

N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍和甲基磺酸乙酯对伯氏疟原虫氯喹抗药性的诱变作用

姚寿南¹、管惟滨 (第二军医大学寄生虫学教研室, 上海 200433)

提要 化学诱变剂 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)和甲基磺酸乙酯(EMS)都能加速伯氏疟原虫对氯喹产生抗性, 并具有量-效关系。用 MNNG 或 EMS 体外处理, 使伯氏疟原虫 ANKA 株及其敏感单克隆产生 30 倍以上的氯喹抗性。实验说明疟原虫对氯喹的抗药性可被诱变剂诱发。

关键词 伯氏疟原虫; 氯喹; 微生物抗药性; 化学致变物; 基因突变; N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍; 甲基磺酸乙酯

抗氯喹恶性疟已遍及亚洲、非洲和拉丁美洲的 36 个国家和地区。但是对疟原虫获得氯喹抗性的机理至今尚未完全明确。有关遗传学杂交实验已表明一些动物疟原虫的氯喹抗性可以同其它遗传性状如同工酶型进行重组和分离⁽¹⁾。因而认为氯喹抗药性的产生是疟原虫细胞基因突变的结果。为了进一步验证疟原虫抗药性形成的基因突变机理, 本实验研究了 2 种化学诱变剂 MNNG 和 EMS 对伯氏疟原虫氯喹抗性的诱变性。

材料和方法

伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*) ANKA 株是 1981 年引自英国伦敦热带卫生医学院(中国预防医学科学院寄生虫病研究所提供); 昆明株小鼠, ♀♂兼用, 18±SD 2g(本校动物所提供); 二磷酸氯喹(上海第十四制药厂), 剂量以基质计算; N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG, 美国 sigma 公司), 甲基磺酸乙酯

(ethyl methanesulfonate, EMS, 上海化学试剂一厂)。

体外诱变伯氏疟原虫及诱变后原虫存活率的估计 疟原虫感染的红细胞用 5% 葡萄糖生理盐水洗涤 2 次, 加入 MNNG 或 EMS 诱变液(用 pH 7.0-7.4 的 RPMI 1640 配制), 置 37°C 中 2 h 后用 5% 葡萄糖生理盐水洗涤 2 次, 配成虫血悬液, 经尾 iv 接种小鼠 4-5 只。每鼠接种量为 10⁷ 个受染红细胞。接种后 4 d, 制血片镜检 2000 个红细胞的感染率(EIR)。以诱变组和对照组平均感染率的 % 为诱变后原虫的相对存活率。

抗氯喹原虫的筛选 按上述方法用诱变剂处理受染红细胞并接种小鼠体内, 繁殖 5-6 d 后取血传种(iv)一批正常小鼠, 每鼠接种 10⁷ 受染红细胞(相当于 3×10⁷ 原虫⁽²⁾), 3 h 后给氯喹 30 mg/(kg·d)×4-6 d。治疗后观察抗性原虫的出现。阳性者转种并再次给药治疗 1 次, 以鉴定原虫对氯喹的抗性。按 Poisson 分布估计抗药突变频率(mutant frequency)⁽³⁾。

$$\text{突变频率} = -\ln P_0/N$$

P₀ 为阳性个体的比例, N 为每鼠平均接种原虫数。

抗性强度测定 仿 4 d 抑制法⁽⁴⁾。以剂量对数和阴转率概率单位按直线回归法求 ED₅₀ 值。

单克隆化 采用有限稀释法^(1,5)。

结果

MNNG 和 EMS 体外处理对伯氏疟原虫的作用 MNNG 和 EMS 体外处理 2 h 后, 原虫

Tab 1. Relationships between the concentrations of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) or ethyl methanesulfonate (EMS) and their effects on parasite survival rate and chloroquine-resistant (CQ^r) mutation in *Plasmodium berghei* ANKA strain. Parasites were treated with mutagens *in vitro*, but were tested for the survival rate and CQ^r mutation in mice. $\bar{x} \pm SD$, r : correlation coefficient with the concentrations. ** $p < 0.05$, * $p < 0.01$**

Mutagens	Concn	Parasite survival rate(%)	Mice with CQ ^r parasites/ Total mice
MNNG μg/ml	0	100	0/18
	0.125	93±23	1/19
	0.25	78±46	1/19
	0.5	54±15	2/20
	1.0	22±14	5/19
	2.0	3±3	6/19
		$r = -0.9938^{***}$	$r = 0.9396^{***}$
EMS mg/ml	0	100	0/20
	0.25	39±23	1/20
	0.5	22±15	2/20
	1.0	20±17	1/20
	2.0	0.97±0.76	2/20
	4.0	0.25±0.17	6/20
		$r = -0.9613^{***}$	$r = 0.7625^{**}$

Tab 2. Effect of MNNG and EMS on chloroquine-resistant (CQ^r) mutation in *Plasmodium berghei* ANKA strain *in vitro*. * $p < 0.01$ vs untreated control.**

Mutagens	Concn	Mice with CQ ^r parasites/ Total mice	Mutant frequency
MNNG μg/ml	0	2/15	4.77×10^{-9}
	1.25	13/14	$8.79 \times 10^{-8^{***}}$
EMS mg/ml	0	1/20	1.7×10^{-9}
	3.75	16/19	$6.15 \times 10^{-8^{***}}$

的存活率随剂量增加而下降。表1说明2种诱变剂对原虫有致死作用。

MNNG和EMS对伯氏疟原虫抗氯喹突变频率的影响 用MNNG或EMS一次诱变处理后存活的原虫中出现抗氯喹原虫的鼠数显著多于不诱变对照组。MNNG和EMS处理后抗

氯喹突变频率显著增高(表2)。MNNG和EMS的诱变处理浓度越大,氯喹治疗后得到的抗性原虫阳性的小鼠数越多(表1),说明2种诱变剂提高氯喹突变频率的作用有量-效关系。

诱变剂促进疟原虫对氯喹抗性的产生 用大剂量复燃法⁽⁴⁾平行比较了2个虫系的氯喹抗性产生速度。其中一虫系经MNNG 0.5或1.0 μg/ml间断性重复诱变处理4次,另一虫系为不诱变的平行对照。两虫系每次传代均用氯喹 ip 40 mg/kg治疗1次以培育抗性。结果MNNG诱变的虫系在第6代起原虫血症到达2%的延迟天数逐渐减少,第8代时已减为2.6 d。最后经6个月14次用药传代,原虫血症到达2%的延迟天数减为1.4 d,而对照组原虫系始终在5 d左右。经14次用药传代的诱变虫系对氯喹的ED₅₀为 $>50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d}) \times 4 \text{ d}$,与正常亲代原虫(ED₅₀ = $1.66 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d}) \times 4 \text{ d}$, 95%可信限为1.51-1.82)相比,氯喹抗性已达30倍以上。而平行对照虫系则无抗性产生(ED₅₀ = $2.89 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d}) \times 4 \text{ d}$, 2.26-3.74)

测定诱变剂诱导的氯喹抗性的强度 我们将疟原虫用MNNG 1.0 μg/ml和EMS 3.75 mg/ml诱变处理后接种小鼠,再用氯喹30 mg/(kg·d)×4 d连续选育5代分别得到抗性达30倍以上的抗氯喹虫系PB 27 A和PB 26 A。用MNNG 2.0 μg/ml诱变处理氯喹30 mg/(kg·d)×6 d筛选5代又获得了抗性达30倍以上的抗氯喹系PB 34-1(未发表资料)。而未经诱变剂处理的原虫系(PB 26 B和PB 27 B)即使经同样的药物筛选均无抗性产生(表3)。

克隆化原虫的氯喹抗性诱导 用有限稀释法将正常伯氏疟原虫ANKA株进行2次连续克隆化得到的纯系(每次实验将原虫连续稀释直至平均每鼠接种0.2个原虫,2次克隆化的概率为99.5%),经初步测定证实克隆系对氯喹的敏感性正常。该系原虫用EMS 0.5 mg/ml,在37℃诱变处理后,用氯喹30 mg/(kg·d)×4 d连续筛选2代,则对氯喹产生抗药性(表4)。

Tab 3. Response to chloroquine ip for 6 d of mutagenized chloroquine-resistant mutants (PB 27 A and PB 26 A), control lines (PB27B and PB 26 B), and parent line of *Plasmodium berghei* ANKA strain in mice. Mice having no surviving parasites during 28 d after treatment were determined as negative.

Lines	Parasitized mice after treatment with chloroquine(mg/(kg·d)) (Positive/Total)					ED ₅₀ * mg/(kg·d) × 4 d	I ₅₀ †
	0	5	15	30	50		
PB 27 A	5/5	—	—	5/5	5/5	>50	>30
PB 27 B	5/5	—	—	0/5	0/5	—	—
PB 26 A	5/5	—	—	5/5	5/5	>50	>30
PB 26 B	5/5	—	—	1/5	0/5	2.33	1.345
Parent	5/5	0/5	0/5	0/5	—	1.66	—

* ED₅₀ in the standard "4-d suppressive test"⁽⁴⁾.

† I₅₀, ED₅₀ of resistant line/ED₅₀ of parent.

Tab 4. Response to ip chloroquine mg/(kg·d) for 6 d of EMS (0.5 mg/ml)-induced chloroquine-resistant mutants selected from a sensitive clonal line of *P berghei* ANKA strain in mice.

Mutants or Lines	Parasitized mice after treatment with chloroquine (Positive/Total)		
	0	30	50
Parent	10/10	0/10	0/10
PB 30-44	10/10	10/10	8/8
PB 30-19	10/10	10/10	7/9

抗氯喹原虫的某些生物学特征

1. 疟色素 光镜下可见寄生于成熟红细胞内的敏感原虫的大小滋养体、裂殖体和配子母体的胞质内含有棕黄色的色素颗粒。但3个抗氯喹虫系 PB 26 A, PB 27 A 和 PB 34-1 均无色素可见。

2. 增殖速率 静脉接种敏感原虫的小鼠5 d内红细胞感染率(EIR)可升至80%以上,而接种相同数量抗氯喹原虫的小鼠在10 d后EIR仅约20%(图1)。两抗性虫系的增殖指数是: PB 26 A 为 1.48±0.08, PB 27 A 为 1.31±0.16, 显著比亲代敏感虫系的增殖指数(3.56±0.28)小, p<0.01。

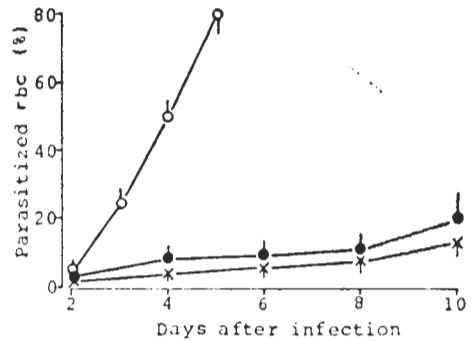


Fig 1. The course of parasitemias in mice inoculated iv with 10⁷ parasitized rbc of the parent ANKA strain of *Plasmodium berghei* (○), chloroquine-resistant lines PB26 A (●) and PB27 A (×). All p<0.01 (●), (×) vs (○). All p>0.05 (●) vs (×).

3. 毒力 感染正常原虫的20只小鼠在8 d内全部死亡,平均存活6.4±0.9 d。而以相同数量接种两抗性系(PB 27 A, PB 26 A)的小鼠平均存活时间均比正常亲代系长,分别为17.8±3.4和16.6±2.8 d (p<0.01), 这表明抗氯喹原虫对小鼠的毒力减弱。

4. 抗性稳定性 3个抗氯喹虫系(PB 27 A, PB 26 A 和 PB 34-1) 分别经无药血传7, 6, 7代(分别为55,41和82 d)后,其氯喹抗性均没有消失。对PB 34-1抗性系在血传过程中隔代进行1次氯喹ED₅₀测定,结果显示传代7次(82 d)后原虫的抗性水平未见下降。4次测定的氯喹ED₅₀均>50 mg/(kg·d)×4 d。

讨 论

疟原虫的抗药性产生机理尚不明确, 当前至少存在着 3 种不同的假说: (1) 基因突变; (2) 生理适应; (3) 虫株内混合有天然抗性原虫, 在药物中获得选择。以往的杂交和重组实验已表明某些抗性的遗传性^(1, 8-8)。本文结果表明: (1) 伯氏疟原虫的氯喹抗性是可诱变的; (2) 经 MNNG 或 EMS 诱导的伯氏疟原虫抗药性至少在无性增殖中具有遗传稳定性, 说明抗性有一定的遗传基础。而生理适应所引起的抗性在无药时将迅速消失; (3) 敏感的克隆系原虫亦产生了明显的抗性, 因此可以排除天然抗性的可能。已知 MNNG 和 EMS 可引起细胞 DNA 的碱基置换而诱发基因突变。因此, 上述结果提示氯喹抗性的产生机理至少在伯氏疟原虫来说可能是基因突变。

本实验所得的各抗性系还伴有无色素、繁殖慢和毒力低的变异特征。这同过去报道的不用诱变剂选育的氯喹抗性株相似^(9, 10)。这些变异特征与抗药性的关系尚待研究。

疟原虫的抗药性虫系无论对抗性研究, 还是新药筛选均具有重要价值, 本文首次将诱变剂成功地用于伯氏疟原虫抗性株的诱导。可以认为诱变剂对实验室快速培育抗药虫株或其它类型的变异株, 如减毒株和营养缺陷型变异株具有潜在的实用价值。

致谢 复旦大学遗传学研究所盛祖嘉教授指导并惠赠

MNNG。中国预防医学科学院寄生虫病研究所提供伯氏疟原虫 ANKA 株。第二军医大学瞿缝伊、周元昌、黄文锦、潘卫庆、李光茹等同志给予指导和协助。

参 考 文 献

- 1 Rosario VE. Genetics of chloroquine resistance in malaria parasites. *Nature* 1976, 261 : 585
- 2 Schoenfeld C, Most H, Entner N. Chemotherapy of rodent malaria: transfer of resistance VS mutation. *Exp Parasitol* 1974, 36 : 265
- 3 盛祖嘉. 微生物遗传学. 北京: 科学出版社, 1981 : 60-145
- 4 Peters W. The chemotherapy of rodent malaria. V. Dynamics of resistance. Part I. Methods for studying by *Plasmodium berghei*. *Ann Trop Med Parasitol* 1968, 62 : 277
- 5 Peters W. The chemotherapy of rodent malaria. XXX. The enigmas of the 'NS lines' of *Plasmodium berghei*. *Ibid* 1978, 72 : 22
- 6 Walliker D, Carter R, Morgan S. Genetic recombination in malaria parasites. *Nature* 1971, 232 : 561
- 7 Walliker D, Carter R. Genetic recombination in *Plasmodium berghei*. *Parasitology* 1973, 66 : 309
- 8 Walliker D, Carter R, Sanderson A. Genetics studies on *Plasmodium chabaudi*: recombination between enzyme markers. *Ibid* 1975, 70 : 19
- 9 Ladda R, Sprinz H. Chloroquine sensitivity and pigment formation in rodent malaria. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969, 130 : 524
- 10 Peter W. The chemotherapy of rodent malaria. I. Host-parasite relationships. Part I: The virulence of infection of the 'wild' strain. *Ann Trop Med Parasitol* 1968, 62 : 238

Mutagenic effects of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) and ethyl methanesulfonate (EMS) on chloroquine resistance in *Plasmodium berghei* ANKA strain

YAO Shou-Nan¹, GUAN Wei-Bin²

(Department of Parasitology, Second Military Medical College, Shanghai 200433)

ABSTRACT The influences of two chemical mutagens, *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) and ethyl methanesulfonate (EMS) on the chloroquine (CQ) resistance in *Plasmodium berghei* ANKA strain were studied, and totally four 30-fold CQ-resistant lines were established successfully using the mutagens. Both MNNG and EMS were shown to be effective in inducing CQ resistances and increasing the frequency of the appearance of CQ-resistant mutants when erythrocytes with *P. berghei* were treated *in vitro* at 37°C for 2 h. By using the relapse technique, one MNNG-mutagenized line developed a more than 30-fold CQ-resistance after 14 drug passages, while the parallel control one did not. EMS also showed mutagenic effectiveness on a sensitive clonal line, which changed into an over 30-fold CQ-resistant one following a single course of

CQ therapy consisting of 30 mg/kg ip for 6 d. The CQ resistance of the mutagenized lines were stable after as many as 7 blood passages in the absence of drug pressure over a period of 82 d.

All the CQ-resistant lines of the malaria parasites had 3 variations, ie, lack of pigment production, decreased virulence and slowed growth rate. It is concluded that the origin of the CQ resistance may lie in gene mutation and the application of mutagens may be in aid of rapid production of drug resistance in malaria parasites.

KEY WORDS *Plasmodium berghei*; chloroquine; microbial drug resistance; chemical mutagens; gene mutation; methylnitrosoguanidine; ethyl methanesulfonate

¹ Now in Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433

² Corresponding author