

乙胺嘧啶与氯喹降低感染疟疾的 BALB/c 孕小鼠的胎盘病理样改变

彭 兰¹, 范能全²

(1. 重庆医药高等专科学校基础部, 重庆 400030)
(2. 重庆市食品药品检验所, 重庆 400042)

[摘要] 怀孕期间患疟疾与胎儿死亡、流产、早产及低体重密切相关, 在一些疟疾发病地区, 常常使用乙胺嘧啶和氯喹来预防治疗, 但它们对于胎盘的病理样改变尚未报道, 本研究的目的即为探讨乙胺嘧啶和氯喹治疗怀孕的 BALB/c 小鼠感染伯氏疟原虫诱发的疟疾引起胎盘的病理样改变. 购买 BALB/c 小鼠, 随机分为 6 组, 建立疟疾模型, 并使用乙胺嘧啶和氯喹治疗处理, 对相应组的疟疾感染情况、小鼠生存率、氧化水平、凋亡水平及组织病理改变情况进行检测分析. 结果发现, 被伯氏疟原虫感染后血液中被感染的红细胞比例显著上升 ($p < 0.05$), 同时小鼠存活率显著降低 ($p < 0.05$), 而乙胺嘧啶和氯喹不但可以降低感染红细胞的比, 还能提升小鼠的存活率 ($p < 0.05$); 被感染的小鼠的脂质过氧化水平和过氧化氢酶水平显著上升 ($p < 0.05$), 使用乙胺嘧啶和氯喹治疗后又显著下降 ($p < 0.05$), 而谷胱甘肽和超氧化物歧化酶的变化则不具有统计学差异 ($p > 0.05$); 被感染的小鼠的凋亡细胞比例、感染红细胞形态和组织病理色素沉积较未感染组显著上升 ($p < 0.05$), 使用乙胺嘧啶和氯喹治疗后又显著下降 ($p < 0.05$). 乙胺嘧啶和氯喹在治疗疟疾中, 通过抑制氧化应激及细胞凋亡的发生, 降低胎盘组织病理学改变, 从而达到有效的治疗目的.

[关键词] 疟疾, 病理, 乙胺嘧啶, 氯喹

[中图分类号] R365 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2015)02-0105-07

Pyrimethamine and Chloroquine Reduced Malaria Infected Pregnant BALB/c Mice with Pathology Changes

Peng Lan¹, Fan Nengquan²

(1. Foundation Department, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 400030, China)
(2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 400042, China)

Abstract: Malaria during pregnancy is closely related to the fetal death, miscarriage, premature delivery and low birth weight in some areas, which are often used to be prevent by pyrimethamine and chloroquine treatment, but the pathological changes in the placenta has not been reported in this study. The purpose is to explore pyrimethamine and chloroquine treatment of pregnant BALB/c mice infected with *Plasmodium berghei* malaria-induced pathology caused by placenta-like changes. BALB/c mice were randomly divided into 6 groups, the establishment of malaria model, and use of pyrimethamine and chloroquine therapy treatment for malaria infection in the corresponding group of mice survival, oxidation level, apoptosis and histopathological change the situation that were detected and analyzed. After being infected with *Plasmodium berghei*, the proportion of infected red blood cells was increased significantly ($p < 0.05$), while the survival rate was significantly lower ($p < 0.05$). Pyrimethamine and chloroquine can not only reduce the proportion of infected erythrocytes, but also enhance the survival rate of mice ($p < 0.05$), lipids in mice infected hydrogen peroxide levels and oxidative enzyme levels increased significantly ($p < 0.05$), which was decreased after the treatment of pyrimethamine and chloroquine ($p < 0.05$), while changes in glutathione and superoxide dismutase was not a significant difference ($p > 0.05$), proportion of apoptotic cells in the infected mice, infected red blood cell morphology and pigmentation histopathology

收稿日期: 2014-04-02.

基金项目: 重庆市高等教育教学改革项目 (133272)、重庆医药高等专科学校校级教研教改项目 (ygjzj201304).

通讯联系人: 范能全, 高级工程师, 研究方向: 药物毒性病理学. E-mail: fannengquan@sohu.com

increased significantly compared with the uninfected group($p<0.05$), the use of pyrimethamine and chloroquine treatment and then decreased significantly($p<0.05$). Pyrimethamine and chloroquine in the treatment of malaria by inhibiting oxidative stress and apoptosis occurs, reduce placental histopathological changes, and achieve effective therapeutic purposes.

Key words: malaria, pathology, pyrimethamine, chloroquine

疟疾是世界上公认的主要公共健康问题之一,每年略有 1~2 万人受到感染,其中大部分是不到 5 岁的儿童及孕妇,在我国主要分布在西南地区^[1]. 而孕妇感染疟疾不但给自己带来伤害,而且也影响到胎儿的发育,初产妇比经产妇受到感染后的损害更严重. 这也说明孕妇患疟疾不但会使孕妇出现贫血症状,而且还会出现流产、死胎及低出生体重的胎儿. 在治疗感染疟疾的孕妇患者时,还应处理疟疾的相应并发症,如肾功能衰竭、低血糖及脑水肿等. 同时研究报道在怀孕期间使用抗疟疾药物会产生胚胎毒性,可导致胎儿心血管畸形或骨骼异常等症状^[2]. 目前按照世界卫生组织的建议,对于怀孕期间感染疟疾的预防治疗主要有 3 个方面:有效管控、杀灭蚊虫及间歇性的预防治疗. 而间歇性的预防治疗主要包括 2 个或 3 个剂量的乙胺嘧啶,在第二或第三个孕期给予,同时在我国氯喹也是治疗疟疾的一种常用药物. 虽然乙胺嘧啶和氯喹用于疟疾的治疗具有很好的疗效,而且有报道指出其可改变机体的氧化性^[3],但是减少胎盘的病理样改变尚未见报道,因此,本研究的目的主要为探讨乙胺嘧啶和氯喹降低 BALB/c 孕期小鼠因感染伯氏疟原虫诱发的疟疾的胎盘病理样改变的现象及机制.

1 材料与方法

1.1 寄生虫

选用致命性的啮齿动物菌株伯氏疟原虫(NK65)用于本研究,该菌株是由伯氏疟原虫感染了小鼠红细胞(IRBC)后传代保存.

1.2 动物

选用 BALB/c 小鼠作为研究模型,由重庆医科大学动物中心提供,所有小鼠均为 6~8 周龄(体重为 20 g~22 g),使用标准的颗粒食物及水喂养,严格按照实验动物伦理委员会的实验动物使用及处理标准进行研究护理.

1.3 第一天妊娠评估

将雌性小鼠和雄性小鼠按 2:1 的比例共同饲养过夜,并且在早晨和傍晚对小鼠的阴道栓进行日常监测,若发现阴道栓即标记为第一个妊娠日.

1.4 实验设计

将所有动物分为 6 组进行研究,第一组:非妊娠感染,共 8 只,这些小鼠按 1×10^6 IRBC 数量进行经腹腔接种;第二组:非妊娠感染,氯喹处理,共 8 只,处理同第一组,但在疟疾感染 2 h 后,给予 $6.25\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 剂量的氯喹(国药准字 H31020869,上海信谊天平药业有限公司)处理,连续处理 4 d;第三组:非妊娠感染,乙胺嘧啶处理,共 8 只,处理同第一组,但在疟疾感染 2 h 后,给予 $26\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 剂量的乙胺嘧啶(国药准字 H33020028,杭州民生药业集团有限公司)1 次处理;第四组:妊娠感染,共 16 只,这些小鼠在妊娠期为 $(10\pm 2)\text{ d}$ 时,按 1×10^6 IRBC 数量经腹腔接种菌株;第五组:妊娠感染,氯喹处理,共 16 只,孕期及感染方法同第四组,给药剂量及时程同第二组;第六组:妊娠感染,乙胺嘧啶处理,共 16 只,孕期及感染方法同第四组,给药剂量及时程同第三组.

1.5 监测指标

对所有感染后小鼠的红细胞感染伯氏疟原虫的比例进行监测,同时对一个月的存活率进行监测,对第四、五、六、七组的小鼠在感染后第六天时进行颈椎脱臼处死,取出胎盘固定在 10% 的福尔马林中,进行氧化性、抗氧化性及 DNA 分离检测,同时进行吡啶橙/溴化乙锭染色,并进行苏木精和伊红(H&E)染色,光学显微镜观察组织的病理学改变情况.

1.6 胎盘组织匀浆及去线粒体上清液制备

使用磷酸盐缓冲液在 Potter-Elvehjem 组织匀浆器(海德创业(北京)生物科技有限公司)中制备胎盘组织匀浆,以 8 000 r/min 的速度在 4 ℃ 离心 10 min,上清液即为去线粒体上清液,储存于-20 ℃ 中进一步使用,使用 Lowry^[4]等人的方法进行蛋白浓度测定。

1.7 脂质过氧化检测

使用 Wills 等人^[5]的方法,选择丙二醛(MDA)的量用于对脂质过氧化作用进行评估。0.5 mL 的 Tris-HCl 作为缓冲液(0.1 M, pH 7.4)加入到 0.5 mL 的组织匀浆中,37 ℃ 孵育 2 h,温育后,加入 1 mL 的 10% (重量/体积)冷冻三氯乙酸,100 r/min 4 ℃ 离心 10 min,取 1 mL 上清液,加入 1 mL 的 0.67% (重量/体积)硫代巴比妥酸溶液,沸水浴 10 min,待冷却后,加入 1 mL 的蒸馏水,并在波长为 532 nm 的条件下进行吸光度测定,结果即为 MDA 的每毫克蛋白纳摩尔数,使用发色基团摩尔消光系数($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)。

1.8 过氧化氢酶活性测定

使用 Luck 等人^[6]的方法对去线粒体上清液中的过氧化氢酶的活性进行测定。使用 100 mL 的磷酸盐作为缓冲液(0.05 M, pH 7.2),并加入 0.16 mL 的 H_2O_2 ,待测样品包括 3 mL 的磷酸盐缓冲液和 5 μL 的 PMS,在波长为 240 nm 的条件下进行吸光度测定,结果即为每毫克蛋白中 H_2O_2 每分钟分解的毫摩尔数,使用发色基团摩尔消光系数($0.0394 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)。

1.9 还原型谷胱甘肽测定

使用 Ellman 等人^[7]的方法对谷胱甘肽(GSH)水平进行测定。将 1 mL 的胎盘匀浆用 1 mL 的 4% 碘基水杨酸进行沉淀,在 4 ℃ 放置 1 h,然后以 100 r/min 的速度在 4 ℃ 离心 15 min。待测样品包括 0.1 mL 的离心上清液,0.2 mL 的 0.01 M 的二硫硝基苯甲酸(DTNB)和 2.7 mL 的磷酸盐缓冲液(0.1 M, pH 8),并在波长为 412 nm 的条件下进行吸光度测定,结果即为每毫克蛋白中 GSH 的微摩尔数。

1.10 超氧化物歧化酶活性测定

使用 Kono 等人^[8]的方法进行测定。加入 0.5 mL 的盐酸羟胺到 2 mL 和氮蓝四唑(NBT)和 0.1 mL 的 PMS 混合液中。超氧化物歧化酶(SOD)活性即为 1 个单位酶活性,定义为超氧化物歧化酶以抑制 50% NBT 减少的速率所需要的超氧化物歧化酶毫克蛋白单位的量。

1.11 溴化乙锭/吖啶橙染色测定细胞凋亡

对研磨后的胎盘进行细胞分离,使用尼龙网布和离心机对悬浮细胞进行过滤,然后以 100 r/min 的速度在 25 ℃ 条件下离心 10 min,使用 2% 的皂素对红细胞沉淀进行溶解,并以 100 r/min 的速度在 25 ℃ 离心 10 min,将含有胎盘细胞的沉淀物洗涤 3 次,然后溶于 PBS 中,在荧光显微镜下使用血球计数板对溴化乙锭/吖啶橙染色后的细胞进行计数。

1.12 统计分析

所有结果均采用(均数 \pm 标准差)的形式表示,使用 SPSS 16.0 进行统计分析,组间比较采用多个比较的方差分析(ANOVA),计数采用卡方检验,计量资料采用 *t* 检验,以 $p < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 感染及治疗效果分析

所有小鼠在被伯氏疟原虫感染后,血液中的红细胞被感染比例急剧上升,并且妊娠组和非妊娠组分别在第十天和第十四天达到高峰,从第二天开始妊娠组上升更加明显($p < 0.05$);使用乙胺嘧啶和氯喹处理后,被感染的比例显著降低($p < 0.05$),且使用乙胺嘧啶的效果显著优于氯喹($p < 0.05$),均在使用药物处理后的第二十四天时感染数降低为 0(图 1 A)。被伯氏疟原虫感染后的小鼠的存活率也显著下降,妊娠组和非妊娠组分别在第十天和第十四天其存活率即降低为 0,这一结果与感染比例达到高峰的时间刚好吻合,而对感染后的小鼠在使用乙胺嘧啶和氯喹处理后,不论是妊娠组还是非妊娠组,其存活率均保持在 100%(图 1 B)。

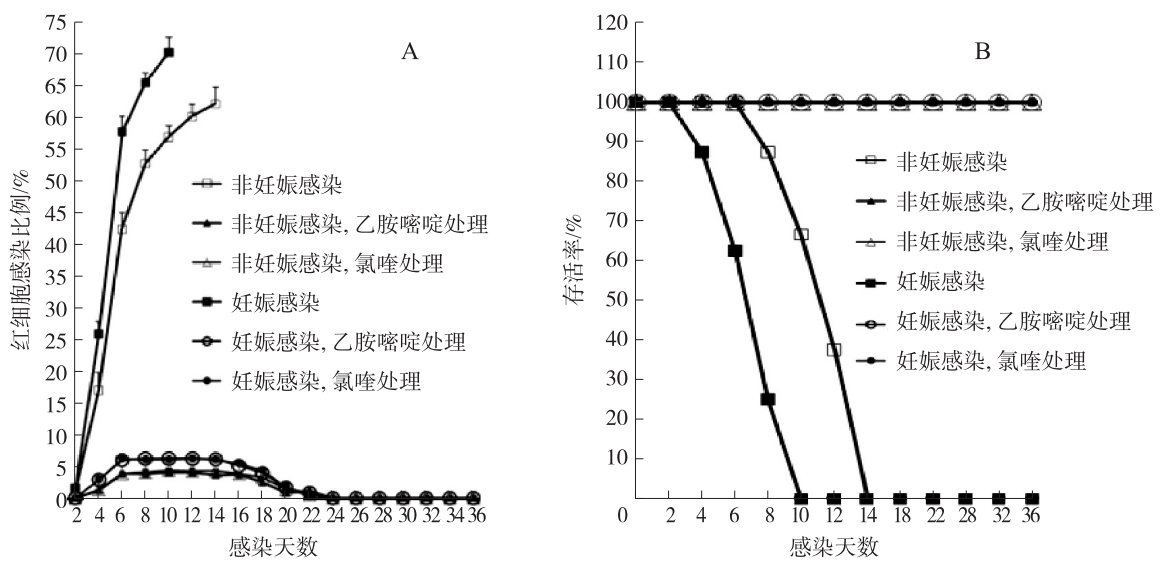
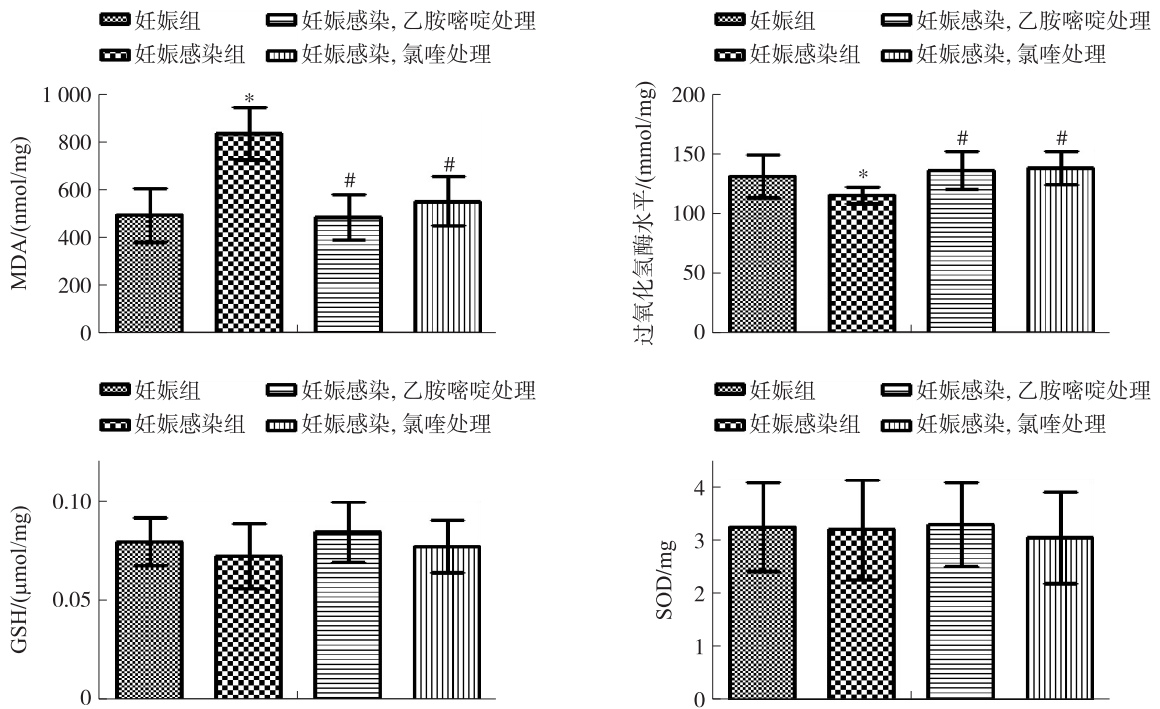


图 1 感染及治疗效果统计结果
Fig. 1 The result of inflammation and effect

2.2 氧化水平变化情况

妊娠的小鼠在受到伯氏疟原虫感染后其 MDA 显著上升 ($p<0.05$), 而过氧化氢酶则显著降低 ($p<0.05$), 在使用乙胺嘧啶和氯喹治疗后, MDA 和过氧化氢酶较治疗组显著降低及升高 ($p<0.05$), 妊娠中的 4 组小鼠在 GSH 和 SOD 的变化情况比较中不具有统计学意义 ($p>0.05$) (图 2).



注: * 与妊娠组比较, $p<0.05$; # 与妊娠感染组比较, $p<0.05$

图 2 氧化水平变化情况统计结果
Fig. 2 The level of oxidation changes

2.3 凋亡情况比较

使用溴化乙锭/吖啶橙进行染色, 结果显示妊娠感染组较妊娠组中的凋亡细胞数量显著升高 ($p<0.05$), 使用乙胺嘧啶和氯喹治疗后, 凋亡细胞的数量显著降低 ($p<0.05$), 结果如图 3 所示.

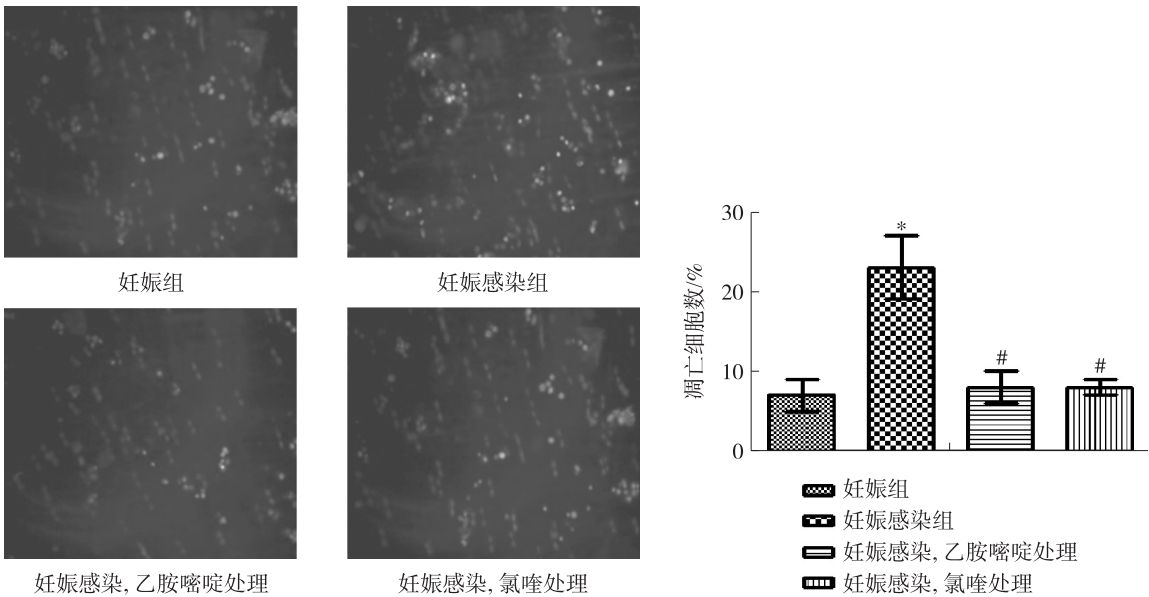


图 3 凋亡情况统计结果

Fig. 3 The result of apoptosis changes

2.4 组织病理学变化

组织病理学检查发现,被感染后的怀孕小鼠的色素沉积和感染的红细胞形态变化数目要显著多于未感染的怀孕小鼠,而使用乙胺嘧啶和氯喹治疗后,小鼠的红细胞形态恢复正常,同时色素沉积消失,结果如图 4 所示.

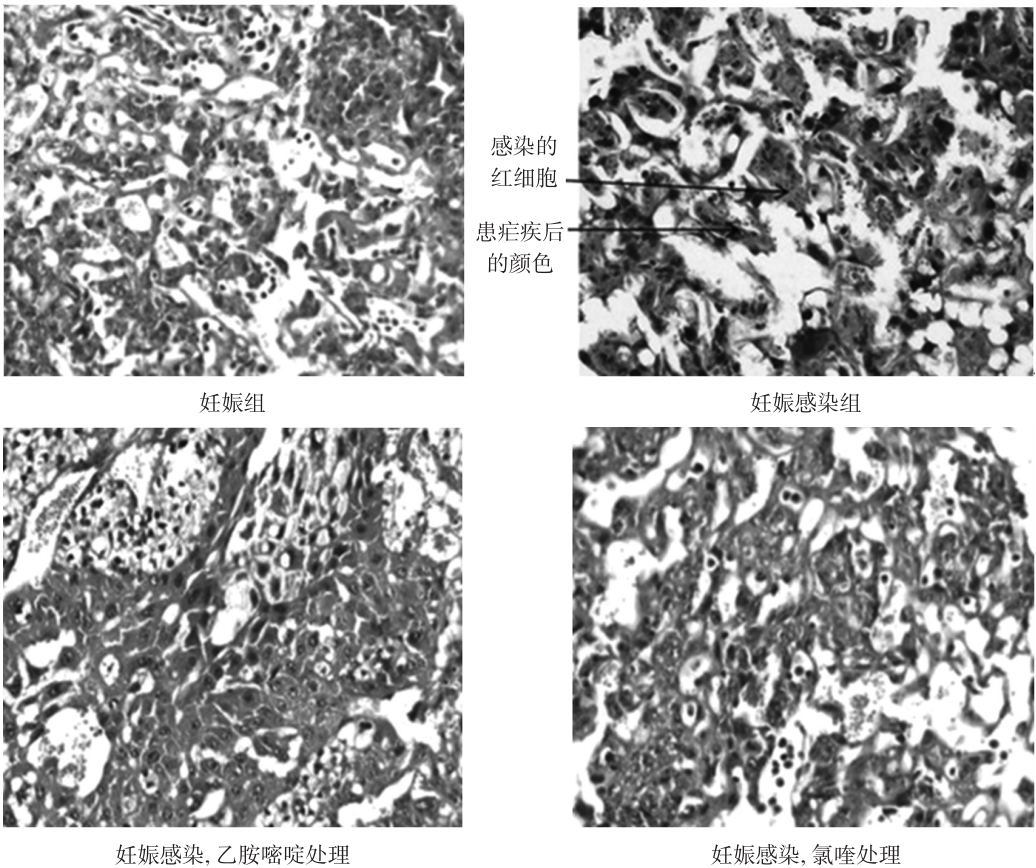


图 4 组织病理学变化

Fig. 4 The result of the pathological changes

3 讨论

尽管已经作出了控制疟疾的多方努力,但它仍然是不发达国家和发展中国家的一个主要公共健康问题,特别是不到5岁的儿童和孕妇面临更大的风险^[1].世界卫生组织和国家卫生部门推荐乙胺嘧啶和氯喹为疟疾流行区的孕期预防药物,减少产妇死亡的发生并促进成功妊娠^[9].由于乙胺嘧啶和氯喹在减少疟疾相关的胎盘病理对于氧化应激和细胞凋亡的疗效尚未进行研究,所以本研究将主要对其进行探讨.

这项研究表明,用乙胺嘧啶或氯喹治疗妊娠或非妊娠因感染伯氏疟原虫而诱发疟疾的小鼠,结果在第六天寄生虫百分比减少了接近90%,小鼠的存活率几乎为100%,而未用药的小鼠死亡率则达到100%.本研究与早期研究在伯氏疟原虫感染的小鼠第五天寄生虫感染减少86.2%和抗疟疾治疗后寄生虫感染量减少至0%的结果是一致的^[10,11].有趣的是,疟疾感染的小鼠在接受抗疟治疗后所有孕鼠均能正常分娩并存活.这些观察结果清楚地表明,乙胺嘧啶和氯喹能有效地治疗疟疾感染从而促进正常分娩,故可以用作妊娠晚期的治疗剂.

氧化应激是体内的活性氧簇(ROS)过多而诱发的生理变化,可促使随后的脂质过氧化作用,它会导致包括疟疾在内的许多人类疾病^[12,13].最近研究表明,在感染的小鼠胎盘病理检查中,衡量脂质过氧化程度的指标MDA水平显著增加^[14].有趣的是,本研究中发现用乙胺嘧啶和氯喹治疗感染的怀孕小鼠后可使MDA和过氧化氢酶的活性恢复到正常水平.然而,过氧化氢酶的活性与早期研究中用氯喹治疗的疟疾患者(包括男性和女性)的血液中过氧化氢酶活性降低的结果相反.在本研究中过氧化氢酶的活性所观察到的差异可能是由于用于分析的模型为小鼠胎盘所致,物种之间存在差异.通过溴化乙锭/吖啶橙染色可以观察到抗疟治疗可显著降低感染小鼠胎盘中的细胞凋亡数.

病理组织学也发现,接受抗疟疾治疗的孕期小鼠的胎盘细胞形态是恢复正常的,同时其色素沉积也显著减轻.这些表明,乙胺嘧啶和氯喹不但能减少小鼠血液中寄生虫感染的红细胞百分比,还能降低疟疾感染所致胎盘病理学的改变,在妊娠后期使用时尤为显著.本研究清楚地表明了乙胺嘧啶和氯喹提供的保护机制,并进一步证明了早期研究中疟疾流行地区采用乙胺嘧啶间歇性预防治疗能大大降低疟疾对孕妇的伤害和降低胎儿出生体重偏轻发生率的结论.

本研究首次提供了关于乙胺嘧啶和氯喹通过降低氧化应激和细胞凋亡水平,对感染疟疾后的胎盘病理改变的保护作用,同时还可有效降低血液中感染红细胞的比率,从而达到很好的疟疾治疗效果.然而,由于人类和小鼠模型的生物学差异,乙胺嘧啶和氯喹对伯氏疟原虫的抗性会存在差异,最终治疗疟疾的结果也就可能会不同,所以目前的观察结果需要在人类身上进行检验,以便能更好地指导临床药物的使用.

[参考文献]

- [1] Taylor W R. Malaria research in the Greater Mekong Subregion: an overview[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2013, 44(1): 231-248.
- [2] Marsden C D, Lee Y, Kreppel K, et al. Diversity, differentiation and linkage disequilibrium: prospects for association mapping in the Malaria vector *Anopheles arabiensis*[J]. *G3 (Bethesda)*, 2013, 4(1): 121-131.
- [3] Pulford J, Kurumop S F, Ura Y, et al. Malaria case management in Papua New Guinea following the introduction of a revised treatment protocol[J]. *Malar J*, 2013, 12(1): 433-451.
- [4] Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A L. Protein measurement with folin's phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(2): 265-275.
- [5] Wills E D. Mechanism of lipid peroxidation formation in animal tissues[J]. *Biochem J*, 1996, 99(5): 667-676.
- [6] Catalase L H. *Methods of Enzymatic Analysis*[M]. New York: Academic Press, 1971: 885-894.
- [7] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups[J]. *Arch Biochem*, 1959, 82(12): 70-77.
- [8] Kono Y. Generation of superoxide radical during autooxidation of hydroxylamine and an assay of superoxide dismutase[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1978, 186(6): 189-195.
- [9] 谭涛, 秦宗会, 谭蓉. 青蒿素类药物的药理作用研究进展[J]. *中国药业*, 2009, 18(3): 63-64.
- [10] Mohd Ridzuan M A R, Ruenruetai U, Noor R A, et al. Antimalarial properties of Goniiothalamine in combination with chloro-

- quine against *Plasmodium yoelli* and *Plasmodium berghei* growth in mice[J]. Trop Biomed,2006,23(2):140-146.
- [11] Chandel S,Bagai U. Antiplasmodial activity of *Ajuga bracteosa* against *Plasmodium berghei* infected BALB/C mice[J]. Ind J Med Res,2010,131(1):440-444.
- [12] Balaji S N,Trivedi V. Extracellular methemoglobin mediated early ROS spike triggers osmotic fragility and RBC destruction: an insight into the enhanced hemolysis during Malaria[J]. Indian J Clin Biochem,2012,27(2):178-185.
- [13] 刘胜中,杨双强. TTX 通过 JAK2/STAT3 通路活化 SOD 减轻心肌细胞凋亡[J]. 重庆医科大学学报,2010,35(1):64-67.
- [14] Sharma L,Kaur J,Rishi P,et al. *Plasmodium berghei*;influence of infection on the oxidant and antioxidants levels in pregnant BALB/c mice[J]. Exp Parasitol,2012,131(7):215-222.

[责任编辑:黄 敏]