DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.06.006

硝喹对鼠约氏疟原虫红内期超微结构的影响

周世文* 胡友梅（第三军医大学训练部 药理学教研室） 630038

提 要 感染约氏疟原虫的小鼠，灌服单剂量的硝喹（1mg/kg）后30min到24h，用光镜和透射电镜动态观察了红内期疟原虫的形态变化。结果发现，在光镜下，有些晚期滋养体核大而不能分裂，有些原虫胞浆中有散在的圆形红色颗粒，这些红色颗粒可能是电镜中观察到的自噬泡或膜性残体。在电镜下，最早观察到的是原虫线粒体肿胀，基质空化，粗面内质网扩张和排列紊乱，核糖体脱落和解聚。随后原虫膜性结构增生，在胞浆中形成多层螺纹膜或髓鞘样结构，核膜肿胀，增生，核周间隙增宽。药物作用晚期，原虫结构瓦解，形成大量自噬泡。结果表明，硝喹干扰了疟原虫的膜系统，胞浆系统和细胞核的结构和功能，从多个环节发挥其抗疟效应。

关键词 抗疟药；硝喹；约氏疟原虫；超微结构

硝喹对间日疟原虫、恶性疟原虫、食蟹猴疟原虫和鸡疟原虫的孢子增殖有阻断作用，使蚊胃壁的卵囊数量明显减少，卵囊变小，囊内出现空泡，胞浆固缩，其核不能进行DNA复制，最后卵囊变性，或被吸收，仅留下疟色素，或变为黑孢子[1-4]。硝喹对食蟹猴疟原虫和约氏疟原虫组织期也有明显的抑制作用，使肝组织中的原虫密度明显降低，原虫发生退变，体积变小，核成团块状，且大小不等[5][6]。硝喹还明显抑制约氏疟原虫红内期DNA合成，阻止其核分裂[7]。该药对鸡疟原虫和约氏疟原虫孢子增殖作用的超微结构也作过观察，它能使卵囊的核膜肿胀，核质浓缩，线粒体空泡变，胞浆中出现自噬体和残余体[8][9]。硝喹对疟原虫孢子增殖期、组织期的原虫结构有明显的影响，但对红内期原虫超微结构的影响尚未见报道，本文为进一步探讨硝喹的抗疟作用方式，动态观察了硝喹对鼠约氏疟原虫红内期超微结构的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 虫株：约氏疟原虫(Plasmodium yoelii，BY 265 株），本校寄生虫学教研室提供，每周血传1次，血传15代以上者供实验用。

1.1.2 动物：昆明株小鼠，体重20～25g，雌雄兼用。

1.1.3 硝喹乙酸盐：上海医药工业研究院合成，临用时用吐温80研磨配制。

1.2 方法

1.2.1 疟原虫感染和血液标本采集：每组感染小鼠10只，小鼠腹腔定量接种约氏疟原虫感染3d后，涂薄血膜，吉氏染色观察疟原虫感染率，选红细胞感染率20%以上，分类计数原虫环状体30%以上者作为实验鼠。实验鼠每组6只，共选用实验鼠54只。实验设计采用自身对照法，即各组实验鼠于给药前采血1次，作为对照，采血后灌服单剂量的硝喹(1mg/kg)。实验按时相点分为30min，1、2、4、8、12、16、20、24h组，每组每只小鼠用毛细玻璃管经鼠眶静脉丛采血于对应编号的肝素抗凝试管中，同时涂薄血膜，吉氏染色，制备光镜标本。

1.2.2 疟原虫超薄切片的制备：各时相点采集的血液标本，立即在冰浴下离心800×g，5min，弃血浆后加8%戊二醛2ml，室温下固定30min后，切成1mm³小块，继续在戊二醛中固定2h，冲洗两次后用1%锇酸作后固定，70%～100%丙酮逐级脱水，环氧树脂618包埋，37℃恒温聚合后作超薄切片，经醋酸铀和枸橼

*现在新桥医院 全军临床药理基地

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

酸铅双重染色，用日立H-300透射电镜观察。

2 结 果

2.1 光镜观察

2.1.1 给药前鼠约氏疟原虫：观察血液涂片共54张，在光镜下可见约氏疟原虫红内期发育不同步，从环状体到裂殖体的不同发育阶段均有。滋养体和裂殖体的核吉氏染色呈紫红色，较致密，胞浆呈蓝色，裂殖体的核分裂清晰可见（图1）。

2.1.2 给硝喹后光镜下不同时间点的原虫形态变化：每鼠各时相点涂片2张，共观察涂片108张。给药后1～2 h，部分滋养体核大而不能分裂，4 h以后，部分原虫胞浆稀疏，着色浅淡，胞浆中出现散在的、大小不等的红色颗粒，随着药物作用时间延长，胞浆中红色颗粒进一步增加，堆积，有的原虫中可见深褐色块状物，有的只能看到原虫的轮晕（图2）。

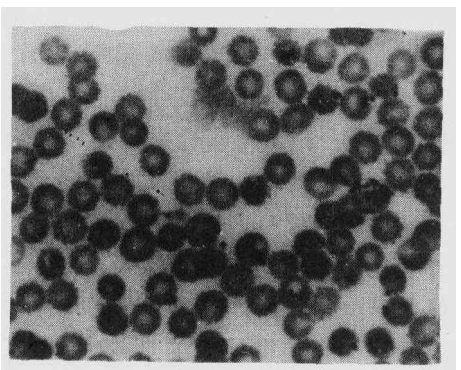


图1 用硝喹前的约氏疟原虫×330

Fig. 1 Plasmodium yoelii before PO. nitroquine. ×330

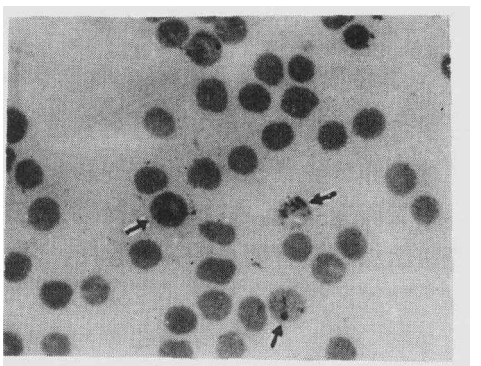


图2 给药后8 h，原虫胞浆中出现散在的、大小不等的红色颗粒（↑）×330

Fig. 2 After treatment with nitroquine at 8 h, red granules scattered over the cytoplasm in the parasites (↑). × 330

2.2 透射电镜观察

2.2.1 给药前鼠约氏疟原虫红内期超微结构：

每组每只小鼠给药前所取标本作超薄切片各2张，共观察超薄切片108张。约氏疟原虫滋养体细胞膜由双层膜构成，外层为宿主红细胞膜，直而规则，内层为原虫质膜，多呈波浪状。滋养体细胞器清晰可见，线粒体为双层膜结构，无嵴，基质均匀；内质网呈囊泡状或短管状，多为粗面内质网，上附有核糖体，滑面内质网较少见；核糖体丰富，为单体或多聚体，细胞核单个，核膜为双层，核膜上有分散的核孔，核质均匀（图3）。

约氏疟原虫裂殖体见有两个以上的核，但核分裂相的特征少见。裂殖体内含有裂殖子的芽状突出，裂殖子可见电子密度增强的棒状体，其周围的原虫质膜内层增厚；胞质可见数个电子密度增高的椭型和圆形颗粒。其线粒体、内质网、核糖体、膜结构同滋养体（图4）。

2.2.2 给硝喹后不同时相点疟原虫超微结构的改变：给药后每组的每只小鼠作超薄切片3张，每个时相点18张，9个时相点共观察超薄切片162张。给药后30min～1h，滋养体的线粒体肿胀，基质空化，内质网扩张，排列紊乱，核糖体从内质网上脱落（图5）。2～4h，原虫质膜模糊，内质网融合，不成网状结构。胞核核膜增生，核周间隙明显扩张，核质呈灶性聚集（图6）。

给药后8～16h，有的原虫胞质结构溶解，形成大量自噬泡，泡中有未完全消化的残留物质；有的原虫膜性结构增生，形成同心圆排列的髓鞘样结构（图7）。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

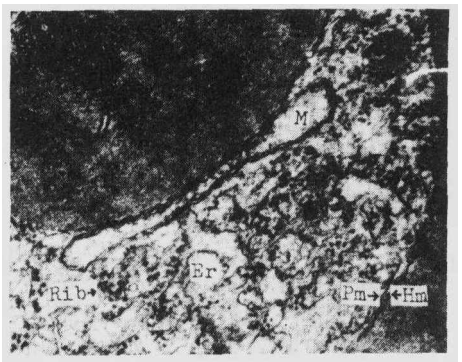


图3 给药前约氏疟原虫滋养体

宿主红细胞膜(Hm),原虫质膜(Pm),线粒体(M),核糖体(Rib),内质网(ER) ×48 000

Fig. 3 Electron micrograph of trophozoite of Plasmodium yoelii before treatment with nitroquine

Host RBC membrane(Hm), Parasite membrane (Pm), Mitochondria (M), Ribosome (Rib), Endoplasmic reticulum (ER). ×48 000

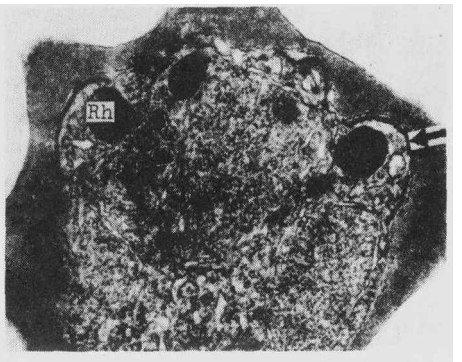


图4 裂殖体内含3～4个裂殖子，棒状体 (Rh)，裂殖子周围原虫质膜内层增厚 (↑) ×32 000

Fig. 4 Schizont containing merozoites, Rhoptres (Rh), Double inner membrane, in region of merozoites budding (↑). ×32 000

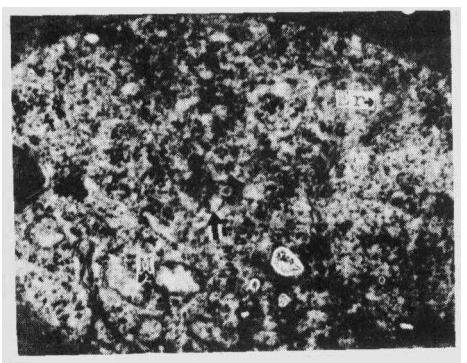


图5 给药后30min，滋养体线粒体肿胀 (M)，内质网扩张 (ER)，核糖体脱落 (↑)。×34 000

Fig. 5 Trophozoite, 30min after treatment, Mitochondria swelling (M), dilatation of endoplasmic reticulum(ER), degranulation of rough endoplasmic reticulum (↑). ×34 000



图6 给药后4h，滋养体核膜增生，核周间隙扩大 (↑)。×36 000

Fig. 6 Trophozoite, 4h after treatment, nuclear membrane proliferated and perinuclear gap enlarged (↑). ×36 000

给药后20～24h，裂殖体中出现多层膜包绕的复合结构，内有细胞核，多层膜小体，内质网和核糖体等胞浆成分，其余大多数原虫完全解体，胞浆消失，出现大小不等的膜性残体（图8）。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

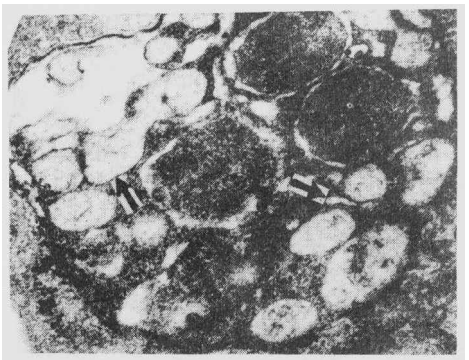


图7 用药后12h，原虫变性，形成大量自噬泡（↑）×27 000

Fig. 7 Degenerated parasite, 12h after treatment, showed a number of autophagocytotic vacuole (↑). ×27 000

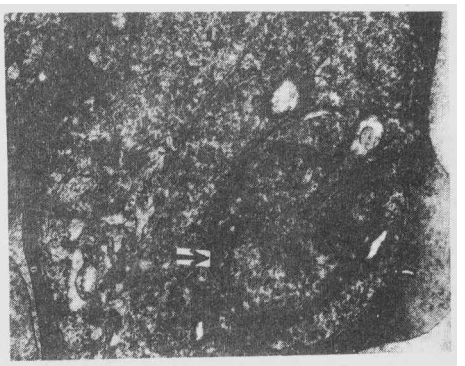


图8 给药后20h，裂殖体的多层膜结构中含有细胞核，髓样小体和胞浆成分（↑）×32 000

Fig. 8 Schizont, 20h after treatment, multilamellate complex structure, containing nucleus, myelinic bodies and cytoplasm (↑). ×32 000

3 讨 论

硝喹能引起鼠约氏疟原虫多方面的形态学改变。在光镜下，给药后早期（1～2h），滋养体出现异常大的核，但不能分裂发育成裂殖体。4h后，疟原虫胞浆中出现圆形或不规则形的红色颗粒。在猴疟和人疟，当宿主服用硝喹后未发现此现象，但在鸡疟的卵囊中有类似现象，而这些红色颗粒中，用Feulgen染色却未见DNA存在，认为这些颗粒并非真正的细胞核[4]。这种红色颗粒在4h后的各时相组的小鼠血涂片中普遍存在，并随药物作用时间延长而加重。这些红色颗粒可能与电镜下观察到自噬泡或膜性残体相似，是否为胞浆中的变性物质，有待进一步证实。

在电镜下，最早观察到的是硝喹明显地影响了疟原虫的线粒体、内质网和核糖体的正常形态。本实验发现的内质网扩张，核糖体脱落可能是导致疟原虫蛋白质合成受抑制的因素之一。我们曾经发现，硝喹在体外与疟原虫作用1h，即能明显抑制疟原虫蛋白质的合成[10]。2h以后发现疟原虫的核膜增生，胞浆中出现多层膜小体，这可能是疟原虫膜系统受到损伤后的一种代偿反应，或者是药物作用后的一种退化性表现。Aikawa[11]认为，多层膜结构中含有细胞色素氧化酶，具有线粒体样功能，是疟原虫为克服药物作用而形成的膜性结构增生。硝喹作用12h后，有些原虫形成大量自噬泡或膜性残体，而虫体结构瓦解。这可能是药物作用后，胞浆成分受到损伤，原虫为消除变性的胞浆成分而产生自噬现象，结果导致大量的自噬泡形成。实验结果表明，硝喹能明显影响疟原虫红内期细胞核的形态和功能，对线粒体、核糖体的影响及自噬泡的形成与黄复生等观察到的硝喹对约氏疟原虫卵囊的影是一致的[9]。本文还发现硝喹对疟原虫内质网和膜系统有明显的影响。疟原虫核不能分裂，这与DNA合成受抑制有关[7]。线粒体的改变，可能会影响疟原虫的生物氧化和能量代谢。这说明硝喹干扰了疟原虫多种结构，通过多种方式而发挥其抗疟效应。

（本文承蒙本校电镜室协助疟原虫超微结构标本制备；寄生虫学教研室王兴相教授，病理解剖学教研室史景泉教授指导超微结构观察，谨致衷心感谢。）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参 考 文 献

1. 刘连珠 任慧娴 梁明书，等。复方硝喹对间日疟原虫孢子增殖期的作用。中华医学杂志 1980；60(7)：428
2. 王兴相 冯崇英 梁明书，等。复方硝喹对恶性疟原虫孢子增殖期的作用。中华医学杂志 1980；60(8)：483
3. 冯崇英 胡友梅 柳 新，等。硝喹对食蟹猴疟原虫孢子增殖的作用。中国药理学报 1982；3(4)：273
4. 王兴相 胡友梅 董丽娟，等。硝喹 (Nitroquine) 阻断鸡疟原虫孢子增殖机制的研究。药学学报 1981；16(5)：334
5. 胡友梅 王兴相 邓宝忠，等。硝喹对食蟹猴疟原虫组织期的作用。中国药理学报 1986；7(1)：78
6. 张有植 赵子鹏 王兴相，等。硝喹对大白鼠体内约氏疟原虫红细胞外期发育的影响。第三军医大学学报 1987；9(2)：169
7. 庞林华 胡友梅。硝喹($CI_{6,79}$)对[^{3}H]次黄嘌呤在体外参入约氏疟原虫核酸的影响。中国药理学报 1988；9(4)：349
8. 胡昌仁 陈佩惠 陈建明，等。五种抗疟药对鸡疟原虫孢子增殖期作用的电镜观察。中国药理学报 1989；10(5)：434
9. 黄复生 王兴相。硝喹对约氏疟原虫卵囊和子孢子作用的观察。第三军医大学学报 1991；13(1)：1
10. Zhou SW, Hu YM. The effects of nitroquine acetate on the protein synthesis of Plasmodium yoelii in vitro. 5th Southeast Asian and Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists. Abstracts 1988; 7:104
11. Aikawa M. Variations in structure and function during the life cycle of malaria parasite. Bull WHO 1977; 55(2-3):137

(收稿：1991-04-08；修回：1991-06-27)

The effects of nitroquine on the ultrastructures of nitraerythrocytic stage of Plasmodium yoelii in mice

Zhou Shiwen, Hu Youmei (Department of Pharmacology, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract After a single oral dose(1 mg/kg) of nitroquine to the mice infected with Plasmodium yoelii, the morphological changes of the parasites were studied with optical and electron microscopy. Enlarged nucleus and some red granules scattered over the cytoplasm in the late trophozoites were observed under optical microscope, which may correspond to the autophagocytic vacuoles or membranous residual bodies seen under electron microscope.

Thirty minutes after the drug administration, the number of mitochondria with matrix cavitation was increased, the endoplasmic reticulum dilated, and ribosomes separated, detached, or disaggregated. Then the pelliculous complex and nuclear membrane of the parasites proliferated to form multi-layered structure with spiral curves or myelin sheath-like structure in the cytoplasm. The nuclear membrane was swollen and proliferated and the perinuclear cisterna was widened. In the late stage of drug action, the structure of the parasites was broken down to form a large number of autophagocytes.

The findings indicate that nitroquine interferes with the structure and function of the cell membrane, cytoplasm and nucleus of malaria parasites and exerts its anti-malarial effects from many aspects.

Key words antimalarial drug; nitroquine; Plasmodium yoelii; ultrastructure

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net