

24) 478-480

地塞米松和环磷酰胺对食蟹猴疟原虫红外期在猕猴中发育的影响¹⁾

胡友梅、聂梅 (第三军医大学药理教研室, 重庆 630038, 中国) R 969.4

Effects of dexamethasone and cyclophosphamide on development of exo-erythrocytic form of *Plasmodium cynomolgi bastianellii* in rhesus monkey

HU You-Mei, NIE Mei
(Department of Pharmacology, Third Military Medical College, Chongqing 630038, China)

ABSTRACT The rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) challenged with *Plasmodium cynomolgi bastianellii* sporozoites were treated with im dexamethasone (Dex) $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 7 \text{ d}$ and cyclophosphamide (Cyc) $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 3 \text{ d}$, respectively. On d 7 after challenge, serial sections of liver biopsy stained with HE revealed that the distributive density and size of exo-erythrocytic (EE) form of the parasites showed no difference between medicated and control monkeys. The prepatent period of the primary attack and the relapse patterns after the treatment of Dex and Cyc were also similar to each other. The radically cured monkeys challenged with the *Plasmodium* erythrocytic form were reinfected with sporozoites, the relapses were much less than those in control monkeys, but the density and size of EE form in liver were similar to those in control monkeys. These results suggest that Dex and Cyc exert no effect on the development of EE form (including hypnozoite) in the monkeys.

KEY WORDS *Plasmodium cynomolgi*; dexamethasone; cyclophosphamide; *Macaca mulatta*

提要 猕猴在感染食蟹猴疟原虫前后分别 im 地塞米松 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 7 \text{ d}$ 及环磷酰胺 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 3 \text{ d}$, 接种 7 d 后肝活检发现红外期原虫在肝脏的形态、密度与体积和对照组无明显差别。首次发作的虫现前期和经抗疟药治疗后复发的形式亦基本相同。提示地塞米松及环磷酰胺并不影响原虫红外期(包括休眠体)的发育。

关键词 食蟹猴疟原虫; 地塞米松; 环磷酰胺; 猕猴

疟疾复发是目前治疗中的一大难题。食蟹猴疟原虫 (*Plasmodium cynomolgi bastianellii*) 红外期存在休眠体是疟疾复发的根源^[1]。给大鼠 iv 环磷酰胺 (cyclophosphamide, Cyc) 或 sc 地塞米松 (dexamethasone, Dex) 后再 iv 约氏疟原虫孢子, 肝脏的原虫红外期密度增高, 原虫体积增大, 这与药物改变宿主机体免疫功能有关^[2,3]。猴疟红外期(包括休眠体)的发育与复发是否也会受免疫调节剂的影响, 尚未见报道。本实验旨在探讨 Dex 及 Cyc 对猴疟红外期发育是否有影响。

MATERIALS AND METHODS

虫种 食蟹猴疟原虫 (*Plasmodium cynomolgi bastianellii*) 由军事医学科学院微生物流行病学研究所引进, 液氮保存。

猴 健康猕猴 (*Macaca mulatta*) 购自四川甘孜, 在实验室饲养 3 个月以上备用。体重 $2.9 \pm 0.7 \text{ kg}$, 3 雌不拘。

蚊媒及子孢子制备 斯氏按蚊 (*Anopheles stephensi*) Hor 株, 饲养于 $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, 相对湿度为 75-90% 的温室内, 羽化后 d 3 吸感染了食蟹猴疟原虫的猴血。d 12 待子孢子进入涎腺后, 给蚊媒用乙醚麻醉, 剪去腹部, 在冰冻的含 20% 灭活猴血清的 M199 培养液中研磨, 过滤去粗渣, 离心 ($89 \times g$ 5 min) 取上清液从大隐静脉接种猕猴。自研磨至接种完毕不超过 0.5 h。

药物 地塞米松磷酸钠 (dexamethasone, Dex, 广州白云山制药厂, 批号 851218, 3); 环磷酰胺 (cyclophosphamide, Cyc, 上海十二制药厂, 批号 860414); 氯喹磷酸盐 (chloroquine phosphate, CQ, 上海十四制药厂); 硝喹醋酸盐 (nitroquine acetate, NQ, 上海医药工业研究院惠赠, 批号 830401)。

方法 共用猕猴 8 只, 接种子孢子的前一天, 当

Received 1991-09-16 Accepted 1992-03-26
¹⁾ Project supported by the National Natural Science Foundation of China. No 3880755.

天及以后分别连续 im Dex $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 7 \text{ d}$ 和 Cyc $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 3 \text{ d}$ 各 2 猴; 经疟原虫红内期感染已治愈半年的 2 猴以及正常对照的 2 猴, 不给任何药物。在接种孢子后于 d 7 作肝活检, 取组织块大小约 6 mm^3 , 用 Formalin 固定。每一组织块连续切 $5 \mu\text{m}$ 厚的切片 50 张以上, HE 染色。光镜下检查疟原虫红外(EE)期的形态和计算每张切片原虫数。用测微计测量原虫的长与宽径并计算一个裂殖体在连续切片所切到的张数相叠加, 作为原虫的厚度。每个原虫体积以长 \times 宽 \times 厚表示。用 DQK 型快速求积仪(长春第一光学仪器厂生产)计算每张肝组织切片的面积, 再乘以切片的厚度, 然后将所有切片累加, 计算每 mm^3 肝组织的原虫含量。

接种孢子后, 每天取血涂厚血膜, Giemsa 染色, 观察原虫血症的出现, 以确定发作的虫现前期。出现虫血症后, 立即用 CQ $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 3 \text{ d}$ 或 NQ $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 3 \text{ d}$ 作 ig 治疗。治愈后每周查血一次, 观察是否复发及复发时间; 如有复发, 再给予同药治疗, 连续观察 7 个月。

为了证明每次用 CQ 或 NQ 后原虫血症再现不是由于红内期治疗不彻底而复燃所致, 我们设计另一实验, 分别用红内期原虫和孢子接种猕猴引起原虫血症, 再用 CQ 或 NQ 治疗, 观察原虫血症再现情况。

RESULTS

Dex 与 Cyc 对 EE 期的作用 接种孢子后 d 7 猕猴肝脏中原虫 EE 密度显示较大的个体差异, 对照组 2 猴的原虫密度相差 11 倍, 原虫形态、密度与体积在各用药组间及与对照组间差异均不显著(Tab 1)。

用药对虫现前期及疟疾复发的影响 8 猴在静脉注射孢子后 8-9 d 均出现原虫血症(Tab 1), 对各组的 1 猴持续观察 7 个月, 发现对照猴及 2 只用药猴各发作 5 次, 每次相距约 1 月。经红内期感染已治愈半年的 1 猴, 仅发作 2 次, 且第一次复发是在接种后 3 个月才出现(Tab 2)。

Tab 2. Day of relapse after *Plasmodium cynomolgi bastianellii* sporozoites inoculation in *Macaca mulatta* treated im with dexamethasone and cyclophosphamide.

	Relapse				
	1st	2nd	3rd	4th	5th
Control	27	67	98	133	168
Dex	30	67	98	126	168
Cyc	35	62	98	140	182
Cured	84	168			

Tab 1. Effects of dexamethasone and cyclophosphamide on size and density of exo-erythrocytic form of *Plasmodium cynomolgi bastianellii* in monkey liver.

	$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times \text{d}$	$10^{-6} \times$ Sporozoites in inoculum	Prepatent period/ d	Number/ mm^3 liver	Exo-erythrocytic schizonts Size ($\mu\text{m} \times \mu\text{m} \times \mu\text{m}$) $\bar{x} \pm s$	Total number
Control		4.7	8	1.1	$(27 \pm 3) \times (24 \pm 5) \times (21 \pm 6)$	7
Control		4.1	8	12.9	$(35 \pm 5) \times (28 \pm 4) \times (22 \pm 6)$	75
Dex	$1 \times 7^{(a)}$	4.7	8	5.3	$(34 \pm 8) \times (27 \pm 5) \times (20 \pm 8)$	17
Dex	$1 \times 7^{(a)}$	4.7	8	0.8	$(24 \pm 4) \times (21 \pm 3) \times (11 \pm 8)$	5
Cyc	$25 \times 3^{(b)}$	4.1	8	1.7	$(28 \pm 5) \times (23 \pm 3) \times (18 \pm 8)$	6
Cyc	$25 \times 3^{(b)}$	13.0	9	2.2	$(29 \pm 6) \times (25 \pm 4) \times (21 \pm 6)$	9
Cured ^(c)		13.0	9	1.2	$(22 \pm 3) \times (21 \pm 4) \times (11 \pm 5)$	8
Cured ^(c)		90.0	9	0.5	$(27 \pm 5) \times (24 \pm 3) \times (15 \pm 6)$	7

^(a) On d -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5 of inoculation;

^(b) On d -1, 0, +1;

^(c) After inoculation of erythrocytic stage of *P. cynomolgi* b.

Tab 3. Recrudescence of *Plasmodium cynomolgi bustianellii* infection after intragastric medication of chloroquine and nitroquine.

	mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹ × d	<i>Plasmodium</i> transmission	Monkeys	Parasitemia disappeared on d	In 180 d recurred on d
CQ	20 [*] × 3	Erythrocytic schizonts	1	2	
NQ	2 × 3	Erythrocytic schizonts	2	4, 5	
CQ	25 [*] × 3	sporozoites	2	2, 2	30, 30
NQ	2 × 3	sporozoites	1	2	30
NQ	5 × 5 - 10 × 5	sporozoites	3	4, 4, 4	35, 45, 37

* Chloroquine base.

CQ 和 NQ 对治疗猴疟红内期感染和子孢子感染的比较 经红内期感染的猴疟, 无论用 CQ 或 NQ 治疗, 当原虫血症消失后持续观察半年均未见原虫复燃, 而用子孢子感染的猴治愈后 1 月左右即复发 (Tab 3).

DISCUSSION

接种子孢子出现原虫血症, 经 CQ 或 NQ 等抗红内期裂殖体药物治疗, 若仍再出现原虫血症, 则有两种可能性. 一是红内期杀灭不彻底而复燃; 二是 EE 休眠体引起的复发. 本实验用 CQ 和 NQ 治疗猴疟红内期和子孢子引起的原虫血症, 结果由红内期引起的原虫血症经治疗后均能较彻底地治愈, 而由子孢子引起的, 虽经同样剂量或更大剂量治疗使原虫血症消失, 但大约过 1 个月以后再现原虫血症, 说明本实验多次出现原虫血症均为 EE 所引起, 而非药物剂量不足而未彻底杀灭红内期所致.

本实验观察到 Dex 和 Cyc 对食蟹猴疟原虫感染的虫现前期和 7 个月内复发的次数, 与对照组并无差别, 其复发型与 Schmidt⁽⁴⁾报道相类似. EE 在肝脏的密度和体积与王兴相等^(2,3)报道的鼠疟不同, 并未受 Dex 和 Cyc 的影响, 这是否与种属差异有关, 有待探讨.

经红内期感染已治愈半年后再接种子孢子的猴, 原虫血症的虫现前期虽未受影响, 但复发次数较其他猴少. EE 裂殖子从肝脏释放至血液时, 可能通过体液免疫反应或被巨噬细胞吞噬, 使裂殖子不能侵入红细胞, 故只减少出

现原虫血症的次数. 说明猕猴虽有一定免疫力, 可减少复发次数, 但不能完全阻断子孢子侵入肝细胞.

Dex 能抑制机体的细胞免疫, 大剂量还可以抑制体液免疫; Cyc 能杀伤多种免疫细胞而抑制机体的免疫功能, B 细胞对本品较 T 细胞更为敏感⁽⁵⁾. 使用 Dex, Cyc 及红内期感染后猕猴体内的免疫功能虽有改变, 但本实验结果未见休眠体在肝脏的发育有所影响.

ACKNOWLEDGMENTS 蚊媒由本校寄生虫学教研室提供; 肝组织切片由病理学教研室制片室协助; 周世文和鹿林华二同志参加部分工作.

REFERENCES

- 1 Krotoski WA, Krotoski DM, Garnham PCC, Bray RS, Killick-Kendrick R, Draper CC, *et al.* Relapses in primate malaria: discovery of two populations of exoerythrocytic stages. *Br Med J* 1980; **280**: 153-4.
- 2 Wang XX, Chen ZQ. Effects of BCG, dexamethasone and carbon particles on invasion of sporozoites and development of exo-erythrocytic forms of *Plasmodium yoelii* in rat liver. *Acta Acad Med Milit Tertiae* 1987; **9**: 175-7.
- 3 Wang XX, Huang FS. Effects of cyclophosphamide on the development of exo-erythrocytic forms of *Plasmodium yoelii* in rats. *Chin J Parasitol Parasit Dis* 1987; **5**: 180-3.
- 4 Schmidt LH. Compatibility of relapse patterns of *Plasmodium cynomolgi* infections in rhesus monkeys with continuous cyclical development and hypnozoite concepts of relapse. *Am J Trop Med Hyg* 1986; **35**: 1077-99.
- 5 Wang CY, Xing ST. The effect of cyclophosphamide on the activity of B and T lymphocytes and peritoneal macrophages in mice. *Bull Acad Milit Med Sci (China)* 1982; (3): 367-72.