

伯氏疟原虫线粒体、微粒体与酸沉淀蛋白中氯喹量的分布*

中国预防医学科学院寄生虫病研究所** 上海 200025
王琴美 王鸣杰 常惠玲

近年,我们发现进入抗氯喹疟原虫中的氯喹量较敏感的低 54.1%,不能达到杀虫有效量^[1]。为此,我们测定了抗氯喹株和敏感株伯氏疟原虫线粒体、微粒体与酸沉淀蛋白质等各组份中的氯喹含量,并分析其结果。

材料与方 法

伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*)印度株和由此株选育的抗氯喹株(抗性强度>200倍,本所病原生物研究室提供),昆明株清洁小鼠(中国科学院动物中心),磷酸氯喹(上海中西药厂),常规试剂为分析纯,HPLC系统所用溶剂为光谱纯。

疟原虫样品制备 敏感株和抗氯喹株疟原虫 5% 感染血各 0.2 ml(约含 10⁷ 感染红细胞)分别 p 小鼠,原虫感染率达 30% 左右时,ig 氯喹 400 mg/kg,3 h 后摘除眼球取血,经碘化乙基纤维素-葡聚糖凝胶 G-25 柱去除白细胞^[2],用皂溶法(20 倍于红细胞压积的 0.015% 皂素 v/v,37-30 min)获得游离疟原虫,每只感染鼠为一样品。

疟原虫高氯酸处理的上清液,沉淀蛋白、线粒体和微粒体样品制备,将上述方法获得的疟原虫样品 2~3 个合并,加入 0.8 mol/L 高氯酸 0.5 ml,匀浆后 2 500 rpm 离心 10 min,获得高氯酸处理的上清液和沉淀蛋白。线粒体:每 2 个疟原虫样品合并,加入线粒体抽提液,匀浆 2 500 g 离心 10 min,除去细胞碎片等粗沉淀物,上清液 10 000 g 4 离心 20 min,沉淀为线粒体样品,其上清液再 100 000 g 4 离心 20 min,获得的沉淀为微粒体样品。

氯喹的抽提与检测 按 Bergquist 等报道,略加修改。在硷性条件下用 1,2-二氯乙烷抽提氯喹^[3],用 HPLC(外标法)分离检测氯喹。流动相:甲醇:水 29:71(v/v)100 ml 水中加入高氯酸 0.56 ml 作离子对,磷酸缓冲液调 pH 至 3.0,UV 343 nm 检测。用 Lowry 法测蛋白质含量。

结 果

氯喹大量进入高氯酸处理的上清液组份中,每毫克蛋白质中的氯喹量高达毫微克水平,两株疟原虫间无明显差异。高氯酸沉淀蛋白质,线粒体和微粒体中每毫克蛋白质的氯喹量相近,线粒体和微粒体中的氯喹量,两株疟原虫间无差异,在高氯酸沉淀蛋白质中,抗氯喹原虫蛋白质中的氯喹量比敏感原虫低 59.1%($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 进入伯氏疟原虫线粒体、微粒体与酸沉淀蛋白中的氯喹量比较

组 别	敏 感 株	抗 氯 喹 株
高氯酸处理的上清液	7013.7 ± 2570(8) 氯喹 ng/mg 蛋白	7215.7 ± 2538(8) 氯喹 ng/mg 蛋白
高氯酸沉淀蛋白	110.7 ± 43(8) 氯喹 ng/mg 蛋白*	45.1 ± 19(7) 氯喹 ng/mg 蛋白*
线粒体	192.8 ± 63(15) 氯喹 ng/mg 蛋白	182.0 ± 57(17) 氯喹 ng/mg 蛋白
微粒体	128.7 ± 47(8) 氯喹 ng/mg 蛋白	179.2 ± 42(5) 氯喹 ng/mg 蛋白

* $P < 0.01$

讨 论

李高德等(1993)报道抗氯喹疟原虫中过度表达的 54 kDa 蛋白与氯喹结合^[5]。Menting(1977)指出 33 kDa 蛋白是氯喹结合蛋白^[6]。王琴美等证明氯喹敏感的疟原虫各蛋白均与氯喹结合,抗氯喹原虫的 80% 蛋白与氯喹结合,同株疟原虫各蛋白与氯喹结合能力有差异,抗性株和敏感株疟原虫间差异更大^[7]。我们的研究指出进入高氯酸沉淀的抗氯喹株原虫蛋白中的氯喹量非常明显地低于敏感株疟原虫。高氯酸处理的上清液中,含有核酸与酸可溶性蛋白等组份,虽然进入的氯喹总量在抗性株和敏感株疟原虫间无差异,但是氯喹在这些组份中的作用仍不能忽视,Meshnick(1990)提出氯喹与疟原虫 DNA 结合上的变化,可以影响抗疟效果^[4]。

参 考 文 献

- 1 王琴美,王鸣杰,常惠玲,等.伯氏疟原虫氯喹敏感株和抗性株中的氯喹积聚和排出.中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1998; 16: 189
- 2 黄左钺,富秀兰,吴克英,等.氯喹在疟原虫多胺与核酸上的影响.中国药理学报 1987; 8: 63
- 3 Bergquist Y, Holmberg M F. Sensitive method for the determination of chloroquine and its metabolite desethylchloroquine in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. J Chromatogr 1980; 221: 119
- 4 Meshnick S R. Chloroquine as intercalator: a hypothesis reviewed. Parasitol Today 1990; 6: 77
- 5 Li GD, Qu FY, Chen X, et al. A 54 kDa protein overexpressed by chloroquine-resistant *Plasmodium berghei* ANKA strain. 中国药理学报 1993; 14: 9
- 6 Menting G T J, Tilley L, Deady L W, et al. The antimalarial drug, chloroquine, interacts with lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 1977; 88: 215
- 7 王琴美,王鸣杰,常惠玲,等.伯氏疟原虫氯喹结合蛋白的分离与定量.中国寄生虫学与寄生虫病杂志(待发表)

* 国家自然科学基金资助课题(No. 39470638)

** 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心,卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室

1998 年 12 月 26 日收稿 1999 年 3 月 22 日修回

(编辑:任燕芬)