

伯氏疟原虫对蒿甲醚的抗药性¹

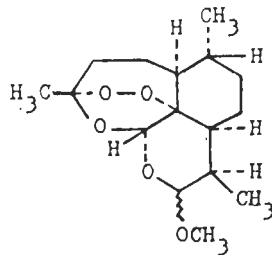
程丽芳、吕丽莉、吴丽丽 (山东省中医药研究所, 济南 250011)

提要 采用剂量递增-原虫复燃法血传培育出抗性指数达139倍的抗蒿甲醚伯氏疟原虫系(RA line)。蒿甲醚亲代系的 SD_{90} 0.49 mg/kg, 抗性系的 SD_{90} 68 mg/kg。抗性培育第67代时停药, 经血传至38 wk时抗性基本消失。以抗性系P(passage) 63, P 70, P 85, P 108其 I_{90} 分别为<15, 16, <57, <58依次测试青蒿酯钠、青蒿素、乙胺嘧啶和氯喹的交叉抗性, 其 I_{90} 为15, 15, 0, 16。

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

蒿甲醚(artemether)是青蒿素(artemisinin)的衍生物, 用于救治脑型疟。在速效、低毒方

面优于氯喹和现有其它抗疟药; 治疗抗氯喹恶性疟具有显著效果⁽¹⁾。鉴于人疟原虫对抗疟药产生抗性的报道日益增加, 因此有必要探讨疟原虫对蒿甲醚产生抗药性的可能性。本文报道伯氏疟原虫N株对蒿甲醚抗药性的实验研究。



Artemether

1987年4月6日收稿 1988年2月22日接受

¹ 本项目得到全国青蒿素研究指导委员会的资助

材料和方法

材料 亲代系伯氏疟原虫 N 株 (*Plasmodium berghei* N strain) 由军事医学科学院微生物流行病研究所引进。Swiss 小鼠, ♂, 体重 $19.8 \pm SD 1.3$ g, 系本所动物房繁殖。蒿甲醚由昆明制药厂供给, 青蒿素由本所化学室提供, 青蒿酯钠由广西桂林制药二厂供给, 乙胺嘧啶、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。

抗性培育

1. 剂量递增法⁽²⁾ 每鼠腹腔接种感染疟原虫的红细胞 $\geq 1 \times 10^7$, 接种之日为 d_0 , 次日为 d_1 , 依次类推。接种后随机将小鼠分为 3-4 组, 每组 5-10 只, 设一对照组, 其余为给药组。用药量始自小剂量逐代递增。 d_0 - d_3 用药, 药后 48 h 或不定时取鼠尾血涂薄血膜, 甲醇固定, 吉氏染色, 镜检, 择大剂量组红细胞感染率 (EIR) $\geq 2\%$ 的小鼠作为血传下一代的种源。

2. 剂量递增-原虫复燃法 在小鼠接种原虫之日 (d_0), 给予单次大剂量药物, 药后逐日取鼠尾血涂薄血膜, 镜检, 待 EIR 复燃 $\geq 2\%$ 时, 血传下一代。

抗性稳定性 抗性虫株培育达一定抗性时停药, 每周血传原虫一次, 并观察和测定原虫消长、抗性水平的变化, 以及恢复至正常毒力所需的时间。

原虫生长特征和感染毒力 将亲代系、抗性系原虫各 1×10^7 分别接种给 10 只小鼠, 然后在 20 d 内逐日涂薄血膜, 镜检, 计算 EIR、查测原虫的消长及对小鼠的感染毒力。

药物敏感性的测定 以“4d 抑制性试验”测定原虫对药物的敏感性, 用线性回归计算 SD_{90} (dose suppressing 90% parasitaemia), 抗性指数 (I_{90}) 为抗性系 SD_{90} 与亲代系 SD_{90} 之比。

结 果

抗蒿甲醚系 (RA line) 的培育 在剂量递

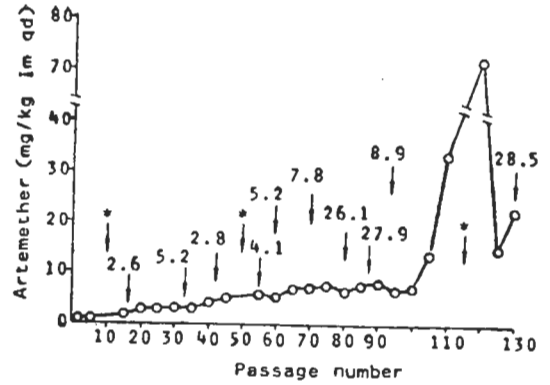


Fig 1. Using a stepwise dose increase method induced resistance to artemether with *P. berghei* N strain in mice. \downarrow indicated SD_{90} mg/(kg·d) for the "4-d suppressive test" at that passage. * was the passage in the absence of drug pressure.

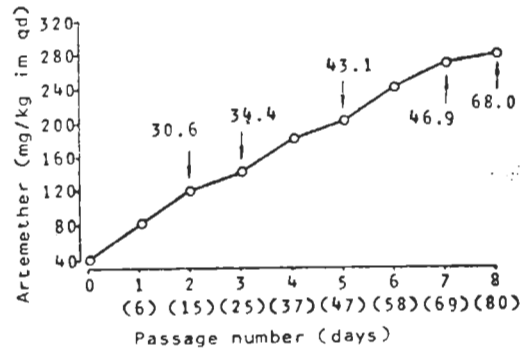


Fig 2. Inducing resistance to artemether with *P. berghei* N strain in mice by stepwise dose and relapse technique.

增量培育 RA 系的时间与剂量曲线上, 疟原虫抗性培育至 P 16, P 33, P 42, P 55, P 60 时, 其抗性水平 (I_{90}) 依次为 5.3, 10.7, 5.7, 8.4, 10.7。从 P 33-P 60 的 I_{90} 可以看出疟原虫抗性发育是缓慢的, 而自 P 60 后原虫抗性水平呈逐渐上升的倾向。P 70, P 80, P 87 的 I_{90} 分别为 15.9, 53.2, 57。但 P 93-P 130 又出现第二次原虫抗性发育减慢、下降的趋势, P 93 的 I_{90} 为 18.1, P 130 为 58 (图 1)。为克服原虫抗性发育变慢, 在 P 127 的基础上改用剂量递增-原虫复燃法继续培育, 原虫抗性水平则持续上升。P'2 (剂量递增-原虫复燃法第 2 代) 的 I_{90} 为 62, P'3 为 70, P'5 为 88, P'7

为 96, P'8 为 139。在 P'7, P'8 小鼠用药剂量 $>260 \text{ mg/kg}$ 时, 出现中毒死亡(蒿甲醚 LD_{50} 263 mg/kg ⁽³⁾), 血中 EIR 仍很高。由图 2 所示, 在剂量递增法培育 RA 系第 127 代、 I_{90} 为 58 的基础上, 改用剂量递增-原虫复燃法, 历经 8 代、80 d 培育出 I_{90} 为 139 的 RA 系虫株。

抗蒿甲醚系的稳定性 取以剂量递增法培育的 RA 系 P 67、 I_{90} 为 15 的抗性原虫, 停药血传, 10 wk 后其 SD_{90} 为 3.94 mg/kg , I_{90} 为 8; 20 wk 后 SD_{90} 1.23 mg/kg , I_{90} 2.5。至 38 wk 时 RA 系原虫的 EIR 及对小鼠的感染毒力与亲代系相近, 存活天数 $9.2 \pm 0.8 \text{ d}$ 。表明原虫对蒿甲醚的抗性基本消失(表 1, 图 3)。

抗蒿甲醚系、亲代系疟原虫的毒力比较

由表 1、图 3 可知, 亲代系原虫 EIR 上升快,

Tab 1. Infective virulences of artemether-resistant (RA) line of *Plasmodium berghei* vs the parent N strain in mice.

P. berghei	Death time (d)					Death Total
	1-4	5-8	9-12	13-16	17-20	
N strain	0	6	4	—	—	10/10
P 16*	0	0	0	0	2	2/10
P 33	0	0	0	0	1	1/10
P 55	0	0	0	0	0	0/10
P 67†	0	1	4	—	—	5/5

* RA line passage 16 th.

† P67: Starting from the RA line passage 67, a further 38 wk passages made in the absence of drug selection pressure.

Tab 2. Activity of 4 antimalarials against the artemether-resistant (RA) line of *P berghei* compared with the parent N strain in suppressive tests in mice.

RA line Passage	I_{90}	Compound	Route	$\text{ED}_{90} \pm \text{L}_{90}^{25} \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d}) \times 4$		I_{90}^{\dagger}
				N strain	RA line	
70	16	Artemisinin	im	2.10 ± 0.82	31.0 ± 12.7	15
63	15	Sodium artesunate	ip	1.66 ± 0.58	25.2 ± 9.6	15
85	57	Pyrimethamine	ig	0.11 ± 0.04	0.1 ± 0.05	0
108	58	Chloroquine	ig	1.24 ± 0.41	19.5 ± 9.1	16

* L_{90}^{25} The 95% average confidence limit of ED_{90} .

† $I_{90} = \text{ED}_{90}$ in RA line/ ED_{90} in parent N strain.

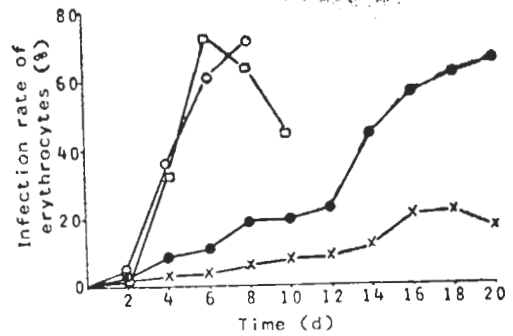


Fig 3. Growth of *P berghei* N strain (○) compared with the RA line passage 16 (●), 55 (×) and the resistance stability test of the RA line passage 67 in the absence of drug pressure up to 38 wk (□).

毒力强, 感染鼠的病程短, 宿主存活时间为 $7.5 \pm 1.4 \text{ d}$ 。RA 系则随着抗性水平的提高, 感染鼠的原虫 EIR 缓慢上升, 其毒力明显弱于亲代系, 病程也较亲代系明显延长, 宿主存活时间 $>20 \text{ d}$ 。

抗蒿甲醚系对 4 种抗疟药的交叉抗性 取剂量递增法培育的 RA 系: P 63, P 70, P 85, P 108、其 I_{90} 分别为 $<15, 16, <57 <58$ 的原虫和亲代系原虫依次对青蒿酯钠、青蒿素、乙胺嘧啶和氯喹进行药物敏感性测定。表 2 说明, RA 系原虫对青蒿素、青蒿酯钠 I_{90} 皆为 15, 提示相互间有明显的交叉抗性; 对氯喹 I_{90} 16(RA 系 P 108 $I_{90} <58$), 说明有一定的交叉抗性; 对乙胺嘧啶则无交叉抗性。

讨 论

本实验伯氏疟原虫血传感染小鼠抗蒿甲醚系的培育起始于剂量递增法。疟原虫对蒿甲醚产生抗性达一定水平后，曾两度呈缓慢发育状态。推测此现象一为药物量效关系发生改变，二是原虫本身机能发生变化。在改用剂量递增与原虫复燃相结合的方法后，原虫抗性发育进程明显加速，在较短的时间内选育出小鼠用药量达 280 mg/kg，超出中毒量 (260 mg/kg)、具有较高抗性 (I_{90} 为 139) 的 RA 系。在 RA 系原虫停药血传 38 wk (266 d) 抗性才基本消失。由此说明一旦原虫对蒿甲醚产生抗性后，短期内抗性不易消失。因此，为延长蒿甲醚在临床上的使用寿命，最好能合理的药物配伍，以延缓原虫抗药性的产生。

采用剂量递增与原虫复燃相结合的方法进行 RA 系的培育，与文献 (4, 5) 的抗性培育方法基本一致，都获得了较好的效果。在抗性培育的方法学上，由本实验 RA 系的培育与文献 (6) 报道抗伯氨喹系的培育方法，均说明在疟原虫抗性培育过程中，其传代时机、原虫密

度、用药时间及用药剂量等因素为实验成败的关键环节。

致谢 本所刘爱如助理研究员指导；济南市第五人民医院唐纯青医师参加部分实验工作；本文由本所朱海、魏振兴和田樱副研究员审阅。

参 考 文 献

- 1 Qinghaosu Antimalaria Coordinating Research Group. Antimalaria studies on Qinghaosu. *Chin Med J* 1979; 92 : 811
- 2 Peters W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. I. Chloroquine resistance. *Exp Parasitol* 1965; 17 : 81
- 3 顾浩明、刘明章、吕宝芬, 等. 蒿甲醚在动物的抗疟作用和毒性. *中国药理学报* 1981; 2 : 138
- 4 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 : 405
- 5 李高德. 伯氏疟原虫 K 173 株对喹啉抗药性的实验研究. *药学报* 1985; 20 : 412
- 6 Merkli B, Peters W. A comparison of two different methods for the selection of primaquine resistance in *Plasmodium berghei*. *Ann Trop Med Parasitol* 1976; 60 : 473

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Jul, 9 (4) : 352-355

Development of artemether-resistant line of *Plasmodium berghei*

CHENG Li-Fang, LÜ Li-Li, WU Li-Li

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

ABSTRACT Using stepwise dose increase and stepwise dose-relapse methods, an artemether-resistant line (RA line) was developed. It was resistant to the toxic effects of the drug which could cause death of the host. The SD_{90} of artemether in *P. berghei* N strain was 0.49 mg/kg, and that of the RA line was 68 mg/kg. The RA line was more stable without artemether dosage. The RA line passage 67 was used as the source and passaged in untreated mice for 38 passages (once a week, a passage) which the parasites essentially reverted to normal

sensitivity to artemether virtually. The I_{90} of the RA line passage 63, 70, 85, 108 were <15, 16, <57, <58, respectively which were successively determined by cross-resistance to sodium artesunate, artemisinin, pyrimethamine and chloroquine. The I_{90} of the above 4 drugs were 15, 15, 0 and 16, respectively.

KEY WORDS *Plasmodium berghei*; anti-malarials; artemether; artemisinin; sodium artesunate; pyrimethamine; chloroquine; microbial drug resistance