

文章编号:1000-7423(2010)-03-0231-03

## 【研究简报】

## 中草药白头翁对阴道毛滴虫蛋白的影响

闫艳<sup>1</sup>, 高兴政<sup>2</sup>

【提要】 采用浓度为 0.625 mg/ml 白头翁水提液进行体外抗阴道毛滴虫(简称滴虫)实验, 药物作用 2 h 和 4 h 后, 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测白头翁作用后滴虫可溶性蛋白组成和含量变化。结果显示, 正常滴虫蛋白图谱共有 28 条蛋白带。药物作用 2 h, 与对照组比较, 5 条蛋白带含量增加, 4 条蛋白带含量明显降低。药物作用 4 h, 与对照组比较, 5 条蛋白带含量增加, 5 条蛋白带含量明显降低, 另出现一条新蛋白带。

【关键词】 阴道毛滴虫; 白头翁; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号: R382.211

文献标识码: B

## Protein Analysis of *Trichomonas vaginalis* Treated by *Pulsatilla chinensis* In vitro

YAN Yan<sup>1</sup>, GAO Xing-zheng<sup>2</sup>

(1 Department of Pathogenic Biology, Baotou Medical College, Baotou 014010, China; 2 Department of Parasitology, School of Basic Medical Science, Peking University, Beijing 10091, China)

【Abstract】 Water extract of *Pulsatilla chinensis* (PWE) (0.625 mg/ml) was added to the medium for the culture of *Trichomonas vaginalis*. After 2 h and 4 h treatment, the content and component of soluble proteins in the parasites were analyzed by SDS-PAGE. A total of 28 protein bands was demonstrated. After treated with PWE for 2 h, the content of 5 protein bands increased and that of 4 bands decreased significantly. Four hours later, a new protein band appeared in the electrophoretogram, and the content of 5 bands increased and that of other 5 bands decreased.

【Key words】 *Trichomonas vaginalis*; *Pulsatilla chinensis*; SDS-PAGE

阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*, 简称滴虫)是一种常见的寄生原虫, 主要寄生于女性的阴道、尿道, 男性的尿道和前列腺, 引起滴虫病。滴虫病是世界范围内发病率较高的性传播疾病。甲硝唑为抗阴道毛滴虫的首选药物, 然而随着甲硝唑的广泛应用, 临床不断有抗性株产生的报道。另外有报道甲硝唑有致畸和致癌的可能性<sup>[1]</sup>, 因而寻找新的高效低毒的替代药物受到医学界的普遍关注。近年研究发现中草药白头翁具有明显的杀灭滴虫的作用<sup>[2]</sup>。本研究利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和扫描技术, 观察白头翁对阴道毛滴虫蛋白组成和含量的影响, 为探讨白头翁对滴虫的杀虫机制及其临床应用提供依据。

### 1 材料与方法

1.1 虫株、试剂和仪器 实验虫株、药物制备及滴虫培养见文献 [1]。丙稀酰胺、N,N-亚甲基双丙稀酰胺、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸铵、四甲基乙二胺(TEMED)和甘氨酸均为美国 Sigma 公司产品, 2-巯基乙醇、标准蛋白质标志物购自北京华美生物工程有限公司。紫外分光光度计(UV-1600 型)为北京瑞利分析仪器公司产品, 电泳槽(DY-CZ-24D 型)和电泳仪(DYY-III2 型)为北京六一仪器厂产品, VDS 凝胶成像分析系统为瑞典 Pharmacia 公司产品。

1.2 滴虫蛋白组分的制备 实验设对照组和药物组, 将培养

24 h 的滴虫接种于含 0.625 mg/ml 白头翁的肝浸培养基中, 虫体浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml, 37 °C 温箱培养。分别收集加药前及加药后 2 h 和 4 h 的虫体, PBS 磷酸盐缓冲液洗涤 (1 000×g 离心 10 min)3 次。用少量 PBS 悬浮虫体, 低温超声粉碎 3 次, 每次 3 min, 间隔 2~3 min。4 °C 10 000×g 离心 40 min, 取上清。-20 °C 保存。用紫外分光光度计测量蛋白吸光度 ( $A_{260}$ 、 $A_{280}$  值), 计算蛋白含量: 蛋白含量 (mg/ml) =  $(1.45 \times A_{260}) - (0.74 \times A_{280})$ 。

1.3 SDS-PAGE 电泳 将抗原稀释至 2 mg/ml, 配制 10% 分离胶和 4% 浓缩胶, 上样量 15  $\mu$ l。开始电泳时, 电压为 70 V, 样品进入分离胶后, 调至 130 V。继续电泳至样品前缘抵达分离胶底部, 断开电源。用 VDS 凝胶成像分析系统对凝胶进行扫描照相、数据分析, 生成蛋白条带的扫描峰图。

### 2 结果

2.1 正常滴虫蛋白图谱 对照组滴虫可溶性蛋白图谱中, 共呈现 28 条蛋白带, 其中相对分子质量 ( $M_r$ ) 为 20 000~100 000 的条带有 20 条。不同蛋白条带蛋白含量差异较大, 其中  $M_r$  57 500 条带蛋白含量最高, 约占 17.97%, 而  $M_r$  53 200 蛋白含量最低, 仅占 0.21% (图 1、表 1)。

2.2 白头翁作用后滴虫蛋白图谱变化 药物作用 2 h, 滴虫蛋白图谱中呈现 28 条蛋白带, 蛋白条带数量与对照组无明显变化, 且各条带分布的位置与对照组亦一致。但同一相对分子质量的蛋白带蛋白含量与对照组比较有较大差异。其中, 编号为第

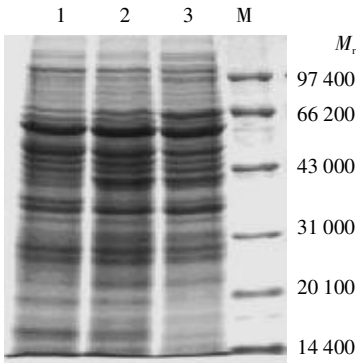
作者单位: 1 内蒙古自治区包头医学院病原生物学教研室, 包头 014060;  
2 北京大学医学部寄生虫学教研室, 北京 100191

10、17、20、22 和 25 的分别为  $M_r$  66 200、40 100、35 400、30 200 和 22 000 等 5 条蛋白带含量增加；编号为 5、14、19、28 的分别为  $M_r$  106 200、48 600、36 800 和 15 900 等 4 条蛋白带含量降低(图 1、表 1)。

药物作用 4 h，与对照组比较，滴虫蛋白图谱变化更加显著，蛋白图谱中呈现 29 条带，即在原有条带基础上，增加一条为  $M_r$  111 700 的新带(编号为 4)。相同蛋白带的蛋白含量与对照组比较有明显差异。其中，编号为 10、17、20、22 和 25 等 5 条蛋白带含量增加；编号为 5、14、19、26、28 的分别为  $M_r$  106 200、48 600、36 800、19 100 和 15 900 等 5 条蛋白带含量下降，其中  $M_r$  19 100 和 15 900 条带几近缺失(图 1、表 1)。

随着白头翁作用时间的延长，编号为 10、20 ( $M_r$  66 200 和 35 400) 两条带蛋白含量逐渐增加。编号为 5、14、28( $M_r$  106 200、48 600 和 15 900)的 3 条蛋白带含量逐渐降低。编号为 19( $M_r$  36 800)的蛋白带在药物作用 2 h 后含量明显降低，药物作用 4 h 后蛋白含量有所回升，但仍然低于对照组。编号为

22 ( $M_r$  30 200)的蛋白带在药物作用 2 h 后，含量明显增加，但药物作用 4 h 后的含量与 2 h 的相近。编号为 26( $M_r$  19 100)的蛋白带药物作用 2 h 含量变化不大，但药物作用 4 h 后，含量明显下降(图 1、表 1)。



M: 蛋白质标志物；1: 对照组；2: 加药 2 h 组；3: 加药 4 h 组。

图 1 药物作用后阴道毛滴虫蛋白图谱

表 1 阴道毛滴虫蛋白电泳分析

编号	对照组			药物作用 2 h			药物作用 4 h		
	$M_r$	吸光度(A 值)	蛋白含量(%)	$M_r$	吸光度(A 值)	蛋白含量(%)	$M_r$	吸光度(A 值)	蛋白含量(%)
1	148 800	3.0	0.32	148 800	1.6	0.17	148 800	3.8	0.42
2	131 300	7.1	0.76	131 300	6.5	0.70	131 300	6.7	0.73
3	126 500	8.0	0.85	126 500	6.7	0.72	126 500	8.1	0.88
4	—	—	—	—	—	—	111 700	4.2	0.46
5	106 200	35.0	3.75	106 200	25.1	2.71	106 200	21.6	2.36
6	97 000	19.6	2.08	97 000	18.7	2.02	97 000	21.7	2.27
7	92 600	6.4	0.67	92 600	5.1	0.55	92 600	2.2	0.24
8	84 900	5.0	0.53	84 900	5.1	0.55	84 900	4.2	0.46
9	79 500	2.9	0.30	79 500	3.3	0.35	79 500	3.9	0.42
10	66 200	13.9	1.48	66 200	30.3	3.26	66 200	67.8	7.43
11	62 700	20.6	2.19	62 700	18.3	1.97	62 700	19.0	2.08
12	57 500	169.1	17.97	57 500	170.0	18.30	57 500	166.2	18.19
13	53 200	2.0	0.21	53 200	2.3	0.24	53 200	3.3	0.36
14	48 600	148.2	15.76	48 600	99.4	10.92	48 600	82.9	9.11
15	45 300	53.2	5.65	45 300	58.1	6.25	45 300	49.9	5.47
16	42 700	52.8	5.61	42 700	47.9	5.16	42 700	56.3	6.17
17	40 100	25.5	2.70	40 100	82.1	8.84	40 100	83.3	9.13
18	39 000	25.2	2.68	39 000	23.1	2.49	39 000	20.3	2.23
19	36 800	35.8	3.80	36 800	10.5	1.13	36 800	13.5	1.81
20	35 400	53.3	5.66	35 400	61.8	6.65	35 400	88.2	10.75
21	33 500	11.2	1.19	33 500	10.9	1.18	33 500	8.3	0.91
22	30 200	19.3	2.06	30 200	27.0	2.92	30 200	26.1	2.86
23	28 200	64.3	6.83	28 200	66.8	7.19	28 200	58.7	6.43
24	26 300	54.9	5.83	26 300	58.9	6.34	26 300	43.9	4.81
25	22 000	10.9	1.15	22 000	25.7	2.77	22 000	18.9	2.07
26	19 100	18.9	2.01	19 100	12.1	1.38	19 100	1.8	0.20
27	17 300	4.4	0.46	17 300	9.5	1.14	17 300	4.2	0.46
28	15 900	58.0	6.16	15 900	29.0	3.12	15 900	1.8	0.20
29	14 400	13.7	1.46	14 400	10.6	1.14	14 400	12.5	1.37
合计			100.00		926.2	100.00			100.00

3 讨论

中药白头翁为多年生草本植物白头翁[*Pulsatilla chinensis* (Bungr) Regel]的干燥根。中医研究认为，白头翁具有清热解毒、凉血止痢、燥湿杀虫的功效。有研究表明，白头翁具有杀灭阴道毛滴虫的作用，0.625~5 mg/ml 浓度的药物对滴虫均具有抑制、

杀灭和裂解作用<sup>[2]</sup>。

生物的生长发育与蛋白质密切相关。近年来有研究者利用蛋白质电泳研究虫株分类，检测不同时期虫体蛋白质变化及药物对虫体蛋白的影响<sup>[3-5]</sup>。分析寄生虫蛋白组分，对探讨寄生虫和宿主的相互关系、开发特异敏感的免疫学诊断及研制

抗滴虫药物和疫苗都具有重要意义。

SDS-PAGE 结果显示, 阴道毛滴虫可溶性蛋白组分十分复杂, 正常阴道毛滴虫全虫可溶性抗原主要有 28 条蛋白带, 此结果多于张跃等<sup>[6]</sup>报道的 14 条带, 接近高兴政等<sup>[7]</sup>报道的 26 条带, 该差异可能与蛋白提取方法有关。

蛋白质是生命的基础, 如果其代谢紊乱将影响滴虫的各项生命活动, 因而干扰和影响滴虫蛋白代谢, 可致滴虫死亡的原因之一。比较白头翁作用前后阴道毛滴虫蛋白组分和含量的变化, 结果显示, 药物作用 2 h, 加药组滴虫蛋白图谱中有共 9 条蛋白带含量发生变化; 药物作用 4 h, 加药组滴虫蛋白图谱中共有 10 条蛋白带含量发生变化, 另出现一条新蛋白带。其可能原因为药物作用后, 破坏虫体内部结构, 滴虫蛋白合成和分解发生障碍, 导致蛋白异常凝聚或降解。

对含量变化显著的条带进行分析, 随药物作用时间延长, 不同条带其蛋白含量变化趋势不同, 提示白头翁抗滴虫作用具有一定的靶向性。对其作用靶点的深入研究对探讨其杀虫机理具有重要意义。在 SDS-PAGE 单向电泳中, 一条电泳带多为若干种蛋白质的混合物, 要探明中草药白头翁究竟对哪些虫体蛋白产生影响, 本实验存在一定的局限性, 应采用双向电泳及功能基因方面的研究将可获取更多的相关信息。

## 参 考 文 献

- [1] Goldman P. Metronidazole: proven benefit and potential risks [J]. Johns Hopkins Med J, 1980, 147(1): 1-9.
- [2] Yan Y, Gao XZ. Trichomonacidal effect and scanning electron microscope study of *Pulsatilla chinensis* against *Trichomonas vaginalis* in vitro [J]. Chin J Parasit Dis Control, 2003, 16(6): 353-355. (in Chinese)
- [3] Xu GY, Chen GH, Tian HS, et al. Study on differences of protein between *Schistosoma X* and *Schistosoma japonicum* [J]. Chin J Parasit Dis Control, 2002, 14 (6): 405-406. (in Chinese) (徐国余, 陈广梅, 田海生, 等. 一种裂体吸虫与日本血吸虫蛋白质差异研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2002, 14 (6): 405-406.)
- [4] Cao Y, Qiao DR, Jiang Y, et al. Studies on antigens of several parasites by SDS-PAGE protein electrophoresis [J]. J Sichuan Univer, 2002, 39(1): 141-145. (in Chinese) (曹毅, 乔代蓉, 蒋彦, 等. 几种寄生虫抗原组分的 SDS-PAGE 电泳分析比较[J]. 四川大学学报, 2002, 39(1): 141-145.)
- [5] Chen ZS, Jia DB, Deng WZ, et al. Effect on component and content of protein of *Cysticercus cellulosae* cultured in vitro with Mienangling [J]. Chin J Zoonoses, 2002, 18(4): 83-86. (in Chinese) (陈治水, 贾丹兵, 邓伟哲, 等. 灭囊灵对体外培养的猪囊尾蚴虫体蛋白质组分和含量的影响[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(4): 83-86.)
- [6] Zhang Y, Wang ZX, Wu L, et al. Electrophoretic analysis of soluble antigens of a pathogenic isolate of *Trichomonas vaginalis* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1998, 16(4): 296-299. (in Chinese) (张跃, 王正祥, 吴练, 等. 阴道毛滴虫致病株可溶性抗原电泳分析 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998, 16(4): 296-299.)
- [7] Gao XZ, Tan RA. Antigen analysis of *Trichomonas vaginalis* trophozoite by SDS-PAGE and two-dimensional gel electrophoresis [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2001, 19(4): 213-216. (高兴政, 谭荣安. 用聚丙烯酰胺凝胶电泳和双向电泳分析阴道毛滴虫滋养体抗原[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19(4): 213-216.)

(收稿日期: 2009-12-08 编辑: 高石, 盛慧锋)

(上接第 230 页)

炎性肉芽肿性改变有关。另一常见特征为成簇的环形强化病灶, 串珠样排列, 通常含 3~6 个环, 边界光滑, T1 呈低信号 T2 等或略高信号, 增强后显著强化, 有此强化病灶者手术多可见活虫。此外亦可见孤立的或结节样强化病灶。本例患者末次头颅 MRI 增强见成簇环形强化病灶, 提示裂头蚴感染可能性大。

Kim 等<sup>[2]</sup>报道 1 例曼氏裂头蚴脑病单光子发射计算机成像术(SPECT)及 18-F 脱氧葡萄糖正电子发射断层扫描(FDG PET)见病灶区代谢较正常脑组织减低, 与本例患者 PET 低代谢表现相印证, 提示裂头蚴周围病灶区呈低代谢分布, 依此可与肿瘤病灶区呈代谢增高的特点进行鉴别。

脑裂头蚴治疗首选去除活体裂头蚴手术, 裂头蚴的线形虫体较易被穿刺针吸取, 且活虫固有的逃避机制使虫体与周围脑组织不易黏连, 因此近年来的手术多选择脑立体定向穿刺术, 而较少进行创伤较大的开颅手术。术中选择以最高强化点为靶

点对虫体进行多次抽吸, 如取出活虫必须检查头节是否完整, 否则术后易复发<sup>[4]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Eom KS, Kim TY. Migration of cerebral sparganosis to the ipsilateral cerebellar hemisphere [J]. Acta Parasitol, 2009, 54(3): 276-280.
- [2] Kim JY, Park JH, Ryu YH, et al. Tc-99m ECD SPECT and FDG PET in partial status epilepticus resulting from cerebral sparganosis[J]. Clin Nucl Med, 2006, 31(5): 307-309.
- [3] Song T, Wang WS, Zhou BR, et al. CT and MR characteristics of cerebral sparganosis[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2007, 28(9): 1700-1705.
- [4] Chen H, Wu JS, Zhou LF, et al. Diagnosis and surgical treatment of cerebral sparganosis[J]. Chin J Clin Neurosci, 2003, 11 (2): 166-169. (in Chinese) (陈宏, 吴劲松, 周良辅, 等. 脑裂头蚴病的诊断与外科治疗[J]. 中国临床神经科学杂志, 2003, 11(2): 166-169.)

(收稿日期: 2009-12-21 编辑: 瞿麟平)