

## 氯喹对疟原虫多胺及核酸的影响<sup>1</sup>

黄左钺、富秀兰、吴克英、王聚君 (中国预防医学科学院寄生虫病研究所<sup>2</sup>, 上海 200025)

**提要** rbc 感染疟原虫后, 微量存在于 rbc 中的腐胺、精脒及精胺 3 种多胺含量急骤上升。其中感染抗氯喹伯氏疟原虫的 rbc 上升最高, 约氏疟原虫感染的 rbc

较低。氯喹能抑制约氏及伯氏疟原虫的多胺代谢, 但却不影响抗性株伯氏疟原虫的多胺代谢。im 氯喹后, 疟原虫多胺代谢受阻, 但其 DNA 及 RNA 含量却保持不变。

1985年9月30日收稿 1986年3月11日修回

<sup>1</sup> 本研究得到联合国开发计划署/世界银行/世界卫生组织热带病研究培训特别规划的部分支持。

<sup>2</sup> 世界卫生组织疟疾、血吸虫病及丝虫病合作中心

**关键词** 氯喹; 多胺; 腐胺; 精脒; 精胺; 约氏疟原虫; 伯氏疟原虫; 去氧核糖核酸; 核糖核酸

多胺与微生物的生长、正常组织再生及肿瘤细胞的生长、繁殖等关系极为密切。疟原虫, 尤其(红内期)恶性疟原虫繁殖速度极快, 在短时间内虫体 DNA 大量复制, RNA 快速转录及蛋白质的迅速合成是否也与多胺有关, 至今研究疟原虫多胺方面的资料报道少见<sup>(1)</sup>。氯喹是具有多胺结构的化合物, 关于氯喹的杀虫机制众说纷云<sup>(2,3)</sup>。作者比较了几种疟原虫及施用氯喹后虫体多胺、DNA 及 RNA 含量变化情况, 该实验结果或许有助于理解氯喹杀灭疟原虫的机理。此外, 本文还报道了一些有关疟原虫生化实验的方法。

## 材料和方 法

**动物** 选用昆明系 20±SD 2g ♂ 鼠

**红内期疟原虫** 约氏疟原虫 (*Plasmodium yoelii*) 系 1976 年 6 月从法国引进。伯氏疟原虫 (*P. berghei*) ANKA 株系 1981 年 9 月由英国伦敦卫生与热带医药学院医学原虫学系惠赠。*P. berghei* 抗氯喹株抗性强度与氯喹敏感株相比较, ig 氯喹剂量达 62 倍以上, 该株由本所用 *P. berghei* ANKA 株施用氯喹选育而得。

**试剂** 多胺标准试剂中 putrescine 及 spermidine 购自瑞士 Fluka 厂, spermine 购自西德 Serva 厂。丹磺酰氯 (dansyl-chloride) 购自英国 K-Light 厂。Kieselgel 60 G 购自西德 E Merck 厂。磺化乙基纤维素 SE-cellulose 购自西德 Serva 厂。其他试剂均为国产。

**感染疟原虫的 rbc 样品制备** 用生理盐水稀释的感染血液经 ip 0.2 ml (约含 40 万个感染 rbc)/鼠后, 于 d 4-d 5 平均感染率达 30% 左右, 心脏穿刺取血 1.0 ml, 用肝素-磷酸缓冲生理盐水稀释 5 倍, 离心 (1600×g, 10 min) 除去上清液, 再加肝素-磷酸缓冲生理盐水至 5.0 ml, 缓慢注入装有预先被肝素-磷酸缓冲生理盐水润湿并混匀了的磺化乙基纤维素 (80-100 mg) 与葡聚糖凝胶 G 25 (200 mg) 的层析柱内<sup>(4)</sup>, 血样流经该柱时, 大部分 wbc 被吸附, 血样处理前后, 均用血细胞计数仪 (瑞士

Contraves) 自动计数。

**疟原虫多胺样品的制备及测定** 柱层析流出液经离心 (1600×g, 10 min) 得压积细胞用玻璃棒搅匀后, 取样 (加少许血清) 涂制薄血膜 (Giemsa 染色), 查红细胞感染率。用肝素-缓冲生理盐水冲至一定体积 (0.5-1.0 ml) 借血细胞计数仪准确计数 rbc。用微量吸管取样 0.5 或 1.0 ml, 加入 0.5 或 1.0 ml 重蒸馏水使溶血, 加入高氯酸 1.0 或 2.0 ml (使终浓度为 0.4 mol/L), 混匀, 记录总容量 (2.0 或 4.0 ml), 冰浴下磨匀浆, 离心 (2500×g, 20 min) 后, 取出上清液, 用 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 除去高氯酸 (1.0 ml 上清液加 0.1 ml 浓度为 55% (wt/vol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液并摇匀后, 1600×g 离心 5 min, 除去沉淀), 所得上清液即为多胺混合样品。

三种多胺的分离及测定, 基本按照文献 (5) 法进行。但对其中某些步骤做了改进, 具体操作如下:

取 0.5 ml 多胺混合样品, 加入等容量 0.25% (wt/vol) 丹磺酰氯丙酮溶液, 10-15℃ 避光反应 20 h, 加入 0.1 ml 10% (wt/vol) 脯氨酸溶液中止反应, 30 min 后置 56℃ 恒温水浴中, 用真空泵抽去丙酮, 取出试管, 加入 0.5 ml 苯液, 振荡 20 min, 离心 (1600×g, 5 min) 后, 除去水层, 荧光标记多胺混合样品即在苯液中, 避光、低温保存备用。

制作点样用硅胶薄板时, 先将硅胶糊 (100g 硅胶粉-Kieselgel 60 G 加 250 ml 重蒸馏水) 用 NaOH 液将 pH 调至 10, 再铺成厚度为 1.0 mm 薄板, 凉干后, 经 120℃ 烤箱活化 2 h, 置干燥器内保存备用。

展开液配比: 氯仿 33 ml、二氧六环 3.2 ml 及异戊醇 1.0 ml 10℃ 避光条件下展开。展开距离为 11-12 cm, 借紫外光分别挖下黄绿色多胺荧光斑点, 置于 4.0 ml 洗脱液 (95 ml 95% 乙醇加 5.0 ml 含 NH<sub>3</sub> 量为 25% 的浓氨水) 中, 用旋涡混合器混匀, 离心 (1600×g, 5 min) 取上清液, 用荧光分光光度计 (HITACHI MPF-4 型) 测定多胺含量。

**荧光测定** 激发光波长 342 nm, 荧光波长 522 nm, 狭缝均选用 8.8 nm.

每次测定生物样品时, 在同一块硅胶薄板上, 同时点样测定多胺标准液, 以避免不同硅胶薄板所引起的误差. 测得标准多胺样品 PTC, SPD 及 SPM 的  $R_F$  平均值分别为 0.66, 0.72 及 0.83.

#### 疟原虫 DNA, RNA 样品的制备及测定

按前所述, 冰浴下磨匀浆, 离心后其沉淀则用于制备 DNA 及 RNA 样品. 用 95% 乙醇多次洗涤, 除去脂溶性物质. 加 20% (wt/vol) 三氯乙酸沉淀蛋白质, 恒温水浴 90°C 保温 15 min (不时摇动), 水浴冷却后离心 (2500 × g, 20 min) 得上清液即为 DNA 与 RNA 混合样品. 用二苯胺法测定 DNA, 用苔黑酚法测定 RNA.

### 结 果

**感染不同种(或株)疟原虫的 rbc 多胺含量** 正常小鼠每  $10^9$  rbc 含 PTC, SPD 及 SPM 分别为 0.57, 8.9 及 1.3 nmol. 感染约氏疟原虫的每  $10^9$  rbc 中, 3 种多胺含量明显高于正常组, PTC, SPD 及 SPM 分别为 10, 102 及 20 nmol. 感染伯氏疟原虫的每  $10^9$  rbc 含 PTC, SPD 及 SPM 分别为 11, 133 及 29 nmol. 感染抗氯喹株伯氏疟原虫的每  $10^9$  rbc 中, PTC, SPD 及 SPM 含量依次为 27, 513 及 111 nmol.

分别相当于氯喹敏感株的 2.5, 3.8 及 3.8 倍 (表 1).

**氯喹对疟原虫体内多胺含量的影响** 感染约氏疟原虫的小鼠, 当平均感染率达 30% 左右, im 氯喹 15 及 30 mg/kg, 20 h 后, 心脏穿刺取血, 收集样品测定多胺含量. 同时用不给药的感染小鼠作对照. 结果表明, 3 种多胺含量均明显减少. 其中 PTC 从 10 降至 2.6 及 2.9 nmol, SPD 从 102 降至 43 及 43 nmol, 而 SPM 则从 20 降至 8 及 9 nmol, 统计学处理表明均有显著差异 (表 1).

感染伯氏疟原虫的小鼠一次 im 氯喹剂量分别为 5, 20 mg/kg, 20 h 后取样测定结果表明: PTC 含量基本不变, SPD 则从 133 分别降至 62 及 54 nmol, 而 SPM 则从 29 降至 23 及 20 nmol, 统计学处理表明均有显著差异.

感染抗氯喹株伯氏疟原虫的小鼠 im 氯喹剂量 60 mg/kg × 1, 20 h 后取样测定结果, 3 种多胺含量无明显改变 (表 1).

此外, 初步摸索了猴诺氏疟原虫 (*P. knowlesi*) 多胺含量. 正常恒河猴每  $10^9$  rbc 含有 PTC, SPD, SPM 分别为 0.5, 3.3 及 2.4 nmol, 测定以大滋养体为主的 (约占感染 rbc 总数的 80%) 每  $10^9$  感染 rbc 中 3 种多胺含量较前者均高出 10 倍以上. 可见虫体内多胺含量也相当可观.

Tab 1. Content of polyamines in erythrocytes of normal mice and those infected with *Plasmodium yoelii* or *P. berghei*.  $\bar{x} \pm SD$

Sample (nmol/ $10^9$ rbc)	Chloroquine (CQ) dose (mg/kg)	Putrescine	Spermidine	Spermine
Normal rbc	0	0.57 ± 0.2 (7)	8.9 ± 2.4 (6)	1.3 ± 0.2 (10)
rbc infected with <i>P. yoelii</i>	0	10 ± 3.4 (7)	102 ± 17 (6)	20 ± 2 (4)
	15 × 1	2.6 ± 1.2 (3)**	43 ± 1.7 (3)**	8 ± 4 (4)***
	30 × 1	2.9 ± 1.6 (3)**	43 ± 16 (3)***	9 ± 2 (4)***
rbc infected with CQ-sensitive strain of <i>P. berghei</i>	0	11 ± 1.7 (12)	133 ± 22 (14)	29 ± 3.7 (17)
	5 × 1	11 ± 2.9 (5)*	62 ± 1.7 (3)*	23 ± 8 (4)**
	20 × 1	10 ± 1.7 (6)*	54 ± 8 (4)***	20 ± 4 (4)***
rbc infected with CQ-resistant strain <i>P. berghei</i>	0	27 ± 7.9 (7)	513 ± 58 (5)	111 ± 16 (7)
	60 × 1	28 ± 2.6 (7)*	510 ± 51 (5)*	109 ± 16 (7)*

\* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$ . Number of experiments in the parentheses.

**感染约氏疟原虫的 rbc DNA 及 RNA 含量**  
正常小鼠每  $10^9$  rbc 中, 测得 DNA 底值相当于  $3.5 \pm 0.1 \mu\text{g}$  ( $n=7$ ), RNA 含量为  $21 \pm 1 \mu\text{g}$  ( $n=4$ ), 感染约氏疟原虫的小鼠, 每  $10^9$  感染的 rbc 含 DNA 及 RNA 分别为  $26 \pm 2$  及  $139 \pm 5 \mu\text{g}$  ( $n=4$ ) 感染约氏疟原虫的小鼠, im 氯喹  $60 \text{ mg/kg} \times 1$ , 20 h 后, 其 DNA 及 RNA 含量分别为  $25 \pm 2$  及  $141 \pm 20 \mu\text{g}$  ( $n=4$ ), 与未用药对照组比较, 含量基本不变。

**去除血样中 wbc 方法的比较** 经磺化乙基纤维素-葡聚糖凝胶 G 25 柱层析法<sup>(4,8)</sup>处理的血样, wbc 除得干净, rbc 得率高, 纤维素粉用量少, 目前被认为是一种较好的方法。感染疟原虫的血样与正常血样相比较, wbc 通常增加 3-7 倍, rbc 计数明显减少, 且脆弱, 易破碎, 血样极易发生溶血或凝血现象。尤以感染伯氏疟原虫的 rbc 更甚。处理时, 纤维素粉用量应适当增加。对于感染伯氏疟原虫的血样, 使用

口径较粗的层析柱为宜。我们选用的层析柱内径为 10 mm。

用上法处理感染约氏疟原虫血样的结果见表 2。用该法处理感染伯氏疟原虫、伯氏疟原虫抗氯喹株及诺氏疟原虫的血样, 结果同样满意。

用纤维素粉 CF-11 (Whatman) 柱层析法<sup>(9)</sup>, wbc 可除去 95% 以上, 但 rbc 得率较低 (表 3)。

**脱脂棉花柱层析方法:** 取 0.5 g 脱脂棉花处理 4 ml 正常血样, wbc 可除去 58% 左右, rbc 得率为 64%。如将脱脂棉花改为 1.5 g, 则 wbc 可除去 80% 左右, 但 rbc 得率却降为 30% 以下。

## 讨 论

由于药物动力学效应, 氯喹能积聚在感染疟原虫的 rbc 内, 其浓度远远高于血浆。氯喹的抗疟作用机制<sup>(2,3)</sup>各说不一, Konigk 等<sup>(10)</sup>

Tab 2. Removal of wbc in different conditions by SE-Cellulose and CF-11

Sample	Chromatography column				Blood Removal of		Recovery of		
	Infected rate(%)	SE-cellulose (mg)	Sephadex G-25 (mg)	Diameter (mm)	sample (ml)	wbc %	(n)	rbc %	(n)
Normal blood	0	80	200	5	1.0	96	6	78	6
<i>P. yoelii</i> -infected blood	46	90	200	5	1.0	95	2	73	2
	19	95	200	5	1.0	96	5	72	5
	19	100	200	5	1.0	97	3	73	3
	CF-11(g)								
Normal blood	0	2		10	4.0	95	13	56	11
<i>P. yoelii</i> -infected blood	37	3		10	4.0	98	6	61	6
	58	3		10	4.0	99	5	51	5

Tab 3. Removal of wbc in different conditions by CF-11 chromatography

Sample	Infected rate(%)	Chromatography column		Blood sample (ml)	Removal of wbc		Recovery of rbc	
		CF-11 (mg)	Diameter (mm)		%	(n)	%	(n)
Normal blood	0	2	10	4.0	95	13	56	11
<i>P. yoelii</i> -infected blood	37	3	10	4.0	98	6	61	6
	58	3	10	4.0	99	5	51	5

报道了氯喹、伯喹等抗疟药能抑制感染 *P. chabandi* 的小鼠 rbc 中 ODC 酶活力。我们的实验亦指出：感染约氏及伯氏疟原虫的小鼠，一次 im 氯喹 15, 30 mg/kg 及 5, 20 mg/kg, 20 h 后，除伯氏疟原虫组的 PTC 含量基本不变之外，约氏疟原虫组的 3 种多胺含量及伯氏疟原虫组的 SPD 和 SPM 含量均显著降低。这一结果支持了下述论点：氯喹的抗疟效果可能由于具有多胺结构，从而直接抑制了疟原虫的 ODC 酶活力，同时又影响了疟原虫的精脒合成酶和精胺合成酶的活力。最近， $\alpha$ -二氟甲基鸟氨酸 (DFMO)-ODC 酶的一种不可逆抑制剂被用来研究多胺代谢与疟原虫生长之间的关系<sup>(11,12)</sup>，结果表明 DFMO 可以降低感染疟原虫的 rbc 内多胺含量，同时使疟原虫的发育停止在滋养体阶段。所有这些实验都指出了多胺代谢与疟原虫的生长、发育有着极密切的关系。有趣的是，伯氏疟原虫抗氯喹株的 3 种多胺含量远较其氯喹敏感株为高，即使大剂量注射氯喹，多胺含量依然如故，始终维持在同一高水平上。这一现象更进一步说明了多胺在疟原虫的生化代谢过程中的重要性。

感染约氏疟原虫小鼠 im 氯喹后，取样测定 DNA 及 RNA，与未用药对照组相比较，两者含量基本不变。与此同时，取样测定多胺，则含量明显降低，提示可能氯喹在杀灭约氏疟原虫之前，先得抑制多胺代谢过程。而对 DNA 及 RNA 的影响看来并不是直接的。

血液中白细胞内含大量 DNA, RNA 及多胺物质<sup>(6)</sup>，其中精脒及精胺的含量分别比 rbc 高 200 及 450 倍，因此去除血样中的 wbc，在进行此项研究时是必不可少的。其方法有很多种，我们认为 Nakao 法简单方便、效率高，比常用的 CF-11 方法为佳。由于 rbc 感染疟原虫之后变脆，易破裂等原因，CF-11 对 rbc, wbc 选择性吸附力与磺化乙基纤维素不同，所以后者 rbc 回收率高。我们应用 Nakao 方法<sup>(4)</sup>处理正常小鼠血样，rbc 回收率达 78% 左右，当处理感染疟原虫的血样时，rbc 回收率基本不变

或略低，方法尚需改进。

## 参 考 文 献

- 1 Assaraf YG, Golenser J, Spira DT, Bachrach U. Polyamine levels and the activity of their biosynthetic enzyme in human erythrocytes infected with the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biochem* 1984; 222 : 815
- 2 Fitch CD. Mode of action of antimalarial drugs. In: Evered D, Whelan J, eds, *Malaria and the red cell, Ciba Foundation Symposium* 94. London : Pitman, 1983 : 222-32
- 3 Liquori AM, Costantino L, Crescenzi V, et al. Complexes between DNA and polyamines : A molecular model. *J Mol Biol* 1967; 24 : 113
- 4 Nakao M, Nakayama T, Kankura T. A new method for separation of human blood components. *Nature (New Biology)* 1973; 246 : 94
- 5 Seiler N. Use of the dansyl reaction in biochemical analysis. In : Glick D, ed. *Methods in biochemical analysis*; vol 18. NY: Interscience Publisher, 1970 : 259-337
- 6 Rennert OM, Shukla JB. Polyamines in health and disease. In: Campbell RA, Morris DR, Bartos D, Daves GD, Bartos F, eds. *Advances in polyamine research*; vol 2. NY : Raven Press, 1978 : 195-211
- 7 Homewood CA, Neame KD. A comparison of methods used for the removal of white cells from malaria-infected blood. *Ann Trop Med Parasitol*. 1976; 70 : 249
- 8 Howard RJ, Smith PM, Mitchell GF. Removal of leucocytes from red cells in *Plasmodium berghei*-infected mouse blood and purification of schizont infected cells. *Ibid* 1978; 72 : 573
- 9 Pasvol RJM, Wilson ME, Smalley, Brown J. Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Ibid* 1978; 72 : 87
- 10 Konigk E, Mirtsch S, Putfarken B, Abdel-Resoul S. *Plasmodium chabaudi*-infection of mice: effects of chloroquine and mefloquine. Inhibition of ornithine decarboxylase activity. *Tropenmed Parasitol* 1981; 32 : 73
- 11 Gillet JM, Bone G, Herman F. Inhibitory action of  $\alpha$ -difluoromethylornithine on rodent malaria (*Plasmodium berghei*). *Trans Roy Trop Med Hyg* 1982; 76 : 776
- 12 McCann PP, Bacchi CJ, Hanson WL, et al.

Effect on parasitic protozoa of  $\alpha$ -difluoromethylornithine an inhibitor of ornithine decarboxylase. In : Caldarera CM, Zappia V,

Bachrach U, eds. *Advances in polyamine research*; vol 3. NY: Raven Press, 1981: 97-110

*Acta Pharmacologica Sinica* 1987 Jan, 8 (1) : 63-68

## Effects of chloroquine on polyamines and nucleic acid of malaria parasites

HUANG Zuo-Yue, FU Xiu-Lan, WU Ke-Ying, WANG Ju-Jun

(Institute of Parasitic Diseases,<sup>1</sup> Chinese Academy of Preventive Medicine, Shanghai 200025)

**ABSTRACT** Three polyamines—putrescine (PTC), spermidine (SPD), and spermine (SPM)—are found ubiquitously in low concentrations in erythrocytes (rbc) of animals. When mice were infected with *P. yoelii* or *P. berghei*, the contents of polyamines rose sharply. The polyamine levels in rbc infected with chloroquine(CQ)-resistant strain of *P. berghei* were found to be PTC 27, SPD 513 and SPM 111 nmol/10<sup>9</sup> rbc, respectively. In contrast, the polyamine levels in *P. yoelii*-infected rbc were lower (PTC 10, SPD 102 and SPM 20 nmol/10<sup>9</sup> rbc). CQ inhibited the metabolism of polyamines in *P. yoelii* and CQ-sensitive strain of *P. berghei*, but not in CQ-resistant strain of *P. berghei*. After im CQ, the contents of DNA and RNA in malaria

parasites remained unchanged, even though the metabolism of polyamines were significantly affected. By the Nakao's method the recovery rate of rbc was higher (78%) and wbc was removed more effectively. Therefore, the Nakao's method was better than the conventional method using CF-11 chromatography.

**KEY WORDS** chloroquine; polyamines; putrescine; spermidine; spermine; *Plasmodium yoelii*; *Plasmodium berghei*; DNA; RNA

<sup>1</sup> WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai. Partial financial support was received from UNDP/World Bank/WHO TDR