

伯氏疟原虫 K173 对哌喹抗性培育的初步观察

高岩¹ 邓长生² 王琪² 陈颖² 裴晶³ 陈沛泉² 宋健平^{1*}

【摘要】目的 培育伯氏疟原虫 K173 哌喹抗性株。**方法** 参照大剂量复燃法进行抗哌喹虫株的培育,每 5 代用 Peters 4 天抑制试验检测 90% 有效剂量 (90% effective dose, ED₉₀) 并计算抗性指数 (resistance index, I)₉₀。结合 Artekin 等抗性培育资料,比较哌喹和磷酸哌喹的抗药性。**结果** 实验历时 7 个多月,培育至 30 代,哌喹抗性株抗性指数 I₉₀ 为 22.9,属于中度抗性。Artekin 资料中,培育至第 30 代,磷酸哌喹抗性株抗性指数 I₉₀ 为 371.1,属于重度抗性;Artequick 药效学资料中,培育至第 30 代,哌喹抗性株抗性指数 I₉₀ 为 27.6,属于中度抗性。**结论** 哌喹较易产生抗药性,但其抗性比磷酸哌喹轻,抗性产生时间也较磷酸哌喹迟。

【关键词】 哌喹;磷酸哌喹;抗药性;伯氏疟原虫 K173

Drug resistance of piperazine in *Plasmodium berghei* K173 GAO Yan¹, DENG Chang-sheng², WANG Qi², CHEN Ying², PEI Jing³, CHEN Pei-quan², SONG Jian-ping^{1*}. ¹Research Center for Artemisia Annual L., Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China ²Science and Technology Park Ltd., Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510445, China ³Guangzhou Pharmaceutical Vocational School, Guangzhou 511455, China

*Corresponding author: SONG Jian-ping, Email:songjping@yahoo.com.cn

Supported by Yue Gang Biding Projects of Economic and Information Commission of Guangdong Province (TC10BH07-9), Guangzhou Science and Technology Projects (2009Z1-E301)

【Abstract】 Objective To induce the resistance to piperazine in a line of *Plasmodium berghei* K173. **Method** The 2% relapse technique was used for cultivation. Peters' 4-day suppressive test was performed to detect the drug's 90% effective dose (ED₉₀) in order to calculate the resistance index I₉₀. The resistance of piperazine and piperazine phosphate was compared with the statistics in Artekin et al. **Results** By cultivation to 30 passage, the I₉₀ of piperazine was 22.9 belonging to moderate resistance. Data in Artekin showed that at 30 passage, the I₉₀ of piperazine phosphate was 371.1 belonging to heavy resistance. While data in Artequick indicated that the I₉₀ of piperazine was 27.6 belonging to moderate resistance at 30 passage. **Conclusion** Piperazine was easy to become drug resistant, but the resistance was much milder than piperazine phosphate, and the occurrence time of the resistance was slower than piperazine phosphate.

【Key words】 Piperazine; Piperazine phosphate; Drug Resistance; *Plasmodium Berghei* K173

疟疾是一种严重危害人体健康的寄生虫病,在世界人群中具有较高的发病率和病死率^[1],是人类最古老的传染病之一。根据《2012 年世界疟疾报告》^[2],2010 年约有 2.19 亿疟疾病例(不确定范围为 1.54 亿至 2.89 亿),有 66 万人死亡(不确定范围为 49 万至 83.6 万),大多数死亡发生在非洲儿童中,每分钟就有一名儿童死于疟疾。抗疟药哌喹 (piperazine, PQ) 即磷酸哌喹 (piperazine phos-

phate, PQP) 去掉 4 个磷酸根和水分子,与磷酸哌喹均属于 4-氨基喹啉衍生物,用于疟疾的预防性服药,也可用于疟疾的治疗,主要作用于红细胞内期的裂殖体^[3],影响伯氏疟原虫红内期裂殖体的超微结构,能使滋养体食物泡膜和线粒体肿胀。哌喹分子式为 C₂₉H₃₂N₆Cl₂,相对分子质量 (M_r) 是 535.45,为类白色至淡黄色的结晶粉末,脂溶性,其结构式见图 1。

由于哌喹为脂溶性,而磷酸哌喹为水溶性,磷酸哌喹较利于机体的吸收。因此在相同剂量下,磷酸哌喹比哌喹的药效强,目前临床应用普遍采用磷酸盐形式^[3]。然而,磷酸哌喹由于含有四个磷酸根,其相对分子质量较哌喹要大很多,如含等量有效抗疟成分,用磷酸哌喹做成的药片就较大,每次服用量较多,这样对患者的依从性会产生一定影响。

DOI: 10.3760/ema.j.issn.1673-4122.2013.02.007

基金项目:广东省经信委粤港招标项目(TC10BH07-9);广州市科技计划项目(2009Z1-E301)

作者单位:¹510405 广州,广州中医药大学青蒿研究中心;²510445 广州,广州中医药大学科技产业园有限公司;³411455 广州,广州市医药职业学校

*通信作者:宋健平,Email:songjping@yahoo.com.cn

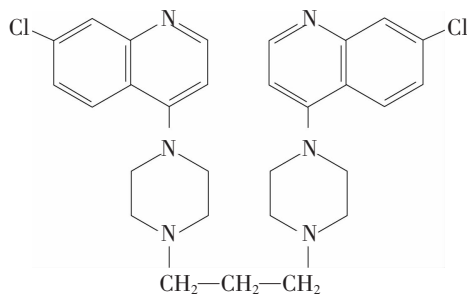


图 1 哌嗪的分子结构式

Fig. 1 The molecular structure of piperazine

本研究采用大剂量复燃法培育伯氏疟原虫 K173 对哌嗪的抗性虫株,观察抗疟药哌嗪的抗药性情况。

1 材料和方法

1.1 实验虫株

伯氏疟原虫 K173 (*Plasmodium berghei* K173) 株,1997 年 4 月引自美国国立卫生研究院,血传与液氮冷冻交替进行保种。

1.2 实验动物

SPF 级昆明小鼠,雌雄各半,鼠龄 4~5 周,体重 (20 ± 2) g,由广州中医药大学实验动物中心提供。自由进食与饮水,饲料均购自广州中医药大学实验动物中心。

1.3 实验主要用药

哌嗪(piperazine, PQ)购自广东新南方青蒿科技有限公司,批号 110804,含量为 98.5%。

1.4 实验方法

参照大剂量复燃法^[4-5]进行。取正常小鼠 4 只,每鼠腹腔接种感染亲代原虫红细胞约 1×10^7 个,记为 d_0 ; d_3 单次灌胃给药,首次给药剂量相当于哌嗪 90% 有效剂量 (90% effective dose, ED_{90}) 的 3 倍,即 6.57 mg/kg,此为第一代。 d_4 - d_6 取尾血涂片镜检,选择原虫感染率最高的小鼠作为下一代的种源鼠,用同样方法接种正常小鼠,给药方法同前。每 3~5 代视原虫寄生率情况酌情递增一定剂量 (20%)。每 5 代用 Peters 4 天抑制试验^[6] (4-day suppressive test) 测试培育中的原虫,按直线回归法求出各药的 ED_{90} ,并计算抗性指数 (resistance index, I) I_{90} ,以 I_{90} 的大小判断药物的抗性水平,其标准是: $I_{90} \leq 2$ 为敏感;

2~9 为轻度抗性;10~100 为中度抗性;>100 为重度抗性。

抗性指数计算公式:

$$\text{抗性指数}(I_{90}) = \frac{\text{抗性品系的 } ED_{90}}{\text{敏感品系 } ED_{90}} \times 100\%$$

实验过程中,取小鼠尾血涂制成薄血膜,吉姆萨常规染色,检查 800 个油镜视野未见原虫者为阴性。

2 结果

历时 7 个多月培育至第 30 代时,PQ 剂量由 6.57 mg/kg 增加至 23.54 mg/kg,给药剂量增加了约 3.6 倍;抗 PQ 株在第 25、30 代出现中度抗性,其抗性指数 I_{90} 分别为 12.5、22.3(表 1、表 2)。抗性培育过程中,疟原虫大滋养体、裂殖体内疟色素逐渐变淡、消失,疟原虫寄生的红细胞着色较深,疟原虫细胞浆着色不明显。

表 1 伯氏疟原虫 K173 哌嗪抗性培育剂量递增情况

Table 1 The dose escalation of resistance to piperazine in *Plasmodium berghei* K173

培育代数 Passage of cultivation	哌嗪抗性株给药剂量 (mg/kg) The dosage of piperazine in resistant strain (mg/kg)
1~	6.57
6~	7.83
9~	9.46
13~	9.46
18~	11.35
21~	13.62
24~	16.35
28~	19.62
30	23.54

表 2 伯氏疟原虫 K173 株对哌嗪抗性测定结果

Table 2 The results of piperazine resistance in *Plasmodium berghei* K173

培育代数 Passage of cultivation	哌嗪抗性指数 I_{90} The I_{90} of piperazine resistant strain
5	2.0
10	1.1
15	2.7
20	1.5
25	12.5
30	22.3

3 讨论

本研究采用大剂量复燃法培育伯氏疟原虫

K173 对哌喹的抗性虫株,大剂量复燃法具有工作量小、操作简单、抗性产生快等优点,但是需要掌握合适的剂量,剂量过大或过小都不利于抗性培育。实验结果显示,哌喹抗性株的抗性并不稳定,在后续实验中,应注意药物剂量的递增,控制相关实验条件,以稳定抗性。

本研究用大剂量复燃法培育至 30 代,哌喹抗性株的抗性指数 I_{90} 为 22.3,属于中度抗性;查阅抗疟药青蒿素-哌喹片 Artequick 药效学试验研究资料(内部资料),该试验采用小剂量递增法培育伯氏疟原虫 K173 对哌喹的抗性株,培育至第 25 代,哌喹抗性株的抗性指数 I_{90} 为 21,属于中度抗性,至 30 代,抗性增至 27.6,仍为中度抗性。两个试验虽然采用方法不同,但培育至 30 代哌喹抗性株的抗性指数都在 25 左右,均属于中度抗性。查阅抗疟药双氢青蒿素-哌喹片 Artekin 药效学试验研究资料(内部资料),该试验使用大剂量复燃法培育伯氏疟原虫 K173 对磷酸哌喹的抗性株,培育至 15 代,磷酸哌喹抗性株的抗性指数 I_{90} 为 9.27,属于轻度抗性,至 20 代,其抗性指数 I_{90} 猛增至 188.01 成为重度抗性,培育至 30 代时,其抗性指数 I_{90} 为 371.1。以上三个实验结果显示,哌喹和磷酸哌喹都易产生抗药性,但磷酸哌喹抗药性出现较早,且抗性较严重。

文献研究显示,李高德^[7]采用剂量递增法培育伯氏疟原虫 K173 对磷酸哌喹的抗性株,历时 5 个多月,至第 20 代,培育出对磷酸哌喹具有 110 倍(I_{50})抗性的虫株。郭虹等^[8]采用鼠间血传、药物递增法培育伯氏疟原虫 ANKA 对磷酸哌喹的抗性虫株,血传 14 代,历时 8 个月,其抗性指数(I_{50})是敏感株的 186 倍。李高德等^[9]用伯氏疟原虫 ANKA 株经鼠间血传培育 9 代,历时 2 个月,形成了对磷酸哌喹抗性指数为 197.2 (I_{50}) 的抗性系。复方双氢青蒿素 Artecom 药效学研究资料(内部资料)中,用伯氏疟

原虫 ANKA 培育磷酸哌喹的抗性株,至第 25 代, I_{90} 为 43.9,已产生中度抗药性。以上实验结果表明,不论是伯氏疟原虫 K173 株或者是 ANKA 株,抗疟药磷酸哌喹抗药性产生较快,且抗性程度较重。对于出现的这一现象,笔者猜测,可能与这两种药物对细胞膜功能的影响有关,特别是膜通透性方面的改变,磷酸根的去,可能导致两种药物进出膜的方式发生改变,从而影响药物的吸收。但是,这一猜想是否成立以及如何影响细胞膜功能的,需要进行更加深入的实验研究。

参 考 文 献

- [1] Giha HA, Elbashir MI, A-Elbasit IE, et al. Drug resistance-virulence relationship in *Plasmodium falciparum* causing severe malaria in an area of seasonal and unstable transmission[J]. Acta Trop, 2006, 97 (2):181-187.
- [2] WHO. World Malaria Report 2012[R]. WHO Press, 2012.
- [3] 陈纪, 邓敬兰, 吴德林, 等. 14C-磷酸哌喹和 14C-哌喹体内吸收、分布和排泄的研究[J]. 中国医药工业杂志, 1979, (8):19-23.
- [4] 陈林. 抗疟药的实验研究与临床应用[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2001:245-253.
- [5] Merkli B, Rinchle R. Study on the resistance to single and combined antimalarials in the *P. berghei* mouse model [J]. Acta Trop, 1980, 37: 228.
- [6] Peters W. The 4-day suppressive test of blood schizontocidal action// Chemotherapy and resistance in malaria[M]. 2nd Ed. London: Academic press, 1987: 111-115.
- [7] 李高德. 伯氏疟原虫 K173 株对哌喹抗药性的实验研究[J]. 药学学报, 1985, 20(6):412-417.
- [8] 郭虹, 周利民, 潘在用, 等. 伯氏疟原虫哌喹抗性系的建立及其抗性表型特征观察[J]. 海南医学院学报, 2011, 17(7):865-869.
- [9] 李高德, 瞿逢伊, 陈林. 伯氏疟原虫 ANKA 株抗哌喹系的培育[J]. 寄生虫学与寄生虫病杂志, 1985, 3(3):189-192.

(收稿日期:2012-01-18)

(本文编辑:陈勤)