

阿奇霉素抗弓形虫速殖子作用的体外实验和超微研究

周永华¹, 石火英², 刘耀兴³, 吴菁¹, 王崇功¹

(1. 江苏省寄生虫病防治研究所, 无锡 214064)

(2. 扬州大学农学院电镜室, 扬州 215009)

(3. 江苏省农林厅畜牧局, 南京 210009)

[摘要] 为了解阿奇霉素在体外杀灭弓形虫速殖子的效果及其机制, 故将阿奇霉素(0.5~1.5 mg/mL)加入小鼠腹水中(含虫 1×10^5 个/mL), 用光镜和透射电镜观察, 并将药物作用 4 h 的速殖子接种于小鼠以观察虫体是否复苏. 结果发现经 1.5 mg/mL 阿奇霉素作用 30 min, 即可见速殖子的棒状体后段中央部分被溶解, 速殖子细胞膜相结构和子虫细胞膜断裂. 经 1.5 mg/mL 阿奇霉素作用 4 h 的虫体在小鼠体内未能复苏. 可见阿奇霉素在体外对弓形虫速殖子具有杀灭作用, 可以抑制速殖子的侵袭力和繁殖. 该药的杀虫力与药物的浓度和作用时间呈正相关趋势.

[关键词] 阿奇霉素; 弓形虫; 速殖子; 体外; 超微结构

[中图分类号] R987; **[文献标识码]** A; **[文章编号]** 1001-4616(2001)02-0095-04

弓形虫病的治疗药物是当前急需解决的问题之一^[1]. 阿奇霉素系大环内酯类广谱抗菌素, 80 年代后期被试用于临床. 国外曾报告其在动物体内有抗弓形虫作用^[2,3], 此后在体外培养中也证实能明显抑制弓形虫生长. 但国内则尚未见系统报告. 为此, 我们在证实阿奇霉素对小鼠体内弓形虫速殖子具有杀灭作用的基础上^[4], 报道阿奇霉素在体外杀灭弓形虫速殖子的实验研究结果.

1 材料与方法

(1) 药物: 阿奇霉素, 克罗地亚 PLIVA 药厂生产, 批号为 284066.

(2) 虫株: 本室保存的 RH 国际标准株.

(3) 实验动物: NIH 远交系小鼠(体重 18~22 g, 雌雄不限), 由本所实验动物室提供.[苏动(环)97027, 苏动(质)97023].

(4) 体外实验: 抽取感染弓形虫 72 h 的小鼠腹水, 光镜检查见其速殖子运动活跃, Trypan blue 着色率 1%~3%, 以无菌生理盐水稀释腹水至含虫密度为 1×10^5 个/mL, 将药品加入含虫悬液中, 混匀置室温 25℃ 左右孵育, 于加药后 1h、2h、4h 分别从各组中取 5 管, 离心, 收集各管虫体. 生理盐水洗涤 2 次后, 每管留 0.5 mL 沉淀物, 以 0.5% Trypan blue 染色 20 min. 光镜观察计算速殖子着色率, 同时涂片, 以 2% Giemsa 染色 20 min, 光镜观察. 加药后 4 h, 除做上述染色检查外, 将剩余沉淀物约 0.4 mL(约含虫 5000 个)接种于小鼠, 待小鼠刚死, 取腹腔液镜检.

(5) 电镜观察: 于加药后 30 min、60 min、120 min、240 min, 分别从各组中随机取 3 管合并虫

收稿日期: 2000-10-18

基金项目: 本研究为江苏省科技厅社会发展项目《弓形虫病治疗方法的研究》课题的一部分(编号为苏 BS96042), 并获省农林厅部分经费资助.

作者简介: 周永华, 1964—, 江苏省寄生虫病防治研究所主管技师, 主要从事弓形虫病的防治研究.

液.按常规电镜取材要求,取虫液离心沉淀.所取样品用 2.5%戊二醛前固定,1%四氯化锶后固定.按透射电镜常规方法制备样品,置 H-600 型透射电镜下观察,并计算每样品中 50~100 个速殖子.

2 结果

2.1 体外实验

(1)正常对照组速殖子呈香蕉形或半月形,虫体透明,Trypan blue 着色率为 1.17%,用药后速殖子的着色率见表 1,与正常速殖子对照组相比,用药后虫体着色率均显著升高($P < 0.01$).部分虫体略肿胀或呈椭圆形.经 Giemsa 染色后,正常速殖子对照组均呈香蕉形或半月形,胞质浅蓝色,胞核紫红色,加阿奇霉素后 1 h,速殖子胞质和胞核染色均加深,部分虫体变形,且胞质着色不均匀,出现深染团块或粗大颗粒.用药后 4 h,部分虫体固缩,虫体呈椭圆形或圆形,深染.0.5、1.0 和 1.5 mg/mL 3 组发生此病变的虫体数分别达 5%~10%、15%~25%和 60%~70%,与此同时,少数速殖子略胀大,呈椭圆形,淡染,虫体结构模糊,虫体破裂.

(2)小鼠接种试验.经阿奇霉素作用 4 h 的速殖子接种小鼠实验结果见表 1,用药各组中小鼠平均存活时间明显长于其它各组($P < 0.01$).虽然其它各组的虫体 Trypan blue 着色率明显高于正常对照组,但小鼠平均存活时间仅稍长于对照组.

表 1 阿奇霉素抗弓形虫速殖子作用的体外实验结果

组别		阿奇霉素组			对照组
		0.5	1.0	1.5	
用药后着色率(%)	1h	87.5	98.2	99.6	1.5
	2h	96.4	100	100	1.67
	4h	98.3	100	100	3
小鼠接种	存活时间/d	5	9	35	4
	阳性数/接种数	5/5	5/5	0/5	5/5

2.2 电镜观察

2.2.1 正常对照弓形虫速殖子形态

虫体超微结构与文献报道基本一致^[5,6].速殖子表膜由 2 层组成,包绕整个虫体.可见有类锥体、微线体、棒状体、致密颗粒、核、线粒体和高尔基复合体,虫体前端包括类锥体和极环,棒状体向后延伸至核附近,棒状体呈棒状,颈部较细而致密,后端膨大,其前端周围有众多微线体,散在分布于虫体前端的胞质中.有的速殖子胞质内有 1~2 个子虫,有时也见有致密颗粒环绕子虫呈串珠状排列.

2.2.2 药物作用弓形虫速殖子后的超微结构改变

阿奇霉素作用 30 min 后,速殖子染色加深,虫体细胞膜破坏,线粒体肿胀,虫体内空泡明显增多,电子密度降低.药物作用 60 min 后,部分速殖子的核周间隙增宽,染色质呈不规则的团块状集中分布在核的周边,细胞基质发生局部溶解,出现较大的空泡.药物作用 120 min 后,虫体病变更为显著,速殖子核周间隙增宽,染色质边集,棒状体中央部分溶解,其边缘部分增厚,且棒状体的腺体结构消失,细胞膜出现泡状突起,核固缩,线粒体、内质网等膜状结构发生溶解样改变,细胞器破坏,细胞内容物外溢,虫体呈坏死改变.

3 讨论

阿奇霉素系大环内酯族广谱抗菌素,80 年代后期始被试用于临床,90 年代初才见有较系

统的临床药理学和临床试用报告.我们曾证实其在小鼠体内具有抗弓形虫作用^[4].本研究更进一步证实了阿奇霉素在体外也有较强的杀灭弓形虫速殖子作用.本实验中 Trypan blue 与 Giemsa 染色的相似结果显示,在阿奇霉素作用下发生病变的速殖子数和病变程度与其浓度和作用时间成正相关趋势.1.5 mg/mL 阿奇霉素对速殖子有较强的杀灭作用.作用 4 h 后接种小鼠体内未能复苏繁殖.我们在研究中发现,速殖子经药物作用后虽然其 Trupan blue 染色的着色率可达 100%,但经小鼠腹腔接种后速殖子仍可复苏繁殖.据此认为 Trypan blue 着色仅示细胞已发生病变,但不能准确区别病变的细胞与死亡初期的细胞.因此认为应用 Trypan blue 染色仅可作为初步检查比较药物杀虫效力指标,而动物接种结果及电镜观察才是可靠的指标.此一结果与吴杰等相似^[7].

应用透射电镜动态观察显示,随着阿奇霉素对速殖子作用时间的延长,发生病变的虫体增多,病变程度也加重.阿奇霉素主要作用于虫体细胞膜、线粒体、棒状体及细胞核,继而广泛损伤其它膜系统结构.文献^[8]报告弓形虫主要侵入细胞,继续在细胞内生存和繁殖,这与其含有微线体、棒状体及致密颗粒等特殊的细胞器有关.有资料表明^[9],棒状体具有分泌并释放一些蛋白质物质,改变宿主细胞膜结构,其功能可能也与虫体侵入细胞有直接关系^[10,11].本实验结果显示,阿奇霉素作用后,电镜下棒状体及致密颗粒数目减少,将直接影响弓形虫对宿主细胞的侵袭能力.由于虫体体内的子虫细胞膜发生断裂,细胞内容物外溢,将可直接影响子虫的形成及速殖子的繁殖.

本实验结果为阿奇霉素应用于抗弓形虫临床治疗提供了体外实验依据.

[参考文献]

- [1] 王崇功.弓形虫病治疗研究进展[J].中国人兽共患病杂志,1994,10(5A):134.
- [2] Chang H R, Pechere Jcf. In vitro efforts of four macrolides roxithomycin, Spiramycin, Anithromycin, and A 56268 on *Toxoplasma gondii*[J]. Antimicrob Agents chemother, 1988, 32: 524.
- [3] Araujo F G, Remihyton J S. Asithrancin: A marobide antibiotic with potent activity against *Toxoplasma gondii*[J]. Ibid, 1988, 32: 755.
- [4] 周永华,石火英,吴菁,等.阿奇霉素对小鼠体内弓形虫速殖子作用的超微电镜研究[J].归鸿,主编.江苏省动物学会 2000 年学术研讨会论文集, 2000, 4: 69—70.
- [5] 张蔚,毛棣华,周旭辉,等.弓形虫速殖子超微结构的观察[J].苏州医学院学报, 1987, 7: 285.
- [6] 徐麟鹤,王裕发,陈聚梁,等.刚地弓形虫速殖子的超微结构[J].中国寄生虫学和寄生虫病杂志, 1989, 7(2):105—107.
- [7] 吴杰,程彦斌,杨少毅,松萝酸抗弓形虫速殖子作用的体外实验和电镜观察[J].中国寄生虫学和寄生虫病杂志, 1996, 14(1): 58—62.
- [8] Mcleod R, Mack D, Brawn C. *Toxoplasma gondii*-New advances in cellular and molecular biology[J]. Exp parasitol, 1991, 72: 109.
- [9] Nichols B A, Chiappino M L, O'connor G R. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion[J]. J Ultrastr Res, 1983, 83: 85.
- [10] Sadak A, Taghy Z, Fortier B, et al. Characterization of a family of rhoptry proteoins of *Toxoplasma gondii*[J]. Mol Biochem parasitol, 1988, 29: 203.
- [11] Ossorio P N, Schwartzman J D, Boothoyd J C. A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusal charge asymmetry[J]. Mol Biochem Parasitol, 1992, 50: 1—16.

Experimental Research and Ultrastructural Study on the Killing Effect of Azithromycin on *Toxoplasma Gondii* Tachyzoite in Vitro.

Zhou Yonghua¹, Shi Huoying², Liu Yaoxing³, Wu Qing¹, Wang Chonggong¹

(1. Jiangsu Provincial Institute of Parasitic Disease, Wuxi 214064, PRC)

(2. Laboratory of Electron Microscope, Department of Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, PRC)

(3. Bureau of Animal Husbandry and Veterinary Science, Department of Agriculture, Jiangsu Provincial Government, Nanjing 210009, PRC)

Abstract :Aim :To study the anti-*Toxoplasma gondii* tachyzoite effect of Azithromycin in vitro and its mechanism. Method :After Azithromycin(final concentration 0.5 ~ 1.5 mg/mL) was added into the ascites of experimentally infected mice for 30 ~ 240 min ,the effect was observed under light microscope and transmission electron microscope. In addition ,mice were inoculated with the drug-treated tachyzoites for 4h. Results :Under the action of 1.5 mg/mL ,Azithromycin for 30 min ,the rhoptries lysed and the daughter cell membrane and membranate structures of tachyzoites appeared broken. The tachyzoites treated by 1.5 mg/mL Azithromycin for 4h could not be recovered in the inoculated mice. Conclusion :Azithromycin could kill *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. The penetration and multiplication of the tachyzoites could be inhibited by Azithromycin. The toxoplasmacidal activity of the drug has positive correlation with the concentration and time of action of Azithromycin.

Key words :azithromycin ;*Toxoplasma gondii* ;tachyzoite ;in vitro ;ultrastructure

[责任编辑 孙德泉]