

伯氏疟原虫 ANKA 株模型的建立及其在抗疟药筛选中的应用

陈 林 郭凤川 戴祖瑞 李从军

(第二军医大学抗疟药研究室)

提要 本文报告伯氏疟原虫 ANKA 株—斯氏按蚊—小鼠($C_{57}BL$ 或 ICR/JCL)模型。实验证明,国内常用的 6 个品系($C_{57}BL$, ICR/JCL, 615, SMMC/B, SMMC/C 和昆明系)小鼠对伯氏疟原虫 ANKA 株输血感染都很敏感;在一定条件下,42 批斯氏按蚊对伯氏疟原虫 ANKA 株的腺感染率为 $38.0 \pm 4.8\%$ 。孢子腹腔接种后,以 $C_{57}BL$ 和 ICR/JCL 小鼠最为敏感,且感染后小鼠平均存活 20 天左右。这一虫株对氯喹、甲氟喹、伯喹、乙胺嘧啶等都敏感,能正确反映常用抗疟药物的病因性预防作用和红细胞内特效作用。

关键词 抗疟药;伯氏疟原虫 ANKA 株;鼠疟模型;抑制性治疗;病因性预防作用;红细胞内特效作用

鼠疟模型是抗疟药物筛选中应用最广且较为稳定的一种测试系统,但国内长期用于抑制性治疗筛选的伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*)印度株由于长期血传保种,失去了蚊传能力,不能用于病因性预防药物的筛选。约氏疟原虫(*P. yoelii*)BY 265 株虽可用于疟疾病因性预防药物的筛选,但毒力较低,有自愈趋势,不适用于抑制性治疗效果的观察。为此建立一种既能观察抑制性治疗又能观察病因性预防,且对常用抗疟药敏感的鼠疟模型实为当务之急。我们对从英国引进的伯氏疟原虫 ANKA 株建立了血传和蚊传方法,完成了生活史,并初步用于抑制性治疗和病因性预防筛选,现将实验结果报告如下:

材 料 和 方 法

虫株 伯氏疟原虫 ANKA 株,1981 年 9 月引自英国伦敦卫生与热带医学院医学原虫学系。

小鼠:近亲交配品系有 $C_{57}BL$; ICR/JCL; 615; SMMC/B 和 SMMC/C,远亲交配品系为昆明系。所有小鼠均由本校动物室供应,小鼠饲料为上海市畜牧兽医协会实验动物组统一配方的含有多种营养成分的饼干。

蚊虫:斯氏按蚊(*Anopheles stephensi* Hor 株),按常规饲养,羽化的成蚊于感染前 1 天移至 $21 \pm 1^\circ C$ 、相对湿度 $80 \pm 10\%$ 的恒温室内,叮咬感染有伯氏疟原虫 ANKA 株的小鼠。

输血感染:抽取♂小鼠心脏血液,用 5%葡萄糖盐水将血液稀释成每 0.4 ml 内含 1×10^7 个受染红细胞的悬液,腹腔接种小鼠。

孢子感染:方法见前报道⁽¹⁾,观察指标为感染小鼠的原虫血症密度,原虫血症的自然消长规律和小鼠死亡数及其存活时间等。

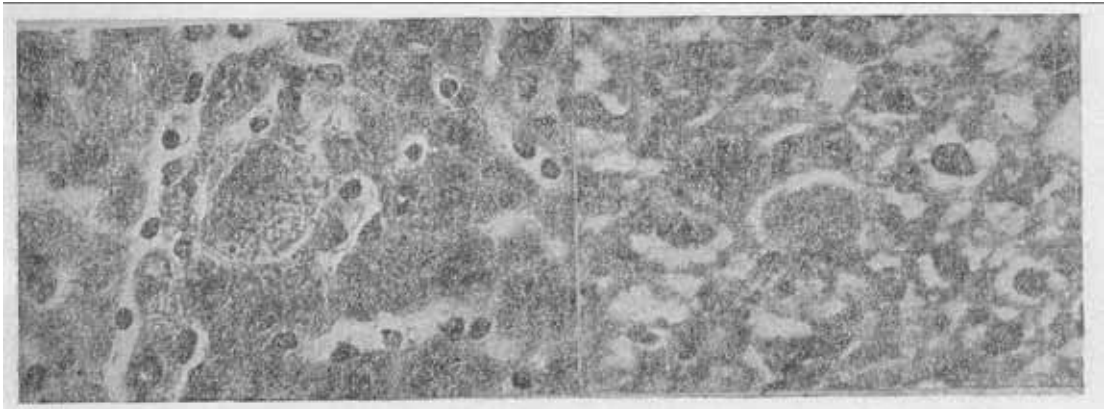
抗疟药物的实验治疗：常用抗疟药剂量按 mg (基质)/kg 计算，以聚乙二醇及吐温-80 研磨成所需浓度混悬液，灌胃给药。抑制性治疗药物筛选：用 4 天抑制性治疗试验法，d 4 取小鼠尾血涂薄血膜，用吉氏染色计数 1×10^3 个红细胞中原虫得感染率，以查 2×10^4 个红细胞未见原虫者为阴性，经初筛和复筛后用直线回归法求出 ED_{50} 及其 95% 可信限。病因性预防药物筛选：用 Peters 改良法 d 3 起至各组红细胞的原虫感染率达 2% 时止，每天血检，至 d 14 未查见原虫者为阴性，计算各组红细胞的原虫感染率达到 2% 的时间(天) (pre-2% -patency period, day, p 2 pp, d)。

结 果

1. 6 个品系小鼠输血感染的结果 6 个品系小鼠，每品系 15~36 只 (每次实验 5~12 只，重复 3 次)，接种后 6 小时取尾血检查原虫，以后每日血检至小鼠死亡。结果表明，各品系小鼠对伯氏疟原虫 ANKA 株输血感染都很敏感，阳性率均为 100%，感染 6 小时后，即可出现原虫血症，并均在 18 天内死于原虫血症。所不同者 ICR/JCL, SMMC/B, SMMC/C 和昆明系小鼠达到原虫血症高峰时间较快 (平均 10 天以内)，死亡时间也较早 (平均 10 天左右)，而 C_{57} BL 和 615 小鼠达到原虫血症高峰时间较迟 (平均 11 天以上)，小鼠死亡时间也较晚 (平均 13 天以上)。

2. 斯氏按蚊的易感性 同批小鼠经输血感染 (血传 3 代内的小鼠作种源鼠) 后的不同天数 (第 2 至 6 天) 分别给斯氏按蚊叮咬，结果均以输血接种后第 4 天叮咬感染的蚊腺感染率为高 (35~40%)。在正常条件下 (种源鼠血传感染 3 代以内，输血感染后第 3, 4 天)，感染斯氏按蚊 42 批，102 笼，解剖结果，腺感染率平均为 $38.0 \pm 4.8\%$ 。

3. 红细胞前期的观察 将感染伯氏疟原虫 ANKA 株子孢子的斯氏按蚊涎腺制成悬浮液，经尾静脉注入小鼠 (C_{57} BL, ICR/JCL 和昆明系) 和大鼠，46 小时后在小鼠和大鼠肝组织切片中均找到了红细胞前期裂殖体⁽²⁾ (图 1)。



1. (C_{57} BL mice)

2. (ICR/JCL mice)

Fig 1. Morphology of pre-erythrocytic schizonts of *P. berghei* ANKA strain (in mice hepatocytes).

4. 小鼠对伯氏疟原虫 ANKA 株子孢子的易感性

腹腔接种 6 个品系小鼠，每品系 15~29 只，每鼠腹腔接种 4×10^4 个左右子孢子，感染结果见表 1。

表 1 指出 6 系小鼠对伯氏疟原虫 ANKA 株子孢子的易感性不同，以 C_{57} BL, ICR/JCL

Tab 1. Susceptibility of 6 strains of mice to *P. berghei* ANKA strain
(inoculated ip with sporozoites)

Mice	No. of positive mice/No. of test mice (%)	Prepatent period (days, $\bar{X} \pm SD$)	Peak parasitaemia density (% , $\bar{X} \pm SD$)	Peak parasitaemia time (days, $\bar{X} \pm SD$)	Survival time (days, $\bar{X} \pm SD$)*
C ₅₇ BL	18/21(85.7)	5.8±0.7	38.3±12.6	20.0±4.6	22.0±4.3
615	14/16(87.5)	5.3±1.5	17.2±12.4	10.0±1.7	10.0±1.5
ICR/JCL	14/15(93.3)	5.9±0.8	34.2±15.6	19.3±4.1	21.9±4.0
SMMC/B	10/22(45.5)	5.0±0.9	22.9± 5.4	11.0±3.8	12.4±4.1
SMMC/C	19/29(65.5)	5.0±1.2	36.0±14.7	18.2±6.2	19.5±6.1
Kunming	6/23(26.1)	5.3±0.6	31.1± 7.3	20.2±5.2	22.6±4.0

* Total mice died of parasitaemia

和 615 小鼠为最敏感, SMMC/C 与 SMMC/B 次之, 昆明系敏感性较差。小鼠存活时间以 C₅₇BL, ICR/JCL, SMMC/C 及昆明系最长, 平均都在 20 天左右, 615 及 SMMC/B 甚短, 平均仅为 10 天左右。

尾静脉接种 2 个品系小鼠各 21~22 只, 每鼠尾静脉接种 4×10^4 个左右孢子, 结果昆明系小鼠的阳性率由腹腔接种的 26.0% 提高到 68.0%, 但小鼠存活时间也从腹腔接种的 22 天缩短到 10.8 ± 2.3 天; ICR/JCL 系小鼠的阳性率反由腹腔接种的 93.3% 波动到 85%, 小鼠存活时间为 16.1 ± 6.1 天, 这一结果可能与正常的实验误差有关。

5. 常用抗疟药的生物效应

抑制性治疗 用昆明小鼠测定了氯喹、羟基哌喹、甲氟喹、伯喹和乙胺嘧啶等抗疟药物对伯氏疟原虫 ANKA 株的生物效应, 实验重复 2~3 次, 求出半数有效量(ED₅₀) 及其 95% 可信限, 各次结果基本一致。

Tab 2. ED₅₀ (po) of antimalarials in Kunming strain mice infected with *P. berghei* ANKA strain

Drug	ED ₅₀ (95% CL) mg (base)/kg/d × 4
Chloroquine	2.58(2.42~2.73)
Mefloquine	3.58(3.17~3.99)
Hydroxypiperazine	2.12(1.97~2.88)
Primaquine	2.76(2.60~2.93)
Pyrimethamine	0.20(0.16~0.25)

表 2 说明伯氏疟原虫 ANKA 株对上述常用抗疟药物的 ED₅₀ 与国外文献⁽³⁾ 报道的数据基本一致, 是敏感的。为了观察药物对不同小鼠品系感染的 ED₅₀ 有否差异, 用氯喹分别对 ICR/JCL 和昆明系小鼠进行了 ED₅₀ 的测定, 结果前者的 ED₅₀ 为 2.78 (2.53~3.05)mg/kg/d × 4, 后者为 2.58 (2.42~2.73)mg/kg/d × 4, 无显著差异。

病因性预防 按照 Peters 改良的方法, 用 C₅₇BL 小鼠对氯喹、伯喹、乙胺嘧啶等在伯氏疟原虫 ANKA 株—斯氏按蚊—小鼠模型上的病因性预防作用进行了测试, 结果见表 3。

根据药物效力值 >1.0 作为病因性预防的有效药物和剂量, 在 0.5~1.0 之间为稍有效药物和剂量, <0.5 为无效药物和剂量的标准⁽⁴⁾, 实验证明, 伯喹 30 mg/kg × 1 次, 乙胺嘧啶 0.1~1.0 mg/kg × 1 次为病因性预防有效药物和剂量; 而氯喹 30 mg/kg × 1 次, 羟基哌喹 15~30 mg/kg × 1 次为无效药物和剂量。

Tab 3. Causal prophylactic activity of antimalarials in *P. berghei* ANKA strain by Peters's method using C₅₇BL mice

Drug	Dose mg(base) /kg×1	Group patency				Group mean pre-2%-patency period				Activity values	
		1	2	3	4	1	2	3	4	Causal prophylactic activity	Residual activity in RBC
Control groups		3/3		3/3		7.1		5.1			
Chloroquine	30.0		3/3		3/3		7.4		5.3	0.1	0.2
Primaquine	30.0		0/3		3/3		>14.0		5.4	6.6	0.3
Pyrimethamine	1.0		0/3		3/3		>14.0		3.6	8.4	-1.5
	0.1		1/3		3/3		9.8		4.0	3.8	-1.1
Control groups		3/3		3/3		6.4		4.6			
Hydroxypiperazine	30.0		0/3		3/3		>14.0		9.0	-0.3	5.1
	15.0		3/3		3/3		8.2		6.5	0.1	1.9

讨 论

建立一个既能应用于疟疾抑制性治疗又能应用于病因性预防药物筛选的鼠疟模型,有利于去除由于鼠疟原虫虫株不同而产生的对抗疟药物统一评价的影响。Vanderberg⁽⁵⁾提出必须审慎地选择建立鼠疟模型的虫株,其中最重要的是虫株必需带有配子母体并能有规则地定期蚊传,以保持原虫的生物学特性和避免虫株的混杂。伯氏疟原虫 ANKA 株系 Bafort 首先分离, Vincke 等⁽⁶⁾、Vincke 和 Bafort⁽⁷⁾在实验室内完成了它的生活史,但不同品系小鼠对其子孢子的易感性不一,寻找对伯氏疟原虫 ANKA 株子孢子易感的小鼠品系,是建立模型的关键。我们用 5 个品系近交小鼠和 1 个品系远交小鼠多次进行易感性比较,证明 C₅₇BL、ICR/JCL 和 615 小鼠对其子孢子感染最为敏感(表 1)。

以伯氏疟原虫 ANKA 株—小鼠模型应用于抑制性治疗筛选,证明氯喹、甲氟喹、伯喹、乙胺嘧啶等对这一虫株的 ED₅₀ 值与国外报道⁽³⁾基本相似,未见自然抗性。结合 Peters 法,应用于病因性预防筛选证明伯喹、乙胺嘧啶和氯喹的作用与 Gregory 等⁽⁴⁾及我们过去⁽¹⁾用约氏疟原虫—斯氏按蚊系统的病因性预防试验结果基本一致。但约氏疟原虫—斯氏按蚊模型系统不能区分喹啉类型抗疟药的病因性预防作用和红细胞内的持效作用⁽¹⁾,而用伯氏疟原虫 ANKA 株—斯氏按蚊—小鼠模型结合 Peters 法,则能明确区分羟基喹啉无病因性预防作用和红细胞内有较强的持效作用,提高了筛选结果的准确性。

致谢 钱永乐、马志明、舒康全等同志参加此项工作, 我校寄生虫学教研室瞿逢伊教授审阅全文, 羟基喹啉由我室药化组提供

参 考 文 献

1. 陈林等: 疟疾防治药物的研究 II: 疟疾病因性预防药物筛选试验动物模型的研究 1. 约氏疟原虫——斯氏按蚊系统. 药理学报 16:260, 1981
2. 郭凤川、陈林: 伯氏疟原虫 ANKA 株红前期的初步观察. 寄生虫学与寄生虫病杂志, 待发表
3. Peters W: Chemotherapy and Drug Resistance in Malaria, p 172, Academic Press, London & New York, 1970
4. Gregory KG & Peters W: The chemotherapy of rodent malaria IX. Causal prophylaxis part I. A method for demonstrating drug action on exo-erythrocytic stages. Ann Trop Med Parasit 64:15, 1970
5. Vanderberg J P & Gwadz R W: The transmission by mosquitoes of plasmodia in the laboratory. In: Kreier J P ed: Malaria, Vol 2, pp 202~203, Academic Press, 1980

6. Vincke I H, et al: Observations récentes sur la transmission cyclique de *Plasmodium berghei*. *Ann Soc Belg Med Trop* 46:327, 1966
7. Vincke I H & Bafort J M: Résultats de deux années d'observation sur la transmission cyclique de *Plasmodium berghei*. *Ibid* 48:439, 1968

RODENT MALARIA MODEL OF *PLASMODIUM BERGHEI* ANKA STRAIN FOR ANTIMALARIALS SCREENING: ITS ESTABLISHMENT AND USE

CHEN Lin, GUO Feng-Chuan, DAI Zu-Rui and LI Cong Jun

(Laboratory for Antimalarial Drug Research, Second Military Medical College, Shanghai)

ABSTRACT For the purpose of screening both suppressive therapeutic and causal prophylactic antimalarials, *Plasmodium berghei* ANKA strain-rodent system and *P. berghei* ANKA strain-*Anopheles stephensi*-rodent (C₅₇BL or ICR/JCL strain) system were established. The results obtained are summarized as follows.

1. The inbred strains of mice (C₅₇BL, ICR/JCL, 615, SMMC/B, SMMC/C) and one outbred strain (Kunming strain) were all found to be very susceptible to infection by blood inoculation (dose: 1×10^7 rbc infected with *P. berghei* ANKA strain), the infection rate being 100%. 2. After the 3rd mice-to-mice passage of the parasite the salivary gland infection rate of the mosquitoes decreased markedly with each passage. The 4th day of blood induced infection was found to be the best time to feed mosquitoes. Under certain conditions the salivary gland infection rate of the *A. stephensi* was shown to be $38.0 \pm 4.8\%$. 3. A very significant difference in susceptibility to sporozoite-induced infection among different strains of the test mice was observed. C₅₇BL and ICR/JCL strains which showed a susceptibility rate of 85~93%, survived as long as 20 days on the average after ip inoculation with sporozoites. Tests of a number of current antimalarials in this model using the "4-day suppressive test" of blood schizontocidal action and Peters's method for causal prophylactic action showed that the ED₅₀s of drugs like chloroquine, mefloquine, primaquine and pyrimethamine were similar to those reported by other authors and that the drugs' causal prophylactic activity and residual activity could be correctly differentiated in one model. These results suggest that this may be a dependable model for antimalarials screening.

Key words Antimalarials; *Plasmodium berghei* ANKA strain; Rodent malaria model; Suppressive therapeutic activity; Causal prophylactic activity; Residual activity in RBC