

哌嗪对伯氏疟原虫 ANKA 株红内期超微结构的影响

陈 林、钱永乐 (第二军医大学抗疟药研究室, 上海 200433)

李泽琳、张奎汉、戴宝强 (中医研究院中药研究所, 北京 100700)

刘泽甫、王京玲 (卫生部北京生物制品研究所, 北京 100050)

提要 受染小鼠 ig 哌嗪 6.4 mg base/kg, 1 h 后 部分疟原虫滋养体食泡膜肿胀; 但色素颗粒仍多为单个矩形晶状体。2 h 后色素颗粒多呈长梭形。4 h 后大部分滋养体食泡膜肿胀, 线粒体肿胀, 线粒体及食泡腔内出现螺旋膜, 食泡内有圆或椭圆形色素凝集。这些变化呈进行性加重, 12 h 后, 部分滋养体瓦解仅余膜残体及大小不等的空泡。

关键词 哌嗪; 氯喹; 伯氏疟原虫 ANKA 株; 电子显微镜检查

哌嗪系 4-氨基喹啉类化合物, 化学名为 1,3-双[4-7-氯代喹啉-4]哌嗪-1]丙烷, 口服对疟疾有长效预防作用, 也可用作治疗药⁽¹⁾。对恶性疟(包括抗氯喹恶性疟 I—Ⅲ级)的疗效明显优于氯喹⁽²⁾。为阐明哌嗪对疟原虫的作用。我们用透射电镜技术观察了它对伯氏疟原虫 (*Plasmodium berghei*) ANKA 株红内期超微结构的影响

材料与方法

伯氏疟原虫 ANKA 株由第二军医大学抗疟药研究室提供⁽³⁾。

取体重为 20 ± 2 g 的昆明株小鼠 50 只, 每鼠 ip 接种伯氏疟原虫 ANKA 株 1×10^7 受染红细胞, 3-4 d 后采血检查, 选原虫感染率达 20% 以上者备用。

实验分为磷酸哌嗪组, 磷酸氯喹组及不给药对照组, 磷酸哌嗪组 6.4 mg(base)/kg(相当于“四天抑制性疗法”的 ED_{50})磷酸氯喹组 40 mg(base)/kg(相当于 3.5 倍 ED_{50}), 一次给药于 ig 给药后 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36 和 48 h 用摘眼球法采血, 将 3-4 滴血滴于平

底玻璃瓶内。待血液刚凝固立即加入 3% 戊二醛(Millonig 磷酸缓冲液配制, pH 7.25) 2 ml, 5 min 后切成约 1 mm^3 小块, 继续固定 1 h。用缓冲液浸洗 3 次, 每次 15 min, 然后移换至 1.5% 的锇酸中固定 1 h, 丙酮逐级脱水。以上各步均在 4℃ 条件下进行。脱水后用 Quetol-812 环氧树脂包埋, 然后置于恒温干燥箱内聚合(35℃, 24 h; 45℃, 24 h 和 60℃, 48 h)。用 LKB-V 型超薄切片机切片, 醋酸铀及枸橼酸铅双染色, H-600 型透射电镜观察。

结 果

哌嗪对伯氏疟原虫 ANKA 株红内期超微结构的影响 受染小鼠 ig 哌嗪后 24 h 内对疟原虫环状体、裂殖体和配子母体作用不明显, 而晚期滋养体则形态改变明显。

给药后 1 h: 与不给药对照组疟原虫(图 1 O)比较, 小部分滋养体内食泡膜明显肿胀并呈波纹状, 食泡中血红蛋白轮廓清晰, 电子密度均匀, 与红细胞电子密度一致(图 1 A, 见图版 2, 以下各图均同), 色素颗粒仍为单个矩形晶状体(图 1 B)。

给药后 2 h: 滋养体食泡膜肿胀加剧呈多层螺旋膜, 色素颗粒形态变异不一, 多呈长梭形并开始聚集(图 1 C)。

给药后 4 h: 大多数滋养体内食泡膜肿胀并呈螺旋膜(图 1 D)。线粒体肿胀, 有的呈蘑菇状, 基质电子密度降低(图 1 E), 腔内有 1—2 个多层膜小体(图 1 F)。核膜间隙增宽(图 1 D)。食泡内有圆或椭圆形色素颗粒凝集(图 1 F)。1 个滋养体内有 1 至数个凝集色素块, 团块外周为单层膜包绕, 每个团块中有色

素颗粒10—20个,色素颗粒电子密度增大(图1G)。

给药后8h:形态改变如前,裂殖体内残余体的色素仍呈矩形结晶(图1H)。

给药后12h:大多数滋养体损伤严重,核膜肿胀、间隙增宽、核内染色物质星状聚集。线粒体肿胀,电子密度下降明显(图1I)。部分原虫瓦解,有的仅留下膜残体,有的出现自噬泡,有的自噬泡已由虫体排出至红细胞内(图1J)。

给药后16h:绝大多数滋养体损伤更为严重,圆颗粒状色素凝集明显成团,外有单层膜包绕。色素颗粒电子密度明显增大(图1K)。胞质内出现较多自噬泡。

给药后20—24h:全部滋养体结构多已瓦解。仅留下膜残体及出现大小不等空泡,但环状体、裂殖体及配子体未见明显变化。

给药后36—48h:很少找到原虫,找到的个别原虫结构已瓦解为碎片,仅留下膜残体及空泡(图1L)。

氯喹对伯氏疟原虫ANKA株红内期超微结构的影响 给药后4h极少数滋养体食泡膜增宽,色素颗粒凝集呈矩形结晶(图1M)。给药后8h多数滋养体食泡膜损伤加重。给药后12h,大多数原虫自噬泡形成,有的已排出虫体,虫体内有多个膜性消化残余物(图1N),但虫体轮廓完整,细胞器可辨认。给药后16h虫体已瓦解,仅见大小不等的自噬泡,有的仅有膜性消化残余物,但裂殖体、配子体形态未见明显异常。至给药后24h已很难找到崩解虫体。

讨 论

哌喹对疟原虫晚期滋养体超微结构的影响主要表现在食泡膜和线粒体的改变和疟色素形态的变异。食泡膜的内外膜间隙增宽、肿胀或呈螺旋膜,可能通过影响膜上有关酶系而改变了

膜功能。线粒体的肿胀变形等变化导致其生理功能的破坏,线粒体数量的增多及其腔内出现较多多层膜小体,则可能是结构遭到损伤后的一种代偿反应,Howells⁽⁴⁾认为这是疟原虫克服药物作用的一种方式。原虫质膜及红细胞形态无明显改变,表明哌喹有较强的选择作用。至于色素颗粒由散布在胞浆中的单个矩形晶状体逐步变成圆或椭圆球形并凝集成团,其原因有待进一步研究。

将哌喹与氯喹引起的疟原虫超微结构的变化进行比较,发现两者都可引起食泡膜的改变,对环状体、裂殖体和配子体的作用都不明显。所不同者则为:(1)哌喹作用后色素颗粒为圆或椭圆球形颗粒凝集成团,氯喹作用后则仍为矩形晶状体的色素凝集,说明构成结晶的组分可能不同;(2)哌喹作用后对疟原虫线粒体影响较明显,氯喹作用后线粒体则未见明显异常;(3)综观各个时相,氯喹杀虫作用似较哌喹为快。此外我们还观察到氯喹作用后期疟原虫发现很多膜性消化残余物,这可能是疟原虫通过增加食泡的数量以克服氯喹造成的饥饿状态的结果,也可能是疟原虫通过增强自身的代谢和呼吸活性以抵消氯喹作用的一种反应。

参 考 文 献

- 1 Chen L, Qu FY, Zhou YC. Field observations on the antimalarial piperazine. *Chin Med J* 1982; 95: 281
- 2 王国俊. 哌喹治愈三级抗氯喹恶性疟疾3例报道. *中华传染病杂志* 1985; 2: 78
- 3 陈林、郭凤川、戴祖瑞、李从军. 伯氏疟原虫ANKA株模型的建立及其在抗疟药筛选中的应用. *药学报* 1984; 19: 732
- 4 Howells RE, Peters W, Fullard J. The chemotherapy of rodent malaria, XIII Fine structural changes observed in the erythrocytic stages of *Plasmodium berghei berghei* following exposure to primaquine and menotone. *Ann Trop Med Parasitol* 1970; 64: 203

Effects of piperazine on fine structure of erythrocytic stages of *Plasmodium berghei* ANKA strain

CHEN Lin, QIAN Yong-le

(Lab Antimalarial Drug Research, Second Military Medical College, Shanghai 200433)

LI Ze-lin, ZHANG Kui-han, DAI Bao-qiang

(Inst Chinese Materia Medica, Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700)

LIU Ze-fu, WANG Jing-lin

(National Vaccine and Serum Institute, Beijing 100050)

ABSTRACT Piperazine, 1,3-bis [4-(7-chloroquinolyl-4)-piperazinyl-1]-propane, is superior to chloroquine in suppressing malaria parasites, even chloroquine-resistant I-III *P. falciparum* and with a relatively long preventive activity.

The effects of piperazine (6.4 mg base/kg, the dose of ED_{50}) on the fine structure of the erythrocytic stages of *P. berghei* ANKA strain indicated that piperazine exerted its effects mainly on the amoeboid trophozoites. No marked effects on the ring forms, immature or mature schizonts, and ♂ or ♀ gametocytes were observed. A proportion of the trophozoites showed progressively morphological changes such as swelling of the food vacuole membrane 1 h after medication. At 4 h after exposure to piperazine, there appeared in the parasites the swelling of mitochondria, proliferation of the multilamellate membrane body (MB) and enlarged digestive

vacuoles containing round or oval pigment grains in clusters. In some trophozoites, the pigment grains exhibited a very dense appearance. The inter-membranous space between the outer and inner nuclear membranes was swollen. Occasionally, aggregations of chromatin material were prominent within the nucleus 12 h after medication. Autophagocytosis became so marked that most of the parasites were disintegrated and only some membranous residues remained 12-24 h after medication. These results suggest that piperazine first interferes with the physiological function of the food vacuole membrane of the trophozoites.

For comparison, the effects of chloroquine on the fine structure of the parasites were also investigated.

KEY WORDS piperazine; chloroquine; *Plasmodium berghei* ANKA strain; electron microscopy

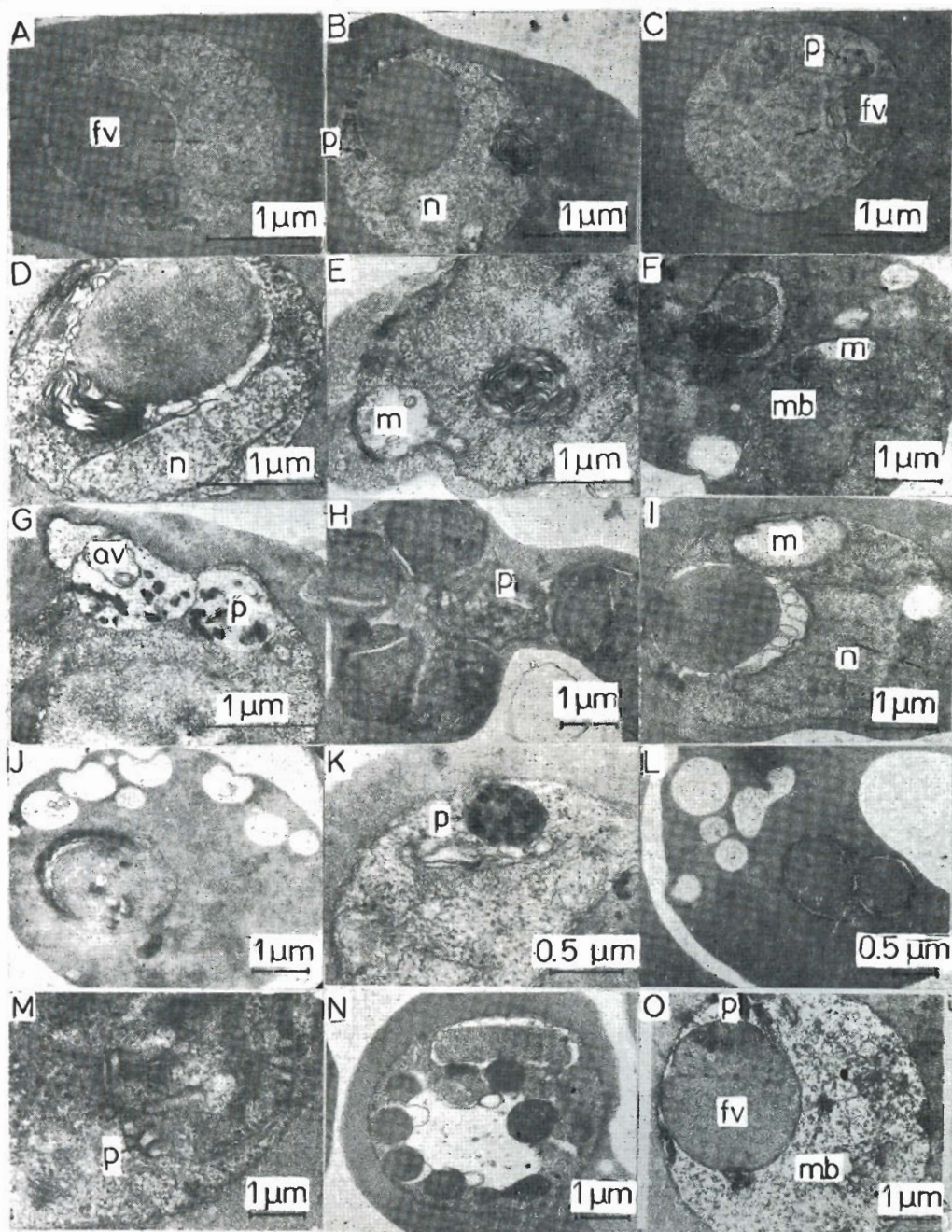


Fig 1. Electron micrographs of *P. berghei* ANKA strain from blood of mice given intra-gastrically piperazine 6.4 mg/kg (A-L) or chloroquine 40 mg/kg (M, N) and untreated trophozoite (O). A,B) Trophozoites after 1 h: swelling of food vacuole (fv) membrane (A) and normal pigment (p) bars (B). C) Trophozoite after 2 h: formation of multilamellate whorls and abnormal pigment grains. D-G) Trophozoites after 4 h: swelling of mitochondrion (m,E), proliferation of multilamellate membrane body (mb, F), and abnormal shape of the clumped digment grains with a very dense appearance (G).H) Schizont after 8 h: normal clumped pigment bars in the residual body. I,J) Trophozoites after 12 h: swollen intermembranous space between the outer and inner nuclear membranes (I) and disintegrated parasite with some membranous residues (J). K) Trophozoite after 16 h: digestive vacuole with clumped round or oval pigment grains which were abnormally electron-lucent in appearance. L) Trophozoite after 36 h: conspicuous whorls of membrane within the cytoplasm. M) Trophozoite after 4 h: normal scattered pigment bars. N) Trophozoite after 12 h: membranous digestive residues.

(See p 351)