

氯喹对体外培养的恶性疟原虫无性期各阶段的作用

周元昌 管惟滨 黄文锦 潘卫庆 (第二军医大学 寄生虫学教研室, 上海 201903)

提要 以体外培养的对氯喹敏感的恶性疟原虫 FCC-1/HN 株无性期, 经 5% 甘露醇作同步处理, 分别于原虫的环状体期、晚期滋养体期及裂殖体期与氯喹接触 8h 或 48h. 结果表明: 环状体期对氯喹最敏感, 晚期滋养体期次之, 裂殖体期最差. 该结果为临床治疗早期投药以取得最佳疗效提供了依据. 本实验方法也可用于其他抗疟药对疟原虫无性期不同阶段的药效研究.

关键词 氯喹; 恶性疟原虫; 培养; 同步处理; 环状体; 晚期滋养体; 裂殖体

氯喹能杀灭恶性疟原虫无性期, 但其对无性期各发育阶段的效应有无差异却未见文献报道. 这问题与体内外试验时评价药效及临床应用药均有关. 恶性疟原虫红内期体外连续培养的成功⁽¹⁾, 为体外测定疟原虫对抗疟药的敏感性提供了极为有利的条件. 利用体外培养的方法进行药效测定的报道也很常见⁽²⁻⁴⁾, 但体外培养的疟原虫失去发育的同步性后, 对体外试验评定药效时可能产生的影响应当探讨. 本文报道了以同批培养的恶性疟原虫经同步处理后所得的无性期各发育阶段, 用氯喹进行药效测定的结果.

材料及方法

虫源 恶性疟原虫 FCC-1/NH 株, 为北京及上海生物制品研究所合作, 于 1977 年自海南岛一恶性疟患者分离所得. 本单位于 1979 年 4 月引入并连续培养至今.

试验器皿及药液配制 试验用上海塑料三厂出品的 40 孔微量测定板, 孔内径为 6.7 mm 深 10 mm, 以 UV 线消毒备用. 磷酸氯喹原粉为上海第十四制药厂出品, 批号 800133, 含量为 99.31%. 将药物称量, 以重蒸水配成 6.4

μg (基质)/ml 的原药液, 微孔膜过滤除菌备用. 试验时以 5% 葡萄糖生理盐水配成 80, 160, 320 及 640 ng/ml, 吸取 20 μl 加到含虫血悬液 180 μl 的各试验孔中, 使终浓度分别为 8, 16, 32 及 64 ng/ml.

同步原虫的获得及试验方法 仿文献方法⁽¹⁾, 于 36.5-37°C 下培养恶性疟原虫. 待原虫生长旺盛且发育到以环状体期为主时, 参照文献⁽⁵⁾方法, 以 5% 甘露醇溶液(由上海医药工业公司出品的 20% 甘露醇液配成)处理培养物而得环状体期原虫, 加入以 ACD 保存并经洗涤的新鲜 rbc 使原虫率成 1.2% 左右, 然后按要求再加入培养液配成虫血悬液, 轻轻摇匀并分装到各孔中, 每孔 180 μl. 投药时每孔加入不同浓度的药液 20 μl, 对照孔中加入同量 5% 葡萄糖生理盐水. 培养物总量为 200 μl/孔, 其中含未感染及感染原虫的 rbc 压积 5 μl. 本试验中由环状体期(R)投药到晚期滋养体期(T)投药为 16 h, 由 T 投药到裂殖体期(S)投药为 14 h. 试验共分 6 组: 第 1 和 2 组为 99% 以上原虫处于 R 期开始投药; 第 3 和 4 组为 89% 以上原虫处于 T 期开始投药; 第 5 和 6 组为 63% 以上原虫处于 S 期开始投药. 第 1, 3 和 5 组各与氯喹接触 8 h, 到时吸干含药的培养液, 加入原量的不含药培养液, 再继续培养 40 h. 在开始投药时及与氯喹中止接触时, 均在不加药的供估测原虫发育情况用的培养孔中采样. 其中原虫发育的变化情况为: R 由 99.2% 变为 93.9%, T 由 89.2% 变为 93.8%, S 由 63.8% 变为 68.1%. 由此证明试验组在与氯喹接触 8 h 期间大部分原虫仍处于原来发育阶段. 第 2, 4 和 6 组各与相应的第 1, 3, 5 组同时投药, 但不更换培养液, 与氯喹接触 48 h. 所有各组在开始投药时均更换新鲜培养液, 以满

足原虫完成一个发育周期(48 h)的营养需求。采样涂制薄血膜,吉氏染剂染色,光学显微镜油镜检查 5000 个 rbc 中各发育期的原虫数,并计算减虫率;同时区分并记录异常原虫数,计算其%。异常原虫判断标准如下。R 期:不呈环状,但核的一侧可见少量胞质。T 期:有的胞质着色浅,内含 1 个大空泡,有的胞质由许多小空泡分隔呈网状。但胞质边缘清晰,其内缘有少许细小色素(称空泡虫);有的虫体变小且着色较深,胞质内含 1-2 个色素团(称团缩虫);有的原虫核及胞质均着色很淡,虫体边缘不清,但胞质内仍可见少许色素(称退变虫)。S 期:多数原虫变化如 T 期空泡虫;有的原虫边缘模糊,

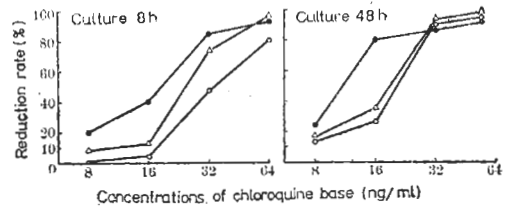


Fig 1. Efficacy of chloroquine on the ring stage (●), trophozoite (△) and schizont (○) of *Plasmodium falciparum* in culture

结果

核与色素团聚在一起难以分清(称退变虫)。

接触氯喹 8 h 各组与 48 h 各组相比, R 期投药者,除 16 ng/ml 时两者的平均减虫率相差

Table 1. Efficacy of chloroquine (CQ) on asexual forms of *Plasmodium falciparum* in culture for 8 h. After exposure to CQ for 8 h at different stages, culture was continued without drug for 40 h, and then parasite count was made from 5000 rbc/thin film.

Concn of CQ base (ng/ml)	Ring stage			Trophozoite			Schizont		
	Total*	Re-duction rate (%)	Abnormal parasite rate (%)	Total*	Re-duction rate (%)	Abnormal parasite rate (%)	Total*	Re-duction rate (%)	Abnormal parasite rate (%)
0	161±22	—	0	203±12	—	0	240±33	—	0
8	129±28	19.8	0	183±28	9.7	0	246±46	0	0
16	95±16	40.8	0.8	178±33	12.5	0	230±21	3.9	0
32	25±9	84.3	93.1	54±16	73.4	16.2	126±31	47.5	3.4
64	11.8±2.2	92.7	97.9	9.8±2.9	95.2	100.0	45±7	81.2	25.0
ED ₅₀ (F.L.)	16.9(15.0—19.1) ng/ml			23.2(21.8—24.8) ng/ml			37.7(36.0—39.5) ng/ml		

* Mean of 4 replicates (including abnormal parasites)±SD.

Table 2. Efficacy of chloroquine (CQ) on asexual forms of *Plasmodium falciparum* in culture for 48 h. Parasites were exposed to CQ for 48 h, and then parasite count was made from 5000 rbc/thin film.

Concn of CQ base (ng/ml)	Ring stage			Trophozoite			Schizont		
	Total*	Re-duction rate (%)	Abnormal parasite rate (%)	Total*	Re-duction rate (%)	Abnormal parasite rate (%)	Total*	Re-duction rate (%)	Abnormal parasite count
0	163±20	—	0	170±13	—	0	239±24	—	0
8	123±11	24.5	0	139±17	18.5	0	195±24	18.3	0
16	33±10	79.8	81.8	110±17	35.5	3.0	176±21	26.2	0
32	21.8±2.6	86.8	100.0	16±4	90.6	100.0	25±9	89.5	40.6
64	12±6	92.7	100.0	6.8±1.7	96.0	100.0	14±7	94.3	49.1
ED ₅₀ (F.L.)	11.2(10.0—12.6) ng/ml			16.4(15.2—17.7) ng/ml			17.9(16.7—19.1) ng/ml		

* Mean of 4 replicates (including abnormal parasites)±SD.

很悬殊(分别为40.8%及79.8%, $P < 0.01$)外,其余各剂量组的平均减虫率均无明显差异。T期投药者,在64 ng/ml时的平均减虫率相似,8 ng/ml时有一定的差异(分别为9.7%及18.5%, P 接近0.05),其余两个剂量组的平均减虫率均以接触8 h组明显低于48 h组(P 均 < 0.01)。S期投药者,各剂量组的平均减虫率均以接触8 h组低于48 h组(P 均 < 0.01)。从 ED_{50} 来看,各发育期投药接触氯喹8 h组均高于48 h组(P 均 < 0.01)。(表1及表2)

不同发育期投药接触氯喹8 h的各剂量组相比,在64 ng/ml时,R期与T期之间的平均减虫率相似,但两者分别与S期相比则差异非常显著(P 均 < 0.01)。在32 ng/ml时,R期与T期之间有一定差异(平均减虫率分别为84.3%及73.4%, P 接近0.05),而与S期相比都有非常明显差异(S期减虫率为47.5%, $P < 0.01$);T期与S期之间也有显著差异($P < 0.05$)。在16及8 ng/ml时,R期、T期及S期之间均有显著差异($P < 0.05$ 或 < 0.01)。从 ED_{50} 来看,显示R期投药组最低(16.9 ng/ml),T期其次(23.2 ng/ml),S期最高(37.7 ng/ml),各组间的差异均非常显著(P 均 < 0.01)。(表1及图1)

不同发育期投药接触氯喹48 h的各剂量组相比,只有在16 ng/ml时,R期与T期及S期之间的平均减虫率有很明显的差异(分别为79.8%,35.5%及26.2%, $P < 0.01$),其余剂量组的各组间均无明显差异。从 ED_{50} 来看R期与T及S期之间有很明显差异(分别为11.2,16.4及17.9 ng/ml, $P < 0.01$),而T期与S期之间则差异不显著。(表2及图1)

从光学显著镜下原虫的外观来看,与氯喹接触8 h在16 ng/ml时,R期只有极少数外观异常,T及S期外观均属正常;在32 ng/ml时,R期已有93%异常,而T期仅16%异常,S期则只有3%异常;在64 ng/ml时,R及T期原虫几乎全部异常,而S期仍只有25%异常。与氯喹接触48 h在16 ng/ml时,R期

已有80%异常,T期却只有3%异常,S期仍均属正常;在32 ng/ml时,R及T期原虫已全部异常,而S期仍只有40%异常;即使在64 ng/ml时,S期仍还有约50%原虫外观正常。(表1及表2)

讨 论

自恶性疟原虫红内期体外连续培养成功⁽¹⁾后,虽以体外培养的方法进行药效测定已广泛应用⁽²⁻⁴⁾,但评定药效的方法颇不一致。对受药物作用后出现的异常原虫,多已计数在内。至于以体外培养的原虫作试验时,因所用原虫无性期各发育阶段所占比例的不同而对评定药效可能产生的影响则未估计在内。

本试验证明,体外培养的恶性疟原虫无性期各发育阶段与氯喹接触8 h或48 h,综观减虫率、异常原虫率及 ED_{50} ,均显示R期对氯喹最敏感,T期其次,S期最差。据报道,被鼠疟(*P. berghei*)⁽⁶⁾及猴疟(*P. knowlesi*)⁽⁷⁾感染的红细胞内有大量氯喹浓集。氯喹可抑制猴疟的DNA的合成⁽⁷⁾,而且显示出以疟原虫发育早期最敏感,随着原虫的发育而敏感性渐降低,到发育后期最不敏感。猴疟的大部分DNA是从R发育到T的过程中合成的,只有少量DNA是在S期合成的⁽⁸⁾。氯喹对鸡疟(*P. gallinaceum*)的成熟裂殖体及裂殖子或刚侵入红细胞的原虫却无作用⁽⁹⁾。这些研究虽然试验材料均非人的恶性疟原虫,但对说明本试验的结果是有参考价值的。本实验结果显示,与氯喹接触48 h各发育期间的差异不及8 h者显著,其原因可能是由于试验开始时原虫虽经同步处理,但其发育仍非绝对一致,因此就可能在48 h期间有不同发育阶段与氯喹接触;尤其在低浓度时,部分不太敏感的原虫因与药物接触时间较长而提高了减虫率,致相互间的差异程度有所缩小之故。

氯喹使鸡疟原虫退变最早可在接触氯喹1 h后见到,5 h有50%原虫发生改变,8 h约95%原虫有改变⁽⁹⁾。本实验中不论原虫与氯喹接触8 h或48 h,均从接触氯喹开始计时,到

48 h 才中止培养采样检查, 所见异常原虫其改变均极明显, 再加上与未加药的对照组相比, 至少绝大部分不致误认。

本实验结果表明, 恶性疟原虫无性期各发育阶段对氯喹的敏感性不同, 为临床治疗恶性疟患者时早期投药可取得较好疗效提供了依据; 本试验的方法, 也可用于其他抗疟药的研究。

致谢 承抗疟药研究室主任龚建章教授审阅本文。

参 考 文 献

- 1 Trager W, Jensen JB. *Science* 1976 Aug 20; *Acta Pharmacologica Sinica* 1983 Jun; 4 (2) : 137-140
- 2 Richard WHG, Maples BK. *Ann Trop Med Parasitol* 1979 Apr; 73 (2):99
- 3 Ponnuduria T, LeeuwenbergADEM, Meuwissem JHET. *Trop Geogr Med* 1981 Mar; 33 (1):50
- 4 管惟滨、黄文锦、周元昌、龚建章. 药学报 1982年2月; 17 (2):139
- 5 Lambros C, Vanderberg JP. *J Parasitol* 1979 Jun; 65 (3):418
- 6 Macomber PB, O'Brien RL, Hahn FE. *Science* 1966 Jun 3; 152 (3727):1374
- 7 Polet H, Barr CF. *J Pharmacol Exp Ther* 1968 Dec; 164 (2):380
- 8 *Bull WHO* 1977 Mar; 55 (2-3):347
- 9 Aikawa N, Beaudoin RL. *Am J Trop Med Hyg* 1969 Mar; 18 (2):166

EFFECT OF CHLOROQUINE ON DIFFERENT STAGES OF ASEXUAL FORMS OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN CULTURE

ZHOU Yuan-chang, GUAN Wei-bin, HUANG Wen-jin, PAN Wei-qing

(Department of Parasitology, Second Military Medical College, Shanghai 201903)

ABSTRACT FCC-1/HN strain of *Plasmodium falciparum* in culture was synchronized with 5% mannitol solution in particular stages to be tested. Each well of plastic plates was filled with 200 μ l of culture medium containing 5 μ l of infected and uninfected rbc with or without drug and incubated at 36.5-37°C by Trager's candle jar method. The whole test consisted of 6 groups (G); G1 and G2 were exposed to chloroquine (CQ) at ring stage (R), G3 and G4 at trophozoite stage (T), and G5 and G6 at schizont stage (S). The final concentrations of CQ were 8, 16, 32 and 64 ng base/ml. Each group had its own control and 4 replicates for each test. G1, G3, G5 and G2, G4, G6 were exposed to CQ for 8 and 48 h, respectively. Parasite count (including normal and abnormal appearan-

ces) per 5000 rbc was made on thin blood film at 48 h of culturing (calculated from the commencement of exposure to CQ). The ED₅₀ of G1, G3, G5 and their abnormal parasite rate of the parasites after exposure to CQ 32 ng/ml for 8 h were 16.9, 23.2, 37.7 ng/ml and 93.1%, 16.2%, 3.4%, respectively. The ED₅₀ of G2, G4, G6, and their abnormal parasite rate after exposure to CQ 16 ng/ml for 48 h were 11.2, 16.4, 17.9 ng/ml and 81.8%, 3%, 0%, respectively. It is suggested that the efficacy of CQ is more remarkable at R stage than at T stage, which, in turn, is more remarkable than at S stage.

KEY WORDS chloroquine; *Plasmodium falciparum*; culture; synchronization; ring stage; trophozoite; schizont