

抗青蒿酯钠伯氏疟原虫膜的流动性[△]

山东省中医药研究所(济南 250014) 刘爱如* 赵东坡 吕丽莉 隋在云

摘要 用荧光探针DPH标记伯氏疟原虫膜脂,在荧光显微分光光度计下测其荧光偏振度P值。结果表明抗青蒿酯钠伯氏疟原虫膜的P值大于正常伯氏疟原虫膜的P值。提示抗青蒿酯钠伯氏疟原虫膜的流动性低于正常伯氏疟原虫膜的流动性。

关键词 伯氏疟原虫抗青蒿酯钠株 伯氏疟原虫正常株 荧光显微分光光度计 荧光偏振度1,6-二苯基-1,3,5-己三烯

疟原虫寄生于活细胞内,其营养物质的供给、代谢产物的排出以及抗疟药物的作用必须经过膜(经细胞膜和疟原虫膜)才能顺利完成。大量研究表明:红细胞感染疟原虫后,出现生化代谢^[1,2],形态结构^[3,4]和功能^[5]的异常变化,也有青蒿素^[6]和青蒿酯钠^[7]对疟原虫超微结构影响的报道。我们研究发现感染抗青蒿酯钠伯氏疟原虫红细胞脂膜的流动性已发生了变化^[6]。现进一步对抗青蒿酯钠伯氏疟原虫膜的荧光偏振度进行测定,拟从原虫本身的变化为抗青蒿酯钠机理寻找依据。

1 实验材料

1.1 试剂及其配制:1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, DP-H)美国Sigma公司出品,用四氢呋喃配成浓度为 2×10^{-3} mol/L的原液,临时用pH 7.2 PBS稀释成 2×10^{-6} mol/L的工作液。Percoll为Sigma公司产品,用pH 7.4 PBS配成60% Percoll分离液^[9]应用。

1.2 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小鼠,每鼠腹腔注射感染红细胞 1×10^7 个,每6~7d传代一次,保种。

1.3 伯氏疟原虫抗青蒿酯钠株(Plasmodium berghei SA-R strain)以下称R原虫,由本所药理室培养^[10]。

3 实验方法

2.1 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,心脏取血于离心管内,3.8%枸橼酸钠溶液防凝。然后,沿离心管壁徐徐加入已备好的60% Percoll分离液面上,其容积比为3:5,25000r/min离心15min,使血液分出。取界面棕色层,用pH7.2 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调整红细胞悬液浓度为 4×10^{10} /L。

2.2 游离疟原虫的制备:溶血:用0.83% NH₄Cl-Tris缓冲液,pH7.4 0.02mol/L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,再调整恢复其原体积。此为一个样品。

2.3 疟原虫膜的DPH标记:将上述样品与DPH工作液1:1混匀,于27℃染色30min,1500 r/min离心10min,弃去剩余的标记液。其沉淀物用PBS洗2次,最后用PBS稀释一倍,灌

△Address: Liu Airu, Shandong Institute of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Jinan

注血球计数板, 立即测量。

2.4 疟原虫膜的荧光偏振度P值的测量: 所用仪器为西德荧光显微分光光度计(SMP-05), 有RS垂直照明器及偏振光装置。光源为200W的高压汞灯, 激发滤片为365nm, 光束分离镜为395nm, 阻断滤片为395nm, 视野光栏的有效直径为20nm, 测量光栏的有效直径稍大于视野光栏, 起偏器固定在垂直位, 物镜为Neofuar 100×NO 1.3, 用红色透射光照明聚焦和观察原虫形态和分布情况, 选择虫体分布均匀的视野进行测量, 测试温度控制在27±0.5℃。

每样品测20个视野。先测其上清在检偏器垂直位和水平位的荧光强度, 为本底的荧光强度。再测原虫在检偏器垂直位和水平位的荧光强度, 最后分别减去本底的荧光强度。所需的荧光偏振度P值, 用下列公式^[8]计算。

$$P = \frac{I_{VV} - G_{VH}}{I_{VV} + G_{VH}} \quad G \text{ 为校正因子, } G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$
。本实验测得的G = 0.68。P值越大, 微粘度越大, 则流动性越小; 其值越小, 微粘度越小, 则流动性越大。

3 结果与讨论

本文结果, R原虫膜的荧光偏振度P值明显大于N原虫 (P<0.05), 见表。提示R原虫膜的流动性低于N原虫膜的流动性。

青蒿素类抗疟药的抗疟机理是由该类药的化学结构特点含有过氧桥所决定。基于其在代谢过程中产生自由基^[11]或使红细胞中O₂和H₂O₂等活性氧的浓度升高^[12], 一方面可能直接杀伤疟原虫, 另一方面可氧化红细胞不饱和脂肪酸产生MDA等产物, 这些产物有很高的反应活性, 可交联脂质和蛋白, 它们既可直接作用于疟原虫, 也可使红细胞损伤、破溶, 而导致疟原虫死亡。药物作用于细胞必须通过细胞膜, 而许多药物又能改变细胞膜的性质^[13]。显然, R原虫及其所寄生红细胞膜的流动性降低^[8], 是长期施加药压所形成的一种适应。此膜的改变可影响药物掺入 (待发表文章), 致使药效降低。如能通过细胞代谢或其他因素对生物膜进行调控, 使其恢复原来膜的流动性, 达到恢复或提高疗效的话, 则对原虫膜的流动性降低也是生产抗药性机理 (之一) 的有力佐证。

表 伯氏疟原虫正常株和抗青蒿素钠株原虫膜的荧光偏振度值 (x̄ ± SD)

原虫	样品数	荧光偏振度P值 ¹
N	7	0.2781 ± 0.0152
R	9	0.3010 ± 0.0180*

* P<0.05

参 考 文 献

1 Schwartz R S, et al. Blood, 1987, 69 (2): 401

2 Joshi P, et al. Biochem J, 1987, 246 (1): 103

3 Bodammer J E, et al. Lab Invest, 1973, 28: 703

4 Weidekam E, et al. Biochem Biophys Acta, 1973, 323: 539

5 Tanabe K. Parasitol Today, 1990, 6 (7): 215

6 叶祖光, 等. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1986, 4(4): 260

7 李 锐, 等. 中草药, 1981, 12(4): 31

8 刘爱如, 等. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1994, 12(3): 70

9 Bivadeneira E M, et al. J Protozool, 1983, 30: 367

10 刘爱如, 等. 中国药理学报, 1987, 8(2): 149

11 靳永刚, 等. 中国药理学与毒理学杂志, 1989, 8(2): 138

12 蒯福宝, 等. 中国医学科学院学报, 1989, 11(3): 180

13 杨福渝, 等. 生理化学与生物物理进展, 1985, 6: 11

(1994-08-27收稿)