

文章编号:1002-2694(2012)01-0091-04

吡喹酮透皮给药治疗日本血吸虫病的效果观察

李小红^{1,2},张大治¹,杨艺²,徐玉梅²,刘毅²,石耀军²,朱传刚²

摘要:目的 本文旨在探究吡喹酮(Praziquantel, PZQ)透皮剂不同透皮剂量和次数的治疗效果,以及吡喹酮透皮剂对发育成熟前后日本血吸虫的治疗效果,为日本血吸虫病提供更加便利的治疗途径。**方法** 试验中每组昆明小鼠均感染日本血吸虫尾蚴 40 ± 2 条,感染后21d、28d和35d采用不同透皮剂量的吡喹酮透皮剂和不同透皮次数治疗昆明小鼠,各试验组均设对照组,感染后42d解剖冲虫,计算减虫率、减肝卵率、减毛蚴孵化率和减雌率,评价透皮剂的治疗效果。**结果** 感染日本血吸虫35d后吡喹酮透皮剂透皮1次高剂量减虫率为56.92%,其它剂量透皮1次减虫率都在50%以下,低剂量透皮3次减虫率为56.15%;减肝卵率都在70%以下;对21d、28d透皮3次的减虫率都在65%以上,减肝卵率基本接近100%。**结论** PZQ透皮制剂对日本血吸虫有一定的杀灭作用,杀灭效果具有剂量和次数依赖性,少量多次治疗效果较好。

关键词:日本血吸虫;吡喹酮;透皮治疗**中图分类号:**R532.21 **文献标识码:**C

Transdermal delivery of praziquantel for treatment of *Schistosoma japonicum* adult worms

LI Xiao-hong, Zhang Da-zhi, YANG Yi, XU Yu-mei, LIU Yi, SHI Yao-jun, ZHU Chuan-gang

(Life Science College, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

ABSTRACT: This article aims to explore the effectiveness of transdermal agent of PZQ by different dose and treat times, and test praziquantel transdermal agent on *Schistosoma japonicum* around mature, providing more convenient access to treatment of schistosomiasis. All of the experiment groups of Kunming mice were infected with 40 ± 2 *Schistosoma japonicum* cercariae 21d, 28d and 35d. They were treated through abdominal and transdermal patches with different dose and treat times; While all of the experiment groups set control groups, the mice were all dissected 42d after infection. The worm reduction rate, egg reduction rate, miracidia hatching reduction rate and female reduction rate of treatment groups were calculated and the therapeutic effect of transdermal agent was evaluated. Results indicated that 35 d after infection, the worm reduction rate for single high-dose of praziquantel transdermal patch was 56.92%; the worm reduction rates for single dose of other dosages were all less than 50%; the worm reduction rate for three-time low-dose was 56.15%; the egg reduction rates in liver were all less than 70%. 21 d and 28 d after infection, the worm reduction rate for three-time transdermal patch were all more than 65%; the egg reduction rates in liver were all close to 100%. It's concluded that praziquantel transdermal patch has certain effectiveness on killing of *Schistosoma japonica*, whose effect is depend on dosage and frequency. Repeated small dose of drug use would lead to a better treatment effect.

KEY WORDS: *Schistosoma japonicum*; praziquantel; transdermal treatment

血吸虫病流行于热带和亚热带等76个国家和地区,是一种危害严重的人畜共患寄生虫病,呈世界性分布^[1],全球受威胁人口高达6亿人,感染人数达2亿人^[2]。在大规模的彻底灭螺和血吸虫疫苗的临床应用实现之前,抗血吸虫病药物仍是防治血吸虫病的主要手段^[1]。吡喹酮(praziquantel, PZQ)以其

高效低毒的特点作为治疗血吸虫病的首选药物,已在全世界广泛用于人畜血吸虫病的治疗^[3]。

但是给药方式的不同,不仅会影响治疗效果,而且在给药的便利度上也有差别。吡喹酮透皮剂能够穿过腹皮直接进入动物体循环,避免了肝脏胃肠道的首次降解,提高了PZQ的生物利用度,操作方便,副反应小,用药量低,可以大大降低吡喹酮的副作用,在治疗血吸虫病中有广阔的应用前景。因此研究给药方便,生物利用度高的PZQ新剂型和新

通讯作者:朱传刚,Email: zcg@shvri.ac.cn

作者单位:1. 宁夏大学生命科学学院,银川 750021;

2. 中国农业科学院上海兽医研究所,动物寄生虫病重点实验室,上海 200241

的给药途径,对于加强人畜同步化疗,提高血吸虫病的防治,具有重要的实际意义。为此,我们研制了吡喹酮的透皮制剂,采用昆明小鼠进行透皮治疗实验,研究吡喹酮透皮剂对人工感染日本血吸虫小鼠的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 材料 昆明小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,雄性,体重30 g左右;阳性钉螺购于江西省寄生虫病防治研究所;含有效吡喹酮浓度25%的吡喹酮透皮制剂由中国农科院上海兽医研究所血吸虫病实验室研制。

1.2 方法

1.2.1 分组和试验方案 为考察吡喹酮透皮剂不同透皮剂量和次数对日本血吸虫成虫的杀灭效果,设下列试验,每次试验的每组均为10只小鼠,下列分组方案中透皮1次组都是透皮1 h,透皮3次组每次1 h连续3 d。

试验一:考察不同透皮剂量和透皮次数对35 d日本血吸虫的治疗效果,试验组分4组,分别是800 mg/kg透皮1次,480 mg/kg透皮1次,240 mg/kg透皮1次和每次80 mg/kg透皮3次,另设感染对照组:只感染不治疗。所有小鼠人工定量感染血吸虫

尾蚴,感染后35 d进行透皮治疗,治疗后7 d既感染后42 d解剖,检测治疗效果。

试验二:考察吡喹酮透皮剂对日本血吸虫发育成熟前后的治疗效果,取21 d的童虫和28 d的成虫作为试验对象,分感染21 d后的300 mg/kg透皮1次组,每次100 mg/kg透皮3次组;感染28 d后的300 mg/kg透皮1次组和300 mg/kg透皮3次组;共4个试验组,另设仅感染不治疗对照组。所有小鼠在感染后42 d解剖,检测治疗效果。

1.2.2 人工感染血吸虫 将实验鼠固定在木板上,用刀片刮去腹部毛,解剖镜下计数尾蚴,每次试验每只小鼠定量感染40±2条尾蚴,玻片贴腹20 min。

1.2.3 透皮治疗 称量试验鼠的体重,按300 mg/kg剂量进行透皮治疗,试验鼠固定在木板上,剃除腹部毛发,均匀涂抹透皮剂,每次透皮面积为4 cm²,透皮时间为1 h。透皮结束后,擦拭腹部,将实验鼠放回笼中,正常饲养,每隔24 h,观察透皮处皮肤和实验鼠进食等状况。

1.2.4 透皮剂的杀虫效果 成虫检获:分别于感染后第42 d解剖,用心脏灌注法冲出门静脉—肠系膜静脉和肝内虫体计数,按下式计算减虫率:

$$\text{减虫率} = \frac{\text{对照组平均每只鼠检获的成虫数} - \text{治疗组平均每只鼠检获的成虫数}}{\text{对照组平均每只鼠检获的成虫数}} \times 100\%$$

1.2.5 透皮剂的减肝卵率 肝脏虫卵计数:取每只实验鼠整个肝脏,肝脏称重后定容至20 mL,均质仪匀浆,取2 mL肝脏匀浆液加2 mL NaOH(10 mol/L)45 °C消化30~60 min,然后取100 μL光学解剖

镜下计数,每样计数3次,并换算出克肝脏虫卵数(Egg per gram of liver, EPG)。按下式计算减肝卵率:

$$\text{减肝卵率} = \frac{\text{对照组平均每克肝脏包含的毛蚴数} - \text{治疗组平均每克肝脏包含的毛蚴数}}{\text{对照组平均每克肝脏包含的毛蚴数}} \times 100\%$$

1.2.6 抑制虫卵毛蚴孵化率 小鼠解剖后,取1.2.5肝脏匀浆液进行虫卵孵化试验。孵化试验操作如下:称重后定容至20 mL,均质仪匀浆。孵化室和孵化水温度保持在25 °C左右,加入匀浆的4 mL肝脏匀浆液于500 mL长颈平底烧瓶内,加孵化水至瓶颈处加脱脂棉,在棉层上加8 mL去氯水,恒温孵化。用吸管吸取棉层上含有毛蚴的水8 mL,移至离心管内,在孵化瓶内再加8 mL水温为25 °C左右

的去氯水继续孵化,以备第2次采样用。分别在孵化后1 h和3 h做两次取样。取样的含毛蚴的孵化液按5%比例加入福马林固定过夜、6 000 g离心10 min、除去上清,沉淀加碘酌1~2滴着色,用吸管吸取离心管内全部液体于载玻片上,解剖镜下分别计数毛蚴数,并换算出克肝脏孵化毛蚴数,按下式计算减毛蚴孵化率:

$$\text{减毛蚴孵化率} = \frac{\text{对照组平均每克肝脏包含的毛蚴数} - \text{治疗组平均每克肝脏包含的毛蚴数}}{\text{对照组平均每克肝脏包含的毛蚴数}} \times 100\%$$

1.2.7 减雌虫配对率 成虫检获:分别于感染后第42 d解剖,用心脏灌注法冲出门静脉—肠系膜静脉

和肝内虫体计数,按下式计算减雌虫配对率:

$$\text{减配对率} = \frac{\text{对照组平均每只鼠检获的配对虫数} - \text{治疗组平均每只鼠检获的配对虫数}}{\text{对照组平均每只鼠检获的配对虫数}} \times 100\%$$

1.2.8 统计分析 统计各试验组减虫率、减肝卵率、减毛蚴孵化率和减雌虫配对率。数据采用 SPSS 软件进行统计学分析,计算各指标的算术平均数和标准差($\bar{x} \pm s$)。同时,比较试验组之间的差异是否具有统计学意义。

2 结 果

2.1 透皮剂的刺激性观察 试验小鼠经 PZQ 溶液腹部透皮治疗后,精神状态正常,食欲良好,无明显的兴奋或抑制现象,行走正常,在透皮部位外表连续 2 d 观察,无红肿热痛等炎症变化。

2.2 吡喹酮不同剂量和治疗次数对 35d 成虫的治疗效果 吡喹酮透皮剂对感染后 35 d 日本血吸虫有一定的杀灭作用,各治疗组与对照组相比,平均虫荷数、克肝脏虫卵数、平均雌虫数和克肝脏平均孵化毛蚴数差异均具有显著性差异。透皮剂量越高,治疗效果越显著(表 1)。透皮剂量为 800 mg/kg 治疗

1 次和每次 80 mg/kg 治疗 3 次治疗效果最好,减虫率都达到 50%以上,480 mg/kg 和 240 mg/kg 治疗 1 次的治疗组减虫率在 30%~50%之间,也有一定的杀灭血吸虫作用。

透皮剂量为 800 mg/kg 治疗 1 次和每次 80 mg/kg 治疗 3 次减毛蚴孵化率均达到 95%以上,其中 800 mg/kg 透皮剂量减毛蚴孵化率基本接近 99%。透皮剂量为 800 mg/kg 的减肝卵率也最高,基本接近 70%,其它治疗组减肝卵率在 30%~50%之间。

各治疗组的减雌虫配对率都达到 100%,说明透皮剂对解除雌雄虫合抱具有很强的效果。

透皮剂量为 240 mg/kg 治疗 1 次和治疗 3 次相比,减虫率分别为 33.85% 和 56.15%,减毛蚴孵化率分别为 57.19% 和 96.75%,平均虫荷数和克肝脏孵化毛蚴数差异极显著,具有统计学意义。说明透皮次数越多,治疗效果越显著。

表 1 吡喹酮透皮剂不同剂量和治疗次数的药效

Table 1 The effective of transdermal agent of PZQ by different dose and treat times

组别	给药剂量	平均虫荷数 ($\bar{x} \pm s$)	减虫率(%)	肝平均卵荷数	减肝卵率 (%)	平均雌虫数 ($\bar{x} \pm s$)	减雌率 (%)	克肝脏平均孵化毛蚴数 ($\bar{x} \pm s$)	减毛蚴孵化率 (%)
1	800	11.2 ± 4.66**	56.92	4704 ± 2341.9*	69.44	0 ± 0**	100.00	0.6 ± 0.77**	99.07
2	480	14.4 ± 7.635**	44.62	10257 ± 2711.9*	33.37	0 ± 0**	100.00	10.2 ± 5.07**	84.23
3	240	17.2 ± 1.92**	33.85	7727 ± 708.9*	49.81	0 ± 0**	100.00	27.7 ± 22.99*	57.19
4	240 × 3	11.4 ± 2.07** ^a	56.15	9136 ± 3218.1*	40.66	0 ± 0**	100.00	2.1 ± 3.96*** ^a	96.75
对照组		26 ± 4.14	0.00	15394 ± 4076.69	0.00	12.1 ± 2.02	0.00	64.7 ± 28.12	0.00

表中 a 表示 240 mg/kg 透皮 3 次组与 1 次组相比,评价指标差异均有统计学意义, $P < 0.01$, ** 表示治疗组与对照组相比,评价指标差异均有统计学意义, $P < 0.01$, * 表示治疗组与对照组相比,评价指标差异均有统计学意义, $P < 0.05$ 。

2.3 吡喹酮透皮剂对日本血吸虫发育成熟前后的治疗效果 吡喹酮透皮剂对感染后 21 d、28 d 日本血吸虫有一定的杀灭效果,透皮 1 次减虫率在 50%~60%之间,透皮 3 次减虫率都在 65%以上,各治疗组与对照组相比,平均虫荷数差异显著具有统计学意义。说明虽然吡喹酮透皮剂透皮 1 次杀虫效果没有透皮 3 次效果好,但对日本血吸虫也有一定的杀灭作用。

减肝卵率和减孵化毛蚴率各治疗组都在 95%以上,各治疗组与对照组相比,克肝脏卵荷数和克肝脏毛蚴孵化数差异都显著,具有统计学意义。

21 d、28 d 透皮 3 次减雌率都在 85%以上,其中 28 d 透皮 3 次减雌率都达到 95%,21 d、28 d 透皮 1

次减雌率分别为 69.66% 和 50.99%。从减虫率和减雌率可以看出,同剂量吡喹酮透皮次数越多,透皮效果越好与 2.2 中结果一致,结果如表 2。

3 讨 论

口服给药或注射给药的吸收、代谢过程多属一级动力学过程,时间血浓曲线上表现出“峰谷”现象,这对于药物充分发挥疗效产生一定的影响。虽然吡喹酮治疗血吸虫病的效果很好,但它在肝脏中有明显的首过效应,半衰期仅约 1.5 h,而且口服时有不悦臭味,口服后有胃肠道副作用。对于动物治疗,服用的量是根据动物的体重来确定的,如牛等大家畜,一次需服用大剂量的吡喹酮,这给实际操作

表 2 吡喹酮透皮剂对日本血吸虫发育成熟前后的治疗效果
Table 2 The therapeutic effect of PZQ transdermal agent around the mature

组 别	平均虫荷数	减虫率 (%)	克肝脏 平均卵荷数	减肝卵率 (%)	平均雌虫数 ($\bar{x} \pm s$)	减雌率 (%)	克肝脏平均 孵化毛蚴数 ($\bar{x} \pm s$)	减孵化 毛蚴率 (%)
21 d 透皮 1 次	7.4 ± 9.91*	63.18	0 ± 0**	100	2.6 ± 3.97	69.66	0.54 ± 0.74*	99.17
21 d 透皮 3 次	3.9 ± 7.70*	80.5	0 ± 0**	100	1.2 ± 1.30**	85.99	0 ± 0**	100
28 d 透皮 1 次	10.6 ± 6.66*	47.26	149.39 ± 365.94**	98.42	4.2 ± 2.95	50.99	0 ± 0**	100
28 d 透皮 3 次	7.01 ± 3.05*	65.1	171.12 ± 382.64**	98.19	0.4 ± 0.89**	95.33	3.07 ± 2.56*	95.3
对照组	20.1 ± 11.80	—	9449.76 ± 5282.62	—	8.57 ± 5.35	—	64.97 ± 46.31	—

表中, * 代表治疗组与对照组相比, 评价指标差异均有统计学意义 $P < 0.05$; ** 代表治疗组与对照组相比, 评价指标差异均有统计学意义, $P < 0.01$

带来了很大的不便。近几年来人们发现吡喹酮透皮给药不但能起局部作用, 而且还可以透过皮肤进入血液循环发挥全身作用, 并且皮肤角质层还具有贮存作用, 使血液浓度曲线平缓^[1]。因此研究给药方便的吡喹酮透皮剂具有重要的实际意义。本文采用了吡喹酮透皮制剂经皮肤渗透给药的方式, 设不同透皮剂量和透皮次数, 从减虫率、减肝卵率和减毛蚴孵化率各指标考察各试验组的治疗效果。

试验表明: 透皮剂量越高, 次数越多, 减虫率越高, 这可能因为高剂量吡喹酮透皮剂经皮肤渗透给药, 宿主的血药浓度高, 因此可以杀灭部分血吸虫。而透皮次数越多吡喹酮透皮剂经皮肤渗透给药, 有效血药浓度维持的时间长, 增加了对血吸虫的杀灭作用。

35 d 各治疗组的减肝卵率都在 70% 以下, 21 d、28 d 减肝卵率都达到 98% 以上, 可能是由于日本血吸虫在体内发育 28 d 后合抱产卵, 在日本血吸虫发育 35 d 后进行透皮治疗, 宿主体内已沉积有大量虫卵, 故此减卵率不是特别高。在 21 d 合抱期和 28 d 产卵期减卵率基本达到 100%, 可能是因为吡喹酮先影响血吸虫的合抱配对, 从而抑制虫卵的产生。

减毛蚴孵化率也是与透皮剂量和次数成正比, 说明吡喹酮对虫卵也有部分的影响, 可能是因为血吸虫经过吡喹酮作用之后, 影响了他们在血管内的移行, 从而使得血吸虫不能够完全合抱配对, 因此减少了排卵数量, 孵出的毛蚴数也就相应减少。

试验中对 35 d 日本血吸虫试验中, 各治疗组的减雌率均为 100%, 解剖冲虫时未发现合抱的血吸虫以及雌虫, 且所有虫体均为雄虫。造成这种现象的原因可能是由于虫体本身对吡喹酮较敏感, 从而促使虫体挛缩解除合抱状态。有实验证实, 吡喹酮对日本血吸虫兴奋的最低浓度为 0.005 μg/mL, 浓度达到 1 μg/mL 时, 虫体即有短暂的活动兴奋或立

即强烈挛缩, 且虫体可缩短 1/3~1/2^[5-6]。同时透皮给药消除了肝脏的首过效应, 减慢了药物的吸收, 达到缓释的效果, 因此解除合抱状态具有实际意义。

综上所述, 经透皮给药也能达到较好的治疗效果, 杀灭效果具有剂量和次数依赖性, 少量多次治疗效果较好。透皮治疗的减虫率虽然不及口服治疗效果好^[7], 未能杀灭宿主体内的所有血吸虫, 但是减雌率却非常高, 由于血吸虫病主要是虫卵造成的病理学反应, 虫体在未配对的状态下, 减少了虫卵的产生以及肝脏虫卵肉芽肿的形成, 起到了一定的保护作用。同时, 虫体经过吡喹酮作用之后, 皮层会受到一定的损害而显露体表抗原, 宿主体内会产生特异性抗体, 从而使得药物和宿主的体液免疫在抗血吸虫过程中起协调作用, 对再感染有一定的抵抗效果^[8]。有关更加具体的内容还值得进一步的探索。

参 考 文 献:

- [1] 李龙. 抗血吸虫病药物的研究现状[J]. 兽医导刊, 2009, (8): 5-8.
- [2] 陈龙达, 王水清, 柳建发. 日本血吸虫病防治研究进展[J]. 地方病通报, 2009, 4(5): 90-91.
- [3] 余瑜, 严燊, 胡湘南, 等. L PZQL 和 PZQL 的研制及其抗小鼠的日本血吸虫病活性的比较[J]. 华西药学杂志, 1999, 14 (5): 215-318.
- [4] 王在华, 彭惠玲, 鲁敏, 等. 吡喹酮透皮给药治疗动物血吸虫病的实验研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1994, 6(6): 331-334.
- [5] 肖树华, 邵葆若, 徐月琴. 吡喹酮对体外培养的日本血吸虫的作用[J]. 药学学报, 1980, 15(2): 105-107.
- [6] 王敏霓, 刘约翰, 芦仙娥, 等. 国产吡喹酮杀日本血吸虫体外试验[J]. 重庆医科大学报, 1980(1): 64-67.
- [7] 尤纪青, 梅静艳, 肖树华. 吡喹酮与蒿甲醚合并治疗小鼠血吸虫病的效果观察[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1994, 7(1): 50-51.
- [8] Brindley PJ, Sher A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against Schistosoma mansoni is dependent on host antibody response[J]. J Immunol, 1987, 139: 215-220.