

# 他克林体外抗细粒棘球蚴作用研究

刘丛珊, 尹建海, 姚嘉青, 薛 剑, 陶 奕, 张皓冰

**摘要:**目的 研究乙酰胆碱酯酶抑制剂他克林体外抗细粒棘球蚴的作用效果。方法 体外分离和培养细粒棘球蚴原头节和生发层细胞,经浓度为4、8、10、20和40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的他克林作用3 d后经0.1%亚甲基蓝染色观察,记录死活原头节的数目以计算原头节死亡率,另外用CCK-8试剂盒检测药物对生发层细胞活性的影响并计算细胞活性抑制率。同时用透射电镜和扫描电镜分别观察药物对细粒棘球蚴原头节和生发层细胞超微结构造成的影响。结果 经20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的他克林体外作用3 d后,原头节的死亡率高达100%,其中死亡原头节的体壁出现轻微肿胀且伴随着外部轮廓的消失,同时超微结构亦发生明显改变,原头节体壁组织中出现了大量的空泡和脂肪滴。当他克林浓度为40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,可造成生发层细胞全部死亡。细粒棘球蚴生发层细胞粘附于培养基质的基质消失、细胞发生聚集且数目减少。扫描电镜可观察到他克林作用3 d后的细胞出现塌陷或者萎缩。结论 他克林可直接影响体外培养的细粒棘球蚴原头节和生发层细胞的活性,是潜在的包虫病治疗药物。

**关键词:**他克林;细粒棘球蚴;原头节;生发层细胞

**中图分类号:**R383.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2694(2018)07-0608-05

## Efficacy of tacrine on *Echinococcus granulosus in vitro*

LIU Cong-shan, YIN Jian-hai, YAO Jia-qing, XUE Jian, TAO Yi, ZHANG Hao-bing

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention;  
Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health; National Center for  
International Research on Tropical Diseases, Ministry of Science and Technology;  
WHO Collaborating Centre for Tropical Diseases, Shanghai 200025, China)

**Abstract:** In order to study the effects of tacrine as the acetylcholinesterase inhibitor on *Echinococcus granulosus in vitro*, the *E. granulosus* protoscoleces and germinal cells were isolated and cultured *in vitro*. The protoscoleces and germinal cells were incubated with tacrine at the concentration of 4, 8, 10, 20 and 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  over 3 days respectively. Then the protoscoleces were stained with 0.1% methylene blue and the percentage of vital protoscoleces were calculated from the number of live and dead parasites. And the inhibition rate of germinal cells were determined based on CCK-8 kit. At the same time, the ultrastructure changes of parasites were observed through transmission and scanning electron microscopy. The results showed that after 3 days of exposure to 20 and 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of tacrine, the percentage of dead protoscoleces was 100%, and the slight swelling of the soma region and the outline of tegument dispersed became evident in the dead protoscoleces. In addition, the ultrastructural alterations was obvious including the presence of numerous vacuoles and lipid droplets in the tegument. The activity inhibition rate on germinal cells was about 100% at 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tacrine, the disappearance of adhesion matrix, the aggregation and detaching from the culture plate of *E. granulosus* germinal cells had be seen as well, SEM revealed the contraction and collapse of germinal cells after tacrine treatment. It suggests that tacrine could directly effect the activity of *E. granulosus* protoscoleces and germinal cells *in vitro*. Therefore, tacrine is a potential drug in the treatment of hydatid diseases.

**Keywords:** tacrine; *Echinococcus granulosus*; protoscoleces; germinal cells

国家自然科学基金(No. 81401691),上海市卫计委面上项目(No. 201540170)和所防治技术储备科研基金(No.CB-16004)联合资助

通讯作者:张皓冰,Email:zhang\_haobing@163.com

**作者单位:**中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所,卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室,科技部国家级热带病国际联合研究中心,世界卫生组织热带病合作中心,上海200025

Supported by Grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81401691), the General Program of Shanghai Municipal Health Bureau (No. 201540170) and National Institute of Parasitic Diseases (CB-16004)

Corresponding author: Zhang Hao-bing, Email: zhang\_haob-

ing@163.com

包虫病又称棘球蚴病(Echinococcosis),是由棘球绦虫中绦期幼虫感染所致的重要人兽共患疾病。目前,细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*)和多房棘球绦虫(*E. multilocularis*)是两种最为重要的致病病原,呈世界性分布<sup>[1-2]</sup>。我国首次包虫病全国流行病学调查结果显示,我国包虫病流行范围广,患病数量和疾病负担均居全球首位<sup>[3]</sup>。人们通过误食虫卵污染的水源和食品等感染,棘球蚴囊可产生占位性病变,其中多房棘球蚴可直接浸润肝组织,使患者肝功能严重受损,随着病程的发展,棘球蚴病严重危害患者生命健康,甚至导致死亡<sup>[1]</sup>。目前,该病的临床化疗药物较为局限,仅有甲苯达唑(mebendazole)和阿苯达唑两种,且治愈率均不高<sup>[4]</sup>,因此寻找新的治疗药物或者治疗方案是目前亟待解决的科学问题。

近年来,一些广谱抗寄生虫药物和抗癌药物被报道具有潜在的抗棘球蚴作用,可观察到其体内外对细粒棘球蚴和多房棘球蚴的作用效果<sup>[5-6]</sup>。本课题组前期亦对一些临床药物的抗棘球蚴效果进行了评价,从中发现了多个潜在的治疗包虫病药物。本研究对临床治疗阿尔兹海默病药物—他克林(Tacrine)在体外对细粒棘球蚴作用进行了观察。

## 1 材料与方法

**1.1 虫体和实验动物** 昆明小鼠体重(20±2)g 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。细粒棘球蚴原头节来源于青海自然感染的绵羊细粒棘球蚴囊,从囊液中取出的原头节用生理盐水清洗5~8次后弃去囊液及残留的囊壁组织。用0.1%的亚甲基蓝溶液对原头节进行染色,并在倒置显微镜下观察其活性,其中死亡的原头节被染成深色,原头节活性大于95%的用于后续的研究。用含有500 U 双抗的生理盐水调整细粒棘球蚴原头节密度为4 000个/mL,向昆明小鼠腹腔注射0.5 mL 原头节悬液,模型建立8个月以上可用于生发层细胞的分离。

**1.2 主要试剂** 他克林和甲苯达唑均购自于美国Sigma公司,RPMI 1640培养基和其他细胞培养相关试剂为美国Gibco公司产品,二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)购自上海林峰化学试剂有限公司,亚甲基蓝(methylene blue)购自上海三爱思试剂有限公司,CCK-8试剂盒购自于日本Dojondo公司。

### 1.3 细粒棘球蚴原头节和生发层细胞体外培养

将细粒棘球蚴原头节加入完全培养基(PRMI 1640培养基中包含10%胎牛血清、10%囊液、2 mmol/L 谷氨酸、1 mmol/L 丙酮酸钠、100 U/mL 青霉素以及100 μg/mL 链霉素)中,在5% CO<sub>2</sub>,37 °C条件下培养,每4~5天换液1次。按照每200 μL 培养基包含50~200个原头节加入96孔培养板中培养过夜后用于药效观察实验。解剖细粒棘球蚴感染的昆明小鼠,取出其腹腔内的囊,用生理盐水清洗3~5次后经37 °C的2.5%胰酶消化10~30 min后以500 ×g离心5 min后弃上清并加入完全培养基调整生发层细胞密度至5 × 10<sup>4</sup>个/mL,置于5% CO<sub>2</sub>,37 °C培养箱中孵育,每2~3 d换液1次。将培养后的生发层细胞悬液按照1 × 10<sup>4</sup>个/200 μL加入96孔培养板,培养过夜贴壁后可用于药效观察实验。

**1.4 细粒棘球蚴原头节和生发层细胞体外给药方案** 用DMSO配制的浓度为4、8、10、20和40 μg/mL的他克林分别同细粒棘球蚴原头节和生发层细胞在5% CO<sub>2</sub>,37 °C条件下进行孵育,同时以0.5% DMSO作为空白对照。孵育3 d后的原头节用0.1%的亚甲基蓝溶液染色并在倒置显微镜下计数,分别记录死亡原头节数和原头节总数,计算原头节死亡率。原头节死亡率(%)=(死亡原头节数目/原头节数目总和) × 100%。生发层细胞的活性用CCK-8试剂盒测定,计算细胞活性抑制率。细胞抑制率(%)=[(对照细胞活性-药物作用后细胞活性)/对照组细胞活性] × 100%。

**1.5 透射和扫描电子显微镜观察** 将40 μg/mL他克林作用后的原头节和生发层细胞置于2.5%的戊二醛4 °C固定过夜。透射电镜实验步骤:用PBS清洗3次,用2%的锇酸4度固定2 h,再用PBS清洗3次(每次15 min),分别用50%、70%、80%和90%乙醇梯度脱水各15 min,再用100%乙醇脱水3次(每次20 min),丙酮置换2次(每次15 min)后用丙酮:包埋剂(体积比)=2:1的浸渍液浸渍4 h,再用丙酮:包埋剂(体积比)=1:2的浸渍液浸渍4 h,用纯包埋剂浸渍2次(每次12 h)。将样品放入盛有纯包埋剂的包埋板中置于65 °C条件下聚合48 h以上,修理包埋头后制备厚度为70 nm的包埋切片,用乙酸双氧铀染色10 min,用柠檬酸铅染色10 min后上机检测。扫描电镜实验步骤:用PBS清洗3次(每次10 min),分别用30%、50%、70%、80%和90%乙醇梯度脱水各15 min,再用100%乙醇脱水3

次(每次 15 min),叔丁醇置换 3 次(每次 30 min)后,用真空冷冻干燥机干燥样品过夜。将样品用导电胶带粘到样品台上,用离子溅射仪镀 10 nm 金膜后上机检测。

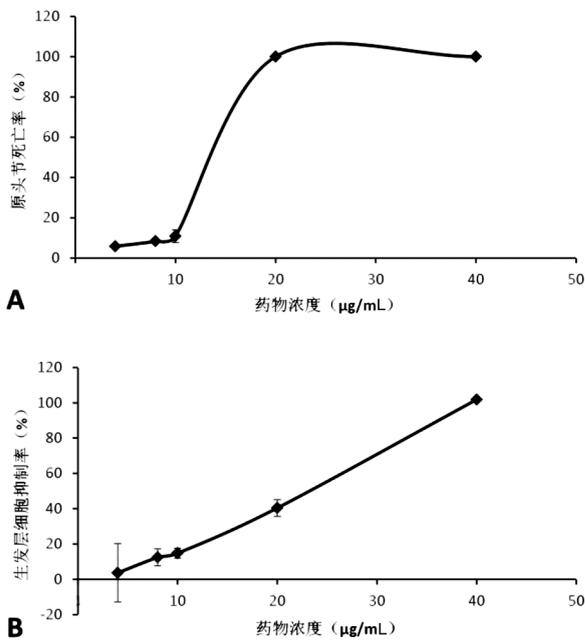
## 2 结果

### 2.1 他克林对细粒棘球蚴原头节的体外作用效果

在倒置显微镜下观察 0.1% 亚甲基蓝染色后的原头节以判断其活性,其中对照组中的原头节经 DMSO 作用 3 d 后活性仍然较高( $94.28 \pm 2.31\%$ ),其形态未见明显的改变(图 1A, 2A)。不同浓度他克林对细粒棘球蚴原头节活性的影响可见图 1A,经 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的他克林作用 3 d 后,原头节的死亡率高达 100%,其中死亡原头节的体壁出现轻微肿胀伴随着外部轮廓的消失(图 2B)。但当药

物作用浓度降低至 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下时,未发现对原头节活性的影响。

**2.2 他克林对细粒棘球蚴生发层细胞的体外作用效果** 他克林对细粒棘球蚴生发层细胞活性的影响呈现剂量相关性(图 1B),当其浓度为 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,对细胞活性的抑制率可达 100%。而当他克林浓度降低至 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,细胞活性抑制率减少到 ( $40.42 \pm 4.67\%$ )。随着药物剂量的进一步降低,由他克林造成的生发层细胞活性抑制率低于 20%。经 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的他克林作用后 3 d 后,细粒棘球蚴生发层细胞粘附于培养介质的基质消失,同时伴随着非正常的细胞聚集以及细胞数目的减少(图 2D)。而在正常状态下,生发层细胞经过夜培养后贴壁生长,均匀平铺于培养板(图 2C)。

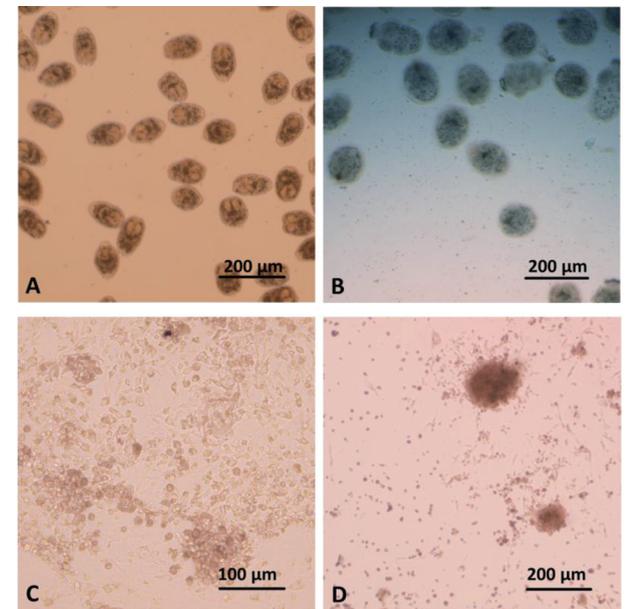


注:A: 他克林对原头节剂量反应关系曲线;B: 他克林对生发层细胞剂量反应关系曲线。

图 1 他克林对体外培养的细粒棘球蚴原头节和生发层细胞活性的影响

Fig.1 Activity of *E. granulosus* metacystodes and germinal cells treated with tacrine *in vitro*

**2.3 透射和扫描电子显微镜观察结果** 透射电镜结果表明,DMSO 对照组的原头节形态正常,其体壁结构完整,包括远端胞浆、肌肉束以及糖原储存细胞等有序排列(图 3A)。而经 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的他克林作用 3 d 后,原头节的超微结构发生了明显的改变,主要体现在其体壁结构被破坏,出现了大量的空泡

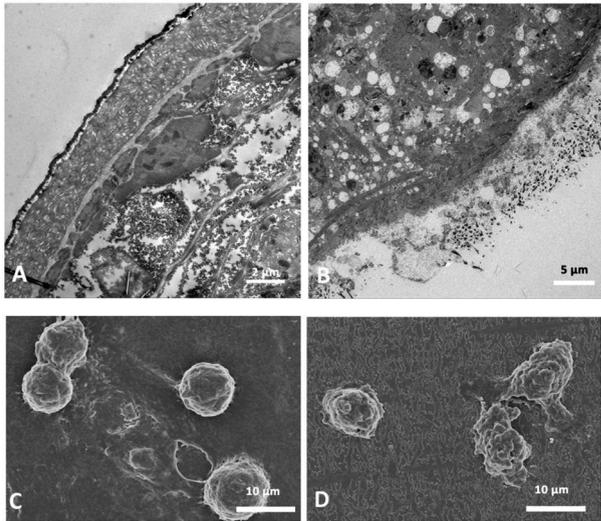


注:A: DMSO 对照组正常原头节;B: 他克林作用 3 d 原头节;C: DMSO 对照组正常生发层细胞;D: 他克林作用 3 d 生发层细胞。

图 2 体外培养的细粒棘球蚴原头节和生发层细胞经 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的他克林作用后的形态变化

Fig.2 Morphological changes of *E. granulosus* metacystodes and germinal cells caused by 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tacrine *in vitro*

和脂肪滴(图 3B)。在扫描电镜下观察到 DMSO 对照组正常的生发层细胞为圆形,其形态均匀饱满,通过粘附基质附着于培养板(图 3C)。当他克林作用 3 d 后,细胞形态发生了明显变化,主要表现在细胞出现塌陷或者萎缩,细胞粘附基质消失(图 3D)。



注:A: DMSO 对照组正常原头节; B: 他克林作用 3 d 原头节; C: DMSO 对照组正常生发层细胞; D: 他克林作用 3 d 生发层细胞。

图 3 他克林 (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 体外作用导致细粒棘球蚴原头节和生发层细胞的超微结构变化

Fig.3 Ultrastructural changes of *Echinococcus granulosus* metacystodes and germinal cells caused by 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tacrine *in vitro*

### 3 讨论

他克林作为乙酰胆碱酯酶抑制剂,于 1994 年由美国食品药品监督管理局批准上市,用于治疗轻到中度阿尔兹海默病<sup>[7]</sup>。本研究报道了他克林对棘球蚴的作用效果,实验结果表明他克林对体外培养细粒棘球蚴生发层细胞和原头节的活性均有直接影响,尤其是 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的药物浓度可造成大部分寄生虫的死亡。药物作用可引起原头节超微结构的改变,在死亡的原头节中可见大量的空泡和脂肪滴,该变化在其他药物的作用中亦有报道<sup>[8-13]</sup>。根据此次实验结果,发现细粒棘球蚴原头节对于他克林相较于生发层细胞更为敏感,提示其主要通过影响原头节的活性发挥抗包虫作用效果,因此其不仅有作为抗包虫药物的潜能,亦可作为原头节杀灭剂使用。

目前,治疗包虫病的药物仅有甲苯达唑和阿苯达唑两种,而上述药物因为口服吸收较差,限制其药效的进一步发挥。他克林作为临床治疗药物,其系统的药代动力学研究结果表明,其亲脂性的特点使得口服他克林可被机体快速以及充分吸收<sup>[14-15]</sup>,可在肾脏、肝脏、膀胱等组织中检测到较高的药物浓度<sup>[16]</sup>,这些部位都是棘球蚴囊可能的寄生位点,提示其在经口服给药后可在棘球蚴治疗靶位点达到有效药物浓度,从而实现治疗效果。根据本研究结果,

他克林的对细粒棘球蚴原头节的体外作用效果较好,但是需要较高药物浓度才能对生发层细胞的活性有较强的抑制效果,因此在后续研究中应该重点关注他克林在治疗包虫病的给药方案的优化,尤其联合用药的可能性。据报道,在他克林治疗阿尔兹海默病的临床治疗中,患者可出现转氨酶的升高,但停药后可恢复正常。鉴于包虫病药物治疗的特点,通常需要长期给药,因而他克林作为抗包虫治疗药物的后续研究仍需考虑药物毒性对治疗带来的影响。

他克林除了治疗阿兹海默病,还对慢性脑缺血起到一定的保护作用<sup>[17]</sup>。其主要的作用机制为该药物可通过抑制突触间隙内乙酰胆碱的降解,从而活化及保护毒蕈碱和烟碱受体,以此改善患者的胆碱能系统功能,提高其认知能力<sup>[18]</sup>。另外,他克林可抑制 K 离子和 Ca 离子通道等一些电压门控离子<sup>[19]</sup>。上述的乙酰胆碱酯酶以及离子通道等是否可作为他克林抗棘球蚴的药物作用靶点还需进一步的研究加以证明。

综上所述,本研究报道了他克林对细粒棘球蚴的作用效果,探索其作为治疗包虫病药物新药的应用前景。经实验验证,他克林作用于体外培养的细粒棘球蚴原头节和生发层细胞,均表现出显著的杀灭和抑制效果,提示其是潜在的包虫病治疗药物。

### 参考文献:

- [1] Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review[J]. Int J Infect Dis, 2009, 13(2): 125-133. DOI: 10.1016/j.ijid.2008.03.037
- [2] 杨婧, 李江, 彭心宇, 等. 肝细粒棘球蚴病 4 种手术方式的成本-效果评价[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33 (6): 559-563. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2017.06.017
- [3] 王国强. 全国包虫病流行情况调查报告[M]. 上海: 上海科学技术出版社; 2016.
- [4] Eckert J, Pawlowski Z, Dar FK, et al. Medical aspects of echinococcosis[J]. Parasitol Today, 1995, 11(8): 273-276. DOI: 10.1016/0169-4758(95)80036-0
- [5] Stadelmann B, Kuster T, Scholl S, et al. *In vitro* efficacy of dicationic compounds and mefloquine enantiomers against *Echinococcus multilocularis* metacystodes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(10): 4866-4872. DOI: 10.1128/AAC.00478-11
- [6] Urrea-Paris MA, Moreno MJ, Casado N, et al. *In vitro* effect of praziquantel and albendazole combination therapy on the larval stage of *Echinococcus granulosus* [J]. Parasitol Res, 2000, 86(12): 957-964. DOI: 10.1007/PL00008526
- [7] Roberson MR, Harrell LE. Cholinergic activity and amyloid precursor protein metabolism[J]. Brain Res Brain Res Rev, 1997, 25(1): 50-69. DOI: 10.1016/S0165-0173(97)00016-7

- [8] Perez-Serrano J, Casado N, Guillermo, et al. The effects of albendazole and albendazole sulphoxide combination-therapy on *Echinococcus granulosus* *in vitro* [J]. *Int J Parasitol*, 1994, 24 (2): 219-224. DOI: 10.1016/0020-7519(94)90029-9
- [9] Elissondo M, Ceballos L, Dopchiz M, et al. *In vitro* and *in vivo* effects of flubendazole on *Echinococcus granulosus* metacestodes [J]. *Parasitol Res*, 2007, 100(5): 1003-1009. DOI: 10.1007/s00436-006-0381-y
- [10] Walker M, Rossignol JF, Torgerson P, et al. *In vitro* effects of nitazoxanide on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2004, 54(3): 609-616. DOI: 10.1093/jac/dkh386
- [11] Colebrook AL, Jenkins DD, Lightowlers MW. Anti-parasitic effect of cyclosporin A on *Echinococcus granulosus* and characterization of the associated cyclophilin protein [J]. *Parasitology*, 2002, 125(Pt 5): 485-493. DOI: 10.1017/S0031182002002330
- [12] Wang B, Jiang Y, Wang Z, et al. Arsenic trioxide negatively affects *Echinococcus granulosus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59 (11): 6946-6951. DOI: 10.1128/AAC.04340-14
- [13] 刘丛珊, 张皓冰, 薛剑, 等. 氨基醇唑啉化合物 BTB3 体外抗微粒棘球蚴的效果评价 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2016, 34 (3): 245-248.
- [14] Hartvig P, Askmark H, Aquilonius SM, et al. Clinical pharmacokinetics of intravenous and oral 9-amino-1, 2, 3, 4-tetrahydroacridine, tacrine [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1990, 38 (3): 259-263. DOI: 10.1007/BF00315027
- [15] Forsyth DR, Wilcock GK, Morgan RA, et al. Pharmacokinetics of tacrine hydrochloride in Alzheimer's disease [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1989, 46(6): 634-641. DOI: 10.1038/clpt.1989.199
- [16] McNally WP, Pool WF, Sinz MW, et al. Distribution of tacrine and metabolites in rat brain and plasma after single- and multiple-dose regimens. Evidence for accumulation of tacrine in brain tissue [J]. *Drug Metab Dispos*, 1996, 24(6): 628-633.
- [17] 舒细记, 柳威, 张磊, 等. 双(7)-他克林对慢性脑缺血老龄大鼠海马神经损伤及认知障碍的改善作用 [J]. *中国医院药学杂志*, 2011, 31(21): 1755-1758.
- [18] Weinstein HC, Teunisse S, van Gool WA, et al. Tacrine in the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Ned Tijdschr Geneeskd*, 1991, 135(35): 1575-1577.
- [19] Dolezal V, Lisa V, Tucek S. Effect of tacrine on intracellular calcium in cholinergic SN56 neuronal cells [J]. *Brain Res*, 1997, 769 (2): 219-224. DOI: 10.1016/S0006-8993 (97) 00711-7

收稿日期: 2018-01-02 编辑: 王晓欢

(上接第 602 页)

- [26] Jyoti A, Singh AK, Dubey M, et al. Interaction of inducible nitric oxide synthase with rac2 regulates reactive oxygen and nitrogen species generation in the human neutrophil phagosomes: implication in microbial killing [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20 (3): 417-431.
- [27] Niwa Y, Akamatsu H. Kojic acid scavenges free radicals while potentiating leukocyte functions including free radical generation [J]. *Inflammation*, 1991, 15(4): 303-315.
- [28] Boyce KJ, McLauchlan A, Schreider L, et al. Intracellular growth is dependent on tyrosine catabolism in the dimorphic fungal pathogen *Penicillium marneffe* [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11 (3): e1004790.
- [29] Sharma KV, Davids LM. Depigmentation in melanomas increases the efficacy of hypericin-mediated photodynamic-induced cell death [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2012, 9 (2): 156-163.

收稿日期: 2017-09-13 编辑: 王晓欢