

• 实验研究 •

抗青蒿酯钠伯氏疟原虫膜表面 Con A
结合位点结合量的研究*

刘爱如 赵东坡 隋在云 吕丽莉

内容提要 目的: 研究疟原虫抗青蒿酯钠的产生机理。方法: 以异硫氰酸荧光素-伴刀豆球蛋白 A (F-ConA) 为探针, 采用荧光显微分光光度技术, 对伯氏疟原虫滋养体膜表面的 ConA 结合位点结合量进行了测定。结果: 抗青蒿酯钠滋养体膜表面的 ConA 结合位点结合量明显低于其正常株。结论: 抗青蒿酯钠原虫膜表面的糖类已发生了改变。而膜的流动性变化可能是 ConA 结合位点结合量改变的原因之一。

关键词 伯氏疟原虫抗青蒿酯钠株 伴刀豆球蛋白 A 结合位点 异硫氰酸荧光素-伴刀豆球蛋白 A 荧光显微分光光度技术

Study in the Combining Quantity of Con A-Binding Sites on Membrane Surface of Artesunate-Resistance Strain of Plasmodium Berghei LIU Ai-ru, ZHAO Dong-po, SUI Zai-yun, et al *Institute of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica of Shandong, Jinan (250014)*

Objective: To study the production mechanism of plasmodium berghei (PB) in resisting artesunate. **Methods:** The combining quantity of Con A-binding sites on membrane surface of PB trophozoite labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) of Con A was determined by fluoromicrospectrophotometer. **Results:** the combining quantity of PB artesunate-resistance strain (PBAR) was reduced significantly than that of PB normal strain ($P < 0.01$). **Conclusions:** The type of glucose in surface membrane of PBAR has changed and the changes of membrane fluidity could be one of the causes of the change in the combining quantity of Con A-binding sites on membrane of PBAR.

Key words plasmodium berghei artesunate-resistant strain, concanavalin A-binding sites, fluorescein isothiocyanate of Con canavalin A, the technique of fluoromicrospectrophotometre

细胞功能的调节有赖于受体与配体的复合物, 当细胞受体的结构、数目及功能发生异常时, 都会影响与配基的识别及结合, 进而影响细胞的功能⁽¹⁾。本研究以异硫氰酸荧光素-伴刀豆球蛋白 A (F-Con A) 为探针, 采用显微分光光度技术, 对抗青蒿酯钠伯氏疟原虫滋养体膜表面的 Con A 结合位点结合量进行测定, 并与其正常株原虫进行比较, 为疟原虫抗青蒿酯钠的产生机理提供科学依据。

材料与方法

1 试剂及其配制 伴刀豆球蛋白 A (Con-canavalin A, Con A) 为 Sigma 公司产品。异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC, F) 为阜宁生化制品厂出品。Percoll 为 Sigma 公司产品, 用 pH7.4 的 PBS 配成 60% Percoll 分离液备用⁽²⁾。F-Con A 的制备, 按文献⁽³⁾配成 2×10^{-4} mol/L 的浓度。

2 疟原虫

2.1 伯氏疟原虫正常株 (Plasmodium berghei N strain, K173), 以下称 N 原虫, 由军事医学科学院微生物流行病学研究所引进, 用体重 20 ± 1 g 的雄性 Swiss 小

* 国家自然科学基金资助课题 (No. 3880713)

山东省中医药研究所 (济南 250014)

鼠,每鼠腹腔注射感染红细胞 1×10^7 个,每 6~7 天传代 1 次,保种。

2.2 伯氏疟原虫抗青蒿酯钠株 (Plasmodium berghei artesunate resistance strain), 以下称 R 原虫, 由本所药理室培育⁽⁴⁾。

3 原虫样品的制备

3.1 感染伯氏疟原虫红细胞的分离 选择寄生率在 30% 以上, 分别感染富含 N 或 R 成熟滋养体原虫小鼠, 心脏取血, 3.8% 枸橼酸钠溶液抗凝, 沿离心管壁将其徐徐加入已备好的 60% Percoll 分离液面上, 其容积比为 3:5, 25000r/min 离心 15min, 使血液分层。取界面棕色层, 用 pH7.2、 $\frac{1}{15}$ mol/L PBS 洗 2 次, 即得感染率高达 95% 左右的红细胞, 其中绝大部分为成熟滋养体, 用 PBS 调整红细胞悬液适宜。

3.2 游离原虫的制备 溶血: 用 pH7.4, 0.02mol/L NH_4Cl -Tris 缓冲液与上述调整后的红细胞悬液, 按体积 9:1 混合, 置 37℃ 温育 10min, 不时轻轻振摇, 2000r/min 离心 10min, 除去表层白色絮状物, 如此反复 3 次, 最后用 PBS 洗 2 次, 再调整恢复其原容积, 此为一个样品。

4 疟原虫膜 F-Con A 标记 将以上备好的游离疟原虫样品, 于载物玻片上涂薄膜, 自然干燥, 冷丙酮固定, PBS 冲洗, 在 27℃ 下, 用 2×10^{-4} mol/L 的 F-Con A 溶液滴染 30min, 用 PBS 冲去未结合的染料, 最后用 80% 甘油 PBS 液封片, 待测。

5 原虫 ConA 结合位点结合量的测定 采用荧光显微分光光度计 SMP-05, 附设 RS 垂直照明器, 有 4 个可随意转换的滤光片组, 调激发滤片至 436nm, 光束分离镜 460nm, 阻断滤片 470nm 于入射光路上加一 Kp500nm 滤光片, 物镜 NEOFLUAR 100×No 1.30, 视野光栏有效直径为 10μm, 测量光栏有效直径为 15μm, 调整所测原虫位置, 用透射光红色光线进行。每测一个原虫细胞, 同时测该细胞背景的荧光强度。光电倍增管接收信号后, 通过放大器由数字显示器显示, 电动数码机打印记录。将测得的每个原虫的荧光强度减去背景的荧光强度, 则为每个原虫细胞膜表面 ConA 结合位点结合量的荧光强度, 每样品测 40 个原虫。

结 果

本研究在荧光显微分光光度计下, 经 F-Con A 标记的原虫呈现较强的亮绿色荧光。测定结果: R 原虫滋养体细胞膜表面 Con A 结合位点结合量明显低于 N 原虫, 经 t 检验有显著性差异 ($P < 0.01$), 见附表。

附表 伯氏疟原虫滋养体 Con A 结合位点结合量 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	样品数	ConA 结合位点结合量 Δ
R 原虫	8	462.39 $\pm$ 50.20
N 原虫	8	595.63 $\pm$ 92.83*

注: 与 R 原虫组比较, * $P < 0.01$; Δ 为荧光强度相对值

讨 论

疟原虫膜表面有无 Con A 受体, 尚未见有报道。因而, 在本研究称 Con A 结合位点较为妥当。

青蒿酯钠对疟原虫的杀害作用, 主要是在原虫的滋养体期⁽⁵⁾, 故推测其抗药性也主要在此期。因而, 我们选择了成熟滋养体作为 Con A 结合位点结合量的测定对象。

细胞膜上的凝集受体是糖蛋白或糖脂, 它在细胞的多种功能中起主要作用, 如细胞间的相互作用、识别和粘着, 细胞对外源物质的识别, 抗原-抗体反应等, 均主要决定于分子中的糖链结构⁽⁶⁾。F-Con A 是常用的荧光探针, Con A 与膜上糖蛋白的 α -D 吡喃葡萄糖苷和 α -D 吡喃甘露糖苷能专一结合⁽⁷⁾。

我们以往研究⁽²⁾表明: R 原虫膜的流动性明显降低, 低于 N 原虫。此与本结果 R 原虫膜表面 Con A 结合位点结合量明显减少, 少于 N 原虫是一致的。因此, 可以推测: (1) R 原虫膜表面的糖类已发生了改变; (2) R 原虫膜流动性降低, 可引起镶嵌于其中的受体蛋白向膜外表面暴露程度的改变即 Con A 结合位点结合量减少。提示膜流动性的改变可能是膜表面 Con A 位点结合量改变的原因之一。至于原虫抗性程度的大小与其膜表面 Con A 位点结合量及分布规律的变化, 尚需进一步探讨。

参 考 文 献

1. 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术. 第一版. 北京: 北京医科大学、协和医科大学联合出版社, 1990: 215.
2. 刘爱如, 赵东坡, 吕丽莉, 等. 抗青蒿酯钠伯氏疟原虫膜的流动性. 中草药 1995; 26 (8): 419—420.
3. 夏庆苏, 杨渝珍, 张希红, 等. HL-60 细胞诱导分化期间细胞表面 ConA 受体结合量变化的研究. 生物化学杂志 1991; 7 (4): 510—512.
4. 刘爱如, 任遵华. 伯氏疟原虫对青蒿酯钠的抗药性培育. 中国药理学报 1987; 8 (2): 147—149.
5. 李 锐, 刘连璞, 许日成, 等. 青蒿酯钠对猴疟原虫超微结构的影响. 中草药 1981; 12 (4): 31—32.
6. 孙 册. 凝集素 (lectin) 研究进展. 生物化学与生物物理进展 1981; 3: 15—25.
7. R·哈里森, CG 龙特. 生物膜结构与功能. 第一版. 北京: 科学出版社, 1981: 139.

(收稿: 1996—01—10 修回: 1996—11—19)