

昆明小鼠感染CT1型弓形虫卵囊的虫体分布及病理组织学研究

付晓莹 孔阳光 梁宏德 杨玉荣*

(河南农业大学牧医工程学院动物病理教研室, 郑州 450002)

摘要 为了研究CT1型弓形虫对昆明小鼠病理组织学损伤及其在体内的分布, 分别选择1个卵囊/只、10个卵囊/只、100个卵囊/只的CT1型弓形虫卵囊灌胃昆明小鼠。于不同感染时间点取材, H&E和免疫组化染色检测小鼠体内弓形虫抗原分布。该研究发现, 昆明小鼠易感CT1型弓形虫, 阳性检出率随着卵囊剂量升高分别为13.51%、24.32%、70.27%。绝对致死剂量(lethal dose 100, LD100)为100个卵囊, 感染后9~10 d死亡; CT1型弓形虫卵囊最早在感染后0.5 h入侵小鼠各组织, 虫体检出率最高的组织是肠系膜淋巴结。昆明小鼠在急性感染期主要表现为血管周围炎, 度过急性期后继续存活的小鼠转为慢性感染且在大脑中观察到了大量组织包囊。该研究通过观察CT1型弓形虫对昆明小鼠的致病性及其在各组织的动态分布, 以期为我国弓形虫病的流行病学和致病机理研究提供理论依据。

关键词 弓形虫; 昆明小鼠; 卵囊; 虫体分布; 病理损伤

Distribution of Tachyzoite and Histological Lesions in Kunming Mice Infected CT1 Strain of *Toxoplasma gondii*

Fu Xiaoying, Kong Yangguang, Liang Hongde, Yang Yurong*

(Animal Pathology, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract To study the distribution of tachyzoite and histological lesions in Kunming mice infected CT1 strains of *Toxoplasma gondii*, 1 oocyst/mice, 10 oocysts/mice and 100 oocysts/mice of CT1 *Toxoplasma gondii* were fed to Kunming mice. Mice were killed at different times after inoculation. Tissues were sampled and stained by H&E and immunohistochemistry (IHC) to observe the distribution of tachyzoite in Kunming mice. This study found that Kunming mice were susceptible to CT1 strain *Toxoplasma gondii*. The positive rate were 13.51%, 24.32% and 70.27% with increasing oocyst dose. Lethal dose 100 (LD100) is 100 oocysts and mice were died during 9~10 days after inoculation (DAI); within 0.5 h after inoculation (HAI), sporozoites had excysted and penetrated some tissue of Kunming mice, the highest rate of tachyzoites positive tissue was mesenteric lymph nodes. There was widespread perivascular inflammation in acute infection period, and numerous cysts were found in the mice brain in chronic infection period. By observing the pathogenicity and dynamic distribution in organs of Kunming mice infected with CT-1 *Toxoplasma gondii*, this study provided basis for the research about *Toxoplasma gondii* epidemiology and pathogenic mechanism in the further.

Keywords *Toxoplasma gondii*; Kunming mice; oocyst; distribution of tachyzoite; histopathological lesion

收稿日期: 2015-06-29 接受日期: 2015-08-24

国家自然科学基金(批准号: 30800812)资助的课题

*通讯作者: Tel: 0371-63558180, E-mail: yangyu7712@sina.com

Received: June 29, 2015 Accepted: August 24, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30800812)

*Corresponding author. Tel: +86-371-63558180, E-mail: yangyu7712@sina.com

网络出版时间: 2015-10-20 17:40:18

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151020.1740.006.html>

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是一种呈世界性分布的细胞内寄生原虫,可感染包括人类在内的几乎所有恒温动物,引起弓形虫病^[1]。弓形虫基因型传统分类有:I、II、III型以及非典型基因型。各型之间致病力有很大差异,I型虫株对远交小鼠和免疫抑制患者有很强的致病性^[2]。目前已从全世界分离到的1 457个虫株中,确定了189个基因型(<http://ToxoDB.org>)。关于不同基因型弓形虫对昆明小鼠的致病性研究尚未见报道,且我国动物和人弓形虫感染率远低于欧洲、美洲。本研究选用属于I型强毒株——CT1型虫株感染我国特有的远交鼠(昆明小鼠),观察CT1型弓形虫的致病性及其在各组织的动态分布,以期为我国弓形虫病的流行病学研究提供相关依据,并有助于进一步了解弓形虫致病机理。

1 材料与方法

1.1 弓形虫虫株与抗体

弓形虫CT1型卵囊(I型强毒株)、兔抗弓形虫多克隆抗体受赠于美国农业部寄生虫实验室Dubey课题组。猫粪便中弓形虫卵囊的实验室获取及纯化参考文献[3],主要是将小鼠体内的CT1弓形虫包囊喂予弓形虫阴性的猫,收集猫粪便,收集并纯化弓形虫卵囊。

1.2 实验动物及分组

4周龄健康昆明小鼠118只,雌雄各半,购于郑州大学实验动物中心。小鼠随机分为感染组I、感染组II、感染组III,每组37只;另设阳性对照组4只,空白对照组3只,分笼饲养,正常采食饮水。三个感染组每只小鼠分别灌胃含1个、10个、100个卵囊的溶液1 mL,阳性对照组每只小鼠灌胃含 1.0×10^4 卵囊的溶液1 mL,空白对照组小鼠灌胃无菌生理盐水。

1.3 取材时间和观察指标

接种卵囊后0.5, 2, 4, 6 h及1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 d, 随机

采取每个感染组小鼠3只,取小肠、大肠、肠系膜淋巴结、大脑、眼球、舌、心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、膀胱和生殖器官,于10%中性福尔马林中固定。感染后每天观察小鼠,记录发病和死亡情况,自然死亡小鼠固定脏器,7 d后仍存活的小鼠于第50 d剖杀取材,常规病理学制片,H&E及免疫组化染色,显微镜下观察各组织病理变化及弓形虫抗原分布情况。

1.4 数据处理

运用SPSS 19.0软件通过单因素分析法进行统计学处理,所有数据均用“平均值±标准误”表示, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 感染小鼠发病情况

感染组小鼠在24 HAI(hours after inoculation)开始表现为精神沉郁,喜卧,采食、饮水量下降,被毛逆立,弓背,感染组III在9 DAI(days after inoculation)和10 DAI各自然死亡一只小鼠。阳性对照组小鼠在7 DAI全部死亡,并检测到弓形虫速殖子。三个感染组除了定时处死之外剩余的小鼠能度过急性期感染逐步恢复而长期存活。空白对照组小鼠未见异常(表1)。此结果提示,昆明小鼠对CT1型弓形虫卵囊易感。

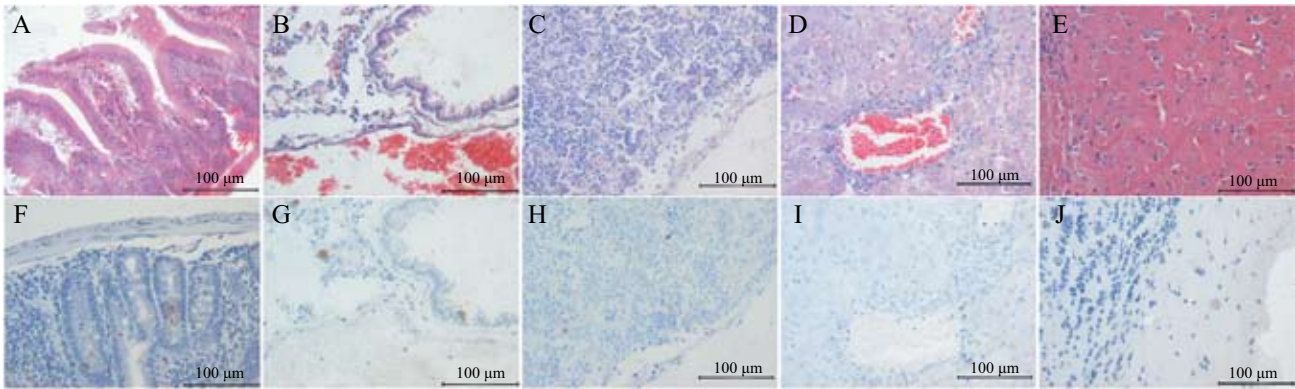
2.2 小鼠的病理学观察

将各时间点的小鼠脏器组织进行剖检取材,眼观可见:肺出血,小肠(尤其是回肠段)肠壁变薄充血且内部充盈有大量稀薄液体,脾和肠系膜淋巴结肿大。镜下可见:回肠黏膜上皮细胞坏死,脱落,黏膜固有层血管出血(图1A);肺血管周围炎明显,肺泡壁毛细血管扩张充血,可见弓形虫假包囊,肺泡腔内浸润有淋巴细胞(图1B);肠系膜淋巴结充血、淋巴细胞坏死,可见弓形虫滋养体(图1C);部分肝细胞坏死,汇管区有炎性细胞浸润,典型的血管周围炎(图1D)。

表1 昆明小鼠灌胃不同剂量CT1型弓形虫卵囊的发病情况

Table 1 Pathogenicity of the CT1 strain of *Toxoplasma gondii* oocysts on Kunming mice

饲喂卵囊数量 No. of oocysts fed	小鼠发病情况 Pathogenicity of mice					
	接种小鼠个数 No. of mice inoculation	感染小鼠个数 No. of mice infection	阳性率(%) Positive rate (%)	死亡个数 No. of died	死亡率(%) Mortality (%)	存活天数 Days of survival
						范围 Range
1×10^4	4	4	100.00	4	100.00	7
100	37	26	70.27	2	5.41	9~10
10	37	9	24.32	0	—	—
1	37	5	13.51	0	—	—



A、F: 回肠; B、G: 肺; C、H: 肠系膜淋巴结; D、I: 肝; E、J: 大脑。A~E为HE染色, F~J为IHC染色。
A,F: ileum; B, G: lung; C,H: mesenteric lymph nodes; D,I: liver; E,J: brain. A~E showed HE staining, and F~J showed IHC staining.

图1 昆明小鼠病理组织学观察及弓形虫在各组织的阳性表达

Fig.1 Histopathological observation on Kunming mice and positive expression of *Toxoplasma gondii* in tissues

表2 各组织最早出现虫体的时间点
Table 2 The time of tachyzoites first appeared in organs

组别 Group	肠系膜 淋巴结 Mesenteric lymph nodes	大脑 Brain	眼球 Eye	舌头 Tongue	肝 Liver	心 Heart	脾 Spleen	肺 Lung	肾 Kidney	肾上腺 Paranephros	骨骼肌 Skeletal muscle	睾丸 Testis	卵巢 Ovary
Group I	0.5 h	—	0.5 h	—	2 h	0.5 h	0.5 h	—	—	—	0.5 h	—	—
Group II	0.5 h	0.5 h	0.5 h	6 h	0.5 h	6 h	0.5 h	—	0.5 h	—	0.5 h	—	6 h
Group III	0.5 h	1 d	2 h	6 d	—	4 h	4 h	3 d	1 d	6 d	3 d	4 d	—

在度过急性期存活至50 d的小鼠大脑中, 可见含有缓殖子的包囊(图1E)。

2.3 弓形虫在小鼠各脏器的分布

随着弓形虫卵囊感染剂量的升高, 阳性检出率也逐渐升高(表1), 感染组III在每个时间点均有小鼠感染。所有组织器官中弓形虫检出率从高到低依次为肠系膜淋巴结(33.33%)>脾(10.81%)>骨骼肌(6.31%)>心(5.41%)>眼球(5.41%)>大脑(4.50%)>肝(3.60%)>肾(3.60%)>舌(1.80%)>肺(1.80%)>肾上腺(0.90%)。在急性感染期阳性小鼠中, 回肠肠腺细胞内可见有染为棕黄色的弓形虫虫体和假包囊(图1F); 肺、淋巴结和肝中也可见圆形的假包囊(图1G~图1I); 存活至50 d的小鼠大脑中可见包囊(图1J)。通过免疫组化结果统计, 三个感染组小鼠在各器官最早检测出虫体的时间见表2。

2.4 CT1型弓形虫在昆明小鼠体内的复制

将存活至50 d的小鼠剖杀, 大脑压片检测发现, 大脑中有弓形虫包囊。将该小鼠大脑的研磨液经皮下注射给4只健康昆明小鼠, 全部死亡, 肺弓形虫速殖子阳性, 存活时间为(9.50±0.50) d。继续将肺研磨液皮下注射给另4只健康的昆明小鼠, 全部死亡, 存

活时间为(10.25±0.48) d, 且肺均检测到弓形虫速殖子。完成了小鼠体内缓殖子向速殖子、速殖子继续分裂速殖子的生殖过程。但经数据分析, 弓形虫两种感染方式对小鼠平均存活时间没有显著差异。

3 讨论

弓形虫感染的动物模型在研究弓形虫对宿主的入侵、感染与免疫、弓形虫病的诊断等方面研究具有重要意义。国际上已经建立急性弓形虫病模型, 常用的实验小鼠有Balb/c小鼠、Swiss小鼠以及一些基因敲除小鼠。昆明小鼠为中国特有的远交鼠, 国内目前尚没有关于CT1型弓形虫卵囊灌胃昆明小鼠的报道。经口感染卵囊是人和动物主要的感染途径之一^[4]。摄取卵囊后, 弓形虫孢子体会在小肠中脱囊并在2 h后入侵肠上皮细胞^[5], 通过血液和淋巴液入侵机体各组织的有核细胞^[6]。

CT1型弓形虫为I型强毒株, 对远交小鼠和近交小鼠的灌胃卵囊LD100均为每只小鼠1个卵囊^[6]。而本研究仅在感染组III中出现自然死亡小鼠, 占5.71%。这个升高的卵囊致死量提示, 昆明小鼠对于CT1型弓形虫可能具有一定的适应性。免疫组化

染色结果显示,从感染组I到感染组III,随着剂量的升高,阳性检出率也逐渐升高,且感染组III在每个时间点均有小鼠感染,说明卵囊的剂量直接影响小鼠阳性检出率。有文献报道,CT1型弓形虫卵囊灌胃Balb/c小鼠后,最早在4 DAI时脾出现阳性;6 DAI时肝、肺、脾出现阳性;7 DAI时大脑、心、肝、肺、脾出现阳性^[7]。本研究发现,0.5 HAI的小鼠多个组织器官出现弓形虫阳性。在7 DAI时,呈弓形虫阳性的器官数量减少。这个结果提示,CT1型弓形虫卵囊最早入侵昆明小鼠的时间是0.5 h或者早于0.5 h,且昆明小鼠具有清除体内CT1型弓形虫的能力,这种现象也在其他小鼠中报道过^[8]。

有研究报道,Balb/c小鼠感染弓形虫后呈一过性急性发作,绝大多数小鼠能度过急性期逐步恢复而长期存活^[9]。本研究证实,昆明小鼠感染CT1型弓形虫卵囊后也呈一过性急性反应阶段,随后进入慢性感染期。小鼠感染弓形虫卵囊后在急性期会死于肠炎^[10],这与本研究自然死亡小鼠表现基本一致。此外,组织损伤最严重的是肺,主要表现为血管周围炎,肺泡壁毛细血管扩张充血、浸润炎性细胞。但其弓形虫检出率不是最高;而在弓形虫检出率最高的肠系膜淋巴结,其组织损伤程度也不是最严重的。虫体检出率与器官损伤并非一一对应关系,说明昆明小鼠各器官对于CT1型弓形虫的适应性有差异。同时,从急性感染病例中较低的死亡率和阳性检出率提示,昆明小鼠对CT1型弓形虫具有适应能力。慢性感染期小鼠(≥ 50 DAI)大脑内形成了组织包囊,这可能由于昆明小鼠经过较长时间的进化,具有某种清除弓形虫的能力,使虫体能够与机体共存。

将慢性感染小鼠大脑组织包囊皮下注射到健康昆明小鼠并引起了小鼠死亡(100%),完成了小鼠体内缓殖子向速殖子的转换。肺研磨液中的CT1型弓形虫速殖子皮下注射小鼠,导致昆明小鼠发病并死亡(100%),且主要侵袭脏器为肺,证明了CT1型弓形虫速殖子对昆明小鼠具有较强的致病性。肺内速殖子皮下注射小鼠的存活时间与大脑内缓殖子皮下注射小鼠存活时间比较,没有显著性差异($P>0.05$)。

本研究结果表明,昆明小鼠对CT1弓形虫强毒株有一定的适应和清除能力,这是否与我国人类和动物弓形虫感染率低的现象有关有待进一步探讨。此外,由于本研究动物数量、切片数量有限,可能会造成一些偏差,这些还需进一步完善和验证。不同基因型弓形虫在不同类型小鼠体内的感染规律以及对小鼠的致病性有所差异,本研究为我国弓形虫虫株的种群进化、致病机制及疫苗研发提供相关实验依据。

参考文献 (References)

- 1 Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: High prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 2012; 139(11): 1375-424.
- 2 Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 1995; 172(6): 1561-6.
- 3 Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and humans, 2 editions. Taylor and Francis Group, CRC Press: Boca raton, 2010: 1-313.
- 4 Boyer K, Hill D, Mui E, Wroblewski K, Karrison T, Dubey JP, et al. Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital toxoplasmosis and causes epidemics in North America. *Clin Infect Dis* 2011; 53(11): 1081-9.
- 5 Dubey JP. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: Stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* 1997; 44(6): 592-602.
- 6 Speer C, Dubey J. Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology* 1998; 116(Pt 1): 35-42.
- 7 Dubey JP, Ferreira LR, Martins J, McLeod R. Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: Effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. *Parasitology* 2012; 139(1): 1-13.
- 8 Zenner L, Foulet A, Caudrelier Y, Darcy F, Gosselin B, Capron A, et al. Infection with *Toxoplasma gondii* RH and Prugniald strains in mice, rats and nude rats: kinetics of infection in blood and tissues related to pathology in acute and chronic infection. *Pathol Res Pract* 1999; 195(7): 475-85.
- 9 李永念, 包怀恩. 刚地弓形虫感染昆明种及 Balb/c 小鼠的病理特征研究. 中国现代医学杂志(Li Yongnian, Bao Huaen. Study of pathological characteristics in Kunming mice and Balb/c mice infected with toxoplasma gondii. *China Journal of Modern Medicine*) 2009; 19: 665-7.
- 10 Dubey J, Frenkel J. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. *J Parasitol* 1973; 59(3): 505-12.