

用小鼠 $[^3\text{H}]$ 珠蛋白作底物法测定伯氏疟原虫珠蛋白酶活性¹

朱梅英、顾浩明 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 采用苯肼法使小鼠引起高网织红细胞后采血, 以 $[4,5-^3\text{H}]$ 亮氨酸参入标记血红蛋白, 并以制得的 $[^3\text{H}]$ 珠蛋白为底物研究了几个伯氏疟原虫株的珠蛋白酶活性。结果表明抗羟基哌啶株的酶活性并不比其敏感株明显高, 提示其抗性的产生可能与该酶无关。本文对去除原虫感染血内白细胞, 酶制备影响因素及其活性测定方法也进行了探讨。

关键词 珠蛋白; 珠蛋白酶; 微生物抗药性; 羟基哌啶; 伯氏疟原虫; 白细胞

疟原虫细胞内含有丰富的珠蛋白水解酶⁽¹⁾, 鉴于该酶对疟原虫具有一定的独特性, 以及近来在面临寻找新型抗疟药及研究疟原虫抗药性的艰巨任务, 因而引起了人们对该酶的重视⁽²⁾。文献尚未报道用鼠网织红细胞(MR)制备的 $[^3\text{H}]$ 珠蛋白为底物来测定伯氏疟原虫(*P. berghei*)中珠蛋白酶的活性, 本文即报道此方法。并以此法对某些株的活性进行了初步研究。

材 料 和 方 法

$[^3\text{H}]$ 珠蛋白的制备 昆明株杂种♀小鼠 $20 \pm \text{SD } 2 \text{ g}$, ip 盐酸苯肼 15 mg/kg , bid $\times 8 \text{ d}$, 取其中MR率较高的5鼠, 摘眼球采血约

3 ml, 用肝素抗凝, 查得MR率为61%。取20 μl 进行总rbc计数, 加3 ml 蛋白质合成培养液[参考文献(3-5)]及100 μl 含37 kBq dl⁻¹[4, 5- ^3H]亮氨酸(上海原子核研究所产品), 于37℃水浴上以120次/min振荡培育4 h。培育毕以850 $\times \text{g}$ 离心去上清液, 以生理盐水(NS)旋洗3次, 用蒸馏水溶血至总容量为12 ml, 再以1200 $\times \text{g}$ 离心去沉淀, 以下按文献(6)法分离珠蛋白, 最后加蒸馏水至10 ml 溶解, 分装小安瓶内-20℃储藏备用。按文献(7)法测定蛋白质。

疟原虫株 本试验中采用下列各虫株: CR为抗羟基哌啶株, 引自上海寄生虫病研究所; ANKA⁽⁸⁾及Anti-HP(ANKA)⁽⁹⁾分别为药物敏感株及衍自ANKA的抗羟基哌啶株, 引自第二军医大学; Anti-artemether(N)为衍自N株的抗蒿甲醚株及Anti-artesunate(N)⁽¹⁰⁾为衍自N株的抗蒿酯钠株, 上述抗青蒿素类化合物的株引自山东省中医药研究所。

酶提液制备 取原虫寄生率不低于10%的感染鼠, 眼眶取血, 肝素抗凝, 850 $\times \text{g}$ 离心去血浆, 并加NS 450 $\times \text{g}$ 离心洗两次, 再以NS稀释至20倍, 经纤维素柱(见表1)去除白细胞(wbc)和血小板, 450 $\times \text{g}$ 离心去上清液, 加入一倍压积细胞容量的NS稀释后, 用血细胞计数器进行总rbc计数及涂片, 吉氏染色后

1985年12月24日收稿 1986年12月16日修回
¹ 本研究得到中国青蒿素及其衍生物指导委员会部分资助

Tab 1. A comparison of methods used for the removal of wbc from blood of mice infected with *Plasmodium berghei*

Cellulose powder	Column bed (cm) Height	Diameter	Packing of powder	Flow rate (ml/min)	Recovery of rbc	Removal of wbc
Carl Schleicher & Schull, No 123(A)	12	1.5	Wet	0.5	<5%	>98%
Whatman, Coarse grade(B)	12	1.5	Wet	5	<5%	>90%
Same as A	6	2.1	Wet	1	14%	>98%
Same as A	6	2.1	Dry	1	20%	>98%
Same as A	6	0.8	Wet	1	83%	>98%

进行寄生 rbc 计数。再用以下两种方法进行溶血及制备：甲法参考文献 (11) 并加以改良，加 10 倍容量 NH_4Cl 155 mmol/L (以 Tris 50 mmol/L 配, pH 7.4) 液, 37°C 振摇 (60 次/min \times 3 min), 850 \times g 离心 10 min 去红色血红蛋白液, 下沉物加 10 倍容量冰冷蒸馏水在液氮中迅速冻融 3 次; 乙法为参考文献 (12, 13) 并经改良, 加 2 倍容量 NS 及 0.5 倍容量 0.2% 或 2% 皂素/NS, 于 37°C 振摇 (60 次/min), 10 min, 4°C 离心 (2000 \times g) 10 min 后去上清液, 同样条件以冰冷的 NS 洗 4 次, 至上清无红色。沉淀物加 10 倍容量冰冷蒸馏水在液氮中迅速冻融 3 次, 再 20 000 \times g 离心, 取上清液。最后根据原虫感染率和总 rbc 计数调整上述提液的容量, 至每 50 μl 该酶提液内含有相当于 3200 万寄生 rbc 的酶量, -70°C 储存备用。

酶活性测定 反应液由 150 μl Hanks 液

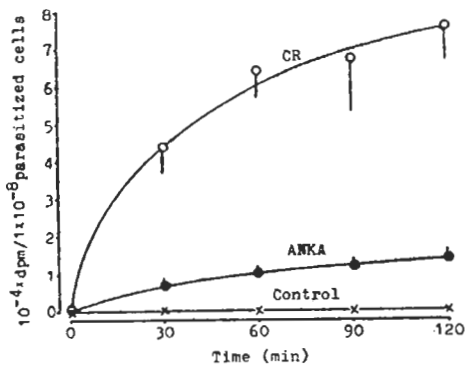


Fig 1. Proteolysis of mouse $[^3\text{H}]$ globin by the globinase extracted from *Plasmodium berghei*. CR: chloroquine-resistant strain. ANKA: ANKA strain. Control: without the enzyme. $[^3\text{H}]$ globin 2.65 kBq was added to each test tube. (n = 6 tubes)

(省去酚红, pH 7.4), 50 μl 上述 $[^3\text{H}]$ 珠蛋白原液 (后为节省底物改用蒸馏水稀释 6 倍后的溶液), 及 50 μl 上述酶提液组成, 反应温度为 37°C. 反应时间见图 1, 表 2, 3. 到时加 5% 三氯醋酸 1 ml 中止反应, 过 10 min 后 850 \times g 离心, 取上清 0.3 ml 加 10 ml 水性闪烁液 (配比为乙二醇乙醚 300 ml, PPO 4 g, POPOP 0.1 g, 二甲苯加至 1000 ml) 使呈均相后于 YST-78 液体闪烁仪计数。

结 果

$[^3\text{H}]$ 珠蛋白制备 所制得的 $[^3\text{H}]$ 珠蛋白的放射比度为 4.83 kBq/mg 蛋白, 放射浓度为 48.3 Bq/ml, 细胞合成率为 0.69 kBq/ 10^8 网织红细胞, $[^3\text{H}]$ 亮氨酸的参入率为 34.7%。

白细胞去除 本法试验了 5 种柱条件 (表 1) 这 5 种方法中虽然 wbc 去除率均很高, 但前 4 种方法均有严重溶血, 至使总 rbc 得率不超过 20%, 唯最后一种方法可使得率提高到 80% 以上, 且操作时间也不长, 以后本试验中的所有酶制备均用此法。

酶提液制备条件对酶活性的影响 (表 2) 用 NH_4Cl 一次离心法测得的酶提液实为粗提物, 反应前酶液预温对其影响很大 (A 法与 B 法)。改用皂素溶血及两次离心分离后可以提高酶提液的纯度而酶总活性无损失, 并且酶反应前的预温对酶活性的影响也不大。由表 2 还可见加入皂素的浓度不足可严重影响酶活性。

酶反应的时相过程 ANKA 株和 CR 株珠蛋白酶活性的时相过程见图 1。可见在 2 h 内

Tab 2. Activity of globinase in the lysate or extract prepared from chloroquine-resistant strain of *Plasmodium berghei* (n=4). Compared with method B, *** p<0.01 Compared with method D & E, ††† p<0.01

Method	Hemolysin & centrifuging	Appearance of preparation	Preincubation for 30 min at 37°C	Activity of globinases ($\bar{x} \pm SD$) §
A	0.83% NH ₄ Cl, 640 × g	Red, turbid	No	26 243 ± 6240***
B	Same as A	Same as A	Yes	75 410 ± 7594
C	0.2% Saponin, 2000 × g & 20 000 × g	Colorless & transparent	Yes	16 552 ± 1129†††
D	2% Saponin, 2000 × g & 20 000 × g	Same as C	No	67 824 ± 14 006
E	Same as D	Same as D	Yes	83 083 ± 7 073

§ dpm/10⁸ parasitized cells/90 min. Mouse [³H]globin 2.65 kBq was added to each test tube.

珠蛋白水解随时间而增加, 但 1 h 后增加量并不很大, 因此以后常规测定中选用 1 h 已够。

温育及 wbc 中蛋白酶对酶活性干扰观察
从图 1 可见, 不加酶对照组 [³H]珠蛋白的水解作用非常微弱, 另有实验表明以表 1 中按最后一种方法制得未感染 rbc 后, 再按上述 2% 皂素法制备的对照提取物对 [³H]珠蛋白几乎没有水解反应, 说明加酶样品所显示的酶活性来源于疟原虫珠蛋白酶, 而可能剩余少数 wbc 中的蛋白酶在本实验条件下不能测出。

几种抗药性株酶的活性 ANKA, Anti-HP, Anti-artemether(N) 及 Anti-artesunate(N) 株的酶活性(以 30 min 的水解度表示)的结果见表 3。从本实验可见 Anti-HP 虽然抗药性比其母株高达 19.3 倍, 其珠蛋白水解酶活性却未见明显增高。

Tab 3. Proteolysis of [³H]globin by the globinase from *Plasmodium berghei*. Compared with ANKA group, *p>0.05

Strain	Activity of globinase† Tubes	$\bar{x} \pm SD$	Drug resistancett
ANKA ⁽⁸⁾	10	12 428 ± 2594	
Anti-HP ⁽⁹⁾	6	10 834 ± 2138*	I ₅₀ = 19.3
Anti-artemether	6	13 722 ± 4031	I ₉₀ > 15
Anti-artesunate ⁽¹⁰⁾	6	10 978 ± 4572	I ₉₀ > 30.1

† (dpm/10⁸ parasitized cells)/30 min. Mouse [³H]globin 15.9 kBq was added to each test tube.

†† Compared with the parent strain

讨 论

亮氨酸在小鼠珠蛋白 α, β 链中出现的频数分别达 12.1% 及 11.6%, 仅次于丙氨酸。然而丙氨酸在生物体系中代谢率快, 显然采用 [³H]亮氨酸作为珠蛋白生物合成的参入物可以提高标记物的比度, [³H]亮氨酸国内也有产品供应, 在本实验条件下 [³H]珠蛋白参入率可达 34.7%。预温对 NH₄Cl 法提得的酶制备的酶活性有明显影响, 这可能与该制备为粗提取物有关, 预温促使活性酶量增加。

有人采用各种专一性底物来测定各特定蛋白水解酶类的活性^(1, 12-15), 但在研究总酶类活性时, 使用蛋白质本身当是最合适的底物。早期采用 uv 分光光度法测定疟原虫蛋白酶水解释出的氨基酸及可溶性小分子肽来估计总酶活性⁽¹⁴⁾, 但由于其灵敏度及专一性均差未能广泛使用。近来采用人的 [³H]珠蛋白作底物来研究鼠疟原虫的蛋白酶活性, 大大提高了灵敏度和专一性⁽¹⁵⁾。由于人高网织红细胞率血来之不易及从原虫与宿主细胞的寄生特异性来看, 采用 [³H]鼠珠蛋白作底物来研究疟原虫珠蛋白活性当更为适合。所以本实验在小鼠(鼠疟原虫的宿主)身上以苯胺法产生的网织 rbc 来合成小鼠 [³H]珠蛋白, 并以此 [³H]珠蛋白作为底物。

用此法初步研究结果看来, 抗羟基哌啶株的酶活性较其药物敏感的 ANKA 株未见明显增高, 这是否与抗性指数不高有关, 尚待进一步

步探讨。

本实验的总酶类活性测定法还可用于疟原虫株蛋白水解酶类特点的分析, 新型抗疟药物的寻找及药物作用原理的研究。

致谢 庞大伟协助离心分离。朱明康、花泽协助同位素测定。

参 考 文 献

- 1 Sherman IW, Tanigoshi L. The proteases of *Plasmodium*: a cathepsin D-like enzyme from *Plasmodium lophurae*. In: Slutsky GM, ed. *The biochemistry of parasites*. 1st ed. Oxford: Pergamon, 1981: 138-49
- 2 Wood PA, Rock LM, Eaton JW. Chloroquine resistance and host cell hemoglobin catabolism in *Plasmodium berghei*. In: Eaton JW, Brewer GJ, eds. *Malaria and the red cell*. 1st ed. NY: Alan R. Liss, 1984: 159-67
- 3 Vinograd J, Hutchinson WD. Carbon-14 labelled hybrids of hemoglobin. *Nature* 1960; 187: 216
- 4 Fuhr J, Natta C, Marks PA, Bank A. Protein synthesis in cell-free systems from reticulocytes of thalassaemic patients. *Ibid* 1969; 224: 1305
- 5 Basch RS. Hemoglobin synthesis in short-term cultures of human fetal hematopoietic tissues. *Blood* 1972; 39: 530
- 6 Anson ML, Mirsky AE. Protein coagulation and its reversal. The preparation of insoluble globin, soluble globin and heme. *J Gen Physiol* 1930; 13: 469
- 7 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265
- 8 陈林、郭凤川、戴祖瑞、李从军。伯氏疟原虫 ANKA 株模型的建立及其在抗疟药筛选中的应用。 *药学报* 1984; 19: 732
- 9 李高德、瞿逢伊、陈林。伯氏疟原虫 ANKA 株抗喹啉系的培育。 *寄生虫学与寄生虫病杂志* 1985; 3: 189
- 10 刘爱如、任遵华。伯氏疟原虫对青蒿素钠的抗药性培育。 *中国药理学报* 1987; 8: 149
- 11 Martin WJ, Finerty J, Rosenthal A. Isolation of *Plasmodium berghei* (malaria) parasites by ammonium chloride lysis of infected erythrocytes. *Nature [New Biol]* 1971; 233: 260
- 12 Charet P, Aissi E, Maurois P, Bouquelet S, Biguet J. Aminopeptidase in rodent *Plasmodium*. *Comp Biochem Physiol* 1980; 65 B: 519
- 13 Aissi E, Charet P, Bouquelet S, Biguet J. Endoprotease in *Plasmodium yoelii nigeriensis*. *Ibid* 1983; 74 B: 559
- 14 Cook L, Grant PT, Kermack WO. Proteolytic enzymes of the erythrocytic forms of rodent and simian species of malarial *Plasmodia*. *Exp Parasitol* 1961; 11: 372
- 15 Mahoney JR, Eaton JW. Chloroquine resistant malaria: association with enhanced plasmodial protease activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 100: 1266

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Jul, 8 (4): 351-355

Determinations of activity of the globinase from *Plasmodium berghei* by radiometry with mouse [³H]globin as substrate

ZHU Mei-Ying, GU Hao-Ming

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT An induction of reticulocytes in mouse blood amounted to 60% was achieved by ip injection of phenylhydrazine hydrochloride 15 mg/kg twice a day for 8 d. [4,5-³H]leucine as a precursor was used to

label the hemoglobin being synthesized in a cell-system *in vitro* consisting of the high percentage of reticulocytes. Then, [³H]globin was prepared from the [³H]hemoglobin. Assays of the activity of the globinase from

P. berghei were performed using the [^3H]globin as a substrate. There was no elevation in activity of the globinase from the strain of *P. berghei* resistant to hydroxypiperaquine than that from the ANKA strain of *P. berghei* sensitive to antimalarials. In the present paper, the affecting factors were also investigated on removal of white

cells from malaria-infected blood and on determinations of activity of the globinase in the lysate or extract from *P. berghei*.

KEY WORDS [^3H]globin; globinase; *Plasmodium berghei*; microbial drug resistance; hydroxypiperaquine; leukocytes

* * * * *