

自拟抗弓形虫汤对急性弓形虫感染小鼠 SOD、MDA 的影响^{*}

★ 万红娇 杨翠萍 王敏璋 (江西中医学院基础医学院 南昌 330006)

摘要:目的:探讨自拟抗弓形虫汤对急性弓形虫感染小鼠血浆、心、肝、肺超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量的影响。方法:昆明小鼠 80 只,随机分为抗弓形虫汤组(灌胃自拟抗弓形虫汤)、复方 SMZ 组(灌胃复方 SMZ)、模型组和正常组,每组 20 只。用 RH 株弓形虫建立小鼠模型,观察小鼠发病及存活时间,血浆、心、肝、肺 SOD 活性和 MDA 含量。结果:自拟抗弓形虫汤能推迟弓形虫感染小鼠的发病时间,延长弓形虫感染小鼠的生存时间;可明显提高小鼠 SOD 活性,同时降低 MDA 含量。与复方 SMZ 组比较,差异有显著性($P < 0.05$)。结论:自拟抗弓形虫汤能改善弓形虫感染小鼠的存活质量,并具有抗氧化损伤作用。

关键词:自拟抗弓形虫汤;刚地弓形虫;超氧化物歧化酶;丙二醛

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

The Effect of Kanggongxingchong decoction on SOD and MDA in Mice Infected with Toxoplasma Gondii

WAN Hong-jiao, YANG Cui-ping, WANG min-zhang

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006

Abstract: Objective: To investigate the effect of Kanggongxingchong decoction (KGXCT) on SOD and MDA in mice infected with Toxoplasma gondii. Methods: Eighty Mice were divided into KGXCT group (intragastric administration KGXCT), Compound SMZ group (intragastric administration compound SMZ), Model group, Normal group. The mice model was made by RH toxoplasma gondii, SOD activities and the content of MDA in mice serum, heart, liver and lung were detected. Results: KGXCT group can delay the invasion time of mice infected by toxoplasma gondii, and their life were extend. When it came to the comparison of the activity of SOD and the content of MDA in each group of mice's serum, heart, liver and lung, the Normal group and model group had remarkable difference ($P < 0.05$). Conclusion: KGXCT can increase greatly the quality of life, and can anti-oxidation injury in mice infected with Toxoplasma gondii.

Key words: Kanggongxingchong Decoction; Toxoplasma gondii; SOD; MDA

弓形虫是一种呈世界性分布的细胞内寄生性原虫,可寄生于人及 190 多种动物体内。世界平均感染率为 25% ~ 50%,严重的威胁人类的健康。有人估计全世界有 5 亿 ~ 10 亿人受弓形虫感染,虽多为隐性感染,但在免疫功能低下时,可因中枢系统和全身性播散性损害而死亡^[1]。对急性期患者治疗尚无理想药物,乙胺嘧啶、磺胺类对增殖期弓形虫有抑制作用,但它们均为叶酸的拮抗剂,能抑制骨髓的造血功能^[2]。现已证明氧自由基及其反应产物丙二醛(MDA)参与

了弓形虫致病过程^[3~4]。本实验观察了自拟抗弓形虫汤对急性弓形虫感染小鼠发病、存活时间及体内的超氧化物歧化酶(SOD)及 MDA 的影响。

1 材料

1.1 动物 健康昆明小鼠,雌性,体重 18 ~ 22 g,由江西中医学院动物实验中心提供。

1.2 虫株 弓形虫 RH 强毒株自中山大学中山医学院寄生虫学教研室引进。

* 基金项目:江西省自然科学基金资助项目(0340008)

1.3 药物及试剂 中药购自江西省中医院中药房, 检验合格。自拟抗弓形虫汤组方: 生黄芪 30 g, 白术 20 g, 青蒿 15 g, 白花蛇舌草 20 g, 槟榔 10 g, 苦参 10 g, 补骨脂 10 g, 生甘草 6 g, 草果 6 g, 怀牛膝 10 g, 天葵子 10 g。鉴定后, 制成 1:1 浓度的水煎剂, 分装消毒, 4℃ 冰箱保存。复方 SMZ 片剂: 由天津力生制药股份有限公司提供, 批号: H12020938, 每片含磺胺甲恶唑 0.4 g, 甲氧苄啶 0.08 g, 用双蒸水配制成悬浊液, 浓度 12 mg/ml。

1.4 试剂 SOD、MDA 及总蛋白测定试剂盒, 均由南京建成生物工程研究所提供。

2 方法

2.1 实验分组 80 只小鼠分 4 组, 即: 抗弓形虫汤组; 复方 SMZ 组; 模型组; 正常组, 每组 20 只。

2.2 动物模型的建立 用 RH 株弓形虫速殖子常规腹腔感染小鼠, 72h 后断颈处死, 0.5% 碘伏消毒小鼠腹部, 注射生理盐水 3 ml 洗涤腹腔, 吸取冲洗液, 用血细胞计数板按白细胞计数方法在高倍镜下计数, 调整弓形虫速殖子浓度为 2×10^4 /ml, A、B、C 组每只小鼠腹腔注射上述弓形虫悬液 0.5 ml。

2.3 给药 小鼠感染 2h 后灌胃给药, 每天 1 次。A 组每只每次 0.5 ml 自拟抗弓形虫汤; B 组每只每次 0.5 ml 复方 SMZ 悬浊液, 其它两组未加任何影响因素, 正常饲养, 疗程 14d, 观察至 30d。

2.4 观察与检测^[5] 每天观察小鼠发病情况, 饮食活动情况并记录死亡数。于治疗后第 3、6 天分别取 A、B、C、D 组小鼠的血浆、心、肝、肺组织, 检测 SOD、MDA 值, 其中, SOD 活性检测采用羟胺法, 每份标本取样 30 μ l, 反应后在 721 分光光度计上比色读取光密度 (OD) 值。MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸 (TBA) 法, 同时用双缩脲法测定每份标本的蛋白浓度, 按说明书公式分别计算 SOD、MDA 值。

2.5 组织匀浆制备 取小鼠心、肝、肺称重, 在冷生理盐水中漂洗, 滤纸拭干, 再切取相应部位组织适当大小称重, 加入

组织重量 9 倍的生理盐水, 置入匀浆器中在冰水中匀浆 5 min, 再 3 000 r/min 离心 10min。分别吸取 0.1 ml 上清液测定 SOD 活性和 MDA 含量, 再取 0.05 ml 上清液测组织中总蛋白含量。

2.6 统计学处理方法 SPSS11.5 统计软件进行方差分析和 q 检验。

3 结果

3.1 一般情况比较 自拟抗弓形虫汤组治疗第 5 天开始相继发病, 复方 SMZ 组第 8 天开始相继发病, 模型组第 4 天开始相继发病, 正常组进食与活动无异常。除正常组外各组在实验期间都发病, 发病小鼠大都出现耸毛、肛门拖粪、弓背、懒动、饮食减少等症状。但是, 抗弓形虫汤和复方 SMZ 组明显延迟发病, 并且发病症状较模型组轻; 实验结束时仍存活的抗弓形虫汤组和复方 SMZ 组小鼠饮食水量在前 6 天中明显多于同期模型组, 并且先减少后增加, 患病症状也是先重后轻。

3.1 小鼠发病及存活时间观察 自拟抗弓形虫汤组治疗第 7 天开始有小鼠死亡, 在 30d 的观察期间没有出现集中死亡的现象, 观察结束时仍存活 4 只小鼠; 复方 SMZ 组小鼠第 9 天开始有小鼠死亡, 也没有出现集中死亡现象, 观察结束时仍存活 7 只小鼠; 模型组第 5 天开始有小鼠死亡, 到第 9 天全部小鼠死亡, 并且出现集中成批死亡现象; 正常组在观察期间没有死亡现象。A、B、C、D 各组小鼠的平均存活时间见表 1。

表 1 各组小鼠存活时间比较

组别	n	存活时间/d
抗弓形虫汤组	20	19.5 ± 8.0 ^{▲▲}
复方 SMZ 组	20	22.5 ± 7.6 [▲]
模型组	20	7.9 ± 1.4
正常组	20	>30

注: 观察期为 30d, 存活大于 30d 的按 30d 计。与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与复方 SMZ 组比较, $\Delta P > 0.05$ 。

3.2 SOD 活性检测结果 见表 2。

表 2 治疗第 3、6 天小鼠血浆和心、肝、肺组织匀浆 SOD 活性值比较

治疗天数	组别	n	血浆 SOD/ $U \cdot ml^{-1}$	组织匀浆/ $U \cdot mg^{-1}$		
				心脏	肝脏	肺脏
第 3 天	抗弓形虫汤组	5	139.7 ± 7.3 [▲]	222.7 ± 13.1 [▲]	141.9 ± 8.2 [▲]	180.5 ± 10.0 [▲]
	复方 SMZ 组	5	136.7 ± 6.6 [▲]	217.0 ± 11.6 [▲]	140.8 ± 7.6 [▲]	182.5 ± 9.1 [▲]
	模型组	5	143.6 ± 6.4 [▲]	234.5 ± 11.2 [▲]	155.5 ± 8.2 [▲]	192.7 ± 9.9 [▲]
	正常组	5	124.1 ± 6.9	197.9 ± 12.1	124.5 ± 12.0	167.8 ± 11.0
第 6 天	抗弓形虫汤组	5	119.9 ± 10.9 [*]	212.1 ± 10.1 [*]	121.3 ± 7.8 [*]	169.0 ± 4.5 [*]
	复方 SMZ 组	5	125.2 ± 6.0	205.6 ± 14.5	123.2 ± 7.0	165.8 ± 5.4
	模型组	5	86.4 ± 5.4	123.7 ± 15.3	70.3 ± 7.5	109.2 ± 9.5
	正常组	5	124.1 ± 6.9	197.9 ± 12.1	124.5 ± 12.0	167.8 ± 11.0

注: 与同期模型组比较, $* P < 0.05$; 与同期正常组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

3.3 MDA 含量检测结果 见表 3。

4 讨论

上述实验结果表明, 抗弓形虫汤组小鼠发病时间与模型组比较, $P < 0.05$, 说明该药能显著的推迟弓形虫病的发生, 延长弓形虫感染小鼠的生存时间。李芸茜等^[6]从黄芪对急性弓形虫 RH 株感染小鼠的保护作用的实验研究中发现: 黄

芪可以改善低剂量速殖子感染小鼠的存活情况。申川军等^[7]在小鼠体内实验证实: 青蒿琥酯延长小鼠存活时间, 以 250 mg/kg 灌胃处理的作用最为明显 (平均存活时间为 10.3d, 净延长 2.6d)。本实验证实自拟抗弓形虫汤组小鼠较模型组小鼠的发病症状轻, 发病时间推迟, 生存期延长, 饮食饮水量多, 活动力明显增强。这可能与该组方中的黄芪、白术

等中药具有增强免疫力的作用,而且毒副作用相对低有关。张效本等^[8]从中药“扶正消原丸”治疗弓形虫病的实验研究中发现:用药后已感染弓形虫小鼠的精神状况、活动程度、食

欲、大小便、皮毛状态及最后的存活时间均明显好于未用药组,“扶正消原丸”短期内未发现毒性反应,从而间接反映了中药的用药安全。

表3 治疗第3、6天小鼠血浆和心、肝、肺组织匀浆 MDA 含量比较

治疗天数	组别	n	血浆 SOD/U·ml ⁻¹	组织匀浆/U·mg ⁻¹		
				心脏	肝脏	肺脏
第3天	抗弓形虫汤组	5	11.15±1.76 [▲]	8.73±1.59 [▲]	11.24±2.11 [▲]	13.88±4.01 [▲]
	复方 SMZ 组	5	10.48±1.22 [▲]	7.46±0.77 [▲]	10.06±1.56 [▲]	12.51±2.33 [▲]
	模型组	5	12.45±3.12 [▲]	10.46±0.95 [▲]	13.01±1.12 [▲]	14.89±5.03 [▲]
	正常组	5	8.07±2.76	6.71±1.85	8.31±2.75	9.74±2.07
第6天	抗弓形虫汤组	5	12.19±4.64 [*]	8.73±1.59 [*]	13.56±2.17 [*]	15.76±1.34 ^{△*}
	复方 SMZ 组	5	11.25±7.08 [*]	9.68±0.53 [*]	12.44±1.66 [*]	14.55±1.81 [*]
	模型组	5	14.09±0.98	13.45±0.59	15.89±0.79	18.66±3.01 [△]
	正常组	5	8.07±2.76	6.71±1.85	8.31±2.75	9.74±2.07

注:与同期模型组比较,* P>0.05;与同期正常组比较,▲ P<0.05。

SOD 是需氧生物体内的一种含金属离子酶蛋白,主要作用是清除体内有毒性的 FR,阻断由超氧离子(O₂⁻)自由基所激发的一系列反应,使机体细胞免受自由基损害^[9]。可见检测其活性可以证明弓形虫感染时小鼠体内发生的氧化损伤情况。弓形虫的致病机理主要是速殖子在细胞内繁殖,使其细胞被反复破坏,引起组织的炎症反应,氧依赖性杀菌系统活化,呼吸爆发,产生许多氧自由基,其可以破坏生物膜。从实验结果得知治疗第3天时,抗弓形虫汤剂组、复方 SMZ 组、模型组各组小鼠体内 SOD 活性都有不同程度的升高,与正常组相比有显著差异性(P<0.05)。这可能是小鼠感染初期在应激状态下,为消除过多的 OFR,保护组织及其靶器官膜系统不受损伤,反馈性地导致机体 SOD 合成增多的结果。因而得出弓形虫感染时机体有氧化损伤的发生,为此在治疗弓形虫感染时考虑到抗氧化损伤的治疗是很有必要的。治疗第6天,抗弓形虫汤剂组、复方 SMZ 组小鼠体内 SOD 活性降低不明显,模型组降低较明显。抗弓形虫汤组、复方 SMZ 组与模型组小鼠的血浆和心、肝、肺组织匀浆液中 SOD 活性相比都有显著差异性(P<0.05),这可能是模型组没有得到治疗,随着感染加重,病情恶化,炎症加重,加上饮食减少、蛋白合成降低,SOD 消耗过多,以致 SOD 活性急剧下降的原因。也有可能和体内的微量元素的消耗有关系。耿志辉等^[10]在弓形虫感染鼠肝脾脑微量元素测定中也证实了弓形虫感染会引起体内 Cu²⁺ 减少。因为 Cu²⁺ 是 SOD 生物合成的必需原料,所以它的不足使体内 SOD 合成减少。可见自拟抗弓形虫汤治疗弓形虫感染很重要的一个机理可能是通过增加机体的 SOD 活性来实现的。

SOD 是直接清除氧自由基的专一酶,MDA 是脂肪酸和氧自由基等氧化剂进行链接式反应的产物,因此 SOD 和 MDA 反映氧自由基对弓形虫感染小鼠的损伤程度。本实验研究表明治疗第3天时,抗弓形虫汤组、复方 SMZ 组、模型组的 MDA 含量较正常组明显降低(P<0.05),这可能与弓形虫感染有关。当机体受到外界病原体弓形虫破坏时,机体本能的保护机制起作用,降低对机体有害的脂质氧化产物。向远东等^[11]研究结果间接证明氧自由基参与了急性弓形虫

病的病理生理过程,为阐明弓形虫病的发病机理增加了新的资料。治疗第6天时,自拟抗弓形虫汤组、复方 SMZ 组、正常组的 MDA 含量较模型组明显降低(P<0.05),这可能是自拟抗弓形虫汤和复方 SMZ 具有清除体内氧自由基的作用,而模型组因缺乏药物治疗,体内过多的氧化代谢终产物超出了机体的清除能力,从而导致过多的诸如 MDA 等物质在体内积聚。这表明自拟抗弓形虫汤对弓形虫感染小鼠体内氧化损伤具有较好的保护作用。

参考文献

- [1]吴观陵.人体寄生虫学[M].第3版,北京:人民卫生出版社,2005.247
- [2]詹希美.人体寄生虫学[M].北京:人民卫生出版社,2005.95
- [3]Murray HW, Cohn ZA. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity II Enhanced oxidative metabolism as expression of macrophage activation[J]. J Exp Med, 1980, 152: 1 596
- [4]Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME. Identification of interferon-γ as the Lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and anti-microbial activity[J]. J Exp Med, 1983, 158: 670
- [5]陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1996. 920~931
- [6]李芸茜,黄佩君,王祝鸣,等.黄芩对急性弓形虫 RH 株感染小鼠的保护作用研究[J].中国血吸虫病防治杂志,2006,24(5):337~341
- [7]申川军,詹希美,杨绍基,等.青蒿琥酯抗弓形虫病的疗效观察[J].中国人兽共患病杂志,2003,19(5):128~129
- [8]张效本,阮秀花,田葱,等.中药“扶正消原丸”治疗弓形虫病的实验研究[J].中华适宜诊疗技术杂志,2005,23(3):3~5
- [9]陈瑗.自由基医学[M].北京:人民军医出版社.1991.4~7
- [10]耿志辉,石毅,方艳秋,等.弓形虫感染鼠肝脾脑微量元素的测定[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2000,18(6):347~348
- [11]向远东,欧阳颖,聂荣兴,等.急性弓形虫病小鼠超氧化物歧化酶活性测定与同工酶分析[J].中国人兽共患病杂志,1998,14(3):40~43

(收稿日期:2007-03-15)