

# 硝喹对体外培养的 约氏疟原虫红内期膜磷脂的影响

邓淑凤\* 胡友梅

第三军医大学药理教研室 重庆 400038

**提要** 目的: 探讨硝喹抗疟作用机理。方法: 用蜡烛缸法体外培养约氏疟原虫红内期, 以 $[^3\text{H}]$ -乙醇胺掺入疟原虫膜磷脂作指标, 观察硝喹对疟原虫膜磷脂合成的影响, 以DPH作为荧光探针, 测膜荧光偏振度及微粘度。结果: 硝喹明显抑制 $[^3\text{H}]$ -乙醇胺掺入约氏疟原虫, 并增高约氏疟原虫膜荧光偏振度和微粘度。结论: 硝喹可明显抑制疟原虫膜磷脂的生物合成, 并明显降低膜流动性。

**关键词** 约氏疟原虫 膜磷脂 生物合成 膜流动性

硝喹是一种对疟原虫红内期、红外期的生长发育及蚊体内孢子增殖均有抑制作用的抗疟新药<sup>[1]</sup>, 目前已知其作用机制主要为抑制约氏疟原虫二氢叶酸还原酶和影响蛋白质合成<sup>[2]</sup>。此外, 据电镜观察, 硝喹对疟原虫膜系统具有明显的损害<sup>[3]</sup>, 推测疟原虫的膜损害与膜磷脂变化有关。本实验旨在探讨硝喹在体外对约氏疟原虫膜磷脂的作用, 以进一步阐明硝喹抗疟作用机制。

## 材料与方 法

### 原 虫

约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)BY265株, 血传20~40代, 由军事医学科学院引进。昆明株小鼠, 体重18~22g, 不拘。硝喹(上海医药工业研究院); 氯喹(上海第十四制药厂); RPM I 1640(GBCO); 纤维素DE22(W hatm an); DPH(Sigma);  $[^3\text{H}]$ -乙醇胺( $[^3\text{H}]$ -EA, 北京原子能研究所), 放射性活度 $6.66 \times 10^8$  PBq/mol; 其余试剂均为市售品, AR级; DYQ-II型多头细胞样品收集器(浙江绍兴医疗器械厂); LKB-1217型液体闪烁计数仪(W al-lac); MPF-4型荧光分光光度计(H itachi)。

### 接种疟原虫和血液标本的制备

小鼠腹腔定量接种约氏疟原虫红内期。接种后2d~2.5d涂片检查, 待红细胞感染率达50%左右, 滋养体在66%以上时, 取多只小鼠眼球血于同一肝素瓶内, 用RPM I 1640培养基稀释, 参照纤维素粉柱过滤法<sup>[4]</sup>去除白细胞, 1600g离心5min, 清洗2次, 进行红细胞计数和姬姆萨染剂染色疟原虫分类计数后, 细胞用RPM I 1640培养基悬浮备用。

### 疟原虫体外培养

疟原虫体外培养采用蜡烛缸法<sup>[5]</sup>。96孔板培养系统中, 每孔含上述稀释血150  $\mu\text{l}$ (约含 $7.5 \times 10^6$ 疟原虫), 加入不同终浓度的硝喹、氯喹和 $[^3\text{H}]$ -EA

37 kBq, 每孔终体积为230  $\mu\text{l}$ , 药物的量效反应和时效反应均孵育8h, 每批均设不加药物的感染疟原虫的红细胞为空白对照组和未感染红细胞组。

### $[^3\text{H}]$ -EA 掺入红细胞和放射性测定

$[^3\text{H}]$ -EA掺入红细胞的测定参照半自动微量稀释法<sup>[6]</sup>略加改进, 滤膜改用国产49型玻璃纤维滤膜收集细胞, 双蒸水冲洗, 抽滤90s, 膜干燥后, 置入盛有5ml闪烁液(用甲苯配制, 含PPO 0.5%, POPOP 0.02%)的闪烁瓶内, 测定dpm值。以未感染红细胞的dpm为本底值。

### 疟原虫膜流动性检测

取经纤维粉柱过滤, RPM I 1640培养基悬浮的血液标本, 离心去上清, 压积细胞加预冷的Tris-NH<sub>4</sub>Cl 1ml溶解红细胞, 500g离心5min沉淀原虫<sup>[7]</sup>。调整原虫数为 $5 \times 10^8$ 个, 悬于2ml  $2 \times 10^{-6}$  mol/L DPH液, 25~30min, 清洗2次, 沉淀以3ml PBS配成疟原虫悬液备用, 采用荧光偏振法<sup>[8]</sup>测定荧光偏振度, 荧光分光光度计测荧光偏振度(fluorescence polarizability, FP), 并按Pertrin公式计算膜平均微粘度( $\eta$ )。实验以不用药组作对照外, 还用CCl<sub>4</sub>作阳性对照。

### 统计学处理

用Student's-t-test程序进行组内和组间检验, 以 $P < 0.05$ 为显著界线, 结果用平均数 $\pm$ 标准差( $M \pm S$ )表示。

## 结 果

$[^3\text{H}]$ -EA掺入体外培养的和未感染约氏疟原虫红细胞的观察

培养8h过程中,  $[^3\text{H}]$ -EA掺入感染疟原虫红细胞的量随培养时间的延长而增加, 呈时间依赖关

\* 现在白求恩军医学院

系。[<sup>3</sup>H]-EA 也能掺入正常红细胞,但掺入量少,而且与培养时间长短无关(图1)。

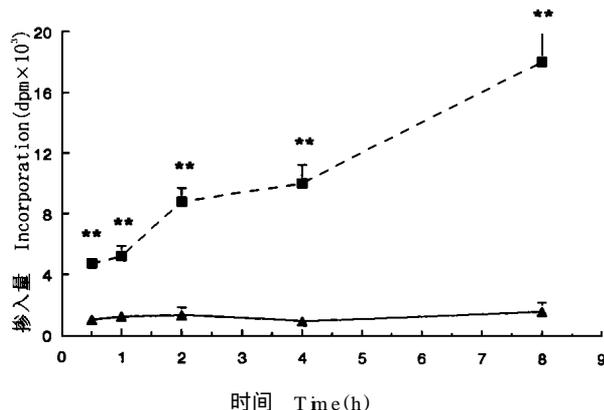


图1 [<sup>3</sup>H]-EA 掺入感染和不感染约氏疟原虫红细胞  
样本数为4 ——不感染红细胞 —■—感染红细胞

Fig 1 Incorporation of [<sup>3</sup>H]-EA into *P. yoelii*-infected-RBC (IRBC) and non-infected RBC (NRBC)  
No. samples=4 ——NRBC —■—IRBC  
\*\* (*P* < 0.01)

### 硝喹对[<sup>3</sup>H]-EA 掺入疟原虫的影响

硝喹和阳性对照药氯喹,从  $2 \times 10^{-6}$  mmol/L 起即可明显减少[<sup>3</sup>H]-EA 掺入疟原虫膜磷脂,(两药抑制率分别为  $20.3 \pm 5.2\%$  和  $22.9 \pm 3.9\%$ , *P* < 0.01),其抑制效应随药物浓度的增加而增强,在最大受试浓度( $2 \times 10^{-2}$  mmol/L),两药的抑制率分别为  $84.3 \pm 4.9\%$  和  $77.1 \pm 4.9\%$ 。两药各浓度组间差别不显著(图2)。

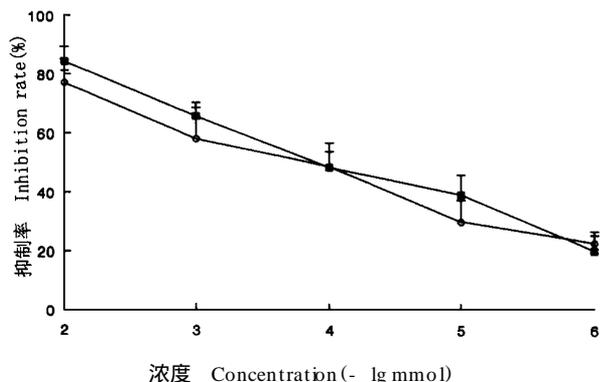


图2 硝喹与氯喹对[<sup>3</sup>H]-EA 掺入约氏疟原虫的影响  
样本数为4 —■—硝喹 —▲—氯喹

Fig 2 Effect of NQ and CQ on the incorporation of [<sup>3</sup>H]-EA into *P. yoelii*  
No. samples=4 —■—NQ —▲—CQ  
\*\* (*P* < 0.01)

$2 \times 10^{-2}$  mmol/L 浓度的硝喹在体外与疟原虫接触1h,即能明显抑制[<sup>3</sup>H]-EA 掺入疟原虫,与不给药对照组比,其抑制率为  $29.6 \pm 7.5$  (*P* < 0.01),8h 抑制率为  $84.32 \pm 4.95$ ,抑制效应与药物作用时间呈时间依赖关系(图3)。

### 硝喹对约氏疟原虫膜流动性的影响

硝喹剂量在  $2 \times 10^{-2}$  mmol/L ~  $8 \times 10^{-2}$  mmol/L 时,可使疟原虫膜 *P* 和  $\eta$  值明显升高(*P* < 0.01),

且 *P* 值(图4)和  $\eta$  值随硝喹浓度的增加而增高,即膜流动性明显降低。

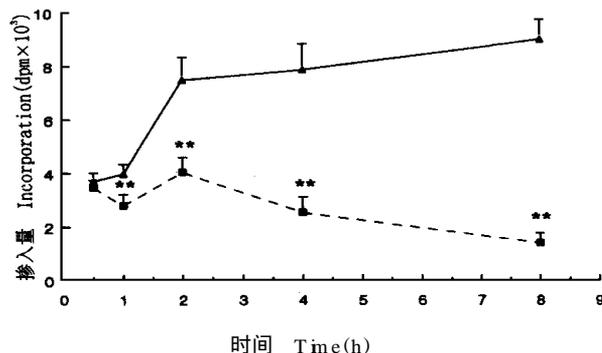


图3 硝喹对[<sup>3</sup>H]-EA 掺入约氏疟原虫的影响  
样本数为4 ——对照 —■—硝喹(0.02 mmol)

Fig 3 Effect of NQ on the incorporation of [<sup>3</sup>H]-EA by *P. yoelii*  
No. samples=4 ——Control —■—NQ (0.02 mmol)  
\*\* (*P* < 0.01)

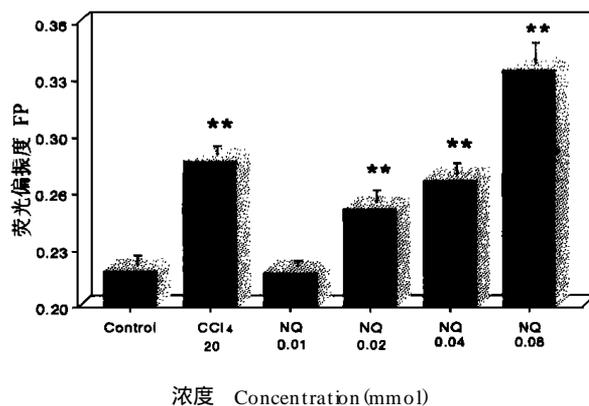


图4 硝喹对约氏疟原虫膜流动性的影响  
样本数为3

Fig 4 Effect of NQ on the membrane fluidity of *P. yoelii*  
No. samples=3 \*\* (*P* < 0.01)

$2 \times 10^{-2}$  mmol/L 硝喹在体外与疟原虫作用1h,与对照组相比,能明显升高 *P* 值(*P* < 0.05)和  $\eta$  值,表明疟原虫膜流动性显著降低,且有时间依赖关系(图5)。

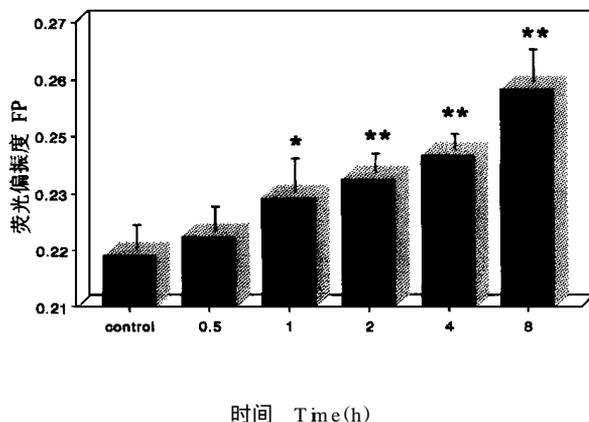


图5 硝喹对约氏疟原虫膜流动性的影响  
样本数为3

Fig 5 Effect of NQ on the membrane fluidity of *P. yoelii*  
No. samples=3 \*\* (*P* < 0.01)

## 讨 论

本实验所用 $[^3\text{H}]$ -EA, 是合成膜磷脂的主要前体物, 因此, 它的掺入可以作为磷脂合成作用的一个观察指标, 实验结果显示, 感染红细胞 $[^3\text{H}]$ -EA 的掺入量明显高于未感染红细胞。已知正常哺乳动物的红细胞磷脂合成的能力很低<sup>[9]</sup>, 所以, 感染红细胞中 $[^3\text{H}]$ -EA 的增加, 则可归因于红细胞内疟原虫的迅速发育, 由于疟原虫发育过程中伴随膜的大量增生, 致使其磷脂代谢异常活跃。

实验证明, 硝喹对 $[^3\text{H}]$ -EA 掺入疟原虫具有抑制作用, 推测硝喹对疟原虫磷脂合成的影响, 一是与其抑制磷脂酰乙醇胺合成的某一环节有关; 二是通过抑制DNA 合成, 减慢原虫发育, 进而影响膜磷脂的合成; 或两种作用同时存在。

国内外以往的实验, 主要集中在抗疟药对宿主细胞膜流动性的影响, 而药物对疟原虫膜流动性的改变, 尚未见报道, 我们的结果表明: 硝喹可使疟原虫膜荧光偏振度和微粘度明显升高, 即膜流动性明显降低。生物膜以脂质双分子层为基本骨架已为大家所公认, 膜脂的基本组分是磷脂, 疟原虫磷脂合成的减少, 势必影响膜的完整性, 这是膜流动性降低的原因之一。生物膜流动性尚与膜脂中不饱和脂肪酸的含量呈正相关。已明确, 疟原虫无能力合成脂肪酸, 其所需脂肪酸主要来源于血浆脂肪酸和溶血磷脂<sup>[10]</sup>。因此, 硝喹是否影响了疟原虫的某一代谢调节机制, 使脂肪酸的吸收或利用障碍, 有待进一步研究。

综上所述, 硝喹作为一种对疟原虫发育具有抑制作用的抗疟新药, 其作用机制很可能是多环节的。本实验证实硝喹能明显抑制疟原虫膜磷脂的生物合成, 并可降低疟原虫膜流动性, 此结果可能是硝喹的抗疟作用机制之一。

## 参 考 文 献

- 1 Thompson PE, Bayles A, Olsze WS. Antimalarial activity of 2, 4-diamino-6-[(3, 4-dichlorobenzyl) nitrosamino]quinazoline (C1 679 Base) and C1 679 acetate. Laboratory studies in mice and rhesus monkeys. *Am J Trop Med Hyg* 1970; 19: 12~26
- 2 周世文, 胡友梅. 硝喹对体外培养鼠约氏疟原虫红内期蛋白质合成的影响. *中国药理学报* 1991; 12: 372~375
- 3 周世文, 胡友梅. 硝喹对鼠约氏疟原虫红内期超微结构的影响. *第三军医大学学报* 1991; 13: 535~539
- 4 庞林华, 胡友梅. 用DEAE 纤维素粉柱清除疟原虫感染血中白细胞. *第三军医大学学报* 1990; 12: 420~421
- 5 Trager W, Jensen JB. Human malarial parasites in continuous culture. *Science* 1979; 193: 673~675
- 6 Elabbadi N, Ancelin ML, Vial HJ. Use of radioactive ethanolamine incorporation into phospholipids to assess *in vitro* antimalarial activity by the semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 50~55
- 7 张龙兴, 邱云, 王聚君. 感染疟原虫小鼠红细胞膜的流动性. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 1993; 11: 124~125
- 8 林克春, 聂松青, 薄惠卿, 等. 用荧光探针DPH 研究腹水癌细胞膜流动性. *生理化学与生物物理进展* 1981; 6: 32~35
- 9 Vial HJ, Ancelin ML, Philippot JR, et al. Biosynthesis and dynamics of lipids in *Plasmodium*-infected mammalian erythrocytes. *Blood Cells* 1990; 6: 531~555
- 10 Wunderlich F, Fiebig S, Vial HJ, et al. Distinct lipid compositions of parasite and host cell plasma membranes from *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 44: 271~278

1998年12月7日收稿 1999年6月3日修回  
(编辑: 庄兆农)

## EFFECT OF NITROQUINE ON THE MEMBRANE PHOSPHOLIPID OF INTRAERYTHROCYTIC PLASMODIUM YOELII IN VITRO

DENG Shufeng\*, HU Youmei

Department of Pharmacology, Third Military Medical University, Chongqing 400038

### ABSTRACT

**AM:** To study the mechanism of antimalarial action of nitroquine. **METHODS:** Intraerythrocytic *P. yoelii* was cultured by the method of Trager and Jensen. The amount of  $[^3\text{H}]$ -ethanolamine incorporation was measured as an index of the phospholipid synthesis. DPH was used as a probe to measure the plasmodial fluorescent polarization. **RESULTS:** The incorporation of  $[^3\text{H}]$ -ethanolamine into the *P. yoelii* infected erythrocytes was markedly inhibited by nitroquine. The plasmodial membrane polarization and viscosity were significantly increased by nitroquine. **CONCLUSION:** Nitroquine could inhibit the phospholipid synthesis and decrease the membrane fluidity of *P. yoelii*.

**Key words:** *Plasmodium yoelii*, membrane phospholipid, biosynthesis, membrane fluidity

\* Present address: Bethune Military Medical College