

硝喹对体外培养鼠约氏疟原虫红内期蛋白质合成的影响¹

周世文、胡友梅 (第三军医大学药理教研室, 重庆 630038, 中国)

Effect of nitroquine on protein synthesis of *Plasmodium yoelii* in vitro

ZHOU Shi-Wen, HU You-Mei (Department of Pharmacology, Third Military Medical College, Chongqing 630038, China)

ABSTRACT The erythrocytic stages of *Plasmodium yoelii* (BY 265 strain) were incubated with nitroquine ($0.2 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1} - 20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), cycloheximide ($0.1-10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and aminopterin ($0.2 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1} - 20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) during 8 h in vitro. The results showed that the incorporation of [³H]-isoleucine into the protein by *Plasmodium yoelii* was inhibited by nitroquine ($0.2 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and cycloheximide ($0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), the inhibitory effect of nitroquine ($\text{IC}_{50} = 0.16 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) was 397 times higher than that of cycloheximide ($\text{IC}_{50} = 63.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$). However, the incorporation of [³H]isoleucine into protein was not affected during at least 8 h of exposure to aminopterin ($20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). The results suggest that the inhibition of protein synthesis by nitroquine is one of the mechanisms of the early antimalarial action.

KEY WORDS nitroquine; cycloheximide; aminopterin; *Plasmodium yoelii*; protein synthesis inhibitors; isoleucine

摘要 体外培养鼠约氏疟原虫红内期与药物共同温育, 以[³H]异亮氨酸掺入疟原虫蛋白质作指标, 观察硝喹、放线菌酮和氨基蝶呤对疟原虫蛋白质合成的影响。结果发现, 硝喹和放线菌酮对疟原虫蛋白质合成均有明显抑制作用, 氨基蝶呤在 8 h 内对疟原虫蛋白质合成无明显影响。提示硝喹对疟原虫蛋白质合成的抑制是其早期抗疟机制之一。

关键词 硝喹; 放线菌酮; 氨基蝶呤; 约氏疟原虫; 蛋白质合成抑制剂; 异亮氨酸

Received 1989 Jan 24

Accepted 1991 Feb 4

¹ This paper was read before at the 5th Southeast Asian and Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists, Beijing, 1988 Jul 4-8

硝喹对疟原虫生活周期中多个环节均有明显的抑制作用⁽¹⁻³⁾。关于硝喹的抗疟机制, 前曾认为是抑制了二氢叶酸还原酶, 干扰疟原虫叶酸代谢^(4,5), 进而影响其 DNA 的合成, 阻止疟原虫核分裂而抑制疟原虫的生长与发育⁽⁶⁾。但是, 对乙胺嘧啶有抗性的虫株, 对硝喹却很敏感⁽⁴⁾。提示硝喹的抗疟机制可能与乙胺嘧啶有一定的区别, 还可能通过其它途径干扰疟原虫的生长发育。本实验采用短时间体外培养鼠约氏疟原虫 (*Plasmodium yoelii*, *yoelii*, BY 265 株) 红细胞内期的方法和放射性核素技术, 用放线菌酮和氨基蝶呤作对照, 观察硝喹对疟原虫蛋白质合成的影响, 以进一步探讨硝喹的抗疟机制。

MATERIALS AND METHODS

约氏疟原虫, 血传 80-100 代, 从第四军医大学寄生虫教研室引进。昆明株小鼠, 体重为 $20.5 \pm \text{SD } 0.5 \text{ g}$, ♀♂ 兼用。硝喹 (nitroquine, 化学名为 2,4-二氨基-[N-亚硝基-(3,4-二氯苄基)-氨基]喹啉, 上海医药工业研究院合成)。放线菌酮 (cycloheximide) 与氨基蝶呤 (aminopterin, 化学名为 4-氨基叶酸) 均为 Fluka 产品。RPMI-1640 培养基, 日水制药株式会社产品。[³H]异亮氨酸, 北京原子能研究院同位素研究室标记, 放射性活度为 $37 \text{ GBq} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

1640 培养基基本上按常规方法配制^(7,8), 略有改变, 即临用前每 10 ml 不完全 RPMI-1640 培养基加入 1.1 ml AB 型人血清, 现改为加入 1.1 ml 灭活小牛血清代替。

疟原虫的感染和血液标本的制备 疟原虫感染采用小鼠腹腔定量接种方法进行, 于接种后 3-5 d, 选用疟原虫感染率 15%-20%,

环状体 30%以上者, 多只小鼠经眼眶取血, 合并收集于同一肝素抗凝试管中, 经 $850 \times g$ 离心 10 min, 弃血浆和棕黄色层, 加入等容量不完全培养基, 离心洗涤两次, 沉淀再加完全培养基使之成为红细胞悬液, 进行疟原虫计数, 用完全培养基稀释成 $2 \times 10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$ 感染红细胞悬液备用。

体外培养 每只 5 ml 三角烧瓶中含稀释血 0.5 ml (约 1×10^8 个疟原虫); 不同浓度的硝喹、放线菌酮和氨基蝶呤; $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸为 370 kBq, 每个标本最终容量为 2 ml。每批实验均设不加药物的感染疟原虫的红细胞作为对照, 疟原虫培养采用 37℃ 蜡烛缸法⁽⁸⁾。在观察量-效反应时, 药物与疟原虫一起培养 4 h 后加入 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸, 然后再继续培养 4 h, 以避免所试药物的作用与 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸参入疟原虫的快慢不同而影响药物的量-效关系。在观察时-效反应时, 则在 0 时即加入药物和 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸, 分别于培养开始后 30 min, 1, 2, 4, 8 h 的不同时间内取样 2 ml, 立即置于冰中以终止反应。

蛋白质提取和放射性测定 蛋白质的提取基本采用 HAc: EtAc: H_2O_2 沸水消化法⁽⁹⁾。提取完毕时的样品总容量为 1 ml, 每个标本各取 0.1 ml, 分别加入预先置有 2 ml 乙二醇乙醚的闪烁杯内, 再加入闪烁液(用甲苯配制, 含 PPO 0.5%, POPOP 0.2%)5 ml, 静置 1-2 h, 用双道液闪计数器(FJ-2101G 型, 由西安二六二厂生产)测定 dpm 值。

统计处理 实验数据用方差分析处理, 并用 FLSD (F-protected least significant difference) 检验, 对相关组数据进行组间比较。

RESULTS

$[^3\text{H}]$ 异亮氨酸参入疟原虫和正常红细胞蛋白质 在培养 8 h 过程中, $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸参入疟原虫蛋白质的量随培养时间延长而增加, 呈明显的时间依赖性, 其 dpm 值能满足本实验

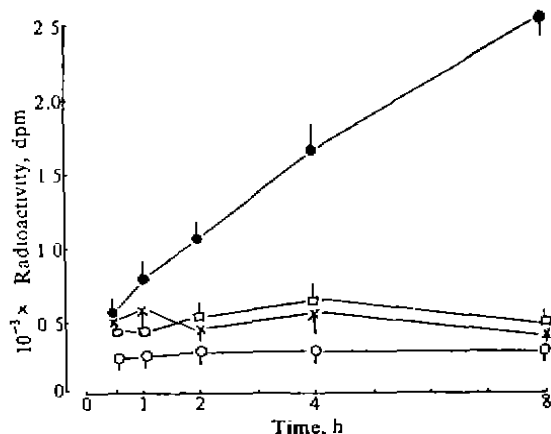


Fig 1. Incorporation of $[^3\text{H}]$ isoleucine into protein of normal RBC (O) and *Plasmodium yoelii* (●). Effects of nitroquinone (x) and cycloheximide (□) on incorporation of $[^3\text{H}]$ isoleucine by *Plasmodium yoelii*. $n=5$, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

的要求。 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸也能参入正常红细胞, 但参入量很少, 与培养时间关系不大(Fig 1)。

硝喹、放线菌酮和氨基蝶呤对 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸参入疟原虫蛋白质的影响 硝喹 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 在体外与疟原虫接触 1 h, 能明显抑制 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸参入疟原虫蛋白质(抑制率为 $18.8 \pm 1.4\%$, $P < 0.05$); 放线菌酮 $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 在体外与疟原虫作用 30 min 即能显著减少 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸参入疟原虫蛋白质(抑制率为 $12 \pm 6\%$, $P < 0.05$)。两种药物的抑制效应均随药物作用时间延长而增强, 药物与疟原虫共同孵育 8 h 时, 硝喹组的抑制率为 $85 \pm 4\%$, ($P < 0.01$), 放线菌酮组抑制率为 $83.1 \pm 2.4\%$, ($P < 0.01$, Fig 1)。在 30 min 到 1 h 内, 放线菌酮 $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对疟原虫蛋白质的抑制作用比 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝喹快, 其余各相应时间组之间无显著差异。

硝喹和放线菌酮分别从 $0.2 \text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.1 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 起即能明显减少 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸参入疟原虫蛋白质(硝喹组抑制率为 $12.8 \pm 2.6\%$, $P < 0.05$, 放线菌酮组抑制率为 $19 \pm 6\%$, $P < 0.01$)。两药的抑制效应均随药物浓

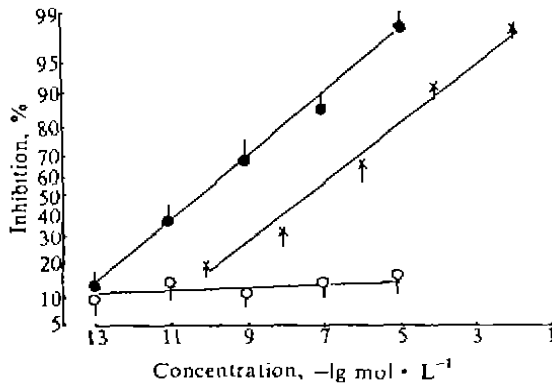


Fig 2. Effects of nitroquine (●), cycloheximide (x), aminopterin (○) on incorporation of $[^3\text{H}]$ isoleucine into proteins by *Plasmodium yoelii*. $n=5$, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

度增加而增强，在药物浓度分别 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，几乎全部抑制 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸的参入(硝喹组抑制率为 $97.8 \pm 2.2\%$, $P < 0.01$, 放线菌酮组抑制率为 $98.3 \pm 1.7\%$, $P < 0.01$)。两种药物抑制 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸参入的浓度相差很大，根据量-效反应求 IC_{50} ，硝喹为 $0.16 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，放线菌酮为 $63.5 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，硝喹的强度是放线菌酮的 397 倍。氨基蝶呤 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸参入疟原虫蛋白质无明显影响(Fig 2)。

最大受试浓度($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的硝喹，在时效反应和量效反应的 8 h 这同一个时间点上，对 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸参入疟原虫蛋白质的抑制率分别为 $85 \pm 4\%$ 和 $97.8 \pm 2.2\%$, $P > 0.05$, 两者无显著差异。

DISCUSSION

应用体外培养和放射性核素示踪技术测定抗疟药对氨基酸参入疟原虫蛋白质的影响，来研究抗疟药的作用机制是比较灵敏的方法⁽¹⁰⁻¹²⁾。本实验所用的 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸是疟原虫生长发育中的必须氨基酸，而血红蛋白中缺乏此氨基酸，疟原虫只能从外源获得，因此容

易参入其蛋白质⁽¹³⁾。实验所用的鼠约氏疟原虫经短期多次在含有小牛血清的 RPMI-1640 培养液中作适应性培养和转种，疟原虫在此种培养液中生长发育良好，在体外培养 30 min, $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸即能很快参入疟原虫，合成其蛋白质。硝喹和放线菌酮均能显著减少 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸参入疟原虫蛋白质，提示硝喹对疟原虫蛋白质合成的抑制，可能是其抗疟机制之一。有人认为放线菌酮的抗疟作用是抑制了真核细胞胞浆核糖体的功能，明显减少 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸参入疟原虫蛋白质⁽¹²⁾。本实验表明硝喹抑制 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸参入疟原虫蛋白质则发生在 1 h，这提示硝喹抑制疟原虫蛋白质合成明显晚于其抑制 DNA 合成。氨基蝶呤和乙胺嘧啶也能明显减少 $[^3\text{H}]$ 次黄嘌呤参入疟原虫的 DNA 和 RNA，但是，氨基蝶呤和乙胺嘧啶均不能抑制 $[^3\text{H}]$ 异亮氨酸和 $[^{14}\text{C}]$ 蛋氨酸参入疟原虫合成其蛋白质^(10,14)。硝喹对疟原虫蛋白质合成却产生了很强的抑制作用，说明硝喹的抗疟机制比氨基蝶呤和乙胺嘧啶要复杂得多，可能通过多方面干扰疟原虫的生长发育。硝喹对疟原虫蛋白质合成的影响可能是：(1) 通过抑制疟原虫 DNA 合成进而影响其蛋白质合成；(2) 干扰了疟原虫蛋白质合成过程中的其它某一个环节，而导致其蛋白质合成障碍。

REFERENCES

- 1 Wang XX, Hu YM, Dong LJ, Deng BZ. Studies on the mechanism of sporontocidal effect of nitroquine (CI-679) on *P. Gallinaceum*. *Acta Pharm Sin* 1981; 16: 334
- 2 Zhang YZ, Zhao ZP, Wang XX, Ren HX, Cheng ZQ. Effects of nitroquine on the development of exoerythrocytic forms of *Plasmodium yoelii* in rats. *Acta Acad Med Mil Tert* 1987; 9: 169
- 3 Hu YM, Wang XX, Deng BZ, Liu FA, Zhu QP, Kuang MS. Action of nitroquine on tissue schizonts of *Plasmodium cynomolgi*. *Acta Pharmacol Sin* 1986; 7: 78
- 4 Zhu QP, Hu YM, Liu FA. Effect of nitroquine

- on folate metabolism of mice plasmodia. *Acta Acad Med Mil Tert* 1984; 6: 183
- 5 Ding YL, Zhou WC. Inhibition of dihydrofolate reductase from rat liver by bis(2,4-diaminoquinazol-6-yl)-substituted amino-alkyl or aralkyl derivatives. *Pharm Ind* 1984; 15(12): 6
 - 6 Pang LH, Hu YM. Effect of nitroquine (CI-679) *in vitro* on incorporation of [³H]hypoxanthine into DNA and RNA of *Plasmodium yoelii*. *Acta Pharmacol Sin* 1988; 9: 349
 - 7 Trager W, Jensen JB. Human malarial parasites in continuous culture. *Science* 1976; 193: 673
 - 8 Jensen JB, Trager W. *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J Parasitol* 1977; 63: 883
 - 9 Neame KD. A simple method for the liquid scintillation counting of precipitated protein from red blood cells. *Anal Biochem* 1977; 80: 51
 - 10 Canfield GJ, Altstatt LB, Elliot VB. An *in vitro* system for screening potential antimalarial drugs. *Am J Trop Med Hyg* 1970; 19: 905
 - 11 Blum JJ, Yayon A, Friedman S, Ginsburg H. Effects of mitochondrial protein synthesis inhibitors on the incorporation of isoleucine into *Plasmodium falciparum in vitro*. *J Protozool* 1984; 31: 475
 - 12 Gershon PD, Howells RE. Mitochondrial protein synthesis in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1986; 18: 37
 - 13 McCormick GJ. Amino acid transport and incorporation in red blood cells of normal and *Plasmodium knowlesi*-infected rhesus monkeys. *Exp Parasitol* 1970; 27: 143
 - 14 Golenser J, Casuto D. *Plasmodium falciparum*: *in vitro* induction of resistance to aminopterin. *Exp Parasitol* 1981; 52: 371

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1991 Jul; 12 (4): 375-377

木防己碱对大鼠血小板聚集、血栓素 A₂ 和前列环素生成的影响¹

谭建权¹, 楚正绪¹, 沈甫明², 陈海生², 梁华靖²

(第二军医大学训练部药理学教研室, ²植化教研室, 上海 200433, 中国)

Effects of trilobine on platelet aggregation, thromboxane A₂, and prostacyclin formation in rats¹

TAN Jian-Quan, CHU Zheng-Xu, SHEN Fu-Ming, LIANG Hua-Qing², CHEN Hai-Sheng² (Department of Pharmacology, ²Department of Phytochemistry, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Using turbidimetry we found that trilobine inhibited ADP-induced platelet aggregation both *in vitro* and *in vivo*. Incubated with TrL 0.5, 0.75, and 1.0 mg · ml⁻¹, platelet aggregation was

inhibited by 38.2%, 68.2%, and 94.0% respectively. The inhibitory rates were 47.6% and 84.0% with TrL 20 and 40 mg · kg⁻¹ ip respectively *in vivo*. The formation of platelet TXB₂ was inhibited by 40% with TrL 20 mg · kg⁻¹ ip *in vivo*, while the formation of carotid artery wall PGI₂ was not affected. The production of TXA₂-like substance was inhibited by 37%, 53%, and 78% with TrL 0.5, 1.0, and 2.0 mg · ml⁻¹ respectively.

KEY WORDS trilobine; platelet aggregation; epoprostenol; thromboxane A₂; nephelometry and turbidimetry

Received 1990 Mar 28 Accepted 1991 Apr 30

¹ This paper was read before the 5th Representative Meeting of the Chinese Pharmacological Society held in Wuhan, 1989 Nov 1

提要 用比浊法观察盐酸木防己碱(trilobine-HCl, TrL)体内外给药对 ADP 诱导大鼠血小板聚集均有抑制作用。TrL 体外给药 0.5, 0.75 和 1.0 mg · kg⁻¹, 其抑制率分别为 38.2%, 68.2% 和 94.0%。TrL ip