

## 马杜霉素对柔嫩艾美耳球虫线粒体的影响

安健<sup>1,2\*</sup> 汪明<sup>1</sup> 孔繁瑶<sup>1</sup> 殷佩云<sup>1</sup>

(1 中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

(2 北京农学院动物科技系, 北京 102206)

**摘要** 为了观察马杜霉素对球虫超微结构的影响, 探讨马杜霉素抑杀球虫的作用机理, 将马杜霉素按 0.000 5% 浓度混入鸡的育雏饲料中, 12 日龄时, 用该饲料喂给药组的鸡, 同时, 另设定 1 组不用药对照组, 在 14 日龄时, 参加实验的 2 个组的每只实验鸡接种对马杜霉素敏感的孢子化的鸡柔嫩艾美耳球虫卵囊  $2 \times 10^4$  个, 感染后 84, 96, 108, 120 和 132 h 每组分别捕杀 2 只实验鸡, 取鸡盲肠组织, 制成超薄切片, 通过透射电镜观察鸡体内的柔嫩艾美耳球虫敏感株在马杜霉素作用下超微结构的变化, 与对照组比较, 发现线粒体表现为数量增多和形态改变。形态改变表现在有的线粒体弯曲为马蹄形或者弓形; 内部结构的变化为: 有的线粒体内膜和嵴脱落, 内部形成空泡、膜状结构、螺旋状或者髓鞘样结构, 有的线粒体的嵴变为与线粒体的长轴平行排列, 且贯穿线粒体。作者推测马杜霉素等抗生素类抗球虫药的作用机理为: 破坏虫体内部结构与抑制虫体的生理机能 2 个方面的协同作用达到抑杀球虫的作用。

**关键词** 柔嫩艾美耳球虫; 马杜霉素; 超微结构; 线粒体

中图分类号 S852.732

## Ultra-structure Change of Mitochondrion of a Sensitive *Eimeria tenella* to Maduramasin

An Jian<sup>1,2</sup> Wang Ming<sup>1</sup> Kong Fanyao<sup>1</sup> Yin Peiyun<sup>1</sup>

(1 College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(2 Department of Animal Science and Technology, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China)

**Abstract** A strain of *Eimeria tenella*, which is sensitive to maduramasin, is treated with  $5 \times 10^{-6}$  maduramasin in 14 day old chickens. The change of mitochondrion of the strain is observed and described. The number of the mitochondrion increased. The shape and structure of the mitochondrion changed. The mitochondrion swelled into round. Some mitochondria turned into banana-shape. The cristae of the mitochondrion turned into paralleling to the longitudinal axis and run through it. The inner membrane and cristae separated from the eternal membrane, and then turned into vacuole. The marrow-sheathed, electric-dense figures and membrane figures were found in the mitochondrion. The mechanism that maduramasin inhibit or kill Coccidia is attributed to the destructure of the structure and function.

**Key words** *Eimeria tenella*; maduramasin; ultra-structure; mitochondrion

收稿日期: 2001-10-24

国家科委“八五”攻关资助项目(910411438)

\* 安健, 博士生, 研究方向为预防兽医学。北京圆明园西路 2 号

马杜霉素是一种新型的抗球虫药,属于聚醚类离子载体抗生素类,是红足分支杆菌的发酵产物,1984年首先在巴西注册使用,我国在1989年注册使用,近年来关于马杜霉素良好的抗球虫效果与耐药性的报道很多<sup>[1]</sup>。而且在现有的抗球虫药中该药在饲料中添加的剂量最小,它在国内肉鸡场使用比较普遍,近年来在我国养鸡业尤其是在商品肉鸡球虫病的防治中起了较大的作用。

为探讨该类药物的作用机理,自20世纪70年代初到目前,有关聚醚类离子载体抗生素类抗球虫药(简称“抗生素类抗球虫药”)引起球虫超微结构变化的报道越来越多,人们观察报道了莫能菌素在离体条件下对球虫的超微结构的影响,发现裂殖子膨胀,细胞浆空泡化,细胞膜结构模糊、破损和细胞整体形态改变<sup>[2~4]</sup>。Couzinet等在鸡肾细胞内观察了Nigericin和Epigericin对弓形体孢子的超微结构的影响,除了上述变化外,还发现细胞核的周围形成空泡,并将细胞核包围起来<sup>[5]</sup>。人们也研究了拉沙菌素、那拉菌素、盐霉素对球虫不同时期的超微结构的影响,所得结果和上述结果基本一致<sup>[6~8]</sup>。然而,国内外的文献中,尚未见到在马杜霉素作用下对球虫线粒体形态结构影响的报道,而且其作用机理仅限于代谢水平上。为此,借助电子显微镜,观察了在马杜霉素作用下柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)敏感株虫体线粒体的变化,并在亚细胞水平上,对抗生素类抗球虫药对球虫的抑杀机理做一些初步探讨。为新型兽药的研制、开发以及合理的使用等方面提供科学的依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

柔嫩艾美耳球虫经单卵囊纯化、增殖、孢子化后置于4℃冰箱保存。

实验动物公鸡雏购自北京海淀乡鸡场,孵化后未落地前饲养于无球虫笼舍中至12日龄备用。

试剂加福(马杜霉素, Maduramycin 1% 预混剂):美国氰胺公司生产,北京华都肉鸡联营公司赠送;固定液:2.5%戊二醛;缓冲溶液:0.1 mol/L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液pH 7.4(保存于4℃冰箱备用)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 虫株对马杜霉素敏感性实验 实验分3组(表1),用抗球虫指数判定实验用柔嫩艾美耳球虫对马杜霉素的敏感性<sup>[9]</sup>。

1.2.2 制备电镜样品实验 实验分成2组(表2),每组15只鸡。第1组:实验组,12日龄开始饲喂加有 $5 \times 10^{-6}$ 马杜霉素的饲料,第2组:不用药对照组,14日龄时,2个组每只实验鸡感染孢子化的柔嫩艾美耳球虫卵囊 $2 \times 10^4$ 。

1.2.3 电镜样品制备和电镜观察 感染后84, 96, 108, 120和132h 每组分别捕杀2只实验鸡,取鸡盲肠置于冷却的蜡盘上,滴上冷却的磷酸盐缓冲液,刮取肠粘膜及肠内容物显微镜检查,发现裂殖体或裂殖子时,立即用冷却的磷酸盐缓冲液冲洗盲肠,用双面刀片在不同部位取4~8块 $1 \text{ mm}^3$ 组织块,于2.5%戊二醛固定液中固定,按电镜常规包埋、超薄切片。利用透射电镜观察、照相并记录。

表1 马杜霉素敏感性实验分组

实验分组	鸡只数	给药与否	接种与否
1	6	$5 \times 10^{-6}$ 马杜霉素	接种
2	6	不给药	接种
3	6	不给药	不接种

表2 制备电镜样品实验分组

实验分组	鸡只数	给药与否	接种卵囊
1	15	$5 \times 10^{-6}$ 马杜霉素	$2 \times 10^4$
2	15	不给药	$2 \times 10^4$

## 2 结果

### 2.1 虫株敏感性测定结果

用抗球虫指数作为判断指标, 经过实验检验, 实验用的柔嫩艾美耳球虫株对马杜霉素敏感。

### 2.2 不用药对照组观察结果

在不用药对照组, 利用透射电子显微镜进行观察, 线粒体的形状为圆形或者椭圆形, 线粒体内膜和嵴的结构完整、清晰, 内部无其他异常的结构出现(图 1-1, 2, 3)。

### 2.3 用药组观察结果

在饲料中添加  $5 \times 10^{-6}$  mg/kg 的马杜霉素作用下, 利用透射电子显微镜进行观察 84, 96, 108, 120 和 132 h 鸡体内的柔嫩艾美耳球虫裂殖子的线粒体, 与不用药对照组比较, 发现线粒体的数量、形态和结构发生明显的改变: 1) 裂殖子中线粒体的数量增加密度增大; 2) 线粒体形状的变化, 有的线粒体肿大为球形, (图 1-4, 8), 有的线粒体失去原有的椭圆形, 改变为弯曲似马蹄形或者弓形(图 1-7), 有的线粒体呈现不规则形(图 1-5); 3) 线粒体内部结构的变化, 有的线粒体的内膜和嵴发生脱落, 线粒体嵴间扩张, 在线粒体内部形成空泡(图 1-4, 8)或者膜状结构(图 1-5), 有的线粒体内部出现膜状结构、旋涡状结构和髓鞘样结构(图 1-7), 有的线粒体内部出现电子致密的团块(图 1-4), 有的线粒体嵴的排列和纵轴平行, 并贯穿线粒体, 有的线粒体内部的嵴加长, 间隙扩张(图 1-6)。

## 3 讨论

抗生素类抗球虫药物的分子中都含有 1 个一元羧基和许多醚基。在溶液中由氢键连接为特殊构型, 中心由并列的氧原子组成, 故带有负电荷, 具有捕捉阳离子的“磁阱”作用, 外部主要为烃类组成, 具有中性亲脂性和疏水性<sup>[10]</sup>。因此抗生素类抗球虫药物具有协助阳离子通过膜结构的作用。故在此类药物作用下孢子、裂殖子和裂殖体内外环境发生改变, 尤其是离子浓度发生的改变。

在饲料中添加  $5 \times 10^{-6}$  mg/kg 马杜霉素作用下, 发现鸡体内柔嫩艾美耳球虫裂殖子的线粒体形态改变, 形状弯曲成马蹄形或弓形, 嵴脱落, 内部有膜状结构、空泡、和髓鞘样结构出现, 线粒体嵴的排列和纵轴平行, 并贯穿线粒体, 说明线粒体的结构遭到了马杜霉素的损伤, 损伤严重的部位在内膜和嵴, 这正是参与氧化还原反应和氧化磷酸化的电子传递链存在的地方, 这方面说明了马杜霉素对球虫的能量代谢造成了严重的损伤。而且杨光华<sup>[11]</sup>也认为线粒体中膜性旋涡和髓鞘样结构是线粒体的一种病理现象, 线粒体嵴的排列出现和纵轴平行的现象, 可伴有细胞色素氧化酶和琥珀酸脱氢酶的活性降低, 这些变化也说明线粒体的能量代谢功能受到了影响, Charles 等<sup>[12]</sup>发现莫能菌素能使孢子和裂殖子内的 ATP 浓度降低, 也表明抗生素类抗球虫药不仅对细胞膜、细胞质和细胞核造成影响, 而且对线粒体的膜结构造成破坏, 使线粒体不能进行正常的能量代谢。

线粒体内部出现电子致密的团块, 作者认为可能为线粒体内的核酸由于线粒体内环境改变而发生的凝聚现象, 汪德耀认为这是 DNA 代谢紊乱引起的一种不可逆病变<sup>[13]</sup>。线粒体结构异常是整个细胞病变的一部分, 线粒体的肿大变圆、嵴变短, 间隙扩张是线粒体水肿的一种表现。线粒体增生是对非特异性细胞损伤的适应性反应, 是一个病理过程<sup>[14]</sup>。

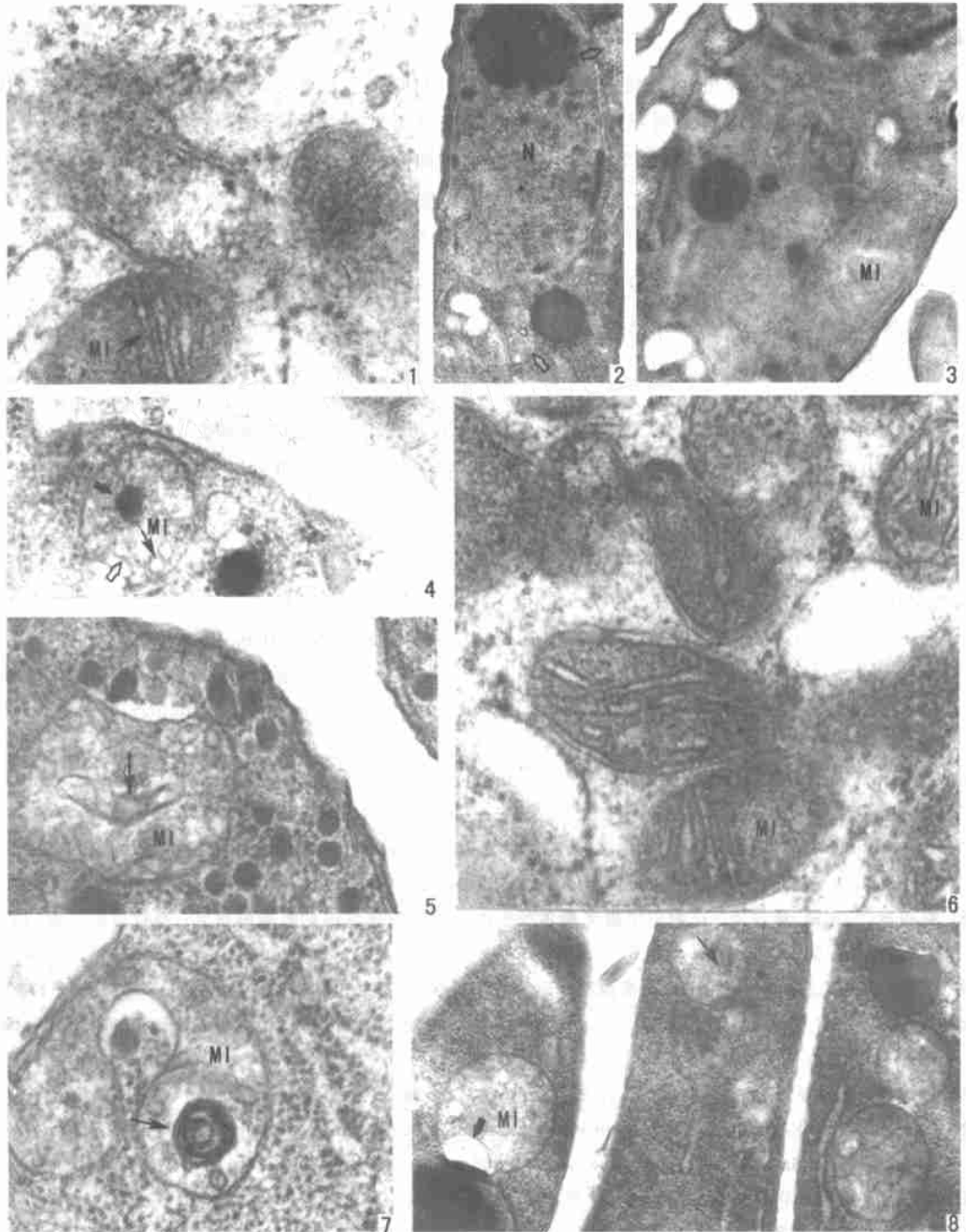


图 1

- 1 对照组, 正常的线粒体(MI) 线粒体的嵴( ) × 75 000;
- 2 对照组, 正常的线粒体(⇔)细胞核(N) × 15 000;
- 3 对照组, 正常的线粒体(MI) × 24 000;
- 4 处理组, 线粒体(MI) 膨胀变为圆形内部出现空泡( )、膜状结构(⇔)和电子致密团块(■) × 49 000;
- 5 处理组, 裂殖子(M)的线粒体(MI)形态改变, 内膜和嵴脱落, 内部出现膜性结构( ) × 49 000;
- 6 处理组, 裂殖子的线粒体(MI)嵴( )排列与长轴平行, 贯穿线粒体, 线粒体的数量增加 × 75 000;
- 7 处理组, 裂殖子内线粒体(MI)呈马蹄形, 线粒体内膜和嵴脱落, 髓鞘样结构( ) × 49 000;
- 8 处理组, 线粒体膨胀变为圆形内部出现空泡( )和膜状结构( ) × 24 000

## 4 结 论

药物使球虫线粒体的形态结构发生了变化。鸡体内的柔嫩艾美耳球虫敏感株在  $5 \times 10^{-6}$  马杜霉素作用下超微结构和对照组比较, 线粒体表现为数量增多、形态和结构发生改变。

根据观察结果, 推测抗生素类抗球虫药杀死或抑制球虫的机理为: 1) 通过影响细胞内外离子的平衡, 破坏虫体的膜结构, 尤其是线粒体, 从而破坏和杀死虫体; 2) 通过影响虫体能量的形成, 导致虫体的代谢和生理功能的异常。这 2 个方面互为因果相伴存在, 影响虫体的侵入、生长、发育和繁殖, 甚至导致虫体的破裂死亡, 达到抑杀球虫的目的。

## 参 考 文 献

- 1 安健, 汪明, 孔繁瑶, 殷佩云. 马杜霉素与莫能菌素交叉抗药性实验. 中国兽医科技, 1995, (7): 39~ 40
- 2 Augustine P C. Effect of Monensin on ultra-structure and cellular invasion by the Turkey *Coccidia Eimeria adenoeides* and *E. meleagridis*. Poultry Science, 1992, 71: 970~ 978
- 3 Smith C K, Strout R G. *Eimeria tenella*: effect of a polyether ionophore narasin, on the culture of intercellular sporozoites. Experimental Parasitology, 1980, 50: 426~ 436
- 4 Pfeiffer J R. Effect of Monensin on the culture of first generation development of *Eimeria tenella* culture *in vitro*. Masters thesis, University of New Hampshire, Durham, New Hampshire 1973
- 5 Couzinet S D, Brenetz J F, David L, Prensier G. *Toxoplasma gondii*: activity of the polyether ionophorous antibiotics nigericin on tachyzoites in cell culture. Experimental Parasitology, 1994, 78: 341~ 351
- 6 Boothby J K. Evaluation of the ionophorous antibiotic lasalocid against *Eimeria tenella* in cell culture. Masters thesis, University of New Hampshire, Durham, New Hampshire 1975
- 7 Dost G, et al. Development of salinomycin as an anticoccidial in replacement in: Research in Avian coccidiosis (MacDougald, LR et al.) University of Georgia. 1985. 235~ 293
- 8 张振岚, 汪志楷, 徐福南. 药物对柔嫩艾美耳球虫内生阶段超微结构的影响的研究. 畜牧兽医学报, 1991, 22(4): 329~ 333
- 9 安健, 王黎霞. 耐药性. 见: 索勋, 李国清编. 鸡球虫病学. 北京: 中国农业大学出版社, 1998, 172~ 173
- 10 Westley J W. Antibiotics (polyethers) in Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. Antibiotics, 1978(3): 47~ 64
- 11 杨光华. 病理学进展. 贵阳: 贵州人民出版社, 1980. 12~ 16
- 12 Charles K S, Reginald B G. Influence of Monensin on cation influx and glycolysis of *Eimeria tenella* sporozoites *in vitro*. Parasitology, 1983, 69(4): 666~ 670
- 13 汪德耀. 细胞生物学超微结构图谱. 北京: 高等教育出版社, 1989. 92~ 94
- 14 赵德明. 兽医病理学. 北京: 中国农业大学出版社, 1998. 6~ 7