

硝喹(CI-679)对 $[^3\text{H}]$ 次黄嘌呤在体外参入约氏疟原虫核酸的影响

庞林华、胡友梅

(第三军医大学药理教研室, 重庆 630038)

提要 在体外, 硝喹 0.1 nmol/L 作用 3 h, $10 \mu\text{mol/L}$ 作用 15 min 即能抑制约氏疟原虫 DNA 的合成, 但对疟原虫 RNA 的合成无明显抑制作用。PABA、叶酸和甲酰四氢叶酸钙对硝喹的作用有明显的拮抗反应, 提示干扰疟原虫的叶酸代谢进而抑制其 DNA 的合成是硝喹在作用早期的主要抗疟机理之一。

关键词 抗疟药; 硝喹; 乙胺嘧啶; 约氏疟原虫; 叶酸; 脱氧核糖核酸; 核糖核酸; $[^3\text{H}]$ 次黄嘌呤

硝喹(nitroquine, CI-679)乙酸盐对多种疟原虫在红细胞内期的增殖有明显的抑制作用⁽¹⁾, 其机理可能与干扰疟原虫的叶酸代谢进而抑制其核酸的合成有关^(1,2)。为验证这一假设, 本实验采用短时体外培养约氏疟原虫(*P. yoelii*, *yoelii*, BY 265 株)红内期的方法和放射性核素示踪技术对该药进行了研究, 并用乙胺嘧啶(pyrimethamine)作为阳性对照。

材料和方法

材料 约氏疟原虫, 血传 20-40 代, 第四军医大学寄生虫学教研室提供。昆明种小鼠, 体重 $22.0 \pm \text{SD } 2.5 \text{ g}$, ♀♂不拘。硝喹乙酸盐, 上海医药工业研究院合成。乙胺嘧啶, 上海中西药厂出品。Men Eagle 培养基(不含 PABA 和叶酸类物质), 中国科学院生物物理所生化试剂厂出品。 $[^3\text{H}]$ 次黄嘌呤, 中国科学院上海原子核研究所出品, 比活性 370 GBq/mmol 。DEAE 纤维素粉(DE 11), 英国分析纯试

剂。对氨基苯甲酸(PABA)、叶酸和甲酰四氢叶酸钙, 市售分析纯试剂。

疟疾的感染和血液标本的采集与制备 疟疾的感染采用小鼠腹腔定量接种法。于接种后 4-6 d, 待 rbc 疟原虫感染率达 40%-70%, 疟原虫分类计数滋养体达 40% 以上时, 摘眼球取血于同一肝素抗凝瓶内, 经纤维素粉柱过滤法(cellulose powder column filtration)^(3,4) 清除血中 wbc 后, 用不含 PABA 和叶酸类物质的 Men Eagle 培养基(pH 7.4)稀释血液标本以作培养。

体外培养 每个培养瓶(10 ml 三角烧瓶)内含有稀释血液标本 1 ml (819×10^6 个疟原虫); 一定浓度的硝喹或乙胺嘧啶; 青霉素 G 200 IU, 链霉素 $200 \mu\text{g}$; $[^3\text{H}]$ 次黄嘌呤 92.5 kBq ; 一定浓度的 PABA, 叶酸或甲酰四氢叶酸钙(仅用于拮抗试验)。每个标本的最终容量均为 2 ml, 每批实验均设空白对照组。疟原虫的培养采用 37°C 蜡烛缸(candle jar)法^(5,6)。观察量-效反应的标本培养 3 h; 时-效反应的标本培养 5 h; 为避免 PABA 和叶酸类物质与所试抗疟药在作用上快慢不同而影响实验结果, 拮抗试验中, 疟原虫与抗疟药及拮抗剂一起培养 3 h 后加入 $[^3\text{H}]$ 次黄嘌呤再培养 2 h。培养结束时, 立即将标本置于冰水浴中, 并于每支培养瓶内分别加入 5 ml 冰冷的 5% 三氯乙酸溶液以终止反应。

核酸的提取和放射性的测定 核酸的提取

基本按酸碱水解法⁽⁷⁾,略有改变,即提取RNA的碱水解过程由原来的KOH 0.3 mol/L温浴17 h改为NaOH 0.5 mol/L温浴90 min。提取完毕后,每个标本各取2份0.2 ml的核酸提取液DNA和/或RNA,分别加入预先置有乙二醇乙醚1.5 ml的闪烁杯内,再加入闪烁液(甲苯配制,含PPO 0.2%, POPOP 0.02%)3.5 ml,混匀并静置1-2 h后,用双道液体闪烁计数器(FJ-2101 G型,西安262厂产品)测定其cpm值。

统计处理 实验数据用方差分析处理,并用Newman-Keul's检验对相关组数据进行组间比较。

结 果

[³H]次黄嘌呤参入疟原虫的核酸 在5 h的培养过程中,[³H]次黄嘌呤参入疟原虫核酸(RNA和DNA)的量与培养时间成显著正相关,且其cpm均值足够大,能满足本实验的要求(图1)。

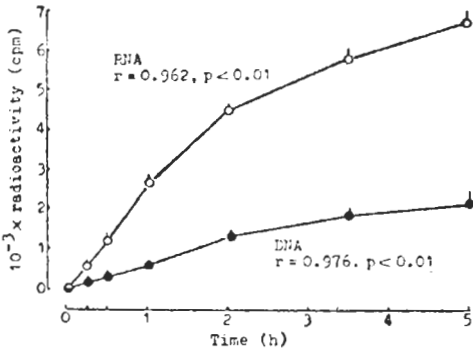


Fig 1. Incorporation in vitro of radioactivity from [³H]hypoxanthine into DNA and RNA of *Plasmodium yoelii*. n = 4, $\bar{x} \pm SD$.

硝喹和乙胺嘧啶对[³H]次黄嘌呤参入疟原虫RNA和DNA的影响 经过3 h的药物作用,除硝喹在10 mmol/L时对[³H]次黄嘌呤参入疟原虫RNA有明显减少(p < 0.05)外,两种药物在其它浓度时对RNA合成均无明显作用,且两药各相应浓度组间亦无显著差别

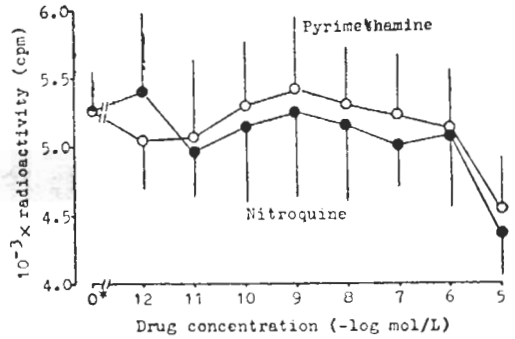


Fig 2. Effect of nitroquine and pyrimethamine on incorporation of radioactivity from [³H]hypoxanthine into RNA of *Plasmodium yoelii*. n = 6, $\bar{x} \pm SD$. 0* means 0 mol/L.

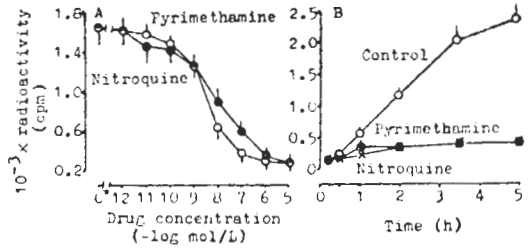


Fig 3. Effect of nitroquine and pyrimethamine on incorporation of radioactivity from [³H]hypoxanthine into DNA of *Plasmodium yoelii*. n = 6, $\bar{x} \pm SD$. 0* means 0 mol/L.

(图2)。对疟原虫DNA的合成,从量-效反应看,经过3 h的药物作用,硝喹和乙胺嘧啶分别从0.1 nmol/L和1 nmol/L起即能显著减少[³H]次黄嘌呤参入疟原虫DNA(硝喹组 p < 0.05,乙胺嘧啶组 p < 0.01)。两药的抑制效应均随药物浓度的增加而增加,在药物浓度为10和100 nmol/L时,乙胺嘧啶的作用强于硝喹(p < 0.01),其余各相应浓度组间相差不显著(图3-1)。从时-效反应看,10 μmol/L的硝喹和乙胺嘧啶在体外作用15 min后,即能显著减少[³H]次黄嘌呤参入疟原虫DNA(p < 0.01)两药的抑制效应均与药物作用时间成明显正相关,在作用30 min和1 h时,硝喹的作用强于乙胺嘧啶(p < 0.01)其余各相应时间

组间相差不显著($p > 0.05$, 图3-2)。

PABA、叶酸和甲酰四氢叶酸钙对硝喹和乙胺嘧啶抑制疟原虫 DNA 合成作用的拮抗反应 在单独使用拮抗剂时, PABA、叶酸和甲酰四氢叶酸钙从 1 nmol/L 起均能显著增加 $[^3\text{H}]$ 次黄嘌呤掺入疟原虫 DNA ($p < 0.01$), 但高浓度的叶酸反而表现出明显的抑制作用 ($p < 0.01$)。3种拮抗剂从 1 nmol/L 起均能显著减弱 10 nmol/L 的硝喹抑制疟原虫 DNA 合成的作用 ($p < 0.01$); 而对乙胺嘧啶 10 nmol/L 的作用, PABA 和叶酸从 1 nmol/L (PABA 组 $p < 0.05$, 叶酸组 $p < 0.01$) 起, 甲酰四氢叶酸钙从 $10 \mu\text{mol/L}$ ($p < 0.05$) 起也能发挥显著的拮抗作用(图4)。

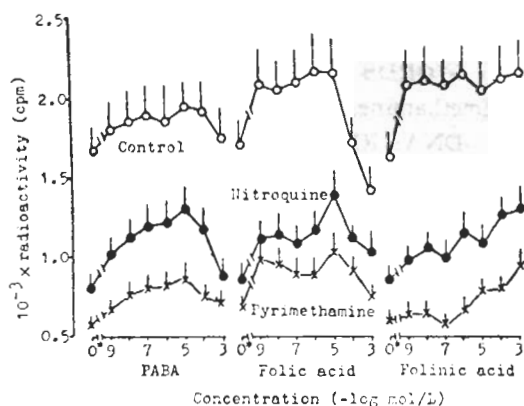


Fig 4. Effects of PABA, folic and folinic acids on incorporation of radioactivity from $[^3\text{H}]$ hypoxanthine into DNA of *Plasmodium yoelii* during incubations without/with nitroquine or pyrimethamine 10 nmol/L . $n = 4$, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

讨 论

从本实验的结果可以看到, 疟原虫在体外经短时间硝喹作用后, 其DNA的合成受到显著的抑制, 而其RNA合成所受的影响不甚明显, 表明抑制疟原虫DNA的合成是硝喹在作用早期的主要抗疟机理之一。由于本实验中硝喹和乙胺嘧啶在反应上存在较大的相似性(如对疟原虫DNA合成的选择性抑制作用及其量-效和时-效反应; PABA、叶酸和甲酰四氢叶

酸钙对两药作用的拮抗反应等), 结合以前观察到的(未发表资料)两药在抗疟作用上的相似之处(如所致疟原虫形态改变相似, 均能抑制疟原虫的核分裂, 对疟原虫发育各期均有作用等), 以及在化学结构上两药之间和两药与叶酸分子之间的相似性, 可以认为, 硝喹在抗疟作用机理上可能与乙胺嘧啶有相似之处, 即通过干扰疟原虫的叶酸代谢, 使其脱氧胸苷酸的合成过程中由 N^5, N^{10} -亚甲基四氢叶酸所介导的一碳单位的传递受阻, 造成脱氧胸苷酸合成的减少, 因而能较为迅速地抑制疟原虫DNA的合成, 导致核分裂的障碍。由于疟原虫RNA的合成不受叶酸代谢的直接影响⁽⁸⁾, 因此硝喹和乙胺嘧啶对RNA合成的影响均不明显。

参 考 文 献

- 1 Thompson PE, Bayles A, Olszewski B. Antimalarial activity of 2,4-diamino-6-[(3,4-dichlorobenzyl) nitroso-amino] quinazoline (CI 679 base) and CI 679 acetate. Laboratory studies in mice and rhesus monkeys. *Am J Trop Med Hyg* 1970; 19 : 12
- 2 朱清平、胡友梅、刘富安。硝喹 (Nitroquine) 对小鼠疟原虫叶酸代谢的影响。第三军医大学学报 1984; 6 : 183
- 3 Fulton JD, Grant PT. The sulphur requirements of the erythrocytic form of *Plasmodium knowlesi*. *Biochem J* 1956; 63 : 274
- 4 Baggley VC, Atkinson EM. Use of CF 12 columns for preparations of DNA from rodent malaras. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972; 66 : 4
- 5 Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976; 193 : 673
- 6 Jensen JB, Trager W. *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocyte and description of the candle jar method. *J Parasitol* 1977; 63 : 883
- 7 McCormick GJ, Canfield CJ, Willet GP. *Plasmodium knowlesi*: in vitro evaluation of antimalarial activity of folic acid inhibitors. *Exp Parasitol* 1971; 30 : 88
- 8 Sherman IW. Biochemistry of *Plasmodium* (malaria parasites). *Microbiol Rev* 1979; 43 : 453

Effect of nitroquine (CI-679) *in vitro* on incorporation of [³H]hypoxanthine into DNA and RNA of *Plasmodium yoelii*

PANG Lin-Hua, HU You-Mei

(Department of Pharmacology, Third Military Medical College, Chongqing 630038)

ABSTRACT The effect of nitroquine acetate, together with pyrimethamine, was studied with [³H]hypoxanthine incorporation into DNA and RNA of *Plasmodium yoelii* during incubation in Men Eagle medium containing neither PABA nor folic acid. Incorporation into RNA was only slightly affected by nitroquine 10 μmol/L, whereas incorporation into DNA was markedly inhibited by nitroquine 0.1 nmol/L and pyrimethamine 1 nmol/L. When both drugs were at 10 μmol/L, inhibition of DNA synthesis was noted after 15 min of drug action. The inhibition was antagonized by

PABA, folic and folinic acids when both antimalarials were at 10 nmol/L. In the absence of antimalarials, incorporation into DNA was stimulated by the 3 antagonists. The results indicate that nitroquine, like pyrimethamine, inhibits DNA synthesis of malaria parasites by interfering with their folic acid metabolism, which is one of the main antimalarial mechanisms of nitroquine.

KEY WORDS antimalarials; nitroquine; pyrimethamine; *Plasmodium yoelii*; folic acid; DNA; RNA; [³H]hypoxanthine