

# 伯氏疟原虫对咯萘啶产生抗药性的延缓<sup>1</sup>

邵葆若、叶秀玉 (中国预防医学科学院寄生虫病研究所<sup>2</sup>, 上海 200025)

**提要** 伯氏疟原虫 ANKA 株每代血传转种后给小鼠 ig 咯萘啶 4 mg/kg 或磺胺多辛 5 mg/kg 或乙胺嘧啶 1mg/kg, 至 31-34 代, 各药组都出现低度抗药性. 如每代转种后小鼠 ig 三药较低剂量(咯萘啶 2 mg/kg, 磺胺多辛 1 mg/kg, 乙胺嘧啶 0.5 mg/kg), 至第 34 代时, 原虫对三药联用的敏感性未见下降, 示三药联用能明显延缓抗药性的出现.

**关键词** 伯氏疟原虫; 抗疟药; 咯萘啶; 氯喹; 乙胺嘧啶; 磺胺多辛; 微生物抗药性; 联合用药治疗

本世纪六十年代以来, 恶性疟原虫对氯喹等产生了抗性, 抗性虫株不断扩散蔓延, 迫使人们重新估价疟疾的化疗问题<sup>(1,2)</sup>, 为使疟原虫对抗疟药不产生与延缓产生抗性, 已有的研究指出, 宜采取几种药联合应用的方案<sup>(3-5)</sup>. 如甲氟喹与其他药联合应用能延缓疟原虫出现抗性<sup>(6)</sup>, 故该药于 1984 年正式注册时, 甲氟喹的复方片也同时问世<sup>(7)</sup>.

咯萘啶为本所七十年代创制的抗疟新药<sup>(8)</sup>. 在实验条件下可使鼠疟原虫对咯萘啶产生抗性<sup>(9)</sup>, 而抗咯萘啶的鼠疟原虫对乙胺嘧啶和周效磺胺(磺胺多辛)敏感<sup>(10)</sup>. 本文报道咯萘啶合并磺胺多辛及乙胺嘧啶延缓疟原虫出现抗性以及咯萘啶与氯喹交替用药未能延缓抗性出现等实验.

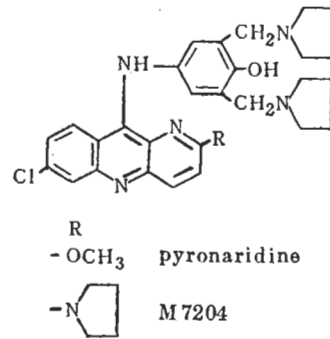
## 材料与 方法

伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*) 1954 年由印度引进, 经血传保种至今, 已丧失产生配子体能力>30 年. *P. berghei* ANKA 于 1981 年由英国引进, 经蚊传保种.

小鼠为本所动物室繁殖的昆明杂交品系,

体重 18—22 g, ♀♂ 皆用.

咯萘啶(pyronaridine)、氯喹、磺胺多辛、乙胺嘧啶、M 7204 等均由本所药物化学研究室提供. 盐类药物按基质量配成药液给小鼠 ig.



**疟原虫的接种及检查** 按前文<sup>(9)</sup>方法给小鼠 ip 感染疟原虫的 rbc 悬液, 72 h 后给药 1 次. 给药前(d 0)及给药后 72 h(d 3)作薄血膜镜检, 计算 rbc 感染率(EIR). 50 个油镜视野未找见疟原虫作为转阴. 求半数鼠转阴剂量(ED<sub>50</sub>)和 95%置信限时, 每药设 5-6 剂量组, 数据按 Finney's 法输入计算机计算.

**疟原虫在药压下传代及测定疟原虫对药物的敏感性(或抗性)** 感染小鼠 ig 药后 d 3 血检, 以 d 3 阳性鼠血或其后复燃的鼠血转种小鼠为第 2 代, 转种后 72 h 再给鼠 ig 药, 其剂量不变或增加. 如此转种加药压至某一代时, 以 1 次给药法测原虫对药的敏感剂量. 抗性倍数为抗药性原虫的耐药性剂量与亲代原虫 ED<sub>50</sub> 相比, 或与培育抗性系的起始剂量相比.

## 结 果

*P. berghei* ANKA 亲代对药物的敏感性(表 1)

感染 72 h 的小鼠 ig 1 剂药, d 3 血检的

1985 年 9 月 30 日收稿 1986 年 1 月 13 日修回

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> 世界卫生组织疟疾、血吸虫病、丝虫病合作中心.

Tab 1. Drug effects in *P. berghei* ANKA -infected mice ig a single dose. EIR = erythrocytes infected rate, d 0 = before ig drug, d 3 = 3 d after administration.

Drug	The highest and the lowest test dose (mg/kg)	Mice (Parasitemia neg/exam)	Mean EIR ‰		ED <sub>50</sub> mg/kg (95% confidence limits)
			d 0	d 3	
Pyronaridine (PND)	1.07	0/7	62	173	2.7(2.2-3.3)
	4.5	8/10	59	15	
Chloroquine (CQ)	5.93	0/9	80	61	16.7(12.8-21.7)
	25.0	7/10	78	0.05	
Sulfadoxine (S)	2.5	1/9	88	70	9.1(10-14)
	40.0	8/9	83	0.01	
Pyrimethamine (PM)	0.5	0/5	181	120	4.3(2.6-7.1)
	16.0	5/5	190	0	
PND + S + PM	2, 2, 1	5/5	115	0	
	2, 1, 0.5	9/9	128	0	
S + PM	1, 0.5	9/10	92	0.2	

ED<sub>50</sub>(95%置信限)mg/kg, 咯萘啶为 2.7(2.2-3.3), 氯喹 16.7(12.8-21.7), 磺胺多辛 9.1(10-14), 乙胺嘧啶 4.3(2.6-7.1)。感染鼠 ig 咯萘啶、磺胺多辛、乙胺嘧啶三药, 剂量依次为 2, 2, 1 mg/kg 或 2, 1, 0.5 mg/kg 时, 全部鼠转阴; ig 磺胺多辛、乙胺嘧啶两药, 剂量为 1, 0.5 mg/kg 时, 9/10 鼠阴转, 减虫率为 99.9%。感染鼠 ig 1 种药, 剂量 ≥ 联合用药中的各药量, 咯萘啶为 2.53 mg/kg, 磺胺多辛 2.5 mg/kg, 乙胺嘧啶 0.5 mg/kg, d 3 血检阴转鼠分别为 3/10, 1/9 及 0/5。

#### *P. berghei* ANKA 血传转种时小鼠 ig 1 或 2 种药, 原虫对药物敏感性的改变

1. 咯萘啶 每代疟原虫转种后小鼠 ig 4 mg/kg, 至第 9 代对咯萘啶的敏感性略有下降; 至第 45 代, 小鼠 ig 40 mg/kg, 4/10 鼠转阴, 与 ED<sub>50</sub> 剂量相比, 抗性约 14 倍, 未见抗性急剧增大。如每代转种后小鼠 ig 剂量从 8 mg/kg 开始并较大幅度增加, 至第 16 代时, ig 600 mg/kg 不能使原虫转阴, 与 ED<sub>50</sub> 比, 抗性 ≥ 200。

2. 磺胺多辛 每代原虫转种后小鼠 ig 5 mg/kg, 至第 15 代, 磺胺多辛 25 mg/kg 可使 4/5 鼠转阴。至第 33 代, 25 mg/kg 不能使原虫转阴, 示有低度抗性。与 ED<sub>50</sub> 比, 抗性 ≥ 2.7。

3. 乙胺嘧啶 每代原虫转种后小鼠 ig 1 mg/kg, 至第 10 代, 10 mg/kg 可使 3/5 鼠转阴; 至第 31 代, 10 mg/kg 不能使原虫转阴, 出现低度抗性。与 ED<sub>50</sub> 比, 抗性 ≥ 2.3。继续转种并加药压, 则出现较高的抗性, 经蚊(斯氏按蚊)传后, 疟原虫的抗性保持。

4. 磺胺多辛合并乙胺嘧啶 每代原虫转种后小鼠 ig 磺胺多辛和乙胺嘧啶(1, 0.5 mg/kg)。第 1 代 ig 两药后, 5/5 鼠的原虫转阴, 但第 16 代 ig 两药后无原虫转阴鼠, EIR 反而上升; 两药剂量增至 5, 2.5 mg/kg 也不转阴, 与起始 ig 量相比, 抗性 > 5。

5. 氯喹 疟原虫转种第 1 代小鼠 ig 40 mg/kg。第 2 代起, 1 组每代均 ig 40 mg/kg, 另 1 组每代剂量迅速递增。后一组至第 5 代的抗性与 ED<sub>50</sub> 比, ≥ 24, 第 13 代抗性 ≥ 48, 这组抗性出现比 40 mg/kg 组快且高。

6. 对 1 或 2 种药产生抗性的 *P. berghei* ANKA, 对其他抗疟药的敏感性(表 2) 高度抗咯萘啶的 *P. berghei* ANKA(抗性 > 200), 对氯喹与 M 7204 有交叉抗性, 但对磺胺多辛与乙胺嘧啶联用敏感。对磺胺多辛和乙胺嘧啶二药联用有轻度抗性(≥ 5)的原虫, 与咯萘啶和氯喹无交叉抗性。对氯喹有抗性(≥ 36)的原虫, 与咯萘啶、M7204、磺胺多辛

Tab 2. Sensitivity of drug-resistant lines of *P. berghei* ANKA. R=resistance compared with ED<sub>50</sub>, R'=resistance compared with starting dose.

Resistant line	Passage	Resistance	Test drug	Dose (mg/kg)	Mice (parasitemia neg/exam)	Mean EIR (%)		Cross resistance
						d 0	d 3	
Pyronaridine (PND)	16	R>200	CQ	400	0/5	20	22	+
			M 7204	120	0/5	26	32	+
			S+PM	1, 0.5	5/5	21	0	-
Sulfadoxine (S)	33	R≥2.7	PND	8	4/4	97	0	-
			CQ	40	4/5	50	0.002	-
			PM	5	0/5	76	63	+
			PND+S+PM	2, 1, 0.5	5/5	81	0	-
Pyrimethamine (PM)	38	R≥2.3	PND	4	5/5	44	0	-
			CQ	40	5/5	4	0	-
			S	25	1/5	39	0.2	±
			PND+S+PM	2, 1, 0.5	5/5	61	0	-
S+PM	20	R'≥5	PND	8	5/5	8	0	-
			CQ	40	5/5	18	0	-
Chloroquine (CQ)	12	R≥36	PND	8	10/10	81	0	-
			S+PM	1, 0.5	4/5	29	0.02	-
			M 7204	8	3/5	20	6	-

Tab 3. Sensitivity of *P. berghei* ANKA passaged under triple drug combination. PND = pyronaridine, S = sulfadoxine, PM = pyrimethamine, CQ = chloroquine.

Passage	Drug	Dose (mg/kg)	Mice (parasitemia neg/exam)	Mean EIR (%)		Resistance	Cross resistance
				d 0	d 3		
1	PND+S+PM	2, 1, 0.5	5/5	40	0		
34		2, 1, 0.5	4/5	27	0.04	-	
	S+PM	5, 2.5	0/5	32	4.1	+	
	PND	4	3/5	28	0.14	-	
		8	5/5	25	0	-	
	S	40	0/5	41	0.8	+	
	PM	10	1/5	39	109.6	+	
	CQ	80	1/5	39	2.42		+

和乙胺嘧啶联用均无明显交叉抗性。

*P. berghei* ANKA 血传转种时小鼠 ig 咯萘啶、磺胺多辛和乙胺嘧啶三药，延缓疟原虫出现抗性(表 3) 每代疟原虫转种后小鼠 ig 咯萘啶 2 mg/kg, 磺胺多辛 1 mg/kg 和乙胺嘧啶 0.5 mg/kg。第 1 代小鼠的原虫血症全部转阴。第 34 代原虫对三药联用仍敏感, 4/5 鼠转阴, 原虫率下降 99.8%; 对单 ig 咯萘啶的敏感性也无明显改变; 但对磺胺多辛和乙胺嘧啶联用或单用, 及对氯喹则有一定的抗性。

*P. berghei* 血传转种时小鼠交替 ig 咯萘啶和氯喹不能延缓原虫出现抗性(表 4)

*P. berghei* 每代血传转种后给小鼠分组 ig 咯萘啶 4 mg/kg 或氯喹 27 mg/kg, 或两药交替。每种药量相当于感染鼠 1 次 ig 药 ED<sub>50</sub> 的 58%。每代转种 ig 咯萘啶 4 mg/kg 组, 至第 11 代抗性明显; 每代 ig 氯喹 27 mg/kg 组, 至第 10 代抗性也明显。交替 ig 药组, 至第 5 代与第 6 代, ig 药后无转阴鼠。d 3 的平均 EIR 值上升, 示抗性明显。这表明交替 ig 药组抗

Tab 2. Sensitivity of drug-resistant lines of *P. berghei* ANKA. R = resistance compared with ED<sub>50</sub>, R' = resistance compared with starting dose.

Resistant line	Passage	Resistance	Test drug	Dose (mg/kg)	Mice (parasitemia neg/exam)	Mean EIR (%)		Cross resistance
						d 0	d 3	
Pyronaridine (PND)	16	R > 200	CQ	400	0/5	20	22	+
			M 7204	120	0/5	26	32	+
			S + PM	1, 0.5	5/5	21	0	-
Sulfadoxine (S)	33	R ≥ 2.7	PND	8	4/4	97	0	-
			CQ	40	4/5	50	0.002	-
			PM	5	0/5	76	63	+
			PND + S + PM	2, 1, 0.5	5/5	81	0	-
Pyrimethamine (PM)	38	R ≥ 2.3	PND	4	5/5	44	0	-
			CQ	40	5/5	4	0	-
			S	25	1/5	39	0.2	±
			PND + S + PM	2, 1, 0.5	5/5	61	0	-
S + PM	20	R' ≥ 5	PND	8	5/5	8	0	-
			CQ	40	5/5	18	0	-
Chloroquine (CQ)	12	R ≥ 36	PND	8	10/10	81	0	-
			S + PM	1, 0.5	4/5	29	0.02	-
			M 7204	8	3/5	20	6	-

Tab 3. Sensitivity of *P. berghei* ANKA passaged under triple drug combination. PND = pyronaridine, S = sulfadoxine, PM = pyrimethamine, CQ = chloroquine.

Passage	Drug	Dose (mg/kg)	Mice (parasitemia neg/exam)	Mean EIR (%)		Resistance	Cross resistance
				d 0	d 3		
1	PND + S + PM	2, 1, 0.5	5/5	40	0		
34		2, 1, 0.5	4/5	27	0.04	-	
	S + PM	5, 2.5	0/5	32	4.1	+	
	PND	4	3/5	28	0.14	-	
		8	5/5	25	0	-	
	S	40	0/5	41	0.8	+	
	PM	10	1/5	39	109.6	+	
	CQ	80	1/5	39	2.42		+

和乙胺嘧啶联用均无明显交叉抗性。

*P. berghei* ANKA 血传转种时小鼠 ig 咯萘啶、磺胺多辛和乙胺嘧啶三药，延缓疟原虫出现抗性(表 3) 每代疟原虫转种后小鼠 ig 咯萘啶 2 mg/kg, 磺胺多辛 1 mg/kg 和乙胺嘧啶 0.5 mg/kg。第 1 代小鼠的原虫血症全部转阴。第 34 代原虫对三药联用仍敏感, 4/5 鼠转阴, 原虫率下降 99.8%; 对单 ig 咯萘啶的敏感性也无明显改变; 但对磺胺多辛和乙胺嘧啶联用或单用, 及对氯喹则有一定的抗性。

*P. berghei* 血传转种时小鼠交替 ig 咯萘啶和氯喹不能延缓原虫出现抗性(表 4)

*P. berghei* 每代血传转种后给小鼠分组 ig 咯萘啶 4 mg/kg 或氯喹 27 mg/kg, 或两药交替。每种药量相当于感染鼠 1 次 ig 药 ED<sub>50</sub> 的 58%。每代转种 ig 咯萘啶 4 mg/kg 组, 至第 11 代抗性明显; 每代 ig 氯喹 27 mg/kg 组, 至第 10 代抗性也明显。交替 ig 药组, 至第 5 代与第 6 代, ig 药后无转阴鼠。d 3 的平均 EIR 值上升, 示抗性明显。这表明交替 ig 药组抗

Tab 4. Sensitivity of *P.berghei* ANKA passaged under chloroquine (CQ) and pyronaridine (PND) pressure alternately. P = Passage.

P	Drug	Dose (mg/kg)	mice (parasitemia neg/exam)	Mean EIR		
				d 0 (%)	d 3	
1	CQ	27	7/9	46.3	0.03	P 1,3,5,...,CQ 27 mg/kg
2	PND	4	4/4	33	0	P 2,4,6,...,PND 4 mg/kg
5	CQ	27	0/10	9.1	50.9	
	PND	4	1/5	5.9	14.0	
6	PND	4	0/7	17.1	55.7	
10	PND	120	0/10	3.7	5.6	
	CQ	100	0/10	9.8	11.5	
1	PND	4	8/10	30.4	12.0	P 1-15, PND 4 mg/kg
11		4	0/9	4.9	26.4	
15		120	7/10	21.5	0.6	
1	PND	8	20/20*	130.3	0	* 2 mice recrudesced on d 9
2		8	1/8	3.1	4.8	
3		16	0/9	15.8	31.4	P 3-5, dose increased greatly
5		64	0/3	9.1	36.7	
1	CQ	27	7/9	46.3	0.03	P 1-10, CQ 27 mg/kg
5		27	0/9	32.0	30.2	
10		100	0/10	14.8	2.3	

性的出现并不比每代 ig 同种药的迟缓。如每代 ig 咯萘啶的剂量成倍增加, 则很快出现抗性。

## 讨 论

鼠疟原虫血传转种时经常处于较低剂量的咯萘啶、磺胺多辛与乙胺嘧啶三药压下, 既有较完全的杀红内期原虫的作用, 又能明显延缓疟原虫抗性的出现。因此, 在恶性疟流行区, 应用咯萘啶治疗患者时, 宜考虑采用与磺胺多辛及乙胺嘧啶联合用药的方案。

伯氏疟原虫在较大剂量的咯萘啶或氯喹药压下, 都较快出现较高的抗性。其原因之一可能是大剂量药压对疟原虫的淘汰与选择, 即敏感性较高的疟原虫被消灭, 残留下对药物敏感性差的, 当后者繁殖占优势时即为抗性虫系<sup>(11)</sup>。当疟原虫处于较低咯萘啶(4 mg/kg)药压下, 第1代 EIR 下降 94.5%, 2/5 鼠转阴, 至第31代原虫对 16 mg/kg 仍敏感, 至第45代对 40 mg/kg 敏感, 未迅速出现较高的抗性。又由于

咯萘啶对红内期疟原虫有明显的持效作用<sup>(12)</sup>, 所以值得探讨将咯萘啶作为抑制性预防药的可能性。

致谢 郑浩同志参加部分技术工作

## 参 考 文 献

- 1 Strube RE. The search for new antimalarial drugs. *J Trop Med Hyg* 1975; 78 : 171
- 2 Peters W. History and current status of drug resistance. In: Peters W, Richards WHG, eds. *Antimalarial drug* 1. 1st ed. NY: Springer, 1984 : 427
- 3 Anonymous. Malarial control and national healthgoals. *WHO Tech Rep Ser* 1982; (680) : 27
- 4 Fernex M. Drug combination in malaria. In: Adolphe M, ed. *Advances in pharmacology and therapeutics*; vol 10. NY: Pergamon Press, 1979 : 91
- 5 Peters W. Prevention of drug resistance in rodent malaria by the use of drug mixtures. *Bull WHO* 1974; 51 : 379
- 6 Merkli B, Riehle R, Peters W. The inhibitory effect of a drug combination on the

- development of mefloquine resistance in *Plasmodium berghei*. *Ann Trop Med Parasitol* 1980; 74 : 1
- 7 Fernex M. Mefloquine and its allies. *World Health* 1985 May : 6
- 8 郑贤育、夏毅、高芳华、郭惠珠、陈昌。抗疟新药 7351 的合成。 *药理学报* 1979; 14: 736
- 9 邵葆若、叶秀玉、郑浩。伯氏鼠疟原虫 (*Plasmodium berghei*) 对咯萘啶抗药性的研究。同上 1982; 17 : 566
- 10 陈克涌、林宝英、张家坝、邵葆若。七种抗疟药对小鼠感染抗咯萘啶伯氏鼠疟原虫的实验治疗。 *中国药理学报* 1983; 4 : 269
- 11 Peters W. Experimental techniques for inducing drug resistance. In: Peters W, ed. *Chemotherapy and drug resistance in malaria*. 1st ed. London: Academic Press, 1970 : 224
- 12 邵葆若、叶秀玉、郑浩。咯萘啶对鼠疟原虫红内期裂殖体的特效作用。 *寄生虫学与寄生虫病杂志* 1984; 2 : 232

*Acta Pharmacologica Sinica* 1986 Sep; 7 (5) : 463-467

## Delay in emergence of resistance to pyronaridine phosphate in *Plasmodium berghei*<sup>1</sup>

SHAO Bao-ruo, YE Xiu-yu

(Inst Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025)

**ABSTRACT** *Plasmodium berghei* ANKA is sensitive to pyronaridine, chloroquine, sulfadoxine and pyrimethamine. The ED<sub>50</sub> of these drugs given by single intragastric doses to infected mice were 2.7, 16.7, 9.1 and 4.3 mg/kg, respectively.

When the parasites of *P. berghei* ANKA were exposed to 3 structurally different drugs in successive syringe passages in mice, ie, 3 lines of the parasites in each mouse passage were given with ig doses of pyronaridine 4 mg/kg, sulfadoxine 5 mg/kg or pyrimethamine 1 mg/kg, low-level resistance developed to all 3 lines on passage 31-34. When the parasites were passaged under a drug pressure of triple combination (pyronaridine 2 mg/kg, sulfadoxine 1 mg/kg, and pyrimethamine 0.05 mg/kg), the sensitivity of the parasites of passage 34 to either pyronaridine or the triple combination was virtually similar to that of a normal line of *P. berghei* ANKA, indica-

ting that the development of resistance to pyronaridine and the triple combination were greatly inhibited. But the emergence of resistance in *P. berghei* ANKA was not delayed by chloroquine (27 mg/kg) and pyronaridine (4 mg/kg) given alternately to mice.

A high-degree pyronaridine resistance developed rapidly when *P. berghei* ANKA was passaged under drug pressure of pyronaridine at high doses. However, under lower drug pressure of pyronaridine (4 mg/kg), no high resistance developed in the parasites of passage 31-45.

**KEY WORDS** *Plasmodium berghei*; anti-malarials; pyronaridine; chloroquine; pyrimethamine; sulfadoxine; microbial drug resistance; combination drug therapy

<sup>1</sup>Partial financial support was offered by UNDP/World Bank/WHO TDR.