

文章编号:1003-4692(2009)06-0553-03

【论著】

一种改进的抗人体蠕形螨药物筛选的实验方法

田晔^{1,2}, 李朝品¹, 张明旭²

【摘要】 目的 寻找一种简便易行和定量的体外抗人体蠕形螨药物筛选的实验方法。方法 以百部乙醇提取物为实验药物,分别应用文献记载的各种方法和自创的跟踪法进行体外抗人体蠕形螨实验,评价各种方法对筛选抗螨药物活性的价值。结果 传统各法在药物和螨的作用方法及药物抗螨效果评价等方面均各有利弊。改进的跟踪法简单易行、视野清晰并可定位跟踪螨的变化,准确记录每只螨的死亡时间,用 $\bar{x} \pm s$ 表示螨的死亡时间为(3.53±1.04)min,可用 t 检验比较不同药物的抗螨活性。结论 跟踪法是一种较为理想的进行体外抗人体蠕形螨药物活性筛选的实验方法。

【关键词】 蠕形螨; 抗螨; 实验方法; 药物筛选; 跟踪法

中图分类号:R384.4; S481⁺.9

文献标识码:A

A modified drug screening method for evaluating *in vitro* anti-mite activity TIAN Ye^{1,2}, LI Chao-pin, ZHANG Ming-xu.

1 School of Medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, Anhui Province, China; 2 School of Earth and Environment, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, Anhui Province, China

【Abstract】 Objective To develop a direct and effective method to screen drug that can kill human *Demodex in vitro*. **Methods** Several methods including self-established method named Tracking-Detection were used in anti-mite experiments *in vitro* with Radix Stemonae alcohol extract individually. Way of drug delivery and anti-mite effect of all methods were evaluated. **Results** All the traditional methods showed advantages and disadvantages in drug delivery and evaluation of anti-mite effect. Tracking-Detection was easy to be conducted with clear visual field, and the exact death time of each mite could be detected and the death time was (3.53±1.04) min with Radix stemonae alcohol extract. And then the differences of the anti-mite activities to human demodex of different drugs could be compared statistically by t -test. **Conclusion** Tracking-Detection is an ideal method to screen anti-mite drug killing human *Demodex in vitro*.

【Key words】 *Demodex*; Anti-mite; Experimental method; Drug screening; Tracking-Detection

人体蠕形螨(*Demodex*)是一类永久性寄生螨,寄生于毛囊和皮脂腺内,可引起人体蠕形螨病^[1],表现为

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金(2004KJ134);安徽省高校青年教师科研资助计划(2006jq1080);安徽理工大学引进人才基金(2005YB90)

作者单位:1 安徽理工大学医学院病原生物学教研室(安徽淮南 232001); 2 安徽理工大学地球与环境学院(安徽淮南 232001)

作者简介:田晔(1977-),女,安徽淮南人,讲师,博士研究生,主要从事病原生物学研究。E-mail: yetian001@126.com

面部皮肤病、睑缘炎、外耳道瘙痒、毛发脱落、外阴瘙痒甚至乳腺肿瘤等^[2-4]。应用抗螨药物杀螨是治疗和预防人体蠕形螨病的最有效方法^[5],目前尚未有国家标准或行业标准的抗螨药物,因此抗螨药物的筛选仍是人体蠕形螨病治疗的研究热点。体外抗人体蠕形螨实验是将药物体外与活螨作用并比较不同药物的抗螨活性,是筛选有效抗螨药物的可靠方法。我们通过大量实验在以往文献记载的体外抗人体蠕形螨实验的基础

- [11] Guo XG, Qian TJ, Guo LJ, et al. Species diversity and community structure of sucking lice in Yunnan, China[J]. Entomol Sinica, 2004, 11(1):61-70.
- [12] 郭宪国, 叶炳辉, 顾以铭, 等. 黄胸鼠体表优势革螨种群空间分布型研究[J]. 医学动物防制, 1996, 12(3):17-19.
- [13] 郭宪国, 钱体军. 高黎贡山及担当力卡山革螨性比及年龄构成分析[J]. 大理医学院学报, 1999, 8(1):1-3.
- [14] Radovsky FJ. The evolution of parasitism and the distribution of some dermanysoid mites (Mesostigmata) on vertebrate hosts [A]// Houck MA (ed.). Mites: Ecological and evolutionary analyses of life-history patterns. New York: Chapman and Hall, 1994:186-217.
- [15] Weeks AR, Hoffmann AA. The biology of *Penthaless* specie in south eastern Australia[J]. Entomol Exp Appl, 1999, 92:179-189.
- [16] 罗礼溥, 郭宪国. 云南省保山等25个县市黄胸鼠革螨的寄生状况[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(8):844-847.
- [17] Guo XG, Qian TJ. Sex ratio and age structure of gamasid mites from small mammals in western Yunnan, China [J]. Entomol Sinica, 2001, 8(2):166-174.

- [18] Rohde K. Ecology of marine parasites [M]. 2nd ed. Wallingford, Oxon, UK: CAB International (Commonwealth Bureau of Agriculture), 1993:298.
- [19] Kennedy CR. Reproduction and dispersal [A]// Kennedy CR. Ecological aspects of parasitology. Amsterdam: North Holland Publ Co, 1976:143-160.
- [20] White GC, Bennetts RE. Analysis of frequency count data using the negative binomial distribution [J]. Ecology, 1996, 77(8):2549-2557.
- [21] Pal P, Lewis JW. Parasite aggregations in host populations using a reformulated negative binomial model [J]. J Helminthol, 2004, 78(1):57-61.
- [22] Krasnov BR, Stanko M, Miklisova D, et al. Distribution of fleas (*Siphonaptera*) among small mammals: Mean abundance predicts prevalence via simple epidemiological model [J]. Int J Parasitol, 2005, 35:1097-1101.
- [23] Krichbaum K, Perkins S, Gannon MR. Host-parasite interactions of tropical bats in Puerto Rico [J]. Acta Chiropterol, 2009, 11 (6):157-162.

[收稿日期:2009-07-10]

上,经过总结和改进,自创了一种简便、定量的药物体外抗人体蠕形螨的实验方法,称为跟踪法,以期为治疗人体蠕形螨病药物的筛选研究提供有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料 百部 20 g、载玻片、盖玻片、透明胶纸、一次性采血针、0号解剖针、Nikon E400 光学显微镜及其配套动静态照像系统、可调式移液器。

1.2 方法

1.2.1 供试蠕形螨采集 供试蠕形螨采集用透明胶纸法和挤压刮拭法 2 种。透明胶纸法:中重度蠕形螨感染志愿者睡前洗脸后,将与载玻片大小相仿的透明胶纸带分别贴于额、颊、鼻、下颌等部位,次晨取下贴回载玻片上。挤压刮拭法:志愿者在 25~30 °C 室温适应 1 h 左右。皮肤表面消毒,用一次性采血针的钝端,采用挤压刮拭法刮取志愿者的面部皮脂,置于湿盒,37 °C 温箱保存待用。虫体分离用 0 号解剖针^[6]。实验螨均为活力强的毛囊蠕形螨 (*Demodex folliculorum*) (以离开原地活动为准,简称活螨)。

1.2.2 药液制备 实验药物为百部乙醇提取物:取百部 20 g,清洗后干燥、粉碎。然后装入标本瓶倒入 80% 乙醇(浸没)浸泡 12 h,后用 80% 乙醇热回流(85 °C 左右)提取 3 次、合并 3 次提取液,减压回收乙醇至无醇味,定容为 200 mg/ml,得到百部提取液。

1.2.3 药物与螨作用方法 体外抗螨实验在(30±0.5)°C 实验室内进行(GMP 实验室)。(1)涂片法:将待试药液直接涂在载玻片上,将采集的人体蠕形螨放在载玻片上^[7]; (2)透明胶纸法:把药液分别均匀地涂于载玻片上,贴上粘有螨的透明胶纸^[8];或将透明胶纸法采集的标本从载玻片上揭开,加入药液后再重新贴回^[9],药物作用前计数活螨数; (3)盖玻片法:将用皮肤刮拭法获取的螨单个分离后置于盖玻片上,盖于已分别涂好药液的载玻片上^[8]; (4)载玻片法:将螨置于滴有生理盐水的载玻片表面,滴加药液,定时观察并记录螨的存活情况^[10]; (5)自创的跟踪法操作方法:用盖玻片的一角挑取少许皮脂,涂在滴有生理盐水的载玻片 1 表面中央,用盖玻片挤压研磨皮脂使之均匀分布。揭开盖玻片,有皮脂的一面向上,盖于中央滴有一滴蒸馏水的载玻片 2 上。分别观察载玻片 1 和载玻片 2,找到活力较好的毛囊蠕形螨(可见其运动活泼)。把活螨置于显微镜视野中央,一人分别滴加药液在载玻片 1 和载玻片 2 有皮脂区域,一人目镜监控下调整螨的位置在视野正中央,轻轻盖上盖玻片。观察螨的活动变化情况。

1.2.4 数据采集及处理 每种方法各采用 100 μl 药液,方法(1)~(4)均观察至少 15 只活螨与药物作用的

情况,每 2 min 观察螨的活动情况(以往文献中观察螨的时间间隔为 1~6 h,但对于抗螨活性较强的药物,螨死亡时间较短,不宜采用),计数每个时间段螨的死亡率及螨全部死亡时间;药物的活性比较指标为每个时间段螨死亡率的差异;方法(5)跟踪法观察至少 15 只活螨,计数每次实验螨死亡时间,以 $\bar{x} \pm s$ 计算螨死亡时间,采用 *t* 检验比较螨死亡时间的差异。

1.2.5 人体蠕形螨死亡判断 在 40× 光学显微镜下观察,毛囊蠕形螨螯肢和足爪(连续观察 1 min)不动者为死亡。

2 结果

2.1 不同抗螨实验方法操作过程 (1)涂片法:虫体位置较固定利于观察,但分离后的螨体不易与已经涂布在载玻片上的药物充分作用;(2)透明胶纸法:操作方法简单且螨的位置固定,但螨体被固定在透明胶纸上不宜与药液充分接触、透明胶纸浸泡药液可有轻度胶质脱落和胶纸起泡现象;(3)盖玻片法:螨体可与药液充分接触,但单个分离螨难度较大且分离单个螨时有时会对螨造成损伤,影响螨的活力,且放下盖玻片的时候螨不易快速调整到视线下甚至丢失;(4)载玻片法:螨体可与药液充分接触,但冲入药液,盖下盖玻片,虫体自身活动及其虫体在药液的冲刷下位置不确定,不易逐个观察螨的活动情况;(5)跟踪法:视野清晰,药物可与螨充分接触,并可观察螨从滴加药物到死亡的全过程。

2.2 不同抗螨实验方法抗螨效果评价的数据采集及处理 方法(1)~(4)每 2 min 记录死亡螨数,各种方法螨全部死亡时间及各时间段螨的死亡数和死亡率见表 1。由于盖玻片法操作复杂且虫体常无法找到,因此放弃记录;方法(5)记录被跟踪的每只螨的死亡时间。另外,应用跟踪法抗螨的全部死亡时间为 6 min,用 $\bar{x} \pm s$ 表示螨的死亡时间为(3.53±1.04)min。

3 讨论

抗人体蠕形螨药物筛选的实验主要包括:采集供试活螨、制备药液、药物与螨作用和药物抗螨效果的评价 4 个步骤。目前文献记载的方法主要有涂片法、透明胶纸法、盖玻片法和载玻片法等,其命名方法主要是根据实验方法中药物与螨的作用方法。这些方法的优缺点主要集中在药物和螨的作用方法和药物抗螨效果的评价两个方面,我们对这些传统方法进行了分析和改进,分别体现在两方面:

一是药物和螨的作用方法。以往方法的局限性:(1)透明胶纸法目前应用较多^[11-16],但存在胶纸对药物

表1 传统方法药物体外抗螨时间

药物作用方法	螨数(只)	螨全部死亡时间(min)	不同时间段螨死亡数量(只)及死亡率(%)					
			2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	12 min
自然死亡	30	>120	0	0	0	0	0	0
涂片法	32	10	0	4(12.50)	24(75.00)	28(87.50)	32(100.00)	-
透明胶纸法	35	8	0	6(17.14)	26(74.28)	35(100.00)	-	-
盖玻片法	6	-	-	-	-	-	-	-
载玻片法	32	6	0	12(37.50)	32(100.00)	-	-	-

注:括号内数据为死亡率。

和螨作用的干扰,螨一侧粘在透明胶纸上,只能一侧与药物接触,难以排除药物与胶纸反应对螨的作用;(2)涂片法、盖玻片法是将皮脂中分离的螨置于事先涂有药物的载玻片上,螨体分离单个螨难度较大,且螨不易与药物充分作用;(3)载玻片法冲入药液,盖下盖玻片后,虫体位置改变,不易跟踪螨的活动情况和进行活螨的计数。跟踪法对以上局限性进行了改进,采用刮拭法自中重度蠕形螨感染患者皮脂获得活螨,让药物直接作用于活螨;中重度蠕形螨感染者的皮脂在镜下观察,视野中蠕形螨较多,且常常成簇出现,不易分离,给体外抗人体蠕形螨实验造成麻烦,为了排除分离工具对螨造成的损伤,我们选择对螨进行简单的分离,用盖玻片的一角挑取少许皮脂,涂在滴有生理盐水的载玻片中央,用盖玻片挤压研磨皮脂使之均匀分布,而不用工具接触螨体。对单只螨进行跟踪药物作用,易于观察。

二是药物抗螨效果的评价。以往的实验方法大都同时观察药物对一定数量螨的作用情况,计数一定时间段内螨的死亡数和死亡率,然后进行统计学处理,进行各个药物抗螨效果的差异显著性分析,但一般抗螨活性强的药物杀螨时间较短,分时间段记录螨的死亡时间时常遇到两个问题:(1)若观察间隔时间短,则在间隔时间内来不及观察每只螨的活动情况;(2)若观察间隔时间长,则使得各种药物间的抗螨时间差异无统计学意义。跟踪法在进行简单分离螨中,找到某一只活力好的螨,然后在显微镜下跟踪其药物作用到死亡的全过程,记录螨的死亡时间,经过统计学处理,用 $\bar{x} \pm s$ 表示螨的死亡时间,再对不同药物作用螨虫后其死亡时间的差异进行显著性分析,从而克服了这两个问题。

综上所述,应用跟踪法进行人体蠕形螨药物筛选实验的优点是:(1)皮脂均匀分布,可使视野清晰且节约皮脂用量;(2)螨可与药物充分作用;(3)跟踪观察,可记录每只螨活动情况变化、形态变化和死亡时间;(4)用 $\bar{x} \pm s$ 表示螨死亡时间,可用统计学方法(如 t 检

验)科学地进行组间比较,定量比较各种药物的杀螨活性。因此认为:应用跟踪法进行药液体外抗蠕形螨的实验是一种简便易行、直观和定量的实验方法,在繁杂的药物筛选工作中做到操作简便、规范;数据定量、可比性强,可以科学地比较2种药物杀螨活性强弱,可为体外抗蠕形螨药物筛选提供较理想的实验方法。

参考文献

- [1] 孟阳春,李朝品,梁国光. 蠕形螨与人类疾病[M]. 合肥:中国科学技术大学出版社,1995:261-281.
- [2] 李朝品,段中汉. 人眼睑缘蠕形螨寄生及致病性的探讨[J]. 中国人兽共患病杂志,1996,12(1):17-19.
- [3] 李朝品. 外耳道瘙痒症流行情况的调查研究[J]. 锦州医学院学报,1999,20(6):12-13.
- [4] Baima B, Sticherling M. Demodicidosis revisited[J]. Acta Derm Venereol,2002,82(1):3-5.
- [5] 田晔,李朝品. 人面部蠕形螨感染致病及其防治[J]. 疾病控制杂志,2004,8(4):355-357.
- [6] 谢秀秀,徐业华,孙建华,等. 人体蠕形螨爬行的观察[J]. 昆虫学报,1990,33(3):382-384.
- [7] 姚全胜,周国林,许晖. 甲硝唑凝胶对兔疥螨、人体蠕形螨的实验治疗和体外杀虫作用[J]. 中国药理学杂志,1998,33(10):594-597.
- [8] 郑善子,崔春权,申成华,等. 藜芦乳膏对毛囊蠕形螨的体外杀虫作用[J]. 延边大学医学学报,2004,27(1):31-32.
- [9] 梁裕芬,李辉. 杀灭人体蠕形螨的中药筛选[J]. 广西中医药,1999,22(2):40-41.
- [10] 李建华,周敏君,裘学丽,等. 桉叶油霜抗蠕形螨的疗效观察[J]. 中国人兽共患病杂志,2001,17(3):98.
- [11] 姜淑芳,杜云静,董丽娟. 不同介质中蠕形螨存活情况观察[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2002,13(2):119-120.
- [12] 赵亚娥,郭娜. 3种环境条件对毛囊蠕形螨杀灭作用的实验研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2005,16(5):372-374.
- [13] 韩梅. 杀灭人体蠕形螨的蒙药筛选[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版),2006,21(6):684-685.
- [14] 赵亚娥,郭娜,李琛,等. 桉叶油对两种蠕形螨的体外杀虫作用[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2006,17(6):461-464.
- [15] 陈殿学,孙宏伟,曲静,等. 复方大膏膏体外杀螨作用的实验研究[J]. 中医药学刊,2006,24(6):1046.
- [16] 余俊萍,王光西,唐灿,等. 百部酊萃取液对人蠕形螨作用的体外实验研究[J]. 热带病与寄生虫学杂志,2008,6(2):72-74.

[收稿日期:2009-05-20]