

伯氏疟原虫对青蒿酯钠的抗药性培育¹

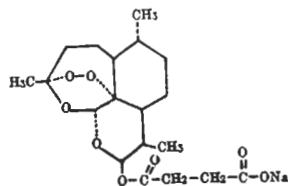
刘爱如、任遵华 (山东省中医药研究所, 济南 250011)

提要 以伯氏疟原虫-小鼠模型, 采用药物剂量递增多次给药培育抗青蒿酯钠虫系。历时 85 d, 血传转种 21 代, 抗性指数 (I_{90}) 达 29.3, 现已培育至 80 代, 每 10 d 转种时 ip 400 mg/kg 青蒿酯钠, 能够保持抗性。但停药转种至第 21 代, 抗性几乎消失。抗性系疟原虫对青蒿素、蒿甲醚及乙胺嘧啶的交叉抗性指数分别为 2.19, 2.23 和 1.38, 与氯喹无交叉抗性。

关键词 抗疟药; 青蒿酯钠; 青蒿素; 蒿甲醚; 乙胺嘧啶; 氯喹; 伯氏疟原虫; 微生物抗药性

青蒿酯钠 (sodium artesunate, 804-Na, Art) 为青蒿素的衍生物, 是我国首先研究的具有新型化学结构和作用方式的水溶性抗疟药⁽¹⁾。它对正常株及高度抗氯喹的伯氏疟原虫

(*Plasmodium berghei*) 有良好的杀裂殖体作用⁽²⁾。临床上除对正常株及间日疟和抗氯喹恶性疟有效⁽³⁾外, 因其治疗抗氯喹脑型恶性疟的疗效明显优于氯喹和奎宁而作为首选药⁽⁴⁾。本实验目的在于了解疟原虫对 Art 产生抗性的潜在能力及抗 Art 疟原虫对其他抗疟药物的敏感性。



Sodium artesunate

1985年11月20日收稿 1986年6月19日修回

¹ 本文是全国青蒿素研究指导委员会资助的课题

材料和 方法

药物与疟原虫株 青蒿酯由桂林制药二厂提供(批号 831023,831027)。取青蒿酯 100 mg, 加 5% NaHCO₃ 溶液 1 ml, 充分混匀使澄清, 再用生理盐水按需要稀释。青蒿素由本所化学组制备。蒿甲醚为昆明制药厂供给。乙胺嘧啶与磷酸氯喹分别为山东新华制药厂与上海第十一制药厂产品。

伯氏疟原虫 N 株 (*Plasmodium berghei* N strain, Keyberg), 1983 年 11 月由军事医学科学院微生物、流行病学研究所引进。♂ Swiss 小鼠, 体重 19 ± SD 1 g, 每鼠 ip 感染红细胞 1 × 10⁷ 个, 感染当天为 d 0。

抗性培育方法 参照文献(5)法, 每代分 3-4 组, 每组 5 鼠。设 2-3 个不同剂量给药组, 并设对照组。连续 4 d (d 0 - d 3), ip 给药。于 d 5 或不定时间 (9.0 ± SD 2.7 d) 血检, 选高剂量组中感染率为 2% 以上的鼠作为下一代供血鼠, 必要时用“4-d 试验法”测定原虫对 Art 的敏感性。以直线回归法计算 SD₉₀。抗性指数 (I₉₀) 为抗性 (R) 原虫与正常 (N) 株原虫 SD₉₀ 之比。

抗性稳定性 采用有较高抗性的原虫, 停药传代, 每周一次, 定期观测抗性指数及原虫生物学变化, 直至抗性消失。

抗性的维持 将有较高抗性的原虫感染小鼠, 以不同剂量、方法, 每 10 d 传代一次, 不定期测其抗性指数, 以确定维持抗性的给药方案。

交叉抗性 用具有一定抗性的原虫系, 采用“4-d 试验法”分别对青蒿素、蒿甲醚、乙胺嘧啶及氯喹做敏感试验, 计算 SD₉₀, 并与亲株原虫比较。

结 果

抗青蒿酯钠原虫的培育过程 从第 1 代 (P 1) 到 P 15, 原虫所耐受的药物剂量持续增加, 原虫的抗性迅速发展。从 P 15 到 P 19 耐

受剂量稳定, I₉₀: P 11, 19.5; P 21, 29.3。随后原虫发育速度明显变慢, 抗性曾一度下降。采用降低剂量、间断给药以及适当延长传代时间的办法, 抗性又缓慢上升。P 33, 24.2; P 39, 29.2; P 45, 31.5; P 49, 29.1。从 P 51 开始原虫耐受的剂量稳定, 抗性也趋向稳定。P 55, 30.1; P 66, 30.2。可见抗青蒿酯钠原虫系是较易获得的。(见图 1, 2)

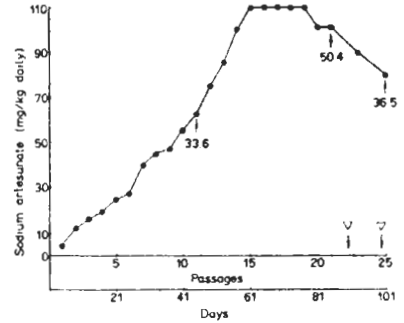


Fig 1. Stepwise increasing of doses at regular intervals induced resistance to sodium artesunate with *P. berghei* N strain in mice. ▽ This passage in the absence of drug pressure. The numerals below “↑” indicate the values of SD₉₀ (mg/kg) at that passage.

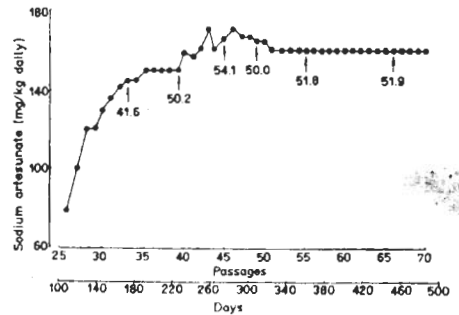


Fig 2. Stepwise increasing of doses at irregular intervals induced resistance to sodium artesunate with *P. berghei* N strain in mice. The numerals below “↑” indicate the values of SD₉₀ (mg/kg) at that passage.

抗性原虫的生长特点及导致宿主死亡情况 接种 1 × 10⁷ 个 N 株原虫之鼠, 于 d 6-7 后大部分死亡。最长存活时间为 9 d, 平均红细胞寄生率为 69 ± 12%。接种 P 11 抗性原虫之鼠, d 10-11 大部分小鼠死亡, 存活最长者为 12 d,

Tab 1. Patterns of cross-resistance to 4 antimalarials shown by artesunate-resistant line (R) of *P. berghei* in mice

Drug	Route	ED ₉₀ (95% confidence limits) mg/(kg·d) × 4		I ₉₀
		N strain	R line	
Artemisinin	im	1.70 (1.45-1.95)	3.72 (3.54-3.90)	2.19
Artemether	im	0.69 (0.62-0.76)	1.54 (1.22-1.87)	2.23
Pyrimethamine	ig	0.55 (0.52-0.57)	0.76 (0.58-0.93)	1.38
Chloroquine	ig	3.36 (3.16-3.55)	2.36 (2.17-2.55)	0.70

平均红细胞寄生率为 $68 \pm 15\%$ 。接种 P 21 抗性原虫之鼠，d 20-25 大部分死亡，存活最长者为 27 d，平均红细胞寄生率为 $79 \pm 10\%$ 。表明抗性原虫之毒力伴随抗性的增长而有所下降，使宿主成慢性感染过程。（见图 3）

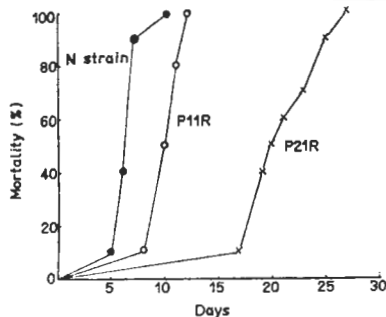


Fig 3. Cumulative mortality of mice ip with 1×10^7 red blood cells parasitized with the parent and artesunate-resistant line of *P. berghei*. P 11 R and P 21 R were artesunate-resistant passage 11 and 21, respectively.

抗性稳定性 停药传代，随着鼠原虫血症发育速度的增快，抗性迅速下降。P 13, 9.3; P 21, 1.3 (147 d)，抗性基本消失。表明抗 Art 原虫的抗性也是不稳定的。但每 10 d 传代一次，一次 ip 400 mg/kg，则能维持抗性。P 9, 29.8; P 20, 30.9 (半年以上)。

交叉抗性 抗 Art 原虫系的 P 45, P 49, P 55, P 66，分别对青蒿素、蒿甲醚的交叉抗性为 2.19 和 2.23，对乙胺嘧啶为 1.38，对氯喹无交叉抗性。（见表 1）

讨 论

本实验所采用的实际为递增给药法与复燃

法相结合的方法。由实验过程表明，此法能较快获得抗药性原虫。

本实验原虫抗药性培育过程所见与文献(5,6)相同：抗性原虫发育速度变慢，且毒力降低。减少药物压力或暂时撤除药物压力，会削弱抗性，延缓传代时间则又耗费时间。故应从合理递增药物剂量和选择适宜转种时机两方面来考虑疟原虫的抗性培育。另外，如接种大于一般的原虫量($\sim 10^7$)，也能促进抗性原虫的选育⁽⁷⁾。

受体占领学说认为原虫抗性是一种特异性受体的数量及其对药物亲和力的降低所致。交叉抗性多见于化学结构或作用机理相似的药物间⁽⁸⁾。因此，抗 Art 原虫对乙胺嘧啶、氯喹的交叉抗性较低或无。至于这种原虫对青蒿素和蒿甲醚的交叉抗性不大的原因，可采用 Bretschcher's 假说⁽⁹⁾来解释。是否本抗性原虫的受体结构发生了改变等，尚待研究。

鉴于某一抗疟药对不同疟原虫的化疗作用不同及不同原虫的高亲和力药物受体的结构不同⁽⁸⁾，由啮齿动物疟疾模型所得的抗性资料，不一定能准确地预告人类的疟疾情况，仅能作为参考依据。另外，影响原虫抗性产生的因素较多，除疟原虫株及药物外，尚有宿主、宿主饮食及其机能状态、培育方法等。因此，在评价疟原虫对某一抗疟药的抗性时，须在同样的情况下，方能考虑。

致谢 承朱海、魏振兴和田樱同志审阅

参 考 文 献

1 Zhou ZM. Metabolism and pharmacokinetics

- of qinghaosu and its derivatives. In: China Cooperative Research Group on Qinghaosu and Its Derivatives as Antimalarials, ed. *Proceedings of UNDP/WORLD BANK/WHO, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Fourth Meeting of the Scientific Working Group on the Chemotherapy of Malaria*. Beijing, 1981 : 1
- 2 Gu HM, Ye ZG. Antimalarial efficacy and mode of action of qinghaosu and its derivatives in experimental models. *Ibid* 1981 : 2-8
 - 3 Wang TY. Clinical studies on the treatment of malaria with qinghaosu and its derivatives. *Ibid* 1981 : 9
 - 4 Li GQ. Clinical studies on treatment of cerebral malaria with qinghaosu and its derivative. *Ibid* 1981 : 10
 - 5 Peters W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. 1. Chloroquine resistance. *Exp Parasitol* 1965; 17 : 81
 - 6 Knight DJ, Williamson P. The antimalarial activity of *N*-benzyloxydihydrotriazines II. The development of resistance to clociguanil (BRL 50216) and cycloguanil by *P. berghei*. *Ann Trop Med Parasitol* 1980; 74 : 409
 - 7 Merkli B, Richle R. *Plasmodium berghei*: Diet and drug dosage regimens influencing selection of drug-resistant parasites in mice. *Exp Parasitol* 1983; 55 : 375
 - 8 Fitch CD. Chloroquine resistance in malaria: Drug binding and cross resistance patterns. In: Sadun EH, Moon AP, eds. *Basic research in malaria*. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 1972; 39 : 266
 - 9 Boeynaems JM, Dumont JE. *Outlines of receptor theory*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical, 1980 : 210

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Mar, 8 (2) : 149-152

Development of a resistant line of *Plasmodium berghei* to sodium artesunate

LIU Ai-Ru, REN Zun-Hua

(Institute of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica of Shandong, Ji-nan 250011)

ABSTRACT A resistant line of *Plasmodium berghei* to sodium artesunate (sodium salt of succinyl dihydroartemisinin, Art, first synthesized by Chinese scientists) was successfully developed in consecutive passages by administering doses of Art increasingly. The index (I_{90}) of passage 21 over 85 d was 29.3. Up to now, passage 80 has been developed and the resistance was stable. During passaging 400 mg/kg of Art was administered ip to mice at each passage (every 10 d), the resistance was stable. If

the parasites were passaged in absence of drug pressure, the resistance to Art lost gradually up to passage 21. The I_{90} for pyrimethamine, artemisinin and artemether were 1.38, 2.19, and 2.23, respectively. No cross-resistance to chloroquine was found.

KEY WORDS antimalarials; sodium artesunate; artemisinin; artemether; pyrimethamine; chloroquine; *Plasmodium berghei*; microbial drug resistance