

实验研究

青蒿素和氯喹对体外培养的红内期恶性疟原虫超微结构的影响

叶祖光* 李泽琳* 傅湘琦** 柳和培** 高敏新*** 李桂琴*

青蒿素抗疟作用的研究,以往多局限于伯氏鼠疟(*P. berghei*)试验模型上,直接应用人的恶性疟为试验材料,将会有益于克服因使用鼠疟、猴疟等动物类疟原虫而造成的种间生物学差异对试验结果的影响。以体外培养的恶性疟为试验对象,可以在排除体内各种复杂因素干扰的条件下,直接观察青蒿素对疟原虫的作用。因此,我们利用电子显微镜(以下简称电镜)技术观察青蒿素对体外培养的红内期恶性疟超微结构的影响,并以氯喹作对照比较。

材料与方法

FCC₂/HN株恶性疟原虫用蜡烛缸方法连续体外培养^(1,2),所用的培养基为加入一定量Hepes缓冲剂的RPMI 1640培养液。操作步骤如下:(1)在直径为3.5厘米的塑料平皿中培养恶性疟,当感染率达6~10%时,分五组进行试验:1×10⁻⁷M青蒿素组、5×10⁻⁷M青蒿素组、1×10⁻⁶M氯喹组、0.02%无水乙醇组和空白对照组。各组分别于加入药物后0.5、1、2、4、12、16小时取样(5×10⁻⁷M青蒿素组0.5和2小时未取样)观察。(2)根据药物作用时限的不同而要在取样前相应不同的时间,将各个组别的平皿中正常培养基去掉,以含有试药的培养基取而代之,这样使药物作用时相不同的疟原虫样品可以同时进入下一步的电镜标本制备过程。(3)电镜标本的制备过程:用4%戊二醛和1%锇酸固定液分别予固定和后固定;在用一系列递增浓度的丙酮脱水后,再用Quito 812包埋剂包埋;用LKB-V型超薄切片机所切得的超薄切片用醋酸铀和枸橼酸铅染液分别进行电子染色,然后在H-500型电镜下进行观察。

结 果

一、红内期恶性疟无性体的正常超微结构

从图1、2(图在封三,下同)看出,一般红内期

疟原虫是由双层膜所包围。虫体胞浆中布满核蛋白体以及常有一个较大的食泡(F),食泡中含有规则的晶体形的色素颗粒,由于用高pH的枸橼酸铅染色的缘故,本来电子密度较高的色素颗粒溶解而留下空白透明区。在滋养体期常见有胞口结构。疟原虫的核膜是由双层膜所组成,核膜上有核孔。恶性疟的线粒体内腔常有少量的管状嵴,有时尚可见到髓鞘样的多层膜小体(Multilaminated-Membrane body)。晚期环状体所感染的红细胞中开始出现Maurer氏裂隙(C),而滋养体所感染的红细胞膜下则还有小瘤节(Knob)样突出物(K)。0.02%无水乙醇组疟原虫超微结构无明显改变,故略。

二、青蒿素对红内期恶性疟无性体超微结构的影响

加1×10⁻⁷M青蒿素后0.5~1.0小时,疟原虫超微结构基本上没有见到异常变化,在加药后2~4小时30%左右的疟原虫开始出现病理变化;而当剂量增至5×10⁻⁷M时,在药后1小时疟原虫的超微结构便出现异常变化。尽管如此,两个剂量水平的青蒿素所造成的病理损伤特征并无明显区别,故一并描述如下:在青蒿素的作用下,疟原虫核的两层膜间隙明显地水肿并增宽,而且虫体胞浆中常伴有自噬泡形成(图3);在胞浆中也常见肿胀的内质网,有些彼此相互融合形成一个大空泡(图4)。纳虫空泡膜和虫体限制膜之间的间隙也有增宽现象,在增宽的膜间隙内还有一些似为虫体所排出的胞浆团块(图5)。在感染的红细胞浆中也有些增殖的膜结构,它类似于疟原虫的多层膜小体(图6)。

除了上述膜系结构的变化外,虫体胞浆中还常有自噬泡的形成,其中含有一些虫体胞浆成分但却没有色素颗粒(图7),有的疟原虫完全解体,形成大小不

* 中医研究院中药所; ** 中医研究院中心实验室电镜室; *** 卫生部生物制品研究所

等的自噬泡散布于红细胞浆中。

恶性疟的线粒体膜和胞口结构未见异常变化；同时疟原虫的裂殖体也对青蒿素不很敏感，裂殖体的“出芽”以及棒状体和微丝等原虫结构未见异常（图8）。

三、氯喹对红内期恶性疟无性体超微结构的影响

加 10^{-6} M 氯喹后 0.5 小时，疟原虫便出现明显的病理变化：在虫体胞浆中形成大自噬泡，其中不仅含有虫体胞浆成分而且还有一些色素颗粒（图9），而且有时可见自噬泡被排出虫体，进入红细胞中；在加药后 12~16 小时，疟原虫的自噬现象更为严重，以致许多疟原虫解体，仅有若干大小不等的自噬泡残留在红细胞浆中。此外，在氯喹作用的后期，疟原虫的另一个形态学上的变化特征是在虫体胞浆中出现较多的食泡样结构，它们有时有相互积聚成一团的现象（图10）。一般疟原虫的细胞核对氯喹的作用不敏感，即使在虫体胞浆几乎完全解体时，核结构仍保持正常形态（图11）。

讨 论

体外培养的 FCC₂/HN 株恶性疟的超微结构和其他种株的恶性疟的超微结构基本相同⁽³⁾。尽管恶性疟是一种哺乳类疟原虫，它也具有一些哺乳类疟原虫的形态特征，例如色素颗粒呈晶体形且易溶于硷性溶液中，但是它在另一些方面又类似鸟类疟原虫，其中包括线粒体内腔有管状嵴以及胞口内径较大，而且在大食泡中具有消化血红蛋白的功能。因此红内期恶性疟在形态学上是一种较独特的哺乳类疟原虫。在电镜下也观察到，在感染的红细胞中有 Maurer 氏裂隙出现，且有小瘤节贅生，一般认为，这些小瘤节在恶性疟从未梢血中消失进入内脏深部小血管进行裂殖生长过程中起着决定性的作用^(4,5)。

青蒿素是一种含有过氧桥的倍半萜内酯化合物，在化学结构上它和已知的抗疟药迥然不同，这就有可能使它在抗疟作用方式上具有独特之处。有人试验证明⁽⁶⁾，大量的对氨基苯甲酸和叶酸均不能拮抗青蒿素的抗疟作用，因而青蒿素可能不是通过干扰叶酸代谢而奏效的；在色素凝集试验中也证明青蒿素的抗疟作用部位不同于氯喹⁽⁷⁾；此外，在体内试验中电镜下观察到，青蒿素的作用主要是引起伯氏鼠疟膜系结构的损伤⁽⁸⁾，其中包括限制膜、食泡膜、线粒体膜和核膜均出现肿胀且膜间隙增宽。在本试验中也观察到相类似的形态学变化，在青蒿素的作用下，恶性疟的核膜和限制膜的膜间隙明显地水肿并增宽以及内质网呈囊

泡状肿胀。所有这些变化在药后 1~4 小时便已出现，其中尤以核膜的损伤为最甚。恶性疟线粒体的膜结构在青蒿素作用下没有明显病理变化，这和以伯氏鼠疟为试验模型所获得的结果有所不同。恶性疟的线粒体在形态上不同于伯氏鼠疟，前者具有管状嵴线粒体，后者则为无嵴线粒体。一般认为，具有嵴线粒体的疟原虫能够利用三羧循环进行物质代谢，而无嵴线粒体则没有完整功能的三羧循环^(9,10)，或许由于这两种疟原虫线粒体在形态和生化代谢上的不同，造成了对青蒿素敏感程度的不一样。

在青蒿素作用下，在感染红细胞胞浆中可见有多层膜小体结构，一般在正常疟原虫体内便有该结构，鼠疟和鸡疟（*P. gallinaceum*）的多层膜小体可能起源于虫体限制膜，且具有线粒体样功能^(11,12)，而恶性疟的多层膜小体的功能目前尚不清楚⁽¹³⁾。上述所见的多层膜小体，可能是疟原虫膜系结构遭到损伤后的一种代偿反应——膜结构的增殖。伯氏鼠疟红内期在伯喹的作用下也出现相似的膜增殖现象，Howel 等认为这是疟原虫克服药物作用的一种反应⁽¹⁴⁾。

在青蒿素的作用下，恶性疟还常有自噬泡形成，在药物作用的早期便有自噬泡的形成，它或是单独出现，或是和膜系结构的损伤同时存在。在自噬泡中虽然有一些胞浆成分，但却没有色素颗粒。这和氯喹作用后形成的自噬泡有所不同。后者除了含有胞浆成分外，还常含有色素颗粒，这提示含有色素颗粒的自噬泡形成可能和氯喹所引起的食泡异常有密切关系，而青蒿素所引起的自噬泡的形成过程可能不同于氯喹，或许它和内质网的异常变化有关，因为有时可见肿胀的内质网，彼此融合形成大自噬泡的现象，因此，自噬泡的形成，也是青蒿素抗疟作用的一个重要组成部分。

虽然青蒿素在抗疟作用的某些方面具有若干长处，但它在临床治疗中也有近期再燃率较高之弊。一般认为这主要是由于青蒿素在体内代谢和排泄较快所致；此外，我们在电镜下发现，疟原虫的裂殖体对青蒿素的作用不敏感，这一特点或许也是造成青蒿素再燃率较高的原因之一。

利用电镜技术在伯氏鼠疟、鸡疟和食蟹猴疟（*P. cynomolgi*）等试验模型上证明疟原虫的食泡是氯喹的原发作用部位⁽¹⁵⁻¹⁷⁾。在氯喹的作用下，疟原虫最早出现的病理变化是自噬泡的形成。此外，利用电镜自显影技术直接证明氯喹集中分布在疟原虫的食泡中⁽¹⁸⁾。在本试验中以红内期恶性疟为试验模型也观察到疟原虫在 10^{-6} M 氯喹作用下最早出现最明显的形态

学变化是自噬泡的形成。关于氯喹所引起的自噬泡形成机理,一般认为,由于大量的氯喹被摄取进入食泡,致使食泡中的pH升高,这样使食泡中的消化酶失去最适pH环境;而且氯喹本身就具有抑制消化酶活性的作用^(19,20)。这样双管齐下造成疟原虫消化血红蛋白的功能障碍,结果引起疟原虫的“饥饿”状态进而导致自噬泡的形成。此外,高浓度的氯喹可以使食泡膜趋于不稳定化,这也是自噬泡的形成原因之一⁽²¹⁾。由于自噬泡的形成及其不断地被排出虫体外,造成胞浆成分的大量流失和耗损,结果造成疟原虫的死亡。

除了自噬泡形成之外,在氯喹作用的后期疟原虫还常出现一些食泡样结构。在伯氏鼠疟模型上也发现了氯喹的这种作用⁽¹⁶⁾,而且在抗氯喹株的伯氏鼠疟也曾发现食泡样结构明显增多的现象,这可能是疟原虫通过增加食泡的数量以克服氯喹所造成的“饥饿”状态的结果⁽²²⁾,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⁽²³⁾。此外,在氯喹作用下,疟原虫的核不甚敏感,这提示疟原虫的核并不是氯喹的原发作用部位。

总之,比较青蒿素和氯喹的作用,就可以发现青蒿素的作用是以膜系统结构的损伤为特点并有自噬泡的形成,而氯喹则是引起疟原虫形成大自噬泡并有食泡样结构出现。因此,这两种抗疟药的作用部位及其作用方式大不相同。

参 考 文 献

- (1) Trager w, et al: Science 193:673, 1976.
- (2) 高敏新等:微生物学报 19:88, 1979.
- (3) Langreth SG, et al: J Protozool 25:443, 1978.
- (4) Miller LH: Trans R Soc Trop Med Hyg 66:459, 1972.
- (5) Langreth SG, et al: Exp Parasitol 48:213, 1979.
- (6) 赵一等:中医杂志 (11):58, 1979.
- (7) 叶祖光等:中医杂志 22(4):62, 1981.
- (8) Qinghaosu Antimalaria Coordinating Research Group: Chin Med J 92:811, 1979.
- (9) Aikawa M: Bull WHO 55:139, 1977.
- (10) Von Brand T: Biochemistry of Parasites 1973.
- (11) Theakston RDG, et al: Life Sci 11:8:521, 1969.
- (12) Howell RE, et al: Milit Med 134:893, 1969.
- (13) Ladda R, et al: Trans R Soc Trop Med Hyg 60:369, 1966.
- (14) Howell RE, et al: Ann Trop Med Parasitol 64:203, 1970.
- (15) Warhurst DC, et al: Nature 214:935, 1967.
- (16) Macomber PB, et al: Nature 214:937, 1967.
- (17) Aikawa M, et al: Am J Trop Med Hyg 18:166, 1969.
- (18) Aikawa M: Am J Pathol 67:277, 1972.
- (19) Wibo M, et al: J Cell Biol 63:430, 1974.
- (20) Mego JL, et al: Biochem Pharmac 28:465, 1979.
- (21) Homewood CA, et al: Nature 235:50, 1972.
- (22) Peters W, et al: Ann Trop Med Parasitol 59:126, 1965.
- (23) Howell RE, et al: Ann Trop Med Parasitol 62:271, 1968.

治 愈 漏 乳 症 1 例

河北省唐山地区医院 刘庆才

笔者在临床中,运用调和营卫,益气养血之法,治疗漏乳症,收到较好的效果。现介绍如下:

何××,女,32岁,农民,1980年8月10日初诊。病者自诉1980年4月分娩,产后四个月在婴儿不吮乳的情况下,乳汁不断地从两乳房溢出,其质清稀而淡,两乳无胀痛之苦。并时有心悸,少气言微,精神疲倦,四肢乏力,常自汗出,大便不成形,小溲清白,月经未潮。视其胸,衣如水淋,两乳状如滴泉,其乳汁滴滴而溢。舌质淡,脉沉弱无力。前医投以炒麦芽、补中益气丸、人参归脾丸,取效不著,乳溢如故。余诊为营卫不和,气血两虚。治拟调和营卫,益气养血之法。

处方:桂枝、白芍、白术、当归、五味子、甘草各10克,党参、黄芪各20克。水煎,日服二次。

服完三剂后,乳汁自溢好其大半,自汗亦减,大便成形。继服三剂,少气好转,言语有力,精神振作,汗止。唯乳汁还有少量溢出,脉较前有力。原方再进三剂,乳汁自溢停止,但偶感肢体乏力,后以十全大补丸巩固疗效。

体会:笔者在《金匱·血痹虚劳篇》“夫失精家,……桂枝龙骨牡蛎汤主之”启示下,乃运用调和营卫,益气养血之法。因乳房属足阳明胃,乳汁乃为气血所化,营卫二气亦为胃气所生。今卫气虚而不固,气虚失密,则统摄无权,营阴不能内守,故乳汁随化随溢也。余用桂枝汤加减化裁。取桂枝、白芍、甘草调和营卫;重用参、芪以益气;白术强胃补中;当归养血活血;五味子酸能收能敛。诸药相伍,使之营卫和调,气旺血足,阳气外密,阴精内守,乳汁自溢方能止矣。

青蒿素和氯喹对体外培养的红内期恶性疟原虫超微结构的影响 (插图)

(正文见65~67页)

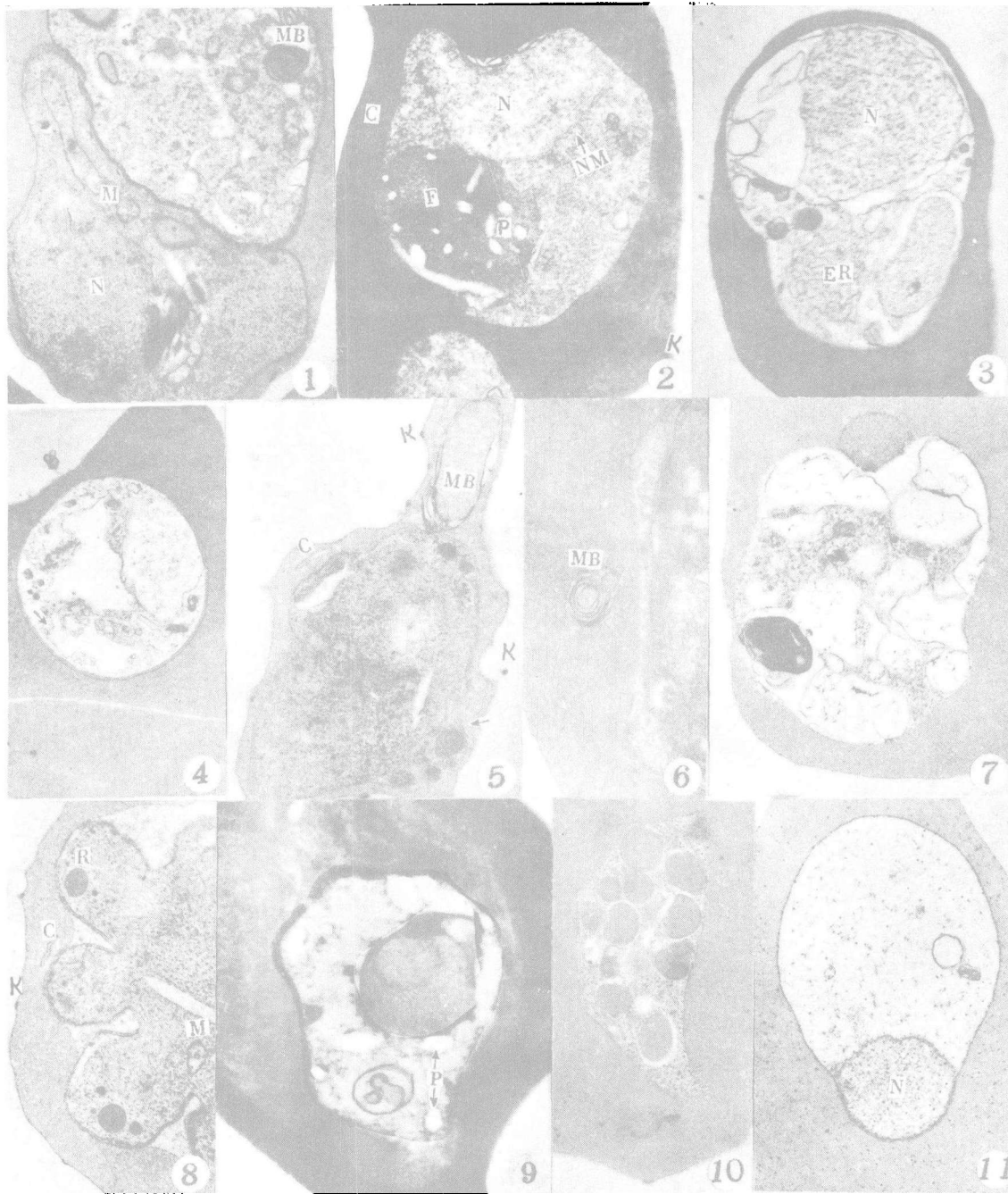


图 1、2 正常疟原虫。(×15000) 图 3 5×10^{-7} M 青蒿素作用 1 小时的疟原虫,核膜间隙肿胀;内质网(ER)呈囊泡状肿胀。(×21000)
 图 4 5×10^{-7} M 青蒿素作用 4 小时的疟原虫,肿胀的内质网彼此融合形成大自噬泡。(×15000) 图 5 5×10^{-7} M 青蒿素作用 1 小时的疟原虫,在肿胀的限制膜间隙中有几团虫体胞浆样物质,在红细胞胞浆中有一多层膜小体结构(MB)。(×15000) 图 6 10^{-7} M 青蒿素作用 12 小时的疟原虫,在红细胞胞浆中有一 MB。(×15000) 图 7 5×10^{-7} M 青蒿素作用 12 小时的疟原虫体内形成大量自噬泡。(×15000)
 图 8 5×10^{-7} M 青蒿素作用 12 小时的裂殖体,线粒体(M)和棒状体(R)等均未见异常。(×15000) 图 9 10^{-6} M 氯喹作用半小时的疟原虫有大自噬泡形成,其中有一些色素颗粒(P)。(×21000) 图 10 10^{-6} M 氯喹作用 12 小时的疟原虫,出现较多的自噬样结构。(×15000)
 图 11 10^{-6} M 氯喹作用 12 小时的疟原虫,胞浆解体,但胞核(N)结构基本正常。(×15000)