

呋喃嘧酮在体外对马来丝虫成虫和微丝蚴的作用

席裕瑞 聂晋华 徐裕信 (中国医学科学院寄生虫病研究所, 上海 200025)

提要 呋喃嘧酮在体外对马来丝虫成虫和微丝蚴有直接的杀虫作用。在含呋喃嘧酮 50 $\mu\text{g/ml}$ 的小牛血清-台氏液(1:20)内,成虫最初表现为活动减弱、体态僵硬或蜷缩, 20 h 后虫体伸直而死亡。在 1 $\mu\text{g/ml}$ 的药液中♀、♂虫的平均存活时间较对照组♀、♂虫的减少 40%, ♀虫产微丝蚴数较对照组减少 80% 以上。药液浓度为 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 时, 微丝蚴的平均存活时间较对照组减少 70% 以上。

关键词 呋喃嘧酮; 抗丝虫药; 马来丝虫; 微丝蚴

呋喃嘧酮^(1,2), 即 1 [(5-硝基呋喃-2)-甲叉氨基]-四氢嘧啶-2-酮(编号 M-170), 是我国近年来发现的抗丝虫新药⁽³⁾。动物实验证明, 该药对棉鼠体内的棉鼠丝虫成虫和微丝蚴、长爪沙鼠体内的马来丝虫成虫和血液及腹腔内的微丝蚴, 均有明显的杀灭作用^(3,4)。本文报道体外观察呋喃嘧酮对马来丝虫作用的结果。

材 料 和 方 法

马来丝虫的体外保存

1. 虫源 含一定量马来丝虫微丝蚴的长爪沙鼠腹腔液加入兔血后, 注入胎盘膜饲血管内, 给中华按蚊吸血。待丝虫幼虫在蚊体内发育成感染期幼虫后, 将蚊麻醉、压碎, 用巴氏漏斗法分离感染期幼虫, 然后腹腔接种长爪沙鼠, 每鼠 200—400 条。6 个月从沙鼠腹腔内取成虫和微丝蚴。

2. 培养液 取小牛血清与含 0.5% 葡萄糖的台氏液按 1:20 的比例配制成培养液(以下简称血清-台氏液)。台氏液于用前经沙氏滤器消毒, 并加入青霉素及链霉素各 500 U/ml。

3. 方法 保存微丝蚴的容器为 0.7—0.8 ml 的改良卡氏并, 内盛培养液 0.6 ml, 加入微丝蚴 20—30 条; 保存成虫的容器为 10×60 mm 的试管, 内盛培养液 2 ml 和一对 ♀、♂ 成虫。两者均置于 37℃ 恒温箱中, 定期用解剖

镜观察虫体活动情况。若培养并内的成虫和所有的微丝蚴均不活动时⁽⁵⁾, 则轻轻振摇后再继续观察 30 s, 如不动, 则间隔 30 min 后再重复上述观察 2 次, 若仍无活动, 则以首次不动的时间作为虫死亡的时间。此外, 还在不同时间, 对部分培养并内的成虫及产出的微丝蚴分别进行了显微镜观察及计算。

药液配制 呋喃嘧酮由上海医药工业研究院赠给。称 10 mg, 加台氏液 100 ml, 在水浴中加温(不超过 55℃)搅拌直至溶解; 左旋咪唑及海群生则直接用冷台氏液溶解。上述各药液于临用前用血清-台氏液稀释至所需浓度。所有培养液及含药培养液的 pH=7.4。

结 果

马来丝虫成虫和微丝蚴的体外观察

1. 成虫 在 5% 牛血清-台氏液中虫体活泼, 至 80 h 后活力始逐渐减弱, 90 h 后虫体伸直而死亡。成虫在血清-台氏液中, 8, 24, 48 及 72 h 后, 虫体内部结构清晰, ♀虫生殖器官内的胚胎颗粒排列整齐, 子宫腔内微丝蚴明显蠕动, 有时还可看到正在产出微丝蚴。于 24 及 48 h 时, 每条 ♀虫产出的平均微丝蚴数分别为 $3261 \pm (\text{SD}) 1229$ 及 4213 ± 1460 条。

2. 微丝蚴 在 5% 牛血清-台氏液中微丝蚴活泼, 可存活 10 d 左右。

药物在体外对马来丝虫成虫的作用

1. 呋喃嘧酮 ♀、♂成虫在含呋喃嘧酮 50 及 100 $\mu\text{g/ml}$ 的血清-台氏液中 2 h 后, 活力减弱, 体态僵硬或蜷缩; 8 h 后呈现间歇性扭动或头、尾部轻微摆动; 20 h 后逐渐不

1981年11月5日收稿 1982年2月17日修回
本项研究得到联合国开发计划署/世界银行/世界卫生组织热带病研究培训特别规划的部分支持。

Table 1. Effect of furaprimidone (F), levamisole(L) and hetrazan(H) *in vitro* on survival time of adult worms and microfilariae of *Brugia malayi*. n = 9-12 samples. $\bar{x} \pm SD$.

* P>0.05, ** P<0.05, ***P<0.01

Drug $\mu\text{g/ml}$	Survival time of the last microfilaria in each Carrel flask (h)	Survival time of adult worms (h)	
		♀	♂
—	252±50	106±10	115±8
F	100	8±5***	29±10***
	50	14±7***	29±4***
	10	22±1***	36±11***
	5	23±1***	44±16***
	1	47±18***	62±22***
	0.5	77±33***	95±22*
	0.1	208±63*	100±14*
	0.05	234±68*	
L	1000	5±2***	5±2***
	500	13±9***	22±8***
	100	68±44***	36±12***
	50	118±35***	34±13***
	10	179±17***	39±16***
	5	208±57*	47±17***
	1	257±51*	67±35**
	0.5		96±38*
	0.1		190±4*
	0.05		99±4*
H	2500	26±11***	46±18***
	1000	142±28***	80±28**
	500	192±41**	80±29**
	100	213±58*	80±22**
	50		91±18*
			6±2***
			26±14***
			55±21***
			58±34***
			41±17***
			46±17***
			69±36**
			91±39*
			107±9*
			107±9*
			113±9*
			70±14***
			81±26**
			79±29**
			84±27**
			105±10*

动, 虫体伸直而死亡。呋喃嘧啶 1, 5 及 10 $\mu\text{g/ml}$ 时, ♀虫的存活时间分别为 62±22, 44±16 及 36±11 h(表 1); ♂虫分别为 68±25, 43±19 及 46±20 h, 均显著地短于对照组的 106±10 及 115±8 h($P<0.01$)。虫与药 <0.5 $\mu\text{g/ml}$ 接触后, 其活动情况及存活时间与对照组无显著差异($P>0.05$)。成虫在药 10 $\mu\text{g/ml}$ 中 8 h 后, 虫体的内部结构清晰, ♀虫生殖器内的胚胎颗粒排列整齐, 子宫腔内微丝蚴的蠕动情况与对照组相仿。24 h 后♀虫的结构较模糊, 体腔间隙稍增宽, 未见子宫腔内微丝蚴蠕动。48 h 后♀、♂虫的内部结构较模糊, 胚胎颗粒及微丝蚴轮廓不清。

♀虫与药 1 $\mu\text{g/ml}$ 接触 24 及 48 h 或和 10 $\mu\text{g/ml}$ 的接触 24 h 后, 每条♀虫产出的微丝蚴数分别为 417±222, 521±222 及 215±76

Table 2. Effect of furaprimidone(F), levamisole (L) and hetrazan (H) *in vitro* on number of microfilariae released by ♀ worms of *B. malayi*. n = 4 samples. $\bar{x} \pm SD$. *P>0.05, ***P<0.01.

Drug $\mu\text{g/ml}$	Number of microfilariae	
	24 h	48 h
—	3261±1229	4213±1460
F	1	417±222***
	10	215±76***
L	1	287±146***
	10	305±159***
H	500	1729±876*
	1000	235±114***
		2088±878*
		397±204***

条(表 2), 与相应的对照组比较, $P<0.01$ 。

2. 左旋咪唑 成虫与含左旋咪唑 0.1—

1000 $\mu\text{g/ml}$ 的血清-台氏液接触后, 立即蜷缩, 活动微弱, 但在 $<100 \mu\text{g/ml}$ 中 2 h 后, 蜷缩的虫体可逐渐缓解, 活力稍有恢复, 但 1 d 后活力又再次减弱, 终至死亡。成虫在 $>1 \mu\text{g/ml}$ 中的存活时间与对照组相比, $P < 0.05$ 或 0.01 。在 $10 \mu\text{g/ml}$ 中 8 h 后, 虫体的内部结构及子宫腔内微丝蚴的蠕动情况与对照组相似, 但 24 h 后, ♀ 、 ♂ 虫的结构均较模糊, 子宫腔内的微丝蚴亦停止蠕动。

♀ 虫与药 $1 \mu\text{g/ml}$ 接触 24 及 48 h 或和 $10 \mu\text{g/ml}$ 的接触 24 h 后, 每条 ♀ 虫产出的微丝蚴数分别为 287 ± 146 , 386 ± 134 及 305 ± 159 条, 与相应的对照组比较, $P < 0.01$ 。

3. 海群生 成虫在含海群生 0.05 mg/ml 的血清-台氏液中, 其活动无明显改变。在 1 mg/ml 的药液中 7 h 后, 虫体活力开始减弱。当浓度为 $0.1, 0.5, 1, 2.5 \text{ mg/ml}$ 时, 虫的平均存活时间与对照组相比, $P < 0.05$ 或 < 0.01 。在 1 mg/ml 的药液中 8, 24 及 48 h 后, 其内部结构及子宫腔内微丝蚴的蠕动情况与对照组相仿, 72 h 后, 结构始较模糊, ♀ 虫子宫腔内微丝蚴亦停止蠕动。

♀ 虫在含海群生 0.5 及 1 mg/ml 的培养液中 24 h 后, 每条 ♀ 虫产出的微丝蚴数分别为 1729 ± 876 和 235 ± 114 条; 48 h 后分别为 2088 ± 878 和 397 ± 204 条, 其中 1 mg/ml 组与对照组比较, $P < 0.01$ 。

药物在体外对马来丝虫微丝蚴的作用(表 1)

1. 吡喃酮 微丝蚴在含吡喃酮 $>50 \mu\text{g/ml}$ 的药液中 2 h 后, 活力明显减弱, 6-8 h 后陆续死亡。当浓度为 $0.5, 1, 5, 10, 50$ 及 $100 \mu\text{g/ml}$ 时, 微丝蚴的平均存活时间分别为 $77 \pm 33, 47 \pm 18, 23 \pm 1, 22 \pm 1, 14 \pm 7$ 及 $8 \pm 5 \text{ h}$, 均显著地短于对照组的 $252 \pm 50 \text{ h}$ ($P < 0.01$)。微丝蚴在 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 的药液中, 未见活动有明显影响, 其存活时间与对照组相比, 亦无显著差异。

2. 左旋咪唑 微丝蚴在含左旋咪唑 $50-100 \mu\text{g/ml}$ 的培养液中, 活力很快下降, 4 h

后在 $1000 \mu\text{g/ml}$ 组中的微丝蚴逐渐死亡。药物浓度 $>10 \mu\text{g/ml}$ 时, 微丝蚴的存活时间与对照组的存活时间相比, $P < 0.01$ 。

3. 海群生 在含海群生 2.5 mg/ml 的培养液中 7 h 后, 微丝蚴活力减弱, 24 h 后陆续死亡。当浓度分别为 $0.5, 1$ 及 2.5 mg/ml 时, 其平均存活时间均比对照组的为短 ($P < 0.05$ 或 0.01)。

讨 论

长期来, 由于缺乏合适的人体丝虫动物模型, 因此在观察药物对丝虫的体外作用时, 多采用犬恶丝虫、棉鼠丝虫、獼猴丝虫及彭亨丝虫等。近年来, 随着长爪沙鼠接种马来丝虫动物模型的建立⁽⁶⁾, 为马来丝虫的体外观察创造了条件。通过初步比较, 证明采用 5% 小牛血清的含糖 (0.5% 葡萄糖) 台氏液作培养液, 在不需每天调换培养液的情况下, 成虫可存活 5 d 左右, 微丝蚴可存活 10 d 以上, 基本上可以满足体外药物试验的要求。

实验结果表明, 吡喃酮 0.5 及 $1 \mu\text{g/ml}$ 即分别对体外的马来丝虫成虫和微丝蚴有直接的杀死作用。三种抗丝虫药物体外杀虫作用的比较结果, 吡喃酮杀死微丝蚴所需的浓度为左旋咪唑的 $1/20$, 为海群生的 $1/1000$; 吡喃酮杀死成虫所需的浓度与左旋咪唑相同, 但为海群生的 $1/100$ 。吡喃酮的代谢研究得出⁽⁷⁾, 正常家兔 1 次 po 吡喃酮 50 mg/kg 后 30 min, 其血药浓度可高达 $30 \mu\text{g/ml}$ 以上, 4 h 后降至 $4 \mu\text{g/ml}$ 左右。人和动物 po 海群生后, 虽其血药浓度可达到 $4-5 \mu\text{g/ml}$ ⁽⁸⁾, 但体外杀死成虫和微丝蚴所需的海群生浓度在 $100 \mu\text{g/ml}$ 以上, 而吡喃酮为 $1 \mu\text{g/ml}$ 。因此, 在宿主体内吡喃酮可能亦有直接杀死丝虫成虫和微丝蚴, 与海群生象调理素样的作用有所不同。

致谢 中华按蚊由彭小妹和高桂珍同志供给。

参 考 文 献

1 Michels JG, *J Org Chem* 1960 Dec; 25(12):2246

- 2 颜 闵、张 振、倪志刚、于继实、雷兴翰、席裕瑞、徐裕信. 药学学报 1981 年 12 月; 16(12):902
 3 席裕瑞、杨元清、杨惠中、徐裕信、郭惠芳、聂晋华、刘和香. 中国药理学报 1980 年 9 月; 1(1):56
 4 杨元清、杨惠中、徐裕信、席裕瑞. 中国药理学报 1981 年 12 月; 2(4):285

- 5 Roger R, Denham DA. *J Helminthol* 1976 Mar; 50(1):21
 6 Ash LR, Riley JM. *J Parasitol* 1970 Oct; 56(5): 969
 7 上海医药工业研究院. 待发表
 8 Hawking F. *Prog Drug Res* 1966; 9:191

Acta Pharmacologica Sinica 1982 Dec; 3 (4) : 280—283

EFFECT *IN VITRO* OF FURAPYRIMIDONE ON ADULT WORMS AND MICROFILARIAE OF *BRUGIA MALAYI*

XI Yu-rui, NIE Jin-hua, XU Yu-xin

(*Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences, Shanghai 200025*)

ABSTRACT Furapyrimidone, 1-[(5-nitrofurayl-2) methylene amino]-tetrahydropyrimidine-2-one, is a new antifilarial agent discovered in China. Its effects on adult worms and microfilariae of periodic *Brugia malayi* were studied in calf serum-Tyrode solution (1:20) containing 0.5% glucose. Furapyrimidone was lethal to adult worms and microfilariae and suppressed ♀ worms to release microfilariae at 1 µg/ml. When adult worms were kept in a medium containing furapyrimidone 50 µg/ml, the worms gradually lost their motility and died after 20 h. When adult worms were placed in fura-

pyrimidone 1 µg/ml, the release of microfilariae by ♀ worms was suppressed and the survival time of adult worms was much shorter than that of controls ($P < 0.01$). Microfilariae kept in a medium containing furapyrimidone 5 µg/ml were all killed within 24 h. The survival time of microfilariae in furapyrimidone 0.5 µg/ml was shorter than that of controls ($P < 0.01$).

KEY WORDS furapyrimidone; antifilarial agent; *Brugia malayi*; microfilariae

This investigation received partial support from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.