中国药理学报　1987 年 9 月；8 (5)：460-464

13个化合物对伯氏疟原虫珠蛋白酶活性及游离氨基酸量的影响[1]

顾浩明、朱梅英、奚国良、陈润莲　（中国科学院上海药物研究所，上海 200031）

提要　以[^{3}H]珠蛋白为底物，试验了 13 个抗疟药和其他化合物对伯氏疟原虫珠蛋白水解酶活性的影响。结果表明蒿酯钠和磷酸咯啶 1 mmol/L，氯喹和常咯啉 10 mmol/L 都分别显示了一定的抑制作用，而 10-羟基喜树碱和 $FeCl_3$ 有较强的抑制作用。二氢青蒿素于 33 mmol/L 时对伯氏疟原虫内游离氨基酸量未见影响。

关键词　伯氏疟原虫；　蛋白酶抑制剂；　氨基酸；　抗疟药；　青蒿素；　氯喹；　抗肿瘤药；　羟基喜树碱

红内期疟原虫的生存必须依赖由消化血红蛋白所得氨基酸的不断供应，疟原虫内血红蛋白水解酶当是化疗攻击点之一。因此，近来已注意到以此为靶点来寻找新型抗疟药及研究抗疟药的作用机理[1]。本文则报道一些抗疟药对伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*)珠蛋白水解酶活性的影响。基于某些抗肿瘤药如甲氨蝶呤(MTX)等对疟原虫生长有抑制作用，从广筛角度考虑也试验了一些抗肿瘤药对该酶的作用。本实验还研究了二氢青蒿素(DHQ)对伯氏疟原虫内游离氨基酸量的影响。

材料和方法

药品　DHQ，蒿甲醚(AM)，硝喹(NQ)，均先溶于二甲基甲酰胺(DMF)，然后以 pH 7.4 无酚红 Hanks 液(氨基酸测定实验中 DHQ 用无 Ca^{2+} Krebs 液)稀释后供试验。下列化合物直接用 pH 7.4 无酚红 Hanks 液配制：常山乙素(Di-β)、磷酸咯啶(Pyr)、磷酸氯喹(CQ)、磷酸伯喹(PQ)及 $FeCl_3$(AR)。10-羟基喜树碱(HC)、高三尖杉酯碱(HH)、甲氨蝶呤(MTX)及阿糖胞苷(Ara-C)系配就的水溶液、再用 pH 7.4 无酚红 Hanks 液稀释。蒿酯钠(AS)为临用前用青蒿酯加等 mol 量的 5% $NaHCO_3$ 液使溶后，以 pH 7.4 无酚红 Hanks 液稀释而成。常咯啉(CRL)配制时加 4 倍 mol 量的柠檬酸使溶，再以 pH 7.4 无酚红 Hanks 液稀释。以上新药的化学结构式见图 1。

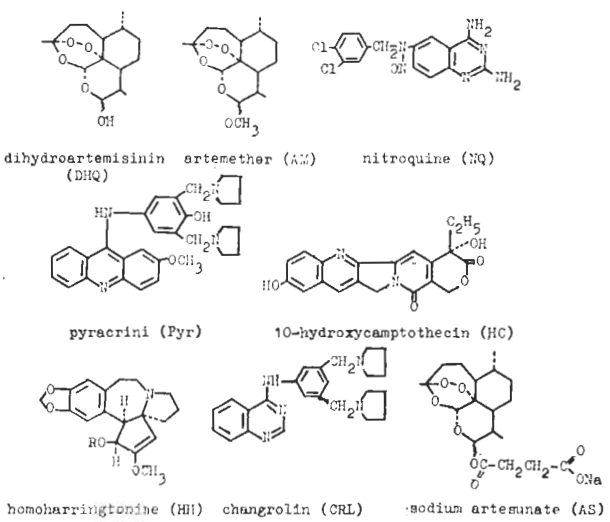

Fig 1. Chemical structures of the drugs used in this study

珠蛋白酶活性抑制试验　酶液(从伯氏疟原虫提取)及底物[^{3}H]珠蛋白均按文献(2)制备。反应液先由 150 μl(pH 7.4)无酚红 Hanks 液，50 μl 酶液及 50 μl 各种不同浓度药液于 37℃ 温育 30 min，然后每管加入 50 μl 预温的[^{3}H]珠蛋白液 2.65 kBq，继续保温 90 min，以后操作除表 1 注中另有说明外，其余均同文献(2)。

药物对 ^{3}H 的淬灭试验　凡经试验对酶活性具有显著抑制作用者均作放射性淬灭试验，以排除可能由此引起的假阳性结果。操作与上述不同者在于加三氯醋酸(TCA)停止反应后再加入各种不同浓度药物。

1986 年 2 月 20 日收稿　1986 年 12 月 16 日修回
[1]全国青蒿素研究指导委员会给予资助

Abbreviations: AM = artemether, Ara-C = cytarabine; AS = sodium artesunate; CQ = chloroquine; CRL = changrolin; DHQ = dihydroartemisinin; Di-β = β-dichroine; DMF = dimethyl formamide; HC = 10-hydrocamptothecin; HH = homoharringtonine; MTX = methotrexate; PQ = primaquine; Pyr = pyracrini.

原虫感染细胞内游离氨基酸试验 参照文献(3)加以改变. 取感染伯氏疟原虫N株(引自上海寄生虫病研究所)小鼠,眼球取血、肝素抗凝, 感染率为9%, 850×g离心去血浆, 以无Ca^{2+}Krebs液旋洗两次后用无Ca^{2+}Krebs液配成红细胞$100\times10^4/mm^3$的悬液. 每管内加1 ml悬液, 0.2 ml DHQ液或含等量DMF的对照液, 37℃振荡(120次/min), 保温4 h,加1.2 ml 10%TCA,摇匀, 10 min后于450×g离心10 min,取上清液加等体积乙醚抽提,保留水相,重复上述乙醚抽提3次.取50 μl水层于LKB 4400氨基酸自动分析仪测定各个氨基酸含量.

结　　果

对珠蛋白水解酶活性的影响 从表1可见青蒿素类化合物中的DHQ及AM浓度达0.1 mmol/L时尚无抑制作用.由于DHQ和AM不溶于水.为提高其浓度, 必须将助溶剂DMF的浓度提高到17%, 而如此高浓度的DMF本身对酶活性已有明显抑制作用. 青蒿素类化合物中的水溶性药物AS亦须1 mmol/L才显示对酶活性有抑制作用. 所试喹啉类药物中CQ达10 mmol/L时才有明显抑制作用.Pyr 1 mmol/L本身对^3H液闪计数虽有影响(表2). 但与药

Tab 1. Effects of the drugs on activity of globinase from *Plasmodium berghei* (n=4, $\bar{x}\pm SD$). *p>0.05, **p<0.05, ***p<0.01 *vs* blank solution; ‡ p>0.05 *vs* 17% DMF

Drug	(mmol/L)	Enzyme	Radioactivity released (dpm) With drug	Radioactivity released (dpm) Without drug	Inhibition rate%
DMF	17%(vol/vol)	RCE_3	937±58***	2757±188	66
	1.7%(vol/vol)	RCE_3	2559±59*	2757±188	
DHQ	1″	RCE_3	1016±51***	2757±188	63‡
	0.1†	RCE_3	2510±210*	2757±188	
AM	1″	RCE_3	801±117***	2757±188	71‡
	0.1†	RCE_3	2595±63*	2757±188	
AS	1	RCE_7	413±90***	2388±82 §	83
	0.1	RCE_7	2662±602*	2388±82 §	
CQ	10	RCE_7	1789±58***	2666±213 §	33
	1	RCE_3	2778±169*	2757±188	
PQ	10	ANKAE	2830±152*	2513±259	
NQ	0.01†	RCE_7	2162±239*	2388±82 §	
Pyr	1	RCE_3	1345±142***	2666±213 §	44
	0.1	RCE_3	2659±77*	2757±188 §	
CRL	10	RCE_7	1861±71***	2666±213 §	30
	1	RCE_7	2328±197*	2666±213 §	
Di-β HC	0.67	RCE_7	2463±455*	2388±82 §	
	0.46	RCE_7	−22±77***	4456±574	100.5
	0.046	RCE_7	1412±67***	2388±82 §	41
HH	0.3	RCE_7	2013±279**	2388±82 §	16
MTX	0.37	RCE_7	4616±214*	4456±574	
Ara-C	0.68	RCE_7	5114±515*	4456±574	
$FeCl_3$	10	RCE_7	−233±115***	4456±574	105
	1	RCE_7	2687±228***	4456±574	40

″ The solution contained 17%(vol/vol) DMF for solubilizing.

† The solution contained 1.7%(vol/vol) DMF for solubilizing.

RCE_3 was prepared by the method with 0.2% saponin and contained the amount of globinase from 72 millions of rbc infected with chloroquine-resistant strain of *Plasmodium berghei*/50 μl; ANKAE was prepared by the method with 2% saponin and contained the amount of globinase from 121 millions of rbc infected with ANKA strain of *Plasmodium berghei*/50 μl; RCE_7 was prepared by the method with 2% saponin and contained the amount of globinase from 32 millions of rbc infected with chloroquine-resistant strain of *Plasmodium berghei*/50 μl.

§ In these groups, 0.2 ml supernatant was taken after centrifugaion and mixed with 8 ml of scintillating solution.

物反应组(表 1)相比仍有显著差异，说明药物对酶活性仍有作用. 所试抗肿瘤药物中 HC 显示了较强的抑制作用. 高三尖杉酯碱也有一定的抑制作用.

Tab 2. Effects on ^3H scintillation counting of the drug with remarkable inhibition rates in Tab 1 ($n=4, \bar{x}\pm SD$). *$p>0.05$, **$p<0.05$, ***$p<0.01$ *vs* the value in "without drug".

Drug	(mmol/L)	Radioactivity released (dpm)†	
		With drug	Without drug
AS	10	2290±214**	2666±213 §
	1	2227±196*	2388±82 §
	0.1	2489±455*	2388±82 §
CQ	10	2485±570*	2666±213 §
Pyr	1	2000±271***	2666±213 §
CRL	10	2573±453	2666±213 §
HC	0.46	4299±509*	4456±574
	0.046	2469±246*	2388±82 §
HH	0.3	2221±217*	2388±82 §
$FeCl_3$	10	4529±648*	4456±574
	1	4460±254*	4456±574

† The enzyme used was RCE_7. § Same as the note in Tab 1.

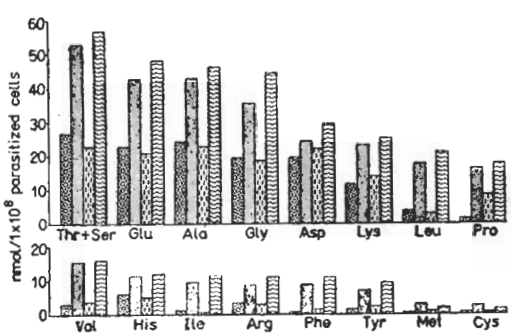

Fig 2. Effects of incubation with or without DHQ on the amounts of free amino acids in *Plasmodium berghei*. In each set of bars from left to right: 1st, before incubation & with DHQ; 2nd, after incubation & with DHQ; 3rd, before incubation & without DHQ; 4th, after incubation & without DHQ.

感染红细胞内游离氨基酸测定 图 2 表示一次实验的结果，可见含量较高的游离氨基酸为 Ala, Asp, Glu, Thr 和 Gly；中等含量者为 Lys, Pro, His, Arg, Val, Leu, Tyr, Ile, Phe 和 Ser；含少量者为 Met 和 Cys(注：本分析条件下，Asn 水解为 Asp，Gln 水解为 Glu，图 1 中 Thr 和 Ser 未分开，实验表明 Thr 和 Ser 的比例为 11.6:1). 感染细胞经 37℃ 温育 4 h 前后，大多数游离氨基酸都升高，而 DHQ 33 μmol/L 作用 4 h 对氨基酸量未见明显影响.

讨　论

青蒿素类化合物对疟原虫细胞系统蛋白质合成有抑制作用[4]，且较对核酸合成的抑制作用[5]出现更早. 然而，此类药物在无细胞蛋白质合成系统中对蛋白质合成并未显示抑制作用(顾浩明等，待发表资料). 青蒿素类药物发挥抗疟作用的浓度很低[6]，本实验表明治疗浓度的青蒿素类药物对疟原虫珠蛋白酶和游离氨基酸水平均未显示明显的抑制作用，提示此类药物抗疟作用的原发环节均不在上述部位，而应从其它代谢环节考虑.

本研究表明，当 CQ 于 1 mmol/L 时对伯氏疟原虫珠蛋白酶活性没有抑制作用. 文献(7-9)亦报道，用此浓度的 CQ 对疟原虫虫提得的血红蛋水解酶活性未显示抑制作用. 而 CQ 在敏感株原虫感染的红细胞内的浓度约为 0.1 mmol/L[10]. 这些事实都说明 CQ 的抗疟作用环节不象是对血红蛋白水解酶的直接抑制. Sherman 等[9]报道 Fe^{3+} 10 mmol/L 可完全抑制从疟原虫中提得的组织蛋白 D 样酶的活性. 本实验结果表明 Fe^{3+} 1 mmol/L 对珠蛋白酶活性已有 40% 的抑制. 那么高铁原卟啉 IX(FP)对血红蛋白水解酶活性的抑制作用有可能与其中 Fe^{3+} 部分有牵涉. CQ 和 FP 的结合可以阻碍 FP 掩蔽[11]，这种作用除了对 FP 的膜毒性[11]有增强作用外，是否对血红蛋白水解酶的抑制亦有增强作用，值得研究.

引人注意的是 HC 对疟原虫珠蛋白酶有较强的抑制作用，后又进行了鼠疟的体内药效筛选，结果表明有一定的疗效(顾浩明等，待发表资料)，这为合成新型抗疟药设计提供了线索.

致谢 朱明康和花泽协助同位素计数. 李英、杨金龙、田载杨、张秀平提供试药.

参 考 文 献

1 Scheibel LW, Bueding E, Fish WR, Hawkins JT. Protease inhibitors and antimalarial effects. In: Eaton JW, Brewer GJ, eds. *Malaria and the red cell*. 1st ed. NY: Alan R Liss, 1984 : 131-41

2 朱梅英、顾浩明. 用小鼠 [^{3}H] 珠蛋白作底物法测定伯氏疟原虫珠蛋白酶活性. 中国药理学报 1987; 8 : 351

3 Cenedella RJ, Rosen H, Angel CR, Saxe LH. Free amino-acid production *in vitro* by *Plasmodium berghei*. *Am J Trop Med Hyg* 1968; 17 : 800

4 Gu HM, Warhurst DC, Peters W. Rapid action of qinghaosu and related drugs on incorporation of [^{3}H]isoleucine by *Plasmodium falciparum in vitro*. *Biochem Pharmacol* 1983; 32 : 2463

5 Li ZL, Gu HM, Warhurst DC, Peters W. Effects of qinghaosu and related compounds on incorporation of [G-^{3}H] hypoxanthine by *Plasmodium falciparum in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77 : 522

6 管惟滨、黄文锦、周元昌、龚建章. 青蒿素及其衍生物对体外培养恶性疟原虫的作用. 中国药理学报 1982; 3 : 139

7 Aissi E, Charet P, Bouquelet S, Biguet J. Endoprotease in *Plasmodium yoelii Nigeriensis*. *Comp Biochem Physiol* 1983; 74 **B** : 559

8 Gyang FN, Poole B, Trager W. Peptidases from *Plasmodium falciparum* cultured *in vitro*. *Mol Biochem Parasitol* 1982; 5 : 263

9 Sherman IW, Tanigoshi L. Purification of *Plasmodium lophurae* cathepsin D and its effects on erythrocyte membrane proteins. *Ibid* 1983; 8 : 207

10 Homewood CA, Warhurst DC, Peters W, Baggaley VC. Lysosomes, pH and the antimalarial action of chloroquine. *Nature* 1972; 235 : 50

11 McChesney EW, Fitch CD. 4-Aminoquinolines. In : Peters W, Richard WHG, eds. *Antimalarial drug II*. Berlin : Springer, 1984 : 42-51. (Born GVR, Farah A, Herken H, Welch AD, eds. *Handbook of experimental pharmacology* ; vol 68/II)

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Sep; **8** (5) : 460-464

Effects of 13 compounds on activity of globinase and amounts of free amino-acids in *Plasmodium berghei*

GU Hao-Ming, ZHU Mei-Ying, XI Guo-Liang, CHEN Run-Lian

(*Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031*)

ABSTRACT The activity of globinase from *Plasmodium berghei* was determined by a radiometric method using [^{3}H]globin of mice as substrate. Nine antimalarials (dihydroartemisinin DHQ, artemether AM, chloroquine CQ, primaquine PQ, nitroquine NQ, pyracrini Pyr, changrolin CRL and β-dichroine Di-β), four antineoplastics (10-hydrocamptothecin HC, homoharringtonine HH, methotrexate MTX and cytarabine Ara-C), and $FeCl_3$ were tested on their capacities to inhibit the proteolysis in the above model system. The results showed that AS, Pyr, CQ and CRL exhibited inhibitory effects on the proteolysis at 1,1,10 and 10 mmol/L, respectively, but not at the lower concentrations, suggesting that the mode of antimalarial action of these drugs is not by inhibiting the globinase.

Since Fe^{3+} 1 mmol/L inhibited the proteolysis, the ferri-portion of ferriprotoporphyrin IX (FP) may be responsible for the inhibition of the proteolysis. CQ did not inhibit the proteolysis at 1 mmol/L that was much higher than its effective concentration against malaria parasites, but the binding of

CQ to FP might hinder FP sequestration.

HC showed a strong inhibition on the proteolysis, that may be a clue to search for the antimalarials with novel structures.

The levels of free amino-acids in *P berghei* were not affected by DHQ 33 μmol/L after incubation *in vitro* at 37℃ for 4 h.

KEY WORDS *Plasmodium berghei*; globin; protease inhibitors; amino acids; antimalarials; artemisinin; chloroquine; antineoplastic agents; 10-hydroxycamptothecin

* * * * * *