

伯氨喹啉对约氏鼠疟原虫配子体和孢子体作用

王淑芬 刘光裕 滕翕和

(军事医学科学院 微生物流行病学研究所)

本文以瑞士杂种和 C₅₇BL/6 Jax 纯种小鼠为疟原虫的脊椎动物宿主,以斯氏按蚊为疟原虫的无脊椎动物宿主,较详细系统地定时定量地评价了标准抗疟药伯氨喹啉对约氏鼠疟原虫 (*Plasmodium yoelii yoelii* By265) 配子体和孢子体作用。

约氏鼠疟原虫是国内各实验室常用的疟原虫株,伯氨喹啉是目前国内外公认的配子体 (Gametocyte) 和休眠体 (Hypnozoite) 杀灭剂代表药^[3]。然而,伯氨喹啉对约氏疟原虫配子体和孢子体作用的定量资料,国外无报道,国内只有部分报告^[3]。国外有关药物配子体和/或孢子体作用较为详细地定量研究都是以猴或人为模型完成的^[4-6]。鉴于猴在我国来源难、价钱昂贵;人作为实验模型不被允许,故我们以小鼠为模型用标准药伯氨喹啉进行了探索,取得了较为详细系统的定量数据,现报道如下,对抗疟药研究与开发可能具有重要意义。

材料和方法

(一) 材料

1. 疟原虫株 约氏疟原虫,1976年自法国巴黎自然博物馆引进,在本实验室定期血传-蚊传,以稳定毒力,保持配子体的密度和活力。实验一律采用血传 II 代、接种后 3—4 天的原虫。

2. 媒介昆虫 斯氏按蚊 (*Anopheles stephensi* Hor 株),1973年首都医院自英国伦敦 Horton 医院引进,1976年转至本实验室。实验采用同批饲养的羽化后 3—5 日龄的蚊虫。

每天光照 12 小时,以 5% 葡萄糖水喂养在温度为 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、相对湿度为 $80 \pm 5\%$ 的养蚊室内。

3. 动物 (1) 瑞士小白鼠 昆明株,远交系。抗日战争时期引进。4—5 周龄,体重 18—22 克,雌或雄性,健康。本院实验动物场提供。(2) C₅₇BL/6Jax 纯品系小黑鼠,对约氏疟原虫孢子高度敏感^[1],6—8 周龄,雌或雄性,体重 18—22 克,健康。本院实验动物场供应。

4. 药物 伯氨喹啉,为二磷酸盐,橙红色结晶性粉末,溶于水。上海 14 药厂生产,批号 801125。剂量一律按基质计算。药液实验当天配制,贮冰箱备用。

5. 器材 一律高压消毒。

(二) 方法 以 1×10^7 寄生红细胞/0.2 毫升腹腔接种给每只受试的瑞士小鼠,记作 D₀。于 D_{2.5} 每鼠取尾血涂薄血膜,染色镜检预选。选每个油镜视野都能查见成熟的雌和/或雄性配子体的鼠,按配子体密度均匀分组,每组 3—5 只。口服给药,共 2 次,间隔 4 小时,平行的空白对照只给药物溶剂。受试鼠接受药物前断料饥饿 12 小时。于首次药前片刻和末次药后不同时间涂制薄血膜或血餐感染媒介昆虫,观察不同的实验结果。末次药后 12 小时每鼠尾血涂片,观察药物对配子体作用的半数有效剂量;同一组鼠,末次药后 0—120 小时涂片,观察杀配子体速度;末次药后 12 小时血餐感染蚊虫,测定药物对孢子体间接阻断最小有效剂量;同一组鼠,末次药后 15—120 分钟血餐感蚊虫,

测定药物对孢子体间接阻断最早时间。以未接受药物的配子体血症鼠先行感染蚊虫，于次日喂以不同浓度的药物糖水，连续4天，空白对照只给糖水，观察药物对孢子体直接阻断浓度。全部受试蚊虫感染前饥饿24小时，感染后第1天用乙醚轻度麻醉，剔除未吸血者。每笼含蚊虫数、置放献血鼠数、血餐时间均相对一致。每类实验重复2—3次。全部实验皆在配子体血症最佳时间内完成^[2]。

(三) 观察指标

1. 配子体 计数100白细胞(WBC)油镜视野内成熟的雌、雄配子体总数，以平均值求出配子体总数的清除率和半数有效剂量。

清除率 = $\frac{\text{药前配子体总数} - \text{药后配子体总数}}{\text{药前配子体总数}} \times 100\%$

半数有效剂量(ED₅₀)采用对数机率格纸法。

2. 孢子体 于血餐感染后8—9天，每笼取样10—20只雌蚊，解剖蚊胃，镜下检查其被感染的阴、阳性数和阳性胃壁上的卵囊总数及分化情况。

3. C₅₇BL/6Jax 叮咬试验 凡胃壁上出现卵囊的实验组，均于感染后第14天，置放对孢子体感染高度敏感的C₅₇BL/6Jax鼠2只，供蚊叮咬30分钟，于叮咬后第4、7天各检查原虫血症1次，凡蚊胃壁不出现卵囊或C₅₇BL/6Jax鼠外周血内不出现原虫者为阻断有效。

结 果

(一) 对配子体作用 末次药后12小时对配子体的平均清除率，6—10 mgkg⁻¹为71.29—72.25%；2.16—3.6 mgkg⁻¹为40.67—54.67%；0.279 mgkg⁻¹只有16.22%。清除配子体的半数有效剂量(ED₅₀)为3.6±0.68 mgkg⁻¹；95%可信限为2.24—4.96 mgkg⁻¹(表1)。

5 ED₅₀ 剂量(即18 mgkg⁻¹)，药后4小时清除率为0；药后7小时为1.3%。7~12小时之间清除作用呈波动状态。24小时清除率75.6%，48小时虽清除率高达96.1%，但实际药物清除作用只有69.2% (需减去此时空白组

表1 伯氨喹啉对约氏疟原虫配子体清除效果

| 药物剂量 (mgkg ⁻¹) | 清除率 (%) | | | | ED ₅₀ ±SD (95%可信限) |
|----------------------------|---------|-------|-------|-------|----------------------------------|
| | 实验1 | 实验2 | 实验3 | 平均 | |
| 10 | 76.13 | 64.08 | 76.55 | 72.25 | 3.6±0.68 (2.24—4.96) |
| 6 | 78.19 | 67.46 | 68.23 | 71.29 | |
| 3.6 | 70.00 | 35.11 | 58.90 | 54.67 | |
| 2.16 | 25.42 | 38.89 | 57.71 | 40.67 | |
| 0.279 | 0 | 22.82 | 25.83 | 16.22 | |
| 空白 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| ED ₅₀ | 3.20 | 4.40 | 3.24 | 3.61 | |

自然下降的26.9%)。120小时配子体数量明显增加，清除率下降至17.2% (表2、图1)。

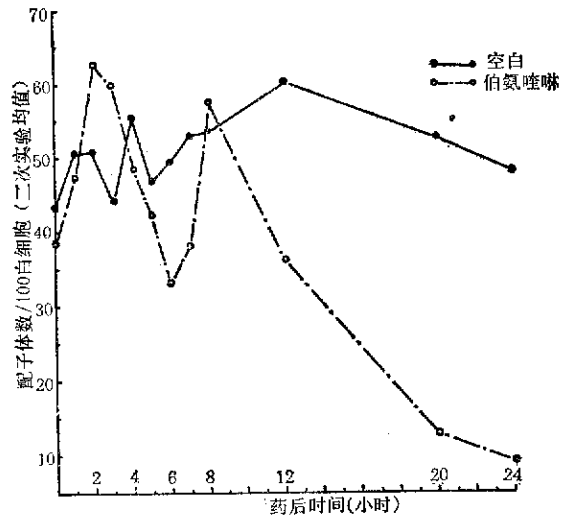


图1 伯氨喹啉对约氏疟原虫配子体清除效应曲线

表2 伯氨喹啉对约氏疟原虫配子体清除速度*

| 药后时间 (小时) | 药物组 | | 空白组 | |
|-----------|------------|--------|------------|--------------------|
| | 配子体/100WBC | 清除率(%) | 配子体/100WBC | 清除率(%) |
| 0 | 38.9 | 0 | 43.5 | 0 |
| 4 | 48.8 | 0 | 55.9 | 0 |
| 7 | 38.4 | 1.3 | 53.3 | 0 |
| 12 | 36.7 | 5.7 | 60.2 | 0 |
| 24 | 9.5 | 75.6 | 48.3 | 0 |
| 48 | 1.5 | 96.1 | 31.8 | 26.9 ¹⁾ |
| 120 | 32.2 | 17.2 | 9.4 | 78.4 ¹⁾ |

* 5ED₅₀ 两次实验结果；1) 多数鼠特异死亡。

(二) 对孢子体作用

1. 间接阻断作用 1.296 mgkg⁻¹，三次实验共抽样解剖30只蚊媒，30只全部为阴性；

0.7776 mgkg⁻¹ 蚊胃阳性率 16.7%、平均卵囊 11.9 (空白组为 100 时), C₅₇BL/6 Jax 鼠不出现原虫血症; 0.46656 mgkg⁻¹ 胃阳性率 43.3%、平均卵囊 35.8, C₅₇BL/6 Jax 有的出现原虫血症, 有的不出现; 0.279936 mgkg⁻¹ 胃阳性率, 卵囊数量均与空白组无差别, C₅₇BL/6 Jax 全为阳性 (表 3)。

表 3 伯氨喹啉对约氏疟原虫孢子体间接阻断效果*

| 药物剂量 (mgkg ⁻¹) | 解剖蚊数 | 阳性蚊数 | 阳性率 (%) | 卵囊均数 ¹⁾ | 卵囊域值 | C ₅₇ BL/6 Jax |
|----------------------------|------|------|---------|--------------------|----------|--------------------------|
| 1.296 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| 0.7776 | 30 | 5 | 16.7 | 11.9 | 8—19.7 | - |
| 0.46656 | 30 | 13 | 43.3 | 35.8 | 9.7—42 | ± |
| 0.279936 | 30 | 25 | 83.3 | 125.6 | 32.7—202 | + |
| 空白 | 30 | 26 | 86.7 | 100 | 7—201.7 | + |

* 三次实验结果; 1) 阳性蚊胃空白对照视为 100。

表 4 伯氨喹啉对约氏疟原虫孢子体间接阻断时间*

| 药物组 | 药后时间 (分) | 解剖蚊数 | 阳性蚊数 | 阳性率 (%) | 卵囊均数 ¹⁾ | 卵囊域值 | C ₅₇ BL/6 Jax |
|-----|----------|------|------|---------|--------------------|-------------|--------------------------|
| 药物组 | 15 | 30 | 18 | 60 | 30.7 | 7.3—64.7 | + |
| | 30 | 30 | 17 | 57 | 10.4 | 2.7—77 | ± |
| | 60 | 30 | 8 | 27 | 5.6 | 2—21.3 | - |
| | 120 | 30 | 5 | 17 | 5.7 | 3—4 | - |
| 空白组 | 15 | 30 | 29 | 97 | 100 | 21.3—300 以上 | + |
| | 30 | 30 | 29 | 97 | 100 | 17.3—300 以上 | ± |
| | 60 | 30 | 29 | 97 | 100 | 22—300 以上 | + |
| | 120 | 30 | 25 | 95 | 100 | 17.7—220.7 | + |

* 0.7776 mgkg⁻¹ 三次实验结果; 1) 阳性蚊胃 空白视为 100。

0.7776 mgkg⁻¹, 药后 15 分钟即能显出对孢子体的间接阻断作用, 空白组胃阳性率 97%、平均卵囊 100、最高卵囊数量超过 300, 而平行的药物组各为 60%、30.7、64.7。药后 30 分钟可部分地保护 C₅₇BL/6 Jax 鼠不出现原虫血症。药后 60—120 分钟, 可完全阻断孢子感染, 三次实验, 每次都使 C₅₇BL/6 Jax 全得到保护, 而空白组则全部阳性。药物组各个时间点平均卵囊密度明显地低于空白组 (表 4、图 2)。

2. 直接阻断作用 两次实验结果表明伯氨喹啉 0.001—0.01% 浓度下, 胃阳性率高达 90%, 平均卵囊密度 146.4—158.3, 最高卵囊密度平

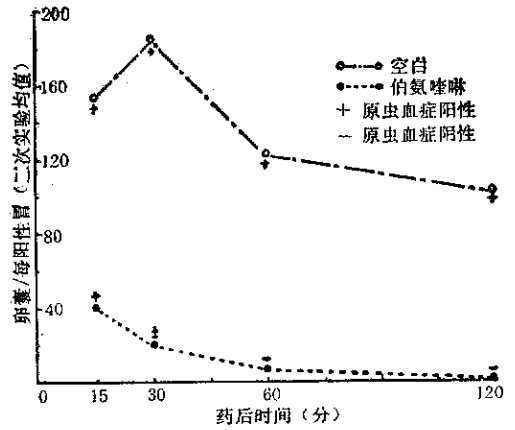


图 2 伯氨喹啉对约氏疟原虫孢子体间接阻断效应曲线

表 5 伯氨喹啉对约氏疟原虫孢子体直接阻断作用*

| 药物浓度 (%) | 解剖蚊数 | 阳性蚊数 | 阳性率 (%) | 卵囊均数 ¹⁾ | 卵囊域值 | C ₅₇ BL/6 Jax |
|----------|------|------|---------|--------------------|-------------|--------------------------|
| 0.05 | 全亡 | ... | ... | ... | ... | ... |
| 0.01 | 40 | 36 | 90 | 146.4 | 3—300 以上 | + |
| 0.001 | 40 | 36 | 90 | 158.3 | 11.5—300 以上 | + |
| 空白 | 40 | 38 | 95 | 174.6 | 79—300 以上 | + |

* 两次实验结果; 1) 阳性蚊胃。

均在 300 以上, C₅₇BL/6 Jax 鼠全部出现原虫血症, 与空白对照组无差别。0.05% 浓度, 蚊虫全部死亡 (表 5)。

讨 论

1. 以小鼠为模型能比较全面系统地定量评价抗疟药的配子体和/或孢子体作用。我们采用本实验模型和方法对目前国内外公认的标准阳性药伯氨喹啉进行了评价。其对约氏疟原虫配子体清除作用的 ED₅₀ 为 3.6±0.68mgkg⁻¹, 95% 总体可信限为 2.24—4.96 mgkg⁻¹。5ED₅₀ 剂量下 (即 18 mgkg⁻¹), 药后 7 小时清除作用出现, 24 小时效果最佳, 清除率为 75.6%。7—12 小时清除作用呈波动状态, 120 小时作用明显降低。间接阻断蚊胃卵囊感染的最小有效剂量为 1.296 mgkg⁻¹ (药后 12 小时)。0.7776 mgkg⁻¹ 药后 30—60 分钟可部分或全部地阻断孢子感染, 保护 C₅₇BL/6 Jax 不出现原虫血症。伯氨喹啉对约氏疟原虫孢子体没有直接阻断作用。

2. 伯氨喹啉作用于疟原虫配子体而不是孢

子体。从我们的实验结果比较清楚地看出,伯氨喹啉对约氏疟原虫只有清除配子体和间接阻断孢子体的作用,对孢子增殖并没有直接阻断的功效。而间接阻断孢子增殖的效力实质上是药物作用于配子体的一种间接反应。并且这种反应比配子体数量反应敏感。比如 18 mgkg^{-1} 药后 4 小时对配子体并无清除作用,但其量的 23^{-1} (即 0.7776 mgkg^{-1}) 药后/小时却能完全阻断孢子对 C₅₇BL/6 Jax 的感染。受药物作用后的配子体尽管数量、形态没有变化,但性质受了根本影响,故失去了在蚊体内继续孢子繁殖的生存能力。这个结论与 Terzian^[7]、Omar 等^[6]猴疟实验结果和 Warharst^[8] 根据人疟和鼠疟同位素示踪超微结构观察所作的分析是一致的。

3. 本模型方法的优点 (1) 可定量测定抗疟药的配子体和/或孢子体效价,便于等效量下进行药物间的合理比较。(2) 小鼠来源方便,价格便宜,远比用猴模经济。(3) 每次实验样本数可扩大,实验可多次重复,提高了结果的可靠性。虽鼠疟和猴疟一样,均属间日疟型,不能完全代表人恶性疟,但能为临床考核提供基础数据,回答临床上不能回答的问题。

4. 鼠疟配子体血症持续时间远比猴、人疟短,给工作带来一定困难。关键是把握住配子体血症的最佳时机和严格控制实验条件,合理设计,紧凑安排。约氏疟原虫配子体在瑞士小

白鼠外周血中密度及持续时间与接种剂量、血传代数等均有一定关系^[2]。根据我们的体验,采用血传 II 代、每鼠接种 1×10^7 寄生红细胞、接种后 3—4 天内进行药物实验最好。

参 考 文 献

- [1] 王淑芬等 1983 不同品系小鼠对约氏疟原虫-斯氏按蚊系统敏感性观察动物学杂志 (3): 4~6。
- [2] 王淑芬等 1984 约氏疟原虫配子体在小鼠外周血中自然消长观察 动物学杂志 (6): 15~18。
- [3] 邵葆若等 1984 咯萘啶等 4 种抗疟药对约氏鼠疟原虫配子体和孢子增殖影响寄生虫与寄生虫病杂志 2(1): 28~31。
- [4] Burgess, R. W., R. S. Bray 1961 The effect of a single dose of primaquine on the gametocytes, gametogony and sporogony of *Laverania falciparum* Bull. W. H. O. 24: 451—456.
- [5] Mohamed S. Omar, et al. 1974—1975 Gametocytocidal and sporontocidal effects of antimalarial drugs on malaria parasites II. action of the folic reductase inhibitors chlorguanide and pyrimethamine against *plasmodium cynomolgi* Exp. paras. 36—37: 167—177.
- [6] Omar, M. S. et al. 1973. Gametocytocidal and sporontocidal effects of antimalarial drugs on malaria parasites I. effect of single and multiple dose of primaquine on *plasmodium cynomolgi*. Exp. paras. 34: 229—241
- [7] Terzian, L. A., 1970 A note on the effects of antimalarial drugs on the sporogonous cycle of *P. Cynomolgi* in *A. stephensi*. paras. 61 (part 2): 191—194.
- [8] Warharst, D. C. 1984. Why are primaquine and the 8-aminoquinolines particularly effective against the mature gametocytes and the hypnozoites of malaria? Annals. Trop. Med. paras. 78(2): 165.