

蓝氏贾第鞭毛虫的细胞骨架

田喜凤, 卢思奇

田喜凤, 华北煤炭医学院生物科学系病原生物学学科
河北省唐山市 063000
卢思奇, 首都医科大学基础医学院寄生虫学教研室 北京市 100054
国家自然科学基金资助课题, No. 30470243
通讯作者: 卢思奇, 100054, 北京市, 首都医科大学基础医学院寄生虫学教
研室: wdxlsq42@yahoo.com.cn
电话: 010-63051447-803
收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

摘要

国外的研究表明, 贾第虫虽然是一种较低级的真核生物, 但确有与其他生物相似的高度发达的、复杂的细胞骨架系统。贾第虫的细胞骨架与虫体的运动、增殖及致病密切相关。因此, 将贾第虫的骨架成分作为新药物开发的靶点, 筛选对细胞骨架有损伤作用的药物, 破坏贾第虫的细胞骨架使其丧失吸附功能, 失去致病能力是值得探寻的新途径。

田喜凤, 卢思奇. 蓝氏贾第鞭毛虫的细胞骨架. 世界华人消化杂志 2005;13
(12):1434-1436
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1434.asp>

0 引言

蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*)寄生于人和某些哺乳动物的小肠, 引起以腹泻为主要症状的贾第虫病(Giardiasis)。人因误食其成熟包囊而感染。贾第虫呈世界性分布, 是最常见的胃肠道寄生虫。在美国和大多数发达国家, 亦是引起流行性和地方性胃肠不适和腹泻的常见寄生虫。在美国曾将贾第虫称为“头号肠道寄生虫”。估计全世界感染率30%。在发展中国家, 感染人数估计为2.5亿。本虫在我国的流行也相当广泛, 凡是调查过的省市, 均有本虫存在。感染率各地区不等, 1-20%左右。现已证实, 贾第虫也是AIDS患者的机会性感染原虫之一。一项最新的资料显示, 在73例有腹泻症状的AIDS患者中, 12%有贾第虫的感染。AIDS患者感染本虫后, 病情极为严重, 腹泻呈持续性, 一日可高达数十次。其致死原因与隐孢子虫相似^[1]。

虽然, 贾第虫性腹泻已长达几百年之久, 但贾第虫对宿主的损伤机制尚未明了, 较明确的概念是贾第虫的滋养体借助其腹吸盘和鞭毛的协助, 吸附于肠上皮细胞表面, 覆盖小肠黏膜或直接损伤肠黏膜细胞, 使肠微绒毛变短、甚至萎缩, 导致营养物质不能吸收, 肠蠕动流增加, 排出较多的肠内含物, 即形成腹泻。显然, 吸盘和鞭毛是虫体活力和附着于宿主肠上皮细胞所必需的, 而吸盘和鞭毛的主要成分是微丝、微管等细胞骨架, 由此可见, 贾第虫的致病与细胞骨架密切相关。因此, 将研究的焦点集中在贾第虫骨架的作用与毒力的关系上是很有必要的, 本文就贾

第虫细胞骨架方面的研究综述如下。

1 贾第虫的生物学特征

肠道寄生性贾第虫是古老真核细胞的典型样本, 又是一个厌氧的、无线粒体的多鞭毛原虫。除了其医学上的重要性以外, 贾第虫还具有其自身独特的生物学特点: 原核样厌氧代谢使其选择性地对细菌性药物敏感, 特别是硝基咪唑类药物; 一种直接把氧变为水的酶类; 半胱氨酸作为氧化还原反应的平衡维持者; 质粒毒素样基因也是明显的原核样。但与原核生物不同的是: 贾第虫有非常复杂、精细、高度发达的细胞骨架; 有界膜的核; 有端粒重复帽的线状染色体以及在端粒酶位置的基因表达调控^[2]。

2 贾第虫的骨架成分

众所周知, 微丝、微管是细胞骨架的主要成分, 在大多数真核细胞参与细胞形态的维持^[3]。最新研究表明, 蓝氏贾第鞭毛虫虽然是一种较低级的真核生物, 但确有与其他生物相似的微管蛋白及由不同微管结构组成的高度发达的、复杂的细胞骨架系统, 如腹吸盘的螺旋状微管、4对鞭毛微管、中体微管、funis微管(由尾鞭毛的轴丝发出的一种短阵列微丝)及贾第虫素(giardins)和中体素(centrins)。上述结构的协调作用使得蓝氏贾第鞭毛虫得以完成复杂的瓢形运动和其他生理功能^[4-6]。

2.1 吸盘 贾第虫与其他鞭毛虫的一个显著区别是其具有可见的、附着性吸盘。电镜观察显示吸盘是由复杂的微丝及微管组成的吸盘骨架, 呈扁平的、0.4 μm 厚的右手螺旋, 由大约100个同心圆纤维结构组成, 吸盘外缘的微管镶嵌在吸盘侧脊内, 横断面是呈锯齿样的电子致密纤维^[7]。用快速冷冻、断裂、蚀刻及旋转复制等技术分析贾第虫的组织结构, 结果显示: 吸盘区的特征是一层复杂、精细的膜下微管层, 表现为一种开放的、扁平的螺旋状结构, 两个游离端重叠, 紧密的附着在虫体的前部。微丝带(microribbons)为厚约18 nm的平行丝, 由短的横桥连接, 并有大量的颗粒附着(highly organized array of particles)^[8]。视频显微镜(video microscope)也观察到贾第虫的吸附过程, 资料显示腹吸盘主动参与吸附的过程^[9]。其吸附机制主要有两种: (1)机械性吸附: 腹吸盘边缘节律性的收缩和膨胀^[7]及 α 、 β -贾第虫素等骨架蛋白及吸盘边缘的收缩蛋白组成可伸缩的器官, 腹鞭毛搏动的协助, 使滋养体贴附于小肠绒毛上。(2)凝集素作用: 贾第虫表面的凝集素与小肠黏膜表面的凝集素

受体结合而吸附^[10].

2.2 鞭毛 贾第虫属双滴虫目, 滋养体有8根鞭毛, 早先的研究表明: 贾第虫的鞭毛表面是有皱纹的, 而胞体的表面是光滑的、被称之为轴柱的细胞质微管层起源于细胞的顶端, 并延伸至细胞的基部. 鞭毛蛋白是一组30 kD的多肽, 不同于其他蛋白(如: 轴丝蛋白). 用中体蛋白抗体标记全鞭毛虫的大部分结构, 显示了轴丝、有丝分裂纺锤体和一部分鞭毛带. 用微管蛋白抗体及MPM-2表位的抗体标记, 通过透射电镜、免疫荧光显微镜观察确定了这些结构. 微管蛋白抗体标记显示了基体、鞭毛、轴丝和有丝分裂纺锤器内的微管, MPM-2抗体标记显示了纺锤极和纺锤丝附着的鞭毛带的短纤维^[11].

2.3 中体 对贾第虫中体(media body, MB)成分的早期研究是采用抗贾第虫素进行免疫染色, 结果表明中体的骨架蛋白与贾第虫分裂时次级吸盘的形成密切相关, 可能是储存物质以便提供新的吸盘纤维的模板^[7]. Piva, *et al*^[12] 2004年采用去除质膜、常规扫描、场发射高分辨率扫描等技术, 观察了贾第虫中体的结构, 结果显示了贾第虫中体的一些新特征: (1) 中体并非是由一种或两种结构组成, 而是数量、形状、位置都有变化的结构. (3) 与早期的观察不同, 中体是在滋养体的有丝分裂期和间期被发现的. (3) 在80%的虫体内观察到中体, 而不是早先的50%. (4) 中体可与质膜、吸盘、尾鞭毛相连, 因此, 在细胞内不是完全游离的早先认为. (5) 中体还可伸出到细胞表面. (6) 中体的微管可与几种抗-微管蛋白和 β -贾第虫素的抗体作用.

免疫荧光技术显示, 中体蛋白是鞭毛、腹吸盘及2个核相关杆状结构的主要成分, 在滋养体2个核的上方, 即基体的所在处, 都表现出强的光点. Western印迹分析表明中体是单一的、23 kD的多肽. 这一发现证实了中体蛋白的普遍存在, 以及其古老的进化起源. 同时也说明贾第虫细胞骨架的复杂性^[12].

中体蛋白是一种钙结合蛋白, 是EF手性家族的成员之一, 表现为钙敏感收缩行为. 抗中体蛋白染色的鞭毛束的类型随着 Ca^{2+} 浓度的变化而改变, 表明中体蛋白在改变鞭毛束的结构中起重要的作用. 此结果还表明中体蛋白位于微管的关联部位, 以便与其他细胞骨架成分相互作用, 维持细胞极性和运动方向. 钙离子可能参与调节那些含有中体蛋白的形态学结构^[11, 13].

2.4 funis 早期的研究认为, funis即: “paraxonemal fibrils”, 是2层纵向的微管层, 部分包裹虫体尾部的轴丝^[7]. 用高分辨率场发射扫描电子显微镜分析贾第虫的funis结构^[4, 14]. funis是贾第虫近尾部鞭毛轴丝发出的短肋样微管层, 锚定在与尾鞭毛平行的致密杆上. 当尾鞭毛出现后, funis微管就锚定在外质膜上, 形成一膜下纤维层, 以此完成贾第虫尾部的运动^[14].

2.5 贾第虫微管蛋白的多样性 贾第虫属滋养体具有4对鞭毛, 其细胞骨架成分复杂. 用几种单克隆抗体如: 鸡胚胎、布氏锥虫、海胆精子、草履虫 α -微管蛋白及酪氨

酸化的 α -微管蛋白; 鸡胚胎和绒朊菌聚合脑磷脂 β -微管蛋白; 细菌蛋白(Fts Z)的 β -微管蛋白特异的抗体及免疫荧光显微镜观察, 研究其骨架结构的特征. 结果显示, 贾第虫的微管有非常强的免疫原性, 每一种骨架结构都表现为由几种抗体标记的显著类型. 其中, 吸盘是由微管组成的螺旋状结构, 中体也由微管组成(其功能尚不了解), 另有8根鞭毛、轴丝和2个称之为funis的微管层. 这些资料表明, 尽管贾第虫一直被认为是最原始的真核生物, 但确实具有与其他生物类似的多种微管结构(至少在微管蛋白方面是这样)^[6].

3 贾第虫骨架的功能

贾第虫的细胞骨架除了维持虫体的正常形态外, 还具有多种功能.

3.1 贾第虫骨架与运动 贾第虫是如何运动的? 用氨基酸特异的荧光燃料(Alexa)标记的贾第虫滋养体, 经视频显微镜观察显示: 贾第虫向前运动时, 依赖于前、后、腹鞭毛在腹吸盘平面的同步击打, 而尾鞭毛是在与腹吸盘垂直面上摆动. 通过尾鞭毛的运动, 虫体完成在吸盘平面上的翻滚运动, 这种运动是恒定的(持续的), 而不是击打式的. 新的微管在吸盘的螺旋状背脊上形成, 从腹面观察呈顺时针螺旋^[5, 15].

用视频显微镜结合数字图像处理器分析与贾第虫生活史相关的动态过程. 结果显示, 虫体滑行并附着在肠上皮细胞上, 引起贾第鞭虫病. 体外观察附着在玻片上的虫体, 仅两对鞭毛呈现主动击打(波动), 前鞭毛的击打波频率为17-18 Hz, 腹鞭毛的击打频率为8-12 Hz, 尾鞭毛未见主动击打动作. 后鞭毛也未观察到此类运动, 但观察到后鞭毛的振动, 此种振动总是与腹鞭毛的波动相关. 分析表明, 自由运动的虫体在向前移位时, 呈现围绕纵轴的侧翻或完全翻滚. 还观察到虫体尾部区的侧向或背向移位. 此种运动形式不依赖于鞭毛的击打, 而是依靠虫体尾部微管所产生的一种复杂的运动形式. 这些动态观察展示了贾第虫完成瓢形运动功能的形态学基础^[16].

3.2 贾第虫骨架与增殖 采用三维共聚焦显微镜(3DCM)、核染色、抗微管蛋白抗体标记等技术研究贾第虫是如何分裂的. 贾第虫的分裂方式是在腹吸盘水平的一种镜像对称方式. 核分裂的早期征象是周边致密的染色质直接附着在核内膜, 腹吸盘的成分细胞的周边向其中的一个核方向生长, 以此限制此核, 使其位于腹吸盘的凸出部, 确保一对核位于基体的侧面, 当基体复制后, 核分裂全部完成, 结果是虫体右侧的母核成为左侧的子核, 一对核通过核周围的微管纤维连在一起(以防母核和子核得到同一个核的两个拷贝或出现其他畸形)^[4, 15, 17]. 可见贾第虫的增殖与细胞骨架密切相关.

3.3 贾第虫骨架与致病性 研究显示, 细胞骨架的获得是进化中的关键事件. 内骨骼成为原始细胞的内部支持结构, 同时参与动态活动的调节, 如: 肌肉的收缩, 染色

体的分裂运动,纤毛和鞭毛的击打及细胞的移行.就贾第虫而言,对肠上皮细胞的吸附作用是其致病的关键步骤,其中,鞭毛和腹吸盘主动参与了吸附的过程.因此,贾第虫的骨架结构与致病性密切相关.体外实验显示,某些药物可使虫体丧失吸附玻片的能力,这是否与骨架的破坏有关,有待进一步的研究^[9].

4 贾第虫骨架与药物治疗

虽然,治疗贾第虫的方法和药物都在不断改进,但治疗失败的现象屡见不鲜,究其原因主要有两个方面:一是患者对疾病的认识不够,不能按时、足量服药;二是药物种类少、毒副作用大,患者难以耐受.因此,开发和寻找高效、低毒的药物实有必要.其中,药物作用靶点的选择至关重要.就贾第虫而言,与其致病作用密切相关的形态结构、关键的代谢酶、与虫体增殖相关的结构等都应作为首要考虑的问题.目前,评价药物效果的方法主要有:形态学观察^[18];药物抑制浓度(IC₅₀)^[19];基因结构的变化^[20];摄氧量的评价及吸附功能的测定^[21]等.其中,1H-benzimidazole衍生物的合成及抗寄生虫活性的研究表明,大多数化合物的抗寄生虫作用都优于甲硝唑和阿苯达唑,只有衍生物3,9和15可抑制微管蛋白的聚合作用^[22].流式细胞仪评价体外贾第虫滋养体对药物的敏感性也显示,药物对细胞骨架有损伤作用^[23].苯并咪唑类药物敏感株和不敏感株的微管蛋白对苯并咪唑类化合物的再结合力实验表明,苯并咪唑的同系物对虫体的 α 和 β -微管蛋白有再结合能力.敏感株再结合 β -微管蛋白的亲合常数明显高于非敏感株.几种苯并咪唑衍生物(albendazole、Fenbendazole、mebendazole)也在敏感株表现出对单聚体 β -微管蛋白和异二聚体 α - β -微管蛋白的高亲和性.体外实验也观察到对贾第虫 β -微管蛋白的亲合常数.说明苯并咪唑- β -微管蛋白帽可能在微管的生长末端形成,这个帽可阻止微管的延长^[24].另有报道显示,电镜下观察发现苯并咪唑类药物可结合微管,使吸盘解体,影响细胞骨架的功能^[25].

总之,贾第虫的细胞骨架结构复杂,与致病性的关系密切,开发和筛选对细胞骨架有损伤作用的药物均可使贾第虫的吸盘丧失吸附功能,从而使其失去致病能力.因此,将贾第虫的骨架成分作为新药物开发和筛选的靶点是值得探寻和研究的新途径.

5 参考文献

- Sandhu H, Mahajan RC, Ganguly NK. Flowcytometric assessment of the effect of drugs on Giardia lamblia trophozoites in vitro. *Mol Cell Biochem* 2004;265:151-160
- Elmendorf HG, Dawson SC, McCaffery JM. The cytoskeleton of Giardia lamblia. *Int J Parasitol* 2003;33:3-28
- Lin Y P. Cell biology. 2nd ed Beijing: People's Hygiene Publication Agency 2001:108-128
- Correa G, Morgado-Diaz JA, Benchimol M. Centrin in Giardia

- lamblia-ultrastructural localization. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 233:91-96
- Benchimol M, Piva B, Campanati L, de Souza W. Visualization of the funis of Giardia lamblia by high-resolution field emission scanning electron microscopy-new insight. *J Struct Biol* 2004;147:102-115
- Campanati L, Troester H, Monteiro-Leal LH, Spring H, Trendelenburg MF, de Souza W. Tubulin diversity in trophozoites of Giardia lamblia. *Histochem Cell Biol* 2003;119:323-331
- Meyer EA. Human Parasitic Diseases. New York. Oxford: Elsevier Amsterdam pub 1999:17-43
- Kattenbach WM, Diniz Junior JA, Benchimol M, de Souza W. A deep-etch study of the cytoskeleton of Giardia duodenalis. *Biol Cell* 1996;86:161-166
- Campanati L, Holloschi A, Troster H, Spring H, de Souza W, Monteiro-Leal LH. Video-microscopy observations of fast dynamic processes in the protozoan Giardia lamblia. *Cell Motil Cytoskeleton* 2002;51:213-224
- Langford TD, Housley MP, Boes M, Chen J, Kagnoff MF, Gillin FD, Eckmann L. Central importance of immunoglobulin A in host defense against Giardia spp. *Infect Immune* 2002;70:11-18
- Lingle WL, Salisbury JL. Centrin and the cytoskeleton of the protist Holomastigotoides. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997;36:377-390
- Piva B, Benchimol M. The median body of Giardia lamblia: an ultrastructural study. *Biol Cell* 2004;96:735-746
- Belhadri A. Presence of centrin in the human parasite Giardia: a further indication of its ubiquity in eukaryotes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214:597-601
- Carvalho KP, Monteiro-Leal LH. The caudal complex of Giardia lamblia and its relation to motility. *Exp Parasitol* 2004; 108:154-162
- Benchimol M. Mitosis in Giardia lamblia: multiple modes of cytokinesis. *Protist* 2004;155:33-44
- Ghosh S, Frisardi M, Rogers R, Samuelson J. How Giardia swim and divide. *Infect Immune* 2001;69:7866-7872
- Solari AJ, Rahn MI, Saura A, Lujan HD. A unique mechanism of nuclear division in Giardia lamblia involves components of the ventral disk and the nuclear envelope. *Biocell* 2003;27:329-346
- Chavez B, Cedillo-Rivera R, Martinez-Palomo A. Giardia lamblia: ultrastructural study of the in vitro effect of benzimidazoles. *J Protozool* 1992;39:510-515
- Campanati L, Monteiro-Leal LH. The effects of the antiprotozoal drugs metronidazole and furazolidone on trophozoites of Giardia lamblia (P1 strain). *Parasitol Res* 2002;88:80-85
- Cruz A, Sousa MI, Azeredo Z, Leite E, Figueiredo de Sousa JC, Cabral M. Isolation, excystation and axenization of Giardia lamblia isolates: in vitro susceptibility to metronidazole and albendazole. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1017-1020
- Cruz A, Isaura Sousa M, Azeredo Z, Carolina Silva M, Figueiredo de Sousa JC, Manso O, Cabral M. Comparison between two common methods for measuring Giardia lamblia susceptibility to antiparasitic drugs in vitro. *Acta Trop* 2003;88:131-135
- Sousa MC, Poiars-Da-Silva J. A new method for assessing metronidazole susceptibility of Giardia lamblia trophozoites. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2939-3942
- Valdez J, Cedillo R, Hernandez-Campos A, Yopez L, Hernandez-Luis F, Navarrete-Vazquez G, Tapia A, Cortes R, Hernandez M, Castillo R. Synthesis and antiparasitic activity of 1H-benzimidazole derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2002;12:2221-2224
- Sandhu H, Mahajan RC, Ganguly NK. Flowcytometric assessment of the effect of drugs on Giardia lamblia trophozoites in vitro. *Mol Cell Biochem* 2004;265:151-160
- MacDonald LM, Armson A, Thompson AR, Reynoldson JA. Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from Giardia duodenalis, Encephalitozoon intestinalis, and Cryptosporidium parvum. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 138:89-96