

文章编号:1000-7423(2008)-06-0442-03

【论著】

磷酸萘酚喹伍用青蒿素对猴疟原虫的药效学研究

王京燕, 丁德本, 李国福, 赵京花

【摘要】 目的 研究磷酸萘酚喹与青蒿素伍用对猴疟的治疗作用。方法 感染诺氏疟原虫恒河猴模型随机均分为 9 组 (3 只/组), A 组和 B 组分别灌服 6 和 10 mg/kg 磷酸萘酚喹 3 d, 1 次/d; C 组和 D 组分别灌服 31.6 和 100 mg/kg 青蒿素, 第 1 天 2 次, 第 2~3 天各 1 次; E 组、F 组和 G 组用 10 mg/kg 磷酸萘酚喹分别与 10、20 和 25 mg/kg 青蒿素配伍 (即以 1:1、1:2 和 1:2.5 配伍) 灌服; H 组和 I 组分别灌服单药磷酸萘酚喹 10 mg/kg 和青蒿素 30 mg/kg。于给药后 24 h 观察原虫感染率, 以给药后 105 d 查不见原虫为治愈标准。结果 给药后 24 h, A、B、C、D 组原虫下降率均超过 90%。E、F 和 G 组平均原虫转阴时间依次为 (56.0±16.0)、(53.3±4.6) 和 (56.0±8.0) h, 均较 H 组 [(69.3±4.6) h] 快。A、B、D、E、F 和 G 组治愈猴数分别为 1、3、3、2、2 和 3 只。C、H 和 I 组均未治愈。结论 磷酸萘酚喹与青蒿素伍用可降低伍用单药剂量, 缩短疗程, 提高治愈率, 两药 1:2.5 的比例配伍治愈率达 100%。

【关键词】 磷酸萘酚喹; 青蒿素; 诺氏疟原虫; 猕猴

中图分类号: R513.39

文献标识码: A

Therapeutic Efficacy of Naphthoquine Phosphate Combined with Artemisinin against *Plasmodium knowlesi*

WANG Jing-yan, DING De-ben, LI Guo-fu, ZHAO Jing-hua

(State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

【Abstract】 Objective To study the antimalarial activity of naphthoquine phosphate combined with artemisinin against *Plasmodium knowlesi* in rhesus monkey. **Methods** Monkeys were randomly divided into 9 groups (3/group). The monkeys in groups A and B were treated i.g. once daily for 3 days with 6 or 10 mg/kg of naphthoquine phosphate respectively. Those in groups C and D were treated i.g. twice for the 1st day and once for the 2nd and 3rd day with 31.6 or 100 mg/kg of artemisinin respectively. In groups E, F and G, they were treated i.g. only once with the combination of naphthoquine phosphate 10 mg/kg and artemisinin 10, 20 or 25 mg/kg respectively. Groups H and I served as controls which were treated i.g. only once with 10 mg/kg of naphthoquine phosphate and 30 mg/kg of artemisinin respectively. Parasitemia was examined beginning 24 h after drug administration. The observation lasted 105 days when no more parasite was found. **Results** At 24 h after drug administration, the parasite reduction rate in all groups was higher than 90%. The parasite clearance time for groups E, F and G was (56.0±16.0), (53.3±4.6), and (56.0±8.0) h respectively, more rapid than that of Group H [(69.3±4.6) h]. There were 1, 3, 3, 2, 2, and 3 monkeys in groups A, B, D, E, F, and G respectively which were cured. No monkeys were cured in groups C, H and I. **Conclusion** The combination of naphthoquine phosphate and artemisinin is superior to the single component and the optimum proportion in the combination is 1:2.5 in treating *P. knowlesi* infection in monkeys.

【Key words】 Naphthoquine phosphate; Artemisinin; *Plasmodium knowlesi*; Rhesus monkey

Supported by Science Foundation of the Military Medicine and Health (No. 9108035-39)

疟疾防治面临严峻的抗药性问题, 抗药性恶性疟原虫几乎遍布所有恶性疟流行区, 且抗性强度不断增强, 由单一抗性向多药抗性发展的趋势。抗性产生的速度惊人, 以致新药上市后临床使用寿命短于研制一

个新药的时间。磷酸萘酚喹和青蒿素均是我国研制的抗疟药。磷酸萘酚喹虽是一种高效的抗疟药, 但动物模型显示疟原虫极易产生抗性。青蒿素是目前惟一尚未报道产生抗性的抗疟药, 但其半衰期短, 服药疗程较长。为保护新药, 延长其使用寿命, 本研究观察磷酸萘酚喹与青蒿素伍用对猴疟模型的疗效, 以确定两药伍用的治疗效果以及伍用的最适配比, 为进一步研

基金项目: 军队医药卫生科研基金 (No. 9108035-39)

作者单位: 军事医学科学院病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

究两药的复方提供实验依据。

材料与方 法

1 药 物

磷酸萘酚喹(naphthoquine phosphate, NP)由本实验室合成(批号为 900608),青蒿素(artemisinin, A)购自海口市制药厂(批号为 890928)。实验所用磷酸萘酚喹剂量均按碱基含量计算。

2 疟原虫

诺氏疟原虫(*Plasmodium knowlesi*) inui 株, 1983 年由 中 国 预 防 医 学 科 学 院 寄 生 虫 病 研 究 所(现 中 国 疾 病 预 防 控 制 中 心 寄 生 虫 病 预 防 控 制 所)引 入 本 实 验 室, 在 本 实 验 室 液 氮 低 温 保 存 并 定 期 血 传。

3 实验动物和模型建立

恒河猴(*Macaca mulatta*)28 只, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 合格证号京动字第 8910MK01, 体重 4.5~7.0 kg, 雌、雄兼用。分笼饲养, 观察 1 周, 饲本院实验动物中心提供的标准混合饲料, 自由饮水。经血片检查无疟原虫及肝囊原虫者备用。

取 1 ml 含有诺氏疟原虫红内期无性体的冷冻血, 复温后经小腿静脉接种于健康猴(献血猴)体内复苏。当其红细胞疟原虫无性体感染率达 10%左右, 取静脉血计算红细胞疟原虫感染率, 生理盐水稀释后每只实验猴接种 10⁸ 个被感染的红细胞。每天涂薄血片 1 次, 油镜下计算红细胞疟原虫感染率达到 3%~5% 时, 用于以下实验。

4 实验方法

恒河猴随机均分为 9 组(3 只/组), A 组和 B 组分别灌服 6 和 10 mg/kg 磷酸萘酚喹组 3 d; 1 次/d, C 组和 D 组分别灌服 31.6 和 100 mg/kg 青蒿素, 第 1 天 2 次, 第 2~3 天各 1 次; E、F 和 G 组用 10 mg/kg 磷酸萘酚喹分别与 10、20 和 25 mg/kg 青蒿素配伍(即以 1:1、1:2 和 1:2.5 比例伍用)灌服; H 组和 I 组分别灌服 10 mg/kg 磷酸萘酚喹和 30 mg/kg 青蒿素, 作为平行对照组。将胃管插入猴胃中, 确认胃管进入胃部后给药, 用注射器推注药液后, 再推注 5 ml 自来水冲洗胃管。

5 观察指标

给药后每 8 h 涂血片查疟原虫 1 次, 厚血膜 200 个视野查不到疟原虫为阴性, 以首次出现阴性血片的采血时间为原虫转阴时间。计算 24 h 原虫下降率, 计算公式: 24 h 原虫下降率=(给药前原虫感染率-给

药后 24 h 原虫感染率)/给药前原虫感染率。记录治愈情况, 原虫转阴后 15 d, 每天涂血片检查 1 次, 16~105 d 每 2 天检查 1 次, 观察是否有原虫复燃情况, 并记录天数。治愈判断标准为^[1]: 无效(I), 原虫感染率与给药前无明显差别或继续增多; 轻度抑制(SS), 原虫感染率暂时受到抑制, 但以后又升高; 显著抑制(MS), 原虫转阴 2 d, 但 30 d 内再次查见原虫; 完全抑制(CS), 原虫转阴后 31~105 d 内再次查见原虫; 治愈(C), 原虫转阴后 105 d 内未查见原虫。

结 果

1 24 h 原虫下降率

给药后 24 h 所有实验组原虫下降率均超过 90%, 表明在猴疟模型上两种药物杀虫速度均较快。E 组、F 组和 G 组 24 h 原虫下降率分别为(98.7±1.1)%、(98.7±1.0)% 和 (99.0±0.7)%, 而 H 组和 I 组 24 h 原虫下降率分别为(95.2±3.7)%和(96.6±3.4)%, 即两药配伍后的杀虫速度略优于单药组(表 1)。

表 1 磷酸萘酚喹、青蒿素对诺氏疟原虫的疗效
Table 1 Antimalarial activity of naphthoquine phosphate(NP) or artemisinin(A) against *Plasmodium knowlesi*

实验组 Group	24 h 原虫下降率 Parasitemia reduction rate in 24 h(%)	原虫清除时间 Parasite clearance time(h)	治愈数/猴数 No. cured/ No. animals
A组 Group A	94.9±0.9	56.0±6.9	1/3
B组 Group B	96.8±2.4	60.0±12.0	3/3
C组 Group C	92.8±1.8	72.0±1.0	0/3
D组 Group D	97.6±1.8	60.0±0.4	3/3
E组 Group E	98.7±1.1	56.0±16.0	2/3
F组 Group F	98.7±1.0	53.3±4.6	2/3
G组 Group G	99.0±0.7	56.0±8.0	3/3
H组 Group H	95.2±3.7	69.3±4.6	-
I组 Group I	96.6±3.4	未转阴	-

2 原虫清除时间

两药伍用组(E、F 和 G 组)平均原虫清除时间依次为(56.0±16.0)、(53.3±4.6)和(56.0±8.0) h, 单药磷酸萘酚喹(H 组)为(69.3±4.6) h, 青蒿素组(I 组)未转阴。从原虫清除时间看, 两药伍用组间差异无统计学意义(P>0.05), 但比单药磷酸萘酚喹组(H 组)快 13~16 h, 明显优于单药青蒿素组(I 组)。

3 治愈效果

单药多次给药组即 A、B、C 和 D 组治愈猴数分别为 1/3、3/3、0/3 和 3/3(表 1)。而两药伍用组的 E、F 和 G 组治愈猴数分别为 2/3、2/3 和 3/3, 其中 E 和 F 组各有 1 只猴分别于原虫转阴后 24 和 19 d 复燃。单药磷酸萘酚喹组(H 组)3 只猴原虫转阴后, 分别在 19、19 和 29 d 复燃。青蒿素组(I 组)

给药后原虫暂时受到抑制，后又升高，3 只猴均未治愈。可见在猴疟实验治疗中，磷酸萘酚喹和青蒿素伍用，可明显提高疗效。

讨 论

2006 年 WHO 出版的“疟疾治疗指南”^[2]中正式提出，治疗无并发症恶性疟须使用以青蒿素类药物为基础的联合疗法 (artemisinin-based combination therapy, ACT)，要求停止使用青蒿素类单方制剂，以延缓或防止疟原虫对此类药物产生抗药性^[3]。

复方蒿甲醚 (Coartem) 是军事医学科学院研制的第一个 ACT 药物，2002 年被列入 WHO 基本药物核心目录，推荐为治疗抗药性恶性疟的首选药物。在此基础上作者进行了青蒿素与磷酸萘酚喹复方的研究，青蒿素与磷酸萘酚喹伍用在鼠疟模型上显示出很好的增效作用，对鼠疟敏感株和抗氯喹株的增效指数分别为 4.2 和 8.2。在鼠疟模型上进行抗药性培育，至 100 代时，青蒿素、磷酸萘酚喹及其伍用的抗性指数分别为 5.6、200.3 和 4.4，两药伍用可明显延缓磷酸萘酚喹抗性的产生，降低抗性程度^[4]。在此基础上，本实验对这两药伍用在猴疟模型上的药效学进行了研究，磷酸萘酚喹多次给药的总剂量达 18 mg/kg，治愈数仅为 1/3。青蒿素多次给药总剂量达 126.4 mg/kg，未治愈。而磷酸萘酚喹与青蒿素以 1 : 1、1 : 2 和 1 : 2.5

比例配伍，治愈数分别为 2/3、2/3 和 3/3。平行对照组的 6 只实验猴无一治愈。本研究结果显示，在猴疟实验治疗中磷酸萘酚喹与青蒿素配伍可明显提高疗效，降低伍用单药剂量，缩短疗程，提高治愈率，其中 1 : 2.5 比例组治愈率达 100%。猴疟模型的实验结果可为磷酸萘酚喹和青蒿素复方的临床研究提供依据。

磷酸萘酚喹与青蒿素配伍增加疗效的作用机制还不十分清楚。青蒿素与磷酸萘酚喹的药代动力学特点不同，青蒿素进入体内迅速吸收，短时间即达到峰浓度，但消除也快，而磷酸萘酚喹则是半衰期较长的药物。两药伍用可能通过作用不同的靶点以及药代动力学而提高疗效，其作用机制尚待深入研究阐明。

参 考 文 献

- [1] Davidson DE, Johnsen DO, Tanticharoenyos P, et al. Evaluating new antimalarial drugs against trophozoite induced *Plasmodium cynomolgi* malaria in rhesus monkeys[J]. Am J Trop Med Hyg, 1976, 25(1): 26-33.
- [2] World Health Organization. Guidelines for the Treatment of Malaria[M]. WHO, Geneva, 2006: 16-38.
- [3] WHO call for an immediate halt to provision of single-drug artemisinin malaria pills, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr02/en/index.html>
- [4] Wang JY, Cao WC, Shan CQ, et al. Naphthoquine phosphate and its combination with artemisinin[J]. Acta Trop, 2004, 89 (3): 375-381.

(收稿日期: 2008-04-30 编辑: 杨频)

文章编号: 1000-7423(2008)-06-0444-02

【研究简报】

人芽囊原虫标本染色方法的改进

张瑞其¹, 陈厚彪², 危会萍³, 苏水莲^{1*}

【提要】 人芽囊原虫标本经肖氏液固定后，用改良的哈氏苏木素染色。结果表明，标本内部结构清晰，中心体明显，与传统的铁苏木素染色方法相比，染色效果好，制片时间短，操作步骤简单。

【关键词】 人芽囊原虫；标本；染色

中图分类号: R382.9

文献标识码: B

Staining Improvement for *Blastocystis hominis* Specimen

ZHANG Rui-qi¹, CHEN Hou-biao², WEI Hui-ping³, SU Shui-lian^{1*}

(1 Microbiology Laboratory of Gannan Medical College, Ganzhou 341000, China; 2 Pediatrics department, Hospital for Women and Children, Ganxian 341100, China; 3 Ganzhou City Hospital, 341000, China)

【Abstract】 Schaudinn solution was used to fix the *Blastocystis hominis* specimen and an improved Harris hematoxylin staining was applied to stain it. The method shows clearer internal structure of the parasite, simpler and less time-consuming than the traditional iron hematoxylin solution.

【Key words】 *Blastocystis hominis*; Specimen; Staining

* Corresponding Author, E-mail: ssushui@gmail.com

作者单位: 1 赣南医学院显微实验室, 赣州 341000; 2 赣县妇幼保健院儿科, 赣县 341100; 3 赣州市立医院, 赣州 341000

* 通讯作者, E-mail: ssushui@gmail.com