DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.05.005
第25卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 5
2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

文章编号:1000-5404(2003)05-0381-04

论著

双氢青蒿素体外抗卡氏肺孢子虫电镜细胞酶化学研究

倪小毅[1],陈雅棠[1],王 健[2],徐 晨[3],王 红[3] ([1]重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所,重庆 400016;[2]深圳市第二人民医院肺科,深圳 518035;[3]重庆医科大学电镜室,重庆 400016)

提 要:目的 观察双氢青蒿素对卡氏肺孢子虫虫体的酸性磷酸酶(AcPase)、葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)和腺苷三磷酸酶(ATPase)等3种代谢酶的影响。方法 将Pc接种于有支持细胞的50 ml培养瓶中,4 h后,试验组每瓶加入DHA 50 μmol·L^{-1},同时作对照组。用药后12 h,作电镜酶细胞化学,观察上述3种酶的定位及用药后各种酶超微结构水平上的变化。结果 AcPase反应产物用药组与不用药组无明显变化。G-6-Pase、ATPase反应产物用药组明显减弱。酶的阴性对照组无酶产物产生。结论 双氢青蒿素对卡氏肺孢子虫细胞内的AcPase无影响。双氢青蒿素对Pc G-6-Pase、ATPase的活性有明显的抑制,可能是影响Pc细胞的代谢功能,最终抑制其增殖的原因之一。

关键词:卡氏肺孢子虫;双氢青蒿素;电镜细胞酶化学
中图法分类号:R382.3;R446.8;R978.6 文献标识码:A

Effect of dihydroarteannuin on *pneumocystis carinii* by electromicroscopic enzymic cytochemistry *in vitro*

NI Xiao-yi, CHEN Ya-tang, WANG Jian, XU Chen, WANG Hong (Institute of Infectious and Parasitic Diseases, First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the effect of dihydroarteannuin (DHA) on acid phosphatase (AcPase), adenosine triphosphatase (ATPase) and glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) of *pneumocystis carinii* (Pc). Methods Pc was inoculated into HepG-2 cells in 50 ml bottle. After incubation for 4 h, DHA 50 μmol/L was added. Samples were harvested after 12 h, and immediately incubated for AcPase, G-6-Pase and ATPase. The localization and ultrastructural changes were observed electromicroscopically. Results No difference was found between DHA treated group and control group in AcPase. The reactive product of G-6-Pase and ATPase decreased markedly in DHA treated group. Conclusion DHA has no effect on AcPase of *pneumocystis carinii*, but the inhibitive effect of DHA on the activities of G-6-Pase and ATPase by the influence on the metabolism function of Pc may be one of the causes resulting in the inhibition of proliferation of Pc.

Key words: *pneumocystis carinii*; dihydroartemisinin; electromicroscopic enzymic cytochemistry

我室曾用大鼠模型证明双氢青蒿素与青蒿琥酯对卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*, Pc)有肯定的抗虫作用;并在体外实验中也证明双氢青蒿素和青蒿琥酯对卡氏肺孢子虫有明显抑制作用[1]。我们已通过透射电镜观察到青蒿素衍生物对Pc虫体的膜性结构如细胞膜、核膜、线粒体、内质网等有明显的损害作用。目前对卡氏肺孢子虫电镜酶细胞化学的研究报道很少。本实验用电镜酶细胞化学技术研究了卡氏肺孢子虫体的酸性磷酸酶(AcPase)、葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)、腺苷三磷酸酶(ATPase)在超微结构水平上的定位,这对阐明卡氏肺孢子虫的生理生化具有重要意义。同时我们也研究了双氢青蒿素对虫体上述酶的影响,以进一步揭示该药抗卡氏肺孢子虫的作用机制。

1 材料和方法

1.1 卡氏肺孢子虫的分离

采用本校实验动物中心纯系Wistar大鼠若干只,通过皮下注射地塞米松及气管内接种本所冻存后复苏的Pc的改良方法建立卡氏肺孢子虫肺炎(Pneumocystis carinii pneumonia, PCP)动物模型[2]。剖杀后,无菌技术取肺叶,用含青霉素,链霉素,二性霉素B的PBS清洗,匀浆器匀浆后取少量接种于血平板,若无细菌、霉菌生长,则该标本保存备用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670658)
作者简介:倪小毅(1959-),女,安徽省芜为县人,博士,副教授,主要从事卡氏肺孢子虫肺炎治疗方面的研究,现在深圳市第二人民医院中心实验室工作。电话:(0755)26191915
收稿日期:2002-03-20;修回日期:2002-06-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 卡氏肺孢子虫的体外培养

50 ml 培养瓶若干个，接种 HepG-2 细胞 1×10^6 个/瓶，加 DMEM$^+$（含青霉素 90 mg/L，链霉素 120 mg/L，二性霉素 B 0.5 mg/L。DMEM：GIBCO，批号 1002805）5 ml/瓶，置 CO_2 孵箱，5% CO_2，95% O_2，37 ℃，培养 24～48 h，待细胞长满底部的 80%，即可接种卡氏肺孢子虫。将培养瓶内细胞换液，同时加入备好的卡氏肺孢子虫悬液，5×10^6 个包囊/瓶，再加 DMEM$^+$ 10 ml。置 CO_2 孵箱，孵育条件同上。

1.3 药物试验

接种卡氏肺孢子虫 4 h 后分别加入双氢青蒿素（DHA）50 μmol/L 3 瓶，另留 6 瓶不加任何药物（其中 3 瓶作不加药物对照组，另 3 瓶作酶的阴性对照）。继续培养 8 h 后，取标本作酶的孵育试验。

1.4 电镜细胞酶化学反应标本制备

弃培养液，每种酶的孵育标本各 3 份，1 份为试验组加 DHA 标本，1 份为不加 DHA 标本正常对照，1 份为酶的阴性对照标本（孵育时不加酶的底物）。用混合固定液（2%多聚甲醛-0.5%戊二醛）固定标本 AcPase 30 min，G-6-Pase 20 min，ATPase10～20 min。用酶的各自缓冲液（AcPase 用 0.1 mol/L 醋酸缓冲液，pH 5.0；G-6-Pase 用 80 mmol/L Tris-maleate 缓冲液，pH 6.5；ATPase 用 80 mmol/L Tris-maleate 缓冲液，pH 7.2）充分漂洗。标本分别加入 AcPase 孵育液［含 0.1 mol/L 醋酸缓冲液，pH 5.0，1 mmol/L，β-甘油磷酸钠（Sigma 公司，批号 48H5400），2 mmol/L 氯化亚铈，5%蔗糖］；G-6-Pase 孵育液［含 2 mmol/L 葡萄糖-6-磷酸二钠盐（Sigma 公司，批号 67H7005），80 mmol/L Tris-maleate 缓冲液，pH 6.5，2 mmol/L 氯化亚铈，5%蔗糖］；ATPase 孵育液［含 80 mmol/L Tris-maleate 缓冲液，pH 7.2，2 mmol/L 氯化亚铈，0.1 mol/L 硫酸镁，2.3 mmol/L ATP 二钠盐（Sigma 公司，批号 88H1320），5%蔗糖］，在恒温水浴箱中孵育 1 h，蒸馏水充分短时漂洗，1.5%亚铁氰化钾-1%锇酸水溶液后固定 1 h，常规电镜包埋、超薄切片，不复染，直接电镜观察。

加 DHA 标本和正常对照标本按上述方法孵育。酶的阴性对照标本，孵育全过程不加酶的底物（分别为β-甘油磷酸钠，葡萄糖-6-磷酸二钠盐，ATP 二钠盐）。

2 结果

2.1 AcPase 孵育结果

正常卡氏肺孢子虫虫体内可见黑色深染颗粒，呈圆形，或椭圆形，非均质状，为酸性磷酸酶反应，见图 1。该 AcPase 在 Pc 内数量较少，单个。用药组与不用药组反应强度与数量无明显变化。无底物对照组无 AcPase 阳性反应。包囊内难于孵出 AcPase 反应产物。

2.2 G-6-Pase 孵育结果

正常卡氏肺孢子虫滋养体其周围黑色沉淀部分即 G-6-P 酶阳性反应。该反应主要见于虫体表膜上，围绕虫体形成黑色沉淀，呈粗线状，表面颗粒状，见图 2。用双氢青蒿素后虫体酶反应产物明显减少，呈细线状淡黑色沉淀物，见图 3。无底物对照组无黑色沉淀。

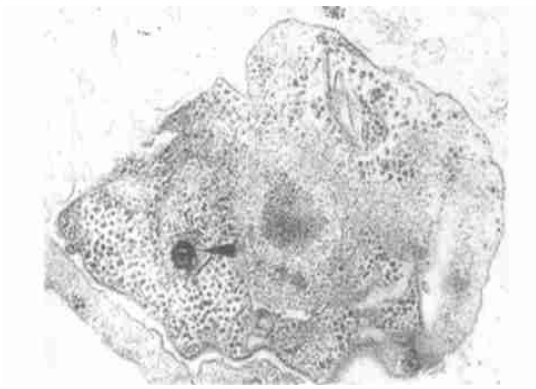


图 1 滋养体内 **AcPase** 阳性反应，箭头处阳性产物 （TEM× 30 000）

Fig 1 AcPase positive reaction product in trophozoite（arrowhead）（TEM× 30 000）

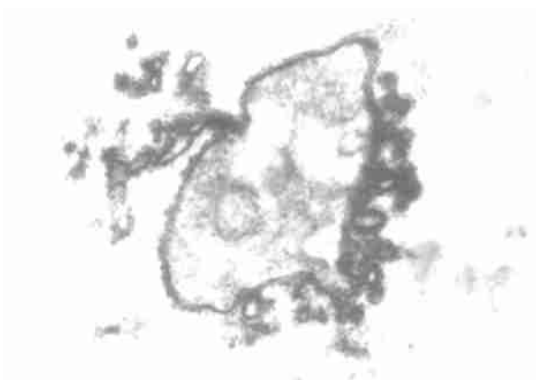


图 2 滋养体表面 **G-6-Pase** 反应产物 （TEM× 25 000）

Fig 2 G-6-Pase reaction product on trophozoite membrane（TEM× 25 000）

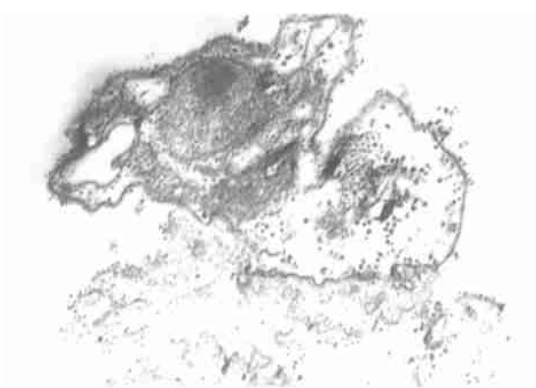


图 3 双氢青蒿素作用后滋养体表面 **G-6-Pase** 反应产物明显减弱 （TEM× 20 000）

Fig 3 G-6-Pase reaction product becomes weak on trophozoite membrane incubated with DHA （TEM× 20 000）

2.3 ATPase 孵育结果

正常对照 Pc ATPase 反应产物沉着于虫体表膜，围绕虫体形成黑色沉淀，虫体附近的管泡状突起也有黑色沉淀环绕，呈

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

粗线状, 电子密度深, 见图 4。用双氢青蒿素后虫体酶反应产物明显减少, 呈细线状淡黑色沉淀物, 见图 5。无底物对照无 ATPase 的反应产物黑色沉淀。

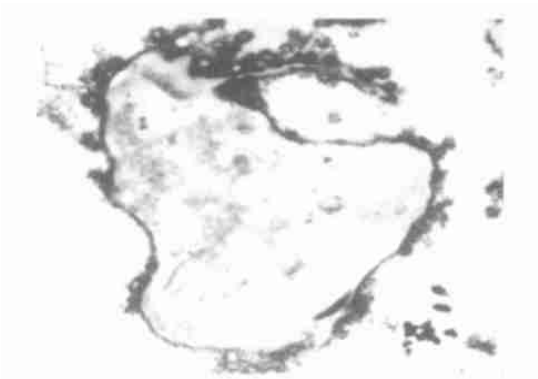


图 4　滋养体表面 **ATPase** 反应产物　(TME× 20 000)

Fig 4　ATPase reaction product on the surface of trophozoite　(TME× 20 000)

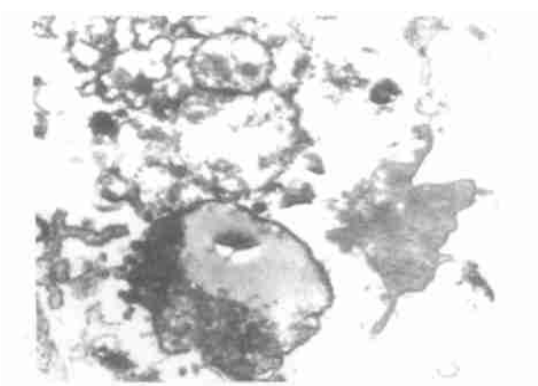


图 5　双氢青蒿素作用后, 滋养体表面 **ATPase** 反应产物明显减弱。　(TME× 17 000)

Fig 5　ATPase reaction product becomes weak on trophozoite membrane incubated with DHA　(TME× 17 000)

3　讨论

为了进一步研究青蒿素衍生物对卡氏肺孢子虫的抗虫作用机制, 我们运用电镜细胞酶化学技术, 以了解青蒿素衍生物对卡氏肺孢子虫的某些代谢酶的影响。电镜细胞化学又称超微结构细胞化学, 主要利用各种化学和物理方法使各种细胞内物质在原位形成电子密度大的可见的最终产物, 即金属沉淀物, 然后借助电子显微镜进行观察分析。电镜细胞化学可获得更精确的定位, 可观察到细胞器、膜系统及大分子物质等, 从而将亚微、超微结构与机能直接结合起来[3]。由于电镜细胞酶化学的定量不很精确, 在酶量差别不大时很难有区别, 因此我们根据用药后卡氏肺孢子虫在普通透射电镜中不同时相的变化, 选择了虫体受损最明显时相与正常虫体进行对照。

在酶组织化学反应时, 需要同时进行对照实验, 以避免或区分出可能发生的假阳性或假阴性结果。我们采用了去底物孵育进行阴性对照实验, 如果标本内有内源性底物的存在, 即使在孵育液中不加底物也能在某种程度上看到反应产物。而在本实验中 3 种酶的阴性对照均无酶的反应产物沉着。说明本实验无假阳性。

酸性磷酸酶是一种在 pH 值酸性范围内能水解磷酸单酯的酶。一般认为 AcPase 位于溶酶体, 是溶酶体的标志酶[4]。在组织蜕变过程中该酶的活性增强。在本实验中, 正常卡氏肺孢子虫虫体反应产物呈黑色深染颗粒, 圆形或椭圆形, 非均质状。双氢青蒿素作用后的虫体内溶酶体的大小、数量、分布及反应强度与正常组的比较均无明显差异, 说明该药对 Pc 的溶酶体无显著作用, 用药后 Pc 膜系结构的破坏可能不是由溶酶体的增加而实现的。

葡萄糖-6-磷酸酶是糖代谢的关键酶, 是一种催化多种磷酸化合物水解的磷酸酶。G-6-P 酶是细胞内参与能量代谢的主要酶, 在糖酵解时, G-6-P 酶催化磷酸葡萄糖转变为自由葡萄糖和磷酸。在大多数动物细胞内, G-6-P 酶位于内质网和核膜上, 是这些细胞器的标志酶。用重金属捕捉剂和磷酸结合可显示酶的活性。在我们的实验中, G-6-Pase 位于 Pc 细胞的表膜, 与一般细胞中该酶的定位不同。但梁志慧等[5]所作弓形虫的细胞化学中发现弓形虫的 G-6-Pase 也存在于该虫的表膜外侧, 可能弓形虫和卡氏肺孢子虫均在细胞膜上有其能量代谢的场所。正常卡氏肺孢子虫滋养体 G-6-P 酶反应产物绕细胞膜一周, 呈粗线状, 其表面为颗粒状, 虫体表面的管泡状突起也有黑色沉淀, 包囊反应同滋养体。双氢青蒿素作用后, 卡氏肺孢子虫表膜上的 G-6-Pase 反应产物明显减少, 说明该药可能抑制或破坏了 G-6-Pase 的活力, 从而影响 Pc 的能量代谢。

膜腺苷三磷酸酶又分为 Na^+、K^+ 激活的 ATPase 和 Mg^{2+} 激活的 ATPase, 这两种酶都是参与主动转运的离子泵的重要组成。因金属离子对 Na^+、K^+ ATPase 有显著的抑制作用, 常常以 p-NPP 酶(对硝基苯磷酸酶)的活性位置代表 Na^+、K^+ ATPase 的定位, 该法不能反映 ATPase 的活性状况, 因此我们选用了 Mg^{2+} ATPase 作为观察指标。正常对照 Pc ATPase 反应产物沉着于虫体表膜, 围绕虫体形成黑色沉淀, 虫体表面的管泡状突起也有黑色沉淀物环绕, 呈粗线状, 浓密黑色。用双氢青蒿素作用后虫体酶反应产物明显减少, 呈细线状淡黑色沉淀物。说明该药可能影响 Mg^{2+} ATPase 的活性, 从而影响 Pc 细胞膜的转运功能。

综上所述, 双氢青蒿素对卡氏肺孢子虫细胞内的 AcPase 可能无影响。Pc 细胞膜系结构的损伤与 AcPase 无关。但双氢青蒿素对 Pc G-6-Pase、ATPase 的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

活性有明显影响，用药后显示这两种酶的活性明显减低。因此，我们认为双氢青蒿素对Pc虫体膜系统上G-6-Pase与ATPase两种酶的抑制或破坏可能是影响Pc细胞代谢的功能，最终抑制其增殖的原因之一。

参考文献：

[1] 倪小毅，陈雅棠. 青蒿素衍生物抗卡氏肺孢子虫体外作用的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志，2001，24(3)：164－167.

[2] 倪小毅，陈雅棠. 改良卡氏肺孢子虫肺炎动物模型的建立[J]. 重庆医科大学学报，2000，25(4)：382－384.

[3] 方福德，周 吕，丁 濂，等. 现代医学实验技巧全书[M]. 北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1995. 263－264

[4] 贲长恩. 实用酶组织化学[M]. 长沙：湖南省科学技术出版社，1996. 96－97.

[5] 梁志慧，徐麟鹤. 弓形虫的酶细胞化学及蒿甲醚对其影响的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，1995，13(3)：182

（编辑 郭建秀）

（上接380页）

为(#AF057025)，用Gene Toll软件设计TLR4上游引物为：GCCGGAAAGTTATTGTGGTGGT（2442-2463），下游引物为：ATGGGTTTTAGGCGCAGAGTTT(2776-2795)，PCR反应条件为变性94 ℃×45 s，淬火52 ℃×60 s，延伸72 ℃×90 s，35个循环后72 ℃延伸10 min，PCR产物为356 bp。各组样本同时扩增β-actin(587 bp)作为内参照。

1.4 ELISA

细胞培养液上清中TNF-α浓度按照Genzyme公司ELISA试剂盒进行检测。

1.5 PCR产物的电泳鉴定

取各样本PCR产物10 μl和1 μl上样缓冲液加于2%琼脂糖凝胶电泳槽齿孔中，50 V恒压电泳30 min，取胶置凝胶成像系统中拍照，结果扫入电脑备处理。

1.6 数据处理

电泳条带密度值以灰度×面积/参照物的该值表示。所有数据以$\bar{x}\pm s$表示，运用F检验进行统计分析。所有数据用SPSS软件统计处理。

2 结果

各组细胞上清TNF-α浓度变化：从表1可看出，B组细胞分泌的TNF-α显著高于正常对照A组，而C组细胞分泌的TNF-α明显减少，显著低于B组，而略高于A组。

各组细胞TLR4 mRNA表达的变化：从表1可知，B组细胞TLR4 mRNA表达显著高于正常A组，而C组细胞TLR4 mRNA表达明显减少，显著低于B组，稍高于A组。

表1 各组大鼠肺巨噬细胞**TLR4 mRNA**表达及**TNF**-α浓度

组别	n	TLR4 Density	TNF-α($\rho_{TNF-\alpha}$/ng·ml^{-1})
A	10	0.43±0.07	0.45±0.01
B	10	0.78±0.02**	0.76±0.03**
C	10	0.54±0.02#	0.49±0.05#

**：$P<0.01$与A组比较；#：$P<0.05$与B组比较

3 讨论

LPS耐受性是指机体或细胞经低剂量LPS刺激后，对LPS的再次刺激呈低反应性或无反应状态。它与机体的免疫力、LPS的内化、LPS信号转导效率等综合因素有关。既往研究表明，LPS胞外的信号转导是通过脂多糖结合蛋白LBP呈递给CD^+14来实现，而胞内则是通过IL-1受体相关激酶(IL-1 receptor association kinase，IRAK)、TNF-α受体相关激酶6(TNF-α receptor association kinase 6，TRAK-6)使IκB激活，活化的IκB再使NF-κB磷酸化后转位，炎症因子开始转录、翻译和表达[6]。LPS信号由胞外向胞内的转导即跨膜转导一直尚不明确，近年TLR4的发现提供了新的线索，它作为LPS靶细胞膜上的跨膜受体蛋白，其胞外的亮氨酸重复序列可以识别和结合LPS，而胞内与IL-1β同源的尾状结构，为将LPS信号呈递给IL-1β提供了可能性，且得到部分实验的证实[7,8]。故TLR4结构与功能的完好及必要的表达量是保证LPS信号转导完成的关键，反之则降低LPS信号转导的效率，使炎症因子释放减少，反应性随之下降，因而产生耐受的可能。我们的实验结果表明，LPS刺激大鼠肺巨噬细胞TNF-α的分泌和TLR4 mRNA的表达；低剂量LPS(100 ng/ml)刺激大鼠肺巨噬细胞12 h后，再用较大剂量LPS(500 ng/ml)刺激，其分泌的TNF-α明显减少，TLR4 mRNA表达亦显著下降。此证明：①LPS重复刺激可使大鼠肺巨噬细胞对其产生耐受性；②LPS信号很可能由TLR4完成其跨膜转导；③LPS耐受性产生与TLR4 mRNA表达下降相关，TLR4表达量与功能下调是LPS耐受性产生的重要原因之一。

关键词：肺泡巨噬细胞；内毒素耐受性；Toll样受体4
中图法分类号：R392.12 文献标识码：B

参考文献：

[1] Qureshi S T，Lariviere L，Leveque G，*et al*. Endotoxin-tolerance mice have mutation in Toll-like receptor 4 (TLR4)[J]. J Exp Med，1999，189(4)：625－625.

[2] Arbour N C，Lorenz E，Schutte B C，*et al*. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans[J]. Nat Genet，2000，25(2)：187－191.

[3] Medvedev A E，Henneke P，Schromm A，*et al*. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4[J]. J Immunol，2001，167(4)：2257－2267.

[4] Wang M J，Jeng K C G，Shih P C，*et al*. Differential expression and regulation of marophage inflammatory protein (MIP)-1α and MIP-2 gene by alveolar and peritoneal macrophages in LPS-hyporesponsive C3H/HeJ mice[J]. Cell Immunol，2000，204(1)：88－95.

[5] LI L W，Cousart S，Hu J，*et al*. Characteriztion of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells[J]. J Biol Chem，2000，275(30)：23340－23345.

[6] Aderem A，Ulevitch R J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response[J]. Nature，2000，406(17)：782－787.

[7] Su G L，Klein R D，Aminlari A，*et al*. Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats：role for lipopolysacccharide binding protein and Toll-like receptor 4[J]. Hepatol，2000，31(4)：932－936.

[8] Yang H，young D W，Gusovsky D，*et al*. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated Toll-like receptor 4[J]. J Biol Chem，2000，275(27)：20861－20866.

（编辑 张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net