

# 用小鼠约氏疟原虫筛选杀组织期抗疟药的方法\*

邵葆若 叶秀玉 郑浩 (中国医学科学院寄生虫病研究所\*\*, 上海 200025)

**提要** 根据约氏疟原虫子孢子 ip 昆明杂交小鼠后 30 min 即从血中消失, 原虫的虫现前期为 48 h 的生物学特点, 对几种筛选方法进行试验比较后, 提出初筛

杀组织期抗疟药的改进方法.

**关键词** 约氏疟原虫; 杀组织期裂殖体剂; 药物筛选; 抗疟药; 伯喹; 乙胺嘧啶

1983年5月14日收稿 1983年8月1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.

\*\* 世界卫生组织疟疾、血吸虫病、丝虫病合作中心.

鼠疟原虫子孢子接种小鼠后的组织期虽然短暂, 但因取材方便, 故被许多实验室作为病

因性预防药或根治药的初筛模型。国内采用约氏疟原虫子孢子接种小鼠当天起给药1-3d的方法<sup>(1-3)</sup>。为了得出用约氏疟原虫初筛杀组织期药的合适的给药时间、疗程和实验步骤,乃根据本株原虫子孢子ip至昆明杂交小鼠30min即从血中消失和原虫虫现前期为48h的生物学特点<sup>(4)</sup>,仿Gregory与Peters<sup>(5)</sup>的计算法及Hill<sup>(6)</sup>的转种法等,对常用抗疟药伯喹、乙胺嘧啶、氯喹和有特效杀红内期作用的咯萘啶<sup>(7)</sup>等进行了实验与比较,以期得出一种较实用的初筛方法。

## 材 料

约氏疟原虫 (*Plasmodium yoelii* Warhurs & Killick-Kendrick, (1967, 265-By)系1976年从法国引进,定期经斯氏按蚊 (*Anopheles stephensi* Liston, 1901) 传代保种。该株原虫的红内期对氯喹有一定的抗性。

小鼠为本所动物室繁殖的昆明杂交品系,体重18-22g, ♀♂均用。

咯萘啶、5-对氟苯氧基伯喹(M7844)和阿的平均由本所药物化学研究室提供;伯喹和氯喹为上海第十四制药厂产品;乙胺嘧啶为重庆西南制药厂产品。盐类药物均按盐基量配成溶液给小鼠ig,其余的加入少量吐温80后混悬于1%西黄蓍胶液ig。

## 方法与结果

### 仿Gregory及Peters公式计算法筛选抗疟

Tab 1. Test for antimalarial activity by Gregory and Peters' method

Drug	Intra-gastric dose (mg/kg)	Mice infected Mice examined					Group mean pre-2% period (day)					Residual Tissue schizontocidal action (i)	action (ii)
		C°	T°	C <sup>x</sup>	T <sup>x</sup>	XC	P <sup>f</sup>	P <sup>h</sup>	P <sup>c</sup>	P <sup>e</sup>	P <sup>b</sup>		
Primaquine	20		0/9		10/10		>14		5.5			1.0	>6.57
Pyrimethamine	1		0/10		9/9		>14		6.67			2.17	>5.4
Chloroquine	100		9/9		10/10				6.75	5.9		1.4	-1.08
Pyronaridine	10		0/10		5/10		>21		>20			15.5	-0.93
Control		9/10		10/10		10/10	6.43		4.5		4.5		

$$(i) = \frac{(P^b - a)(P^e - a)}{(P^c - a)} - (P^b - a) \quad (ii) = (P^h - P^f) - (i)$$

药(表1) 100只小鼠ip子孢子悬液后 $\frac{1}{2}$ h给药时分成A与B两大组,每组再分5小组;不给药对照组、伯喹20mg/kg、乙胺嘧啶1mg/kg、氯喹100mg/kg及咯萘啶10mg/kg. B组小鼠接种子孢子并给药后48h再ip接种 $5 \times 10^6$ 感染红细胞。全部鼠均从子孢子接种后d3起逐日作薄血膜镜检原虫,记录各鼠感染红细胞率达2%的时间,以50个油镜视野未查见原虫作为阴性。将各有关数据代入表1公式(ii),求出P<sup>s</sup>-P<sup>f</sup>值,评价各药的作用:

$$P^s - P^f > 1.0 \quad \text{对组织期有作用}$$

$$P^s - P^f \approx 0.5 - 1.0 \quad \text{对组织期有微效}$$

$$P^s - P^f < 0.5 \quad \text{对组织期无效}$$

结果, A组小鼠子孢子接种后ig伯喹、乙胺嘧啶、氯喹和咯萘啶(T°组)14d内原虫血症分别为0/9, 0/10, 9/9与0/10,不给药对照组(C°组)为9/10. B组小鼠于接种和给药后48h再ip感染红细胞(T<sup>x</sup>组)14d内的原虫阳性鼠依次为10/10, 9/9, 10/10, 5/10;子孢子接种后加种感染红细胞(C<sup>x</sup>组)及仅ip感染红细胞(XC组)各对照鼠的原虫血症皆为10/10. 这表明伯喹与乙胺嘧啶对组织期有效,但无杀红内期的特效;氯喹对组织期无效,该剂量亦未见杀红内期的特效;咯萘啶“有”杀组织期作用并有杀红内期特效. C°与T°等各组原虫血症达2%时间为P<sup>f</sup>及P<sup>h</sup>等. 将有关参数(本株原虫a=2)代入公式(ii),伯喹与乙胺嘧啶的P<sup>s</sup>-P<sup>f</sup>值均>1.0示有杀组织期作用,氯喹与咯萘啶之值<0.5示无杀组织期作用. 该结果与这4

Tab 2. Activity of 4 antimalarials (ig 1/2 h after sporozoite inoculation on d 0) on pre-erythrocytic stages of *Plasmodium yoelii*

Drug	Intragastric dose(mg/kg)	Mice infected/Mice examined							Tissue schizontocidal activity
		Mice inoculated with sporozoites			Recipient mice				
		d 7	d 14	d 21	d 5	d 10	d 20		
Primaquine	20	0/9	0/9	0/9	0/5	0/5	0/4	+	
M 7844	100	1/9	1/9	1/9	0/5	0/5	0/4	+	
Pyronaridine	10	0/9	0/9	0/8	1/5	1/4	0/2	±	
Mepacrine	10	6/7	7/7		0/4	0/0	0/4	-	
Control		7/9	7/9	7/9	2/4	3/4	4/4		

种药的已知抗疟作用相符。

**仿 Hill 法筛选抗疟药** 小鼠 50 只, ip 孢子悬液(以下称种鼠)后 1/2 h, 每 10 只为 1 组, 分别 ig 伯喹、M 7844、咯萘啶和阿的平 1 次, 留 1 组作对照。孢子注射后 52-53 h, 即首批红内期原虫与药接触 4 h 左右, 每组任取种鼠 5 只, 自心脏取血约 0.2 ml 分别接种 1 只正常鼠(受血鼠)。血检种鼠与受血鼠的结果见表 2。

伯喹组 9 只种鼠接种后 21 d 内均未查见原虫, 5 只受血鼠 20 d 内亦未查见原虫, 示伯喹有杀组织期作用。M 7844 组 9 只种鼠仅 1 只呈原虫阳性, 5 只受血鼠均为阴性, 表明 M 7844 有杀组织期作用。咯萘啶组种鼠 21 d 内原虫阴性, 但 1 只受血鼠查见原虫, 表明种鼠接种孢子后 52-53 h, 血中已有少量红内期原虫, 故不能断定它有杀组织期作用。咯萘啶组受血鼠半数以上原虫阴性的结果表明它有杀红内期

持效。阿的平组种鼠均出现原虫血症, 示无杀组织期作用。该组受血鼠均为原虫阴性则表明阿的平给药后 52 h 对种鼠血中的少量红内期原虫有一定的持效。

为区分杀组织期与杀红内期持效作用, 取小鼠先分别 ig 伯喹、M 7844、咯萘啶与阿的平, 48 h 后 ip 感染红细胞  $5 \times 10^8$  (以下称种鼠), 3-4 h 后取心脏血 ip 正常小鼠(受血鼠), 定期查血。结果(表 3), 伯喹与 M 7844 两组的种鼠和受血鼠全部出现原虫血症, 其红细胞感染率与对照组的相仿, 示该两药对红内期无持效。咯萘啶组种鼠 6 d 内未出现原虫血症, 示有明显持效; 5 只受血鼠在受血 24 h 尚未查见原虫, 其后原虫密度较低, 亦表明为红内期持效作用。小鼠 ig 阿的平 10 mg/kg 后 48 h ip  $5 \times 10^8$  感染红细胞时, 不能杀死大部分原虫而推迟原虫血症的出现。受血小鼠于受血后 2 d

Tab 3. Activity of antimalarials (ig 48 h before inoculation of asexual forms on d 0) on erythrocytic stages of *Plasmodium yoelii*

Drug	Intragastric dose(mg/kg)	Mice infected/Mice examined (Infection rate of rbc%)										Residual action
		Mice inoculated with asexual forms					Recipient mice					
		d 1	d 2	d 3	d 4	d 6	d 14	d 1	d 2	d 3	d 4	
Primaquine	20	9/10	10/10	10/10	10/10			4/5	5/5	5/5	5/5	-
		(3.4	28.0	42.5	47.0)			(0.2	6.0	15.8	30.4)	
M 7844	100	9/10	9/10	9/10	9/10			4/5	5/5	5/5	5/5	-
		(1.6	10.9	14.6	26.8)			(0.2	5.9	21.2	23.8)	
Pyronaridine	10	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	8/8	0/5	5/5	5/5	5/5	+
		(0	0	0	0	0	17.8)	(0	3.1	1.8	20.0)	
Mepacrine	10	10/10	10/10	10/10	10/10			2/5	5/5	5/5	5/5	±
		(4.4	23.4	25.4	53.0)			(1.6	7.3	14.0	25.0)	
Control		10/10	10/10	10/10	10/10			4/5	5/5	5/5	5/5	
		(0.7	16.7	25.0	36.4)			(0.5	9.2	19.8	36.0)	

Tab 4. Activities of antimalarials given on various days (Mice infected/Mice examined). Control groups (C) was examined on d 7.

Drug	Intra-gastric dose (mg/kg)		Dosing day																	
			d -1		d 0		d 1		d 3		d 1,2		d 0,1,2		d 3,4,5					
	d 7	d 14	c	d 7	d 14	c	d 7	d 14	c	d 7	d 14	c	d 7	d 14	c	d 7	d 14	c		
Primaquine	20	10/10	10/10	23/24	0/10	0/10	23/24	17/19	19/19	23/24		8/10	9/9	23/24	0/10	0/10	8/8	0/9	7/9	23/24
M 7844	40	4/5	5/5	23/24	0/10	0/10	23/24	5/8	6/8	23/24										
	100		0/10	0/8	12/12	6/10	7/7	12/12	1/10	6/10	12/12	0/10	0/8	12/12	0/9	0/6	10/10			
Pyrimethamine	5	7/10	8/10	23/24	0/10	0/10	23/24	3/10	8/9	23/24	0/10	0/10	0/10	0/10	0/15	0/15	23/23	0/10	0/10	23/24
Mepacrine	10		9/10	9/10	12/12	10/10	10/10	12/12	10/10	10/10	12/12	6/10	9/10	12/12	4/10	7/10	10/12	1/10	10/10	12/12
Pyronartidine	2.5	10/10	32/35	5/10	8/10	32/35	3/10	4/10	32/35	1/10	9/10	32/35					0/10	0/10	8/8	
	5	0/10	3/10	8/8	0/10	1/10	8/8	0/10	1/10	8/8	1/9	3/9	32/35				0/10	0/10	8/8	
	10	0/9	0/9	8/8	0/10	0/10	8/8	0/10	0/10	8/8	0/10	0/10	8/8				0/10	0/10	8/8	

才全部出现原虫血症,表明当原虫数较少时能显示阿的平的一点持效作用。

**孢子接种前后不同时间 1 次或 2-3 次给药对原虫作用的比较** 小鼠接种孢子(d 0)前、后 1 次或数次 ig 伯喹、M 7844、乙胺嘧啶、阿的平与咯萘啶, d 7 与 d 14 血检的结果见表 4。

伯喹剂量为 20 mg/kg 时, d 0 或 d 0-2 给药组小鼠均未见原虫血症,即凡 d 0 给药的,即使只给 1 次,就能保护小鼠不受感染。d-1 或 d 1 ig 40mg/kg 或 d 1-2 连给 2 次 20 mg/kg, 各组鼠大部分查见原虫。d 3-5 每天 ig 伯喹 20 mg/kg 推迟出现原虫血症。这表明该疗法的伯喹对红内期也有一定作用。

M 7844 于 d 0 给药也能完全保护小鼠不受感染。于 d 1 给药则无明显杀组织期作用。d 3 给药推迟全部鼠出现原虫血症的时间,表明也有一定的杀红内期作用。

乙胺嘧啶剂量为 5 mg/kg 时,除 d-1 与 d 3 给药组对原虫仅有部分作用外, d 0, d 1, d 1-2 与 d 3-5 给药各组鼠在接种后 14 d 内均未查见原虫,表明该药兼有杀组织期和杀红内期的作用,但无明显持效。

小鼠于 d 0, d 1 或 d 3 ig 阿的平 10 mg/kg 无杀组织期和杀红内期的明显作用。如于 d 1-2, d 0-2 或 d 3-5 连续 ig 2-3 次,则推迟部分鼠出现原虫血症,表明阿的平有杀红内期作用。

咯萘啶 10 mg/kg 于 d 3 给药抑制原虫血症出现的结果示有杀红内期作用, d-1 给药有效可判断有持效,但不能肯定是否有杀组织期作用。

根据小鼠 1 次服咯萘啶 10 mg/kg 对红内期持效(100%抑制原虫)至少 6 d<sup>(7)</sup>推算:小鼠 ip 孢子前 4 d 给药, d 7 与 d 14 血检原虫应为阴性;小鼠于 ip 感染红细胞前 6 d 给药, d 5 与 d 10 的血检结果亦应为阴性。实验结果(表 5)与推算的基本一致。小鼠于孢子接种前 5 d 给药, d 7 与 d 14 血检原虫血症为阳性。

Tab 5. Antimalarial activity of ig pyronaridine 10 mg/kg before inoculation of *Plasmodium yoelii* sporozoites or infected rbc. Sporozoites inoculated mice were examined on d 7 and d 14; parasitized rbc inoculated mice examined on d 5 and d 10.

Day before inoculation	Mice inoculated with sporozoites			Mice inoculated with parasitized rbc		
	Mice examined	Mice developing parasitemia	Parasitemia suppression rate(%)	Mice examined	Mice developing parasitemia	Parasitemia suppression rate(%)
7				14	5	64.3
6	10	8	11.1	10	2	80.0
5	10	8	11.1	15	0	100.0
4	10	0	100.0			
3	10	0	100.0	5	0	100.0
0	10	9		23	23	

## 讨 论

鉴于子孢子 ip 小鼠后 30 min 基本从血中消失, 48 h 后出现原虫血症<sup>(4)</sup>, 因此筛选杀组织期药的投药时间宜在子孢子接种后  $\frac{1}{2}$ -1 h。如于接种后 3 h 投药<sup>(9,9)</sup>, 则不能充分发挥它对发育初期的组织期原虫的作用; 如于接种当天起连续投药 3 d<sup>(1-3)</sup>, 则又将概括杀红内期的作用。

参照 Gregory 及 Peters<sup>(5)</sup> 的计算法筛选杀组织期药, 可将伯喹和咯萘啶等不同的作用相区分。唯方法复杂不适宜作为初筛常规。其后该作者虽作了些改进, 但仍需逐日血检求感染红细胞率达 2% 时间。Hill 提出的输血转种法基本上也能区分不同作用, 但亦不够简便。至于对兼有杀组织期和红内期持效作用的药, 这两种方法都不能作出判断。

参考前述方法与本实验结果, 提出如下初筛杀组织期抗疟药的步骤:

**1. 初步判断有无杀组织期和/或杀红内期的持效作用** ip 阳性蚊悬液于小鼠(d 0),  $\frac{1}{2}$ -1 h 后给药 1 次。每药设两剂量组, 每组 10 只小鼠。高剂量为最大耐受量或用 100 mg/kg, 低剂量用 20 mg/kg。d 7 与 d 14 作薄血膜镜检。6/10 鼠呈原虫阴性(-)时, 初步认为对原虫有作用(+).

血检结果 杀虫作用

d 7 d 14 组织期 红内期持效(48 h 以上)

+	+	-	-
-	+	-	+
-	-	+?	+?

有+? 符号的少数化合物的作用不能完全肯定, 需作第(2)步实验。

**2. 判断上述待肯定作用的化合物(有+? 符号者)为红内期持效作用抑或为杀组织期作用** 10 只小鼠 ip 约氏或伯氏疟原虫感染的红细胞前 48 h 给药 1 次。d 5 与 d 10 作薄血膜镜检原虫。

血检结果 杀虫作用

d 5 d 10 组织期 红内期持效(48 h 以上)

+	+	+	-
-	-	?	+
-	+	?	+

有? 符号的个别化合物不能肯定是否兼有杀组织期作用, 需进行第(3)步实验。

上述 2 步实验共用小鼠 30 只, 用药量 250 mg。

**3. 判断是否有持效杀组织期作用** 先给小鼠服药, 后接种感染红细胞的方法求红内期作用的持效天数(a)。然后另取 10 只小鼠于接种前 a-1 d 给药, d 0 ip 子孢子。d 7 与 d 14 血检原虫均为(-)时, 可以认为有 a+1 d 持效的

杀组织期作用。

由于本株鼠疟原虫的红前期仅 2 d, ip 孢子后 18 d 起小鼠原虫血症有自然转阴现象, 故只能用作初筛。初筛有效者应采用猴疟模型复筛。

### 参 考 文 献

- 1 张家坝、黄文洲、叶秀玉, 等. 药学通报 1980; 15:43
- 2 黄文洲、张家坝、叶秀玉, 等. 中国医学科学院

学报 1982;4:229

- 3 陈 林、戴祖瑞、马志明. 药学学报 1981;16:260
- 4 邵葆若、叶秀玉、郑 浩. 待发表
- 5 Gregory K G, Peters W. *Ann Trop Med Parasitol* 1970; 64:15
- 6 Hill J. *ibid* 1975;69:421
- 7 邵葆若、叶秀玉、郑 浩. 待发表
- 8 张家坝、叶秀玉、林宝英、王良昌. 中国医学科学院寄生虫病研究所 1979 年年报:112
- 9 Peters W, Davies E E, Robinson B L. *Ann Trop Med Parasitol* 1975;69:311

*Acta Pharmacologica Sinica* 1984 Sep; 5 (3) : 201-206

## A SCREENING METHOD FOR TISSUE SCHIZONTOCIDES WITH *PLASMODIUM YOELII*\*

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

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

**ABSTRACT** Primaquine, pyrimethamine, chloroquine and long-acting blood schizonticide pyronaridine were tested with several causal prophylactic and tissue schizontocidal screening methods. The sporozoites of *Plasmodium yoelii* strain 265-By disappeared from the blood of mice 30 min after an ip inoculation and the prepatent period of the parasites was 48 h or less. A modified method for preliminary screening for tissue schizontocides is suggested.

(1) Test compound is dosed orally or parenterally to 2 groups of 10 mice each  $\frac{1}{2}$ -1 h after an ip inoculation of *P. yoelii* sporozoites on d 0. The doses are 20 mg/kg and a maximal tolerable dose (or 100 mg/kg). Blood examinations are made on d 7 and d 14. Sign (-) denotes that at least 6/10 mice are negative for parasitemia. If the examinations on d 7 and/or d 14 are (+), the test compound is considered to have no tissue schizontocidal effect; if the result is (-) on d 14, it may be effective against tissue form and test (2) for differentiating residual blood schizontocidal action is needed.

(2) A dose is given to 10 mice 48 h

before an inoculation of  $5 \times 10^6$  parasitized rbc. Blood examinations are made on d 5 and d 10. If both examinations are (+), the drug is considered to have tissue schizontocidal action; if it is (-) on d 5, the drug may have residual schizontocidal action and test (3) is suggested to identify long-acting tissue schizontocidal action.

(3) The days (a) of residual blood schizontocidal effect is first detected by giving a dose before the inoculation of parasitized rbc, then a dose is given to clean mice a-1 days before sporozoite inoculation. If parasitemia on d 14 is (-), a prolonged (a-1 days) tissue schizontocidal action is suggested.

**KEY WORDS** *Plasmodium yoelii*; tissue schizontocides; drug screening; antimalarials; primaquine; pyrimethamine

\* Partial financial support was received from UNDP/World Bank/WHO TDR.

\*\* WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis.