

伯氏鼠疟原虫(*Plasmodium berghei*)对咯萘啶 抗药性的研究

邵葆若 叶秀玉 郑 浩

(中国医学科学院寄生虫病研究所, 上海)

提要 用本所传代已二十余年、对药物敏感的伯氏鼠疟原虫作种源, 每转种一代给小白鼠口服单次量咯萘啶。第1代剂量为8 mg/kg, 其后剂量每代增加2 mg/kg。转种至第23代, 剂量达2,400 mg/kg时, 虽部分小鼠死亡, 存活小鼠的原虫血症仍不转阴, 此时原虫的抗药性为亲代原虫的300倍以上。抗咯萘啶鼠疟原虫(RPB₂)对氯喹、喹啶、吡咯喹、M-6407、阿的平与青蒿素等有一定程度的交叉抗药性。用对亲代原虫有效量的3~10倍治疗RPB₂原虫时, 不能使原虫血症转阴。如不再用药, 连续转种5代, RPB₂可恢复对咯萘啶的敏感性。

关键词 疟疾; 疟原虫; 伯氏鼠疟原虫; 抗疟药; 裂殖体杀灭剂; 抗药性; 交叉抗性; 咯萘啶; 氯喹; 青蒿素

咯萘啶为我所于1970年合成的红内期裂殖体杀灭剂。小白鼠口服该药单次量的LD₅₀为1,368±238.9 mg/kg, 治疗伯氏鼠疟原虫感染小鼠的ED₅₀为6.8±1.4 mg/kg。咯萘啶具有毒性比氯喹低, 与抗氯喹鼠疟原虫无交叉抗药性等特点⁽¹⁾。现场试用证明, 咯萘啶治疗间日疟现症病人、恶性疟脑型患者与抗氯喹株恶性疟病例均获满意疗效⁽²⁾。

鉴于人疟原虫对药物产生抗性的报道日益增加, 而恶性疟原虫抗氯喹株的存在与扩散已成为东南亚和中南美洲抗疟工作中的一项突出问题, 因此, 了解咯萘啶在扩大应用中是否也可能出现抗药性等, 显然是十分必要的。本文报道伯氏鼠疟原虫对咯萘啶产生抗药性的实验研究。

材 料 和 方 法

材料

伯氏鼠疟原虫(*Plasmodium berghei*)亲代系(parent line)于1954年由印度引进, 经血液接种传代已二十余年。小白鼠系本所动物房繁殖, 实验开始时体重为18~22 g。磷酸咯萘啶(含盐基57%)和M-6407⁽³⁾均由本所药物化学研究室供给, 用时都按盐基量配成稀释液给小鼠灌胃。青蒿素系中国科学院上海药物研究所赠给。

方法

1. 抗咯萘啶鼠疟原虫(RP line)的培育(图1)

A组 正常小白鼠每鼠腹腔注射感染亲代系疟原虫的红细胞约 5×10^6 个, 此为第1代。待红细胞感染原虫率(EIR)达2%或以上时, 以其中5鼠给咯萘啶单次量8 mg/kg(\rightarrow ED₅₀的1.2倍), 另5鼠不给药。其后, 选择服药组中原虫血症复燃最快或未转阴且原虫密度最高的小鼠, 取其血, 用同样方法转种给15只正常小鼠。从第2代起, 待EIR上升达2%以上

时,分3组:(1)组不给药;(2)组给药剂量同上一代;(3)组给药量增加2 mg/kg,并取该组鼠血转种至下一代。设置(1)与(2)组是为必要时重复实验。每代以2 mg/kg剂量递增至第22代时,剂量达50 mg/kg。

B组 自A组的第17代起,每代给药剂量比上一代增加1~3.5倍,至第23代时剂量达2,400 mg/kg。

B₂组 从B组的第24~34代,每代给药量均为1200 mg/kg,自第35代起,每代剂量为600 mg/kg。

在各组转种传代过程中,每隔4~5代检测疟原虫对咯萘啶的敏感性。所用的测试剂量为培育起始量8 mg/kg的15~400倍,即120、2,400或3,200 mg/kg。

2. 抗咯萘啶鼠疟原虫(RP line)抗药性的消失(图1)

A₁组 从A组第24代起,每代给药剂量按2 mg/kg递减,至第44代剂量降到8mg/kg。以后连续5代的剂量均为8mg/kg。从第49代起,不再用药。

A₂组 从A组第24代起至第48代,每代剂量均为50 mg/kg。从第49代起,不再用药。

B₁组 从B组第24代起,每代剂量比上一代减20~50%,至第33代剂量降到8 mg/kg,以后每代均给8 mg/kg,至第49代起停止用药。

上述三组的第48代分别用1,200和2,400 mg/kg的咯萘啶测定疟原虫对药的敏感程度。连续停药5代至第54代时,用2,400、600和8 mg/kg三种剂量测定原虫的敏感性。

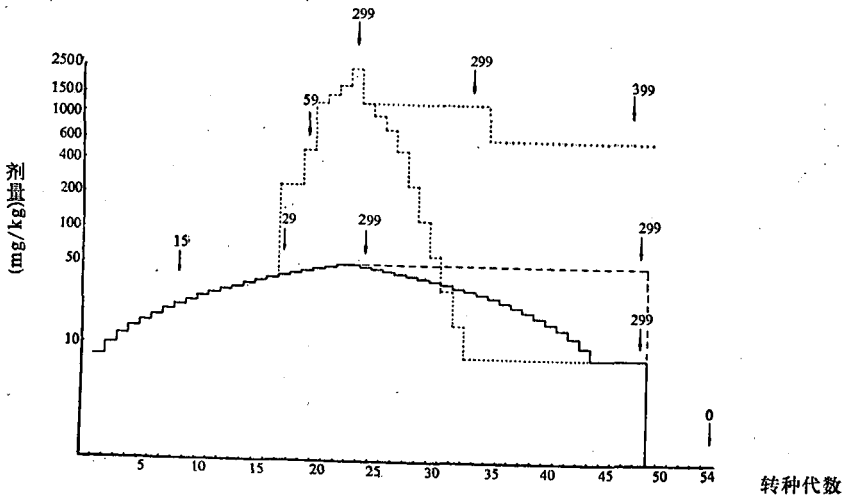


图1 鼠疟原虫对咯萘啶抗性的培育和抗性程度

- A₁组
- - - A₂组
- B₁组
- · · · · B₂组
- ↓ 抗性倍数

3. 抗咯萘啶鼠疟原虫(RPB₂ line)、抗氯喹鼠疟原虫(RC line)与亲代系原虫的毒力比较

RPB₂原虫自B₂组第35代起每代给咯萘啶600 mg/kg,至第47代时的抗性为亲代系的400倍以上。RC系原虫为本所培育⁽⁴⁾,对氯喹抗性比亲代大52倍以上。

取感染 RPB₂、RC 及亲代系的小鼠血，分别接种 10 只正常小鼠（♀♂各半），于 15 天内逐日查血，记录每千个红细胞的感染原虫率及小鼠死亡情况。

4. 抗咯萘啶鼠疟原虫(RPB₂ line)对 6 种抗疟药的敏感性

取 RPB₂ 系第 47 代(抗性>399)鼠血转种给正常小鼠后 72 小时，以每 5 鼠为一组，分别灌胃给一剂(盐基)氯喹、喹哌、吡咯喹、M-6407 和阿的平各 400 mg/kg 与青蒿素 1,200 mg/kg。同时观察药物对亲代系原虫的疗效，各药的剂量为上述剂量的 1/3 ~ 1/10。给药后的第 3~4 天查血。如用目镜 5~6× 和油镜 90~100× 检查 50 个视野(约 2.5×10⁴红细胞)，未检出原虫，作为阴性。

结 果

1. 抗咯萘啶鼠疟原虫的培育

接种亲代鼠疟原虫第 1 代的 5 只小鼠，灌服一剂咯萘啶 8 mg/kg 后 24 小时，原虫血症均明显下降，第 3 和第 4 天各有 2 和 4 只鼠的原虫血症转阴，另 1 只鼠从第 4 天起原虫密度回升。第 2 代起，药量虽逐代递增亦不能使原虫血症转阴，有的反而上升。至第 8 代，给药 120 mg/kg 后，原虫密度有所下降，但不转阴。第 17 代药量为 240 mg/kg 时，原虫密度与不给药对照组同样持续上升，与起始有效剂量 8 mg/kg 相比，具有 > 29 倍的抗药性。以后，不论是小剂量递增的 A 组或大剂量递增的 B 组，约经 5 ½ 月，至 23 或 24 代时测得其抗性程度均比亲代系大 299 倍以上(表 1, 图 1)。

表 1 抗咯萘啶鼠疟原虫(RP line)的培育结果

组 别	转种代数	抗性培育量 mg/kg	抗性测定量 mg/kg	D ₃₋₄ 原虫转阴鼠/ 检查鼠	平均原虫密度*		抗性程度**	小鼠死亡 情况***
					给 药 前 D ₀	给 药 后 D ₃₋₄		
A	1	0	8	4/5	62.0	1.6		
	2	8	10	0/5	32.2	106.2	>0.2	
	17	38	240	0/5	57.5	266.6	>29	
	21	46	1200	1/4	32.0	3.4	>149	D ₁
	24	50	2400	0/4	19.8	16.0	>299	D ₃ D ₄
B	19	240	480	0/5	42.8	69.0	>59	
	21	1200	1440	0/3	20.0	69.0	>179	D ₁ D ₃
	23	1680	2400	0/3	44.6	115.0	>299	D ₁ D ₂ D ₃

* 感染红细胞/10³红细胞

** 大于 8mg/kg 的倍数

*** D_i 右上数字示死亡鼠，右下数字示给药后天数，D₀ 为给药当天

2. 抗咯萘啶鼠疟原虫抗药性的消失

从第 24 代起按不同级差递减咯萘啶剂量的 A₁ 和 B₁ 组及每代给 50 mg/kg 的 A₂ 组，在第 48 代时，各组取 5 鼠给服一剂咯萘啶 2,400 mg/kg。给药后 2 天内除 4 只鼠因不能耐受该剂量而死亡外，其余 11 只鼠的原虫血症均持续阳性。各组自 49 代起停药 5 代，至第 54 代用 8 mg/kg 测定抗药性，原虫血症于第 4 天全部转阴(表 2)，表明原虫对药的抗性消失，恢复了对药的敏感性。

3. 抗咯萘啶鼠疟原虫(RPB₂)、抗氯喹鼠疟原虫(RC)与亲代原虫的毒力比较

三系原虫接种正常小鼠后，以亲代系的原虫密度上升最快，小鼠于 10 天内全部死亡(表

表 2 抗咯萘啶鼠疟原虫 (RP line) 抗药性的消失

组 别	转种代数	抗性培育量 mg/kg	抗性测定量 mg/kg	D ₃₋₄ 原虫转阴鼠/ 检查鼠	平均原虫密度*		抗性程度**	小鼠死亡 情况***
					给 药 前 D ₀	给 药 后 D ₃₋₄		
A ₁	24	50	2400	0/3	26.0	225.0	>299	D ₃ ¹ D ₄ ¹
	48	8	2400	0/3	21.0	0.1	>299	D ₃ ²
	54	0	8	5/5	37.0	0.0		
A ₂	48	50	2400	0/3	12.0	25.0	>299	D ₂ ² D ₃ ²
	54	0	8	5/5	28.8	0.0		
B ₁	23	1680	2400	0/3	44.6	115.0	>299	D ₁ ¹ D ₂ ¹ D ₃ ¹
	48	8	2400	0/5	18.4	19.0	>299	D ₃ ¹
	54	0	8	5/5	26.0	0.0		
B ₂	33	1200	2400	0/3	23.2	213.0	>299	D ₁ ¹ D ₂ ¹
	47	600	3200	0/5	16.6	30.0	>399	D ₃ ¹

* 感染红细胞/10³红细胞

** 大于 8mg/kg 的倍数

*** D₂¹ 右上数字示死亡鼠, 右下数字示给药后天数, D₀ 为给药当天

而 RPB₂ 系与 PC 系原虫密度的增长皆慢于接种亲代系的 (图 2)。结果表明, RPB₂ 系的毒力和 RC 系的相仿, 均低于亲代系。

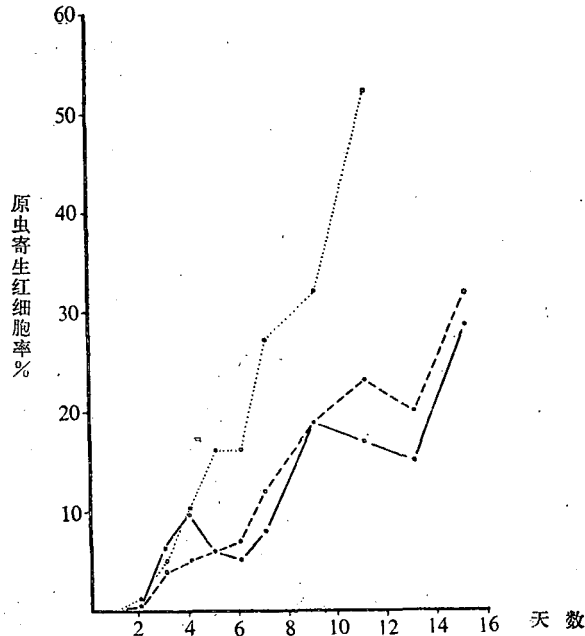


图 2 三系鼠疟原虫血液接种后原虫密度

- 抗咯萘啶系
- - - 抗氯喹系
- 亲代系

4. 抗咯萘啶鼠疟原虫 (RPB₂) 对 6 种红内期裂殖体杀灭剂的敏感性

氯喹、喹啶、吡咯喹、M-6407、阿的平和青蒿素在所用剂量下对 RPB₂ 系原虫无抑

表 3 小白鼠感染不同系鼠疟原虫后的死亡情况

原 虫 系	实验鼠 (只)	死 亡 鼠 数			
		1~5天	6~10天	11~15天	合 计
抗咯萘啶系 RPB ₂	10	0	4	4	8
抗氯喹系 RC	10	0	3	4	7
亲代系 P	10	2	8	...	10

制作用, 各组鼠的原虫血症均未转阴, 原虫密度与不给药对照组一样上升。亲代系原虫接种的小鼠用上述 6 种药治疗, 其剂量为治疗 RPB₂ 系的 1/3~1/6 时, 除青蒿素组仅 2 鼠的原虫血症转阴外, 其余 5 种药物组的原虫血症全部转阴(表 4)。结果表明 RPB₂ 系原虫对该 6 种抗疟药具有不同程度的交叉抗药性。

表 4 抗咯萘啶鼠疟原虫(RP line)及亲代系(P line)对 6 种抗疟药的敏感性

药 物	原 虫 系	剂 量 mg/kg	D ₄ 原虫转阴鼠/检查鼠	对药物敏感性
氯 喹	P	40	4/4	+
	RPB ₂	400	0/5	-
喹 啶	P	40	3/4	+
	RPB ₂	400	0/5	-
吡 咯 嗉	P	80	5/5	+
	RPB ₂	400	0/5	-
M-6407	P	40	5/5	+
	RPB ₂	400	0/5	-
阿 的 平	P	40	3/3	+
	RPB ₂	400	0/5	-
青 蒿 素	P	400	2/5	±
	RPB ₂	1200	0/5	-
对 照	P	...	0/5	...
	RPB ₂	...	0/5	...

讨 论

伯氏鼠疟原虫血传感染小白鼠, 每代所给咯萘啶的剂量不论是小剂量递增的 A 组或大剂量递增的 B 组, 至第 23 或 24 代都较快地培育出对咯萘啶具有高度抗性(> 299 倍)的原虫系。这种抗性原虫又同时对其他 6 种红内期裂殖体杀灭剂有一定的交叉抗药性。虽然实验室培育出抗咯萘啶鼠疟原虫的结果不能直接推论于人类疟原虫, 但结果提示, 应充分估计临床多次使用咯萘啶时可能出现原虫对咯萘啶的抗性与交叉抗药性。为此, 应有针对性、有计划地使用咯萘啶, 即应侧重在有抗氯喹株恶性疟的地区采用咯萘啶治疗抗氯喹株恶性疟患者和凶险型病人。在应用该药一个时期后, 应换用其他药, 以防产生抗性。同时还应建立必要的监测制度, 以了解疟原虫对药物效应的变化。

抗氯喹鼠疟原虫(RC)对咯萘啶相当敏感, 无交叉抗性。咯萘啶对 RC 原虫的 ED₅₀ 为 2.88 ± 0.48 mg/kg, 与它对亲代原虫的 ED₅₀ 2.61 ± 0.44 mg/kg 相仿⁽⁴⁾, 而本实验培育的

抗咯萘啶鼠疟原虫却对氯喹等有交叉抗药性。为此,探讨交叉抗性的机理、寻找对付抗咯萘啶原虫的有效药或研究防止产生抗性的配伍用药方法等,对充分发挥咯萘啶的抗疟作用将是很有意义的。

参 考 文 献

1. 中国医学科学院寄生虫病研究所原疟疾研究室新药组: 抗疟新药 7351 的疗效和毒性的实验研究. 药理学报 15:630, 1980
2. 中国医学科学院寄生虫病研究所: 实用疟疾学, p153, 人民卫生出版社, 1978
3. 黄兰孙等: 新抗疟药 M-6407 的合成. 药理学报 14:561, 1979
4. 周祖杰等: 鼠疟原虫 (*Plasmodium berghei*) 抗氯喹株的选育. 上海寄生虫病研究所研究技术资料汇编, p 183, 1972

DEVELOPMENT OF PYRONARIDINE-RESISTANCE IN *PLASMODIUM BERGHEI*

SHAO Bao-ruo, YE Xiu-yu and ZHENG Hao

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

ABSTRACT

Drug-sensitive *P. berghei* maintained by syringe passage for over 20 years was passed successively to clean mice under increasing selection pressure of pyronaridine base. Of the 5 mice administered single oral doses of 8 mg/kg (\odot 1.2 times its ED_{50}) in Passage 1, four mice were free from parasitemia 3~4 days after drug administration. From passage 2 onwards, an escalation of 2 mg/kg of pyronaridine per passage was performed. Five mice of Passage 2 were dosed with 10 mg/kg, but their parasitemia remained positive. This result suggested the commencement of drug resistance. By Passage 23, which was reached in about $5\frac{1}{2}$ months, a test dose of 2,400 mg/kg (\odot 1.8 times its LD_{50}) was given to a group of mice to assess the drug sensitivity. Though some of the mice died of the dosage, none of the survivors was free of plasmodium parasite. It was evident that a pyronaridine-resistant line of *P. berghei* was fully developed as the parasites could tolerate a higher dose of pyronaridine than the hosts, bearing approximately a 300-fold resistance to pyronaridine when compared with the parent line.

The virulence of pyronaridine-resistant line was much lower than that of its parent line. The sensitivity of pyronaridine-resistant line to 6 erythrocytic schizontocides [chloroquine, piperquinoline, amopyroquine, M-6407 (a 4-aminoquinoline), mepacrine, qinghaosu] was also decreased significantly. By testing these drugs at doses over 3~10 times those effective to the parent line parasites, pyronaridine-resistant line failed to respond to the 6 drugs, indicating the presence of cross resistance of pyronaridine-resistant line to the 6 schizontocidal agents. However, when the pyronaridine pressure was lifted for 5 passages, the pyronaridine-resistant line was reverted to a pyronaridine sensitive line.

Key words Malaria; Plasmodium parasite; *Plasmodium berghei*; Antimalarials; Blood schizontocide; Drug resistance; Cross resistance; Pyronaridine; Chloroquine; Qinghaosu