

文章编号: 1000-7423(2017)-03-0235-04

【论 著】

氯硝柳胺原位固化长效注射剂对感染日本血吸虫小鼠和水牛的预防效果

姜斌¹, 张皓冰¹, 薛剑¹, 陶奕¹, 贾铁武¹, 殷梦², 霍乐乐¹, 刘妮¹, 周晓农^{1*}

【摘要】 目的 观察氯硝柳胺原位固化长效注射剂对感染日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 的小鼠和水牛的疗效。方法 50 只昆明小鼠随机均分为 2 组, 给药组小鼠皮下注射低浓度氯硝柳胺原位固化长效注射剂 (71 mg/ml) 450 mg/kg 1 次, 对照组小鼠不作任何处理。给药后第 1、15、43、57 和 71 天, 各组分分别取 5 只小鼠采用腹部贴片法感染日本血吸虫尾蚴 (80 ± 4) 条/鼠。35 d 后, 处死小鼠, 检获成虫, 计算减虫率。10 头水牛分成 2 组, 给药组 4 头、对照组 6 头。给药组水牛皮下注射高浓度氯硝柳胺原位固化长效注射剂 (222 mg/ml) 30 mg/kg 1 次, 对照组水牛不作任何处理。于给药后第 1 和 3 个月粪检, 计算粪检阳性率, 并观察水牛的不良反应。采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析, 组间比较采用 *t* 检验。结果 给药后第 1、15、43、57 和 71 天感染日本血吸虫尾蚴, 35 d 后给药组小鼠的虫荷分别为 (3.6 ± 1.4) 条、(17.5 ± 8.6) 条、(10.0 ± 6.8) 条、0 条、(11.3 ± 8.4) 条, 均少于对照组小鼠的虫荷 ($P < 0.05$), 且减虫率均超过 50.0%。第 1 和 3 个月对水牛进行粪检, 给药组均为阴性, 对照组分别有 2 和 3 头阳性, 其中 1 头牛给药后 8 h 出现精神沉郁。结论 氯硝柳胺原位固化长效注射剂预防小鼠感染日本血吸虫尾蚴的作用达 2 个月, 预防水牛感染日本血吸虫尾蚴的作用达 3 个月, 具有现场应用预防血吸虫感染的潜力。

【关键词】 氯硝柳胺; 原位固化; 缓释; 日本血吸虫; 感染

中图分类号: R383.24 文献标识码: A

The protective effect of niclosamide *in situ* sustained-release injection against *Schistosoma japonicum* infection in mice and buffaloes

JIANG Bin¹, ZHANG Hao-bing¹, XUE Jian¹, TAO Yi¹, JIA Tie-wu¹, YIN Meng², HUO Le-le¹, LIU Ni¹, ZHOU Xiao-nong^{1*}

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; WHO Collaborating Centre for Tropical Diseases; National Center for International Research on Tropical Diseases, Ministry of Science and Technology; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health, Shanghai 200025, China; 2 Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 200000, China)

【Abstract】 Objective To observe the protective effect of niclosamide *in situ* sustained-release injection against *Schistosoma japonicum* infection in mice and buffaloes. **Methods** Fifty female mice were randomly divided into 2 groups. One group received a subcutaneous low-concentration niclosamide *in situ* sustained-release injection (71 mg/ml) at a single dose of 450 mg/kg (drug group, $n = 25$), while the other group did not receive any treatment (control group, $n = 25$). Each group was further divided into 5 subgroups, in which five mice were infected with 80 ± 4 *Schistosoma japonicum* cercariae on days 1, 15, 43, 57 and 71 after the treatment, and were sacrificed after 35 days to obtain adult worms and calculate the worm reduction rate. In the field trial, 10 buffaloes uninfected with *Schistosoma japonicum* were also divided into the drug group ($n = 4$) and the control group ($n = 6$). Buffaloes in the drug group were each given with a high concentration of niclosamide *in situ* sustained-release injection (222 mg/ml)

基金项目: 上海市公共卫生三年行动计划 (No. GWIV-29, 15GWZK0101); 上海市卫生和计划生育委员会科研课题 (No. 20154Y0051); 国家重点研发计划“重要热带病相关入侵媒介生物及其病原的动态分布与资源库建设 (No. 2016YFC1202000)”

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织热带病合作中心, 科技部国家级热带病国际联合研究中心, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 上海 200025; 2 上海健康医学院, 上海 200000

* 通讯作者, E-mail: ipdzhouxn@sh163.net

at a single dose of 30 mg/kg, while those in the control did not receive any treatment. After 1 and 3 months, fecal examination was performed to detect *Schistosoma japonicum* infection in buffaloes. The positive rate was calculated and adverse reactions were observed. Between-group comparisons were made with *t* test by using the SPSS19.0 software. **Results** In mice infected with cercariae on days 1, 15, 43, 57 and 71 after drug treatment, the mean worm burden at 35 days after the infection was (3.6 ± 1.4) , (17.5 ± 8.6) , (10.0 ± 6.8) , 0, and (11.3 ± 8.4) worms, respectively. All were significantly lower than that of the control ($P < 0.05$), and the worm reduction rates in drug group were all over 50.0%. Two and 3 infected buffaloes showed positive fecal examination at 1 and 3 months, respectively, while none in the drug group showed positive at both time points. One buffalo showed signs of depression at 8 h after treatment. **Conclusion** The niclosamide *in situ* sustained-release injection can protect mice against *Schistosoma japonicum* infection for 2 months and protect buffaloes for 3 months in the field, revealing a promising formulation to prevent schistosome infection.

[Key words] Niclosamide; *In situ*; Sustained-release; *Schistosoma japonicum*; Infection

Supported by Shanghai Public Health Three-year Action Plan (No. GWIV-29, 15GWZK0101), Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning Scientific Research (No. 20154Y0051), the Program for National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFC1202000)

* Corresponding author, E-mail: ipdzhouxn@sh163.net

血吸虫病是一种严重危害人体健康的人兽共患寄生虫病，全球累计约2亿人感染，大部分集中在非洲，7.8亿人存在感染风险，每年约有20万人死于该病^[1-3]。我国流行的是日本血吸虫病，作为重大传染病之一，其防治受到历届政府的高度重视^[4]。有研究表明，感染血吸虫的牛是我国血吸虫病的主要传染源，对草洲的潜在污染指数可高达90%，消除传染源是有效控制血吸虫病的重要途径^[5]。为此，我国实施“以机代牛”的防治措施，但需解决农机服务和农田管理等制度问题^[6]。

目前，用于血吸虫病治疗的一线药物只有吡喹酮，具有很好的治疗效果，但无预防作用^[7]。氯硝柳胺是目前WHO推荐的灭螺药物，对尾蚴具有极强的杀灭作用^[8-13]。根据澳大利亚对氯硝柳胺残留限量的规定，在可食内脏、肉、蛋、奶、大米中不高于0.01 mg/kg^[14]。因此，氯硝柳胺具备体内应用的可能。口服氯硝柳胺抗血吸虫感染效果不理想，但氯硝柳胺涂肤剂有100%的杀灭作用^[15-20]。长效涂肤剂“防蚴灵”，达到100%防护效果可维持4 d，随着时间推移，防护率逐渐降低^[21]。疫区动物长时间接触尾蚴，需经常给药，但给药方式不方便。原位固化长效注射剂因其制备工艺简单、剂量准确、给药方便、缓慢释放药物且无需手术取出残体等优点，一直是缓控释注射剂型的研究热点。其释药机制是将溶解于安全溶剂的高分子材料与药物混匀，皮下注射给药，通过体内环境形成包裹药物的半固体或固体贮库^[22-25]。本研究以氯硝柳胺为主药，采用原位固化技术，直接进行皮下注射，在皮下固化

后，形成储药库，并随着生物聚合物的降解缓慢释放，杀灭侵入体内的尾蚴，达到保护水牛等家畜不受感染的目的。

1 材料与方法

1.1 日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 尾蚴和实验动物来源 日本血吸虫尾蚴由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所提供。50只雌性昆明小鼠(清洁级)，体质量 (16 ± 2) g，购自上海斯莱克实验动物有限公司(动物伦理证号IPD-2013-6)。

水牛为湖南省汉寿县农民家饲养，齿龄2~3岁，采用塑料杯顶管粪孵化法进行血吸虫感染情况筛查(三送九检)，粪检结果均为阴性者用于本次实验。

1.2 主要试剂 低浓度(71 mg/ml)和高浓度(222 mg/ml)氯硝柳胺原位固化长效注射剂由本实验室自制。

1.3 给药方案及尾蚴感染

1.3.1 小鼠抗日本血吸虫感染 50只昆明小鼠随机均分为2组，给药组小鼠皮下注射低浓度氯硝柳胺原位固化长效注射剂(71 mg/ml) 450 mg/kg 1次，对照组小鼠不作任何处理。给药后第1、15、43、57和71天，各组分别取5只小鼠采用腹部贴片法感染日本血吸虫尾蚴 (80 ± 4) 条/鼠。感染35 d后，处死小鼠，检获成虫，计算减虫率。实验期间小鼠可自由饮水取食。

1.3.2 水牛抗日本血吸虫感染 10头水牛随机分成2组，给药组4头、对照组6头。给药组水牛皮下注射高浓度氯硝柳胺原位固化长效注射剂(222

mg/ml) 30 mg/kg 1 次, 对照组水牛不作任何处理。于给药后第1和3个月粪检(一送三检), 计算粪检阳性率, 并观察水牛的不良反应(1 = 反应减少, 2 = 食欲减退, 3 = 精神沉郁, 4 = 瘤胃胀气, 5 = 流涎, 6 = 腹泻, 7 = 体重降低, 8 = 死亡, 9 = 结节)。

1.4 统计学分析 采用SPSS19.0软件进行统计学分析, 小鼠的实验结果数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 水牛的实验结果数据, 组间比较采用 χ^2 检验。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 小鼠抗日本血吸虫尾蚴感染的预防效果 给药后第1、15、43、57和71天, 感染日本血吸虫尾蚴35 d后, 给药组小鼠的虫荷分别为 (3.6 ± 1.4)

条、(17.5 ± 8.6) 条、(10.0 ± 6.8) 条、0 条、(11.3 ± 8.4) 条, 均少于对照组小鼠的 (78.6 ± 18.7) 条、(39.8 ± 6.5) 条、(31.0 ± 2.4) 条、(37.0 ± 8.9) 条、(30.0 ± 0.8) 条 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。减虫率分别为 95.4%, 56.0%, 67.7%, 100% 和 62.2%。雌虫和雄虫减虫率差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表1)。

2.2 水牛抗日本血吸虫尾蚴感染的预防效果 给药后第1和3个月进行粪检, 给药组水牛均为阴性, 对照组水牛分别有 2 和 3 头阳性, 两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。给药组水牛在给药部位均出现结节, 即药物储库, 其中1头水牛给药后 8 h 出现精神沉郁。此外, 无其他不良反应。

表1 低浓度氯硝柳胺原位固化长效注射剂对小鼠抗日本血吸虫尾蚴感染的作用
Table 1 The protective effect of low-concentration niclosamide *in situ* sustained injection on *Schistosoma japonicum* cercarial invasion in mice

给药后天数/d Time/d	对照组虫荷 Worm burden in control group			给药组虫荷 Worm burden in drug group			减虫率/% Worm reduction rate/%		
	雌虫 Female	雄虫 Male	合计 Total	雌虫 Female	雄虫 Male	合计 Total	雌虫 Female	雄虫 Male	合计 Total
1	24.6 ± 6.6	54.0 ± 13.6	78.6 ± 18.7	1.4 ± 0.8 ^b	2.2 ± 0.7 ^b	3.6 ± 1.4 ^b	94.3	95.9	95.4
15	18.0 ± 3.7	21.8 ± 3.1	39.8 ± 6.5	7.3 ± 2.8 ^b	10.3 ± 5.9 ^a	17.5 ± 8.6 ^a	59.7	52.9	56.0
43	15.0 ± 0.8	16.0 ± 1.6	31.0 ± 2.4	4.5 ± 3.0 ^b	5.5 ± 3.8 ^a	10.0 ± 6.8 ^b	70.0	65.6	67.7
57	16.8 ± 3.5	20.3 ± 5.6	37.0 ± 8.9	0 ^b	0 ^b	0 ^b	100	100	100
71	12.0 ± 0.8	18.0 ± 0.8	30.0 ± 0.8	5.3 ± 4.1	6.0 ± 4.3 ^a	11.3 ± 8.4 ^a	55.6	66.7	62.2

注: 与对照组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ 。Note: vs. control group, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ 。

3 讨 论

氯硝柳胺作为WHO推荐的灭螺药物, 对水体污染较大, 但对哺乳动物毒性很低, 用家兔进行皮肤刺激实验和眼刺激试验均无刺激性, 体内应用安全^[26]。大鼠灌胃 30 mg/(kg·d) 对体重、肝肾代谢和骨髓功能均无影响^[27]。成年人1~2次口服 1 000 mg, 未观察到任何中毒症状; 儿童口服 750~1 000 mg, 未观察到任何中毒症状, 且肝肾功能均未受损^[26]。但氯硝柳胺是否具有致突变、致畸性和致癌性尚无定论。自1975年WHO将氯硝柳胺作为绦虫驱虫药以来, 仅有84例出现瘙痒、呕吐等不良反应报道^[28]。原位固化注射剂是近年来缓控型注射剂领域的研究热点, 具有以下优势: ① 克服了普通乳剂、脂质体、微球和胶束制备工艺复杂, 灭菌困难等缺点; ② 避免植入剂开刀植入时的痛苦, 注射剂用药方便; ③ 缓慢释放药物, 降低给药剂量和药物不良反应; ④ 由于生物降解性, 无须手术取出残体。

而且药代动力学研究表明, 小鼠口服氯硝柳胺后, 氯硝柳胺更易在皮肤上分布, 有利于预防尾蚴感染的作用^[29]。本实验制备的氯硝柳胺皮下长效注射剂用于预防日本血吸虫感染, 即发挥了氯硝柳胺预防血吸虫感染的优势, 同时避免了作为灭螺剂使用时对水体的污染。

小鼠皮下注射氯硝柳胺原位固化长效注射剂后第71天, 有2只小鼠皮下已无原位固化注射剂, 而第57天小鼠减虫率为100%, 说明本制剂预防小鼠感染日本血吸虫尾蚴的作用可达2个月。其中, 该制剂对雌虫和雄虫的抗感染作用一致, 差异无统计学意义。

现场实验中, 10头水牛均为同一户主所有, 活动范围一致, 给药组1头水牛怀孕, 未进行感染实验, 最终对照组6头牛, 给药组4头牛。3个月时, 给药组水牛粪检阴性, 而对照组粪检 3 头阳性。因此, 推测氯硝柳胺原位固化注射剂对预防水牛感染日本血吸虫尾蚴的作用可达3个月。

给药组中4头水牛, 其中1头水牛注射过程中挣扎厉害, 因此注射了两处, 合计剂量30 mg/kg, 其余3头牛在6个月时均未感染血吸虫, 只有该头水牛感染了血吸虫, 可能由于两处药物同时释放, 速度加快。所有给药水牛在注射部位均出现结节, 为该制剂形成的药物储库, 随着药物不断释放, 结节不断变小, 最终消失, 说明牛体内可能已无药物。注射两处的水牛在给药后8 h出现精神沉郁, 可能与注射过程中挣扎厉害, 多次注射导致。其余给药牛均无不良反应, 说明该制剂是安全的。

参 考 文 献

- [1] 卫生部血吸虫病专家咨询委员会. 人畜共患血吸虫病研究与防治策略重点 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2006, 18(2): 81-82.
- [2] Chitsulo L, Engels D, Montresor A, *et al.* The global status of schistosomiasis and its control [J]. Acta Trop, 2000, 77(1): 41-51.
- [3] World Health Organization. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: Report of a WHO Expert Committee [M]. Geneva: World Health Organization, 2004: 912.
- [4] 雷正龙, 周晓农. 血吸虫病“十二五”防治规划实施进展及面临的挑战 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2014, 32(2): 81-85.
- [5] 李浩, 刘金明, 宋俊霞, 等. 2012年全国家畜血吸虫病疫情状况[J]. 中国动物传染病学报, 2014, 22(5): 68-71.
- [6] 柳伟, 曹淳力, 陈朝, 等. “以机代牛”等传染源综合治理措施防治血吸虫病的效果评价 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 31(3): 206-211.
- [7] 肖树华. 近年来发展抗血吸虫新药的进展 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 28(3): 218-225.
- [8] Andrews P, Thyssen J, Lorke D. The biology and toxicology of molluscicides, bayluscide[J]. Pharmacol Ther, 1982, 19(2): 245-295.
- [9] 陈淑玉, 林辉环, 陈炳德. 氯硝柳胺(mansonil)对家禽消化道寄生驱虫试验[J]. 畜牧兽医科技, 1980(2): 14-18.
- [10] Tchounwou PB, Engle AJ Jr, Malek EA, *et al.* The effects of bayluscide and malathion on the survival of *Schistosoma mansoni* miracidia [J]. J Environ Sci Health B, 1991, 26(1): 69-82.
- [11] 严晓岚, 吴玲娟, 杨明瑾, 等. 氯硝柳胺控释贴膜防御日本血吸虫尾蚴感染的初步试验 [J]. 浙江省医学科学院学报, 2004, 15(1): 23-25.
- [12] 吴莉莉. 用氯硝柳胺治疗人体长膜壳绦虫和犬复孔绦虫感染 [J]. 国外医学寄生虫病分册, 1980, 8(1): 39-40.
- [13] 氯硝柳胺合并氨基阿的平和卡马拉治疗裂头绦虫病 [J]. 国外医学参考资料(寄生虫病分册), 1974(4): 184-185.
- [14] 国家质量监督检验检疫总局. 澳大利亚修订氯硝柳胺等物质残留限量 [EB/OL]. <http://www.scnj.gov.cn/ArticleShow.asp?ArticleID=7321>.
- [15] 涂珍, 姜斌, 薛剑, 等. 氯硝柳胺在小鼠血浆中的代谢及抗日本血吸虫尾蚴侵袭作用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2015, 33(2): 101-104.
- [16] 洪志勇, 寇用义, 黄铭西. 灭绦灵预防小鼠血吸虫病研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1990, 6(3): 43.
- [17] 徐明, 许永良, 沈林南. 氯硝柳胺等涂肤剂防御血吸虫尾蚴感染实验观察 [J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2004, 2(4): 181-182.
- [18] 蔡德全, 卢永嵩, 左世会, 等. 氯硝柳胺控释剂药物动力学的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1993, 5(3): 145-149.
- [19] 神学慧, 戴建荣, 李叶芳, 等. 氯硝柳胺悬浮剂灭蚴和预防血吸虫感染的研究 [J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(8): 600-602.
- [20] 李洪军, 梁幼生, 戴建荣, 等. 氯硝柳胺悬浮剂杀灭日本血吸虫尾蚴的实验研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2005, 17(6): 424-426.
- [21] 严晓岚, 杨明瑾, 漏磊君, 等. 长效涂肤剂“防蚴灵”预防血吸虫尾蚴感染的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15(2): 135-138.
- [22] 黄胜炎. 抗肿瘤药新制剂[J]. 上海医药, 2005, 26(5): 211-214.
- [23] Singh K, Harikumar SL. Injectable *in-situ* gelling controlled release drug delivery system [J]. Int J Drug Dev Res, 2012, 4(2): 56-69.
- [24] 苏丹, 涂家生. 替硝唑原位固化缓释凝胶的处方研究[J]. 药学与临床研究, 2009, 17(2): 100-104.
- [25] 王丽娟, 朱照静, 吴青, 等. 均匀设计法优选布洛芬缓释原位凝胶剂处方及释药性质的研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(12): 1704-1708.
- [26] 王飞, 戴建荣. 氯硝柳胺的毒理学安全性评价研究概况[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(1): 86-90.
- [27] 徐颖, 戴建荣. 氯硝柳胺的细胞毒性机制研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2015, 27(1): 104-107.
- [28] Ofori-Adjei D, Dadoo ANO, Appiah-Danquah A, *et al.* A review of the safety of niclosamide, pyrantel, triclabendazole and oxfamiquine [J]. Int J Risk Safety Med, 2008, 20(3): 113-122.
- [29] 陶奕, 涂珍, 张皓冰, 等. 氯硝柳胺在小鼠血浆、肌肉及皮肤中的药代动力学研究[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2015, 42(3): 142-145, 155.

(收稿日期: 2017-03-18 编辑: 衣凤芸)