

口服防治血吸虫病新药的初筛方法

邵葆若 蕭樹華 湛崇清 潘秋如 徐月琴

(中国医学科学院寄生虫病研究所, 上海)

提要 本文对新型防治日本血吸虫病药物的初筛方法进行了初步探讨。预防或治疗日本血吸虫病新药的筛选剂量, 可以得自6鼠3天测毒的结果。小白鼠感染尾蚴当日起连续服药14天, 停药次日解剖, 用冲洗法冲出肝内童虫, 测量其平均长度。如对照组平均长度与服药组相比的比率大于2, 而且部分童虫的长度不及300微米, 可认为该药有抑制童虫的作用。小白鼠感染尾蚴后4周, 连续服药5—7天, 停药次日解剖。如体虫雌虫缩短, 色素明显减退, 则认为该药对成虫有作用。

从大量药物的筛选工作中来发现新型的可供口服的防治血吸虫病的药物, 仍然是目前寻找新药线索的一个重要方面。

有关找到预防性治疗药物的方法的文献尚不多见。1956年 DeMeillon 等^[1]主要根据小白鼠感染曼氏血吸虫尾蚴后粪检虫卵阴性及成虫发育率减低, 报告 S-616 有预防感染的作用。其后, 曾衍霖等(1958)^[2]及 Wright 等^[3]分别报导玫瑰苯胺对日本血吸虫病及曼氏血吸虫病有预防作用。1959年高柏生等^[4]及萧树华等^[5,6]系根据童虫的大小及其生长发育是否受到抑制而分别证实了南瓜子及南瓜子氨酸对日本血吸虫病的预防作用。

寻找治疗血吸虫病药物的方法, 大体上分为体外杀虫筛选试验^[7]及动物体内治疗试验二类。由于体外试验方法与体内试验的实际情况相距甚远, 故一般仍多采用后一类方法。体内筛选法中用以判断药物是否有效的指标有很多种。有的主要是根据成虫减少率(Bang, 1946)^[8]; 有的是观察虫体在肝、肠血管内的分布(Schubert, 1948)^[9]; 有的是观察虫体是否有肺移现象(Hewitt, 1960)^[10]; 有的是观察小白鼠的寿命是否延长(Luttermosser, 1954)^[11]; 有的是依据治疗后粪便内虫卵是否转阴(Lee, 1932)^[12]; 也有的是计数组织内虫卵数(Schwink, 1955)^[13]及观察肠壁内卵谱变化的(Pellegrino, 1962)^[14]。各种方法虽皆有其特点, 但由于筛选方法仍不够理想, 因此影响了筛选新药的进展。

为了把新药的筛选工作向前推进一步, 近年来我们在筛选药物工作的基础上, 对初步筛选新类型药物的几个问题, 即剂量的选择、预防性治疗药物初筛的指标及治疗药物初筛的指标等, 进行了初步的探讨。

方法与结果

(一) 新药剂量的选定

筛选实验中, 给动物口服最大耐受量的药物, 可以减少初筛时漏筛有作用的新型化合

物。根据一系列摸索的结果,每一新药的毒性初测,可用体重为 18—22 克的健康小白鼠 6 只。药物系溶于或混悬于 4% 的淀粉液中,用灌胃法给药。每药分 2000,1000,500 毫克/公斤/日三种剂量(相邻二剂量的比为 2),每 2 鼠口服一种剂量,连服 3 天,记录服药开始后 6 天内的动物死亡数。如动物全部死亡,则需降低剂量,从 250 毫克/公斤/日开始给药。最后,以 2 鼠均不死亡组每日剂量的 60%,作为预防性治疗初筛(7 鼠为一组,服药 14 天解剖)及治疗初筛(7 鼠为一组,服药 7 天解剖)的每日剂量。在 457 个各类新药的毒性测定中,一次用 6 鼠即完成测毒的有 405 个,其余 32 个系经第二次测毒方得出测毒结果。

统计 314 个化合物的预防性治疗初筛的实验,其中 97.8% 的药物均能得到初筛结果,2.2% 的药物因筛选剂量过大,动物未到解剖日期已全数死亡而不能得出结果。

统计治疗初筛 121 个化合物的实验得出,100% 皆能如期解剖动物获得初筛结果。

按上述毒性初测法测得的吐酒石、F-30066、玫瑰苯胺、血-30、敌百虫、南瓜子氨酸及萱草根等药物的每日给药剂量治疗小白鼠血吸虫病,除定期解剖部分小白鼠外,逐次记录动物死亡数,算得各组服药 7 天的理论累积死亡率依次为 0, 0, 0, 40.4%, 14.4%, 35.8% 及 77.1% (表 1)。

表 1 药物治疗小白鼠血吸虫病时的动物死亡情况

药 物	实验小鼠数	每日剂量 (毫克/公斤)	各服药阶段内死亡动物数			服药 7 天理论累积死亡率(%) ¹²⁵¹
			1—3天	4—5天	6—7天	
吐酒石	25	50	0/25*	0/20	0/16	0
F-30066	25	300	0/25	0/20	0/16	0
玫瑰苯胺	25	1200	0/25	0/20	0/16	0
血-30	25	25	3/25	2/20	4/16	40.4
敌百虫	25	150	1/25	0/20	0/16	14.4
南瓜子氨酸	24	600	2/24	2/18	3/14	35.8
萱草根	24	1200	1/24	3/18	1/14	77.1

* 分子数系死亡鼠数,分母数系本阶段开始时的实验鼠数。

(二) 预防性治疗药物初筛的指标

根据药物是否对童虫的生长发育有抑制作用,作为发现新型药物的初筛指标,要比根据成虫减少率的方法好。主要是在于前一方法减少了漏筛仅有暂时作用的药物的可能性。

预防性实验治疗的方法是:小白鼠各感染尾蚴 60 条,自感染之日起每日服药一次,连服 10—14 天。停药后 24 小时每组解剖 2—3 鼠,用自来水冲出肝内童虫^[15],待虫死后,测量虫的长与宽,并与对照组的相比较。

用已知有显著抑制及杀死童虫作用的 F-30066 (β -(5-硝基-2-咪喃)丙烯酸异丙酰胺)^[16]与玫瑰苯胺,及仅有抑制作用的 S-601 (咪喃西林)^[17]等试验的结果(表 2)表明,小白鼠从感染之日起,口服药物 10 天解剖,肝内童虫的平均长度经统计处理均较对照组的显著为短,唯对照组童虫长度与 S-601 组及小剂量的 F-30066 组的童虫长度间的比率尚在 2 以下。服药 14 天解剖对照组童虫长度与各试验组童虫长度的比率皆增加,均在 2 以

上。此时各服药组肝内童虫长度不及 300 微米的仍占有相当比例, 而对照组仅见一条童虫长度在 300 微米以下。在 14 天解剖时, 童虫的宽度并未见明显增长。结果认为, 判断初筛有一定作用的依据可以是: 服药 14 天解剖 2—3 鼠, 求其肝内童虫平均长度。如对照组长度为试验组的 2 倍以上, 试验组部分童虫长度不及 300 微米, 则示该药有一定的抑制童

表 2 预防性治疗小白鼠血吸虫病的结果

实 验	药 物 (毫克/公斤/日)	肝 脏	服 药 10 天 解 剖						服 药 14 天 解 剖											
			各鼠内找出虫数					童虫长度 (微米)		童虫宽度		各鼠内找出童虫数					童虫长度		童虫宽度	
			1	2	3	4	5	平均	与对照 组之比	平均	与对照 组之比	1	2	3	4	5	平均	与对照 组之比	平均	与对照 组之比
I	对照	肝	15	20	27	21	26	444.2		98.6		22	28	18	17	25	1462.3		169.1	
		肠	0	0	4	0	0	505.8		114.8		4	0	11	12	0	2025.6		173.7	
	呋喃西林 (80毫克/公斤)	肝	6	2	5			297.8	1:1.48	58	1:1.7	16	17	14	15	13	465.3	1:3.14	97.7	1:1.73
II	对照	肝	10	18	15	26	16	515.9		112.2		17	16	1/19	16	15	1212		164.6	
		肠	0	0	0	0	0					21	28	17	10	15	1912		209	
	F-30066 (200)	肝	1	6	0	0	0	265	1:1.95	50	1:2.24	3/3	1/1	1/3	5/5	0	264	1:4.61	52.8	1:3.12
III	对照	肝	1	0	0	0	0	217	1:2.38	50	1:2.24	1/1	0	0	0	0	267	1:4.56	33	1:4.99
		肠	0	0	0	0	0				0	0	0	0	0					
	F-30066 (50)	肝	15	14	12	21	17	444.1		102.8		21	12	20	13	16	1059.6		153.1	
IV	对照	肝	13	2	22	5	14	314.8	1:1.40	73.1	1:1.41	10	22	16	4/15	3/22	647.8	1:1.64	120.6	1:1.27
		肠	0	0	0	0	0				0	0	0	0	0					
	F-30066 (100)	肝	2	14	4	4	0	267.7	1:1.65	57.3	1:1.79	1/5	1/11	2/16	3/4	2/4	447.1	1:2.37	93.5	1:1.64
IV	对照	肝	4	19	4	5	15	295.8	1:1.49	64.7	1:1.59	4	4/12	1/9			443.3	1:2.39	101.3	1:1.51
		肠	0	0	0	0	0				0	0	0							
	F-30066 (300)	肝	19	21	15	26	21	614.1		118.3		18	20	1	21	4	1741.6		170.2	
IV	对照	肝	0	0	0	0	1	731		136		12	24	18	18	7	2436.1		151.4	
		肠	0	0	0	0	0				0	0	0	0	0					
	F-30066 (100)	肝	11	5	10	3		277	1:2.21	61.5	1:1.92	4/17	2/3	3/6	0		466.1	1:3.74	83	1:2.05
IV	对照	肝	0	0	1	0		187	1:3.28	51	1:2.32	0	0	0	0					
		肠	0	0	0	0					0	0	0	0						
	玫瑰苯胺 (1200)	肝	7	0	0			233.4	1:2.63	55.8	1:2.12	4/10	21	2/10	4/7		462.1	1:3.77	111.9	1:1.54
IV	对照	肝	0	0	0						0	0	0	0						
		肠	0	0	0						0	0	0	0						
	呋喃西林 (80)	肝	4	18	8	25		346.1	1:1.77	85.9	1:1.38	4/16	23	1/19	18		854.3	1:2.04	131.3	1:1.30
肠	0	0	0	0						3	2	3	0		1325		161.5			

[注] 表内分子数系长度在 300 微米以下的虫数。

虫的作用(表 2)。

从表 2 各次实验还可看出, 14 天解剖时对照组的 20 鼠中, 17 鼠的肠系膜血管灌流液中找到童虫; 而玫瑰苯胺及不同剂量的 F-30066 各組則均未找到童虫; 仅对早期童虫发育有影响的 S-601 组内的一部分鼠的肠系膜血管灌流液中, 也有童虫找到。资料提示, 有效药物在抑制童虫生长发育的同时, 也延缓了童虫自肝移行至肠系膜血管的时间。

(三) 治疗血吸虫病药物的初筛指标

选择对日本血吸虫成虫有退化萎缩作用的萱草根^[13]与南瓜子氨酸^[16]及兼有杀死成虫作用的吐酒石、F-30066^[16]、玫瑰苯胺^[2]、血-30(六氯次甲基二苯酚)^[19]及敌百虫^[20]等, 治疗感染血吸虫尾蚴后一月的小白鼠(每鼠感染尾蚴 40 条), 并于给药 3, 5, 7 及 10 天, 各解剖 2~3 鼠, 剖杀后先用自来水灌洗肝肠血管, 再撕碎肝及肠系膜, 检出成虫, 测量其长度。同时, 对新鲜标本进行肉眼观察及镜下检查, 并与对照组相比较。

实验结果得出, 小白鼠口服各药 3 天后, 体内的雌虫多数已有色素减退及缩短的现象。服药 5 天, 每組雌雄虫的平均长度与对照组相比均显著缩小, $P < 0.01$ 。同时, 各組雌虫体内的色素减少亦更明显, 肉眼观察看不清有色素的雌虫(色素的分布不到肠管的 1/3, 色素量亦大大减少)数, 各組皆占 50% 以上。服药 7 天及 10 天解剖所见虫体的变化基本上同于 5 天的结果(表 3、表 4)。

表 3 小白鼠口服药物后其体内血吸虫长度的改变(平均长度, 厘米±标准误)

药 物	每日剂量 (毫克/公斤)	服药 3 天解剖		服药 5 天解剖		服药 7 天解剖							
		♀	♂	♀	♂	♀	♂						
对 照		1.54±0.02		1.14±0.02									
吐 酒 石	50	1.09	0.02	0.96	0.03	0.84	0.04	0.94	0.04	0.80	0.06	0.59	0.05
F-30066	300	1.37	0.03	1.04	0.04	1.11	0.04	0.97	0.03	1.04	0.03	1.03	0.04
		$P < 0.001$										$P < 0.02$	
玫瑰苯胺	1200	1.34	0.03	0.98	0.03	1.30	0.03	1.01	0.06	0.88	0.2	0.78	0.02
						$P < 0.001$							
血-30	25	1.09	0.05	0.95	0.02	0.92	0.04	0.72	0.02	0.84	0.05	0.88	0.03
敌百虫	150	1.44	0.05	1.17	0.02	1.04	0.05	0.81	0.04	1.05	0.03	0.96	0.02
		$P > 0.05$											
对 照		1.50±0.01		0.97±0.02									
萱 草 根	1200	0.87	0.04	0.69	0.03	0.90	0.03	0.73	0.02	0.88	0.03	0.80	0.03
				$P < 0.001$									
南瓜子氨酸	600	1.13	0.06	0.9	0.03	0.88	0.03	0.86	0.03	0.88	0.03	0.84	0.03
		$P < 0.001$		$P > 0.05$				$P < 0.02$					

[注] 表内各 P 值皆系与对照组相比的结果。

显微镜下观察新鲜雌虫标本看到, 随着服药天数的增加, 各組雌虫子宫内的虫卵数亦逐渐减少。服药 7 天, 吐酒石、F-30066、玫瑰苯胺、南瓜子氨酸及萱草根等組大部分雌虫子宫内已无虫卵, 玫瑰苯胺組雌虫子宫内多充满卵黄粒。

实验证明, 已知各类对日本血吸虫有效的药物, 用适当剂量治疗感染血吸虫病的小白鼠 5 天, 肉眼观察已能看见其体内雌虫有色素明显减退及缩小的现象。因此认为可以用此作为治疗初筛的指标。

表 4 小白鼠口服药物后雌虫色素及虫卵数的变化

药 物	每日 剂量 (毫克/ 公斤)	服药 3 天解剖					服药 5 天解剖					服药 7 天解剖					服药 10 天解剖				
		肠 管 色 素					肠 管 色 素					肠 管 色 素					肠 管 色 素				
		○	±	+	++	+++	○	±	+	++	+++	○	±	+	++	+++	○	±	+	++	+++
对 照		0	0	0	0	24 (虫数)	0	0	0	0	33	0	0	0	1	33	0	0	0	0	15
吐酒石	25	0	0	11	5	4	0	8	11	5	1	1	3	7	1	1	1	3	8	6	0
F-30066	300	1	3	10	9	2	2	13	9	1	0	3	5	8	0	0	3	3	10	0	0
玫瑰苯胺	1200	0	0	3	11	7	0	1	14	6	0	1	0	8	7	0	0	2	10	0	0
血-30	25	1	0	5	8	1	0	0	12	6	2	3	6	4	0	0	5	1	0	0	0
敌百虫	150	0	0	6	11	4	0	0	16	14	2	0	4	11	4	2	0	3	10	5	1
对 照		0	1	0	2	19															
萱草根	1200	3	7	4	0	0	0	3	5	2	0	1	2	9	1	0					
南瓜子氨酸	600	0	1	12	0	0	1	4	10	2	0	0	1	9	3	0	0	5	11	2	0

[注] 肠管色素 +++ 肉眼见色素明显;显微镜下见色素基本占满整个肠管。
 ++ 肉眼见有色素;显微镜下见色素分布占肠管的 1/2 左右。
 + 肉眼隐约见有色素;显微镜下见色素的分布占肠管的 1/3 以下。
 ± 仅显微镜下见微量色素。
 ○ 肠管内无色素。

讨 论

用感染动物进行筛药的筛选指标,应因筛选的目的要求不同而异。作为发现新型药物的初筛指标,应尽可能观察到药物对虫体的,即使是暂时的作用。当筛选同一类型化合物,其中有作用的药物又较多,筛选的目的是在找出较有疗效的药物时,则应考虑以能否杀死虫体或根据疗效的高低作为进一步筛选的指标。药物是否会被漏筛,一方面决定于方法与指标是否选择得适当,同时在很大程度上也决定于所用的剂量是否恰当。在寻找新型化合物的初筛实验中,最好选择最大耐受量作为给药剂量,以减少漏筛的机会。当我们用 6 鼠 3 天测毒法,取动物不死亡组剂量的 60% 作为每日给药剂量时,每组 7 鼠的 14 天预防性治疗初筛实验,有 2.2% 的服药组因动物全数死亡而无结果。因此,预防初筛的剂量也许还可适当调低;治疗初筛实验如服药 5 天就观察结果,则每日剂量可以稍加提高,或把每组动物数略为减少。

目前用以初筛预防药物的指标,不论是比較 10 天或 14 天童虫的长度,皆需对测量资料进行分析,工作量较大。实验观察得出,对童虫有作用的药物能延缓童虫由肝移向肠系膜血管,而对照组各鼠于感染 14 天解剖时几皆发生童虫移行至肠系膜血管的情况。进一步研究童虫移行的规律,有可能依据童虫是否延缓移行作为初筛的指标。判断是否延缓移行的计数资料显然比测量童虫长度的测量资料要更易于掌握与更为简单。

治疗血吸虫病药物的筛选方法有多种。服药后一定时期解剖动物观察减虫率虽能肯定其疗效,但对成虫仅有一时抑制作用但无杀虫作用的萱草根^[10]等,则将因停药后虫体已

恢复至正常而漏筛。观察成虫是否出现肝移作为筛选的指标,对锑剂及南瓜子^[21]等药很适用,但玫瑰苯胺^[2]、萱草根^[18]及 F-30066 等在短期用药后并不出现明显的肝移现象。计数组织内虫卵数,或观察卵谱变化,或观察粪便中虫卵是否转阴,或观察小白鼠寿命有否延长等的筛选方法,不是工作量较大,便是实验过程较长。比较各种对日本血吸虫有不等作用程度的药物治疗小白鼠血吸虫病的实验结果得出,服药 5 天解剖 2~3 鼠,肉眼观察已见到大部分雌虫明显缩小,雌虫体内的色素亦显著减退,难以辨认。应用此种变化作为治疗初筛的指标时,不仅不会漏筛已知各类有作用的药物,而且指标明显,方法简便,易于掌握,整个实验过程亦较短。

为了不断提高筛选新药工作的质量,讲究筛选新药工作的经济效率,还需继续研究与改进筛药的方法。

致谢 F-30066 及血-30系化学工业部上海医药工业研究院合成并赠给;玫瑰苯胺系中国科学院药物研究所赠给,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] De Meillon, B., England, E. C. & Lämmler, G.: Experimental Bilharziasis in Animals. IV. Chemoprophylaxis in Bilharziasis, *South African Med. J.*, 1956, **30**(26), 611.
- [2] 曾衍霖、丁光生: 防治血吸虫病药物的研究 XII. 口服 Rosaniline 对日本血吸虫病的防治试验, *生理学报*, 1958, **22**, 60.
- [3] Wright, H. N. & Crauston, E. M.: Rosaniline Base (C1677) as a Prophylactic in *Schistosoma mansoni* Infections in Mice, *Fed. Proc.*, 1948, **2**, 267.
- [4] 高柏生、李思温、郭启贞、祝学新、黄吉美、韩忠谔: 筛选预防血吸虫病药物常规的初步探讨, 浙江卫生实验院第十年年报, 1959, 82 页。
- [5] 萧树华、乐文菊、毛守白: 南瓜子对血吸虫童虫的作用。中国医学科学院寄生虫病研究所 1959 年年报, 1959, 84 页。
- [6] 萧树华、邵葆若、何毅勋、杨元清: 南瓜子氨酸实验防治小白鼠血吸虫病的研究, *药学学报*, 1962, **9**(6), 327.
- [7] 日本血吸虫体外药物试验, 中央卫生研究院华东分院 1953 年年报, 38 页。
- [8] Bang, F. B. & Hairston, N. G.: Studies on Schistosomiasis japonica. IV. Chemotherapy of Experimental Schistosomiasis japonica. *Amer. J. Hyg.*, 1946, **44**(3), 348.
- [9] Schubert, M.: Conditions for Drug Testing in Experimental Schistosomiasis mansoni in Mice. *Amer. J. Trop. Med.*, 1948, **28**(1), 121.
- [10] Hewitt, R. & Gill, E.: The "Lung Shift" of Schistosomiasis mansoni in Mice Following Therapy with Tartar Emetic or Miracid. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.*, 1960, **9**(4), 402.
- [11] Luttermoser, G. W.: Studies on the Chemotherapy of Experimental Schistosomiasis. 1. A Method for Detecting Schistosomacidal Activity Based on Response of *Schistosoma mansoni* Infections in Mice to Fuadin Therapy, *J. Parasitol.*, 1954, **40**(2), 130.
- [12] Lee, C. U.: Treatment of Schistosomiasis japonica with Fuadin in Experimentally Infected Rabbits. *Chinese Med. J.*, 1932, XLVI (12), 1169.
- [13] Schwink, T. M.: Use of Organ Egg Counts in Assaying Chemotherapeutic Activity against *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 1955, **41**(6-2), 27.
- [14] Pellegrino, J., Oliverira, C. A.: Faria, J. & Cunha, A. S., New Approach to the Screening of Drugs in Experimental Schistosomiasis mansoni in Mice. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 1962, **11**(2), 201.
- [15] 韩忠谔、黄吉美、李美蓉、高柏生: 应用全身和个别脏器灌注法检取小白鼠体内血吸虫虫体的初步报告, 浙江卫生实验院第十年年报, 1959, 70 页。
- [16] 邵葆若、萧树华、何毅勋、席裕瑞、张应良: F-30066 实验治疗动物血吸虫病的初步研究, *中华医学杂志*, 1963, **49**(5), 316.
- [17] 药理研究室: S-601 实验预防动物血吸虫病的研究, 中国医学科学院寄生虫病研究所, 1960 年年报, 1960, 103.
- [18] 萧树华、邵葆若、何毅勋、杨元清、杨惠中、商云征: 萱草根的研究 II. 萱草根实验治疗小白鼠血吸虫病的研究, *药学学报*, 1962, **9**(4), 218.
- [19] 朱巧贞、梁猷毅、曾衍霖、沈美玲、陶正琴、吕宝芬、俞月桂、丁光生: 防治血吸虫病药物的研究 XXVII. 377 种药

- 物对小白鼠血吸虫病的治疗, 药学报, 1962, 9 (2), 84.
- [20] 吕宝芬、梁猷毅、施觉民、丁光生: 防治血吸虫病药物的研究, XXVIII. 敌百虫的毒性及其对日本血吸虫病的实验治疗, 药学报, 1962, 9 (10), 599.
- [21] 中葯南瓜子防治血吸虫病的研究, 浙江卫生实验院第十年年报, 1959, 91.
- [22] 邵葆若、许学积: 钉螺人工感染血吸虫的研究, 中华医学杂志, 1956, 42 (4), 357.

SCREENING METHOD FOR ORAL ANTIBILHARZIAL DRUGS IN MICE

SHAO BAO-RUO, XIAO SHU-HUA, ZHAN CHONG-QING,
PAN QIU-RU AND XU YUE-QIN

(*Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences*)

ABSTRACT

The present report deals with a preliminary screening method for new drugs in prophylactic or therapeutic treatment of experimental schistosomiasis japonica.

The dosage selected in the screening was calculated according to the result of a 3-day toxicity test of 6 mice.

In the preliminary prophylactic screening test, mice were treated orally from the day of infection for 14 days and were autopsied at the end of treatment. The schistosomula in the liver were collected by perfusion method and their lengths were measured. The drug may be considered effective in suppressing the growth of schistosomula if the mean length of the worms in the control group is twice that of the test group and a certain proportion of the schistosomula in the treated group is less than 300 micron in length.

In a preliminary therapeutic screening test mice were treated one month following exposure to cercariae for 5—7 days. Mice were killed the day after withdrawal of the drug. The flukes were washed out and examined for changes in size and intestinal pigment content. The drug is considered to be active if the worms decreased in size and in their pigment content.