

文章编号: 1003-4692(2009)01-0021-03

【论著】

家蝇幼虫抗菌肽对弓形虫速殖子 DNA 的损伤作用

于娟¹, 程璟侠², 赵瑞君¹, 饶华祥¹, 刘颜岗¹

【摘要】 目的 从家蝇幼虫血淋巴中分离纯化出有抗弓形虫作用的抗菌肽, 观察其对弓形虫速殖子 DNA 的损伤作用。方法 通过损伤加感染的方法诱导家蝇幼虫大量表达抗菌肽, 然后经过研磨、离心和层析等过程, 分离纯化并筛选出抗弓形虫作用的抗菌肽, 采用流式细胞术(FCM)分析其对弓形虫速殖子 DNA 含量的影响。结果 通过 DNA 含量直方图可以看出, 实验组的速殖子数少于对照组, 且两组分布参数存在较明显差异。正常的弓形虫速殖子处于 M1 期的较 M2 期的少, 抗菌肽组则相反, 处于 M1 期的较 M2 期的多, 且 M1 峰值明显前移。结论 家蝇幼虫血淋巴中存在抗弓形虫作用的抗菌肽, 其可通过抑制弓形虫 DNA 的合成杀伤弓形虫。

【关键词】 家蝇幼虫; 抗菌肽; 抗弓形虫; 速殖子; DNA 含量

中图分类号: R384.2

文献标识码: A

The injury of the antimicrobial peptides with anti-*Toxoplasma* activity isolated from housefly (*Musca domestica*) larvae on the DNA of *Toxoplasma gondii* YU Juan^{*}, CHENG Jing-xia, ZHAO Rui-jun, RAO Hua-xiang, LIU Yan-gang. ^{*}Institute of Medical Parasitology, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Corresponding author: ZHAO Rui-jun, E-mail: 4935186aaa2272@sina.com

【Abstract】 Objective To observe the injury of the antimicrobial peptides with anti-*Toxoplasma* activity isolated from housefly larvae on the DNA of *T. gondii* tachyzoites. **Methods** The antimicrobial peptides of housefly larvae were induced largely by infection and injury, which were isolated and purified by trituration, centrifugalization and column chromatography. Then the antimicrobial peptides with anti-*Toxoplasma* activity were sieved by methyl thiazolyl tetrazolium colorimetric method and haemacytometry. The DNA contents of *T. gondii* tachyzoites were detected by flow cytometry (FCM). **Results** From the bar chart of DNA contents, it showed that the difference of distribution between the control group and the experimental group, and tachyzoites in the experimental group were fewer than that in the control group. The tachyzoites in M1 phase were fewer than that in M2 phase in the control group, but the condition was on the contrary in the antimicrobial peptide group. Furthermore, the peak in the M1 stage had an obvious antedisplacement. **Conclusion** The antimicrobial peptide isolated from housefly larvae could kill *T. gondii* by inhibiting the synthesis of DNA.

【Key words】 Housefly larvae; Antimicrobial peptide; Anti-*Toxoplasma*; Tachyzoite; DNA content

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是一种世界性分布的细胞内寄生原虫, 人群感染率极高, 对免疫力低下的人群危害极大, 可引起人兽共患的弓形虫病。目前, 临床上抗弓形虫以化学药物为主, 但疗程长, 毒副作用大, 停药易复发, 迫切需要寻找新的抗弓形虫药物^[1]。研究发现, 家蝇(*Musca domestica*)幼虫血淋巴粗提物有杀灭弓形虫的作用^[2], 而家蝇血淋巴中起主要作用的活性物质就是抗菌肽(antimicrobial peptide,

AMP)^[3]。目前抗菌肽的纯化多采用层析方法进行, 许多种抗菌肽就是在纯化的基础上进行质谱分析后被鉴定的。本实验将采用这种方法, 筛选并纯化出抗弓形虫抗菌肽, 结合流式细胞术(FCM)探讨其对弓形虫速殖子 DNA 含量的影响, 为弓形虫病的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 家蝇幼虫 多代培养的纯种品系, 由山西省疾病预防控制中心提供。

1.1.2 菌株与虫株 大肠埃希菌(军事医学科学院微生物流行病学研究所), 用无菌生理盐水调整浓度相当于 0.5 麦氏标准单位(McFarland standard unit, 相当于 10⁸ CFU/ml); 弓形虫 RH 强毒株(北京大学医学部寄生虫学研究所提供), 本实验室液氮保存, 常规保种, 参照俞乃勋^[4]的方法将弓形虫速殖子进行分离纯化。

基金项目: 山西省高校科技研究开发项目(200613011); 山西省科技攻关项目(2006031087-04); 太原市科学技术发展计划项目(081049)

作者单位: 1 山西医科大学寄生虫学教研室(太原 030001); 2 山西省疾病预防控制中心

作者简介: 于娟(1983—), 女, 山西长治人, 硕士研究生, 从事昆虫抗弓形虫抗菌肽的筛选研究。E-mail: yujuan2006008@163.com

通信作者: 赵瑞君, E-mail: 4935186aaa2272@sina.com

1.1.3 试剂 苯甲基磺酰氟(PMSF)(美国Sigma公司);MTT(美国Sigma公司)溶于0.15 mol/L磷酸缓冲液(PBS,pH值7.4),配制成工作浓度5 mg/ml,过滤除菌,4℃避光保存。十二烷基磺酸钠(SDS)(美国Amersco公司),10 g SDS溶于100 ml双蒸水中配成10%SDS,加入1 g KCl;DMEM培养液(美国Gibco公司);胎牛血清(杭州四季青);碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)、RNase、Triton X-100(美国Sigma公司)。

1.1.4 器材 AKTA™ purifier、Resource S(1 ml)阳离子层析柱和Superdex G75 HR10/30凝胶分子筛层析柱(瑞典Amersham Pharmacia公司);ZS-2板式酶标仪(北京新风机械厂);生物显微镜BH-2型(日本Olympus公司);FD-1-50真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);流式细胞仪(FACSCalibur, B.D Corp, USA)。

1.2 方法

1.2.1 抗菌肽粗提物的制备 将3日龄家蝇幼虫间断地放在冰盘上,用蘸有大肠埃希菌液的昆虫针刺伤幼虫,然后将其放回新鲜麸皮饲料中饲养,诱导抗菌肽的产生。24 h后将幼虫置于研钵中,冰浴下1 g幼虫加入0.5 ml生理盐水(内含1 mmol/L PMSF)研磨,取匀浆液于4℃,12 000 r/min(10 786×g)离心30 min,重复2次,除去大分子杂蛋白,取上清液即为血淋巴提取物,-20℃保存备用。

1.2.2 抗菌肽的筛选和纯化 将抗菌肽粗提物依次进行阳离子柱层析和Superdex G75凝胶分子筛层析。阳离子柱层析条件为:平衡缓冲液为20 mmol/L,pH值6.0的磷酸缓冲液,洗脱液为含0.5 mol/L NaCl的磷酸缓冲液,采用梯度洗脱,流速为0.5 ml/min;Superdex G75凝胶分子筛层析条件为:采用平衡缓冲液为20 mmol/L,pH值6.0的磷酸缓冲液洗脱,流速为0.35 ml/min。测定280 nm处的紫外吸收值,收集各峰经血细胞计数法和MTT法进行抗弓形虫活性检测^[5,6],发现在保留体积分别为19和25 ml处收集的峰有抗弓形虫活性,后者活性较强,用于下步实验。

1.2.3 弓形虫速殖子DNA含量的测定 将筛选的抗菌肽进行真空冷冻干燥,用PBS重溶调整浓度为50 μg/ml,PBS作为对照组,每组设3个平行组,50 μl/组,加入500 μl浓度为2×10⁷/ml的弓形虫速殖子悬液中,置于4℃冰箱。24 h后加入4 ml PBS,1000 r/min

(111×g)离心5 min,弃上清,加入适量PBS再离心洗涤1次,用5 ml注射器注入70%冰乙醇固定,每组2 ml,防止结成团块。置于4℃冰箱固定4 h后,离心弃乙醇,PBS离心洗涤1次,加入PI染液(含PI 50 μg/ml,RNase 10 μg/ml,0.1% Triton X-100),常温避光孵育30 min后,采用FCM进行测定。

1.3 统计学分析 数据采用SPSS 11.5软件录入并分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本t检验。

2 结果

应用FCM对2组弓形虫速殖子DNA含量进行测定,通过Cellquest软件获取数据,采用Midfit软件分析得出DNA含量的直方图。从图1可以直观的看出对照组速殖子数多于实验组,两组图中均有2个集中趋势,但两组分布参数存在较明显的差异。从表1中可以看出,对照组中处于M1期的速殖子百分比为(26.57±0.89)%,实验组中为(91.89±0.67)%,实验组的M1期速殖子百分比要大于对照组,二者差异具有统计学意义($t=-102.00, P<0.01$);对照组中处于M2期的速殖子百分比为(73.47±0.89)%,实验组中为(8.35±1.08)%,实验组的M2期速殖子百分比要小于对照组,二者比较差异具有统计学意义($t=80.51, P<0.01$)。为了反映出M2期速殖子数与M1期速殖子数的关系,用M2/M1计算得出对照组中二者的值为2.77±0.12,实验组中二者的值为0.09±0.01,差异具有统计学意义($t=36.98, P<0.01$),进一步说明对照组中M2期的速殖子数较M1期要多,而在实验组中结果正好相反,停留在M1期的速殖子数较多。

由于横坐标中的道数与荧光强度成正比,而荧光

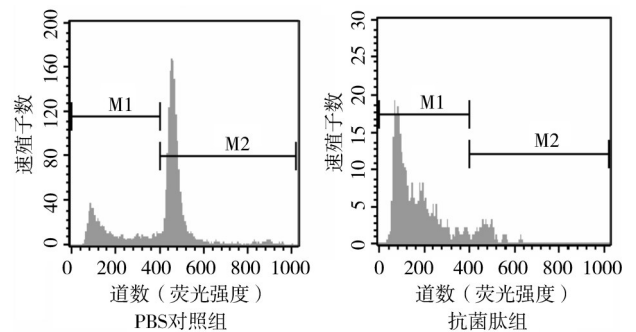


图1 弓形虫速殖子DNA含量的分布

表1 弓形虫速殖子DNA含量的分布参数

组别	速殖子数 ($\bar{x} \pm s$)			道数 ($\bar{x} \pm s$)		
	M1 (%)	M2 (%)	M2/M1	M1 (%)	M2 (%)	M2/M1
PBS对照组	26.57±0.89	73.47±0.89	2.77±0.12	176.47±1.77	477.19±7.09	2.70±0.02
抗菌肽组	91.89±0.67*	8.35±1.08*	0.09±0.01*	137.38±4.32*	463.04±11.61	3.37±0.19*

注: * $P<0.01$ 。

强度与速殖子DNA含量也成正比,因此可用道数反映速殖子的DNA含量。从表1可以看出,对照组M1期出现峰值的道数为 176.47 ± 1.77 ,在实验组中出现的道数为 137.38 ± 4.32 ,二者比较差异具有统计学意义($t=14.49, P<0.01$),说明M1峰出现了明显的前移;对照组M2期出现峰值的道数为 477.19 ± 7.09 ,在实验组中出现的道数为 463.04 ± 11.61 ,二者比较差异无统计学意义($t=1.80, P>0.05$),说明M2峰变化不明显。对照组中M2期和M1期2个时相的DNA含量比为 2.70 ± 0.02 ,实验组中二者比为 3.37 ± 0.19 ,差异也具有统计学意义($t=6.20, P<0.01$)。

3 讨论

目前,抗弓形虫药物以磺胺嘧啶、乙胺嘧啶等化学药物为主,但由于其毒副作用,难以达到彻底治愈。因而,有关弓形虫病治疗的研究成为国内外学者关注的焦点,也是迫在眉睫的问题。抗菌肽是一类小分子免疫多肽,具有多种生物学活性,研究者已发现数种具有抗弓形虫作用的抗菌肽^[7,8]。抗菌肽的纯化多采用几种层析方法的相互结合^[9],本实验在前一段研究的基础上,采用AKTA purifier层析系统,将家蝇幼虫血淋巴粗提物进行纯化。根据抗菌肽为碱性阳离子小肽,分子量多在 20×10^3 以下等特点,我们设计了阳离子柱和Superdex G75凝胶柱两步层析分离出了有抗弓形虫活性的抗菌肽,并采用FCM对其抗弓形虫作用进行了进一步探索。

FCM是一种自动分析大量群体细胞的新技术,近年来在细胞生物学领域应用十分广泛,目前也被应用于寄生虫学方面的研究。国内陈发凯和徐秉锟^[10]首先应用FCM系统对卡氏肺孢子虫包囊进行探索性研究。1995年,陈观今等^[11]应用FCM系统对RH株弓形虫速殖子的群体DNA进行分析。本实验也尝试采用FCM对弓形虫速殖子的DNA进行分析,从直方图中可以看出有2个明显的分布峰,说明弓形虫速殖子具有2个不同DNA含量的群体,也就是存在2个生物学时相。将纯化后的抗菌肽作用于弓形虫速殖子,发现其

DNA含量分别发生了明显的改变。正常的弓形虫速殖子处于M1期的较M2期的少,抗菌肽组则相反,处于M2期的较M1期的少,说明大量速殖子停留在M1期,无法进入M2期。另外,抗菌肽组速殖子M1期DNA含量比对照组显著减少,导致2个时相的DNA比例发生变化,与文献报道的一致^[12]。

弓形虫速殖子M1期DNA含量的显著减少表明其群体水平DNA含量减少,提示抗菌肽可能是通过抑制DNA的合成,引起其遗传过程的中断和生长发育异常。因此,有理由相信抗菌肽在弓形虫病的治疗方面具有非常好的应用前景。

参考文献

- [1] Derouin F, Almadany R, Chau F, et al. Synergistic activity of azithromycin and pyrimethamine or sulfadiazine in acute Experiment *Toxoplasma*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36:997.
- [2] 赵瑞君,刘成芳,董建臻,等.家蝇抗菌肽对弓形虫的抑制作用研究[J].*中国媒介生物学及控制杂志*, 2005, 16(3):189-190.
- [3] 周义文,尹一兵,涂植光,等.家蝇抗菌肽抗菌活性及抗菌机制的初步研究[J].*中国抗生素杂志*, 2004, 29(5):272-274.
- [4] 俞乃勋.制备间接血凝试验抗原用弓形虫速殖子的净化[J].*微生物学报*, 1983, 10(4):161.
- [5] 蒋艳,胡群,刘双又,等.雷公藤、盐酸小檗碱及柔红霉素在MOLT-4细胞中的药物作用及不同噻唑蓝法比较[J].*实用儿科临床杂志*, 2005, 20(7):684-685.
- [6] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].北京:世界图书出版社, 2001:181-209.
- [7] Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives[J]. *Biometals*, 2004, 17(3):189-196.
- [8] Seeber F. An enzyme - release assay for the assessment of the lytic activities of complement or antimicrobial peptides on extracellular *Toxoplasma gondii*[J]. *Microbiol Methods*, 2000, 39(3):189-196.
- [9] 屈军梅,黄庭汝,屈孝初,等.家蝇抗菌肽的分离纯化及生物学活性[J].*中国兽医学报*, 2007, 27(3):387-390.
- [10] 陈发凯,徐秉锟.卡氏肺孢子虫激光照射后的生物效应观察[J].*广东寄生虫学年报*, 1991, 11:28.
- [11] 陈观今,陈发凯,郑焕钦,等.弓形虫速殖子群体DNA含量及其形态特征测定的生物学意义[J].*中国人兽共患病杂志*, 1995, 11(1):5.
- [12] 陆绍红,林爱芬,吕庆华,等.激光照射对弓形虫速殖子作用的流式细胞分析[J].*中国寄生虫病防治杂志*, 2000, 13(3):175-177.

[收稿日期:2008-07-27]

【会讯】

LOHAS2009国际病媒生物防制科技展通知

为了促进国内外病媒生物防制产业的交流与快速发展,于2009年4月18—20日在上海国际展览中心举办国际健康生活方式博览会——病媒生物防制科技展。旨在借助2010年上海世博会平台,倡导健康可持续的生活方式,传播城市新生活理念,提高全民健康素质和水平。以技术交流、健康体验、产品展示、贸易洽谈等多样化的活动,提供全方位的舞台。

欢迎业内厂商参展参观,咨询电话:021-51873918 13761428316 黄霞小姐