

# 大剂量咯萘啶和氯喹对伯氏疟原虫抗咯萘啶系红内期超微结构的影响

吴莉莉 (中国预防医学科学院寄生虫病研究所<sup>1</sup>, 上海 200025)

**提要** 伯氏疟原虫 RP 系红内期超微结构中未消化食物泡增多, 含疟色素的消化泡减少; 滋养体复合膜较模糊。经咯萘啶 120, 600 和 1200 mg/kg 作用后 8-24 h, 分别约有 2, 5 和 10% RP 滋养体的复合膜或食物泡出现变化; 经氯喹 400 mg/kg 作用后 8-24 h, 约 5% RP 滋养体出现食物泡变化, 但经两药作用后 24 h, 95% 左右的 RP 系红内期超微结构未出现变化。

**关键词** 咯萘啶; 氯喹; 伯氏疟原虫; 电子显微镜检查

咯萘啶引起伯氏疟原虫正常株红内期中滋养体复合膜和食物泡的变化<sup>(1)</sup>, 也能引起伯氏疟原虫抗氯喹系红内期滋养体复合膜的早期变化<sup>(2)</sup>。但抗咯萘啶鼠疟原虫对氯喹有交叉抗性<sup>(3)</sup>。为进一步探讨咯萘啶的作用方式及产生交叉抗性的原因, 本文观察了伯氏疟原虫抗咯萘啶系(RP)红内期的超微结构及大剂量咯萘啶和氯喹对其超微结构的影响。

## 材 料 和 方 法

伯氏疟原虫抗咯萘啶系红内期(RP)为我所培育, 与其亲代相比, 抗性指数 300。磷酸咯萘啶和磷酸氯喹由我所药物化学研究室提供, 用双蒸水按盐基量配成稀释液, 然后给小鼠一次灌胃。

体重  $20 \pm SD$  2 g 的昆明株小鼠, 每鼠经 ip 接种感染 RP 原虫的 rbc  $4 \times 10^7$  个后 8 d 选原虫感染率达 14-44% 的鼠为实验鼠。分为: 1. 未给药组 6 只; 2. 给咯萘啶 120, 600, 1200 mg/kg (分别为正常株  $ED_{50}$  量的 20, 100, 200 倍) 组各 6 只; 3. 给氯喹 400 mg/kg (正常株  $ED_{50}$  量的 10 倍) 组 6 只。给药后 1, 8, 24 h,

每鼠分别以摘眼球法取血 1 ml, 按前文方法<sup>(4)</sup>将 rbc 制成 60 nm 超薄切片, 枸橼酸铅染色后置 H-500 透射电镜下观察。同时制作薄血膜用吉氏染色作油镜观察。

## 结 果

**伯氏疟原虫 RP 系红内期的超微结构** 与正常株相比, 油镜下 RP 系滋养体和裂殖体胞浆中疟色素很不明显。电镜下, RP 系红内期的超微结构与正常株相比, 具有以下特点: 1) 食物泡的变异 在绝大多数滋养体胞浆中未消化食物泡数目由正常株中的 1-3 个<sup>(4)</sup>增至 6-14 个, 经常可查见一些未消化食物泡已经或正在发生融合(图 A, 见铜版图 1, 下同); 在绝大多数滋养体和裂殖体中明显缺乏含疟色素的消化食物泡(图 B), 在少数滋养体和裂殖体胞浆中可查见少许米粒状, 未成结晶, 其外亦无单层膜围绕的疟色素颗粒, 平均长仅  $0.1 \mu\text{m}$  ( $0.08-0.12 \mu\text{m}$ ), 远较正常株中的为小<sup>(4)</sup>(图 C)。2) 多数滋养体的复合膜显得较模糊(图 A, C)。3) 少数滋养体胞浆中出现多个电子密度明显高于宿主 rbc 胞质的圆或椭圆形结构, 有的呈边集排列(图 D)。4) 查见少数裂殖子中棒状体数目由正常株中的一对增至 5-8 个(图 E)。RP 系红内期的其余超微结构则与正常株中的相同。

**咯萘啶对伯氏疟原虫 RP 系红内期超微结构的影响** 经咯萘啶 120, 600, 1200 mg/kg 作用后 24 h, 与未给药组相比, 油镜下原虫密度及形态未出现明显变化。

电镜下, 经上述不同剂量咯萘啶作用后 1 h, RP 系红内期超微结构亦未见明显改变。经 120 mg/kg 作用后 24 h, 仅约 2% 的滋养体复

合膜出现局部肿胀(图 F)。经 600 mg/kg 作用后 8, 24 h, 在约 5% 原虫胞浆中查见单层膜围绕的含疟色素颗粒聚集成块的空泡(图 G); 另有约 5% 滋养体的复合膜呈明显肿胀的多层螺旋膜变(图 H), 严重者伴胞浆核糖体模糊或胞浆电子密度增高。经 1200 mg/kg 作用后 8, 24 h, 具有上述变化的原虫数增至 10% 左右(图 I)。但经上述不同剂量的咯萘啶作用后 8, 24 h, 95% 左右的 RP 系红内期的超微结构未出现任何变化。

**氯喹对伯氏疟原虫 RP 系红内期超微结构的影响** 经氯喹 400 mg/kg 作用后 24 h, 油镜下原虫密度及形态与未给药组相比, 均未出现明显变化。

电镜下, 于作用 8, 24 h, 查见约 5% 滋养体的胞浆内出现含疟色素颗粒聚集成块的单层膜空泡(图 J)。其余约 95% 原虫的超微结构与未给药组中的相同。

## 讨 论

疟原虫经胞口摄入宿主血红蛋白并形成未消化食泡, 血红蛋白降解后形成含疟色素的消化泡。RP 系红内期中未消化泡数量增多而含色素的消化泡显著减少以及色素颗粒不成结晶等形态特点提示该原虫在培育过程中在药物作用下使血红蛋白降解受到影响。研究认为血红蛋白的降解产物高铁原卟啉 IX(FP) 是氯喹的高亲和受体<sup>(5)</sup>, 因此上述形态特征可能为探讨该原虫对氯喹产生交叉抗性原因提供了线索。裂殖子的棒状体富含组氨酸蛋白酶, 它有助于裂殖子侵入 rbc<sup>(6)</sup>。RP 原虫裂殖子中棒状体数目增加的现象提示此抗性原虫可能增强了其侵

入 rbc 的能力。此外, 少数 RP 原虫含若干电子致密结构, 它也曾被 Macomber 等在经氯喹作用的伯氏疟原虫滋养体中观察到<sup>(7)</sup>。

比较大剂量咯萘啶和氯喹作用后受损的 RP 原虫的形态变化, 进一步证实咯萘啶和氯喹一样能最先引起滋养体食泡变化。此外, 它还能引起滋养体复合膜变化。今后如临床上出现咯萘啶抗性虫系, 则以使用与此两类药物作用部位完全不同的抗疟药为宜。

**致谢** 电镜部分工作在上海第二医科大学超微结构实验室、上海医药工业研究院药理电镜室及上海第二军医大学电镜室进行, 得到中国科学院昆虫研究所吴敦肃的帮助, 本所于永和印放电镜照片。

## 参 考 文 献

- 1 吴莉菊. 咯萘啶对伯氏疟原虫红内期超微结构的影响. 中国药理学报 1985; 6 : 280
- 2 吴莉菊. 咯萘啶对伯氏疟原虫抗氯喹系红内期作用的超微结构观察. 寄生虫学寄生虫病杂志 1986; 4 : 263
- 3 邵葆若、叶秀玉、郑浩. 伯氏疟原虫 (*Plasmodium berghei*) 对咯萘啶抗药性的研究. 药学报 1982; 17 : 566
- 4 黄美玉、王才中、连惟能、陈细法. 伯氏疟原虫滋养体超微结构的初步研究. 动物学杂志 1984; 2 : 5
- 5 Fitch CD. Mode of action on antimalarial drugs. In: *Malaria and the red cell* (Ciba Foundation Symposium 94). 1st ed. London: Pitman, 1983 : 222-32
- 6 Kilejian A. Does a histidine-rich protein from *Plasmodium Lophurae* have a function in merozoite penetration? *J Protozool* 1976; 23 : 272
- 7 Macomber PB, Sprinz H, Tousimis AJ. Morphological effects of chloroquine on *Plasmodium berghei* in mice. *Nature* 1967; 214 : 937

## Effects of large doses of pyronaridine and chloroquine on ultrastructure of erythrocytic stages of pyronaridine-resistant line of *Plasmodium berghei*

WU Li-Ju

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

**ABSTRACT** The ultrastructure of erythrocytic stages of pyronaridine-resistant line (RP line) of *Plasmodium berghei* possessed following features: 1) Food vacuole: the number of indigested food vacuoles increased obviously from 1-4 in normal trophozoite to 6-14 in the RP line trophozoite. Some of the vacuoles were fusing. The digestive food vesicles containing malaria pigment granules were markedly reduced in most of the trophozoites and schizonts. In addition, the RP line parasites did not form typical grains of haemozoin. 2) Pellicular complexes in most of the RP line trophozoites blurred. 3) Numerous round or oval electron-dense structure were seen in a few trophozoites cytoplasm. 4) The increased number of rhoptries were also detected in a few RP line merozoites.

Eight to twenty four h after ig pyronaridine of 120,600 or 1200 mg/kg to the RP line infected mice, swelling and whorled membranes of pellicular complexes, and malaria pigment aggregations in food vacuoles were observed in about 2,5,10% of the trophozoites respectively. And 24 h after ig chloroquine (400 mg/kg), about 5% of the trophozoites exhibited pigment aggregations in food vacuoles. However, 24 h after ig pyronaridine or chloroquine, about 95% of the trophozoites of the RP line still remained unchanged.

**KEY WORDS** pyronaridine; chloroquine; *Plasmodium berghei*; electron microscopy

<sup>1</sup> WHO collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis.

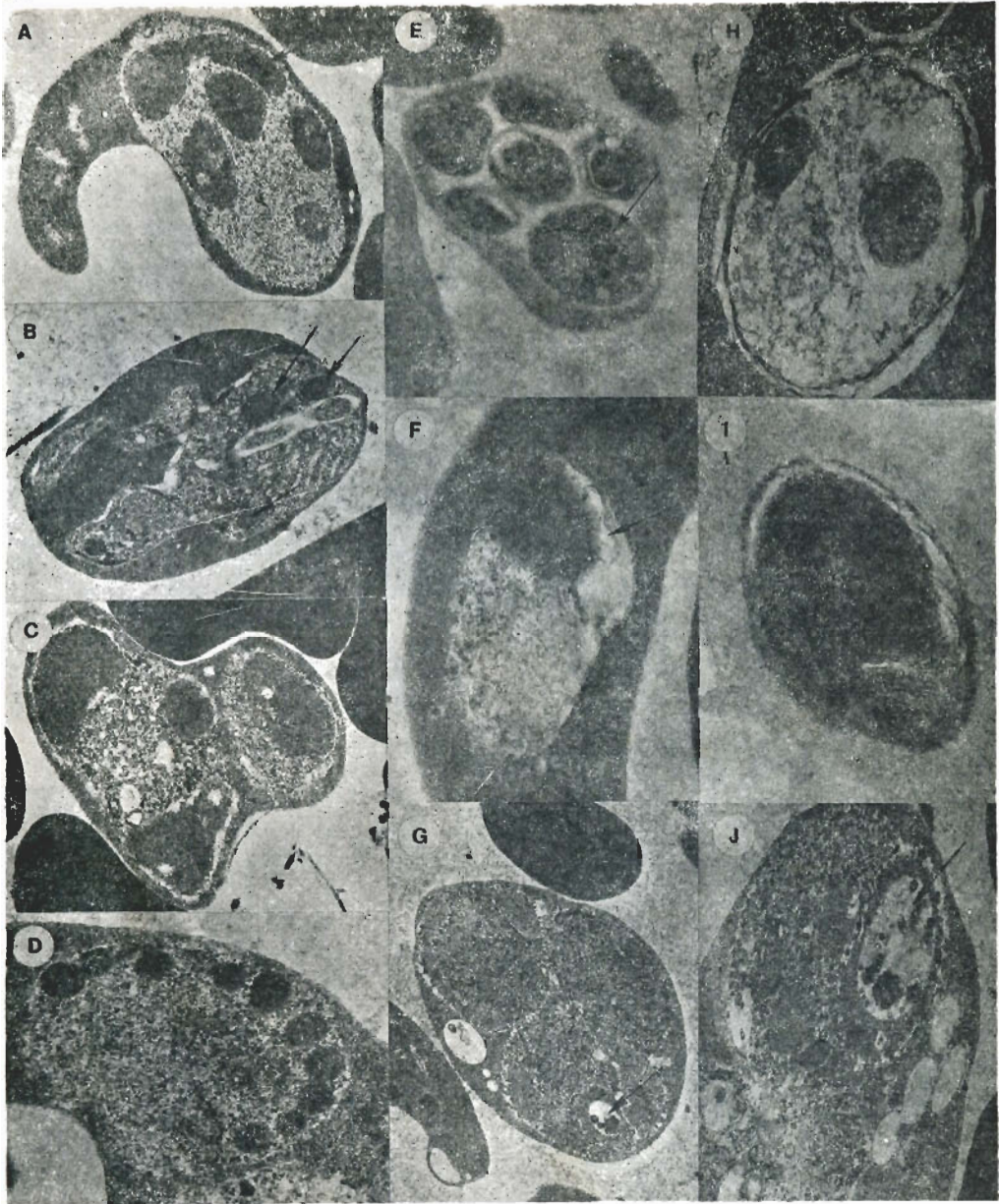


Fig 1. Electron micrographs of erythrocytic stages of pyronaridine-resistant line of *Plasmodium berghei*. (A) Seven indigested food vacuoles within the trophozoite cytoplasm, three of them fusing (arrow); pellicular complexes blurring,  $\times 17\ 000$ . (B) A schizont showing 3 indigested food vacuoles in its cytoplasm (arrow), lacking pigment-containing digested vesicle,  $\times 15\ 000$ . (C) Some granules of pigment appearing to lie free in the trophozoite cytoplasm (arrow); pellicular complexes blurring,  $\times 13\ 000$ . (D) The trophozoite cytoplasm containing several oval electron-dense structures,  $\times 32\ 000$ . (E) Arrow showing increasing of the number of rhoptries in the merozoite,  $\times 12\ 800$ . (F) 24 h after ig pyronaridine 120 mg/kg, arrow showing partial swelling of pellicular complexes,  $\times 26\ 000$ . (G) 8 h after ig pyronaridine 600 mg/kg, arrow showing malaria pigment aggregations in food vacuole of the trophozoite,  $\times 9\ 600$ . (H) A trophozoite after 8 h of pyronaridine 600 mg/kg, swelling and multilamellate whorl of pellicular complexes and blurred ribosomes in cytoplasm,  $\times 24\ 000$ . (I) 24 h after ig pyronaridine 1200 mg/kg, the trophozoite showing severe multilamellate whorl of pellicular complexes and increasing of electron density of cytoplasm,  $\times 25\ 500$ . (J) A trophozoite 24 h after ig chloroquine 400 mg/kg, arrow showing a vacuole containing clusters of pigment granules,  $\times 18\ 000$  (See p 87—88)