

瑞香素对体外培养恶性疟原虫超氧化物歧化酶活性及 DNA 合成的影响

牟凌云 王琴美 倪奕昌

【摘要】 目的 研究瑞香素(DPNT)对体外培养恶性疟原虫超氧化物歧化酶(SOD)活性及 DNA 合成的影响。方法 在恶性疟原虫 FCC1 株体外培养体系中,以 SOD 试剂盒检测瑞香素、瑞香素铁盐及去铁胺(DFO)对疟原虫 SOD 活性的影响。疟原虫培养同步化,利用荧光素 Hoechst33258 测定在瑞香素和去铁胺作用下疟原虫不同发育阶段(环状体和滋养体)的 DNA 合成水平。结果 与未加药对照组比较,经瑞香素作用后疟原虫总 SOD 下降约 60% ($P < 0.01$),而相应的经去铁胺作用后,疟原虫的总 SOD 仅下降约 22% ($P > 0.05$)。瑞香素铁螯合能力被遮蔽后,几乎失去对疟原虫 SOD 的影响。同步培养的滋养体阶段疟原虫,在瑞香素作用下 DNA 合成率明显低于对照组。结论 在体外瑞香素可显著降低疟原虫 SOD 活性,并影响滋养体阶段疟原虫的 DNA 合成。

【关键词】 恶性疟原虫;瑞香素;超氧化物歧化酶;脱氧核糖核酸

中图分类号: R382.31

文献标识码: A

Effect of Daphnetin on SOD Activity and DNA Synthesis of *Plasmodium falciparum* in vitro

MU Ling-yun, WANG Qin-mei, NI Yi-chang

(Institute of Parasitic Diseases*, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200025)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of daphnetin on superoxide dismutase (SOD) activity and DNA synthesis in *P. falciparum* in vitro. Methods The effect of daphnetin, daphnetin-Fe complex and desferrioxamine B on SOD activity of *P. falciparum* (P. f) FCC1 in vitro was determined with a SOD test-kit. The level of DNA synthesis of P. f synchronized cultured in vitro at various developmental stages after treatment of daphnetin or desferrioxamine B was assayed by fluorescein Hoechst 33258. Results The total SOD activity decreased by 60% after daphnetin treatment while it only decreased by 22% if treated with desferrioxamine B. No effect on SOD activity of P. f treated with daphnetin-Fe complex was observed. The level of DNA synthesis of P. f trophozoites in synchronized in vitro culture was significantly lower than that of the control. Conclusion Daphnetin lowered SOD activity and decreased DNA synthesis of P. f in vitro.

【Key words】 *Plasmodium falciparum*, daphnetin, superoxide dismutase (SOD), deoxyribonucleic acid (DNA)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39970669)

* WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis

近年来许多体内、外实验结果表明,铁螯合剂类化合物是一类值得关注的新型抗疟原虫化合物,其中去铁胺(desferrioxamine B, DFO)是具有代表性的一种^[1]。

瑞香素(daphnetin, DPNT)是中草药铁螯合剂,已证明具有剂量依赖的抗疟原虫活性^[2]。体外实验表明瑞香素抗疟作用与其铁螯合能力有密切关系^[3]。为进一步了解瑞香素的抗疟原虫机制,本文探讨瑞香素在体外对疟原虫超氧化物歧化酶(SOD)活性及 DNA 合成的影响。

材料与方 法

1 试剂

基金项目:国家自然科学基金(No. 39970669)

作者单位:中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所,世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心,上海 200025
单行本索要函寄倪奕昌

瑞香素由吉林省长春市春城制药厂生产。去铁胺、荧光素 Hoechst33258、蛋白酶 K 购自 Sigma 公司。SOD 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。小牛胸腺 DNA 购自上海华美生物工程公司。硫酸亚铁铵(FAS)购自上海化学试剂公司。瑞香素铁盐(DPNT-Fe)的制备按参考文献[3]方法,由 DPNT 与 FAS 作用后生成。

2 体外培养疟原虫 SOD 活性的测定

按 Trager 等^[4]方法建立恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*, P. f.) FCC1 株体外培养体系,在疟原虫培养物中分别加入药物 DPNT、DFO 及 DPNT-Fe,在自动恒温培养箱中培养 24 h。培养物 1 000 g 离心 5 min,去上清,加入 10 倍体积的 0.015% 皂素溶液,37℃ 孵育 15 min,不时搅拌,3 000 g 离心 10 min 后所得沉淀即为疟原虫。Hanks 液洗 3 次后,超声匀浆疟原

虫。4 ℃ 10 000 g 离心 20 min, 上清即为疟原虫细胞裂解液。

SOD 活性测定, 按南京建成生物工程研究所 SOD 试剂盒说明书进行。在测定管和对照管中分别加入 1.0 ml 一号试剂, 在测定管中加入 0.1 ml 待测样品及 0.5 ml 蒸馏水, 在对照管中加入 0.6 ml 蒸馏水, 然后分别加入 2 号、3 号及 4 号试剂各 0.1 ml, 充分混匀后 37 ℃ 水浴保温 40 min。在上述各管加入显色剂 2 ml, 混匀, 10 min 后测定 OD 值, 波长 550 nm。按 Lowry 法测定样品蛋白质含量, 计算疟原虫细胞 SOD 活性。

3 体外培养恶性疟原虫 DNA 水平的测定

建立恶性疟原虫体外培养体系, 加入 5% 山梨醇使培养的疟原虫同步化。待生长至环状体阶段, 在培养物中加入 DPNT 及 DFO, 在自动恒温培养箱中培养到预定时间, 取培养物离心去上清, 按上述皂素法收集疟原虫。将收集的疟原虫重新悬浮于 375 μl 冰浴的裂解缓冲液 5 min。4 ℃ 10 000 g 离心 2 min, 取上清置一洁净的 1.5 ml 微量离心管(eppendorf)中, 管内预先加入 5 μl 20% 十二烷基硫酸钠(SDS)。将小管在振荡器上振荡混匀, 加入 2 mg/ml 蛋白酶 K 25 μl, 37 ℃ 水浴孵育 15 min, 所得透明溶液即疟原虫全细胞裂解液。

荧光比色法测定疟原虫 DNA 水平^[5]: 吸取 2 ml H33258 分析液于比色杯, 放入 DNA 定量仪 (Hofer DyNAQuant 200) 的样品室, 记录空白读数。在上述空

白 H33258 分析液中加入 2 μl 标准小牛胸腺 DNA 溶液, 混匀, 记录荧光读数; 取待测样品, 重复测量 3 次, 读出样品 DNA 浓度。

结 果

体外培养的 *P. f* 经 DPNT 作用后, 检测其总 SOD 活性, 并与 DFO 组对比。结果表明, 与未加药的对照组相比, 经 4 mol/L DPNT 作用后原虫的总 SOD 活性为 13.73 ± 2.23 U/mg 蛋白, 明显下降 ($n=3, P < 0.01$); 而经 10 mol/L DFO 作用后原虫的总 SOD 活性为 26.70 ± 1.21 U/mg 蛋白 ($n=3$), 与对照组 34.26 ± 3.33 U/mg 蛋白 ($n=3$) 无显著性差异。

4 μmol/L DPNT 和 4 μmol/L DPNT-Fe 对体外培养 *P. f* 总 SOD 活性分别为 17.97 ± 3.66 及 40.07 ± 5.74 , 对照组为 40.02 ± 2.92 。表明 DPNT 与 FAS 作用后形成 DPNT-Fe 复合物, 遮蔽了其铁螯合能力。虽然 DPNT 对体外培养 *P. f*, 总 SOD 活性具有显著影响 ($P < 0.01$), 但当它的铁螯合能力被遮蔽后 (DPNT-Fe), 对疟原虫 SOD 活性的影响几乎完全消失。

体外培养的 *P. f* 经 DPNT 作用后, 在给药后连续 26 h 内取不同生长阶段培养物测定总 DNA, 并与 DFO 对比, 给药时疟原虫处于环状体阶段, 给药后 15 h 疟原虫发育为滋养体阶段。DPNT 组疟原虫 DNA 水平, 给药后 1 h 稍低于对照组, 给药后 21 h 明显低于对照组。在相同给药时间测定 DFO 组, 其 DNA 水平在各时间点也相应下降 (表 1)。

表 1 体外培养 *P. f* 的 DNA 合成率
Table 1 DNA synthesis rate of *P. f* in vitro

组 别 Group	给药后不同时间(h)DNA 合成率 (%) ($n=3$) DNA synthesis rate (%) by hours after administration of compounds ($n=3$)				
	1	6	15	21	26
瑞香素 DPNT	18.6 ± 2.8	27.4 ± 4.8	41.8 ± 1.9	54.1 ± 5.2	65.0 ± 2.9
去铁胺 DFO	17.3 ± 0.4	25.1 ± 1.6	41.4 ± 3.3	52.4 ± 1.8	57.1 ± 3.2
对照 Control	20.0 ± 4.5	28.5 ± 1.9	50.0 ± 2.4	85.8 ± 6.0	100

注: 相对于对照组 26 h 的合成总量
Note: Comparing to total synthesis at 26 h of the control

讨 论

铁螯合剂的抗疟作用已得到广泛验证, 而其抗疟机制研究尚处起步阶段。一般认为疟原虫在体内以指数方式增长, 对铁的需求高, 铁螯合剂可对其造成选择性“铁饥饿”, 从而起到杀虫作用。但是这类化合物抗疟作用的具体机制以及药物作用的靶分子等都需要从细胞和分子生物学水平进行深入探索。含铁生物大分子, 如 Fe-超氧化物歧化酶 (Fe-superoxide dismutase, Fe-SOD)^[6] 和核糖核苷酸还原酶 (ribonucleotide reductase, RNRase), 很可能是铁螯合剂在疟原虫中的分子

靶标^[7,8]。

疟原虫是一类微嗜氧的寄生虫, 对氧及其代谢产物十分敏感。在感染过程中, 无论红前期或红内期疟原虫都要承受氧化压力的影响。各类含活性氧物质 (如 O_2^- , H_2O_2 , $-OH$ 等) 可对疟原虫造成各种致命伤害, 如酶蛋白氧化、膜脂质过氧化、DNA 损伤等。为保护机体, 疟原虫必须拥有一个完整的抗氧化防御系统。疟原虫生长发育的不同阶段抗氧化酶系统组成有所改变, 而 SOD 始终是疟原虫抗氧化酶系的重要成员^[10]。药物对 SOD 活性的抑制会严重影响疟原虫的生命活动。

实验表明, 0~12 $\mu\text{mol/L}$ 的 DPNT 对体外培养的 *P. f* 的抗疟活性与 0~30 $\mu\text{mol/L}$ 的 DFO 抗疟活性相当^[2,3]。然而它们对体外培养 *P. f* 总 SOD 的影响却有明显差异。经 DPNT 作用后, 疟原虫的总 SOD 下降约 60%; 而相应的经 DFO 作用后, 疟原虫的总 SOD 仅下降约 22%。DPNT 的铁螯合能力被遮蔽后, 几乎完全失去对疟原虫 SOD 的影响。这些结果提示 SOD 很可能是 DPNT 在疟原虫细胞内的作用靶点之一。

DPNT 究竟如何影响体外培养疟原虫的总 SOD 活性尚不清楚, 但它显然不是单独只影响 Fe-SOD。DPNT 作为一种铁螯合剂, 也有螯合其他金属的能力 (如 Cu, Zn)。作者推测 DPNT 是通过螯合酶活性中心的金属离子来影响 SOD 的活性, 但并不排除 DPNT 存在其他机制来影响 SOD 的活性。

本文观察了在一定的药物浓度下, 不同发育时期疟原虫的 DNA 水平。加入 DPNT, 各组疟原虫感染率及红细胞浓度一致, 疟原虫均处于环状体阶段。在给药后 1 h 和 6 h 测定疟原虫 DNA 水平, DPNT 组与对照组相比无明显差异; 给药后 15 h, 疟原虫进入滋养体阶段, 与对照组相比, DPNT 组 DNA 水平略有下降; 而在给药后 21 h, DPNT 组 DNA 水平明显低于对照组。DFO 组与对照组比较, 在相应时间测定的 DNA 水平也有不同程度的下降。作为铁螯合剂类抗疟化合物的典型代表, DFO 已被证明主要作用于滋养体/裂殖体阶段疟原虫^[7]。与 DFO 相比, DPNT 也特异作用于滋养体阶段疟原虫。

红内期疟原虫 DNA 的合成与复制主要发生在滋养体阶段, RNRase 酶是 DNA 合成的限速酶^[8,10]。在不同的体外细胞培养体系中, DFO 能可逆的抑制 RNRase 还原酶从而有效地抑制 DNA 合成^[8,11], 产生抗疟作用。

在平行对照实验中, DPNT 表现出与 DFO 相当的抑制 DNA 合成作用, 而且主要发生在疟原虫 DNA 合

成复制最旺盛的滋养体/裂殖体阶段。提示 DPNT 有可能通过某种方式作用于疟原虫 RNA。DPNT 是一种弱铁螯合剂, 其铁螯合能力远低于 DFO^[12]。本文结果表明两者抑制 DNA 合成的能力大致相当。因此是否 DPNT 对 RNRase 具有较 DFO 更特异的亲和力或抑制能力, 值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Pollack S, Flemming J. *P. falciparum* takes up iron from transferrin[J]. Br J Haematol, 1984, 58: 289-293.
- [2] 王琴美, 倪奕昌, 徐月琴, 等. 瑞香素杀疟原虫裂殖体的作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18: 204-206.
- [3] 牟凌云, 王琴美, 倪奕昌, 等. 瑞香素体外抗疟作用与其铁螯合能力的关系[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002, 20: 83-85.
- [4] Trager W, Jensen JB. Human malaria parasite in continuous culture[J]. Science, 1976, 193: 673-675.
- [5] F 奥斯伯, RE 金斯顿, R 布伦特等主编. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 833-834.
- [6] Becuwe P, Gratepanche S, Fourmaux MN, et al. Characterization of iron-dependent endogenous superoxide dismutase of *Plasmodium falciparum*[J]. Mol Biol Parasitol, 1996, 76: 12-134.
- [7] Atkinson CT, Bayne MT, Gordeuk VR, et al. Stage-specific ultrastructural effects of desferrioxamine on *Plasmodium falciparum* in vivo[J]. Am J Trop Med Hyg, 1991, 45: 593-601.
- [8] Nyholm S, Mann GJ, Johansson AG, et al. Role of ribonucleotide reductase in inhibition of mammalian cell growth by potent iron chelators[J]. J Biol Chem, 1993, 268: 26200-26205.
- [9] Faiefield AS, Abosch A, Ranz A, et al. Oxidant defense enzymes of *Plasmodium falciparum*[J]. Mol Biochem Parasitol, 1988, 30: 77-82.
- [10] Rubin H, Salem HS, Li LS, et al. Cloning, sequence determination, and regulation of the ribonucleotide reductase subunits from *Plasmodium falciparum*: a target for antimalarial therapy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 9280-9284.
- [11] Reichard P, Ehrenburg A. Ribonucleotide reductase - a radical enzyme[J]. Science, 1983, 221: 514-519.
- [12] Polsten VJ, Schwenk M. Zur spektroskopischen analyse von metalkomplexgleichgewichten am beispiel daphnetin und FeCl_3 [J]. Z Physik Chem Neue Golge, 1986, 1505: 87-96.

(收稿日期: 2002-09-27 编辑: 富秀兰)

《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》杂志由邮局向国内外公开发行人。邮发代号 4-362。欲订阅者, 可向当地邮局直接订阅。漏订者可直接与本编辑部联系。
欢迎来稿, 欢迎订阅, 欢迎批评指正。