

蛇床子素体外对蓝氏贾第鞭毛虫超微结构的影响

李文超^{1,2}, 顾有方², 刘畅¹, 吴娜¹, 罗文武¹, 宫鹏涛¹, 李赫¹, 李建华¹, 张西臣^{1*}

【摘要】 用含 1.345 mg/ml (24 h IC_{50}) 蛇床子素的改良 TYI-S-33 培养基培养蓝氏贾第鞭毛虫滋养体, 采用扫描和透射电镜观察蛇床子素作用后 24 h 虫体超微结构的变化。结果显示, 经蛇床子素作用后, 鞭毛虫滋养体表面凹凸不平, 腹吸盘和中体附近表面有明显的病变, 主要表现为腹吸盘表面细胞膜破裂, 细胞内容物外溢、稀疏, 出现板层样结构, 空泡化严重, 细胞核畸形, 边缘锯齿状, 核内染色质边集, 吸盘微管部分结构崩解。

【关键词】 蓝氏贾第鞭毛虫; 蛇床子素; 体外; 超微结构

中图分类号: R382.213

文献标识码: B

In Vitro Effect of Osthole on Ultrastructure of *Giardia lamblia*

LI Wen-chao^{1,2}, GU You-fang², LIU Chang¹, WU Na¹, LUO Wen-wu¹,
GONG Peng-tao¹, LI He¹, LI Jian-hua¹, ZHANG Xi-chen^{1*}

(1 College of Animal Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China; 2 College of Animal Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

【Abstract】 *Giardia lamblia* trophozoites were cultivated axenically in TYI-S-33 modified medium containing 1.345 mg/ml of osthole (24 h IC_{50}). The parasites were observed by scanning and transmission electron microscopes after treated with osthole for 24 h. The surface of the trophozoites treated with osthole was rough. The surface of ventral sucker and median body had obvious lesions, the cell membrane was damaged and the content spilled out. There were a lot of vacuoles in the cytoplasm. And the nuclear was severely deformed with a serrated edge and marginated nuclear chromatin. The microtubules of sucker had partially disintegrated.

【Key words】 *Giardia lamblia*; Osthole; *In vitro*; Ultrastructure

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30970322), the Key Program of Anhui Science and Technology University (No. ZRC2014406) and the Key Discipline Construction Program of Anhui Science and Technology University (No. AKXK20101-2)

* Corresponding author, E-mail: xc Zhang@jlu.edu.cn

蓝氏贾第鞭毛虫 (*Giardia lamblia*, 简称贾第虫) 是呈世界性的分布, 以腹泻为其特征性临床症状, 寄生于人和多种动物肠道的一种人兽共患寄生虫。无论在发达国家还是发展中国家, 贾第虫病均是重要的公共卫生问题^[1-3]。目前, 临床上常用于治疗贾第虫病的药物包括 5-硝基咪唑类、5-硝基呋喃类药物和苯并咪唑类药物。虽然这些药物效果不错, 但存在由于产生耐药性导致有效率下降、复发增多和不良反应等问题^[4,5], 因此研发可替代的抗贾第虫新药势在必行。

蛇床子素是从伞形科蛇床子属植物蛇床的果实中提取的一种香豆素类化合物, 具有多种生物学活性, 如抗高血压、抗衰老、抗肿瘤、杀灭细菌和真菌等作用。研究证实蛇床子素对阴

道毛滴虫和阿米巴等原虫具有一定的杀灭作用^[6,7]。本课题组前期的研究也证实蛇床子素体外具有杀灭贾第虫的作用^[8], 为探讨其杀灭贾第虫的作用机制, 本研究采用扫描电镜和透射电镜观察蛇床子素体外对贾第虫滋养体超微结构的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 蓝氏贾第鞭毛虫 (长春株, 属聚集体 D), 由本室分离自长春的腹泻犬, 在改良 TYI-S-33 培养基培养, 保种等^[9]。蛇床子素购自上海源叶生物科技有限公司 (纯度 $\geq 98\%$), 批号为 20130507。

1.2 方法

1.2.1 贾第虫的处理 将培养至对数生长期的贾第虫培养管冰浴 15 min, 使虫体从管壁脱落, 离心 10 min, 弃上清, 将虫体浓度调整为 4×10^6 ml。在培养管中加入 10 mg/ml 蛇床子素原液 (蛇床子素粉末用乙醇溶解), 使蛇床子素的终浓度为 1.345 mg/ml (24 h IC_{50}), 加入 10% 胎牛血清, 37 °C 厌氧培养 24 h, 另设阴性对照组和空白对照组。

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30970322); 安徽科技学院校级重点项目 (No. ZRC2014406); 安徽科技学院重点学科建设项目 (No. AKXK20101-2)

作者单位: 1 吉林大学动物医学学院, 长春 130062; 2 安徽科技学院动物科学学院, 凤阳 233100

* 通讯作者, E-mail: xc Zhang@jlu.edu.cn

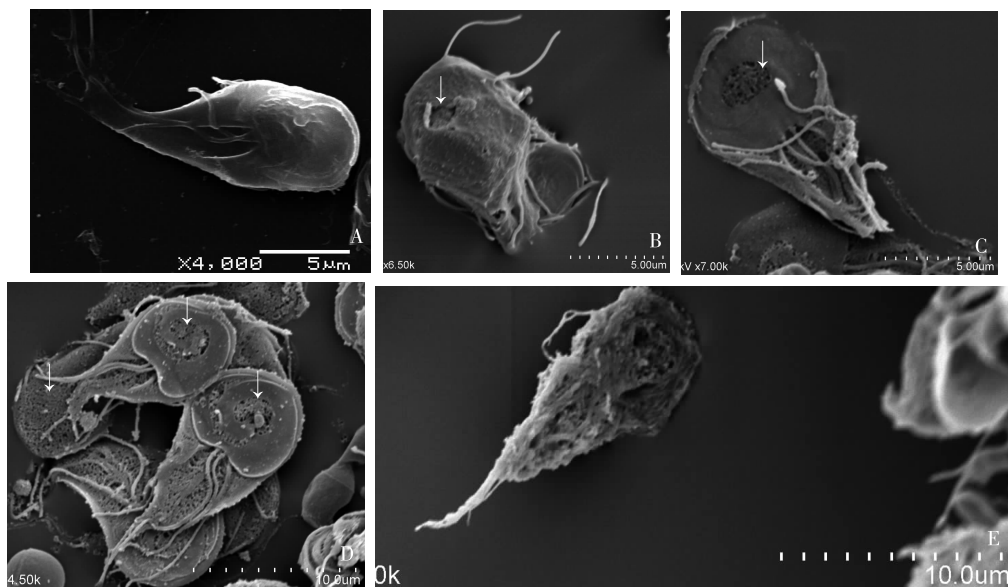
1.2.2 电镜样品制备 培养后的虫体转移至1.5 ml离心管中, 2 000×g常温离心5 min, 弃上清, 沉淀用37 ℃预热的PBS反复洗涤两次, 最后沉淀中加入1 ml 2.5%戊二醛固定液, 分别参照文献 [10,11]的方法进行扫描和透射电镜样品制作, 置于扫描电镜 (S3400N型, 日本Hitachi公司) 和透射电镜 (H-7650型, 日本Hitachi公司) 下进行超微结构观察。

2 结果

2.1 扫描电镜观察 阴性对照组和空白对照组贾第虫滋养体呈半切倒置的梨形; 两侧对称, 前部呈圆形, 后部较尖; 腹面扁平有两个吸盘; 背面突起; 有分布于虫体的前、中、腹和尾部的4对鞭毛, 体中部有两个细长的中体 (图1A)。经蛇床子素处理后, 滋养体变形, 表面凹凸不平, 腹吸盘表面以及中体

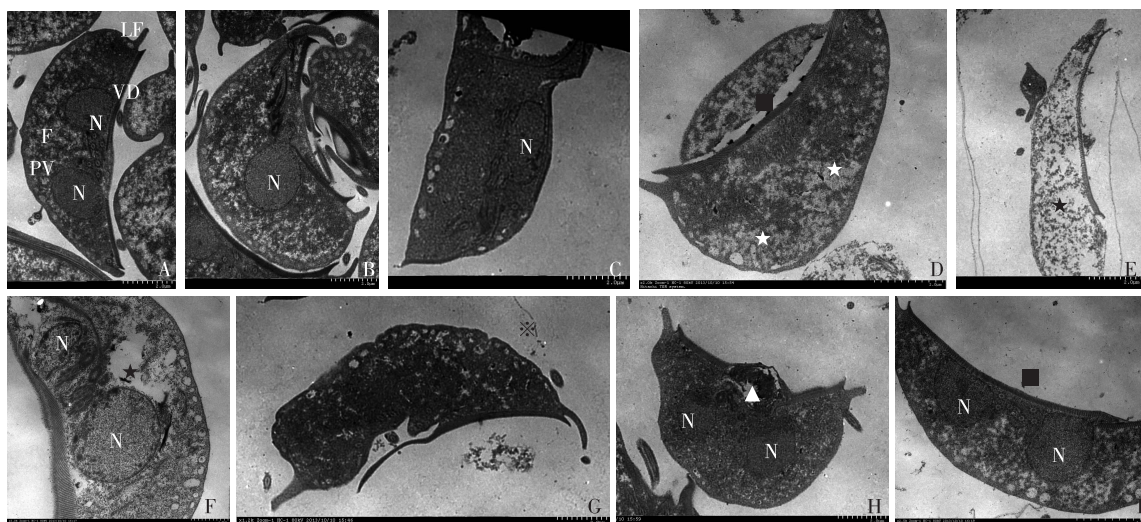
附近虫体表面有明显的病变, 主要表现为腹吸盘表面细胞膜破裂, 出现一个或多个裂口, 细胞内容物外溢, 剩余表膜皱缩, 进而导致虫体立体结构改变, 细胞由于胞质内容物外泄而失去支撑, 变扁平 (图1B~D)。部分由于虫体表面破损严重, 胞质耗空而最后只剩下躯壳而死亡 (图1D)。

2.2 透射电镜观察 阴性对照组和空白对照组虫体横切面外观呈梨形, 两个泡状核呈椭圆形, 核膜完整, 核周染色质均匀分布在核膜内侧, 质膜下可见小囊泡, 呈单层排列, 鞭毛自基体发出, 鞭毛微管结构清晰可见 (图2A、B)。经蛇床子素处理后, 滋养体早期肿胀 (图2C、H), 胞质内容物稀疏, 空泡化严重 (图2D~F), 虫体细胞膜边缘不整齐 (图2G), 胞内出现板层样结构 (图2H), 细胞核畸形, 边缘锯齿状 (图2C、F、I), 核内染色质边集, 吸盘微管部分结构崩解 (图2D、I)。



A: 对照组; B~E: 蛇床子素处理组; 箭头表示不同的病变区域。

图1 扫描电镜观察蛇床子素作用后贾第虫滋养体的变化



A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C~I: 蛇床子素处理组。N: 泡状核; F: 横向微管; PV: 外围囊泡; LF: 横向鞭毛; VD: 腹面吸盘; ★ 胞质空泡化; ■ 吸盘部分微管结构解体; ※ 滋养体肿胀, 边缘不整齐; ▲ 胞质内板层样结构。

图2 透射电镜观察蛇床子素作用后贾第虫滋养体的变化

3 讨论

蛇床子素是一种重要的香豆素类化合物, 具有广泛的作用, 包括消炎、抗肿瘤、预防动脉粥样硬化、抗老化和抗生殖等的属性。蛇床子素已被用来控制作物昆虫^[12]和抗致病性细菌^[13,14]。然而, 目前蛇床子素抗寄生虫的相关研究较少, 而有关其抗寄生虫机制的研究则未见报道。

本研究在前期确定蛇床子素具有体外抗犬源蓝氏贾第鞭毛虫作用的基础上^[8], 进一步研究其对贾第虫滋养体结构的影响, 扫描电镜观察发现, 蛇床子素可导致贾第虫滋养体腹吸盘表面细胞膜破裂, 这一结果与Müller等^[15]用噻唑类化合物处理贾第虫滋养体后的病变类似, 均造成滋养体腹吸盘显著病变, 目前尚不清楚是什么原因导致腹吸盘结构的破坏, 不过, Almeida等^[16]的研究发现罗勒精油中的酚类抗氧化剂可能改变贾第虫滋养体的通透性, 进而导致细胞内大分子物质的外泄, 最终引起虫体结构与功能的改变。蛇床子素的作用可能与罗勒精油类似, 可造成虫体细胞膜的破裂, 细胞内容物外溢, 最后由于胞质耗空而导致虫体死亡。透射电镜观察发现, 蛇床子素主要造成虫体胞质内大面积的空泡化, 出现板层样结构, 细胞核畸形, 边缘锯齿状以及吸盘微管部分结构崩解等, 显示虫体在代谢和结构上均严重受损, 这一现象与Müller等^[15]和Tian等^[17]的结果一致。对贾第虫而言, 吸盘结构的完整对于其黏附非常重要, 而蛇床子素可造成吸盘微管部分结构崩解, 意味着贾第虫滋养体失去了黏附的能力, 这也是造成虫体死亡的原因之一。更为重要的是, 研究证实抗寄生虫的药物可能会影响原虫的内吞^[18]和/或自噬途径^[19], 其中板层样结构的形成是自噬途径的标志, 本研究发现, 蛇床子素可致贾第虫滋养体胞内形成板层结构, 暗示自噬参与了虫体的死亡过程。考虑到贾第虫吸盘不仅是虫体黏附的重要器官, 而且参与虫体的营养吸收, 虫体吸盘的病变不仅影响了虫体的正常黏附, 而且不可避免地导致了虫体营养吸收的障碍, 进而导致虫体营养供应不足, 因饥饿而诱发自噬, 最后导致死亡。

参 考 文 献

- [1] Sprong H, Cacciò SM, van der Giessen JW, *et al.* Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis* [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2009, 3(12): e558.
- [2] 冯宪敏, 王月华, 鞠晓红. 蓝氏贾第鞭毛虫表面抗原变异机制研究进展[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2012, 30(4): 317-320.
- [3] 王乙惠, 李雅杰, 蓝氏贾第鞭毛虫基因表达调控的研究进展[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2011, 29(2): 138-141.
- [4] Upcroft P, Upcroft JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14(1): 150-164.
- [5] Busatti HG, Vieira AE, Viana JC, *et al.* Effect of metronidazole analogues on *Giardia lamblia* cultures [J]. *Parasitol Res*, 2007, 102(1): 145-149.
- [6] 张永生, 杜军, 施雨露, 等. 五种中药灭阴道毛滴虫体外试验初步研究[J]. *白求恩医科大学学报*, 1996, 22(4): 355-357.
- [7] 兰继毓, 袁继红, 邵忠俊, 等. 五种中药杀灭溶组织内阿米巴滋养体体外实验研究 [J]. *中国寄生虫病防治杂志*, 1996, 9(1): 43-46.
- [8] 刘畅, 吴娜, 田甜, 等. 蛇床子素体外抗犬源蓝氏贾第鞭毛虫作用研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2013, 8(11): 1014-1016.
- [9] Liu C, Li J, Zhang X, *et al.* Stable expression of green fluorescent protein mediated by GCV in *Giardia canis* [J]. *Parasitol Int*, 2008, 57(3): 320-324.
- [10] Mattos A, Solé-Cava A, De Carli, *et al.* Fine structure and isozymic characterization of trichomonadids protozoa [J]. *Parasitol Res*, 1997, 83(3): 290-295.
- [11] Chen L, Li J, Zhang X, *et al.* Inhibition of krr1 gene expression in *Giardia canis* by a virus-mediated hammerhead ribozyme [J]. *Vet Parasitol*, 2007, 143(1): 14-20.
- [12] 孟琳琳, 王进忠, 张志勇, 等. 蛇床子素对小菜蛾幼虫的胃毒作用及对虫体内两种酶活性的影响 [J]. *北京农学院学报*, 2010, 25(3): 24-27.
- [13] 黄天华, 杨天武, 肖凤平, 等. 蛇床子素对植物病原菌抑制效果的测定[J]. *华中农业大学学报*, 2005, 24(3): 258-260.
- [14] 尹彩萍, 张应烙, 邓贤兰, 等. 蛇床子等中药提取物对几种病菌生物活性的初步研究 [J]. *井冈山学院学报 (自然科学)*, 2005, 26(1): 33-34.
- [15] Müller J, Rühle G, Müller N, *et al.* *In vitro* effects of thiazolides on *Giardia lamblia* WB clone C6 cultured axenically and in coculture with Caco2 cells[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(1): 162-170.
- [16] de Almeida I, Alviano DS, Vieira DP, *et al.* Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil [J]. *Parasitol Res*, 2007, 101(2): 443-452.
- [17] 田喜凤, 卢思奇, 刘业民, 等. 双氢青蒿素对体外蓝氏贾第鞭毛虫的损伤 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2005, 23(5): 292-295.
- [18] Bernardes CF, Meyer-Fernandes JR, Saad-Nehme J, *et al.* Effects of 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid on *Trypanosoma cruzi* proliferation and Ca (2+) homeostasis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32(5): 519-527.
- [19] Vannier-Santos MA, de Castro SL. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill[J]. *Curr Drug Targets*, 2009, 10(3): 246-260.

(收稿日期: 2014-01-15 编辑: 衣凤芸)

**感谢寄生虫病科研、防治、教育工作者
多年来对本刊的大力支持！欢迎继续投稿！**