

文章编号: 1000-7423(2002)-05-0298-04

【实验报道】

日本血吸虫成虫肠道内容物中金属蛋白酶的鉴定

袁仕善¹ 易新元^{1*} 曾宪芳¹ 张顺科¹ 黄跃龙¹ Larry McReynolds²

【摘要】 目的 鉴定日本血吸虫成虫肠道内容物中的金属蛋白酶。方法 以明胶作底物,利用明胶-SDS-PAGE 分离日本血吸虫成虫肠道内容物,将电泳后的凝胶于不同 pH 缓冲液和酶抑制剂中进行孵育,对其中的金属蛋白酶进行分析和鉴定。结果 日本血吸虫成虫肠道内容物中存在降解明胶的金属蛋白酶,其最适 pH 值为 7~9。金属蛋白酶抑制剂 EDTA 抑制其活性。电泳分离获得有活性的酶蛋白,该酶是血吸虫感染血清识别的弱抗原。结论 日本血吸虫成虫肠道内容物存在金属蛋白酶。

【关键词】 日本血吸虫;成虫;肠道内容物;明胶;电泳;抑制剂;金属蛋白酶

中图分类号:R383.24

文献标识码:A

Identification of Metalloproteinase in Intestinal Contents Of Adult *Schistosoma japonicum*

YUAN Shi-shan¹, YI Xin-yuan^{1*}, ZENG Xian-fang¹, ZHANG Shun-ke¹, HUANG yue-long¹, Larry McReynolds²

(1 Laboratory of Schistosomiasis, Xiangya School of medicine, Central South University, Changsha 410078;

2 Molecular Parasitology Group, New England Biolabs, MA 0195, USA)

【Abstract】 Objective To identify the proteinases in intestinal contents of *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*) adult worms. **Methods** Proteinases were fractionated through gelatin-SDS-PAGE, and gelatin was degraded by proteinases when the gel was incubated in buffer with optimal pH. Metalloproteinase which degrades gelatin was identified by incubating gel in optional buffer containing different enzyme inhibitors. Metalloproteinase was isolated through SDS-PAGE. **Results** A metalloproteinase was identified in intestinal contents of *S. japonicum* adult worms. The optimal pH of metalloproteinase is pH 7~9. The activity of the metalloproteinase was inhibited by EDTA. The metalloproteinase showed enzymatic activity after being fractionated through SDS-PAGE and weakly reacted with sera of rabbits infected with *S. japonicum*. **Conclusion** A metalloproteinase is present in intestinal contents of *S. japonicum* adult worms.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*, adult worm, intestinal contents, gelatin, electrophoresis, inhibitor, metalloproteinase

Supported by the Science Commission of Hunan Province (No. 00JZY2115) and the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (No. 980268)

* Corresponding author, E-mail: xinyuanyi55@yahoo.com

血吸虫在终宿主体内主要靠吞食并消化宿主红细胞获取营养。消化降解宿主蛋白的酶主要存在于血吸虫的肠道及其排泄物中。业已证明,血吸虫肠道内存在降解血红蛋白的血红蛋白酶,血吸虫通过血红蛋白酶分解宿主红细胞而获得营养,此酶为酸性半胱氨酸蛋白酶,与哺乳动物的组织蛋白酶 B 类似,分子量为 31 kDa^[1-3]。为探讨血吸虫肠道及其排泄物中是否存在降解宿主蛋白的其它蛋白酶,本研究以明胶作底物,利用明胶-SDS-PAGE 分离日本血吸虫成虫肠道内容物,将电泳后的凝胶进行孵育和考马斯亮蓝染色,对其中的蛋白水解酶进行分析和鉴定。

材料与方法

1 仪器与试剂

电泳仪、电泳槽、转印电泳槽系美国 BIO-RAB 公司生产,冷冻干燥机系新芝生物技术研究所生产。丙烯酰胺系 Amresco 公司进口分装,甲叉双丙烯酰胺系 Fluka 公司进口分装,十二烷基硫酸钠(SDS)系 Serva 公司进口分装,标准分子量预染蛋白系美国 NEW ENGLAND BIOLABS Ins. 产品,乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)系广州化学试剂厂生产。蛋白酶抑制剂对甲苯磺酰氟(PMSF)、cystatin、pepstatin 系美国 BACHEM 公司产品,乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)系广州化学试剂厂生产。明胶系 MERCK 公司产品。其它试剂均系国产分析纯。

2 血清制备

分别给家兔人工感染 2 000 条和 500 条尾蚴,于

基金项目:湖南省科技厅资助(No. 00JZY2115)及世界卫生组织热带病研究培训专门规划资助项目(No. 980268)

作者单位:1 中南大学湘雅医学院血吸虫病研究室,长沙 410078; 2 Molecular Parasitology Group, New England Biolabs, Ma1915, USA

* 通讯作者 E-mail: xinyuanyi55@yahoo.com

45 d 和 120 d 后分别宰杀感染家兔,颈动脉取血,得 45 d 和 120 d 的日本血吸虫感染兔血清(IRS)。-20℃冻存。

3 血吸虫成虫肠道内容物的收集

按参考文献[4]的方法进行:自人工感染 2 000 条尾蚴后 45 d 的家兔门脉系统内取虫。用生理盐水洗涤 3 次,加入少量蒸馏水,37℃培养 30 min,挑出虫体,悬液于 4℃,10000 g 离心 20 min,收集上清,冻干浓缩,加少量 PBS 溶解,得日本血吸虫成虫肠道内容物。-20℃冻存。参考 Sedmak 等^[5]的方法检测血吸虫成虫肠道内容物的蛋白浓度。

4 血吸虫成虫肠道内容物的明胶-SDS-PAGE 分析

参考 Young 等^[6]的方法进行:分离胶浓度为 10%,含 0.1%明胶,浓缩胶的浓度为 3.75%,于 4℃冰箱内,25 mA 恒电流泳,2.5% Triton X-100 振荡洗涤凝胶 30 min,用选定的孵育缓冲液洗涤 1 h,期间换液 1 次,于选定的孵育缓冲液中 37℃孵育过夜,0.1%考马斯亮蓝 R-250 染色,含 25% 甲醇的 7.5% 乙酸脱色,参考标准分子量预染蛋白,参照郭晓君^[7]的方法计算蛋白酶的分子量。

5 pH 值对血吸虫成虫肠道内容物中蛋白酶活性的影响

配制 pH 4~9 的不同缓冲液:0.1 mol/L pH 4 的 HAc-NaAc,0.1 mol/L pH 5 的 HAc-NaAc,0.1 mol/L pH 6 的 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄,0.1 mol/L pH 7 的 Tris-HCl,0.1 mol/L pH 8 的 Tris-HCl,0.1 mol/L pH 9 的 Tris-HCl。将凝胶置于不同缓冲液中孵育过夜,分析 pH 值对血吸虫成虫肠道内容物蛋白酶活性的影响。

6 血吸虫成虫肠道内容物中金属蛋白酶的鉴定

于各凝胶的孵育缓冲液中(0.1 mol/L pH 9 的 Tris-HCl)加入如下终浓度的各种酶抑制剂:PMSF(1 mmol/L,系丝氨酸蛋白酶抑制剂)、cystatin(5 μg/ml,系半胱氨酸蛋白酶抑制剂)、pepstatin(10 μmol/L,系门冬氨酸蛋白酶抑制剂)、EDTA(10 mmol/L,系金属蛋白酶抑制剂),37℃孵育过夜,分析金属蛋白酶对各种抑制剂的敏感性。

7 血吸虫成虫肠道内容物中金属蛋白酶的分离及其活性分析

参照 Valli 等^[8]的方法,在非还原条件下进行电泳。分离胶及浓缩胶的浓度分别为 10% 和 3.75%。

参考标准分子量预染蛋白的位置,切取分子量为 85 kDa 的凝胶带,碾碎凝胶,加入少量蒸馏水,4℃浸取,高速离心,收集上清,得分离的金属蛋白酶。参考 Valli 等^[8]的方法,在非还原条件下,对分离的金属蛋白酶进行 SDS-PAGE 及免疫印迹分析。酶标二抗为 HRP-SPA,稀释度为 1:3 000。参考 Young 等^[7]的方法,同前分析其蛋白水解活性。

结 果

1 血吸虫成虫肠道内容物中蛋白酶的最适 pH 值

血吸虫成虫肠道内容物在中性及碱性缓冲液中水解明胶,pH 9 时的活性最强。肠道内容物水解明胶后,在 62 和 83 kDa 附近产生 4 条水解蛋白带(图 1)。

2 血吸虫成虫肠道内容物中蛋白酶分子量的测定

SDS-PAGE 分离的肠道内容物在 0.1 mol/L pH 9 的 Tris-HCl 缓冲液中水解明胶产生 4 条带,其主带的蛋白酶分子量为 85 kDa。另 3 条弱带的蛋白酶分子量分别为 60、64 和 80 kDa(图 2)。

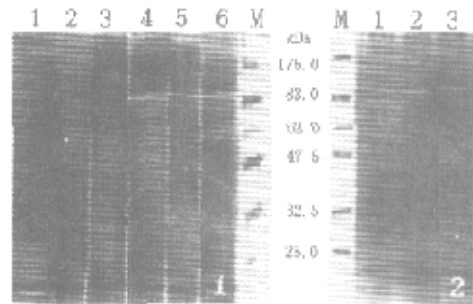


图 1 pH 值对血吸虫肠道内容物蛋白酶活性的影响 1~6 pH 4~9 的不同缓冲液 M 蛋白质标志物 图 2 血吸虫肠道内容物中蛋白酶的明胶-SDS-PAGE 的凝胶图谱 M 蛋白质标志物 1~3 肠道内容物

Fig.1 Effect of pH on the activities of proteinases in schistosome intestinal contents Lanes 1-6 Buffers with different pH values ranging from 4 to 9 M Marker Fig.2 Gelatin-SDS-PAGE of proteinase in schistosome intestinal contents M Marker Lanes 1-3 Intestinal contents

3 血吸虫成虫肠道内容物中金属蛋白酶的鉴定

血吸虫成虫肠道内容物在含各种酶抑制剂的缓冲液中水解明胶,85 kDa 的蛋白酶受金属蛋白酶抑制剂 EDTA 抑制,丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 cystatin 及门冬氨酸蛋白酶抑制剂 pepstatin 并不抑制该蛋白水解酶的活性,表明 85 kDa 的酶

为金属蛋白酶。另外 3 条弱带处的蛋白酶不受所用酶抑制剂的抑制,因而未能得到鉴定(图 3)。

4 血吸虫成虫肠道内容物中金属蛋白酶的分离及其活性分析

分离的金属蛋白酶的电泳结果如图 4。分离后的

金属蛋白酶显示 1 条蛋白带。其免疫印迹分析结果如图 5。分离后的金属蛋白酶能被 45 d 及 120 d 的 IRS 识别,呈较弱的阳性反应。分离的金属蛋白酶水解明胶的结果如图 6。与血吸虫成虫肠道内容物一样,分离的金属蛋白酶具有蛋白水解活性,能水解明胶,产生 1 条亮带,且其活性被 EDTA 抑制。

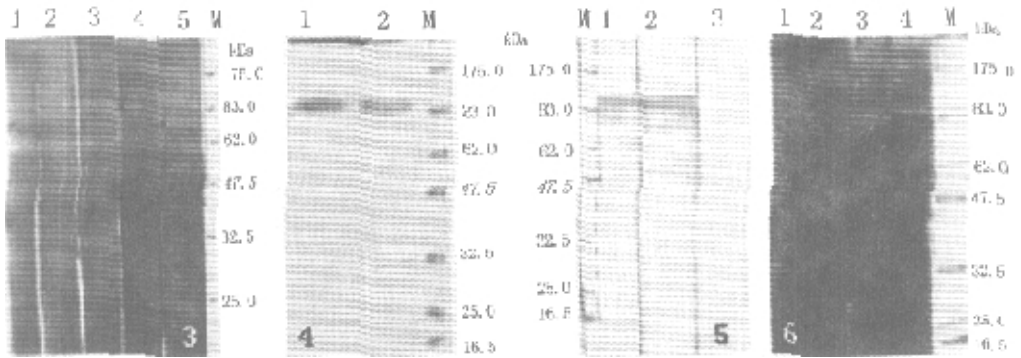


图 3 酶抑制剂对血吸虫肠道内容物中蛋白酶活性的影响 1 正常对照 2 PMSF 3 Cystatin 4 Pepstatin 5 EDTA M 蛋白质标志物 图 4 分离的金属蛋白酶的电泳图 1,2 分离的金属蛋白酶 M 蛋白质标志物 图 5 分离的金属蛋白酶的免疫印迹图 M 蛋白质标志物 1~3 分离的金属蛋白酶 1 与 45 d IRS 反应 2 与 120 d IRS 反应 3 与 NRS 反应 图 6 分离的金属蛋白酶水解明胶的图谱 M 蛋白质标志物 1 肠道内容物在含 EDTA 的 0.1 mol/L pH 9 Tris-HCl 孵育 2 分离的蛋白酶在含 EDTA 的 0.1 mol/L pH 9 Tris-HCl 孵育 3 肠道内容物在 0.1 mol/L pH 9 Tris-HCl 孵育 4 分离的蛋白酶在 0.1 mol/L pH 9 Tris-HCl 孵育

Fig. 3 Effect of inhibitor on the activities of proteinases in schistosome intestinal contents Lane 1 Control without inhibitor Lane 2 PMSF Lane 3 Cystatin Lane 4 Pepstatin Lane 5 EDTA M Marker Fig. 4 SDS-PAGE of fractionated metalloproteinase Lanes 1 and 2 Fractionated metalloproteinase M Marker Fig. 5 Immunoblotting of fractionated metalloproteinase M Marker Lanes 1-3 Fractionated metalloproteinase Lane 1 Reacted with 45 d IRS Lane 2 Reacted with 120 d IRS Lane 3 Reacted with NRS Fig. 6 Proteolysis of gelatin by fractionated proteinase M Marker Lane 1 Intestinal contents incubated with 0.1 mol/L pH 9 Tris-HCl buffer containing EDTA Lane 2 Fractionated proteinase incubated with 0.1 mol/L pH 9 Tris-HCl buffer containing EDTA Lane 3 Intestinal contents incubated with 0.1 mol/L pH 9 Tris-HCl buffer Lane 4 Fractionated proteinase incubated with 0.1 mol/L pH 9 Tris-HCl buffer

讨 论

宿主血红蛋白是血吸虫的重要营养源。分析和鉴定参与降解宿主血红蛋白的蛋白酶,对探讨血吸虫诱导宿主免疫应答的机制,寻找有效的诊断抗原、疫苗候选抗原及药物靶分子具有重要意义。Chappell 等^[9]在曼氏血吸虫成虫可溶性呕吐物中检测到“血红蛋白酶”的蛋白水解活性,且加入巯基化合物和半胱氨酸能增强其酶的活性,随后,从曼氏血吸虫成虫抽提物中分离得到两种蛋白酶 SM_w32 和 SM_w28 均能水解血红蛋白的巯基依赖性酸性蛋白酶。Gotz 等^[11]重组表达了曼氏血吸虫的组织蛋白酶 B(Sm31),证明组织蛋白酶 B 就是参与消化宿主血红蛋白的“血红蛋白酶”。Cafrey 等^[10]对 5 种血吸虫成虫呕吐物分析了与哺乳动物组织蛋白酶 B、H 和 L 的生化同源性,发现呕吐物中可能存在少量组织蛋白酶 L 的活性,组织蛋白酶 B 的

活性在各血吸虫种间是不同的。Brady 等^[11]重组表达了有活性的、存在于曼氏血吸虫排泄分泌物中的组织蛋白酶 L1(SmCL1)和组织蛋白酶 L2(SmCL2),证明 SmCL1 和 SmCL2 是不同的组织蛋白酶型半胱氨酸蛋白酶,具有不同的生物学作用。本研究利用明胶-SDS-PAGE 分析日本血吸虫成虫肠道内容物的金属蛋白酶活性,在 60、64、80 和 85 kDa 处出现 4 条水解蛋白带,其中 85 kDa 处最强;经酶抑制剂处理,发现肠道内容物中存在受金属蛋白酶抑制剂 EDTA 抑制的 85 kDa 蛋白酶,说明该酶是一种金属蛋白酶,该酶的最适 pH 值为碱性,酶活性不受非金属蛋白酶抑制剂 PMSF、cystatin、pepstatin 的抑制。电泳后切胶获得有活性的金属蛋白酶,此结果将有助于研究该酶在血吸虫营养、代谢和致病中的作用。

金属蛋白酶是一类以金属离子作为辅基的蛋白酶,目前在寄生虫领域中的研究较少。Branquinha

等^[1]以明胶为底物,于明胶-SDS-PAGE 上用抑制剂原位检测了锥虫科中 7 个不同属的 11 个虫种的蛋白酶谱,结果表明,锥虫中广泛存在半胱氨酸蛋白酶和金属蛋白酶,有金属蛋白酶活性部分的分子量为 50~100 kDa,用 Triton X-114 抽提后分布在去垢剂相,说明该金属蛋白酶是一种膜结合蛋白。Etges 等^[13]用活细胞表面放射性碘标记检测人利什曼原虫、豚鼠利什曼原虫、*Crithidia fasciculata* 和 *Herpetomonas samuelpeaoi* 中共 13 个虫种的鞭毛体,发现有双亲性的、定位于表面的金属蛋白酶的表达;用纤维蛋白原-SDS-PAGE 作酶谱分析,发现各种利什曼原虫和两种单寄生的锥虫均存在与鞭毛体表面蛋白酶类似的胞外酶,认为这种功能保守的金属蛋白酶与对哺乳动物宿主的寄生虫感染无关,但对在宿主体内的虫体存活起作用。Haffner 等^[14]发现,旋盘尾丝虫的排泄分泌物中存在降解明胶的金属蛋白酶。Day 等^[15]利用锌螯合型金属蛋白酶抑制剂 1,10-二氮菲,通过体外和体内试验证明曼氏血吸虫成虫存在起重要作用的金属蛋白酶。本文从日本血吸虫成虫肠道内容物中鉴定出金属蛋白酶,其对血吸虫及宿主的作用尚不清楚,还有待进一步研究。

本研究参照文献[4]所述方法,于低渗的蒸馏水中短时培养血吸虫成虫以收集其肠道内容物,其中必然含有体表细胞的脱落物和代谢物,但因培养时间短,体表细胞的脱落物和代谢物相对较少,其中主要成分仍为肠道内容物。宋小平等^[16]的研究也发现,日本血吸虫成虫排泄分泌抗原同样含有血吸虫的体表成分。本研究采用明胶-SDS-PAGE 分离肠道内容物,在不同条件下孵育凝胶以分析其中金属蛋白酶的活性。所采用的方法简便,所需设备少,结果重现性好,是一种分析和鉴定血吸虫金属蛋白酶的有效方法。然而,本研究未鉴定到其中存在的半胱氨酸蛋白酶类,可能与冻存过程中酶失活及所用缓冲液有关。由于所选用的酶抑制剂有限,其余 3 条蛋白水解带的酶未能获得鉴定,尚待进一步分析。

参 考 文 献

[1] Gotz B, Klinkert MQ. Expression and partial characterization of a

cathepsin B-like enzyme (Sm31) and a proposed 'haemoglobinase' (Sm32) from *Schistosoma mansoni*[J]. *Biochem J*, 1993, 290:801-806.

[2] Ghoneim H, Klinkert MQ. Biochemical properties of purified cathepsin B from *Schistosoma mansoni*[J]. *Int J Parasitol*, 1995, 25:1515-1519.

[3] Caffrey CR, Ruppel A. Affinity isolation and characterization of the cathepsin B-like proteinase Sj31 from *Schistosoma japonicum*[J]. *J Parasitol*, 1997, 83:1112-1118.

[4] Chappell CL, Dresden MH. *Schistosoma mansoni*: proteinase activity of "hemoglobinase" from the digestive tract of adult worms[J]. *Exp Parasitol*, 1986, 61:160-167.

[5] Sedmak JJ, Grossberg SE. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Commassie brilliant blue G250[J]. *Anal Biochem*, 1977, 79:544-552.

[6] Young CJ, McKeand JB, Knox DP. Proteinases released *in vitro* by parasitic stages of *Teladorsagia circumcincta*, an ovine abomasal nematode[J]. *Parasitology*, 1995, 110:465-471.

[7] 郭晓君. SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1991, 18:32-39.

[8] Valli LC, Kanamura HY, Da Silva RM, et al. Schistosomiasis mansoni: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 61:302-307.

[9] Chappell CL, Dresden MH. Purification of cysteine proteinases from adult *Schistosoma mansoni*[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1987, 256:560-568.

[10] Caffrey CR, Rheinberg CE, Mone H, et al. *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum* and *S. rodhaini*: cysteine-class cathepsin activities in the vomitus of adult worms[J]. *Parasitol Res*, 1997, 83:37-41.

[11] Brady CP, Brindley PJ, Dowd AJ, et al. *Schistosoma mansoni*: differential expression of cathepsin of L1 and L2 suggests discrete biological functions for each enzyme[J]. *Exp Parasitol*, 2000, 94:75-83.

[12] Branquinha MH, Vermelho AB, Goldenberg S, et al. Ubiquity of cysteine and metalloproteinase activities in a wide range of trypanosomatids[J]. *J Eukaryot Microbiol*, 1996, 43:131-135.

[13] Etges R. Identification of a surface metalloproteinase on 13 species of *Leishmania* isolated from humans, *Crithidia fasciculata*, and *Herpetomonas samuelpeaoi*[J]. *Acta Trop*, 1992, 50:205-217.

[14] Haffner A, Guilavogui AZ, Tischendorf FW, et al. *Onchocerca volvulus*: microfilariae secrete elastolytic and matrix-degrading serine and metalloproteinases[J]. *Exp Parasitol*, 1998, 90:26-33.

[15] Day TA, Chen CZ. The metalloproteinase inhibitor 1,10-phenanthroline affects *Schistosoma mansoni* motor activity, egg laying and viability[J]. *Parasitology*, 1998, 116:319-325.

[16] 宋小平, 刘多. 日本血吸虫成虫排泄分泌抗原的生化及免疫学特性研究[J]. *湖南医科大学学报*, 1991, 16:118-122

(收稿日期:2002-05-13 编辑:盛慧锋)