

文章编号: 1000-7423(2003)-04-0203-04

【论著】

PCR 技术监测大蒜素及其与复方磺胺甲基异噁唑伍用治疗小鼠弓形虫病的研究

单连玉 杨秀珍 刘佩梅

【摘要】 目的 用聚合酶链反应(PCR)评价大蒜素及其与复方磺胺甲基异噁唑(SMZco)伍用治疗小鼠弓形虫病的疗效。方法 昆明系小鼠147只,以 2×10^4 RH株弓形虫速殖子感染后随机分成5组,每组35只。A组和B组为大蒜素与SMZco联合用药组;其中A组两药用至7d后停用SMZco,大蒜素继续用至21d;B组两药用至14d后停用SMZco,大蒜素继续用至21d;C组为大蒜素单药组连续用药21d;D组为SMZco单药组连续用药7d;E组7只小鼠为未用药对照组。剂量:SMZco 400 mg/kg 每天1次,大蒜素 35 mg/kg 每天1次。于感染后5、10、15、20、25、30、40和50d从各组随机取3只小鼠,眼眶取血以及取肝实质组织分别提取DNA,PCR检测各组疗效。从各治疗组随机取9只小鼠观察其治疗后存活情况。结果 实验小鼠感染后5d血样,除大蒜素组有特异性194 bp带,其余各组均未见扩增带。感染后10d到观察结束,均未见特异性扩增带。感染后5d到50d,所有肝组织标本均有特异带,感染后5d扩增带较亮,治疗结束后到观察终止,扩增带较弱。分析结果表明,小鼠存活率,联合用药的A组为77.8%,B组为88.9%;C组小鼠在急性期即很快死亡,D组为44.4%。结论 大蒜素与SMZco联合应用治疗弓形虫病具有协同作用,大蒜素单药治疗作用不明显,PCR技术可用于监测疗效及检测弓形虫隐性感染状态。

【关键词】 弓形虫病;聚合酶链反应;大蒜素;复方磺胺甲基异噁唑

中图分类号: R531.8

文献标识码: A

PCR in Evaluating the Effect of Allicin and Its Combination with SMZco on Murine Toxoplasmosis

SHAN Lian-yu, YANG Xiu-zhen, LIU Pei-mei

(Department of Parasitology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070)

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of allicin alone or combined with SMZco on murine toxoplasmosis by a specific, rapid, and sensitive PCR technique. **Methods** 147 mice were infected with 2×10^4 tachyzoites intraperitoneally and divided into 5 groups at random. Each group was divided into two sub-groups except an untreated group. One sub-group was used to get samples for PCR test and the other for observing the survival duration. The therapeutic grouping was as follows: group A, a combination of allicin and SMZco administered orally for 7 days and continued by allicin alone till 21 days; group B, the combination administered for 14 days and continued with allicin till 21 days; group C, allicin alone for 21 days; group D, SMZco alone for 7 days; group E, untreated control. The dosage was: SMZco 400 mg/(kg · d) and allicin 35 mg/(kg · d). PCR test was used to detect the parasites in samples of liver and blood from infected mice at 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 and 50 days after infection. **Results** Parasites were eliminated in the blood because no signal was seen in all the blood samples except for samples from group C at day 5 after infection. From day 10 after infection until the end of the experiment, no amplification of DNA was seen in all the samples. As for liver samples, signals were clear at day 5 post infection. From day 10 post infection till the day 50 post-infection, parasites were still detected, but the PCR products decreased significantly than that of day 5 post-infection. Result showed that a combination of SMZco with allicin provided a significant protection. SMZco alone was also effective, but allicin alone was not. **Conclusion** When SMZco is used in combination with allicin, a much higher efficacy is received in the treatment of acute murine toxoplasmosis.

【Key words】 toxoplasmosis, polymerase chain reaction(PCR), allicin, sulfamethoxazole complex(SMZco)

Supported by the Natural Science Foundation of Tianjin Municipality(No. 973609311)

弓形虫病是一种严重危害人类健康的机会性寄生虫病,先天性感染可导致不同程度的异常妊娠。获得

性感染在某些免疫功能低下者是致死的重要原因。传统的治疗药物乙胺嘧啶及磺胺类药物等,其疗程长、副作用大,尤其不适用于孕妇。实验证实大蒜素具有明显增强机体细胞免疫功能,无毒副作用,可长期服

基金项目:天津市自然科学基金(No. 973609311)

作者单位:天津医科大学寄生虫学教研室,天津 300070

用^[1]。本实验将杀虫效果明显的复方磺胺甲基异噁唑 (sulfamethoxazole complex, SMZco) 与增强机体免疫力的大蒜素两药联合应用,以聚合酶链反应 (PCR) 考核疗效,并结合小鼠的存活情况评价大蒜素对弓形虫病的治疗效果。以期获得疗效好、毒副作用小、可长期服用的药物。

材料与方 法

1 实验动物及虫株

昆明系小鼠体重约 25 g,购自天津药物研究所动物中心。国际标准强毒株 RH 株弓形虫为本室保存。

2 药物、试剂及 DNA 标志物

大蒜素片 (thera-garlicin) 为新疆天山制药工业有限公司产品,每片含大蒜素 4 mg (批号 000618)。SMZco 为天津太平洋制药有限公司产品,每片含 SMZ 400 mg,三甲氧苄二氮嘧啶 (TMP) 80 mg (批号 000502)。淋巴细胞分离液 (LSM),蛋白酶 K (贮存浓度 20 mg/ml),胰 RNA 酶 (贮存浓度 10 mg/ml),Tris 饱和酚 pH8.0,氯仿-异戊醇 (24:1),Taq DNA 聚合酶, DNA 提取液 [10 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 0.1 mol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA) pH 8.0, 0.5% 十二烷基硫酸钠 (SDS)],以上试剂均购自天象人生物工程公司。其他试剂为国产分析纯。DNA 标志物为 DL-marker 2000。

3 治疗方法

昆明系小鼠 147 只,以 2×10^4 RH 株弓形虫速殖子感染后随机分成 5 组,每组 35 只。A 组和 B 组为大蒜素与 SMZco 联合用药组;其中 A 组两药用至 7 d 后停用 SMZco,大蒜素继续用至 21 d;B 组两药用至 14 d 后停用 SMZco,大蒜素继续用至 21 d;C 组为大蒜素单药组连续用药 21 d;D 组为 SMZco 单药组连续用药 7 d;E 组 7 只小鼠为未用药对照组。剂量:SMZco 400 mg/kg 每天 1 次,大蒜素 35 mg/kg 每天 1 次。于感染后 5、10、15、20、25、30、40 和 50 d 从各组随机取 3 只小鼠,眼眶取血,淋巴细胞分离液提取血样中有核细胞,以酚-氯仿-异戊醇方法提取 DNA;分别取肝实质组织各 0.02 g,常规酚-氯仿-异戊醇方法提取 DNA, -20 °C 保存备用。另外,从各治疗组随机取 9 只小鼠,分别为 a、b、c、d 组,观察各组小鼠存活情况。

4 PCR 扩增

4.1 引物 根据 Burg 等^[2]方法由 B1 基因设计一对

引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成一对寡核苷酸。上游引物为:5'-GGAAGTGCATC-CGTTTCATGAG-3' (696~714 bp),下游引物:5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3' (887~868 bp)。

4.2 扩增参数 92 °C 变性 10 min;循环 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s;延伸 72 °C 10 min。扩增 30 个循环。

4.3 扩增体系 10 × 反应缓冲液 2.5 μl (pH9.0 25 °C 500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl, 1.0% Triton X-100), MgCl₂ 2.0 mmol/L, 1U Taq DNA 聚合酶,适量的模板 DNA, 10 pmol 脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP),加 ddH₂O 至 25 μl。

5 结果判定

PCR 检测设立阴性、阳性对照。阴性对照为正常小鼠的血、肝组织 DNA,阳性对照为弓形虫感染急性期未治疗小鼠血、肝组织 DNA。扩增后进行琼脂糖 (2%) 凝胶电泳,紫外投射仪观察结果。以阴性对照无特异带,阳性对照有特异带,待测标本出现特异带视为阳性。另外每组同时检测 3 只小鼠样本,其中至少 2 个样本为阳性,则确定该时期小鼠为阳性。

6 统计学处理

对各治疗组的生存率和生存时间采用两样本生存曲线比较-对数秩和检验 (log-rank test) 和 Wilcoxon (Gehan) statistic 进行统计学处理,评价疗效。

结 果

1 各组小鼠死亡情况

a 组小鼠感染后 16 d 死亡 1 只,腹水中有大量速殖子,感染后 20 d 死亡 1 只,但生理盐水冲洗腹腔未检测到虫体。b 组仅在 18 d 死亡 1 只,未检测到虫体。c 组感染后 5 d 腹腔内有虫体,于 7、8、9、10 和 11 d 相继死亡。d 组感染后 9 d 开始死亡,14、15、16 和 20 d 各死亡 1 只。结果显示,a、b 组死亡数量较少,存活率高;c 组在急性期即全部死亡,d 组死亡时间延迟。而未用药对照组 e 组小鼠于感染后 5 d 出现腹水,感染后 9 d 全部死亡。

2 各组小鼠生存率及生存时间比较

生存率,联合用药的 a 组为 77.8%,b 组为 88.9%,与对照组 e 组相比,生存率以及生存时间的差异均具有显著性意义 ($P < 0.05$)。d 组与 e 组相比,死亡时间延迟,其生存率为 44.4% ($P < 0.05$)。a 组与 d 组相比,a 组的生存时间较长,生存率较高 ($P <$

0.05)。a组与b组相比, c组与e组相比, 存活率以及生存时间的差异均无显著性意义 ($P>0.05$)。各组的

存活率曲线对比见图1。

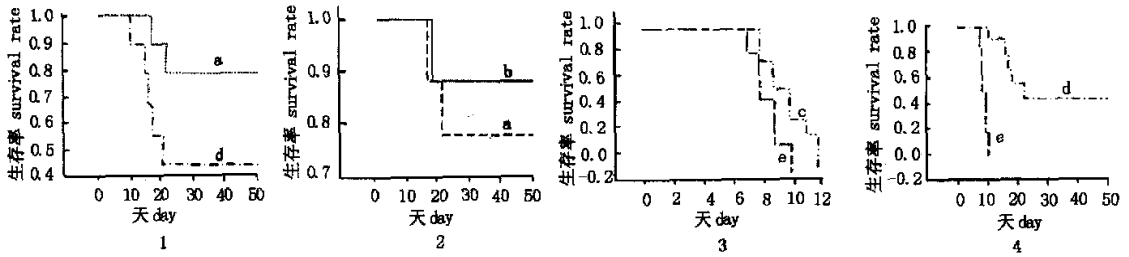


图1 不同药物治疗组与未治疗组小鼠存活率比较 1 a组与d组 ($P<0.05$) 2 a组与b组 ($P>0.05$) 3 c组与e组 ($P>0.05$) 4 d组与e组 ($P<0.05$)
 Fig. 1 Comparison of the survival rate of mice in different treated groups and the control group 1 a and d ($P<0.05$) 2 a and b ($P>0.05$) 3 c and e ($P>0.05$) 4 d and e ($P<0.05$)

3 PCR 检测

3.1 血标本 感染后5d, A、B、D组PCR检测的3个标本均未见特异扩增带, 只有C组有特异性扩增带, 约194 bp。其实, 感染后5d之内, A、B两组治疗方法相同(图2-1)。感染后10~50d的血标本也未见特异扩增带。

3.2 肝组织标本 感染后5、10、15、20、25、30、40和50d, 所有肝组织标本均出现特异扩增带。图2-2显示感染后15d肝组织标本。进一步观察发现, 取同一数量(0.02g)的肝组织, 控制相同的试验条件, 感染后5d特异扩增带较清晰, 感染后15~50d, 扩增带明显减弱。

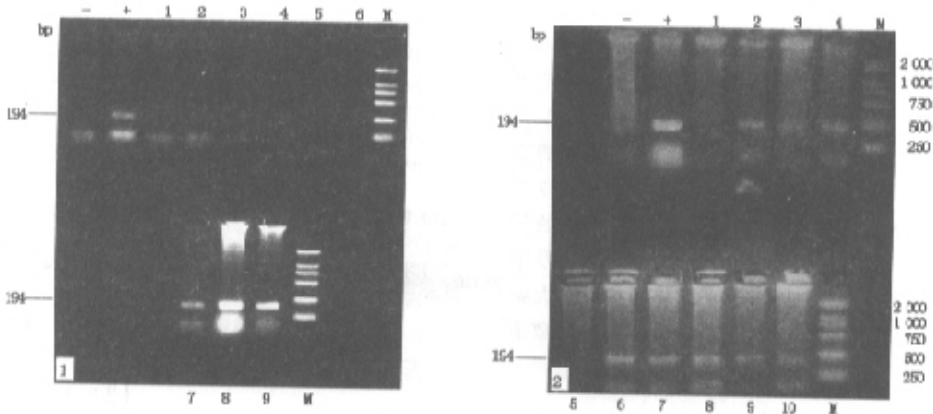


图2 感染弓形虫小鼠血及肝组织PCR检测结果 1 感染弓形虫5d后的血标本 - 阴性对照 + 阳性对照 1~3 A组和B组 4~6 D组 7~9 C组 M DNA标志物 2 感染弓形虫15d后的肝组织标本 - 阴性对照 + 阳性对照 1~3 A组 4~6 B组 7 C组 8~10 D组 M DNA标志物
 Fig. 2 Results of PCR detecting DNA of *T. gondii* in blood and liver samples of infected mice 1 Blood samples at day 5 after infection - Negative control + Positive control 1-3 Samples from group A and B 4-6 Samples from group D 7-9 Samples from group C M Marker 2 Liver samples at day 15 after infection - Negative control + Positive control 1-3 Samples from group A 4-6 Samples from group B 7 Samples from group C 8-10 Samples from group D M Marker

讨 论

本实验观察大蒜素单药或联合(SMZco)用药对急性期弓形虫RH株感染小鼠的治疗作用。各治疗组的存活率高低依次为, B组>A组>D组>C组。统计分

析结果显示, 与未治疗对照组E组相比, D组即SMZco单药组存活率为44.4%, 表明SMZco治疗急性期弓形虫病有明显疗效。但由于治疗时间短, 未能将虫体完全杀死, 此时小鼠自身的免疫力不能控制虫体的迅速繁殖, 导致停药后陆续死亡。A组与D组相比, A

组存活时间明显延长, D 组感染后 9 d 开始死亡, 而 A 组直到感染后 16 d 开始死亡, 存活率为 77.8%。两组间差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。显示大蒜素与 SMZco 联合治疗弓形虫病具有协同作用。在 SMZco 停药后, 大蒜素可能起保护性作用, 到实验终止, 除 2 只小鼠死亡, 其余均无弓形虫病复发。A 组与 B 组相比, C 组与 E 组相比, 其差异均无显著性意义, 表明大蒜素对急性期弓形虫病无效。

PCR 检测感染后 5 d 的血标本, 仅 C 组检测到虫体, 其余各组均未检测出虫体。显示单纯大蒜素对治疗急性弓形虫血症无效。自感染后 5 d 至观察终止, 各治疗组存活小鼠血中均未检测到弓形虫, 而肝组织内始终有弓形虫存在。表明 SMZco 治疗弓形虫病有一定疗效, 但未能杀死隐匿在组织、器官内的弓形虫。取同一数量 (0.02 g) 的肝组织, 控制相同的试验条件, 感染后 5 d 扩增带的亮度较强, 而 15~50 d 相对较弱。这表明经过一定时间的治疗, 小鼠处于隐性感染状态。即体内虽有少量虫体, 但靠免疫力能控制虫体繁殖, 而不出现明显临床症状。小鼠的体征也证实这一点, 停药后体重持续增加, 食欲旺盛, 活动力强, 毛发光亮, 属于治愈。只有当机体的免疫力显著下降时, 才会导致虫体大量繁殖引起复发。

本实验发现, 大蒜素具有协同杀灭弓形虫的作用, 大蒜素对弓形虫的作用机制很可能与提高机体的免疫力有关。张晓利等^[1]以大蒜素灌胃小鼠, 连续给药 10 d 后, 进行 T 淋巴细胞转化实验, 测定小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能及天然杀伤细胞 (NK cell) 活性, 发现大蒜素具有明显增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的作用。大蒜素还具有明显促进小鼠 T 淋巴细胞转化及增强 NK 细胞活性的作用。Lau 等^[3]通过实验证实大蒜提取物很可能作为生物反应的调节物质, 增强巨噬细

胞和 T 淋巴细胞的功能。李钦章等^[4]也证实大蒜素增强小鼠体内巨噬细胞的吞噬功能。在机体抗弓形虫感染的免疫反应中, 细胞免疫起主导作用, 激活的 T 细胞、巨噬细胞和 NK 细胞等是细胞免疫杀伤和抑制弓形虫的主要效应细胞, 其中 T 细胞释放的淋巴因子在刺激抗体产生、激活巨噬细胞和增强 NK 细胞活性中起关键作用。因此, 大蒜素很可能通过增强机体免疫力尤其细胞免疫功能, 达到杀灭虫体, 使机体由急性期向隐性感染转变。大蒜素治疗弓形虫病有效的另一个原因可能与其活性成分二丙烯基二硫化物有关, 其活性基团是“-SO-S-”, 该基团可对巯基进行氧化从而使蛋白质灭活, 还可以与含巯基的半胱氨酸竞争, 抑制蛋白质的合成, 从而影响病原体的繁殖, 起直接杀灭病原体的作用^[5]。

本实验显示大蒜素治疗 21 d 后并未将虫体全部杀死, 一方面可能与大蒜素本身对虫体的作用弱有关, 另一方面可能与药量或药物治疗时间有关。作者认为, 可提高大蒜素剂量或延长治疗时间, 结合体外实验作进一步观察。

参 考 文 献

[1] 张晓利, 张红军, 唐晓云, 等. 大蒜素对小鼠免疫功能的影响[J]. 中医药学报, 1998, 26(1): 57-58.
[2] Burg JL, Grover CM, Pouletty P, et al. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction [J]. J Clin Microbiol, 1989, 8: 1787-1792.
[3] Lau BH, Yamasaki T, Gridley DS. Garlic compounds modulate macrophage and T-lymphocyte functions[J]. Mol Biother, 1991, 3: 103-107.
[4] 李钦章, 李少伟, 杨冠群. 大蒜抗肿瘤作用及机理研究[J]. 中药材, 1998, 21: 240-243.
[5] 叶元唐, 唐纳·阿姆斯特朗. 大蒜提取物与大蒜素抗深部真菌的实验研究[J]. 蚌埠医学院学报, 1990, 15: 82-85.

(收稿日期: 2002-06-10 编辑: 庄兆农)

文章编号: 1000-7423(2003)-04-0206-01

【病例报告】

喉部铁线虫寄生一例

李朝品 崔元宝

中图分类号: R532.5 文献标识码: D

患者男性, 38 岁, 出租车司机, 有饮用生水习惯。喉部发痒、阻塞感、咳嗽、声音嘶哑 4 月余, 痰中带血丝近 3 个月, 经中西药物对症处理未能奏效。于 2002 年 6 月 16 日咳出 1 条暗红色活虫, 随即装入瓶内并用白酒浸泡, 当天送至淮南市某医院检验科, 6 月 18 日转送至本教研室, 19 日和 20 日患者在本教研室又咳出 2 条活虫, 经鉴定均为铁线虫属 (*Gordius*) 绒毛铁线虫 (*Gordius villoti*)。虫体标本呈棕褐色, 线状, 体壁较厚且粗糙, 前后等粗。虫体 1: 体长 1.3 cm、宽 1.2 mm, 前部有

一个能伸缩的吻和多个向后突出的棘, 尾部完整钝圆, 鉴定为雌虫。虫体 2: 体长 2.4 cm、宽 1.6 mm。虫体 3: 体长 1.6 cm、宽 1.2 mm, 尾部末端均分叉, 鉴定为雄虫。

铁线虫 (*Gordiacae* Von Siebold, 1843) 又名发形蛇, 为铁线虫纲蠕虫的总称。大多数生活在沼泽、池塘、溪流等淡水中。以往报告铁线虫寄生人体消化道、泌尿道、眼眶、外耳道, 感染途径可能是接触水或饮用生水时感染性幼虫侵入人体。防治本病首先是勿饮不洁之水, 下水时应注意避免铁线虫由腔道口侵入人体。

作者单位: 安徽理工大学医学院人体寄生虫学教研室, 淮南 232001

(收稿日期: 2003-02-18 编辑: 富秀兰)