

对氟苯丙氨酸对体外培养恶性疟原虫 蛋白质及核酸合成的抑制作用

潘星清 周铭贤

(中国预防医学科学院寄生虫病研究所*)

摘要 氟苯丙氨酸常被认为是苯丙氨酸的拮抗剂,它对体外培养恶性疟原虫生长具有抑制作用, $1 \times 10^{-3}M$ 可抑制虫裂殖体形成。用同步生长的培养疟原虫进行观察表明, $2 \times 10^{-3}M$ 浓度下已可使疟原虫环状体难以发育成滋养体并开始死亡。 $2 \times 10^{-4}M$ 浓度下疟原虫蛋白质合成仍然进行,只是因为虫发育延缓而推迟,而虫丝核酸代谢却明显受到抑制。

研究疟原虫生化代谢的方法之一是利用各种代谢抑制剂,观察它们对疟原虫的作用方式。作者以前曾观察到苯丙氨酸拮抗剂对氟苯丙氨酸^[1]对 *P. Yoelii* 感染小鼠有一定的治疗作用^[2],本文观察了对氟苯丙氨酸对体外培养的恶性疟原虫蛋白质和核酸合成的影响。

材料与方 法

一、疟原虫及其培养方法 人恶性疟原虫 *Fcc1* 株 1979 年引自北京生物制品所。按常规法在 96 孔塑料培养板上用 RPMI-1640/10% 兔血清完全培养液进行蜡烛缸培养。

二、药品来源 4-氟-DL- β -苯丙氨酸为 BDH 产品, RPMI-1640 购自日本水厂公司。3, 5-[³H]-酪氨酸及 [³H]-次黄嘌呤购自中国科学院上海原子核所比活性分别为 25ci/mMole 及 10ci/mMole。

三、药物对虫作用的观察 体外 96 孔板培养系统中,每孔加入一定量药物, 37°C 蜡烛缸中培养 48 小时,其间换气一次;此时取样涂片,姬氏液染色,镜检 10^4 个红细胞,进行疟原虫感染红细胞计数,另设不加药对照孔进行比较。

四、疟原虫蛋白质合成观察 每孔 200 μ l 的培养液 RPMI-1640/10% 兔血清培养系统

中,红细胞压积 5%,含经山梨醇二次同步处理的疟原虫 0.5—1%,加入终浓度为 1 μ ci/ml 的 3, 5-[³H]-酪氨酸,并按一定浓度加入对氟苯丙氨酸, 37°C 蜡烛缸中进行培养,至一定时间取出全部红细胞,以 0.8% 氯化铵水溶液 37°C 处理 5 分钟破红细胞,用上海医工院产混纤微孔滤膜过滤截留疟原虫,生理盐水洗 3—4 次去血红蛋白等污染物, 80°C 烘干,置 5ml POPOP/PPO/萘闪烁液中用 LS-7500 型 Beckman 液闪测定仪测定^[3]。

五、疟原虫核酸合成观察 疟原虫培养及处理方法与蛋白质合成观察方法相同,但改用 [³H]-次黄嘌呤作标记底物^[4]。

结 果

一、对氟苯丙氨酸对体外培养恶性疟原虫的抑制作用 浓度高于 $1 \times 10^{-4}M$ 的对氟苯丙氨酸对培养恶性疟原虫具有明显抑制作用。 $1 \times 10^{-3}M$ 以上浓度时可抑制裂殖体形成;更高浓度下对滋养体形成亦可能产生抑制作用,并使部份疟原虫死亡(见表 1)。

当用经山梨醇二次同步处理的疟原虫感染红细胞进行培养时,0 小时取样中 98% 以上为

* 董小妹、郭菁曾参加部份技术工作特此致谢。

表1 不同浓度对氟苯丙氨酸对体外培养恶性疟原虫的影响

药物浓度	0	$5 \times 10^{-3}M$	$1 \times 10^{-4}M$	$5 \times 10^{-4}M$	$1 \times 10^{-3}M$	$5 \times 10^{-3}M$	$1 \times 10^{-2}M$
	R T S	R T S	R T S	R T S	R T S	R T S	R T S
10^4 rbc 中疟原虫数	91 35 32	100 41 40	58 25 58	13 25 1	17 28 0	11 0 0	7 0 0
	160 28 40	111 37 54	41 47 44	18 27 1	16 17 0	17 1 0	9 0 0
	115 30 38			24 40 7	20 20 0		
	179 27 32			15 49 8	23 23 5		
平均虫数/孔	196	191	136	57	42	15	8
成虫%		2%	31%	73%	29%	92%	96%

R 环状体, T 滋养体, S 裂殖体。

环状体疟原虫(R), 在本实验条件下对照不加药组经3小时培养已开始出现滋养体期疟原虫(T), 经18小时培养则全部R期疟原虫长成T期, 并出现少数裂殖体期疟原虫(S)。培养至30小时, T期疟原虫与S期疟原虫约各占一半, 个别裂殖体虫已释出裂殖子并形成了新的子代环状体。培养42小时样品中疟原虫只存在原有的期S及子代R期, 几乎没有T期疟原虫留存。培养48小时的样品中则大部份为新一代R期疟原虫。

加入 $2 \times 10^{-4}M$ 的对氟苯丙氨酸使环状体

发育推迟约6小时, 滋养体期疟原虫形态亦有变化, 虫体皱缩、色素集中、核肿胀, 着色淡。裂殖体的形成则较对照组推迟约12小时, 且大多数仅含4—6个核, 明显少于对照组。加药组总虫数在48小时培养结束时亦较对照组明显减少。加入 $2 \times 10^{-3}M$ 对氟苯丙氨酸观察组中则难以形成滋养体, 更无裂殖体期疟原虫出现。原有的环状体亦在培养18小时后逐渐死亡(见表2)。

二、对氟苯丙氨酸对培养恶性疟原虫蛋白质合成的抑制作用 经同步处理的疟原虫蛋白

表2 对氟苯丙氨酸(FPA)对体外培养同步恶性疟原虫发育的影响

培养时间	3h	18h	24h	30h	42h	48h
	R T S	R T S	R T S	R T S	R T S	R T S
不加药对照	82 5 0	0 90 2	0 57 51	2 61 42	204 0 41	302 8 26
	98 6 0	0 100 0	0 50 45	7 50 51	225 0 45	380 10 30
	102 0 0	6 85 2	1 63 18	0 51 33	180 6 45	350 20 0
$2 \times 10^{-3}M$ FPA	100 4 0	70 6 0	23 5 0	30 2 0	21 0 0	11 0 0
	93 2 0	68 22 0	17 12 0	21 0 0	14 0 0	8 0 0
	98 5 0	68 10 0	24 13 0	24 0 0	38 0 0	10 0 0
$2 \times 10^{-4}M$ FPA	90 5 0	50 40 0	2 103 1	2 90 0	2 66* 49*	0 55* 40*
	88 3 0	13 89 0	1 95 0	3 91 4	12 34* 72*	0 60* 38*
	96 0 0	15 63 0	6 100 0	6 102 12	0 66* 32*	37 7* 65*

T* 核肿胀滋养体, S* 形态不正常之裂殖体。

质合成在 0—24 小时之间，即从 R 期长成 T 期的过程中进行得比较缓慢，在 S 形成期则明显加强。在裂殖体释出裂殖子过程中可能同时丢失部分疟原虫合成的蛋白质，因此新形成的 R 期疟原虫虫数虽明显增多但放射性标记蛋白质数量却下降。加入 $2 \times 10^{-4}M$ 对氟苯丙氨酸虽可使各期虫发育迟缓，且在形态上发生明显变化，但蛋白质合成却随着虫的发育而仍然进行，若将加入对氟苯丙氨酸组疟原虫的同位素

标记量与同样发育期的对照组虫进行比较时，两者并无明显差别。例如加药组 30 小时培养虫与对照组 24 小时培养虫在发育阶段上相仿，而加药组 42 小时培养虫的发育情况与对照组 30 小时虫相仿，它们相应的蛋白质合成总量亦相近。

加入 $2 \times 10^{-3}M$ 对氟苯丙氨酸时，大部份 R 期虫不能再发育成 T 期，与此同时蛋白质合成亦被抑制，几乎接近于 0 (见图 1)。

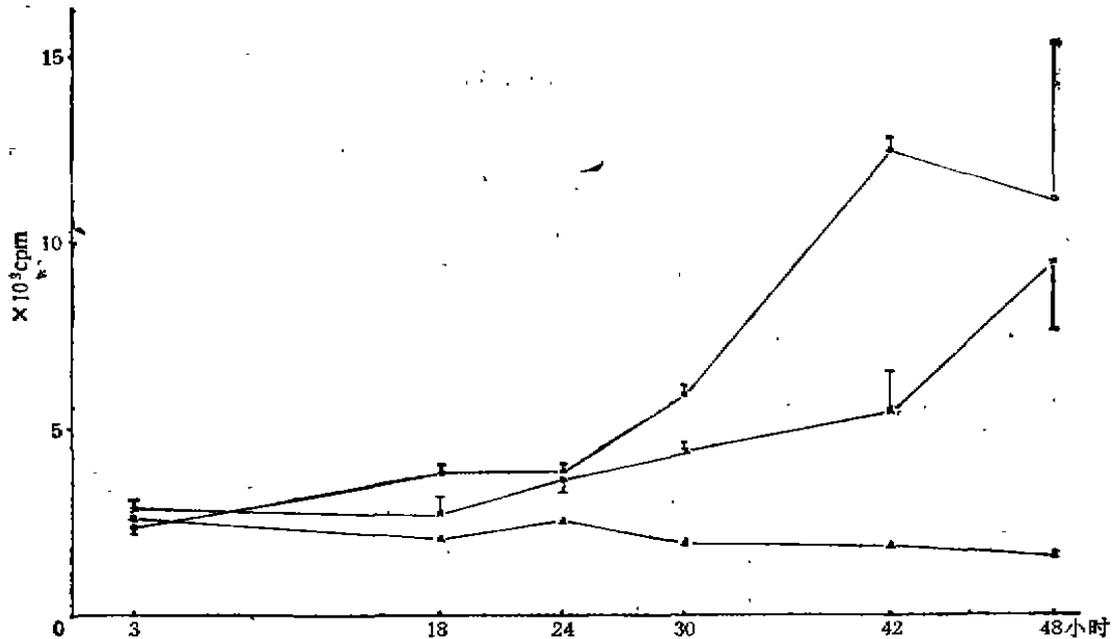


图 1 对氟苯丙氨酸对体外培养同步生长恶性疟原虫蛋白质合成的影响
—○—○—对照 —×—×— $2 \times 10^{-4}M$ 对氟苯丙氨酸 —△—△— $2 \times 10^{-3}M$ 对氟苯丙氨酸

三、对氟苯丙氨酸对培养恶性疟原虫核酸合成的抑制作用 正常体外培养恶性疟原虫的核酸合成主要发生于培养 18 小时之后，随 S 期疟原虫增多和发育标记核酸合成明显上升。加入 $2 \times 10^{-4}M$ 对氟苯丙氨酸使疟原虫核酸合成受到明显抑制。加药组虫的核酸合成不仅比同一培养时间对照组疟原虫低，并且还比生长期相仿的对照虫要低。由此似表明疟原虫的核酸合成因加入对氟苯丙氨酸而受到抑制，而且其抑制可能与蛋白质合成的抑制有所不同。

加入 $2 \times 10^{-3}M$ 对氟苯丙氨酸时虽仍有少量 $[^3H]$ -次黄嘌呤被疟原虫摄入，但与对照组比较差距十分明显(见图 2)。

讨 论

(一) 体外培养中影响疟原虫生长的因素甚多、在本实验条件下疟原虫发育的周期约为 45 小时。 $2 \times 10^{-3}M$ 对氟苯丙氨酸可完全阻断疟原虫的生长发育而 $2 \times 10^{-4}M$ 对氟苯丙氨酸则不能完全抑制疟原虫的发育和繁殖，仅推迟其发育增殖的速度。此时裂殖体释出的裂殖子数量亦有所减少。

酮替芬对体外培养恶性疟原虫生长的抑制在于阻止其滋养体发育，使之不能形成裂殖体。本实验表明对氟苯丙氨酸的主要作用则是使环状体难于形成滋养体，并使环状体逐步死亡。

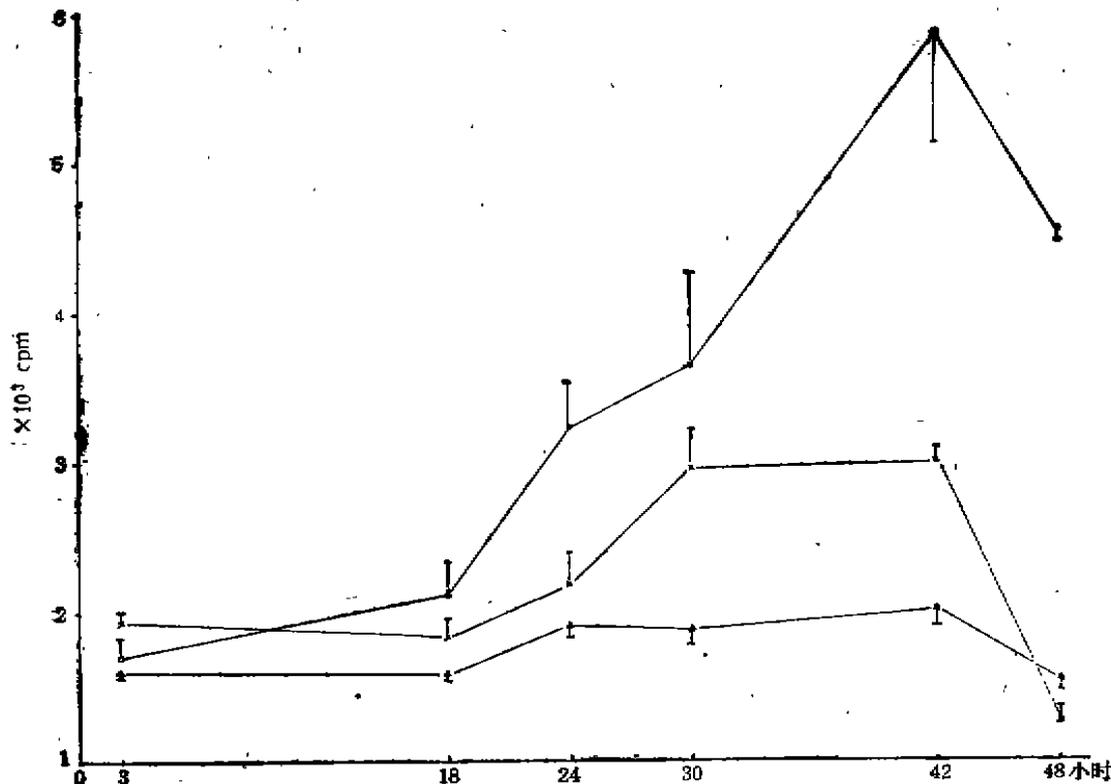


图2 对氯苯丙氨酸对体外培养同步生长恶性疟原虫核酸合成的影响
 —○—对照 —×—×— $2 \times 10^{-4}M$ 对氯苯丙氨酸 —△—△— $2 \times 10^{-3}M$ 对氯苯丙氨酸

少数疟原虫即使形成滋养体,但其形态已不正常,且不能再继续生长,以后逐渐死亡。

(二) 在培养过程中,同位素标记底物必需首先进入红细胞然后才能被疟原虫所利用。作者曾将正常红细胞在加有放射性标记底物的培养液中进行培养比较,并测定完整红细胞中的放射性物质总量,结果表明培养30小时内进入疟原虫感染红细胞及正常红细胞中的放射性标记底物的数量相当接近,仅在培养30小时以后疟原虫感染红细胞中标记底物的数量才显著高于正常红细胞。这一结果表明用整个红细胞进行测定的方法很不理想,因此本实验中采用氯化铵溶液破红细胞,使只有疟原虫留于纤维膜之上,由此测得的结果能较为正确地代表虫体中的标记物的数量。但本方法中仍假定了进入虫体的标记底物均已被结合掺入了核酸或蛋白质之中,实际上必然尚有部份以未结合状态存在。

(三) 从本法测定结果看来,培养恶性疟原虫核酸及蛋白质合成主要发生在24小时之后,通常认为这一现象与疟原虫形成裂殖体后进行大量的合成有关,但是否早期的疟原虫主要以宿主红细胞内原有的大量生化成份如血红蛋白等作为营养来源,在以后才开始依靠由红细胞外摄取?这一方面尚有待研究。

(四) 从本实验测得结果表明:当加入 $2 \times 10^{-4}M$ 对氯苯丙氨酸时疟原虫蛋白质合成数量比同时取样的对照组虫少,但与同样发育阶段的疟原虫比较其蛋白质合成数量相仿;而核酸合成则在两种情况下均较对照虫减少,从这一点看来,对氯苯丙氨酸对疟原虫的作用可能不仅是拮抗苯丙氨酸使之不能掺入蛋白质,而尚有更为重的作用机理,值得作进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 潘星清等 恶性疟原虫 Fcc1 敏感株和 Fcc2 抗氯喹株

蛋白质合成及蛋白质合成拮抗剂对约氏疟原虫抑制的初步观察 中国预防医学中心寄生虫病研究所 1984年年报 117。

- [2] Geary, T. G. 1983 An in vitro assay system for the identification of potential antimalarial drugs. *J. Parasitol* **69**:577.
- [3] Lambros, C et al 1979 Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in cultu-

re *J. Parasitol* **65**:418.

- [4] Peters, W et al 1985 The chemotherapy of rodent malaria XXXVIII. Studies on the activity of three new antimalarials against rodent and human malaria parasites. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **78**:567.
- [5] Wheatly, D.N. et al 1974 p-Fluorophenylalanine and 'Division-related proteins' *Nature* **247**:281.