

## · 基础论著 ·

# 1,6-二磷酸果糖对蓝氏贾第鞭毛虫滋养体形态学的影响

冯宪敏 鞠晓红 王月华 朱枫 藏秋雨 时文艳 卢思奇

**【摘要】 目的** 探讨1,6-二磷酸果糖对体外培养的蓝氏贾第鞭毛虫(贾第虫)滋养体形态学的影响。**方法** 按 $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 的贾第虫滋养体浓度接种于4 ml培养瓶,接种后即时(A组)或接种后4 h(B组)加入1,6-二磷酸果糖,终浓度30 ng/ $\mu\text{l}$ 。分别于药物作用后24、48、72和96 h以倒置显微镜观察虫体的贴壁情况、活力和形态变化;收集各组、各时段虫体,计数虫体滋养体浓度并绘制虫体生长曲线;同时,设立正常培养滋养体为对照组(C组)。**结果** 同C组相比,A与B组虫体在药物作用后48 h形态出现明显变化,活力下降,仅有少数贴壁;培养72 h后,无贴壁虫体,形态破坏;96 h后无活虫体。虫体生长曲线显示A与B组在药物作用后24 h虫体生长受到抑制,48 h时虫体死亡近1/2,96 h时未见活体。A与B组同C组之间比较差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** 过量1,6-二磷酸果糖可导致体外培养的贾第虫滋养体形态破坏和死亡,其机制有待于进一步研究。

**【关键词】** 蓝氏贾第鞭毛虫;1,6-二磷酸果糖;形态学

**Effect of fructose 1,6-biphosphate on morphology of Giardia lamblia trophozoites** FENG Xian-min, JU Xiao-hong, WANG Yue-hua, ZHU Feng, ZANG Qiu-yu, SHI Wei-yan, LU Si-qi. Department of Pathogen Biology, Jilin Medical College, Jilin 132013, China

Corresponding author: FENG Xian-min, Email: xianminfeng@yahoo.cn

**【Abstract】 Objective** To study the effect of fructose 1,6-biphosphate (FBP) on the morphology of Giardia lamblia trophozoites. **Methods** Fructose 1,6-diphosphate was added into each cultural tube with the final concentration of 30 ng/ $\mu\text{l}$  immediately for group A and 4 hours later for group B after the inoculation at concentration of  $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ . The adherence, activity and morphology of trophozoites were detected under the inverted microscope at 24 h, 48 h, 72 h and 96 h after drug administration, respectively. Trophozoites in each group were collected at those time points. The concentrations of trophozoites were calculated and the growth curves were constructed. Meanwhile, a group cultured normally was set as a control (group C). **Results** Compared with group C, morphology of the trophozoites changed significantly with activity and adherence of trophozoites decreasing at the time point of 48 h after exposing to FBP. No adherent trophozoites were found after 72 h. All the trophozoites died after 96 h. The growth curve showed that the growth of trophozoites was considerably depressed after 24 h exposing to FBP. Half of the trophozoites died after 48 h and no alive ones were detected after 96 h. The difference were statistically significant between group A, B and C ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Over accumulation of fructose 1,6-biphosphate can induce the morphology damage and death of Giardia lamblia trophozoites. But, further study of the mechanism should be performed.

**【Key words】** Giardia lamblia; Fructose 1,6-biphosphate (FBP); Morphology

蓝氏贾第鞭毛虫(Giardia lamblia)简称贾第虫,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.01.001

基金项目:吉林市科技局社会发展项目(201032243);吉林省教育厅十一五科技项目(2010D532);吉林医药学院大学生科研基金(吉医学科学[2009]第10号)

作者单位:132013 吉林市,吉林医药学院病原教研室(冯宪敏、鞠晓红、王月华、朱枫、藏秋雨、时文艳);首都医科大学病原生物学系(卢思奇)

通讯作者:冯宪敏,Email:xianminfeng@yahoo.cn

寄生于人体小肠,可引起以腹泻和消化不良为主要症状的蓝氏贾第鞭毛虫病(giardiasis,简称贾第虫病),是世界范围内危害人类健康的十种主要寄生虫病之一<sup>[1]</sup>,也是目前发现的重要机会性致病病原体。免疫力低下的个体,如免疫抑制剂应用患者、先天或后天获得性免疫功能缺陷者、儿童和老人等均易感,贾第虫病往往威胁此类人群的生命<sup>[2]</sup>。目前,临床上治疗该病的首选药物是甲硝唑<sup>[3]</sup>,该药虽有较好的疗效,但存在显著的不良反应,最常见的是胃肠道

反应,严重者可出现消化道大出血。由于甲硝唑可引起胎儿畸形,故孕期禁用<sup>[4]</sup>,因而极大限制了甲硝唑在本病治疗中的应用。迄今,关于抗贾第虫新药的研发仍是研究的热点问题。

1,6-二磷酸果糖(1,6-biphosphate,FBP)是糖酵解途径重要的中间产物。在贾第虫糖酵解过程中,1,6-二磷酸果糖的生成是以 PPi 作为磷酸基团的供体,由焦磷酸依赖的磷酸果糖激酶 2(pyrophosphate-depend phosphofructokinase, PFP) 所催化。1,6-二磷酸果糖和 PPi 对该反应具有抑制作用,使反应向相反的方向进行<sup>[5-6]</sup>。由于贾第虫的能量代谢主要依赖糖酵解途径,过剩的 1,6-二磷酸果糖必将干扰糖的代谢。

本研究选用 1,6-二磷酸果糖作为抗贾第虫的药物,探讨其对体外培养的贾第虫滋养体形态破坏和杀伤作用,现将研究结果报道如下。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 蓝氏贾第鞭毛虫虫株:种株(C2)由首都医科大学寄生虫学教研室提供,由本室液氮保存。实验前将虫体复苏,用改良 TY1-S-33 培养基培养、传代。

2. 主要试剂与仪器:1,6-二磷酸果糖冻干粉由意大利福斯卡玛生化制药公司生产,购自吉林市吉林大药房。37℃ 恒温箱购自北京六一仪器厂;倒置显微镜为德国莱卡公司产品(Leica DMIL)。

### 二、方法

1. 药物浓度:在未改变培养液渗透压的情况下,药物终浓度选用 30 ng/μl。

2. 虫体密度与药物作用时间:冰浴使培养至对数期的虫体脱壁,计数并按  $0.5 \times 10^6/\text{ml}$  的浓度接种于 4 ml 的小培养瓶中,共 8 瓶。随机分为 A 和 B 两组,每组 4 瓶。A 组在接种后即刻加入药物,B 组于接种后 4 h 加入药物;同时设立正常培养滋养体对照组(C 组)。

3. 药物作用观察:分别于药物作用后 24 h、48 h、72 h 和 96 h,随机从两组中各取 1 管虫体,倒置显微镜观察虫体的贴壁情况、活力和形态改变。冰浴使其脱壁,计数并绘制虫体生长曲线。

### 三、统计学处理

采用 SPSS 10.0 对实验所得数据进行方差分析,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、虫体贴壁、活力和形态改变

药物作用后 24 h 虫体生长状况良好,与对照组

相比无显著差异。培养 48 h 后虫体形态出现显著变化,运动明显迟缓、无力,活力下降,仅有少数贴壁,且形态不典型;培养 72 h 后,虫体脱壁,聚集在瓶体下部,偶见在原地颤动虫体,虫体破碎;96 h 后无活虫体。A 与 B 组各时间段的虫体活力、贴壁情况和形态改变比较差异无统计学意义(图 1)。

### 二、虫体生长曲线

分别于药物作用后 24 h、48 h、72 h 和 96 h 收集虫体,计数并绘制虫体生长曲线(图 2)。培养 48 h 后 C 组虫体浓度达  $(0.99 \pm 0.10) \times 10^6/\text{ml}$ ,72 h 生长达到峰值  $(1.30 \pm 0.10) \times 10^6/\text{ml}$ 。同 C 组相比,A 与 B 组各时段虫体生长均受到明显抑制,药物作用后 24 h,A 与 B 组虫体浓度分别下降至  $(0.50 \pm 0.18) \times 10^6/\text{ml}$  和  $(0.40 \pm 0.05) \times 10^6/\text{ml}$ 。48 h 虫体死亡近 1/2 [A 组:  $(0.23 \pm 0.06) \times 10^6/\text{ml}$ ,B 组:  $(0.24 \pm 0.14) \times 10^6/\text{ml}$ ],96 h 未见活体。A、B 两组同 C 组相比,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );A、B 两组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 讨 论

贾第虫是一种厌氧的真核生物,主要以糖酵解途径获取能量。1,6-二磷酸果糖是贾第虫糖酵解过程的重要中间产物。其生成以 PPi 作为磷酸基团的供体,由 PFP 所催化<sup>[7]</sup>。与高等的真核生物不同,该反应是可逆的<sup>[5-6]</sup>。

贾第虫滋养体主要寄生于人和其他哺乳动物的小肠。小肠的渗透压环境极其复杂,虫体维持形态稳定性的机制尚不清楚。其中酸性钙离子学说将虫体渗透压的调节能力归结为酸性钙离子体内多聚磷酸的水解和合成<sup>[8]</sup>。当体内多聚磷酸浓度降低时,虫体应对渗透压应激的能力下降,而多聚磷酸的转运与钙离子和 PPi 的浓度密切相关<sup>[9]</sup>。

本研究选用 1,6-二磷酸果糖作为抗贾第虫的药物,结果表明体内过量的 1,6-二磷酸果糖可导致虫体形态破坏和死亡。如前所述,在贾第虫糖酵解过程中,1,6-二磷酸果糖的生成是可逆的。过量 1,6-二磷酸果糖导致虫体内渗透压增高的同时,使反应向相反方向进行,导致虫体内 PPi 积聚,从而使葡萄糖代谢异常;同时 1,6-二磷酸果糖可以与钙离子结合,抑制钙离子的转运,导致虫体内多聚磷酸的合成和转运障碍,虫体渗透平衡被打破,致使虫体形态改变进而死亡。

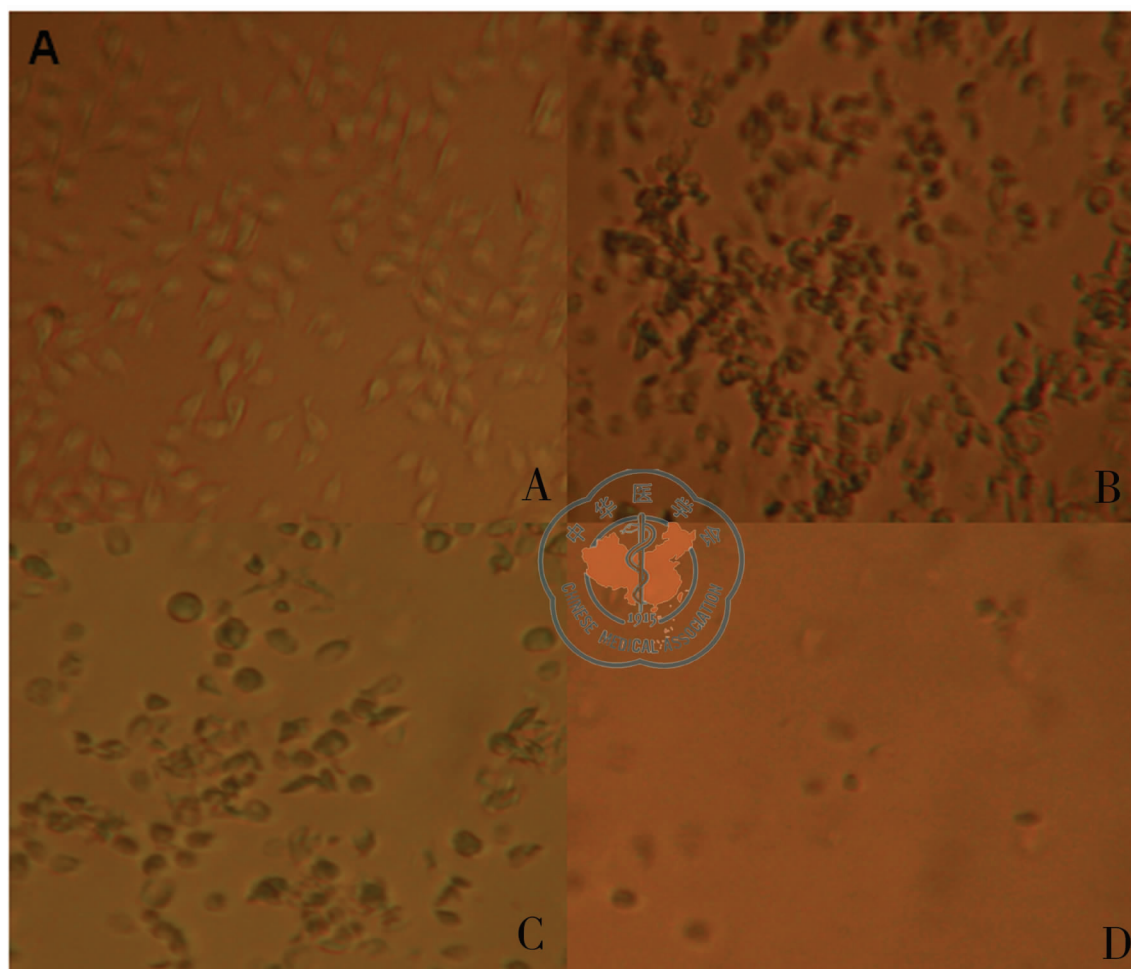


图 1 1,6-二磷酸果糖作用后虫体贴壁和形态学改变(×2000)  
注:A:药物作用前;B:药物作用 24 h;C:药物作用 48 h;D:药物作用 72 h

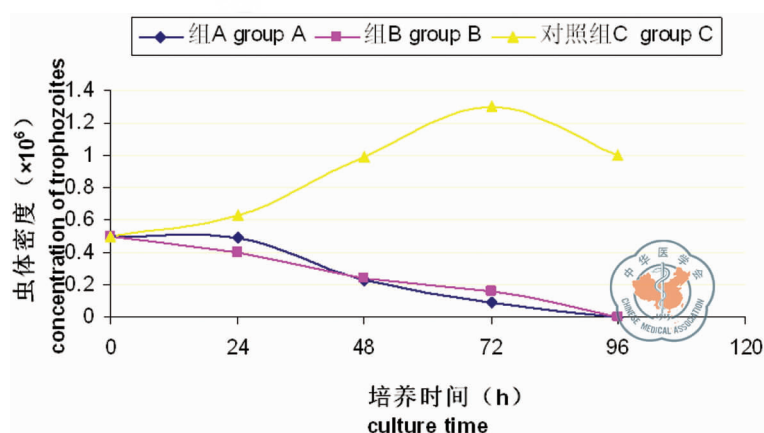


图 2 1,6-二磷酸果糖作用后蓝氏贾第鞭毛虫生长曲线



此外,为了明确药物对虫体贴壁的影响,本研究设立了实验组 A 和实验组 B,分别在接种后即时和 4 h 后加入 1,6-二磷酸果糖。结果显示两组虫体在药物作用后 24 h 均贴壁良好,表明此作用时间内药物对虫体的贴壁无直接影响。

综上,1,6-二磷酸果糖对贾第虫滋养体的形态具有破坏作用,可导致虫体死亡。其可能机制包括虫体渗透压的增高和渗透压调节机制被破坏,尚有待于进一步的研究。

### 参 考 文 献

- 1 Boontanom P, Mungthin M, Tan-Ariya P, et al. Epidemiology of giardiasis and genotypic characterization of *Giardia duodenalis* in preschool children of a rural community, central Thailand. *Trop Biomed*, 2011, 28(1):32-39.
- 2 Lono A, Kumar S, Chye TT. Detection of microsporidia in local HIV-positive population in Malaysia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2011. [Epub ahead of print].
- 3 Kiser JD, Paulson CP, Brown C. Clinical inquiries: What's the most effective treatment for giardiasis. *J Fam Pract*, 2008, 57(4): 270-272.
- 4 徐春玲. 甲硝唑临床应用中的不良反应. *中华医药指南*, 2008, 6(16):500-589.
- 5 Galkin A, Kulakova L, Melamud E, et al. Characterization, kinetics, and crystal structures of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from the human parasite, *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*, 2007, 282(7):4859-4867.
- 6 Li Z, Phillips NF. Involvement and identification of a lysine in the PPI-site of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from *Giardia lamblia*. *Biochimie*, 1997, 79(4):221-227.
- 7 Li Z, Phillips NF. Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from *Giardia lamblia*: purification and characterization. *Protein Expr Purif*, 1995, 6(3):319-328.
- 8 Docampo R, Moreno SN. Acidocalcisomes. *Cell Calcium*, 2011, 50(2):113-119.
- 9 Rohloff P, Miranda K, Rodrigues JC, et al. Calcium uptake and proton transport by acidocalcisomes of *Toxoplasma gondii*. *PLoS One*, 2011, 6(4):e18390.

(收稿日期:2011-05-10)

(本文编辑:孙荣华)

冯宪敏,鞠晓红,王月华,等. 1,6-二磷酸果糖对蓝氏贾第鞭毛虫滋养体形态学的影响[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2012, 6(1):1-4.