

- 8 Gong LS, Shen XY, Ding H, *et al*. Plasma thromboxane B₂ and 6-keto-prostaglandin F_{1α} concentrations in patients with essential and renovascular hypertension. *Chin J Cardiol* 1986; 14: 23
- 9 Shen XY, Gong LS, Ding HY, *et al*. Changes of circulatory thromboxane B₂ and 6-keto-prostaglandin F_{1α} in acute myocardial infarction. *Chin J Intern Med* 1987; 26: 333
- 10 Fang YX, Shen N, Chen X. Beneficial changes in prostacyclin and thromboxane A₂ by ginsenosides in myocardial infarction and reperfusion injury of dogs. *Acta Pharmacol Sin* 1986; 7: 226

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1991 May; 12 (3) : 266-268

二氟甲基鸟氨酸对约氏疟原虫孢子增殖期作用的超微结构观察

黄复生, 王兴相 (第三军医大学寄生虫学教研室, 重庆 630038, 中国)

Effect of α-difluoromethylornithine on sporogony of *Plasmodium yoelii*

HUANG Fu-Sheng, WANG Xing-Xiang
(Department of Parasitology, The Third Military Medical College, Chongqing 630038, China)

ABSTRACT The effect of α-difluoromethylornithine (DFMO) on the sporogony of *P. yoelii* was studied by electron microscopy. DFMO sugar solution was fed to ♀ mosquitoes. Scanning electron microscopy (SEM) revealed that the oocysts were smaller and the surface of oocysts was uneven as compared with control. Transmission electron microscopy (TEM) showed that cytoplasm of the affected oocysts contained vacuoles and the multilamellate structures increased. The number of matrix cavitations and deformations of mitochondria increased. Nuclear membrane was damaged. The number of autophagocytic vacuoles increased. The membrane system was markedly affected.

KEY WORDS antimalarials; α-difluoromethylornithine; *Plasmodium yoelii*; *Anopheles stephensi*; electron microscopy

提要 感染鼠疟原虫的斯氏按蚊吸食含 1% DFMO 糖水后, 扫描电镜观察表明: 卵囊个体变小, 表面遍布凹陷; 透射电镜显示胞浆空泡化, 多层膜样结构增

多, 线粒体空泡变, 核膜肿胀, 消失, 白噬泡较多, DFMO 对卵囊膜系统影响较为显著。

关键词 抗疟药; α-二氟甲基鸟氨酸; 约氏疟原虫; 斯氏按蚊; 电子显微镜检查

二氟甲基鸟氨酸 (difluoromethylornithine, DFMO) 是鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 活化的抑制剂, 迅速减少多胺的生物合成, 这已证明是有效的化疗手段, 并已广泛应用于锥虫病等⁽¹⁾ 的防治, 在防治疟疾方面也有多种作用, 不但能减少和抑制红内期裂体增殖速度⁽²⁾, 而且可抑制红外期⁽³⁾, 蚊期的发育⁽⁴⁾, 但该药对蚊期的电镜观察尚未见报道。作者通过蚊吸饲含 DFMO 糖水后不同时间卵囊的超微结构变化, 探索其作用机理。

MATERIALS AND METHODS

约氏疟原虫 (*Plasmodium yoelii*) BY 265 株每周用昆明株小鼠血传一次, 每 5 wk 内蚊传一次, 昆明株小鼠由校动物所供给, 体重 16 ± SD 2 g, 斯氏按蚊 (*Anopheles stephensi*) Hor 株, 常规饲养。

DFMO (MDL 71, 782A, eflornithine HCl) 由美国 Merrell Dow Research Institute

Received 1990 Apr 28

Accepted 1991 Mar 14

提供, 用 10% 的蔗糖水配成 1% 的浓度。

蚊媒分组及给药 取保种鼠血, 按常规腹腔接种健康小鼠, d 3 后, 选择 4 只含有一定数量配子体的小鼠为阳性供血鼠, 供 4 d 龄 400 只♀斯氏按蚊吸血 1.5 h, 血餐当日为 d₀。将饱血后♀蚊随机分二组即正常对照组和用药组, 前者仅喂饲 10% 蔗糖水, 后者则饲以含 1% DFMO 的蔗糖水, 每日更换糖水。上述蚊均置于 24–25℃, 相对湿度 70–80% 养蚊室中。

蚊胃电镜样品制备及观察 蚊虫于感染后 d 7, 9, 11, 置于含 4% 蔗糖和 1.25% 戊二醛溶液中解剖, 蚊胃以 2.5% 戊二醛固定, 乙醇系列脱水, CO₂ 临界点干燥, 喷金等, 用日本 JEOL-JSM-T 300 型扫描电镜观察。d 7, 9, 11 的蚊胃置于 2% 戊二醛和 2% 鞣酸内, 1% 钨酸后固定, 脱水, 包埋, 切片, 用日立 H-300 型透射电镜观察。

RESULTS

扫描电镜观察

1 正常对照组 通过 30 多个感染蚊胃观察, 卵囊分布一般较均匀, 但感染重的卵囊大小不一, 发育程度有异。7 d 龄卵囊外表一般较光滑, 圆球形, 呈未分化状, 少数卵囊略显不平(Fig 1 A, Plate 3), 大小为 $16.8 \pm 2.3 \mu\text{m}$ 。11 d 龄成熟卵囊表面皱褶状, 有的卵囊表面有大小不等的小孔, 囊壁凹陷, 囊内无物, 可能为释放子孢子后微陷, 皱缩(Fig 1 B, Plate 3), 大小为 $26.1 \pm 2.5 \mu\text{m}$ 。

2 DFMO 作用后变化 通过 30 多个蚊胃观察, 与对照组同日龄相比, 个体较小。7 d 龄卵囊数量减少, 个体较小, 大小为 $13.2 \pm 2.3 \mu\text{m}$, 与对照组相比, 有显著性差异, 其它无明显变化(Fig 1 C, Plate 3)。11 d 龄卵囊仍呈球形, 但表面布满杯状凹陷或不规则形状, 卵囊变化率达 80%, 显示囊内容物固缩所致, 其大小为 $17.1 \pm 2.6 \mu\text{m}$, 与对照组有显著

性差异, 未见表面有小孔的卵囊(Fig 1 D, Plate 3)。

透射电镜观察

1 正常对照组 7 d 龄卵囊膜清楚, 膜内缘有散在小突起, 胞内结构清晰, 大量细胞核分散于胞浆内, 核膜完整, 可见线粒体, 核蛋白体, 内质网, 糖元体等(Fig 1 E, Plate 3)。11 d 龄卵囊已发育成熟, 可见大量子孢子, 核呈长形, 可见棒状体, 微线体等, 表膜分二层, 内层下可见膜下微管(Fig 1 F, Plate 3)。

2 DFMO 作用后变化 7 d 龄卵囊胞浆内出现许多条形或环形式裂隙, 整个胞浆密度较均匀, 核、线粒体、内质网、核膜结构不清, 难以辨认, 核糖体稀疏, 囊壁下出现一些类似疟色素的电子致密物质和空泡, 在裂隙部位出现多层膜样结构, 髓鞘样结构(Fig 1 G, Plate 4)。线粒体空泡变, 基质密度不均, 有环形内质网及密度较深, 不规则的团块, 可能为变性内质网形成(Fig 1 H, Plate 4)。9 d 龄卵囊裂隙部位明显可见多层膜样结构, 胞浆内有密度较深的嗜银小体, 核膜明显肿胀, 增生, 核基质呈灶性聚集, 密度不均, 线粒体空泡变, 内质网少, 膜性结构增多(Fig 1 I, Plate 4)。11 d 龄卵囊内缘有分布很广黑色团块样物质, 胞浆空泡化, 膜性结构明显增多, 核膜肿胀或消失, 自噬泡内可见较多密度较深的颗粒, 多核糖体解聚, 线粒体数量增多但变小, 固缩, 基质密度降低(Fig 1 J, Plate 4)。线粒体变形, 有的基质密度降低, 有的增加, 腔内嵴结构不清(Fig 1 K, Plate 4)。少数卵囊内可见形态异常的子孢子, 胞浆内结构不清, 未见棒状体, 微线体, 在亚端位, 虫体向外隆起, 电子密度明显降低(Fig 1 L, Plate 4)。

DISCUSSION

本实验结果从超微结构方面表明 DFMO 主要作用于蚊卵囊膜系统中的内质网, 线粒体, 核膜等, 使得约氏疟原虫孢子增殖期的发

育受到抑制, 该结果与 Gillet *et al*⁽⁴⁾对伯氏疟原虫的观察结果是一致的。

DFMO 作用后, 卵囊中内质网数量减少, 受损或退变, 使得蛋白质合成受到影响, 卵囊发育受阻。含有细胞色素氧化酶, 具有线粒体功能的多层膜样结构⁽⁵⁾增多, 可能是 DFMO 作用后内质网或线粒体重叠形成的, 是一种退化性表现。至于线粒体数量增多, 变小, 可能是膜系统受损后的一种代偿性反应, 而线粒体的空泡变或变形可为药物作用的结果⁽⁶⁾, 线粒体的固缩退变使细胞生物氧化, 能量代谢受到影响, 阻碍了嘧啶的合成⁽⁷⁾。

DFMO 作用晚期, 主要由于胞浆内膜性成份受损和退变, 卵囊内形成大量自噬泡以清除变性成份, 个别卵囊内虽可见到子孢子, 但形态异常, 本实验结果表明: DFMO 抑制和阻断了疟原虫的孢子增殖。

ACKNOWLEDGMENTS 本实验得到广州中山大学生物系伦照荣老师, 本校陈聪连副教授, 陈志强同志, 电镜室诸同志的帮助。

REFERENCES

1 Bacchi CJ, Nathan HC, Clarkson AB Jr, *et al*.
Effects of the ornithine decarboxylase inhibitors

DL- α -difluoromethylornithine and α -mono-fluoromethyldehydroornithine methyl ester alone and in combination with suramin against *Trypanosoma brucei brucei* central nervous system models. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36: 48

2 Bitonti AJ, McCann PP, Sjoerdsma A. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*: effects of ornithine decarboxylase inhibitors on erythrocytic schizogony. *Exp Parasitol* 1987; 64: 237

3 Hollingdale MR, McCann PP, Sjoerdsma A. *Plasmodium berghei*: inhibitors of ornithine decarboxylase block exoerythrocytic schizogony. *Exp Parasitol* 1985; 60: 111

4 Gillet JM, Charlier J, Bone G, Mulamba PL. *Plasmodium berghei*: inhibition of the sporogonous cycle by α -difluoromethylornithine. *Exp Parasitol* 1983; 56: 190

5 Aikawa M. Variations in structure and function during the life cycle of malarial parasites. *Bull WHO* 1977; 55: 139

6 Giffin BF, McCann PP. Physiological activation of the mitochondrion and the transformation capacity of DFMO induced intermediate and short stumpy bloodstream form trypanosomes. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40: 487

7 Prapunwattana P, O'Sullivan WJ, Yuthavong Y. Depression of *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase activity in *in vitro* culture by tetracycline. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 27: 119

~~~~~

**UNESCO Regional Seminar on Chemistry of Bioactive Natural Products**

1991 Nov 6-8

Shanghai

Please contact Professor XU Ren-Sheng, Chairman, Department of Phytochemistry, Shanghai Institute of Materia Medica, 319 Yue-yang Road, Shanghai 200031, China. Fax: 86-21-437-0269. Telephone: 431-1833. Telex: 33275 CASS CN. Telegram: 3434.