



使君子提取物体外抗蓝氏贾第鞭毛虫效果的研究

曹晓琴,童 杨,方振峰,施 璐,房 辉,刘骥才*

(江汉大学 医学院,武汉 430056)

中图分类号:S855.9*9;S853.72

文献标识码:A

文章编号:1004-7034(2023)09-0110-07

摘 要:为了观察中药使君子提取物体外抗蓝氏贾第鞭毛虫(简称贾第虫)的作用效果,试验分别采用乙醇和去离子水对使君子进行提取,得到使君子醇提物和使君子水提物,设置使君子醇提物组、使君子水提物组、甲硝唑对照组(3组各分别设置0.312 5,0.625,1.25,2.5,5 mg/mL 5个药物浓度)及空白对照组(TYI-S-33培养基),分别在37℃厌氧培养滋养体浓度为 $8.0 \times 10^5 \sim 4.2 \times 10^6$ 个/mL的贾第虫24 h,收集贴壁虫体,计算半数抑制浓度(IC₅₀);用IC₅₀的使君子醇提物、使君子水提物和甲硝唑分别作用于贾第虫,依次培养0,2,4,6,8,12,24 h,同时设空白对照,计算出药物达IC₅₀的最短作用时间;对作用时间分别为6 h和12 h的使君子醇提物组和空白对照组进行倒置光学显微镜、扫描电镜和透射电镜下观察,分析使君子醇提物对贾第虫滋养体超微形态结构的影响。结果表明:三种药液对贾第虫均有一定的抑制作用。使君子醇提物、使君子水提物和甲硝唑的IC₅₀分别为1.060,8.145,0.325 mg/mL,达IC₅₀的最短时间分别为5.28 h、5.95 h和3.85 h。IC₅₀浓度下,培养6 h及以上时,使君子醇提物组与甲硝唑对照组虫体浓度差异不显著($P>0.05$),而使君子水提物组虫体浓度均显著高于甲硝唑对照组($P<0.05$)。使君子醇提物作用6 h后滋养体虫体变形,鞭毛受损;作用12 h后引起细胞膜破裂,细胞内容物外溢,吸盘微管部分结构崩解,滋养体开始死亡。说明使君子具有抑制贾第虫生长的作用,且醇提物比水提物抑制效果更强,呈浓度依赖性。IC₅₀浓度的使君子醇提物与甲硝唑对虫体抑制效果相当。

关键词:蓝氏贾第鞭毛虫;使君子醇提物;使君子水提物;生长抑制;形态结构

蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia intestinalis*)简称贾第虫(*Giardia*),通过虫体腹部吸盘吸附寄生于人体小肠,可引起以腹泻为主要症状的贾第虫病。贾第虫是危害人类健康的十种主要寄生虫之一^[1],且可以在人和伴侣动物之间传播。

贾第虫是一种重要的人兽共患寄生虫^[2],伴侣动物是人类感染肠贾第虫的潜在来源。人类大量饲养、亲密接触的动物中,如黄牛^[3]、奶牛^[4]、牦牛^[5]、猪^[6]和羊^[7]等农场动物^[8]和狗^[9]、猫^[10]等家养宠物都可感染贾第虫,引起人畜共患病,造成经济损失,损害人体健康。

目前,临床上治疗该病的药物大多为甲硝唑、替硝唑、阿苯达唑等苯并咪唑类药物^[11-12],这些药物虽有较好的抗贾第虫作用,但长期使用易产生耐药性,且临床应用中存在许多已知的显著不良反应^[13-14],因此迫切需要寻找低毒有效的抗贾第虫药物。

中药材中用于抗贾第虫的药物较少,现有确切数据证明有效的中药材有苦参^[15-16]、青蒿素^[17]和蛇床子^[18-19]等。使君子又名留求子、索子果,为使君子科使君子属植物使君子的干燥成熟果实^[20-21],主产于热带及亚热带地区,民间许多治疗寄生虫病的复方药剂中多含有此种药物,且中药典籍中也记录其味甘、性温,有杀虫消积、健脾等功能^[22]。现有研究结果表明,使君子在治疗人和动物的蛔虫病、阴道毛滴虫病^[23-24]等寄生虫病方面具有较好的作用,杀虫率较高,且没有产生使人类和动物难以承受的不可逆性损害的报道。因此,本研究探究了使君子醇提物和水提物在体外对贾第虫的抑制效果,以期筛选治疗贾第虫病的中药材提供依据。

1 材料

1.1 虫体、药物

贾第虫,由江汉大学病原微生物教研室提供,液氮保存。使君子,由天济药业有限公司生产;0.5%甲硝唑注射液,由武汉滨湖双鹤药业有限责任公司提供。

1.2 主要仪器

倒置光学显微镜(型号为奥林巴斯 CKX31)、超高分辨冷场扫描电子显微镜(型号为SU8010,简称扫

收稿日期:2022-07-12;修回日期:2023-02-28

作者简介:曹晓琴(1982—),女,副教授,博士,研究方向为药物分析及食品安全检测,caoxiaoqin012@jhun.edu.cn.

*通信作者:刘骥才(1989—),男,讲师,硕士,研究方向为中药活性成分,315379839@qq.com.



描电镜)和透射电子显微镜(型号为 HT7700 EXALENS),均由日本日立公司生产;旋转蒸发仪,购自上海申生科技有限公司。

1.3 主要试剂

TYI-S-33 培养基配制试剂,由上海源叶生物科技有限公司提供;酵母提取物、L-半胱氨酸盐酸盐、血清,均由默克生命科学技术(南通)有限公司提供;葡萄糖、柠檬酸铁胺,均由上海麦克林生化科技有限公司提供;维生素 C,由阿拉丁试剂(上海)有限公司提供;牛胆汁粉末、199 液体,由上海泽叶生物科技有限公司提供;Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、戊二醛、醋酸异戊酯和乙醇等(分析纯),均由国药集团化学试剂有限公司提供。

2 方法

2.1 贾第虫滋养体的培养

从液氮罐中取出含有贾第虫的培养管,用配制好的新鲜的含 15% 血清的 TYI-S-33 培养基(参照参考文献[25]配制)进行复苏,37℃ 无菌培养 24 h 后传代,当倒置光学显微镜下培养瓶瓶壁上的贾第虫生长至对数期后,使用血细胞计数板调整滋养体浓度为 $8.0 \times 10^5 \sim 4.2 \times 10^6$ 个/mL,备用。

2.2 使君子醇提物和水提物的制备

将中药材使君子粉碎,取粉末 25 g 溶于 50% 乙醇溶液中,60℃ 水浴回流提取 3 h,得使君子乙醇提取液,然后用抽滤瓶除去滤渣,将所得溶液置于旋转蒸发瓶中,旋转蒸干除去乙醇溶液,得到浸膏。以上步骤重复 3 次,合并浸膏,得到使君子醇提物。

将中药材使君子粉碎,取粉末 25 g 溶于去离子水并用电炉加热至沸腾,调至微沸后加热 3 h,得使君子水提液,然后用抽滤瓶除去滤渣,将所得溶液置于旋转蒸发仪中,旋蒸除去溶剂,得到浸膏。以上步骤重复 3 次,合并浸膏,得到使君子水提物。

2.3 不同浓度药液对贾第虫滋养体的生长抑制作用

设使君子水提物组、使君子醇提物组、甲硝唑对照组,每组取相应使君子水提物、使君子醇提物、甲硝唑注射液适量,用改良的含 10% 血清的 TYI-S-33 培养基稀释得到 5 个浓度(0.312 5, 0.625, 1.25, 2.5, 5 mg/mL)。预试验结果表明,乙醇对贾第虫没有明显抑制作用,因此用 TYI-S-33 培养基作为空白对照。

将 2.1 中所得的贾第虫滋养体分别加入到不同浓度的使君子醇提物组、使君子水提物组、甲硝唑对照组和空白对照组中,37℃ 培养 24 h。培养结束后,将培养瓶竖直放置半小时左右沉淀已干瘪的虫体;弃去沉淀,再加入新的培养基至瓶满,冰浴 20 min;用手滚搓培养瓶,使贴壁虫体脱落下来,收集虫体,在血细胞计数板上计数。依照刘畅^[19]方法判断贾第虫虫体活力:在倒置光学显微镜 400× 下观察,在 10 s 内贾第

虫滋养体频繁活动且腹鞭毛有摆动则视为有活力。采用抑制率^[26]评价不同药物对贾第虫滋养体的生长抑制情况,每个浓度重复 3 次,计算抑制率,公式为抑制率(%)=(1-药物处理组活虫体数/空白对照组活虫体数)×100%。用 SPSS 22.0 软件的“probit 分析”计算药物对贾第虫的半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.4 药液 IC₅₀ 浓度下不同作用时间对贾第虫滋养体生长抑制作用的观察

分别取使君子醇提物组、使君子水提物组、甲硝唑对照组的培养基稀释液,加入到贾第虫滋养体为 8.2×10^5 个/mL 的液体中,使各组药液终浓度为 2.3 所计算的 IC₅₀,同时设空白对照组,37℃ 恒温培养 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h(每个时间点 2 个重复),参照 2.3 方法处理虫体,用血细胞计数板计数,分别计算 IC₅₀ 下药液不同作用时间对贾第虫滋养体的抑制率,计算出药液达 IC₅₀ 的最短作用时间。以上试验重复 3 次。

2.5 贾第虫滋养体超微形态结构的观察

根据 2.3 和 2.4 结果,设置使君子醇提物组和空白对照组进行超微形态的对比观察。使君子醇提物组中使君子醇提物的浓度为 IC₅₀。两组分别在 37℃ 恒温培养箱中培养 6 h(抑制率≈50%)和 12 h(抑制率≈90%),参照 2.3 方法处理虫体,收集虫体放入 15 mL 离心管中,3 000×g 离心 10 min;弃去上清液,保留沉淀(有活力虫体),备用。

取上述各组沉淀,用 TYI-S-33 培养基稀释,分别置倒置光学显微镜下,调整视野,观察 100× 和 400× 时虫体形态结构变化。

取上述各组沉淀,用 37℃ 预热的 PBS 清洗 2 次,然后在沉淀中加入 2.5% 戊二醛固定液 1 mL,采用 A. Mattos 等^[27]和 Chen L. F. 等^[28]方法制备样品,分别置于扫描电镜和透射电子显微镜下观察各时间点的贾第虫滋养体超微结构。

2.6 数据的统计分析

用 Graphpad 8.0 制图软件作图。试验数据均以“平均值±标准差”表示,采用独立样本 *t* 检验进行两组间比较,*P*<0.05 表示差异显著,*P*>0.05 表示差异不显著。

3 结果与分析

3.1 不同浓度药液对贾第虫滋养体生长的影响

结果见表 1。

当使君子水提物组浓度为 1.25~5 mg/mL,使君子醇提物组浓度为 0.312 5~5 mg/mL,甲硝唑对照组浓度为 0.312 5~5 mg/mL 时,抑制率随药物浓度增大而增加,且贾第虫滋养体浓度与空白对照组相比差异显著(*P*<0.05)。与空白对照组相比,使君子醇提物组、使君子水提物组和甲硝唑对照组贾第虫滋养体均受到不同程度的抑制,且相同浓度使君子醇提物比使君子水提物对贾第虫滋养体的生长抑制作用更强。



表1 贾第虫滋养体抑制率的测定结果
Table 1 Determination results of *Giardia trophozoites*
inhibition rate

组别	药液浓度/ (mg · mL ⁻¹)	贾第虫滋养体浓度/ (×10 ⁶ 个 · mL ⁻¹)	抑制率/%
使君子水提物组	0.312 5	11.47 ±3.76	10.00 ±3.52
	0.625	9.78 ±2.75	23.33 ±2.67
	1.25	9.34* ±3.91	26.67 ±3.45
	2.5	8.07* ±2.87	36.67 ±4.21
	5	6.98* ±5.44	40.00 ±3.98
使君子醇提物组	0.312 5	7.53* ±2.91	39.28 ±2.78
	0.625	6.69* ±1.81	44.64 ±3.47
	1.25	5.83* ±2.73	53.57 ±3.47
	2.5	5.65* ±1.81	55.36 ±2.67
	5	4.53* ±1.41	64.28 ±4.82
甲硝唑对照组	0.312 5	6.61* ±2.21	47.37 ±3.45
	0.625	2.01* ±3.47	84.21 ±4.89
	1.25	1.66* ±1.58	89.47 ±5.21
	2.5	0.21* ±2.66	99.87 ±5.28
	5	0.19* ±1.42	99.98 ±4.75
空白对照组	0	12.75 ±4.82	—

注:与空白对照组相比,数据未标*表示差异不显著($P>0.05$),肩标*表示差异显著($P<0.05$)。

当药液浓度均为1.25 mg/mL时,使君子醇提物组的抑制率为(53.57±3.47)%,而使君子水提物组的抑制率仅为(26.67±3.45)%。甲硝唑对照组的生长抑制作用最强,当浓度为0.312 5 mg/mL时,抑制率为(47.37±3.45)%;当浓度为1.25 mg/mL时,抑制率高达(89.47±5.21)%。采用独立样本 t 检验对使君子醇提物组抑制率(浓度为0.625 mg/mL)与甲硝唑对照组

(浓度为0.312 5 mg/mL)进行比较,发现两者抑制率差异不显著($t=-0.987$, $P>0.05$),说明使君子醇提物0.625 mg/mL与甲硝唑0.312 5 mg/mL对虫体抑制率等效,但甲硝唑的作用效果优于使君子醇提物。

用SPSS 22.0软件计算药物对贾第虫滋养体的 IC_{50} 值:使君子水提物、使君子醇提物和甲硝唑对贾第虫滋养体的 IC_{50} 分别为8.145,1.060,0.325 mg/mL。

3.2 药液作用时间对贾第虫生长的影响

在甲硝唑对照组 IC_{50} 为0.325 mg/mL、使君子醇提物 IC_{50} 为1.060 mg/mL和使君子水提物 IC_{50} 为8.145 mg/mL下,分别观察不同作用时间时贾第虫滋养体的生长抑制率,同时设空白对照组,结果(见表2)空白对照组虫体贴壁生长旺盛,随着培养时间的延长,虫体逐渐增多。2小时时,使君子醇提物组和甲硝唑对照组开始出现空泡,抑制率分别为(31.25±3.45)%和(43.57±2.98)%,且两组虫体浓度与空白对照组相比均差异显著($P<0.05$);而使君子水提物组虫体无明显变化,抑制率仅为(10.34±2.62)%,贾第虫滋养体与空白对照组差异不显著($P>0.05$)。4小时时,使君子醇提物组虫体胞质开始溶解,只有鞭毛微微摆动,而甲硝唑对照组虫体已经不能运动,甲硝唑对照组抑制率为(51.58±5.34)%,且贾第虫滋养体浓度与空白对照组相比差异显著($P<0.05$)。使君子醇提物和水提物分别在6 h后对贾第虫抑制率超过50.00%。当作用12 h及以后,3个药液组的虫体大部分内容物耗空,虫体变得扁平,最终死亡。可见,不同药液对贾第虫滋养体的生长均具有明显抑制作用,且随着作用时间的延长,抑制作用也逐渐增强。

表2 不同作用时间各组药液对贾第虫滋养体抑制率影响的测定结果($n=3$)
Table 2 Determination results of effects of different drug solutions on inhibition rates of *Giardia* at different
treatment time ($n=3$)

作用时间	空白对照组	使君子水提物组		使君子醇提物组		甲硝唑对照组	
	滋养体浓度/ (×10 ⁶ 个 · mL ⁻¹)	滋养体浓度/ (×10 ⁶ 个 · mL ⁻¹)	抑制率/ %	滋养体浓度/ (×10 ⁶ 个 · mL ⁻¹)	抑制率/ %	滋养体浓度/ (×10 ⁶ 个 · mL ⁻¹)	抑制率/ %
2 h	8.83 ±4.77	7.92* ±3.41	10.34 ±2.62	6.07*# ±2.15	31.25 ±3.45	4.98* ±2.73	43.57 ±2.98
4 h	9.67 ±2.54	6.26*# ±2.83	35.27 ±3.41	5.38*# ±3.32	44.38 ±4.66	4.68* ±3.45	51.58 ±5.34
6 h	10.57 ±3.58	4.67*# ±5.16	55.81 ±4.34	4.04* ±4.20	61.78 ±4.46	3.44* ±4.28	67.45 ±5.23
8 h	11.22 ±4.36	4.34*# ±2.84	61.32 ±4.67	2.88* ±3.71	74.29 ±5.67	1.46* ±3.72	86.97 ±4.23
12 h	12.02 ±3.54	3.29*# ±2.59	73.15 ±3.78	1.63* ±2.73	86.41 ±3.78	0.99* ±2.57	91.71 ±2.97
24 h	12.96 ±3.21	1.99*# ±3.76	84.65 ±3.89	0.75* ±2.69	94.25 ±3.89	0.14* ±3.18	98.87 ±4.77

注:与空白对照组相比,数据未标*表示差异不显著($P>0.05$),肩标*表示差异显著($P<0.05$);与甲硝唑对照组相比,数据未标#表示差异不显著($P>0.05$),肩标#表示差异显著($P<0.05$)。

采用独立样本 t 检验对甲硝唑对照组与使君子对提物组和使君子醇提物组的滋养体浓度进行比较,发现作用6 h后使君子醇提物组与甲硝唑对照组贾第虫滋养体浓度差异不显著($t=-0.435$, $P>0.05$),

而使君子水提物组与甲硝唑对照组差异显著($t=-11.032$, $P<0.05$),说明 IC_{50} 下使君子醇提物与甲硝唑对虫体抑制效果相当,甲硝唑的作用效果显著优于使君子水提物。

IC₅₀ 下,甲硝唑达 50% 抑制率的最短时间为 3.85 h,使君子水提物为 5.95 h,使君子醇提物为 5.28 h。

3.3 药物作用对贾第虫滋养体超微形态结构的影响
倒置光学显微镜观察结果见图 1。
100×倒置光学显微镜视野下,空白对照组虫体

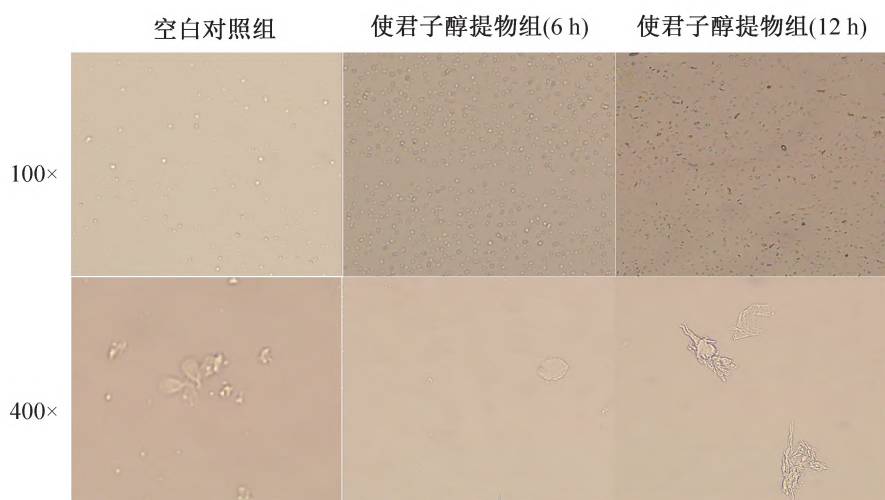


图 1 空白对照组和使君子醇提物组(IC₅₀)贾第虫滋养体倒置光学显微镜观察结果

Fig. 1 Results of inverted light microscopic observation of *Giardia* trophozoites in the blank control group and in the *Combretum indicum* alcohol extracts group (IC₅₀)

饱满椭圆状,虫体透亮,400×视野下可看到完整的半切梨状;使君子醇提物组培养不同时间后,虫体可观察到不同程度的损伤。当培养 6 小时,在 100×视野下可见一半以上贾第虫虫体暗沉;400×视野下可见虫体变圆瘪塌,中部内陷且皱缩。当培养 12 小时

时,100×视野内绝大多数贾第虫虫体死亡,几乎看不到透亮的虫体;400×视野下观察到“畸形”滋养体,无法看到完整的虫体形态。

扫描电镜观察结果见图 2。

空白对照组的贾第虫滋养体虫体呈半切倒置的

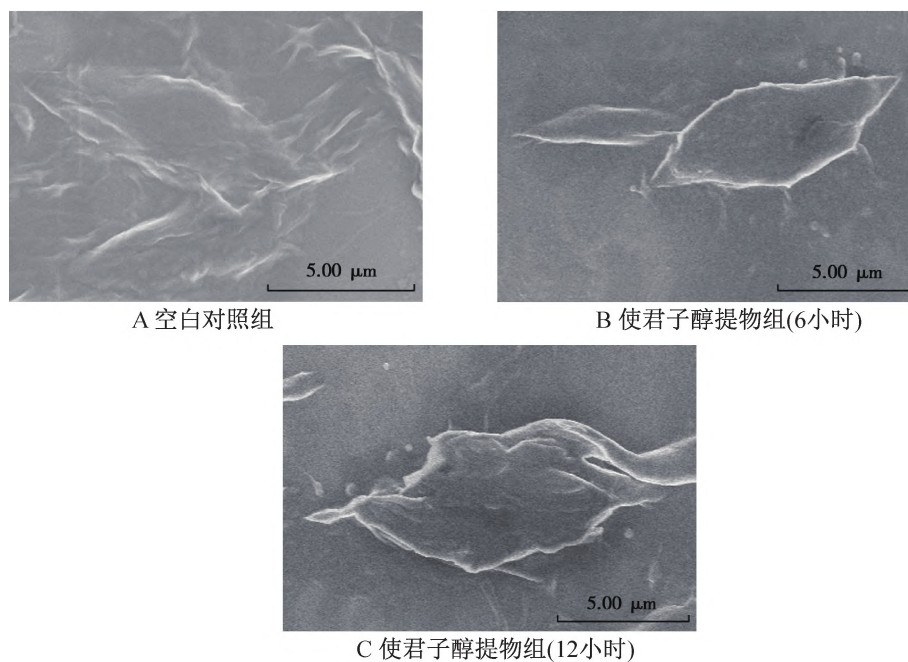


图 2 空白对照组和使君子醇提物组(IC₅₀)贾第虫滋养体扫描电镜观察结果

Fig. 2 Results of scanning electron microscopic observation of *Giardia* trophozoites in the blank control group and in the *Combretum indicum* alcohol extracts group (IC₅₀)

梨形,形态饱满,结构完整,两侧呈现出对称性,前部呈圆形,后部较尖,腹面扁平有两个吸盘,背面突起,

鞭毛清晰可见,体中部有两个细长的中体。当培养6小时时,贾第虫滋养体变形,表面凹凸不平,鞭毛受损严重,贾第虫滋养体已停止分裂,出现畸形;当培养12小时时,细胞膜破裂,出现多个裂口,虫体内容物溶解,导致结构改变,失去支撑变扁平,最终致内容物耗空而死亡。

透射电子显微镜观察结果表明:空白对照组滋养体核膜完整;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,微管结构清晰可见。见图3A。经使君子醇提取物处理后的贾第虫滋养体虫体见图3B和图3C,当培养6小时时,贾第虫滋养体结构出现变形,一部分鞭毛受损,贾第虫滋养体虫体细胞膜边缘不整齐;当培养12小时时,胞质内容物稀疏,导致细胞内容物外溢,细胞失去支撑而变得扁平,空泡化严重,吸盘微管部分结构崩解,细胞核畸形。

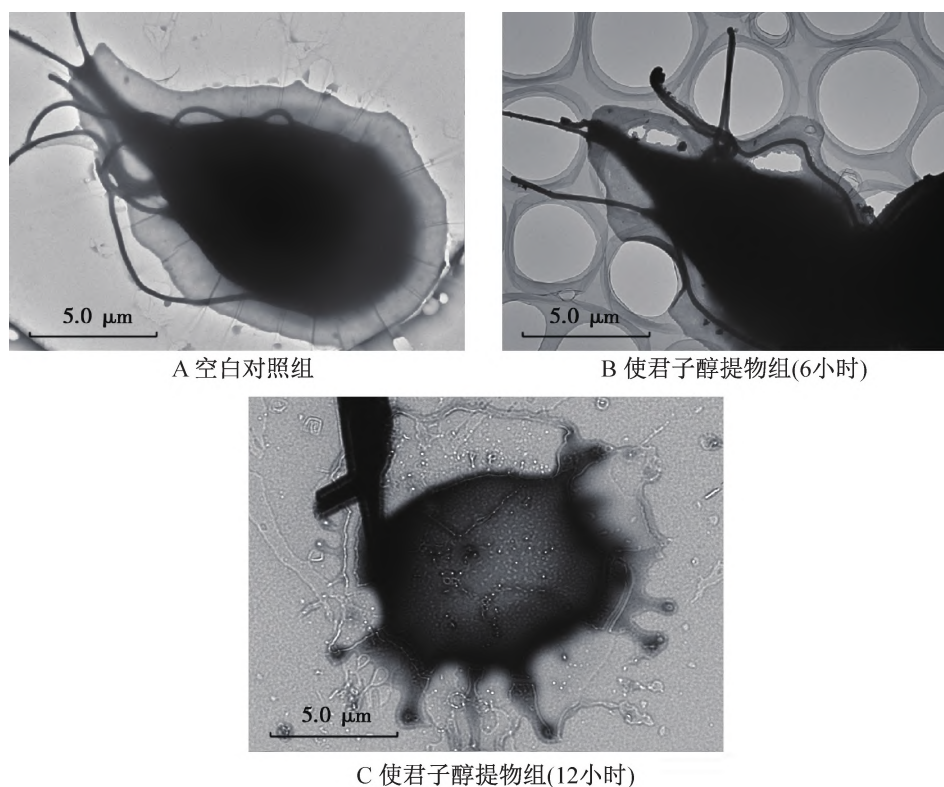


图3 空白对照组和使君子醇提取物组(IC_{50})贾第虫滋养体透射电子显微镜观察结果

Fig. 3 Results of transmission electron microscopic observation of *Giardia* trophozoites in the blank control group and in the *Combretum indicum* alcohol extracts group (IC_{50})

通过倒置光学显微镜、扫描电镜和透射电子显微镜观察结果表明,贾第虫滋养体经使君子醇提取物作用后,虫体形态和内部结构均受到破坏。

4 讨论

贾第虫作为一种细胞结构和进化地位都非常特殊的生物,能够广泛寄生于各种哺乳动物的小肠中^[3-8],但在贾第虫病防治方面,还缺乏十分有效的长效防治药物。

本研究结果表明,使君子醇提取物比使君子水提取物对贾第虫的生长抑制作用更强,当使君子醇提取物和使君子水提取物给药浓度均为5 mg/mL时,使君子醇提取物的抑制率达 $(64.28 \pm 4.82)\%$,而使君子水提取物抑制率仅为 $(40.00 \pm 3.98)\%$,该浓度下经使君子醇提取物和使君子水提取物处理的滋养体浓度与空白对照组比较均差异显著。使君子水提取物对贾第虫的 IC_{50} 为8.145 mg/mL,使君子醇提取物为1.060 mg/mL,可见

使君子醇提取物抗贾第虫作用优于使君子水提取物。吴玲清等^[15]研究了苦参总黄酮、苦参总生物碱和苦参乙醇提取物体外抗贾第虫的效果,结果发现3种药物均有不同程度的抗贾第虫作用,但以乙醇提取物的作用效果最强。

本研究结果表明,0.625 mg/mL使君子醇提取物与0.312 5 mg/mL甲硝唑对虫体抑制效果相当。说明在相同浓度下,甲硝唑的作用效果优于使君子醇提取物,但使君子醇提取物与甲硝唑在各自的 IC_{50} 下对虫体的抑制效果相当。甲硝唑的抑制效果明显优于使君子水提取物。虽然甲硝唑疗效较佳,但易对服用此药的患者造成不可逆性的生理功能损害^[13-14],对婴幼儿、胎儿影响尤为强烈^[29],且在治疗剂量下长期使用,会改变贾第虫的基因表达,从而使贾第虫对甲硝唑产生耐药性^[14]。使君子是我国治疗寄生虫病的复方中药制剂中的常用药物^[20-21]。据记载,使君子的

毒性反应主要为胃肠道刺激及过敏性紫癜,不良反应少,患者可承受且反应均可逆^[20]。现有研究结果表明,使君子具有驱除蛔虫、蛲虫、绦虫、钩虫等常见寄生虫的作用,其中驱蛔虫作用最为可靠,且对耐西药的患者也有效^[24]。兽医上也常用使君子单药或与其他药物配伍对牲畜进行驱虫,治疗效果明显,且尚无治疗后动物致畸、致残或死亡事件发生^[30]。因此,使君子可以作为潜在的治疗寄生虫病的药物。

本研究结果表明,IC₅₀使君子醇提物作用6小时时,虫体结构均被不同程度破坏。扫描电镜结果表明,使君子醇提物可造成贾第虫腹吸盘表面细胞膜破裂,滋养体停止分裂,变圆,内容物外渗,与赵春燕^[25]利用茴香霉素处理贾第虫后的虫体腹吸盘的病变类似。透射电子显微镜观察结果表明,使君子醇提物可造成虫体胞质内大面积空泡化,细胞核畸形,边缘呈锯齿状及吸盘微管部分结构崩解等,表明虫体在结构上严重受损,与刘畅^[19]利用蛇床子素处理贾第虫后的结果一致。上述研究结果为研究使君子醇提物体外抗贾第虫的杀虫机制提供了依据。

5 结论

本研究发现,不同浓度的使君子醇提物和使君子水提物均对贾第虫的生长有一定的抑制作用,且使君子醇提物对贾第虫的抑制作用明显优于水提物,同时随着药液浓度的增加,生长抑制作用越明显。使君子醇提物在IC₅₀(1.060 mg/mL)时作用5.28 h可明显抑制贾第虫活力。经IC₅₀使君子醇提物处理6 h后,滋养体体表凹凸不平,细胞核畸形,边缘呈锯齿状。说明使君子抑制贾第虫活力存在剂量依赖性,可作为中药治疗贾第虫病的潜在药物。使君子抑制贾第虫活力的机制尚不明确,下一步拟对药物培养后的贾第虫提取蛋白质,通过SDS-PAGE分析贾第虫滋养体裂解物的肽酶,从而研究使君子抗贾第虫的机制。

参考文献:

- [1] 刘晴,邹扬,杨文彬,等.我国人体贾第虫病流行病学及基因分型的研究进展[J].中国病原生物学杂志,2018,13(1):106-109.
- [2] 徐宁,尹建海,沈玉娟,等.隐孢子虫和蓝氏贾第鞭毛虫分子流行病学研究进展[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2018,36(6):661-665,672.
- [3] 蔡伟龙,李娜,冯耀宇,等.牛十二指肠贾第虫的分子流行病学研究进展[J].畜牧兽医学报,2021,52(2):300-310.
- [4] 化军,冯会利.奶牛贾第虫病的研究进展[J].河南农业,2015(8):49-50,53.
- [5] WU Y Y, CHEN Y C, CHANG Y K, et al. Genotyping and identification of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bienersi* from free-range Tibetan yellow cattle and cattle-yak in Tibet, China [J]. Acta Trop, 2020, 212: 105671.
- [6] SPENCER L A, IRWIN M T. *Cryptosporidium* and *Giardia* prevalence amongst lemurs, humans, domestic animals and black rats in Tsinoarivo, Madagascar [J]. Heliyon, 2020, 6(11): e05604.
- [7] CAO L, HAN K, WANG L, et al. Genetic characteristics of *Giardia duodenalis* from sheep in Inner Mongolia, China [J]. Parasite, 2020, 27: 60.
- [8] 柳佳.河北部分区域肉牛三种肠道原虫感染情况调查[D].秦皇岛:河北科技师范学院,2020.
- [9] LIAO S Q, LIN X H, SUN Y X, et al. Occurrence and genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Blastocystis* sp. in household, shelter, breeding, and pet market dogs in Guangzhou, southern China [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 17736.
- [10] SURSAL N, SIMSEK E, YILDIZ K. Feline *Giardiasis* in Turkey: prevalence and genetic and haplotype diversity of *Giardia duodenalis* based on the β -Giardin gene sequence in symptomatic cats [J]. J Parasitol, 2020, 106(5): 699-706.
- [11] ADAM R D. Biology of *Giardia lamblia* [J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(3):447-475.
- [12] 吴昆.阿苯达唑与硝基咪唑类治疗中美贾第鞭毛虫病的临床效果比较[J].畜牧与兽医,2016,48(10):70-72.
- [13] ARGUELLO-GARCIA R, CRUZ - SOTO M, ROMERO - MONTOYA L, et al. *In vitro* resistance to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in *Giardia duodenalis*: variability and variation in gene expression [J]. Infect Genet Evol, 2009, 9(6): 1057-1064.
- [14] PAZ-MALDONADO M T, ARGUELLO R, CRUZ-SOTO M, et al. Proteomic and transcriptional analyses of genes differentially expressed in *Giardia duodenalis* clones resistant to albendazole [J]. Infect Genet Evol, 2013, 15:10-17.
- [15] 吴玲清,卢思奇,王凤芸,等.苦参乙醇提取物体外抗贾第虫药物作用的观察[J].首都医学院学报,1994,15(4):261-264.
- [16] 吴富鑫,童津津,熊本海,等.苦参碱的生物学功能及其在畜牧生产中的应用前景[J].动物营养学报,2019,31(12):5454-5460.
- [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] 李文超,顾有方,刘畅,等.蛇床子素体外对蓝氏贾第鞭毛虫超微结构的影响[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2014,32(3):242-244.
- [19] 刘畅.蛇床子素抗犬贾第虫的作用研究[D].长春:吉林大学,2013.
- [20] 王慧,谢珍连,黄锁义.使君子的临床应用和毒副作用研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(61):107-108.
- [21] 张悦,徐怀双,范冬立,等.使君子的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2015,32(7):515-518.
- [22] 冯有劲.中药使君子药理作用[J].中国畜牧兽医文摘,2014,30(4):189.
- [23] 叶进,喻闽凤,徐卉卉,等.中医儿科临床诊疗指南·蛔虫病(修订)[J].中医儿科杂志,2018,14(1):1-4.
- [24] 杨继生,肖啸,杨美兰,等.使君子提取物对感染猪蛔虫小鼠的驱虫试验[J].中国畜牧兽医,2007,34(8):81-82.
- [25] 赵春燕.茴香霉素抗贾第虫的作用研究[D].长春:吉林大学,2017.
- [26] LI L D, LI W C, LIU C W, et al. *Giardia intestinalis*: effects of *Pulsatilla chinensis* extracts on trophozoites [J]. Parasitol Res, 2012, 111(5): 1929-1935.
- [27] MATTOS A, SOLE - CAVA A M, DECARLI G, et al. Fine structure and isozymic characterization of trichomonadid protozoa [J]. Parasitol Res, 1997, 83(3): 290-295.
- [28] CHEN L F, LI J H, ZHANG X C, et al. Inhibition of krr1 gene expression in *Giardia canis* by a virus-mediated hammerhead ribozyme [J]. Vet Parasitol, 2007, 143(1): 14-20.
- [29] 罗万和,周凯翔,菅复春,等.抗寄生虫中草药研究进展[J].中兽医医药杂志,2018,37(4):87-89.
- [30] 沈学文,肖啸,严达伟,等.使君子提取物对驱除猪蛔虫效果研究及对猪主要生理生化指标的影响[J].中兽医医药杂志,2009,28(1):8-13.

(下转第126页)



- expression[J]. J Nutr, 2000, 130(12):3122S-3126S.
- [22] 那威, 吴媛媛, 王宇祥, 等. 肉鸡胚胎发育过程中肝脏的组织学观察[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(11):111-115.
- [23] 吴媛媛, 王宇祥, 李辉. 鸡肝脏内脂肪代谢相关因子的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(1):91-95.
- [24] KIM C W, ADDY C, KUSUNOKI J, et al. Acetyl coA carboxylase inhibition reduces hepatic steatosis but elevates plasma triglycerides in mice and humans: a bedside to bench investigation[J]. Cell Metab, 2017, 26(2):394-406.
- [25] ZHAO H, WU M, TANG X, et al. Function of chick subcutaneous adipose tissue during the embryonic and posthatch period[J]. Front Physiol, 2021, 12:684426.
- [26] CHEN P, SUP Y, CHOI Y M, et al. Developmental regulation of adipose tissue growth through hyperplasia and hypertrophy in the embryonic leghorn and broiler[J]. Poult Sci, 2014, 93(7):1809-1817.

Analysis of liver tissue development characteristics in embryonic stage of Wuliangshan Black-bone chickens

SHI Yanyan¹, SONG Chongjing², LI Qingqing^{1,3}, WU Yun⁴, CHEN Fenfen^{1*}

(1. College of Life Science, Southwest Forest University, Kunming 650224, China; 2. Livestock Workstation, Dali Bai Autonomous Prefecture, Dali 671099, China; 3. Kunming Xianghao Technology Co., Ltd., Kunming 650204, China; 4. School of Biology and Agriculture Technology, Zunyi Normal University, Zunyi 563006, China)

Abstract: In order to clarify the development characteristics of liver tissue during embryonic period of Wuliangshan Black-bone chickens, three varieties of eggs, including Arbor Acres (AA), Hy-Line gray layers and Wuliangshan Black-bone chickens, were incubated at the same time. The embryonic weight and liver weight were measured by weighing method, and the relative liver weight of liver weight / embryonic weight was compared among varieties. H. E. staining of paraffin sections and oil red O staining of frozen sections were used to detect lipid deposition in liver; the mRNA expression changes of FAS and ATGL were detected by RT-qPCR. The results showed that the relative liver weights of Wuliangshan Black-bone chickens at E10 and E14 stages were significantly different from those of AA chickens and Hy-Line gray layers ($P < 0.05$). Oil red O staining showed that E18 liver tissue had the darkest staining color. The relative expression of FAS and ATGL in Wuliangshan Black-bone chickens was the highest before E18 and the difference was significant ($P < 0.05$). The temporal expression of FAS and ATGL in Wuliangshan Black-bone chickens showed that both of them reached the peak at D0 and had significant difference compared with other stages ($P < 0.01$), indicating that the lipid metabolism activity of Wuliangshan Black-bone chickens was more active after embryonic stage than that of broiler and laying hens.

Keywords: Wuliangshan Black-bone chickens; chicken embryo; liver; growth and development; lipid metabolism

(020)

(上接第 115 页)

Study on *Combretum indicum* extracts against *Giardia intestinalis* in vitro

CAO Xiaoqin, TONG Yang, FANG Zhengfeng, SHI Lu, FANG Hui, LIU Jicai*

(College of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, China)

Abstract: In order to observe the effects of traditional Chinese medicine *Combretum indicum* extracts against *Giardia intestinalis* (referred to as *Giardia*) in vitro, in this experiment, ethanol and deionized water were used to extract *Combretum indicum* to obtain *Combretum indicum* alcohol extracts and *Combretum indicum* water extracts. *Combretum indicum* alcohol extracts group, *Combretum indicum* water extracts group, and metronidazole control group (the concentrations were 0.312 5, 0.625, 1.25, 2.5, 5 mg/mL), and blank control group (TYI-S-33 medium), were set respectively. *Giardia* was cultured anaerobically at 37 °C at a concentration of $8.0 \times 10^5 - 4.2 \times 10^6$ trophozoites/mL for 24 h, respectively. Adherent *Giardia* were collected and half of the inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated. The *Giardia* were exposed to *Combretum indicum* water extracts, *Combretum indicum* alcohol extracts, and metronidazole using IC_{50} , respectively; and at the same time a blank control was set to culture for 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h. The shortest action time of the drugs up to IC_{50} was calculated. The IC_{50} group of *Combretum indicum* alcohol extracts and blank control group with action time of 6 h and 12 h respectively were observed under inverted light microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy to analyze the effects of *Combretum indicum* alcohol extracts on the ultramorphological structure of *Giardia* trophozoites. The results showed that the three medical solutions had a certain inhibitory effect on *Giardia*. The IC_{50} of *Combretum indicum* alcohol extracts was 1.06 mg/mL; the IC_{50} of *Combretum indicum* water extracts was 8.145 mg/mL, and the IC_{50} of metronidazole was 0.325 mg/mL; and the shortest time to IC_{50} was 5.28 h, 5.95 h and 3.85 h, respectively. At IC_{50} concentration, when incubated for 6 h or more, there was no significant difference in the *Giardia* concentration between the *Combretum indicum* alcohol extracts group and the metronidazole control group ($P > 0.05$). During the entire culture period, the *Giardia* concentration in *Combretum indicum* water extracts group was significantly higher than that in metronidazole control group ($P < 0.05$). After 6 h of action of *Combretum indicum* alcohol extracts, the trophozoite body was deformed, and the flagella were damaged. After 12 h of action, the cell membrane ruptured; the cell contents overflowed; part of the structure of the suction cup microtubules disintegrated, and trophozoites began to die. The results suggested that *Combretum indicum* had the effect of inhibiting the growth of *Giardia*, and the alcohol extracts had a stronger inhibitory effect than water extracts, which was concentration dependence. The IC_{50} concentration of *Combretum indicum* alcohol extracts was comparable to metronidazole on inhibition effect of *Giardia*.

Keywords: *Giardia intestinalis*; *Combretum indicum* alcohol extract; *Combretum indicum* water extract; growth inhibition; morphological structure

(020)