

青蒿素伍用磺胺多辛-乙胺嘧啶延缓伯氏疟原虫抗药性的作用¹

周义清、宁殿奎 (军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100850)

提要 采用小鼠伯氏疟原虫 K 173 株体内法测定青蒿素、磺胺多辛-乙胺嘧啶的合理配伍及其延缓疟原虫抗药性的作用。结果表明, 青蒿素伍用磺胺多辛-乙胺嘧啶的最佳配比为 400:1。三药伍用显示相加作用, 抗性虫系的耐药剂量及抗性指数明显低于单用。伍用后对鼠疟有高效、速效和延缓其抗性的作用特点。

关键词 抗疟药; 青蒿素; 磺胺多辛; 乙胺嘧啶; 合并用药; 微生物抗药性; 伯氏疟原虫

常用抗疟药都在不同程度上产生了抗药性⁽¹⁾, 因此预防和延缓疟原虫产生抗性, 已成为疟疾化疗研究的重要课题之一。青蒿素(artemisinin, Art)是我国研制的新型抗疟药, 临床证明它对抗氯喹恶性疟有良好的治疗作用⁽²⁾, 但鼠疟原虫对它及其衍生物同样也能产生抗性⁽³⁾。为此, 研究延缓原虫对 Art 产生抗性的办法, 对延长新药的使用寿命有其现实意义。本文报告 Art 伍用磺胺多辛(原名周效磺胺)-乙胺嘧啶(sulfadoxine-pyrimethamine, Sul-Pyr)对鼠疟的抗药作用及其延缓抗性的效果。

材料和方 法

伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*) K 173 株为我室按常规保种, 1983 年引自英国伦敦卫生与热带医学院医学原虫系。

瑞士种昆明远交系小鼠, ♂, 体重 18-22 g, 由我院实验动物中心提供。室温 20-24℃, 相对湿度为 50-80%。

Art(昆明制药厂); Pyr(西南制药二厂); 磺胺多辛(sulfadoxine, Sul)由本所药化室供

应。Sul 与 Pyr 2:1 相伍。实验前按设计剂量加 Tween-80, 经研磨配成水悬浮液。剂量均以 mg/kg 计, ig 给药, 每次 0.2 ml/鼠。

效价评定 采用“4 d 抑制试验”⁽⁴⁾, d 4 以小鼠尾部取血涂薄片, 用甲醇固定, 吉姆萨染色, 计算疟原虫平均寄生率, 求出疟原虫抑制率, 用直线回归方程计算 SD_{50} 和 SD_{90} 。增效指数按下式计算⁽⁵⁾: 增效指数 = 单药 SD_{50} 或 SD_{90} /复方中相对应单药 SD_{50} 或 SD_{90} 。

伍用药物间的作用 参照相加线图示法⁽⁶⁾分析判定结果: 凡伍用药物 SD_{90} 的座标点位于相加线附近, 判为药物间有相加作用; 如 SD_{90} 的座标点位于相加线之下, 且远离此线, 定为药物间有增效作用; 当 SD_{90} 落在相加线上方, 且远离该线, 判为药物间呈拮抗作用。

抗性虫系培育 采用药物递增传代法最优方案⁽⁷⁾。取小鼠 10 只, 每只 ip 接种含 1×10^7 个亲代疟原虫寄生 RBC 血液 0.2 ml, 接种日为 d 0。感染后小鼠随机分为两组, 其中一组起始给药量为 1 个 SD_{90} , 另一组给药量大于 SD_{90} , d 3-5 qd 称为第一代。d 7(下同)自大剂量组选择供血鼠, 按上述过程培育下代。每代递增药量视疟原虫耐受程度而定, 但其增加量至少要保证 d 7 血传时有一只供血鼠的寄生率在 2-10%。每 5 代测抗性指数一次, 并观察原虫生物学变化。抗性指数按下式计算: I_{90} = 抗性虫系 SD_{90} /亲代虫株 SD_{90} 。抗性程度按抗性指数分类法⁽⁸⁾划分: $I_{90} \cong 1$ 为敏感; $I_{90} = 2-10$ 为轻度抗性; $I_{90} = 11-100$ 为中度抗性; $I_{90} > 100$ 为重度抗性。拟培育的抗性品系是: 抗青蒿素 R Art; 抗磺胺多辛-乙胺嘧啶 R Sul-Pyr; 抗青蒿素 + (磺胺多辛-乙胺嘧啶) R Art + (Sul-Pyr)。

1987 年 6 月 26 日收稿 1988 年 4 月 23 日接受

¹ 本文为中国青蒿素及其衍生物开发研究指导委员会资助的课题

Tab 1. Schizontocidal effect of artemisinin (Art) and sulfadoxine (Sul)-pyrimethamine (Pyr) in blood ig alone or in combination with varying proportions to mice infected with *Plasmodium berghei* K 173 strain in the "4 d suppressive test".

Art mg/(kg·d)	Schizontocidal effect (%)						SD ₅₀	SD ₉₀
	0	0.05	0.1	0.3	0.5	0.9*		
0	—	52.1	70.7	99.8	99.97	100.0	0.051	0.14
5	27.1	46.4	64.7	98.4	100.0	100.0	0.064	0.16
10	33.5	54.0	86.6	95.8	100.0	100.0	0.054	0.14
20	53.3	69.7	81.0	99.8	100.0	100.0	0.041	0.11
40	82.9	75.5	86.5	99.9	100.0	100.0	0.016	0.08
80	97.2	98.3	98.5	100.0	100.0	100.0	—	—
SD ₅₀	13.0	11.5	4.6	—	—	—		
SD ₉₀	55.0	26.0	24.5	3.2				

*Daily dose of Sul-Pyr (2 : 1) mg/kg

Tab 2. Indices of synergistic effects of Art and Sul-Pyr (2 : 1) ig in mixture of varying proportions to mice infected with *P. berghei* K 173 strain in the "4 d suppressive test".

Drug	SD ₅₀ (mg/kg) (95% confidence limits)	SD ₉₀ (mg/kg) (95% confidence limits)	Index of synergism	
			SD ₅₀	SD ₉₀
Art	15.8 (11.8-19.9)	37.9 (28.3-47.6)	—	—
Sul-Pyr (2 : 1)	0.11 (0.08-0.14)	0.27 (0.19-0.35)	—	—
Art + (Sul-Pyr)				
400 : 1	7.8 (6.1-9.5)	18.9 (14.7-23.1)	7.4	7.4
200 : 1	8.9 (6.4-11.4)	35.6 (25.5-45.7)	7.3	4.1

结 果

药物伍用剂量比 适合药物伍用的剂量范围, Art 为 10-40 mg/kg, Sul-Pyr (2:1) 为 0.05-0.10 mg/kg (表 1); 3 药伍用后药效呈相互作用 (图 1); Art 与 Sul-Pyr 抑制试验的最佳配比是 400:1, 其增效指数按 SD₅₀ 计为 7.43, 以 SD₉₀ 计为 7.41 (表 2)。

治疗作用 各组均以 20 × SD₉₀ 剂量单次口服试验, 尽管 Art + (Sul-Pyr) 伍用组用药量比单用少 360.8 mg/kg, 但杀虫速度显著比 Sul-Pyr 快, 原虫下降 90 和 99% 的时间, 分别比 Sul-Pyr 快 14.6 和 10.4 h (表 3)。“4 d 抑制试验”表明, 3 药伍用组的作用明显优于单用。Art 20 mg/kg + (Sul-Pyr) 0.05 mg/kg 原虫

抑制率达 90.7%, 而单用 Art 20 mg/kg 抑制率仅为 77.8%, 当 80 mg/kg 时方为 99.3%。Sul-Pyr 0.05 mg/kg 的抑制率只有 8.3%, 0.4 mg/kg 方能达到 99.9% (图 2)、Art + (Sul-Pyr) 组 d 4 的原虫转阴率也显著比单方高, 但 d 10-30 的原虫转阴率及小鼠平均死亡时间与 Sul-Pyr 无显著差异。

延缓抗性的作用 3 药伍用组抗性虫系的耐药量显著低于单方虫系。第 40 代 R Art + (Sul-Pyr) 系耐 Art 量为 249.38 mg/kg, 耐 Sul-Pyr 量为 0.62 mg/kg, 同期 R Art 系的耐 Art 量高达 700 mg/kg, R Sul-Pyr 虫系的耐 Sul-Pyr 量为 7.0 mg/kg。3 药抗性虫系第 40 代的耐药量, 大体相当于单方抗性虫系第 8 代的耐药水平 (图 3), R Art + (Sul-Pyr) 虫系的

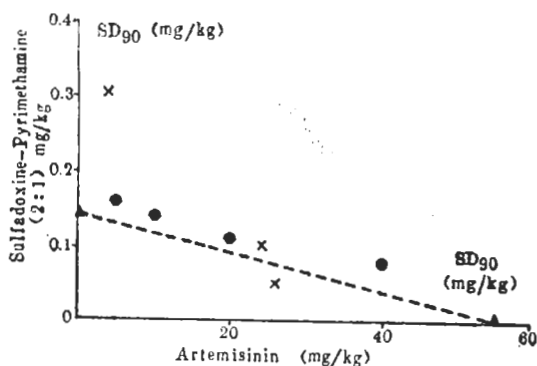


Fig 1. Potentiation of suppressive action against *P. berghei* erythrocytic infection in mice. SD_{90} of Sul-Pyr or Art alone (▲); SD_{90} of Sul-Pyr in combination with different doses of Art (●); SD_{90} of Art in combination with different doses of Sul-Pyr (×). A simple additive effect would be presented if the points fell on the dotted lines joining the respective ED values for the individual compounds (▲); Points below this line indicate potentiation of activity; Points above, drug antagonism.

Tab 3. Blood schizontocidal rate of Art and Sul-Pyr ig alone or in mixture to mice infected with *P. berghei* K 173 strain.

Drug	Dose mg/kg 20 × SD_{90}	Reductive rate (h)	
		of parasitaemia 90%	99%
Art	730.0	21.9	30.9
Sul-Pyr (2 : 1)	2.8	35.2	41.6
Art + (Sul-Pyr) (400 : 1)	372.0	20.6	31.2

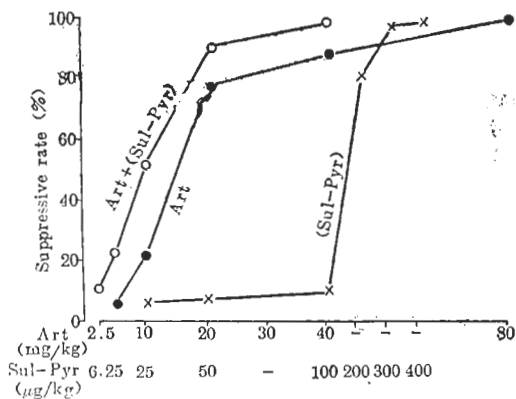


Fig 2. Suppressive action of Sul-Pyr and Art ig alone or in mixture to mice infected with *P. berghei* in the "4 d suppressive test"

抗性指数也显著低于单方虫系。以第 55 代的 I_{90} 相比, R Art 为 8.2, R Sul-Pyr 为 33.4, 而 R Art(Sul-Pyr) 的只有 1.4。从 10-80 代的抗性指数动态变化值, R Art + (Sul-Pyr) 的 I_{90} 最高为 5, 大部分时间维持在 2-3 之间; R Art

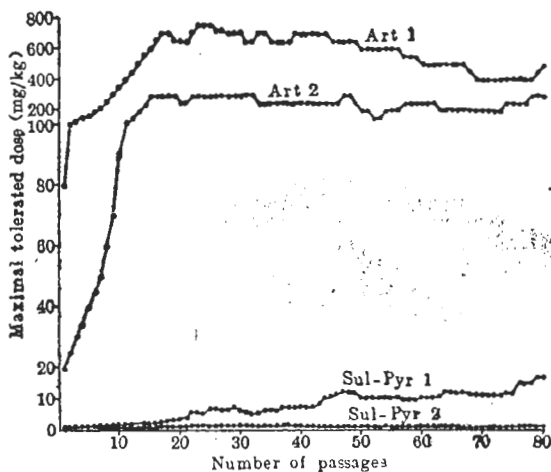


Fig 3. Maximal tolerated dose (MTD) of *P. berghei* K 173 strain in mice under increasing drug pressure.

Art 1; MTD of Art alone

Art 2; MTD of Art in Art + (Sul-Pyr) combination

Sul-Pyr 1; MTD of Sul-Pyr alone

Sul-Pyr 2; MTD of Sul-Pyr in Art + (Sul-Pyr) combination

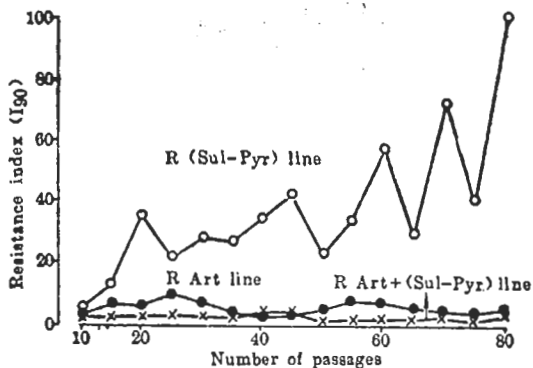


Fig 4. Drug resistant indices of *P. berghei* K 173 strain in mice under increasing drug pressure R Art; artemisinin resistant line, R Sul-Pyr; sulfadoxine-pyrimethamine resistant line, R Art + (Sul-Pyr); artemisinin + (sulfadoxine-pyrimethamine) resistant line.

的 I_{50} 峰值为 10, 多数时间波动在 4-8 之间, R Sul-Pyr 系自第 15 代起 I_{50} 波动在 20-50 之间, 第 80 代后则 >100 (图 4)。

讨 论

药物间的协同作用既取决于药物的特性, 又与伍用药物的合理组成有关。鉴于药物伍用作用的复杂性, 单一试验方法很难作出正确评价, 因此本实验采用系列试验和综合评价的方法, 对 Art + (Sul-Pyr) 复方的合理组成、作用特点等进行了较系统的实验研究, 取得了比较满意结果。但实验时间长, 耗资较大有待改进。实验结果表明, Art, Sul, Pyr, 3 药伍用在药效上呈协同作用, 它具有剂量小, 杀虫速度快, 能延缓抗性的产生和降低抗性水平的作用特点, 对 Art, Sul, Pyr 的合理使用有参考意义。

Peters 曾指出, 抗疟药的合理伍用能够延缓抗药性的产生, 但不能完全阻止抗性的出现⁽⁹⁾。本实验结果支持上述看法。Art + (Sul-Pyr) 3 药伍用后抗性产生速度明显缓慢, 抗性水平显著降低。但培育的所有虫系, 包括 2 药和 3 药伍用, 先后均出现了耐药量明显增加, 抗性指数显著增高和虫系毒力下降等抗药特征。

Sul-Pyr 对抗氯喹恶性疟有较好疗效⁽¹⁰⁾。本实验表明, Art + (Sul-Pyr) 3 药伍用优于 Art 和 Sul-Pyr 分别用药, 具有杀虫速度快, 治愈率高的优点, 这与蔡贤铮等临床报告结果⁽¹¹⁾一致。但 Chawira 等认为 Art 与 Sul-Pyr 伍用有拮抗作用(私人通信, 1985), 因未见到详细报道, 难以进行比较。

致谢 李国福、尚凤美、朱仲江、李景琦同志参加部分工作; 滕翥和教授对本稿进行审修; 单成启同志协助部分工作。

参 考 文 献

- 1 WHO. World malaria situation 1984. *Weekly Epidemiological Record* 1986; 61 : 133
- 2 广东海南青蒿抗疟临床研究协作组. 青蒿素治疗抗氯喹疟疾 65 例的效果观察. *新医药学杂志* 1979; 1 : 12
- 3 刘爱如、任遵华. 伯氏疟原虫对青蒿素钠的抗药性培育. *中国药理学报* 1987; 8 : 149
- 4 Peters W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. I. Chloroquine resistance. *Exp Parasitol* 1965; 17 : 80
- 5 万尧德、藏其中. 青蒿素伍用伯喹抗鼠疟近期复燃的研究. *药学通报* 1981; 16 : 9
- 6 Peters W. The action of some sulphonamides alone or with folic reductase inhibitor against malaria vectors and parasites. *Ann Trop Med Parasitol* 1968; 62 : 488
- 7 Merkli B, Richle RW. *Plasmodium berghei*: Diet and drug dosage regimens influencing selection of drug-resistant parasites in mice. *Exp Parasitol* 1983; 55 : 372
- 8 Merkli B, Richle RW. Studies on the resistance to single and combined antimalarials in the *Plasmodium berghei* mouse model. *Acta Trop* 1980; 37 : 228
- 9 Peters W. Prevention of drug resistance in rodent malaria by the use of drug mixture. *Bull WHO* 1974; 51 : 379
- 10 Ross Institute. Malaria prevention in travellers from the United Kingdom. (Report of meetings convened by the Ross Institute) *Br Med J* 1981; 283 : 214
- 11 蔡贤铮、梁爱花、庞学坚、罗勤奕. 青蒿素、周效磺胺、乙胺嘧啶、伯喹伍用一次疗法对抗氯喹恶性疟疗效的观察. *中华内科杂志* 1981; 20 : 724

Inhibitory effect of artemisinin-sulfadoxine-pyrimethamine combination on the development of drug-resistance in *Plasmodium berghei*

ZHOU Yi-Qing, NING Dian-Xi

(*Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*)

ABSTRACT By increasing drug pressure during successive weekly passages of *Plasmodium berghei* (K 173 strain) infection in mice, the retardative effects of artemisinin-sulfadoxine-pyrimethamine combination [Art + (Sul-Pyr)] on the rate of development of drug resistance in parasites were investigated. The results revealed that this drug combination markedly decreased the rate of development of resistance to the individual components. After 80 passages over 560 d, the resistant indices of Art and Sul-Pyr resistant lines were 5.7 and 118.6, respectively, while that of the Art + (Sul-Pyr) resistant line was only 3.5. In addition,

the maximum tolerated dose of the Art + (Sul-Pyr) line was far less than that for each individual compound. The maximum tolerated doses for the Art and Sul-Pyr lines were 500 and 17 mg/kg, respectively, while those for Art + (Sul-Pyr) line was 229 and 0.75 mg/kg, respectively.

The results suggest that the optimal combination of Art and Sul-Pyr is at a ratio of 400 : 1.

KEY WORDS antimalarials: artemisinin; sulfadoxine; pyrimethamine; drug combinations; microbial drug resistance: *Plasmodium berghei*