

青蒿酯钠、咯萘啶和羟基哌喹对恶性疟原虫氯喹敏感和抗性虫株的体外效应

李 军、黄文锦 (第二军医大学寄生虫学教研室, 上海 200433)

提要 体外微量药效测定显示, 恶性疟原虫敏感和抗性虫株对氯喹的 IC_{50} 分别为 56 ± 8 和 322 ± 69 nmol/L。抗疟新药青蒿酯钠、咯萘啶和羟基哌喹对氯喹敏感和抗性株均有明显的生长抑制效应, 其效价强度不同, 但都显著高于氯喹, IC_{50} 依次为: 青蒿酯钠 7.5 ± 1.8 nmol/L、咯萘啶 15.2 ± 2.0 nmol/L 和羟基哌喹 42 ± 8 nmol/L, 均未发现与氯喹有交叉抗药性。

关键词 抗疟药; 恶性疟原虫; 青蒿酯钠; 咯萘啶; 羟基哌喹; 氯喹; 微生物抗药性

恶性疟原虫抗氯喹株的出现和扩散使疟疾防治工作陷入严重困境⁽¹⁾, 因此, 氯喹替代药的研究也日益引起重视。青蒿酯钠、咯萘啶和羟基哌喹均为我国近年来研制的抗疟新药, 已在临床初步应用中获得较好疗效⁽²⁻⁴⁾。有关青

蒿酯钠对恶性疟原虫氯喹敏感株及羟基哌喹对抗氯喹虫株的体外药效测定已有报道^(6,8)。为准确测定3种新药的效价强度及了解其与氯喹是否存在交叉抗药性,本研究用体外48h微量药效测定技术⁽⁹⁻¹¹⁾,直接比较各种药物对恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)氯喹敏感株和抗性株的体外生长抑制效应。

材 料 和 方 法

虫株 实验以我国海南岛及苏皖两处恶性疟流行区近期复苏培养的原虫分离株为检测对象,其中FCC-101/AH和FCC-102/JS为1984年分别于安徽省来安县和江苏省盱眙县采集,FCC-4/HN和FCC-5/HN由本室1978年分离自海南岛东方县,均以液氮冻存。测试前按烛缸法培养原虫⁽⁷⁾。实验对照氯喹敏感虫株FCC-1/HN(海南岛)和抗氯喹株Camb-I(Cambodian-I,柬埔寨)系本室保种^(6,8)。

药物 青蒿酯钠(sodium artesunate)系桂林第二制药厂产品,批号820513;磷酸咯萘啶(pyronaridine phosphate)由中国预防医学科学院寄生虫病研究所药化室惠赠,批号840610;磷酸羟基哌喹(hydroxy-piperaquine phosphate)为本校抗疟药研究室合成,批号810330;磷酸氯喹(chloroquine phosphate)系上海第十四制药厂产品,批号800133。除青蒿酯钠在临用前配制外,其余各药均先以灭菌双蒸水配成浓缩贮液置4℃保存,用前稀释所需浓度。

药效测定 待各株原虫复苏后在培养中增殖率达3-6倍/48h时,按本室48h微量药效测定常规进行⁽⁹⁻¹¹⁾。试验用40孔(6.7×10mm)有盖塑料测定板,设9组药浓度,1组空白对照,每组4孔。氯喹和羟基哌喹检测时终浓度分别自1280nmol/L连续对倍稀释至5nmol/L;咯萘啶和青蒿酯钠均为上述各组药浓度的1/10。每孔含虫血悬液180μl,红细胞压积2.5%(vol/vol)原虫感染率(配子体不计)为0.7-1.1%;再加不同浓度的药液20μl,对照孔加等量5%葡萄糖盐水。在37.0±0.5℃

下培养48h后采样涂制薄血膜,吉氏染色,镜检5000红细胞中原虫数。先求各组平均原虫率,再与对照组相比得减虫率。按Finney氏机率单位分析法经计算机程序运算求出各药的半数抑制浓度(IC₅₀)及95%置信限(95%CL)。实验时氯喹敏感和抗性虫株均同时测定药效。

结 果

不同虫株对氯喹敏感性的差别 药测结果显示,对照组原虫生长良好,平均增殖3-6倍;苏皖FCC-102/JS及FCC-101/AH和对照株FCC-1/HN为氯喹敏感虫株,在氯喹浓度达到80nmol/L时,除查见个别退化变异原虫外,无性期原虫的生长完全被抑制,3株原虫2次测试的IC₅₀分别为:58±11和55±6nmol/L,无显著差别(p>0.05);而海南岛FCC-4/HN及FCC-5/HN和柬埔寨Camb-I株对氯喹有明显抗性,当药浓度高达320-640nmol/L时仍有无性期原虫生长,初测3株原虫IC₅₀高达379±38nmol/L,为敏感株的6.7倍;在不加氯喹连续培养28d后再测,其IC₅₀为264±21nmol/L,虫株抗性程度虽有所下降,但仍

Tab 1. 50% Inhibitory concentrations (IC₅₀) and 95% confidence limits (CL) of chloroquine against different isolates of *Plasmodium falciparum* culture in vitro.

Isolate*	Source	No	IC ₅₀ (95% CL) nmol/L
FCC-1/HN	Hainan	1	69 (62-76)
		2	56 (50-63)
FCC-101/AH	Anhui	1	57 (52-62)
		2	60 (55-66)
FCC-102/JS	Jiangsu	1	48 (43-53)
		2	49 (45-54)
Camb-I	Cambodia	1	343 (304-386)
		2	269 (241-300)
FCC-4/HN	Hainan	1	376 (327-432)
		2	241 (215-272)
FCC-5/HN	Hainan	1	420 (365-482)
		2	282 (250-319)

* FCC, *Plasmodium falciparum* cultured in China; FCC-1, -4, -5/HN were isolated from Hainan island; FCC-101/AH, -102/JS were isolated from Anhui and Jiangsu Provinces, respectively.

Tab 2. 50% Inhibitory concentrations (IC_{50} and 95% confidence limits, nmol/L) of 3 new antimalarials against different isolates of *Plasmodium falciparum*.

Isolate	No	Artesunate	Pyronaridine	Hydroxypiperazine
FCC-1/HN	1	7.5(6.8-8.3)	13.9(12.5-15.4)	57(52-63)
	2	7.9(7.0-8.8)	14.4(12.8-16.2)	28(26-32)
FCC-101/AH	1	8.7(7.8-9.8)	13.9(12.4-15.6)	28(26-31)
	2	8.9(8.0-9.9)	20.3(18.2-22.6)	41(37-45)
FCC-102/JS	1	4.2(3.8-4.6)	14.4(12.8-16.3)	52(48-56)
	2	4.8(4.3-5.4)	15.3(13.9-16.8)	45(41-49)
Camb-I	1	6.5(5.8-7.3)	12.1(10.9-13.5)	35(32-39)
	2	11.0(9.8-12.3)	17.2(15.8-18.8)	40(36-44)
FCC-4/HN	1	8.4(7.6-9.4)	15.6(14.1-17.3)	39(35-43)
	2	7.8(6.9-8.7)	16.0(14.4-17.6)	41(38-45)
FCC-5/HN	1	6.9(6.3-7.5)	14.7(13.5-16.0)	45(41-50)
	2	7.6(6.8-8.5)	14.4(12.9-16.1)	46(41-50)

为敏感株 IC_{50} 的 4.7 倍(表 1)。

青蒿酯钠、咯萘啶和羟基哌喹对氯喹敏感和抗性虫株的效应 3 种新药对体外培养的恶性疟原虫氯喹敏感株 (FCC-1/HN, FCC-101/AH, FCC-102/JS) 和抗性株 (Camb-I, FCC-4/HN, FCC-5/HN) 的生长抑制效应基本相近(表 2), 未发现其与氯喹有明显交叉抗药性(表 3)。重复测定的结果基本一致($p > 0.05$)。6 株原虫 2 次检测的 IC_{50} 分别为: 青蒿酯钠, 7.0 ± 1.6 及 8.0 ± 2.0 nmol/L; 咯萘啶 14.1 ± 1.2 及 16.3 ± 2.2 nmol/L; 羟基哌喹 43 ± 11 及 40 ± 6 nmol/L。

Tab 3. IC_{50} ($\bar{x} \pm SD$, nmol/L) of the 4 drugs against CQ-resistant (Camb-I, FCC-4/HN, FCC-5/HN) and CQ-sensitive (FCC-1/HN, FCC-101/AH, FCC-102/JS) isolates of *Plasmodium falciparum*. $p > 0.05$, $***p < 0.01$ vs CQ-resistant isolates

Antimalarials	CQ-R isolate	CQ-S isolate
Chloroquine	322 ± 69	$56. \pm 7.8^{***}$
Artesunate	8.0 ± 1.6	$7.0 \pm 2.0^*$
Pyronaridine	15.0 ± 1.7	$15.4 \pm 2.5^*$
Hydroxypiperazine	41 ± 3.9	$42 \pm 12^*$

四种抗疟药效价强度的比较 本实验表明, 青蒿酯钠、咯萘啶和羟基哌喹与氯喹的作用特点相似, 均能迅速抑制红内期原虫无性体的生长繁殖, 但各药半数抑制浓度显著不同($p < 0.05$)。4 种药物的 IC_{50} 依次为: $7.5 \pm$

1.8 、 15.2 ± 2.0 、 42 ± 8 和 56 ± 8 nmol/L, 因此提示青蒿酯钠的效价强度最高, 其次分别为咯萘啶、羟基哌喹和氯喹。

讨 论

实验结果表明, 虽然不同地区分离培养的恶性疟原虫株对氯喹敏感性的差别极显著, 但抗疟新药青蒿酯钠、咯萘啶和羟基哌喹无论对氯喹敏感或抗性虫株均显示一致的抑制效应, 与现场临床治疗情况⁽²⁻⁴⁾十分相似。青蒿酯钠、咯萘啶和羟基哌喹之所以能迅速杀灭抗氯喹恶性疟原虫红内期无性体, 可能与其作用机理与氯喹不尽相同有关。青蒿素类药物对伯氏疟原虫超微结构的影响主要是对原虫红内期滋养体膜系结构的作用, 表现为食物泡膜、线粒体膜、内质网膜、核膜等的形态改变, 而氯喹仅以含大团色素的自噬泡形成为特征⁽²⁾。同位素参入试验表明⁽¹²⁾, 该类药直接抑制恶性疟原虫蛋白合成的作用快而强, 而氯喹与此不同, 这可能是影响原虫膜系合成代谢的部分原因。咯萘啶杀灭伯氏疟原虫抗氯喹株的作用主要是破坏滋养体的复合膜结构; 而氯喹仅影响原虫食物泡的代谢活力, 从而不能抑制抗性虫株的生长⁽³⁾。

青蒿酯钠、咯萘啶和羟基哌喹与氯喹的作用特点相似, 均能迅速抑制红内期原虫无性体

的生长,对配子体形成无直接影响。并且其效价强度明显高于氯喹,其中以青蒿酯钠最高,咯萘啶和羟基哌喹次之。因此,在恶性疟原虫对氯喹普遍产生抗性的地区,仍可考虑有计划地交替使用这3种新抗疟药控制疟疾的流行。

致谢 承本室管惟滨副教授、瞿逢伊教授指导;中国科学院药物研究所张明明工程师进行电子计算机演算。

参 考 文 献

- 1 Peters W. *Chemotherapy and drug resistance in malaria*. 1st ed London: Academic Press, 1970: 1-22
- 2 Qinghaosu Antimalaria Coordinating Research Group. Antimalaria studies on qinghaosu. *Chin Med J* 1979; 92: 811
- 3 陈 昌. 抗疟药磷酸咯萘啶的研究进展新药与临床 1985; 4: 218
- 4 李裕棠、泰一中、瞿 瑶、龚建章. 磷酸羟基哌喹对抗氯喹恶性疟疾治疗效果的观察. 第二军医大学学报 1981; 2: 1

- 5 管惟滨、黄文锦、周元昌、潘卫庆. 哌喹及羟基哌喹对抗氯喹恶性疟原虫的药效测定. 寄生虫学与寄生虫病杂志 1983; 1: 88
- 6 管惟滨、黄文锦、周元昌、龚建章. 青蒿素及其衍生物对体外培养恶性疟原虫的作用. 中国药理学报 1982; 3: 139
- 7 Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976; 193: 673
- 8 管惟滨、黄文锦、周元昌. 恶性疟原虫红内期体外连续培养的观察. 中华医学杂志 1980; 60: 625
- 9 黄文锦、管惟滨、周元昌. 抗疟药体外微量筛选方法的观察. 第二军医大学学报 1981; 2: 52
- 10 管惟滨、黄文锦、周元昌、龚建章. 体外微量测定抗疟药药效的方法. 药学报 1982; 17: 139
- 11 管惟滨、黄文锦、周元昌. 体外测定抗氯喹恶性疟原虫方法的改进. 第二军医大学学报 1981; 2: 55
- 12 Gu HM, Warhurst DC, Peters W. Rapid action of qinghaosu and related drugs on incorporation of [^3H]isoleucine by *Plasmodium falciparum* in vitro. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 2463

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Jan, 9 (1): 83-86

Effects of artesunate, pyronaridine and hydroxypiperaquine on chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant isolates of *Plasmodium falciparum* in vitro

LI Jun, HUANG Wen-Jin

(Department of Parasitology, Second Military Medical College, Shanghai 200433)

ABSTRACT The effects of three new anti-malarials are reported on both chloroquine (CQ)-sensitive and CQ-resistant isolates of *Plasmodium falciparum* from different regions of China by 48-h *in vitro* microtechnique. The results showed that the recent isolates Jiangsu FCC-102/JS, Anhui FCC-101/AH and control strain FCC-1/HN were CQ-sensitive ones with IC_{50} of 56 ± 8 nmol/L; and the other two FCC-4/HN, FCC-5/HN from Hainan and Cambodian-I strains were CQ-resistant ones with IC_{50} of 322 ± 69 nmol/L and a mean resistant index of 5.7.

No significant difference of sensitivity to artesunate (AS), pyronaridine (PN) and hydroxypiperaquine (HPQ) was detected between the CQ-sensitive and CQ-resistant isolates. The IC_{50} of AS, PN or HPQ was 7.5 ± 1.8 , 15.2 ± 2.0 or 42 ± 8 nmol/L, respectively, and therefore the effects of these new drugs were apparently stronger than that of CQ.

KEY WORDS anti-malarials; *Plasmodium falciparum*; sodium artesunate; pyronaridine; hydroxypiperaquine; chloroquine; microbial drug resistance