DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.04.004

叶酸对硝喹小肠毒性防护的机制探讨

胡友梅 聂 梅（药理教研室）

提 要 本文用232只小鼠进行4组实验。（1）灌服硝喹醋酸盐（N，570mg/kg×1）后分别肌注生理盐水（NS组）和叶酸（NF组，8mg/kg×1）。药后96h，NS组小肠绒毛显著减少、变短、上皮脱落、隐窝细胞退变，而NF组变化轻微。（2）硝喹能显著降低小肠DNA含量，随剂量增大和时间延长（至72h）而越明显。（3）分别伍用叶酸及甲酰四氢叶酸钙后，与NS组比较，小肠DNA含量降低未见明显差异。（4）伍用叶酸后〔^{3}H〕TdR参入小肠DNA量比NS组增多。以上结果提示叶酸能加速DNA合成，从而有利于小肠粘膜上皮细胞的修复。

关键词 制叶酸—药效学；硝基喹啉类—毒性；脱氧核糖核酸—生物合成；中毒—预防和控制

硝喹是一种抑制二氢叶酸还原酶的抗疟药[1]，其毒性较小，但50倍临床治疗量可使狗出现严重肠道毒性症状[2]。使用大剂量复方硝喹（硝喹与氨苯砜等量配伍）可出现同样的毒性反应。合用叶酸和甲酰四氢叶酸钙后可明显降低动物的死亡率和减轻小肠的毒性反应[3]。本文进一步探讨叶酸防护作用的机理。

材 料

药物 硝喹醋酸盐（简称硝喹）由上海医药工业研究院合成（批号830401）。叶酸粉剂（常州制药厂，批号75—05—30），应用时加0.1N NaOH溶解配成溶液。甲酰四氢叶酸钙（上海第十二制药厂，批号811201），DNA（上海牛奶公司综合厂，批号810616）。〔^{3}H〕TdR（上海原子核研究所，放射性强度41.5Ci/mmol，放射性浓度1mCi/ml）临用时加生理盐水稀释10倍，即10μCi/0.1ml作静脉注射。

动物 小鼠，昆明株，雌雄不拘，体重18～22g。

方法与结果

1. 硝喹对小鼠小肠毒性作用及伍用叶酸后的肠粘膜形态变化

45只小鼠，随机分9组，每组5只。用20%吐温80将硝喹（N）配成乳剂后分别给8个组小鼠一次灌服570mg/kg（相当口服的LD_{50}）。然后给其中4组肌注生理盐水（NS组）0.1ml，另4组肌注叶酸（NF组）8mg/kg一次。一组不给硝喹，只灌服20%吐温80 0.2ml和肌注生理盐水作对照（C组）。C组在灌注后24h，服硝喹的NS及NF组在药后24、48、72和96h分别活杀1组（5只），取出全部小肠用生理盐水冲洗肠腔，纵行剪开、铺平，以Bouin氏液滴于粘膜表面进行初固定，随即用一小玻棒作蕊，将小肠从十二指肠端卷至回肠末端，而后置Bouin氏溶液中固定24h，用石腊包埋。同心圆卷肠按肠纵向切片，HE染色。在显微镜下从卷肠中心向上、下、左、右四方推进直至卷肠最外层。以低倍视野（直径1.642mm）范围计算每层小肠的绒毛数。然后累计上、下、左、右四方各层绒毛数；又以高倍视野（直径0.365mm）范围计算每层小肠隐窝数及其中的分裂细胞和坏死细胞数，以累计数计算出每100个隐窝中的分裂细胞和坏死细胞数，同时还观察绒毛与隐窝细胞的形态改变。

结果见表1，NS组在用药后96h绒毛数目显著减少，与对照的C组比较相差显著，而NF组在药后各时间组绒毛数目未见明显减少。NS 96h组的5只鼠中有4只部分小肠绒毛变短、稀疏、绒毛上皮脱落（图1 B_1），部分有新生上皮被覆；而NF 96h组的5只鼠绒毛基本完好。隐窝中分裂细胞无论是NS或NF组在药后24h均明显下降，96h更甚，特别是NS组，而NF组基本稳定在同一水平，但NS及NF组在相应时间的各组差别不显著。隐窝的坏死细胞数随时间推移而逐步增加，特别是NS组，但NS与NF组比较差别不显著。NS 96h组5只鼠中3只的隐窝细胞出现变性肿胀，核内空泡形成以至空化（图1B_2），而NF 96h组未见这些现象。

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

表1　小鼠肌注叶酸（8mg/kg）对一次灌服硝喹（LD_{50}）后小肠绒毛、隐窝分裂细胞数及坏死细胞数的影响

药后时间(h)	绒毛数($\bar{X}\pm SD$)		分裂细胞数/100隐窝($\bar{X}\pm SD$)		坏死细胞数/100隐窝($\bar{X}\pm SD$)	
	NS	NF	NS	NF	NS	NF
对照	626.6±44.3		113.4±49.8		0.11±0.15	
24	623.7±34.4	597.0±58.2	58.5±20.6**	43.0±12.3**	2.6± 2.5**	1.8± 2.6**
48	621.0±60.4	699.4±113.9	27.4±12.5**	25.8±10.9**	14.1± 6.7**	25.3±18.3**
72	633.8±64.5	665.6±53.1	36.1±19.0**	26.8±11.7**	13.3±14.3**	16.6± 5.4**
96	507.8±104.5**	603.0±63.1	16.1± 7.3**	26.6±10.5**	54.4±13.6**	30.6±21.6**

注　n = 5　NS = 生理盐水组　NF = 叶酸组　** 与对照组比 $P<0.01$

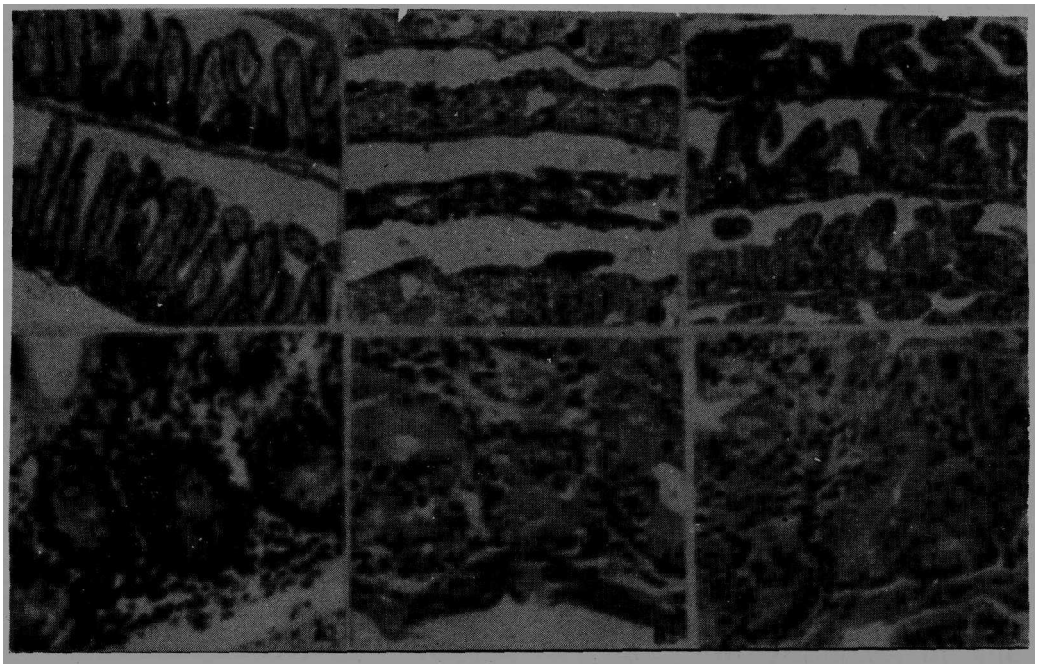


图1　小鼠口服单剂量硝喹（LD_{50}）和合用叶酸（8mg/kg im）96h小肠绒毛及隐窝形态改变

A_1、B_1、C_1均为卷肠，HE×90；A_2、B_2、C_2为隐窝，HE×800

A：对照组（服吐温80）

B：服硝喹合并肌注生理盐水。B_1图示绒毛上皮脱落；B_2隐窝细胞变性肿胀，核内空泡形成以至空化，部分细胞坏死（箭头所示）

C：硝喹合并肌注叶酸，绒毛上皮以及隐窝细胞基本完好。

2．硝喹对小鼠小肠DNA含量的影响　取小鼠48只分8组，分别进行以下处理，即不给药组，一次灌服20%吐温80 0.4ml/只，硝喹570 mg/kg(LD_{50})，399mg/kg ($0.7\times LD_{50}$)，279.0 mg/kg($0.49\times LD_{50}$)。这5组动物均于药后72h活杀；另3组在灌服硝喹570mg/kg后8、24及48h活

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

杀。用脱颈椎方法将小鼠处死，立即剖开胸、腹部，从心耳插入注射器针头，用生理盐水冲洗全身血液，直至肠系膜血管呈现无色为止。取空肠一段，注入生理盐水冲洗肠腔，除去肠系膜组织。剪开小肠，用滤纸将肠壁吸干，剪碎（以上操作均在冰盘中进行），取约500mg组织称重，置玻璃匀浆器中加入冷冻生理盐水 1ml，研磨成匀浆，将匀浆转移至离心管，并用2ml 冷冻生理盐水将匀浆管洗净，将洗液合并至离心管中。按Schneider 氏法[4]提取DNA，再按改良二苯胺法[5]测定 DNA含量。

结果用279mg/kg组，小肠DNA 含量较不用药组明显降低，当剂量增至570mg/kg时，DNA 含量下降更为明显（表 2），即DNA由559.7±38.8μg/100mg湿组织下降至 458.1±58.6μg/100mg 湿组织（$P<0.001$），下降率18.4%。用570mg/kg剂量后8h，见小肠DNA含量下降，72h下降更明显，与不给药或吐温组比，差异非常显著（$P<0.001$）（表 3）。

表2　小鼠服不同剂量硝喹后的小肠DNA含量

组别	剂量 (mg/kg×1)	动物数	DNAμg/100mg湿组织 ($\bar{X}\pm SD$)
不给药	/	8	561.4±41.2
吐温80	0.4ml	8	559.7±38.8
硝　喹	279.0	5	486.6±51.9*
硝　喹	399.0	5	525.2±50.0
硝　喹	570.0	10	458.1±58.6***

与吐温组比　* $P<0.05$　*** $P<0.001$

表 3　小鼠服硝喹570mg/kg (LD_{50}) 后不同时间的小肠DNA含量

组别	药后时间 (h)	动物数	DNAμg/100mg 湿组织 ($\bar{X}\pm SD$)	下降 (%)
不给药		8	561.4±41.2	
吐温80		8	559.7±38.8	
硝　喹	8	8	503.3±73.0	10.4
硝　喹	24	5	500.9±64.4	10.8
硝　喹	48	5	491.2±38.4**	13.4
硝　喹	72	10	458.1±58.6***	18.4

与吐温组比 ** $P<0.01$　*** $P<0.001$

3．硝喹分别合并叶酸及甲酰四氢叶酸钙对小鼠小肠DNA含量的影响

给72只小鼠（分成10组，n = 7 或 8）灌服硝喹 LD_{50}的同时，分别一次肌注叶酸（2、4、8、16及32mg/kg）和甲酰四氢叶酸钙（0.5，1及 2mg/kg）动物的处理，DNA 的提取和含量测定均与实验2相同。提取测定均在药后72h 进行。

结果用硝喹和伍用叶酸（2、4、8、16 及 32 mg/kg）或甲酰四氢叶酸钙（0.5、1 及2mg/kg）各组DNA的含量，经统计学处理均无明显差别。

4．叶酸对[^{3}H]TdR参入DNA的影响

取小鼠55只随机分11组（每组 5 只）。1 组灌服 20%吐温80 0.4ml/只，同时肌注生理盐水0.1ml/只，5 个组灌服硝喹LD_{50}同时肌注生理盐水0.1ml/只（NS）；另 5 个组灌服硝喹 LD_{50} 同时肌注叶酸 8mg/kg（NF）。在药后 8、24、48、72和 96h 两种处理的动物各分别活杀 1 个组。活杀前 2 h 给每只鼠从尾静脉注射〔^{3}H〕TdR 10μCi。动物处理方法、DNA 提取及测定与实验 2 相同。对提取的DNA液分成两部份，一部份作DNA 测定，另一部份用10N KOH调pH至 8，离心取上清液0.1ml 滴于49型玻璃纤维滤膜，在室温过夜晾干，将每片滤膜置一闪烁杯中，加闪烁液 5ml（由 PPO 3g，POPOP 0.3g，甲苯加至1000ml组成）。用FJ-2101g型双道液体闪烁计数仪（国营二六二厂产品）测定其cpm值，然后换算至cpm/mg DNA。

结果用硝喹后，不论肌注生理盐水或叶酸，DNA的含量均随时间后延而逐步下降，与对照组比差异显著，但肌注生理盐水和叶酸两组比较，经统计学处理差异不明显。而〔^{3}H〕TdR对DNA 的参入量（cpm值），则叶酸组高于生理盐水组，尤以48及72h 2 个时相点差异非常显著（见图 2）。

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

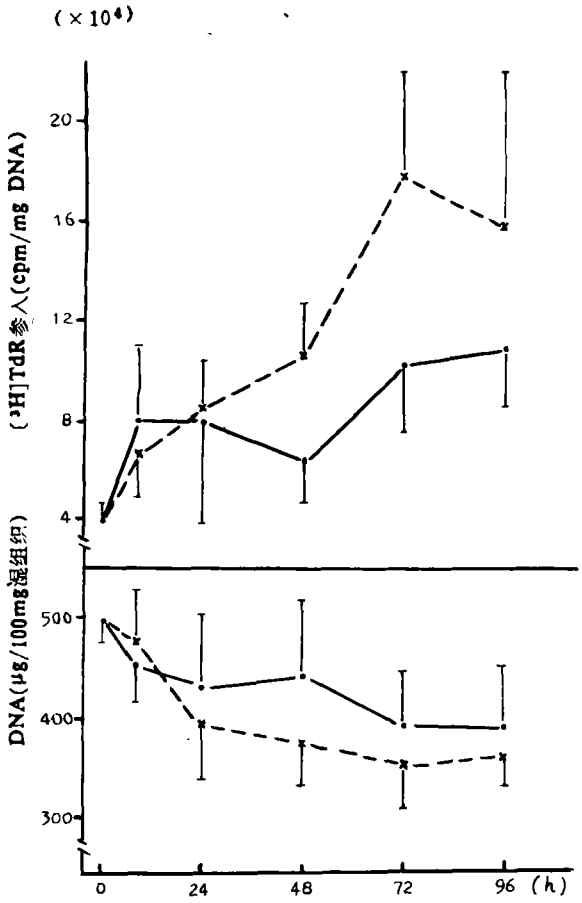


图2 小鼠服硝喹LD_{50}和伍用肌注叶酸对小肠DNA含量及〔³H〕TdR参入DNA的影响。

NS(·—·)、NF(x---x)

讨 论

经病理组织学观察，小鼠灌服硝喹LD_{50}后96 h小肠病变才显得较为严重，这与以往毒性实验所见小鼠中毒后第4或第5天才出现死亡高峰是相吻合的。小肠的DNA含量在药后48 h即明显下降，随药后时间延长而越加降低。形态学改变较DNA含量降低出现得迟一些。提示硝喹能抑制DNA的合成，以致严重影响隐窝细胞分裂，使绒毛上皮细胞更新减慢，甚至缺乏来源(正常小鼠空肠细胞更新周期为41.8h[6])，从而不能及时递补脱落的绒毛被覆上皮细胞，这种现象与我们以往在狗的实验中所观察到的结果相一致。

叶酸对硝喹中毒有一定的防护作用。服半数致死量的硝喹后，小肠隐窝细胞有丝分裂相逐渐减少，到药后96 h仍继续下降，而合用叶酸后，在药后48 h有丝分裂相减少的现象便趋稳定，小肠DNA的含量虽不比生理盐水组高，但〔³H〕TdR对DNA的参入量却明显高于生理盐水组。小肠上皮细胞DNA经硝喹毒性损伤后能自行修复，中毒后48h〔³H〕TdR参入量为对照组的160.3%。合用叶酸后，〔³H〕TdR参入更快，48h参入量为对照组的264.1%。以上说明补充外源的叶酸后，可以加速DNA的合成，使有较多新生细胞来更新绒毛上皮。从形态学上也观察到小肠绒毛上皮结构基本完整。本实验只用一次叶酸，若硝喹中毒后连续多次使用叶酸，其疗效可能更佳。

(本文病理组织切片由第三军医大学防原教研室病理组古德全、罗长坤二同志协助制成，特此致谢)

参 考 文 献

1. 丁燕玲，等。双-(2,4-二氨基喹唑啉-6-取代氨基)烷烃或芳烷烃衍生物对大鼠肝脏二氢叶酸还原酶的抑制作用。医药工业 1984；(12)：6
2. 胡友梅，等。对抗疟药硝喹毒性作用的观察和安全剂量的确定。解放军医学杂志 1981；6(4)：211
3. 胡友梅，等。复方硝喹的毒性作用及其防治的实验研究。第三军医大学学报 1986；8(1)：25
4. Schneidder WC. Phosphorus Compounds in Animal Tissues I. Extraction and Estimation of Desoxypentose Nucleic Acid and of Pentose Nucleic Acid. J Biol Chem 1945; 161:293
5. 朱俭，等编著。生物化学实验：脱氧核糖核酸定量测定—改良二苯胺法。上海：上海科技出版社，1981：124～127
6. 程天民，等编。防原医学：急性放射病的病理变化。上海：上海科技出版社，1985：201

(收稿日期：1987年12月29日，修回日期：1988年5月1日)

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

Study on the Prophylactic Effect of Folic acid on the Toxicity of Nitroquine

Hu Youmei and Nie Mei

(Department of Pharmacology, Third Military Medical College)

232 mice were utilized in this study. (1) After administration of nitroquine 570mg/kg×1 po, the mice were given with normal saline(NS)and folic acid(NF,8 mg/kg×1 im)in two subgroups respectively. 96h later, decrease in number and shorter in length of intestinal villi, and necrosis of epithelial cells, especially the crypt cells showed markedly in NS group, but much mild in NF group. (2) The DNA contents in the tissue of the small intestine showed decrease after nitroquine administration, & markedly in the larger dose and as the time going on. The values of cpm after the[^{3}H] TdR incorperation into DNA were much higher in NF group than in the NS group. The results suggest that the DNA synthesis in small intestine is promoted by folic acid, so that it is advantage for the repairing of damaged intestinal mucosa.

Key words: Folic acid/pharmacodynamics; Nitroquinolines/toxicity; DNA/biosynthesis; Poisoning/prevention and control

---

(下转292页)

five aspects between alveolar epithelium and capillary endothelium: (1) Number of strands (4.54±1.86; 2.64±0.67). (2) Width of tight junction (0.399±0.268; 0.175±0.075 micron). (3) Area of tight junction (0.353±0.35; 0.11±0.098 square micron). (4) Total length of strands (3.97±3.5; 1.47±0.916 micron). (5) Morphology of strands and pattern of the tight junction. However, there was no significant difference in density of strands of tight juuctions between the alveolar epithelium and capillary endothelium. The functional significance of these differences between alveolar epithelium and capillary endothelium was discussed in detail.

Key words: Freezing etching/method; Capillaries/cytology; Pulmonary alveolo/cytology

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