

· 研究简报 ·

二氟甲基鸟氨酸与贝尼尔配用治疗实验伊氏锥虫病

伦照荣¹ 张光朴² Cyrus J. Bacchi³

摘 要

三组体重20~23克的雌性NIH小鼠, 每只经腹腔接种 10^5 伊氏锥虫(*Trypanosoma evansi*)后24小时, 分别用不同剂量的贝尼尔治疗一次, 同时让小鼠喝不同浓度的二氟甲基鸟氨酸(DFMO)水溶液, 连续3天。结果表明, 1%DFMO+1.25mg/kg贝尼尔、1%DFMO+0.625mg/kg贝尼尔和0.5%DFMO+2.5mg/kg贝尼尔的配伍组, 其治愈率均达100%, 比各自单独使用的对照组均有明显的增效作用。另4组NIH小鼠, 每只经腹腔接种 10^5 伊氏锥虫后65小时(虫血症达 $1.5\sim 2.5\times 10^8$), 先用1.5mg/kg贝尼尔治疗一次, 7天后再让小鼠分别喝0.5%、0.75%、1%和2%的DFMO水溶液, 连续3天。结果显示, 1.5mg/kg贝尼尔+0.5%DFMO、1.5mg/kg贝尼尔+0.75%DFMO、1.5mg/kg贝尼尔+1%DFMO和1.5mg/kg贝尼尔+2%DFMO对后期危重的实验伊氏锥虫病的治愈率分别为20%、40%、80%和100%。

关键词 伊氏锥虫, 药物配用, 二氟甲基鸟氨酸, 贝尼尔, 增效作用, NIH小鼠

伊氏锥虫病又名苏拉病(Surra disease), 是一种重要的家畜寄生原虫病⁽¹⁾。由于该虫的宿主特异性极不严格⁽²⁾, 因而使该虫得以广泛流行, 特别是在亚洲的印度⁽³⁾和中国⁽⁴⁾, 每年均导致马、牛和骆驼等家畜的大批死亡, 造成巨大的经济损失。目前常用的抗锥虫药如贝尼尔(berenil)、苏拉明(suramin)和安锥赛(antrycide)等药源困难, 毒性较大, 而且对后期病例往往不能达到根治的目的。因此, 寻找、开发新的高效抗锥虫药已成急待解决的问题。Bacchi等人于1980年发现二氟甲基鸟氨酸(DFMO)对实验的布氏锥虫(*T. brucei*)有良好的治疗效果⁽⁵⁾。但因其用量太大, 难以在较大的动物中广泛使用⁽⁶⁾。此外, 由于DFMO的作用方式是通过抑制ODC的作用从而使锥虫体内的腐胺和亚精胺耗尽, 最终导致锥虫死亡^(7,8), 故其作用较缓慢, 不宜在危重的锥虫病例中使用。目前, 虽已发现另一种抗多胺生物合成的药物——单氟甲基脱氢鸟氨酸(monofluoromethyldehydroornithine, MFMO·CH₃), 在治疗实验感染的布氏锥

本文1988年3月7日收到

1. 广州中山大学生物学系

2. 美国健康科学大学/芝加哥医学院, 微生物学/免疫学系

3. 美国纽约Pace大学, Haskins实验室

虫病中,其药效比DFMO要高^[9],特别是治疗伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*)红外期,其疗效要比DFMO高10倍左右^[10]。但是,有关DFMO的详细药理作用和对寄生原虫的确切疗效以及如何利用现有的常用抗锥虫药如贝尼尔等与DFMO合用,对由伊氏锥虫引起的急、慢性家畜锥虫病进行合理的治疗,以达到根治的效果,仍需作深入的研究。

1 材料和方法

- 1.1 药物 DL- α -二氟甲基鸟氨酸(DL- α -DFMO)由美国 Merrel Dow Research Institute提供;贝尼尔是武汉第二制药厂产品。
- 1.2 小鼠 本实验所用小鼠均为雌性 NIH 小鼠,购于广东省卫生厅实验动物场,体重20~23克。
- 1.3 伊氏锥虫株的来源及分离 伊氏锥虫于1981年在广东省阳江县患伊氏锥虫病的水牛中分离到,经小鼠传代后保存于液氮。实验前1周左右,锥虫经复苏后接种小鼠,待出虫后再转种到健康的小鼠。当虫血症达 10^7 以上时,用肝素抗凝,心脏取血,并用含1%葡萄糖的磷酸缓冲液(PSG, pH8.0)稀释,在1000转/分中离心5分钟左右,把上层虫液吸到另一离心管,用血球计数板计数后接种小鼠。
- 1.4 小鼠感染与治疗 各组小鼠每只均由腹腔接种锥虫 10^5 。①5组小鼠接种锥虫后24h,按Bacchi等^[6]介绍的方法分别给小鼠喝不同浓度的DFMO水溶液,连续3天;②3组小鼠接种锥虫后24h,分别用不同剂量的贝尼尔治疗一次,同时让小鼠喝不同浓度的DFMO水溶液,连续3天;③4组小鼠接种锥虫后24h,单用不同剂量的贝尼尔治疗一次;④4组小鼠接种锥虫后65h,虫血症达 $1.5\sim 2.5\times 10^8$ 时,各组小鼠先用1.5mg/kg贝尼尔治疗一次,7天后再让各组小鼠分别喝0.5%、0.75%、1%和2%DFMO水溶液,连续3天,详见表1。

2 结果

实验结果显示,小鼠感染伊氏锥虫后24h,单用1%以上的DFMO连续治疗3天,可获得满意的效果,与单独使用5mg/kg贝尼尔的治疗效果相同(见表1)。用1%DFMO+1.25mg/kg贝尼尔,1%DFMO+0.625mg/kg贝尼尔和0.5%DFMO+2.5mg/kg贝尼尔的配用治疗感染伊氏锥虫后24h的小鼠,均获得100%的治愈率,疗效比各自单独使用时有明显的提高。由于上述各组小鼠在使用药物治疗时其虫血症都较低($\sim 10^4$),而且离接种时间相隔较短,为了证明DFMO与贝尼尔合用时的治疗危重(后期)实验伊氏锥虫病的效果,我们在小鼠感染伊氏锥虫后65h(此时每只小鼠的虫血症均达 $1.5\sim 2.5\times 10^8$),先用1.5mg/kg贝尼尔治疗一次,目的是用该药迅速杀灭绝大部分外周血液的锥虫,以免小鼠死亡,贝尼尔治疗7天后再让这些小鼠喝不同浓度的DFMO水溶液,连续3天,目的是清除脑脊髓系统的小量锥虫。结果表明,以0.5%和0.75%DFMO作后治疗的两组小鼠,生存时间超过60天以上的分别只有20%和40%。用1%DFMO作后治疗的小鼠,其存活时间超过60天以上的达80%,而用2%DFMO治疗的小鼠,治愈率则达100%(表1)。

表1 二氟甲基鸟氨酸和贝尼尔对伊氏锥虫的作用
 Tab. 1 Effects of DFMO and berenil on *Trypanosoma evansi* infection in mice

Drug	Treatment regimen	Day of mice died after treatment	No. Cured/Total No. (%cured)
Control ^a	0	3,3,3,3,3.5 3.5,4,4,4,4	0/10 (0) ^d
DFMO ^a	0.1% in drinking water, ^b 3 days	3,3,3.5,3.5,3.5, 4,4,4,4,4	0/10 (0)
	0.25% in drinking water, 3 days	3,3,3.5,3.5,3.5, 3.5,3.5,4,4,4	0/10 (0)
	0.5% in drinking water, 3 days	20,21,21,21,22, 22,23,24,24,24	0/10 (0)
	1.0% in drinking water, 3 days		10/10 (100)
	2.0% in drinking water, 3 days		10/10 (100)
	Berenil ^a	0.625mg/kg, i. p. one dose	12,13,13,13,14, 14,14,16,16,16
1.25mg/kg i. p. one dose		16,16,18,18,18, 19,19,19,20,20	0/10 (0)
2.5mg/kg i. p. one dose		21,23,23	7/10 (70)
5.0mg/kg i. p. one dose			10/10 (100)
DFMO + Berenil ^a	1.0% + 1.25mg/kg		10/10 (100)
	1.0% + 0.625mg/kg		10/10 (100)
	0.5% + 2.5mg/kg		10/10 (100)
Berenil + DFMO ^c	1.5mg/kg + 0.5%	21,22,22,22,22 22,24,24,	2/10 (20)
	1.5mg/kg + 0.75%	22,22,22,26,29,38,	4/10 (40)
	1.5mg/kg + 1.0%	22,24,	8/10 (80)
	1.5mg/kg + 2.0%		10/10 (100)

a. Mice (NIH, female, 20-23g) were inoculated with 10^5 trypanosomes. Treatment began 24 hours after inoculation. Untreated infected mice died in 3 to 4 days with trypanosome counts of $>10^9$ /ml blood.

b. DFMO provided in all instances in drinking water based on a daily intake of 5ml water/25g mouse (Bacchi et al., 1980).

c. Sixty-five hours after inoculation (10^5 trypanosomes/mouse), the parasitaemia of all the mice reached $1.5-2.5 \times 10^8$ trypanosomes/ml blood, all the mice were treated with 1.5mg/kg berenil. Seven days after berenil treatment, the mice were treated again with 0.5%, 0.75%, 1.0% or 2.0% DFMO in drinking water respectively for three days.

d. Considered curative: Cured animals remained aparasitaemia for >30 days (the groups with mark a) or >60 days (the groups with mark c), and the blood, brain homogenated from these animals failed to infect health mice.

3 讨 论

贝尼尔、苏拉明等是被公认有良好杀锥虫作用的药物,不过由于它们难以通过血脑屏障(blood-brain barrier),故不能有效地杀灭入侵脑脊髓系统的锥虫,因而常引起复发^[1]。Bacchi等报道二氟甲基鸟氨酸(DFMO)对由布氏锥虫引起的早期和后期的实验非洲锥虫病均有显著的疗效^[5]。近年,在现场用于治疗后期锥虫病人,亦取得了良好的效果^[12-15]。尽管DFMO能有效地到达脑脊髓组织,杀灭其中的锥虫,但是,由于用药量太大、疗程太长(400mg/kg/day,连续6周^[15]),故极不利于广泛地推广使用。因此,在目前的情况下如何利用DFMO能有效地通过血脑屏障的优点,寻找与DFMO合用,既能减少组合药物的用量、缩短疗程,又能有效地治疗后期锥虫病的药物,已引起了人们广泛关注。用苏拉明,争光霉素(bleomycin)、间型霉素(formycin)和9-deazainosine等药物与DFMO配用,已被证明这些药物间能起到增效作用,即既能降低药物的原使用量又能有效地治愈实验感染的后期锥虫病^[16-18]。由于伊氏锥虫在中国大陆流行甚广,导致牛、马等家畜的大批死亡,造成极大的损失^[4]。因此,寻找、筛选和开发新的抗锥虫药在中国无疑显得更为迫切和重要。为此,我们试用DFMO与国产贝尼尔配用治疗实验伊氏锥虫病,其结果表明:小鼠接种伊氏锥虫后24小时,分别用0.625mg/kg、1.25mg/kg和2.5mg/kg的贝尼尔治疗一次,同时让这些小鼠分别喝1%和0.5%的DFMO,连续3天,各组的治愈率均达100%,比各自单独使用治疗早期的伊氏锥虫病有较明显的增效作用。但是,如在小鼠接种伊氏锥虫后65小时(虫血症达 $1.5\sim 2.5\times 10^8$),虽然用1.5mg/kg的贝尼尔治疗一次已把绝大部分外周血液的锥虫杀灭,而且在贝尼尔治疗7天后又用DFMO连续治疗三天,但效果却不如在小鼠接种锥虫后24小时用DFMO和贝尼尔配用治疗的效果理想。其中,1.5mg/kg贝尼尔+0.5%DFMO配用组,只有20%小鼠存活时间超过60天以上;1.5mg/kg贝尼尔+0.75%DFMO组只有40%小鼠生存时间超过60天以上;即使是1.5mg/kg贝尼尔+1%DFMO组,生存时间超过60天以上的小鼠亦只有80%,详见表1。我们认为,出现上述的结果是不难理解的。当动物患重度虫血症时,进入脑脊髓组织的虫体无疑有相当大的数量。因此,当DFMO的药量稍有不足时,余下的锥虫便可重新进入外周血液,引起复发,导致小鼠死亡。

参 考 文 献

- [1] Woo P T K, *Salivarian trypanosomes producing disease in livestock outside of sub-saharan Africa, Parasitic Protozoa*, Academic Press, Vol. 1(1977), 269~296
- [2] Clark H C et al., *Am. J. Trop. Med.*, 13(1933), 273~282
- [3] Verma B B, *Haemoprotozoan diseases of domestic animals*. (Proc. Seminar CWVA Asian/Australian regions), Haryana Agric. Univ. Hissar, India, 27 Oct. to 1 Nov. 1980), 1983, 181~186
- [4] Zheng Ce-Ping, *Trypanosomiasis of Livestock*, Science and Technology Press of Shanghai, 1966, (Chinese)
- [5] Bacchi C J et al., *Science*, 210(1980), 332~334

- [6] McCann P P et al., *Adv. Polyamine Res.*, 3(1981), 97~110
[7] Bacchi C J et al., *Mol. Biochem. Parasitol.*, 7 (1983), 209~225
[8] Bacchi C J, *J. Protozool.*, 28 (1981), 20~27
[9] Bacchi C J et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36(1987), 48~54
[10] Hollingdale M R et al., *Exp. Parasitol.*, 60(1985), 111~117
[11] Jennings F W et al., *Internation. J. Parasitol.*, 9(1979), 381~384
[12] McCann P P et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35 (1986), 1152~1156
[13] Schechter P J et al., *Parasitol. Today*, 2 (1986), 223~224
[14] Sjoerdsma A et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 35 (1984), 287~300
[15] Von Nieuwenhove S et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79(1985), 692~698
[16] Bacchi C J et al., *Antimicrob. Agent. Chemother.*, 31 (1987), 1406~1413
[17] Clarkson A B et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 (1983), 5729~5733
[18] Clarkson A B et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33 (1984), 1073~1077

Effects of Drug Combination DL-alpha-Difluoromethyl-ornithine With Berenil on *Trypanosoma evansi* in Mice

Lun Zhaorong* K.-P. Chang Cyrus J. Bacchi

Abstract

Three groups of inbred NIH mice which had been infected with *T. evansi* (10^5 parasites/mouse) for 24 hours were then treated with berenil for one dose and with DFMO in drinking water at the same time for three days. The results show that the combination of 1% DFMO + 1.25mg/kg berenil, 1% DFMO + 0.625mg/kg berenil or 0.5% DFMO + 2.5mg/kg berenil all give curative rate of 100% when examined 30 days after the therapy. The curative rate of above drug combinations was higher than that of them when they singly used.

In the other four groups of mice also inoculated with 10^5 *T. evansi*/mouse. Sixty-five hours after inoculation (the parasitaemia of these mice reached $1.5-2.5 \times 10^8$ trypanosomes/ml blood), all the mice were treated with 1.5mg/kg berenil. Seven days after berenil treatment, four groups of mice were treated again with 0.5%, 0.75%, 1.0% and 2.0% DFMO in drinking water for three days respectively. The results show that the curative rate of these drug combinations is 20%, 40%, 80% and 100% individually when examined 60 days after the therapy. We consider that the above drug combinations DFMO with berenil are not very effective for treating the late-stage (CNS) *T. evansi* unless the dose of DFMO is increased up to 2.0%.

Keywords *Trypanosoma evansi*, drug combination, synergism, difluoromethyl-ornithine, berenil, NIH mice

• Department of Biology