

筛选驱除钩虫药物实验方法的研究

陈玉清 蒋则孝 赵启昌 成宝珠 徐亚雄 颜学红

(中国医学科学院寄生虫病研究所, 上海)

提要 本文研究了巴西日本圆线虫在大、小白鼠(以下简称大鼠、小鼠)体内发育的规律,认为大鼠可作为筛选药物适宜的动物。试验方法为每组4只大鼠,每鼠定量接种该虫感染期幼虫400条。于感染后第11或12日给药,给药后48小时解剖,检视肠中残存虫数,并收集给药后2天内鼠粪成虫。用检获总虫数与粪便中掏出虫数加上肠中残存虫数来比较,计算出有效率或直接疗效。作者初步实验了10种已知有效驱钩药物和广谱驱虫药物,结果除土荆芥油和 stilbazium iodide 外,皆获得良好效果。5种已知非驱钩药物则皆无效。本方法所用粪便掏虫结合解剖检虫法,不需要设对照组,较国外的方法简便经济,而且准确可靠。

钩虫对宿主的特异性较强,因之不能交叉感染小的实验动物,目前研究治疗钩虫病药物多取犬钩虫作体外实验,或进行犬体驱虫。但在筛选大量药物时用犬做实验动物则不够经济简便。国外曾介绍用与钩虫同一亚目(圆线亚目)的巴西日本圆线虫感染白鼠以筛选驱蠕虫药物,多选用大鼠为实验动物^[1-3],也有少数选用小鼠者^[4]。由于小鼠繁殖快,价格便宜,如果能用小鼠进行筛选,则比用大鼠法经济。因此我们进行了些实验观察,目的为找出适于驱除钩虫药物筛选的实验动物。

关于体内筛选驱钩药物的方法,国外有人曾介绍用治疗组与对照组小肠内检获虫数,计算出间接疗效作为考核疗效的标准^[1-4]。如 Steward^[2] 曾指出,由于对照组感染率不稳定,疗效也常有波动,治疗组虫数必须比对照组减少50%才有意义。这就说明用间接疗效作为考核标准并不十分确切。

本文主要是介绍一个筛选驱钩虫药物的简便方法。兹叙述如下。

实验与结果

(一) 实验动物的选择(巴西日本圆线虫在大、小鼠体内发育的比较)

1. 材料与方法

(1) 虫种的来源: 在检查的沟鼠、黄胸鼠、田姬鼠体内找到成虫。将含有虫卵的鼠粪培养所得的感染期幼虫接种小鼠,其中仅黄胸鼠体内的线虫接种获得成功。根据成虫、幼虫和虫卵的形态和测量结果,鉴定该虫种为巴西日本圆线虫 (*Nippostrongylus brasiliensis*)^[5]。

(2) 接种实验动物的方法: 皆用定量计数400条幼虫皮下注射法。有些实验是将已计数的幼虫用0.9%盐水洗2次,于炎热季节并加入青霉素及链霉素,每毫升幼虫悬液内

約各 500 单位。所用大鼠为 90—110 克体重的雄鼠,小鼠为 18—22 克的雄鼠。

(3) 检查感染的方法:

① 解剖鼠检查成虫: 于感染第 11—13 天解剖。将腸取出, 把小腸分为上、中、下三段, 并检查大腸。将腸縱剖, 于鏡下用压片法检虫并計数。

② 粪便掏虫: 收集鼠粪放于管中, 用水浸軟, 投入小玻璃数粒, 加塞振搖使粪便松散, 沉淀后取沉渣于鏡下检虫, 记录性別及数目。

③ 定期用小管盐水漂浮法^[6]检查粪便中虫卵。連續检查三次未查見虫卵者始判为阴性。

2. 结果

(1) 平均发育虫数: 实验 5 次共大鼠 27 只, 每鼠平均虫数为 229.5 ± 11.1 , 变异系数为 24.6%, 成虫发育率为 57.4%。小鼠 5 次实验共 32 只, 平均虫数为 166.4 ± 11.8 , 变异系数为 39.5%, 成虫发育率为 41.6%, 两组結果有显著性差异 ($P < 0.01$)。說明本虫在大鼠体内的平均成虫发育率比在小鼠要高。

(2) 虫体在鼠腸内的分布: 結果見表 1。可以看出, 在白鼠体内 94% 的虫体集中于小腸上段。小腸中段以下只占少数, 大腸中偶或有之, 但为数极少, 仅占 0.09%。而虫在小鼠体内的分布則較分散, 在小腸中、下段及大腸的虫数所占比例远比大鼠为多。

表 1 巴西日本圓綫虫在鼠腸中的分布

鼠 别	鼠 数	小腸上段虫数 %	小腸中段虫数 %	小腸下段虫数 %	大腸虫数 %	总 虫 数
小 鼠	180	12,081(64.74)	4,603(24.67)	1,874(10.04)	104(0.56)	18,662
大 鼠	56	10,607(94.36)	610 (5.43)	14 (0.12)	10(0.09)	11,241

(3) 未成熟的虫体占总虫数的百分比: 在 44 只大鼠体内, 总虫数 8,725 条中有 13 条 (0.15%) 为未成熟的虫体。虫比正常的細小, 呈淡灰紅色, 性別不易分清。而 56 只小鼠总虫数 6,625 条中, 有 632 条为未成熟虫体, 占 9.44%, 即小鼠体内未成熟虫体比大鼠的約多 60 倍。

(4) 成虫在鼠体内自然排出: 用同一批幼虫接种大、小鼠。于感染后第 11 至 31 天, 每天取粪便掏虫。各观察 7 只。結果大鼠在此期間只有 1 只鼠于感染后第 19—22 天大量排出 90 条虫, 另 2 只鼠在感染第 20—23 天各排出 10、4 条虫。其余的 4 只鼠在此期間排虫极少, 仅偶有一条排出。在小鼠的情况就完全不同, 从感染后第 11—23 天有大量虫排出, 自数十条至百余条, 而且缺乏規律性, 有早在第 11—12 天, 也有迟至 20—22 天的。一般排虫連續 3—4 天。

(5) 粪便中虫卵阴性时鼠体内的虫数: 75% 的小鼠在 6 周以内粪便虫卵轉阴。在 46 只粪便虫卵轉阴的小鼠中, 26 只体内无虫, 占总鼠数的 56.5%, 其余 20 只鼠共有 147 条虫(雄 34, 雌 102, 未成熟的 11), 少数是雌雄虫同时存在, 多数仅殘存雌虫。这可能是所产虫卵太少, 粪检时未查出, 或到后期虽有雌虫存在而不产卵。在大鼠粪便内有在 1—2 月内轉阴者, 在 10 只轉阴的大鼠中 4 只体内无虫, 另 6 只共有雄虫 8 条, 雌虫 1 条。殘存虫体多为雄虫。因此粪便中虫卵轉阴并不能确定沒有成虫存在。

(二) 筛选驱除钩虫药物实验

1. 材料和方法

(1) 药物: 使用两类药物, 一类为已知有效的驱钩药物, 即四氯乙烯、四氯化碳、羧萘酸苯酚宁(灭虫宁)、土荆芥油及与灭虫宁同一系列的化合物如钩₅、钩₇、钩₁₂和文献报告的广谱驱虫药物^[7-11], 如 α -甲氧乙基吡啶、苯腈咪唑及 stilbazium iodide 共 10 种。另一类为已知驱钩无效的药物, 即枸橼酸哌嗪、海羣生、氯喹、山道年、阿的平共 5 种。

(2) 给药方法与剂量: 用小鼠初步测定新药毒性, 找出其最大耐受量, 然后依此剂量给药。已知的驱钩有效或无效药物则参考文献或测出 LD₅₀, 一般依 1/2 LD₅₀ 剂量给药。凡不溶于水的药物加入适量(约 1/4 量)的阿拉伯胶制成悬液。根据虫在鼠体内的发育规律, 于鼠感染后第 11 或 12 日以钝针头插入食道或胃中给药, 一次给予。一般每只大鼠喂药液 1 毫升, 小鼠 0.5 毫升。

(3) 考核疗效的方法:

① 粪便掏虫: 见前。

② 解剖找虫: 于治疗后 48 小时解剖。治疗组是剖开肠腔后, 刮下肠粘膜及肠内容物, 置于有水的小皿中, 直接于镜下检虫计数, 判定死活, 遇可疑者用针触之, 凡不动者视作死亡; 并设对照组, 用压片法检查。

(4) 疗效的计算方法:

$$\text{① 有效率} = \frac{\text{大肠虫数} + \text{粪便掏虫数}}{\text{治疗组总虫数(肠内} + \text{粪便中)}} \times 100$$

$$\text{② 直接疗效} = \frac{\text{肠内死亡虫数} + \text{粪便掏虫数}}{\text{治疗组总虫数(肠内} + \text{粪便中)}} \times 100$$

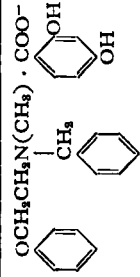
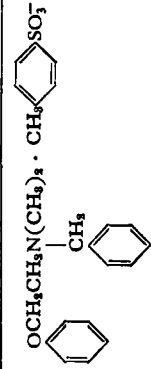
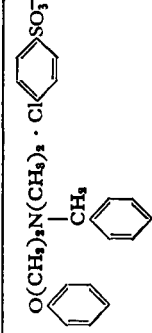
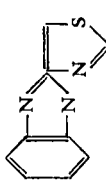
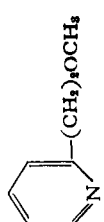
$$\text{③ 间接疗效} = \frac{\text{对照组肠内平均虫数} - \text{治疗组肠内平均虫数}}{\text{对照组肠内平均虫数}} \times 100$$

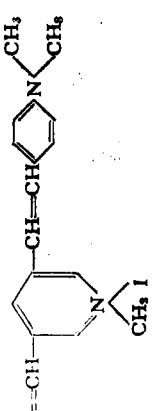
2. 结果 试验结果见表 2。在已知驱钩及广谱药物中可以看出四氯乙烯、四氯化碳、灭虫宁、钩₅、钩₇、钩₁₂、苯腈咪唑对大鼠体内的虫作用极佳。有效率在 97% 以上, 直接疗效在 92% 以上, α -甲氧乙基吡啶的有效率为 55—70%, 而土荆芥油和 stilbazium iodide 效果极差。在小鼠体内钩₅、钩₇、钩₁₂、 α -甲氧乙基吡啶的有效率在 70% 以上, 四氯乙烯的疗效很低, 而四氯化碳和土荆芥油都无效。曾用 Bayer 厂制的驱蛔素 (ascariadol), 有效成分为 0.125 毫升/20 克体重试验, 鼠在 3 小时内死亡, 虫全部活存, 也未看到虫在肠段的移位现象, 故可以认为无效。灭虫宁的剂量是取用于大鼠剂量的 2/3, 而 4 只小鼠全部在 2.5 小时内死亡, 虫在肠段有移位现象。虫在小鼠肠内正常的分布为: 小肠上段 64.7%, 小肠中段 24.7%, 小肠下段 10.0%, 大肠 0.6%, 今各为 34%, 23%, 37%, 6%。5 种已知驱钩无效药物在大、小鼠体内都无效。

治疗组 7 只大鼠给灭虫宁, 经检粪便及肠内虫体得出每鼠平均总虫数为 197.9 ± 15.6 , 对照组 11 只鼠平均总虫数为 236.6 ± 13.1 。两组检获虫数无显著差异 ($P > 0.05$)。说明药物组用掏虫法结合解剖找虫的方法与对照组用压片法检虫者相差不大。换言之, 虫在排出过程中被消化、破坏的可能性极小。

从有效的药物看来, 一般在 24 小时内粪便中掏到虫数约占总掏虫数 80% 以上, 而 48

表 2 已知羧鈎、广譜羧鈎和羧鈎无效药驅虫結果

鼠 別	药 物 类 別	药 物	剂 量 (每 100 克 体 重)	有 效 率, %	直 接 疗 效, %	间 接 疗 效, %	
大	已 知 羧 鈎 药	四氯乙烯 四氯化碳 灭虫宁 土荆芥油	0.3 毫升 0.3 毫升 0.3 克 0.03 毫升	99.0 97.6 100 0.9	99.2 94.9 100 0.9	99.4 89.2 100 0	
		鈎 ₅	$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{COO}^-$ 	0.5 克	100	100	100
		鈎 ₇	$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{CH}_2\text{SO}_2^-$ 	0.5 克	98.4	99.9	87.0
		鈎 ₁₃	$\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{Cl} \cdot \text{SO}_2^-$ 	0.5 克	100	100	100
广 谱 驱	广 谱 驱	苯咪咪唑 	0.1 克	99.7	92.5	96.1	
		α -甲氧乙基吡啶 (methyridine) 	0.045 毫升	69.5	71.6	80.2	

鼠	虫药	0.025 克	12.2	12.2	12.2	18.3
鼠	stilbazium iodide 	0.2 克	13.6	13.6	13.6	10.9
		0.05 克	0.8	0.8	0.8	0
		0.023 克	0.2	0.2	0	6.6
		0.013 克	0.1	0	0	0
		0.013 克	1.6	1.6	1.6	0.1
小	四氯乙烯 四氯化碳 灭虫宁* 土荆芥油	0.2 毫升	38.6	38.6	38.6	57.8
		0.3 毫升	0.7	0.5	0.5	11.1
		0.2 克	—	—	—	—
		0.01 毫升	0.2	0.1	0.1	0
		0.5 克	71.3	96.3	96.3	80.3
鼠	α-甲氧乙基吡啶 吡啶 吡啶 吡啶	0.045 毫升	96.0	92.7	92.7	94.6
		0.5 克	97.4	97.4	97.4	94.8
		0.5 克	96.7	97.5	97.5	99.0
		0.2 克	4.2	4.2	4.2	0
		0.05 克	4.9	4.9	4.9	0
鼠	吡啶 吡啶 吡啶 吡啶 吡啶	0.023 克	0.7	0.7	1.18	9.0
		0.013 克	0.4	0.4	0.4	40.0
		0.013 克	1.0	1.0	1.0	29.9

* 鼠于服药后 2.5 小时内死亡。

小时为 20% 左右, 72 小时掬到极少数。但苯腓咪唑及四氯乙烯在大鼠中于 24 小时内掬到虫数的百分比为 2% 及 22%, 而 48 小时掬到 98% 及 78%。

于服药 48 小时将动物解剖, 小腸中的死虫多已排出。在效果好的药物中, 残留在小腸中的虫子极少: 灭虫宁 0、四氯乙烯 1.5、四氯化碳 2.0、鈎₅ 0、鈎₇ 0.5、鈎₁₂ 0、 α -甲氧乙基吡啶 38.1、苯腓咪唑 0.3 条。但中毒严重的鼠则例外, 如 stilbazium iodide, 鼠接近死亡状态, 腸蠕动着缓慢, 排不出粪便与死虫, 因此在 48 小时解剖时仍有少数死虫存在。

討 論

1. 实验动物的选择 巴西日本圓綫虫虽然在大、小鼠体内都能发育, 但在大鼠体内平均发育虫数高, 94% 的虫体集中于小腸上段, 大腸中仅有 0.09%, 在感染后 11—18 天内极少自然排虫。虫体在小鼠腸内的分布、发育及排虫情况都不理想。

又从已知有效驅鈎药如四氯乙烯、四氯化碳、灭虫宁等来看, 在大鼠体内的疗效远比小鼠的要高。比較已知驅鈎无效药物的驅虫結果, 在大、小鼠体内虽都无效, 但山道年、阿的平在小鼠体内的間接疗效偏高, 分别为 40% 与 30%。这可能由于成虫在小鼠体内发育的变异系数大, 以致間接疗效有偏高的假象, 而且小鼠一般对药物的耐受性弱, 容易死亡。因此以大鼠做实验动物更为合宜。

2. 考核疗效的方法 用此虫筛选药物采用粪便掬虫法結合解剖找虫来考核疗效者, 在过去文献中尚未見报导。Steward^[2] 認为此虫很小, 常在消化道中被消化、破坏, 在粪便中难以查出。所以一般都用間接疗效来考核^[1-4]。在实验中我們发现在解剖鏡下检查粪便时仍可检出大量虫体。并証实药物組用本法所获虫数与对照組用压片法检虫者相差不多。将所試药物的間接疗效与有效率或直接疗效比較(表 2), 发现有效率和直接疗效非常接近, 而間接疗效則不完全相符。間接疗效系用对照組腸内虫数进行計算比較, 終难避免因宿主防御机制所产生的誤差, 而有效率或直接疗效則无此弊。直接疗效由于解剖时还要观察虫死活, 可能較有效率精确, 但費时較多, 而有效率的法却比較簡單。

在感染后第 11—18 天, 大鼠偶或可以从粪便中排出一条虫体, 因此很低的(2% 以下)有效率、直接疗效并非是药物的真正疗效, 而很大可能是虫的自然排出。

正常 94% 虫集中于大鼠的小腸上段, 自小腸中段以下虫所占的比例就极低。如果在治疗后解剖时发现虫分布异常, 比例变动很明显或顛倒者可以認为是药物作用所致, 可能有些参考价值。

虫卵減少率及虫卵轉阴率在考核药物对某些寄生虫的疗效是經常使用的。但看来不适用于此虫。实验証实虫卵轉阴并不能代表完全无虫, 而且虫卵減少及轉阴也不是在治疗后 2—3 日内即呈現的, 時間稍久, 虫又可能自然被排出, 虫卵数下降并不能說明問題真象。因此不能作为疗效考核标准之一。

3. 本法的实用评价 实验証明許多有效驅鈎药及广譜驅虫药对驅除大鼠体内虫的效果都极佳。stilbazium iodide 虽在鼠体内效果不好, 但对人体鈎虫效果也不理想^[1], 只有土荆芥油例外。一种筛选方法能篩出大部分有效药物, 虽有个別被漏篩也是难免的。5 种已知驅鈎无效药对此虫都无效, 証实本方法的可靠性。我們認为在目前用此虫感染大鼠篩选驅除鈎虫及毛圓綫虫药物是值得推荐的。

致谢 钩₅、钩₇、钩₁₂、苯骈咪唑、 α -甲氧乙基吡啶、stilbazium iodide 7 种药物为化学工业部上海医药工业研究院所赠，特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Rogers, W. P.: Studies on the Anthelmintic Activity of Hexylresorcinol and Tetrachlorethylene, *Parasitology*, 1944, **36**, 98—109.
- [2] Steward, J. S.: Anthelmintic Studies 11. A Double Enteronemacidal Anthelmintic Test Covering a Wide Range of Activities, *Parasitology*, 1955, **45**(3/4), 242—254.
- [3] Whitlock, J. H., et al.: A Bioassay Technique for Anthelmintics, *J. Parasitol.*, 1943, **29**, 48—58.
- [4] Brackett, S., et al.: Screening Large Number of New Chemical Compounds for Anthelmintic Activity Using Infections with *Nippostrongylus muris* in mice, *J. Parasitol.*, 1949, **35**, 8—18.
- [5] Скрябин К. И. и др.: Основы нематологии, 1954, том 4, 96—100.
- [6] 陈玉清等：一种新的钩虫卵计数法——小管漂浮法，中华内科杂志，1961, **9**(5), 297—298.
- [7] Broome, A. W. J., et al.: Anthelmintic Activity of Methyridine Against Experimental Nematode Infections in Mice, *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy*, 1961, **17**(3), 321—326.
- [8] Phillips, A. P., et al.: Pyridine Derivatives with Anthelmintic Activity, *Nature* (London), 1961, **191** (4789), 707—708.
- [9] Burrows, R. B., et al.: Stilbazium Iodide as an Anthelmintic I. Against *Syphacia obvelata* in Mice, *J. Parasitol.*, 1962, **48**(5), 767—768.
- [10] Brown, H. D., et al.: Antiparasitic Drugs IV. 2-(4'-Thiazolyl) benzimidazol, A New Anthelmintic, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1961, **83**(7), 1764—1765.
- [11] Hsieh, H. C., et al.: Treatment of *Fasciolopsis buski*, *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *trichuris trichuria*, and *Enterobius vermicularis* Infections with Stilbazium Iodide, *J. Parasitol.*, 1963, **49**(3), 425—427.

A NEW SCREENING METHOD FOR ANTHELMINTICS AGAINST HOOKWORM BY USING NIPPOSTRONGYLUS BRAZILIENSIS *IN VIVO*

CHEN YU-CHING, CHIANG TSE-HSIAO, CHAO CHI-CHANG, CH'ENG PAO-CHU,
HSU YA-HSIUNG AND YEN HSUEH-HUNG
(*Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences, Shanghai*)

ABSTRACT

The development of *N. braziliensis* was studied both in rats and mice. From the observations made on the development rate of adult worms, the worms' distribution in the small intestine, and the number of worms passing out spontaneously, it was concluded that rats are better laboratory animals for our purpose than mice.

A routine technique for screening anthelmintics against hookworm *in vivo* was established. Young laboratory rats (90—110 g in wt.) are each inoculated subcutaneously with 400 active *N. braziliensis* infective larvae, and after 11 or 12 days, drugs to be tested are given per os. A group of 4 rats are used for each drug, and no control group is necessary. Faecal material is collected for 48 hours and the rats are then sacrificed, worms being searched carefully both in the intestines and in the faeces. The total number of worms in the intestine and faeces of the whole group of animals are counted, and the ratio is termed the direct therapeutic index:

$$\frac{\text{Dead worms in intestine} + \text{worms in faeces}}{\text{Dead} + \text{living worms in intestine} + \text{worms in faeces}} \times 100$$

Among the ten known antihookworm drugs and broad-spectrum anthelmintics tested, eight were highly effective, the therapeutic index being 69.5—100%. Oil of chinopodium and stilbazium iodide are the only exceptions. Regarding the drugs known to be ineffective against hookworms, the therapeutic index was almost nil. The results appear to prove that the new method is not only time saving and economical but also more accurate as compared with the methods reported previously.