

青蒿素对鸡柔嫩艾美耳球虫第二代裂殖子微线基因 mRNA 转录及鸡盲肠组织结构的影响

莫平华^{1,2}, 马庆涛^{1,2}, 纪小霞^{1,2}, 宋萍^{1,2}, 陶建平^{1,2}, 李金贵^{1,2*}

(1. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009;

2. 江苏省动物重要疫病与人畜共患病防控协同创新中心, 扬州 225009)

摘要: 拟探讨青蒿素抗鸡柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)的作用机制。将试验鸡随机分为空白对照组、攻毒对照组和青蒿素药物组,于攻毒后 120 h,收集试验鸡的盲肠并提取 *E. tenella* 第二代裂殖子。通过红细胞计数法计算第二代裂殖子数量;SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测第二代裂殖子微线基因(*EtMIC1*、*EtMIC2*、*EtMIC3*、*EtMIC4*、*EtMIC5*)mRNA 相对转录量及扫描电镜观察试验鸡盲肠组织的病理学变化。结果表明:与攻毒对照组比较,青蒿素组的球虫第二代裂殖子数量降低了 25.37% ($P < 0.05$),同时裂殖子中微线基因 *EtMIC1*、*EtMIC2*、*EtMIC4* 的 mRNA 转录水平均显著下调($P < 0.05$),*EtMIC3*、*EtMIC5* 则极显著下调($P < 0.01$);青蒿素组盲肠的病理组织结构也得到改善。青蒿素减轻鸡盲肠组织病变可能与其下调 *EtMICs* mRNA 转录并使裂殖子数量减少有关。

关键词: 鸡;青蒿素;柔嫩艾美耳球虫;盲肠;微线基因;荧光定量 PCR

中图分类号: S853.74

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)05-0833-06

Effects of Artemisinin Treatment on Microneme Genes Transcription in Second-generation Merozoites and Pathological Changes of Caecum in Chickens Infected by *Eimeria tenella*

MO Ping-hua^{1,2}, MA Qing-tao^{1,2}, JI Xiao-xia^{1,2}, SONG Ping^{1,2}, TAO Jian-ping^{1,2}, LI Jin-gui^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The aim of this study was to study the mechanism of artemisinin against *E. tenella*. At 120 h after inoculation by oral *E. tenella* sporulated oocysts, we collected the second generation merozoites of *E. tenella* from the chicken's caecum in different groups (challenge control group, and artemisinin-treated group) and counted with erythrocytometer. mRNA transcription of microneme genes (*EtMIC1*, *EtMIC2*, *EtMIC3*, *EtMIC4*, *EtMIC5*) in second-generation merozoites were analyzed using quantitative real-time PCR. The pathological structural changes of chicken cecal tissue were observed by scanning electron microscopy. Compared with the challenge control group, the number of second generation merozoites of *E. tenella* was decreased by 25.37% ($P < 0.05$) in artemisinin-treated group. Meanwhile, the transcription level of *EtMIC1*, *EtMIC2*, *EtMIC3*, *EtMIC4*, *EtMIC5* were decreased by 46.59% ($P < 0.05$), 36.53% ($P < 0.05$), 57.89% ($P < 0.01$), 38.09% ($P < 0.05$), 54.53% ($P < 0.01$), respectively. The cecal pathological structures were partially improved by artemisinin treatment. These results suggested that artemisinin may decrease the number of merozoites by inhibiting the expression levels of microneme genes in

收稿日期: 2013-11-08

基金项目: 江苏省高校优势学科建设工程资助项目;国家自然科学基金资助项目(31272548)

作者简介: 莫平华(1988-),女,广东佛山人,硕士生,主要从事中药在兽医临床上的应用研究, E-mail: yzphmo@163.com

* 通信作者: 李金贵,教授, Tel: 0514-87979031, E-mail: jgli@yzu.edu.cn

second-generation merozoites, and then result in alleviating the cecal lesion.

Key words: chicken; artemisinin; *E. tenella*; caecum; microneme genes; qRT-PCR

鸡球虫病是由艾美耳球虫寄生于肠道所引起的一种危害严重的寄生虫病,给养鸡业造成巨大的经济损失^[1]。目前该病在国内仍然以药物预防为主,但由于抗药性、药物残留等问题的出现以及抗生素的限制应用或禁用,给该病的防治带来了新的挑战。因而积极寻找源于天然的替代药物、加强球虫耐药机制以及现有抗球虫药增敏机理的研究迫在眉睫。

1972年,中国科学工作者从菊科植物黄花蒿(*Artemisia annua* L)中提取到具有抗疟活性的成分,命名为青蒿素(artemisinin)^[2]。其不仅在抗疟和抑制利什曼虫、锥虫和刚地弓形虫等原虫的繁殖方面具有不俗的表现^[3],而且在抗鸡球虫病方面表现突出,但总体看来青蒿素的抗球虫作用多限于疗效研究,而对其作用机制研究明显不足^[4]。

鸡球虫与疟原虫、刚地弓形虫等同属于顶复门原虫,它们都有一个共同的入侵机制:即虫体在入侵时,依赖其顶端特殊的分泌器官(微线、棒状体和致密颗粒)通过一个复杂而有序的滑行运动完成入侵^[5]。近年来,国内外工作者已在顶复门艾美耳球虫目中发现了20多种微线蛋白(microneme, MIC),尽管这些蛋白种类繁多,结构复杂,但它们都含有真核生物蛋白相应的黏附结构域。微线分泌的MICs能帮助顶复门原虫识别和黏附于宿主细胞表面来完成入侵过程,而且由MICs组成的复合物及其特异性在很大程度上决定了寄生虫对宿主细胞和组织的趋向性^[6-7]。对*E. tenella*的研究发现,在入侵阶段,虫体微线分泌多种蛋白,其中EtMIC1、EtMIC2、EtMIC3、EtMIC4、EtMIC5研究得最为广泛^[8]。

国内外的研究均表明,黄花蒿干燥叶片及其有效成分青蒿素均能显著降低球虫感染鸡的卵囊排出量,并减轻肠道病变^[9-10]。目前尚未明确其作用是否与抑制*EtMICs* mRNA转录而减少入侵裂殖子的数量有关。笔者通过构建*E. tenella*感染及青蒿素药物作用模型,以鸡盲肠组织和*E. tenella*第二代裂殖子为研究对象,采用荧光定量PCR方法检测虫体MICs mRNA的转录水平,同时采用扫描电镜观察青蒿素处理鸡盲肠组织的病变情况,为探讨青蒿素抗鸡球虫作用机制奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 试剂与仪器

青蒿素购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;Hyaluronidase(Sigma);RNAsimple Total RNA Kit(北京天根生化科技有限公司);PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒(大连宝生物工程股份有限公司);低速大容量离心机(AnKe公司);DM2500正置荧光显微镜(德国Leica公司);XL-30 ESEM环境扫描电子显微镜(荷兰Philips公司);ABI 7500荧光定量PCR仪。

1.2 试验卵囊的制备

试验黄羽雄性肉鸡为扬州家禽研究所提供,经口接种*E. tenella*孢子化卵囊,感染8d后,采集盲肠,按常规方法收集卵囊。置于2.5%重铬酸钾溶液的平皿中,于29℃下通气培养,直到出现95%以上的孢子化率,4℃保存备用。

1.3 动物处理与分组

中国农业科学院家禽研究所提供1日龄黄羽雄性肉鸡90只,饲养于严格消毒的笼具中至14日龄,试验前经粪便检查无球虫卵囊。按体重随机平均分成3组,即空白对照组、攻毒对照组、感染并予以青蒿素组,每组3个重复($n=10$)。除了空白对照组外,其余组的试验鸡均经口接种 5×10^4 个孢子化卵囊,自由饮水,同时空白对照与感染对照组饲喂正常饲料,而青蒿素组于接种当天开始饲喂含 $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 青蒿素的饲料,连续用药5d。接种后120h剖杀试验鸡,按照刘立恒等^[11]和周变华^[12]的方法,以每个重复为单位收集各组鸡盲肠内*E. tenella*第二代裂殖子。

1.4 *E. tenella* 第二代裂殖子的制备

1.4.1 裂殖子释出 纵向剪开1.3中试验鸡的盲肠,用含2000U青链霉素双抗的PBS洗去肠内容物;释放裂殖子:将盲肠切成小块后放入烧杯中,加入10倍体积的透明质酸酶消化液($\text{NaCl } 7.029 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O } 0.684 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{BSA } 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Tris } 2.4228 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Hyaluronidase } 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),置于37℃水浴摇床振荡消化1h;消化液经4层灭菌纱布过滤,滤液经3000

$r \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 10 min, 去上清, PBS 重悬沉淀, 洗涤、重复沉淀 1 次。

1.4.2 红细胞裂解 按照 1:3 的比例加入红细胞裂解液, 吹打均匀, 4 °C 裂解 10 min, 2 500 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清后用 PBS 重悬沉淀, 离心, 弃上清。

1.4.3 Percoll 密度梯度离心 向沉淀中加入适当体积的 PBS, 制成悬液后加入 100% Percoll 原液, 两者体积比为 3:7, 混匀后为 30% Percoll 裂殖子悬液; 100% Percoll 原液加入到 PBS 溶液中, 体积比为 1:1, 混匀后为 50% Percoll-PBS 分离液; 准备 10 mL 玻璃管, 将含 30% Percoll 裂殖子悬液缓慢加入 50% 的 Percoll 液面上, 两者体积比为 5:1, 3 200 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 吸取 50% Percoll-PBS 分离液的溶液层到另一个干净的离心管中, 用灭菌 PBS 洗涤, 3 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 重复 2 次, 收集沉淀, 沉淀即为获得的第二代裂殖子。

1.5 *E. tenella* 第二代裂殖子的数量测定

取 1.4 中收集的 2 组(攻毒对照组和青蒿素组)第二代裂殖子, 用适量 PBS 重悬后, 采用血球计数板计数法计算 *E. tenella* 第二代裂殖子的数量。

1.6 总 mRNA 提取及 cDNA 合成

将 1.4 步骤中得到的第二代裂殖子, 根据 RNAsimple Total RNA Kit 说明书提取总 mRNA, 并取 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测。采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂

盒进行反转录, 去除基因组 DNA 的反应体系: 5 \times gDNA Eraser Buffer 6 μL , gDNA Eraser 3 μL , Total RNA 3 μL , Rnase Free dH₂O 18 μL , 总体积为 30 μL , 42 °C 反应 2 min; 反转录体系: 上述步骤的反应液 30 μL , PrimeScript RT Enzyme Mix I 3 μL , RT Primer Mix 3 μL , 5 \times PrimeScript Buffer 2 (for Real Time) 12 μL , Rnase Free ddH₂O 12 μL , 总反应体系 60 μL , 37 °C 15 min, 85 °C 5 s 得到的 cDNA 于 -20 °C 保存。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测

以 cDNA 为模板, 应用特异性扩增引物进行 qRT-PCR(表 1)。20 μL 反应体系: SYBR Premix Ex TaqII 10 μL , 上游引物、下游引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.8 μL , ROX Reference Dye 0.4 μL , cDNA 模板 2 μL , dH₂O 6 μL 。反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。每个目的基因和管家基因均进行 3 个生物学重复。应用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪进行扩增反应。运行 PCR 仪自带软件绘制溶解曲线并分析数据, 由溶解曲线判定 PCR 反应的特异性, 根据荧光曲线的 *Ct* 值计算相对定量结果, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算每个基因在攻毒对照组和青蒿素组中的相对转录水平, ΔC_t 目的基因 = *Ct* 目的基因 - *Ct* 管家基因, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ 青蒿素组 - ΔC_t 攻毒对照组, 各基因 mRNA 转录差别倍数以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

表 1 目的基因和管家基因引物序列^[12]

Table 1 Primers of target and house-keeping gene^[12]

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primers (5'→3')	序列号 Accession No.	PCR 产物/bp Products (base pairs)
18S RNA	ATCGCAGTTGGTTCTTTTGG CCTGCTGCCTTCCTTAGATG	U67121	170
<i>EtMIC1</i>	CGTCACCTACACGCATTACG TCCTGCACTCACTCGAATTG	AF032905	221
<i>EtMIC2</i>	TCAGCCGTTAGGACGAGAGT AGACAATGAAGTCCCGTTTCG	AF111839	214
<i>EtMIC3</i>	CTATACGGAAGGAGCGCTTG GCTGCAGAACTCTTGTGTGC	FJ374765	169
<i>EtMIC4</i>	ACACTCCCCATATCCCCTTC CCGCCGTCAGCTCTCTATAC	AJ306453	193
<i>EtMIC5</i>	TGGGGTCAAAGAGGGTAGTG TTATCCTCAGCGGATCCAAC	AJ245536	228

1.8 *E. tenella* 感染鸡盲肠组织扫描电镜观察

在攻毒感染后 120 h, 剖杀 3 个组的试验鸡, 采集盲肠中后段, 用 PBS 溶液冲洗干净后放入 2.5% 戊二醛固定液 4 °C 固定 2 h 以上; PBS 漂洗 3 次, 1% 的锇酸固定 2 h; PBS 漂洗 3 次; 梯度乙醇脱水; 乙酸异戊酯与无水乙醇体积比 1:1, 30 min; 乙酸异戊酯浸泡 30 min; CO₂ 临界点干燥; Leica SCD 500 刻蚀镀膜仪喷金处理; XL-30 ESEM 环境扫描电镜观察。

1.9 统计方法

用 SPSS 17.0 版统计分析软件对数据进行统计分析, 用 GraphPad Prism 6 Demo 对试验数据作图。

2 结果

2.1 青蒿素对 *E. tenella* 第二代裂殖子数量的影响

将盲肠样品经酶消化、Percoll 密度梯度离心等方法收集的裂殖子置于正置荧光显微镜下观察发现, 我们分离得到的 *E. tenella* 第二代裂殖子较为纯净, 形态为长柳叶状(图 1)。经计数后, 攻毒对照组与青蒿素组每只鸡的第二代裂殖子平均数量分别为 9.05×10^6 、 6.75×10^6 个。与攻毒对照组相比, 青蒿素组 *E. tenella* 第二代裂殖子的数量减少了 25.37% ($P < 0.05$) (图 2)。

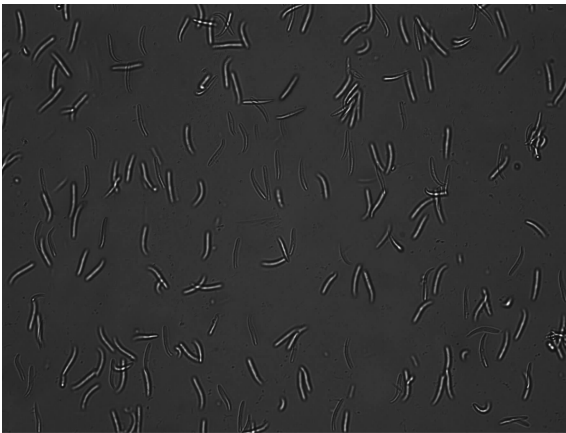
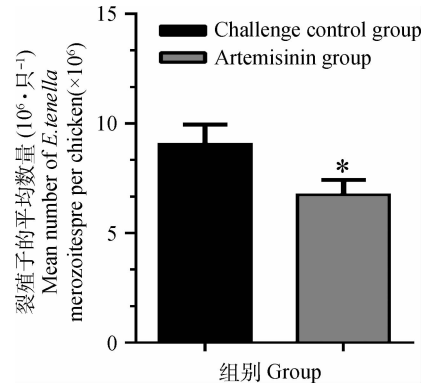


图 1 正置荧光显微镜观察 *E. tenella* 第二代裂殖子的提取 (400 ×)

Fig. 1 Second-generation merozoites of *E. tenella* were photographed under fluorescent microscopy

2.2 青蒿素对 *E. tenella* 第二代裂殖子微线基因 (*EtMICs*) mRNA 转录的影响

与攻毒对照组比较, 青蒿素组裂殖子微线基因 (*EtMIC1*、*EtMIC2*、*EtMIC3*、*EtMIC4*、*EtMIC5*) mRNA 的转录量分别降低了 46.59% ($P < 0.05$)、



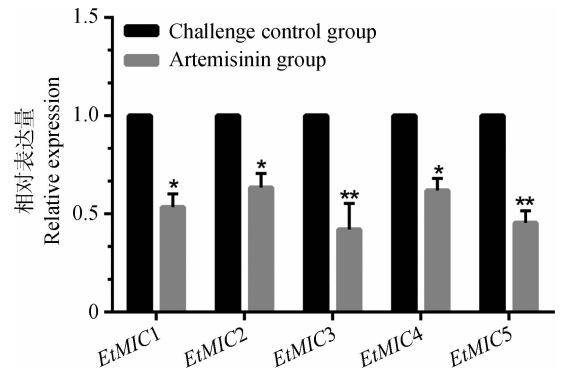
* 表示差异显著 ($P < 0.05$)

* show remarkable difference ($P < 0.05$)

图 2 攻毒对照组与青蒿素组裂殖子的数量

Fig. 2 Mean number of *E. tenella* merozoites of challenge control group and artemisinin group

36.53% ($P < 0.05$)、57.89% ($P < 0.01$)、38.09% ($P < 0.05$)、54.53% ($P < 0.01$) (图 3), 提示青蒿素可能是通过抑制裂殖子 *EtMICs* mRNA 的转录, 影响入侵复合体的组装, 干扰虫体入侵宿主细胞, 从而降低了孢子或裂殖子对盲肠上皮细胞的入侵能力。



* 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)

* show remarkable difference ($P < 0.05$), ** show extremely remarkable difference ($P < 0.01$)

图 3 *E. tenella* 第二代裂殖子微线基因 (*EtMICs*) 相对荧光定量 PCR 分析结果 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

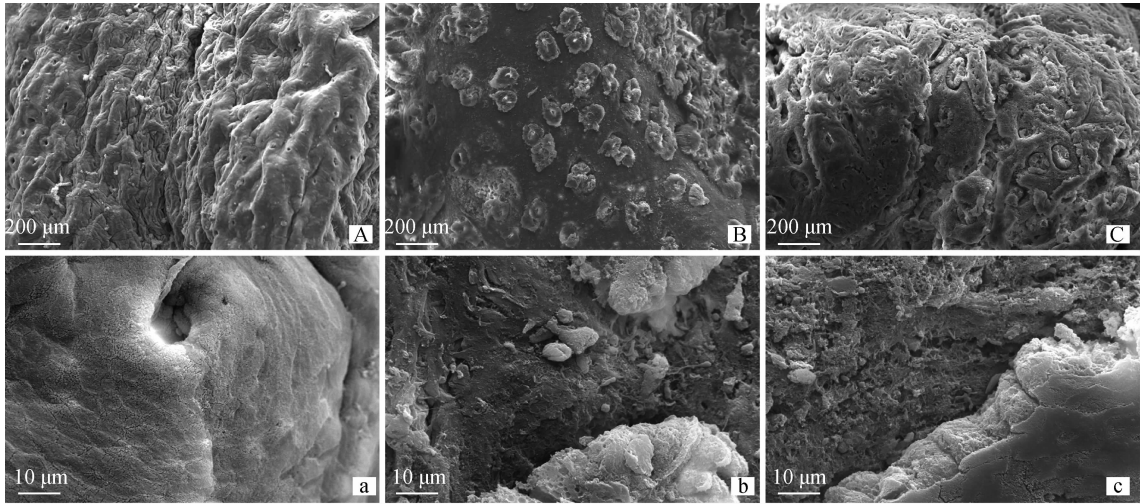
Fig. 3 Microneme genes mRNA expression in second-generation merozoites of *E. tenella* as analyzed by relative quantitative PCR ($n=3, \bar{x} \pm s$)

2.3 *E. tenella* 感染鸡盲肠组织扫描电镜观察

扫描电镜观察试验鸡盲肠组织, 显示空白对照组盲肠黏膜表面平滑, 形成盲肠皱褶, 上皮细胞纹状缘完整且密集(图 4A, a)。攻毒对照组盲肠黏膜表面糜烂, 由于大量黏膜上皮细胞脱落而裸露出黏膜肌层(图 4B), 攻毒感染 120 h, 大部分上皮细胞纹状缘随上皮细胞脱落而丢失, 呈现蜂窝状外观, 因裂殖

体、裂殖子或配子寄生所致(图 4b)。青蒿素组(图 4C,c)盲肠黏膜表面也存在糜烂结构,与攻毒对照

组相比,纹状缘仍能清晰可见,黏膜结构在一定程度上得到了改善。



A(250×)、a(4 000×)为空白对照组盲肠;B(250×)、b(4 000×)为攻毒感染 120 h 后攻毒对照组盲肠;C(250×)、c(4 000×)为攻毒感染 120 h 后青蒿素组盲肠

Cecal mucosa of control group (A,a) showing the flattened “collar” and rugae. Cecal mucosa from Challenge control group (B,b) of an 120 h post-inoculation infected chicken, revealed lesion ranging from localized tissue swelling to complete disruption of the mucosal epithelium due to the rupture of large number of epithelial cells. It was characterized by the mucosa sloughed down to the muscularis mucosa. Approved structure of cecum mucosa (C,c) could be observed at 120 h in the group treated by artemisinin

图 4 试验鸡盲肠组织扫描电镜观察

Fig. 4 Scanning Electron Microscopy analysis of cecal mucosa of chickens

3 讨论

目前关于青蒿素抗球虫机制的研究鲜有报道,E. Del Cacho 等^[13]发现鸡日粮中 10~17 mg·kg⁻¹的商品级青蒿素,能降低 *E. tenella* 卵囊的排出量和肠道病变指数,且可降低卵囊孢子化率;超微结构的研究发现,青蒿素没有明显影响球虫配子的发育,但能显著抑制卵囊壁的形成;经免疫荧光试验发现该作用与青蒿素抑制了大配子中肌浆内质网钙 ATP 酶的表达有关。

鸡球虫生活史包括无性增殖期与有性生殖期,前者是主要的致病期,子孢子入侵上皮细胞后发育成裂殖体,裂殖体进一步分化为裂殖子,肠上皮细胞破裂后,裂殖子释放,重新入侵新的肠上皮细胞,从而导致感染鸡盲肠肿胀出血等病理变化^[14]。该过程中的子孢子和裂殖子是高度分化的细胞,含有微线细胞器,当它们与宿主细胞表面接触时,微线会分泌 EtMIC1、EtMIC2、EtMIC3、EtMIC4、EtMIC5 等蛋白。经序列分析显示它们具有共同的特征,都含有黏附区,该蛋白在介导虫体运动与对宿主细胞表面的黏附时具有重要的作用^[15-16]。

在本研究中青蒿素不但降低了 *E. tenella* 第二代裂殖子的数量(25.37%),而且使球虫裂殖子 *EtMICs* mRNA 的转录下调了 36.53%~57.89%。然而,总体来看,青蒿素的抗球虫作用仍达不到地克珠利等传统抗球虫药的疗效,如周变华^[12]的研究发现,地克珠利能使 *E. tenella* 第二代裂殖子的数量减少 65.13%($P<0.01$),同时也使 5 个微线基因 mRNA (*EtMIC1*、*EtMIC2*、*EtMIC3*、*EtMIC4*、*EtMIC5*) 的相对转录量分别降低了 65.63%($P<0.01$)、64.12%($P<0.01$)、56.82%($P<0.01$)、73.48%($P<0.01$)、78.17%($P<0.01$)。

在鸡球虫致肠道组织结构病变方面,W. J. Bemrick 等^[17]利用扫描电镜观察 *E. tenella* 感染鸡盲肠黏膜的损伤情况,发现正常组织的盲肠表面平滑且形成肠皱褶,而被感染盲肠组织内虫体所处阶段不同而呈现出不同的病理变化,主要以肠上皮细胞发生炎症,坏死脱落而导致盲肠黏膜肌层裸露,部分视野可见到裂殖体、裂殖子或卵囊。在本试验中经过电镜观察发现,青蒿素组的试验鸡盲肠组织也见有明显的病变,这与临床病变情况一致,但与攻毒对照组相比,其临床和显微病变的程度均有明显改善。

本研究与前人研究青蒿素可以减轻病理损伤的研究结果相吻合^[9-10]。然而,球虫对现有抗球虫药均有不同程度的抗药性,地克珠利也不例外^[18],加上新型抗球虫药物的研制困难重重,所以利用现有药物开展复方抗球虫药物研究不失为当前的紧迫任务,也是现实之举。

张灿等^[19]研究发现,含青蒿素的“中宝杀球散”对柔嫩艾美耳球虫病的预防效果较理想,其 ACI 值达到 173.10;该散与地克珠利合并使用后 ACI 值为 214.16,可显著提高抗球虫疗效。戴和斌等^[20]研究指出复方青蒿合剂(每 10 mL 合剂中含青蒿 3 g、常山 3 g、白头翁 2 g、黄芪 2 g)高剂量(水中加 1.0 mL·L⁻¹)与中剂量(水中加 0.5 mL·L⁻¹)的 ACI 指数平均值分别为 190.3、186.7,能达到优秀药效的抗球虫药物水平,但试验鸡仍然会出现血便现象。

为了减少或延迟青蒿素类药物的抗药性,世界卫生组织早在 2001 年即提倡青蒿素复方疗法(artemisinin combination therapy),从以上青蒿素复方用于抗球虫的研究结果来看,复方疗法能明显提高疗效,并减少药物剂量,也是减缓或推迟球虫抗药性的有效选择,故进行青蒿素类药物复方抗球虫疗效及机理研究还有待于进一步挖掘。

4 结 论

青蒿素抗球虫作用机制可能与其抑制第二代裂殖子微线基因 mRNA 的转录,使入侵盲肠组织的第二代裂殖子的数量明显减少,从而减轻盲肠组织病变有关。

参 考 文 献:

[1] ABBAS R Z, IGBAL Z, KHAN A, et al. Options for integrated strategies for the control of avian coccidiosis [J/OL]. *Int J Agric Biol*, 2013. <http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/health/articles/options-integrated-strategies-control-t2727/165-p0.htm>.

[2] 青蒿素结构研究协作组. 一种新型的倍半萜内酯—青蒿素[J]. *科学通报*, 1977(3):142.

[3] EFFERTH T. Artemisinin; a versatile weapon from traditional Chinese medicine[M]//Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 2009:173-194.

[4] DE ALMEIDA G F, HORSTED K, THAMSBORG S M, et al. Use of *Artemisia annua* as a natural coccidiostat in free-range broilers and its effects on infection dynamics and performance[J]. *Vet Parasitol*, 2012, 186(3-4):178-187.

[5] DUBREMETZ J F. Host cell invasion by *Toxoplasma*

gondii[J]. *Trends Microbiol*, 1998, 6(1):27-30.

[6] 郑 君. 柔嫩艾美耳球虫 Rhomboid 蛋白与微线蛋白相互作用的研究[D]. 吉林:吉林大学, 2011.

[7] COWPER B, MATTHEWS S, TOMLEY F. The molecular basis for the distinct host and tissue tropisms of coccidian parasites[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2012, 186(1):1-10.

[8] CARRUTHERS V B, TOMELY F M. Microneme proteins in apicomplexans. Molecular mechanisms of parasite invasion[M]. Berlin Heidelberg, Germany: Springer, 2008:33-45.

[9] ALLEN P C, LYDON J, DANFORTH H D. Effects of components of *Artemisia annua* on coccidia infections in chickens[J]. *Poult Sci*, 1997, 76(8):1156-1163.

[10] ARAB H A, RAHBARI S, RASSOULI A, et al. Determination of artemisinin in *Artemisia sieberi* and anticoccidial effects of the plant extract in broiler chickens[J]. *Trop Anim Health Prod*, 2006, 38(6):497-503.

[11] 刘立恒, 李 俊, 徐立新, 等. 柔嫩艾美耳球虫第二代裂殖子的分离纯化[J]. *畜牧与兽医*, 2006, 38(12):38-40.

[12] 周变华. 地克珠利抗鸡柔嫩艾美耳球虫第二代裂殖子作用机理研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2010.

[13] DEL CACHO E, GALLEGO M, FRANCESCH M, et al. Effect of artemisinin on oocyst wall formation and sporulation during *Eimeria tenella* infection[J]. *Parasitol Int*, 2010, 59(4):506-511.

[14] 韩红玉, 林娇娇, 黄 兵. 鸡球虫入侵相关分子的研究进展[J]. *动物医学进展*, 2007, 28(9):60-64.

[15] TOMLEY F M, BILLINGTON K J, BUMSTEAD J M, et al. EtMIC4: a microneme protein from *Eimeria tenella* that contains tandem arrays of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type-I repeats[J]. *Int J Parasitol*, 2001, 31(12):1303-1310.

[16] MÉNARD R. The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way [J]. *Microbes Infect*, 2000, 2(6):633-642.

[17] BEMRICK W J, HAMMER R F. Scanning electron microscopy of damage to the cecal mucosae of chickens infected with *Eimeria tenella* [J]. *Avian Dis*, 1978, 22(1):86-94.

[18] 顾有方, 郭广富, 陈会良. 5 株柔嫩艾美耳球虫对 4 种抗球虫药的抗药性[J]. *畜牧兽医学报*, 2004, 35(6):727-730.

[19] 张 灿, 李相钊, 郭 义, 等. “中宝杀球散”对鸡柔嫩艾美耳球虫病的疗效试验[J]. *动物医学进展*, 2008, 29(9):50-52.

[20] 戴和斌, 夏 彤, 赵林峰, 等. 复方青蒿合剂治疗鸡球虫病初探[J]. *中国家禽*, 2009, 31(10):55-56.