

双氢青蒿素对约氏疟原虫在蚊体内发育的影响

陈佩惠¹ 屠呦呦² 王凤芸¹ 李凤舞¹ 杨岚²

1 首都医科大学寄生虫学教研室 北京 100054

2 中国中医研究院中药研究所 北京 100700

提要 目的: 观察双氢青蒿素 (dihydroqinghaosu, DQHS) 对约氏疟原虫在斯氏按蚊体内发育的影响。方法: 受染疟原虫小鼠一次性经口灌喂不同浓度 DQHS 药液后, 供蚊虫吸血, 应用光镜和电镜观察对照组和用药组的疟原虫在蚊体内的发育情况。结果: DQHS 对疟原虫配子体有一定的抑制作用, 其作用强度与配子体成熟程度和用药剂量不同有关。未成熟配子体对药物较敏感; 随着药物剂量的增加, 卵囊和子孢子的阳性率和密度随之逐渐下降; 但 180 mg 或 240 mg/kg 用药组对子孢子密度的影响的差别无显著性意义。电镜观察 60 mg/kg 作用 16 h 后, 用药组的蚊胃上卵囊 (12 d- 13 d 解剖蚊), 出现膜受损, 甚至胞质空泡化。120 mg/kg 药量对蚊体内 3 日龄卵囊作用 16 h, 卵囊仍继续发育, 比较对照组和用药组的卵囊和子孢子密度, 两组间差别无显著意义 ($P > 0.05$); 两组卵囊超微结构形态亦无明显差异。结论: DQHS 影响约氏疟原虫配子体感染性而减少蚊媒传播, 但对蚊体内子孢子增殖期不起直接的抑制作用。

关键词 双氢青蒿素 约氏疟原虫 配子体感染性 斯氏按蚊 孢子增殖期

双氢青蒿素 (dihydroqinghaosu, DQHS) 是我国新合成的青蒿素衍生物, 具有高效、速效、安全、复燃率低、剂量小及口服方便等优点^[1,2]。关于青蒿素及其衍生物对疟原虫配子体感染性及其在蚊体内发育影响的研究^[3-8], Dutta 首先通过光镜和扫描电镜观察在食蟹猴疟原虫 (*Plasmodium cynomolgi* B) 斯氏按蚊 (*Anopheles stephensi*) 猴疟模型中的蚊虫感染, 结果显示青蒿素可影响疟原虫配子体感染性, 但不能直接抑制孢子增殖期发育^[3,4]; 陈沛泉等报道青蒿素治疗恶性疟患者, 可抑制部分配子体在蚊体内发育^[5]。对双氢青蒿素在这方面作用的研究, 国内已有一些实验报道^[6,9]。鉴于应用约氏疟原虫-斯氏按蚊鼠疟模型有利于进行重复实验的条件, 本研究着重观察 DQHS 对约氏疟原虫配子体感染性以及不同用药剂量对疟原虫蚊体内发育的影响, 并观察该药是否对孢子增殖发育有直接作用。

材料与方法

1 原虫

约氏疟原虫 (*Plasmodium yoelii yoelii*) BY265 株, 由军事医学科学院提供。实验用血传第二代的疟原虫。

2 动物

昆明小鼠, 体重 18 g- 20 g, 以 1 滴血作薄血膜涂片, 姬姆萨染色, 以血片中含约 50 个配子体/100 个白细胞的小鼠为供血鼠。供血鼠分为血传 3.5 d (成熟配子体达高峰)^[10] 和 2.5 d 受染鼠实验组。

3 药物

双氢青蒿素单体由中国中医研究院中药研究所提供。以吐温-80 加蒸馏水配制成药液, 分别按 20 mg/kg、60 mg/kg、120 mg/kg、180 mg/kg 和 240 mg/kg 的剂量, 对受染小鼠以一次性经口灌喂, 每次 0.2 ml。

4 斯氏按蚊 (*Anopheles stephensi*)

引自军事医学科学院, 本实验室按以往方法饲养及感染疟原虫。于蚊吸血后解剖, 光镜观察并计算卵囊和子孢子的阳性率 (阳性蚊数/解剖蚊数) 和密度 (每只蚊胃及唾腺

* 本研究获中国中医研究院中药研究所科研基金资助

所含卵囊和子孢子数)。部分受染蚊虫作电镜样品处理,以 H-600型透射电镜观察其超微结构的变化^[11,12]。

5 配子体形态观察

系取受染鼠尾静脉血作血涂片,姬姆萨染色,光镜(油镜)观察其形态变化。

6 统计学处理

计算几何均数和标准差($\bar{X} \pm SD$),并进行 *t* 检验(或方差分析)。

结 果

药物对配子体感染性的影响

表 1 受染小鼠用双氢青蒿素 60 mg/kg 4 h 后吸血蚊感染情况

Table 1 Infection of mosquitoes taking blood from infected mice 4 h after treated with 60 mg/kg of DQHS

组 别 Group	小鼠血传 2.5 d 2.5 days after blood transmission to mice				小鼠血传 3.5 d 3.5 days after blood transmission to mice			
	卵囊感染 Oocyst infection		子孢子感染 Sporozoite infection		卵囊感染 Oocyst infection		子孢子感染 Sporozoite infection	
	阳性率 Positive rate(%)	平均密度 Average density ($\bar{X} \pm SD$)	阳性率 Positive rate(%)	平均密度 Average density ($\bar{X} \pm SD$)	阳性率 Positive rate(%)	平均密度 Average density ($\bar{X} \pm SD$)	阳性率 Positive rate(%)	平均密度 Average density ($\bar{X} \pm SD$)
对照组 Control group	10/10	4.90 ± 1.11	9/10	4.20 ± 1.75	10/10	5.36 ± 0.50	9/10	3.04 ± 2.05
用药组 Treated group	10/10	2.75 ± 1.10	10/20	0.80 ± 0.83	10/10	3.65 ± 1.34	18/20	2.47 ± 1.86
<i>t</i>	4.34		7.30		3.80		0.78	
<i>P</i>	<0.001		<0.001		<0.05		>0.05	

不同剂量药物对疟原虫在蚊体内发育的影响

对同一批血传 3.5 d 受染小鼠分组,一次性灌喂药液(60 mg/kg、120 mg/kg、180 mg/kg 或 240 mg/kg)后 16 h,分别供蚊虫叮咬,在蚊吸血后 7 d-8 d 和 14-17 d 作解剖,观察卵囊和子孢子的阳性率和密度。结果表明:用药组的卵囊和子孢子的阳性率随药物浓度增高而下降;各用药组的卵囊和子孢子的密度也逐渐下降(表 2)。统计每只蚊胃卵囊和唾腺子孢子数量及平均数,结果如下:卵囊对照组平均数为 411.77 个(3 个-1100 个),各用药组分别为 143.0 个(4 个-485 个)、54.6 个(0 个-23 个)、3.17 个(0 个-11 个)和(9.03 个-90);子孢子

给血传 2.5 d 和 3.5 d 受染小鼠用药 60 mg/kg 4 h 后供蚊叮咬,在蚊吸血后 7 d-8 d 和 14 d-16 d 分别解剖,观察卵囊和子孢子的阳性率和密度,见表 1。卵囊阳性感染率 2.5 d 和 3.5 d 实验组均为 100%;子孢子阳性率 2.5 d 实验组有差别,对照组比用药组高 40%;密度的比较在 2.5 d 实验组,不论是卵囊或子孢子,其对照组与用药组间差别均具有非常显著性差异(卵囊 = 4.34, 子孢子 = 7.30, $P < 0.001$);而 3.5 d 实验组,卵囊有显著性差异($t = 3.80, P < 0.05$),子孢子则无显著性差异($t = 0.78, P > 0.05$)。

对照组平均数为 129.75 个,不同剂量用药组平均数分别为 113.75 个、45 个、0 个和 0.25 个。经方差分析比较各用药组与对照组之间,以及不同剂量用药组之间的差异,特别指出的是,药量对子孢子密度的影响,180 mg/kg 与 240 mg/kg 用药组间差别无显著性意义。

药物对配子体及其发育到孢子增殖期形态结构的影响

对 10 只血传 3.5 d 受染小鼠,在用药 60 mg/kg 16 h 后,可见血涂片中出现形态异常的配子体即虫体皱缩、胞质空泡化及疟原素聚集成块等。计算每只小鼠血涂片中形态正常与异常配子体数量比例如下:73:37, 14:25, 102:18, 15:30, 21:74, 43:76, 33:14, 54:12, 42:21, 31:43 形态

表 2 受染小鼠服用不同剂量双氢青蒿素 16 h 后吸血蚊感染情况
 Table 2 Infection of mosquitoes taking blood from infected mice 16 h after treatment with different dosages of DQHS

组别 Group	药量 Dosage Of drug mg /kg	卵囊感染 Oocyst infection		孢子子感染 Sporozoite infection	
		阳性率 Positive rate(%)	平均密度 Average density ($\bar{X} \pm SD$)	阳性率 Positive rate(%)	平均密度 Average density ($\bar{X} \pm SD$)
对照组 Control group		100(30/30)	5.5 ± 1.35	85 (17/20)	3.34 ± 2.25
用药组 Treated group	60	100(20/20)	4.25 ± 1.47	50.5(11/20)	2.29 ± 2.61
	120	90(18/20)	3.28 ± 1.48	2/9	0.84 ± 2.00
	180	70(21/30)	0.88 ± 0.85	0 (0/18)	0
	240	74(26/35)	1.24 ± 1.30	0.5(1/20)	0.08 ± 0.36

异常的配子体数量占总数 43% (350/814); 差别最多的一只小鼠血片中形态异常配子体 (74) 比正常配子体数量多 3.5 倍。同时, 以同一批小鼠供蚊吸血, 12 d- 13 d 后解剖蚊胃, 透射电镜观察晚期卵囊超微结构的变化, 与对照组的卵囊相比, 用药组的吸血蚊胃上可见许多发育异常, 形态结构发生变化的卵囊和孢子芽, 主要表现膜系统改变与受损, 细胞器 (内质网与线粒体等) 变形与被破坏, 严重者细胞质空泡化 (图 1- 6)

药物直接作用蚊体内卵囊对孢子增殖发育的影响

吸过受染鼠血 (血传 3.5 d) 的蚊虫, 在吸血后 4 d (蚊胃上出现了 3 日龄卵囊) 将其分为对照组和用药组, 前者叮咬未用药正常小鼠, 后者叮咬用药 120 mg/kg, 6 h 后的小鼠。当上述两组蚊虫在第一次吸血后 6 d, 各解剖 10 只蚊虫以观察卵囊感染情况, 并在 12 d 和 14 d 各组解剖蚊虫 30 只, 以观察孢子感染情况。两组卵囊的感染均为阳性。孢子感染情况: 于 12 d 和 14 d 对照组分别解剖蚊虫 14 只和 16 只, 其阳性蚊虫分别为 12 只和 13 只; 用药组在同时间分别解剖蚊虫 12 只和 18 只, 其阳性蚊虫分别为 11 只和 17 只。观察两组蚊虫感染的卵囊 (各 10 只蚊虫) 和孢子 (各 30 只蚊虫) 的密度, 对照组和用药组的卵囊密度分别为 5.7501 ± 0.775 个和 5.5520 ± 0.931 个, 经 *t* 检验, 两

组间差别无显著性意义 ($t = 0.52, P > 0.05$); 两组的孢子密度依次为 4.6346 ± 2.397 个和 4.43735 ± 2.210 个, 经 *t* 检验, 两组间差别无显著性意义 ($t = 0.33, P > 0.05$), 其差异均无显著性意义。此外, 应用透射电镜观察两组蚊虫 (各解剖 16 只) 的胃上卵囊的超微结构, 其形态差异也不明显。表明该药对约氏疟原虫的卵囊发育不起直接抑制作用。

讨 论

本研究结果表明, 双氢青蒿素对约氏疟原虫配子体有一定的抑制作用。其作用强弱与配子体的成熟程度有关, 且与药物剂量亦有关。双氢青蒿素对未成熟配子体的作用明显强于成熟配子体, 即使用较低的剂量 (20 mg/kg) 药物亦可使孢子阳性率下降, 此结果虽与 Mehra 和 Bhasin (1993) 的报道一致, 但尚需应用电镜观察用药后小鼠血中被破坏的未成熟与成熟配子体数量的比例, 才能获得确切论证。随着药量的增加, 卵囊和孢子的感染及其密度亦逐渐下降。但当蚊体内疟原虫发育至 3 日龄卵囊期, 经双氢青蒿素作用 (120 mg/kg 16 h), 未能抑制卵囊继续发育到孢子, 即对孢子增殖期发育不起抑制作用。鉴于当前作为抗疟药的青蒿素类药物皆具有共同的抗疟活性基因, 由此表明青蒿素类药物用于疟疾预防的科学依据不足。

(本文图 1- 6见封三)

本文蒙刘尔翔教授提出宝贵意见; 程道新教授和刘学崇教授对本研究给予热情帮助, 特此致谢。

参 考 文 献

- 1 蔡贤铮, 韦任忠, 邢启良, 等. 青蒿素片治疗恶性疟 108 例效果. 中国寄生虫病防治杂志 1994; 7: 175
- 2 车立刚, 李兴亮, 杨沧江, 等. 双氢青蒿素治疗恶性疟与间日疟的效果. 中国寄生虫与寄生虫病杂志 1997; 15: 119
- 3 Dutta GP, Bajpai R, Vishwakarma RA. Artemisinin (Qinghaosu) - a new gametocytocidal drug for malaria-chemotherapy 1989; 35: 200
- 4 Dutta GP, Mohan A, Tripathi R. Study of the gametocytocidal /sporontocidal action of Qinghaosu (artemisinin) by electron microscopy. J Parasitol 1990; 76: 849
- 5 陈沛泉, 李国桥, 郭兴伯, 等. 青蒿素对恶性疟原虫配子体感染性的影响. 中华医学杂志 1994; 74: 209
- 6 黄亚铭, 傅伟忠, 赵忻, 等. 青蒿琥酯对食蟹猴疟原虫

- 孢子增殖期发育影响的研究. 中国寄生虫病防治杂志 1993; 6: 96
- 7 Tripathi R, Dutta GP and Vishwakarma RA. Gametocytocidal activity of $\alpha\beta$ artemether by the oral route of administration. Am J Trop Med Hyg 1996; 54: 6528
- 8 Mehra N and Bhasin Vk. In vitro gametocytocidal activity of artemisinin and its derivatives on *Plasmodium falciparum* Jpn J Med Sci Biol 1993; 46: 37
- 9 黄亚铭, 傅伟忠, 常海燕, 等. 双氢青蒿素阻断食蟹猴疟原虫孢子增殖期发育研究. 中国寄生虫病防治杂志 1997; 10: 5
- 10 高兴政, 袁国选. 鼠疟原虫配子体在小鼠体内数量消长与分布的初步研究. 北京医科大学学报 1985; 17: 262
- 11 陈佩惠, 李慧珠, 时云林, 等. 约氏疟原虫亚种在斯氏按蚊体内发育及三种按蚊敏感性的观察. 畜牧兽医学报 1983; 14: 146
- 12 陈佩惠, 卞英华, 胡昌仁, 等. 间日疟原虫卵囊内成孢子细胞与子孢子形成的超微结构观察. 动物学报 1990; 36: 330

1998年 5月 4日收稿 1998年 9月 14日修回

EFFECT OF DIHYDROQIN GHAOSU ON THE DEVELOPMENT OF *PLASMODIUM YOELII YOELII* IN *ANOPHELES STEPHENSI*

Chen Peihui¹, Tu Youyou², Wang Fengyun¹, Li Fengwu¹, Yang Lan²

1 Department of Parasitology, Capital University of medical sciences, Beijing 100054

2 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700

ABSTRACT

AIM To observe the effect of dihydro qinghaosu (DQHS) on the development of *Plasmodium yoelii yoelii* in *Anopheles stephensi* and to explore the possibility of whether DQHS has preventive effect against malaria. **METHODS** *Plasmodium yoelii yoelii* -infected mice that had been administered with a single dose of different dosages (60 mg/kg, 120 mg/kg, 180 mg/kg and 240 mg/kg) of DQHS were exposed to mosquitoes to suck blood. The development of malaria parasites in the mosquitoes of the control group and the treated group were observed by light microscopy (LM) and transmission electron microscopy (TEM). **RESULTS** DQHS exhibited certain inhibitory effect on the infectivity of gametocyte. The degree of inhibition was related to the developmental stages of gametocyte and the drug dosage. Immature gametocytes were more sensitive to DQHS than the mature gametocytes. With the increases in dosage, the positive rate and the density of oocyst and sporozoite decreased. However, the difference in the density of sporozoite between 180 mg/kg and 240 mg/kg treated groups was insignificant. TEM result showed damage of the membrane system and vacuolation in the cytoplasm of the oocysts (12- 13 d) on mosquito midgut of 60 mg/kg 16 h treated group. The oocysts in the mosquitoes continued to develop after treated with 120 mg/kg of DQHS for 16 h on 3-day-instar. There was no significant difference ($P > 0.05$) in the density of oocyst and sporozoite between the control group and the treated group. **CONCLUSION** DQHS can affect the infectivity of gametocyte and decrease the malaria transmission but cannot inhibit the sorogonic stage directly.

Key words Dihydroqinghaosu, *Plasmodium yoelii yoelii*, infectivity of gametocyte, *Anopheles stephensi*, sporogonic stage

* Supported by Institute of Traditional Chinese Medicine, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine