

潘氏细胞在昆明小鼠弓形虫病发病过程中的变化

张琼方 付晓莹 王 凯 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 每只昆明小鼠灌胃 1×10^4 个弓形虫卵囊, 分别在灌胃后1, 3, 5, 6 DAI(days after inoculation), 采用H&E方法和免疫组织化学方法对小鼠回肠潘氏细胞的变化以及弓形虫在回肠的分布和数量进行研究, 探讨潘氏细胞(paneth cells, PCs)在弓形虫感染期间的变化。结果发现, 回肠隐窝总数、含PCs的隐窝数、PCs总数及颗粒总数呈先增加后迅速减少至消失的趋势, 回肠后段表现明显, 6 DAI各参数与对照组比较差异显著($P < 0.05$)。弓形虫在回肠中的分布面积呈增大趋势, 6 DAI与1 DAI、3 DAI相比差异显著($P < 0.05$)。该研究结果表明, 弓形虫卵囊感染昆明小鼠可减少回肠潘氏细胞及其分泌颗粒的数量, 为以小肠潘氏细胞为基础的弓形虫病的防治提供了实验依据。

关键词 昆明小鼠; 回肠; 弓形虫; 潘氏细胞

The Change of Paneth Cells in the Toxoplasmosis of Kunming Mice

Zhang Qiongfang, Fu Xiaoying, Wang Kai, Liang Hongde, Yang Yurong*

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

Abstract 1×10^4 *Toxoplasma gondii* oocysts were fed to Kunming mice orally. Clinical symptoms and lesions were observed on 1, 3, 5, 6 days after inoculation (DAI). Ileal lesions, the distribution and quantity of *T. gondii*, the change of paneth cells (PCs) and granules were checked by H&E and immunohistochemical staining. The results showed that the total number of crypts, crypts containing PCs, PCs and granules in ileum were increased first, then decreased explosively, especially in the distal ileum, compared to the control group ($P < 0.05$). The positive area of *T. gondii* in the ileum was increased. Compared with 1 DAI or 3 DAI, the positive area of *T. gondii* was the highest at 6 DAI ($P < 0.05$). The results indicated that *T. gondii* oocysts had a significant influence on PCs of Kunming mice, which providing an experimental basis for the prevention and treatment of toxoplasmosis based on small intestine PCs.

Keywords Kunming mice; ileum; *Toxoplasma gondii*; paneth cell

弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是世界性广泛分布的细胞内寄生原虫, 几乎可以感染所有恒温动物^[1]。动物食用弓形虫卵囊污染的食物或水, 或者食用未煮熟的带有弓形虫组织包囊的生肉都可以感染弓形虫^[2]。对中间宿主来说, 卵囊是弓形虫感染率和致病

力最强的发育阶段^[3], 小鼠经口感染弓形虫后可引起严重的肠道炎症反应^[4]。

潘氏细胞(paneth cells, PCs)位于小肠隐窝的底部, 细胞顶部有大量粗大的嗜酸性分泌颗粒, 富含 α -防御素、溶菌酶、磷脂酶A2(phospholipase A2, PLA2)、血管生成因子等, 具有抑制细菌、病毒和寄生虫生长的作用^[5-7]。潘氏细胞在控制微生物穿透肠道屏障方面起重要作用, 参与维持肠腔宿主细胞与微生物的稳态。

Foureau等^[8]报道, 弓形虫感染后, 经TLR9受体调节肠道细胞及潘氏细胞表达IFN- α 和IFN- β , 上调隐窝素(cryptdin, Crp)表达, 诱导潘氏细胞脱颗粒, 但

收稿日期: 2015-06-17 接受日期: 2015-09-07

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 17, 2015 Accepted: September 7, 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: 2015-10-22 15:57:20

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151022.1557.006.html>

在弓形虫感染过程中, 潘氏细胞及其颗粒的变化过程尚未见报道。本文应用经口感染弓形虫的昆明小鼠, 研究回肠内潘氏细胞及其颗粒的变化情况来探讨潘氏细胞在小鼠弓形虫病过程中的作用和影响, 为以小肠潘氏细胞为基础的弓形虫病的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂

兔抗弓形虫多克隆抗体、TOXDB#216弓形虫卵囊受赠于美国农业部Dubey实验室, HRP标记羊抗兔IgG购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组及动物感染 6~8周龄健康昆明小鼠随机分为感染组和对照组, 感染组30只, 对照组20只, 分笼饲养。对照组小鼠灌胃无菌生理盐水0.5 mL/只。感染组小鼠灌胃基因型为TOXDB#216弓形虫卵囊 1×10^4 /只。

1.2.2 样品的采集与处理 每日观察小鼠精神状态。参考Dubey报道的弓形虫强毒株卵囊对远交小鼠的致病性^[9-10]进行取材。小鼠分别于接虫后第1, 3, 5 DAI(days after inoculation)随机处死5只, 分别取回肠前段、中段、后段各1 cm, 固定于10%的中性福尔马林溶液中。实验期间自然死亡的小鼠, 也进行同样的取材。常规石蜡切片, 厚度5 μm , H&E染色和免疫组织化学染色(immunohistochemical staining, IHC)。

1.2.3 潘氏细胞的观察 每个样品选择染色良好、结构清晰的肠管横切面, 对回肠各段横切面中的隐窝数量、含潘氏细胞的隐窝数量、潘氏细胞总数、颗粒总数、平均每个隐窝中潘氏细胞的数量以及平均每个潘氏细胞中颗粒的数量进行统计。平均每个隐窝中潘氏细胞的数量利用横切面潘氏细胞总数/隐窝总数来计算。平均每个潘氏细胞中颗粒数量利用横切面潘氏细胞中颗粒总数/潘氏细胞总数计算^[11]。

1.2.4 虫体在肠道的分布和数量以及对肠道损伤的关系 显微镜下观察IHC切片中侵染不同时间后弓形虫在肠道的分布和数量的变化。应用Leica DFC320显微图像分析系统, 每张IHC染色切片随机取6个视野, 测定弓形虫平均阳性面积。

1.2.5 数据处理 运用GraphPad Prism 5软件进行

统计学处理, 比较各组间的差异, 所有数据均用“平均值 $\pm$ 标准误”表示。

2 结果

2.1 临床症状

1 DAI~3 DAI: 实验组小鼠被毛光滑, 精神状态正常; 4 DAI: 小鼠精神不佳; 5 DAI: 小鼠精神沉郁、弓背、被毛逆立, 15%小鼠自然死亡; 6 DAI: 小鼠100%自然死亡。对照组小鼠未见异常。

2.2 病理组织学变化

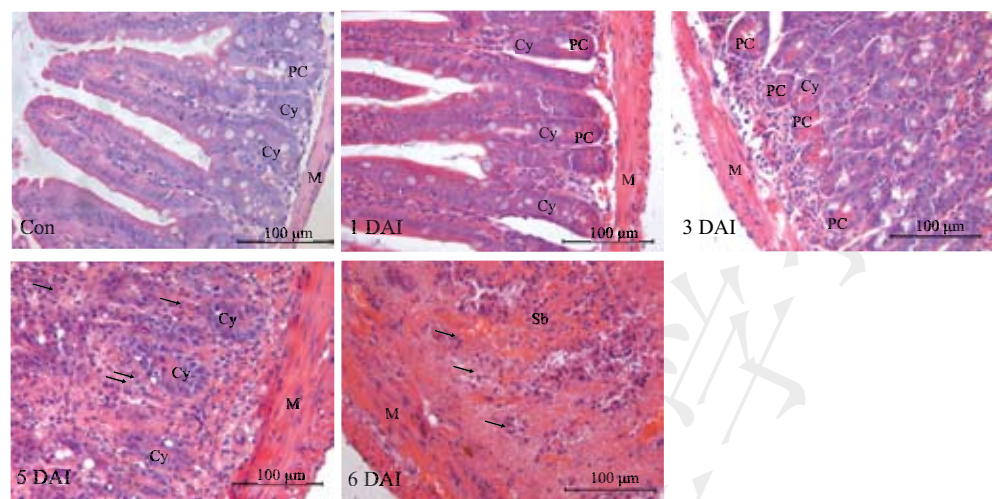
图1为不同DAI小鼠病理组织学的结果。1 DAI小鼠其回肠隐窝基部可见少量聚集的潘氏细胞和颗粒。3 DAI小鼠其回肠黏膜层充血, 固有层增厚, 淋巴细胞浸润, 隐窝基部潘氏细胞及其顶端的嗜酸性颗粒明显增多。5 DAI小鼠其回肠中后段肠腔充满水肿物质, 淋巴滤泡内淋巴细胞坏死, 固有层显著增厚, 固有层充血、出血。隐窝萎缩, 前段和中段不及后段严重。有的小鼠回肠黏膜层细胞坏死, 细胞核溶解, 细胞间界限不清。少数小鼠回肠潘氏细胞颗粒丰富, 腺腔内可见从潘氏细胞脱出的嗜酸性颗粒; 多数小鼠回肠隐窝基部潘氏细胞大量减少, 残留的潘氏细胞内颗粒变碎小。回肠各层及淋巴滤泡内大量弓形虫侵入, 隐窝也有弓形虫侵入。6 DAI小鼠其回肠中后段固有结构消失, 隐窝破坏严重。

2.3 回肠潘氏细胞的变化

昆明小鼠经灌胃感染弓形虫卵囊后, 回肠前段隐窝数、含PCs的隐窝数、潘氏细胞总数及总颗粒数都呈现先增多后减少的趋势, 隐窝数量5 DAI最多, 1 DAI最少, 与对照组比较差异不显著。含PCs的隐窝数6 DAI最少, 5 DAI次少, 且6 DAI和5 DAI与对照组比较差异均显著($P < 0.05$)。横切面潘氏细胞总数和颗粒总数3 DAI达到最多, 6 DAI最少, 与对照组比较差异均不显著(表1)。

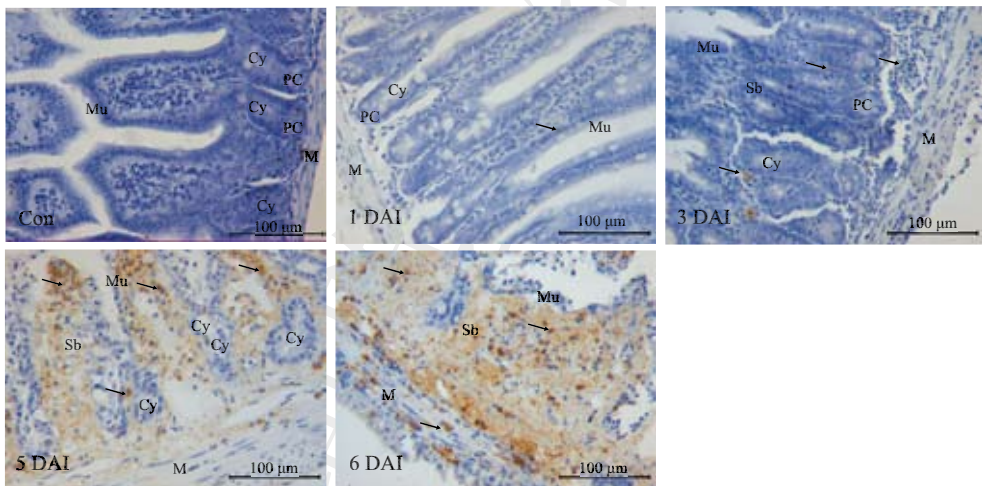
回肠中段隐窝及潘氏细胞的变化呈先增多后减少的趋势。隐窝数5 DAI达到最多, 6 DAI最少, 与对照组比较无统计学差异。含潘氏细胞的隐窝数、潘氏细胞总数6 DAI最少, 与对照组比较差异显著($P < 0.05$)。潘氏细胞颗粒总数3 DAI最多, 6 DAI最少, 与对照组比较无统计学差异(表1)。

小鼠回肠后段各项指标呈现出明显的先增加后减少的趋势。回肠后段隐窝数前5 d无明显变化, 到6 DAI急剧减少, 且与对照组比较差异极显著



Con: 小鼠回肠后段, 对照组; 1 DAI: 回肠后段; 3 DAI: 回肠后段, 潘氏细胞增生; 5 DAI: 回肠后段, 肠腺萎缩; 6 DAI: 回肠后段, 固有结构消失(开放箭头)。PC: 潘氏细胞; Cy: 隐窝; Sb: 黏膜下层; M: 肌层。箭头表示弓形虫速殖子。H&E染色。
Con: distal ileum of mice, control group; 1 DAI: distal ileum; 3 DAI: distal ileum, hyperplasia of paneth cells; 5 DAI: distal ileum, crypts atrophy; 6 DAI: distal ileum, architectonic disappear (open arrow). PC: paneth cell; Cy: crypt; Sb: submucosa; M: tunica muscularis. Arrow: tachyzoites of *T. gondii*. H&E staining.

图1 昆明小鼠弓形虫病回肠后段病理变化
Fig.1 Pathological changes of the distal ileum in the toxoplasmosis of Kunming mice



Con: 小鼠回肠后段, 对照组; 1 DAI: 回肠后段, 黏膜上皮细胞可见弓形虫; 3 DAI: 回肠后段, 固有层可见少量弓形虫; 5 DAI: 回肠后段, 固有层大量弓形虫; 6 DAI: 回肠后段, 黏膜下层、肌层分布大量弓形虫。PC: 潘氏细胞; Cy: 隐窝; Mu: 黏膜; Sb: 黏膜下层; M: 肌层。箭头表示弓形虫速殖子。IHC染色。
Con: distal ileum of mice, control group; 1 DAI: distal ileum, *T. gondii* in intestine epithelial cell; 3 DAI: distal ileum, little *T. gondii* in lamina propria; 5 DAI: distal ileum, heavy *T. gondii* load in lamina propria; 6 DAI: distal ileum, heavy *T. gondii* load in submucosa and tunica muscularis. PC: paneth cell; Cy: crypt; Mu: mucosa; Sb: submucosa; M: tunica muscularis. Arrow: tachyzoites of *T. gondii*. IHC staining.

图2 弓形虫在昆明小鼠回肠后段的分布
Fig.2 The distribution of *T. gondii* in the distal ileum of Kunming mice

($P<0.01$)。含潘氏细胞的隐窝数5 DAI和6 DAI急剧减少, 且与对照组比较差异极显著($P<0.01$)。横切面潘氏细胞总数和颗粒总数5 DAI和6 DAI明显减少, 且与对照组比较差异显著($P<0.05$)。单个隐窝中的潘氏细胞数6 DAI时最少, 与对照组比较无统计学差异。单个潘氏细胞中的颗粒数6 DAI最少, 与对照组

比较差异显著($P<0.05$)(表1)。
2.4 虫体在肠道的分布以及与肠道损伤的关系
随着感染时间的增加, 回肠弓形虫分布面积呈增大趋势, 1 DAI和3 DAI差异无显著性, 5 DAI和6 DAI明显高于1 DAI和3 DAI($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(表2)。
免疫组织化学染色结果发现, 昆明小鼠回肠后

表1 小鼠回肠隐窝、潘氏细胞及其颗粒的变化

Table 1 The change of crypts, paneth cells and granules in the ileum of Kunming mice

参数 Parameter	回肠 Ileum	对照组 Control group	1 DAI	3 DAI	5 DAI	6 DAI
No. of crypts	Front	164.67±11.39	131.60±8.26	180.80±22.90	199.00±36.77	139.40±10.65
	Middle	169.67±11.70	118.40±8.88	167.40±22.62	232.20±30.44	102.00±18.93
	Distal	145.33±0.67	132.80±18.30	150.80±7.86	160.60±27.02	45.80±14.50**
No. of crypt contain PCs	Front	125.00±7.23	97.20±3.14	122.40±17.11	57.00±19.79*	49.60±13.88*
	Middle	127.00±13.61	87.60±11.30	103.80±16.23	79.60±13.01	42.40±14.56*
	Distal	92.33±13.25	74.00±8.48	90.20±13.27	15.80±6.33**	2.40±1.94**
No. of PCs	Front	349.67±22.48	319.20±16.11	427.40±60.07	269.40±92.60	149.60±47.30
	Middle	396.67±31.17	293.20±47.94	353.80±88.92	264.60±57.07	120.00±57.08*
	Distal	213.00±44.14	203.80±39.08	276.20±65.52	43.20±19.39*	13.20±11.31*
No. of granules	Front	3 302.67±313.11	3 284.20±218.47	5 235.40±865.93	2 601.20±943.43	1 692.60±640.50
	Middle	3 985.67±432.91	3 211.20±582.45	4 448.60±1 750.46	3 903.40±938.63	1 122.80±456.12
	Distal	2 564.67±669.88	2 022.00±441.37	3 188.60±748.35	567.80±292.96	129.40±114.53*
No. of PCs in one crypt	Front	2.80±0.05	3.30±0.22	3.51±0.28	5.30±1.03	2.82±0.57
	Middle	3.16±0.20	3.30±0.17	3.24±0.28	3.23±0.30	2.13±0.66
	Distal	2.25±0.19	2.69±0.32	2.90±0.33	1.94±0.52	1.46±1.12
No. of granules in one PC	Front	9.47±0.87	10.41±0.87	12.16±1.02	8.95±0.77	9.17±1.71
	Middle	10.05±0.68	10.92±0.69	11.51±1.48	14.17±1.95	8.20±2.37
	Distal	11.67±0.97	9.81±0.52	11.47±1.08	9.94±2.13	4.34±2.83*

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组相比较。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the control group.

表2 回肠弓形虫阳性面积百分比

Table 2 The percentage of positive area of *T. gondii* in ileum

回肠 Ileum	对照组 Control group	1 DAI	3 DAI	5 DAI	6 DAI
Front ileum	—	1.14±0.23	1.13±0.19	4.83±1.59*	5.06±0.98*
Middle ileum	—	0.83±0.27	0.87±0.30	6.63±2.44*	9.03±2.21*
Distal ileum	—	1.40±0.27	1.33±0.19	7.74±2.93*	11.99±1.92**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与1 DAI组相比较。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the 1 DAI group.

段虫体明显多于其他肠段(图2)。1 DAI单个虫体出现于黏膜上皮细胞内; 3 DAI速殖子或假包囊散在性地分布于淋巴滤泡和黏膜层内。5 DAI和6 DAI回肠后段虫体及分泌物呈片分布于肠道各个位置, 包括黏膜层, 黏膜下层、肌层和淋巴滤泡内。黏膜层分布最多, 损伤也最严重。

3 讨论

昆明小鼠灌胃TOXDB#216弓形虫卵囊5 d后, 根据临床症状及全身病理组织学变化(数据尚未发表), 小鼠出现明显的症状及病变, 且回肠后段炎症较重, 推测回肠后段是弓形虫复制和入侵的主要场所之一。

潘氏细胞是肠道天然黏膜免疫中关键的细胞之一。从昆明小鼠感染弓形虫后回肠隐窝总数前期增多后期迅速减少可推测, 昆明小鼠感染弓形虫卵囊后, 首先刺激小肠隐窝的增生, 而后期弓形虫的快速繁殖引起细胞大量坏死, 破坏了小肠隐窝的完整性。小鼠感染弓形虫的初期含PCs的隐窝总数、横切面PCs总数及颗粒总数先增多, 后又迅速减少, 可见昆明小鼠通过灌胃卵囊感染弓形虫后, 首先刺激了潘氏细胞的增生以及潘氏细胞颗粒的合成, 后又诱导潘氏细胞脱颗粒并破坏潘氏细胞。尚未见关于弓形虫诱导潘氏细胞增生的报道。Rodriguez等^[12]报道沙门氏菌感染时潘氏细胞增生, 预示急性肠炎的发生, 类似炎症中中性粒细胞的增生, 但其机制尚不

明确。小鼠感染弓形虫5 d, 其潘氏细胞颗粒总数锐减, 推测颗粒是迅速脱出的过程, 一个隐窝中的潘氏细胞一次性全部脱颗粒, 有的只残存少量未脱颗粒的潘氏细胞。6 DAI小鼠100%因感染弓形虫自然死亡, 小鼠感染弓形虫后, 隐窝的坏死和潘氏细胞的坏死已经很严重, 未进行脱颗粒的潘氏细胞坏死, 所在的隐窝也大量发生坏死。潘氏细胞在小鼠感染弓形虫的前期有增生现象, 而后期脱颗粒以及被破坏后没有再生, 可能是因为弓形虫破坏了肠道干细胞, 导致潘氏细胞不能再生, 也可能是因为损伤的潘氏细胞还未再生, 小鼠已经由于严重的肠炎而死亡。而对于弓形虫是否影响肠道干细胞分化为潘氏细胞, 目前尚不清楚, 今后将采用弓形虫弱毒株进一步研究。

关于弓形虫对小肠的损伤和潘氏细胞之间的关系, 报道较少。Raetz等^[13]发现, 弓形虫经TLR11调节Th1细胞IFN- γ 的产生, 诱导潘氏细胞死亡, 从而导致肠道内稳态失调。Wilhelm等^[14]通过无菌小鼠研究发现, 弓形虫感染后重塑肠道菌群, 诱导大肠杆菌易位, 启动Th1细胞免疫反应, 进而引起IFN- γ 依赖的病理反应, 表现为潘氏细胞缺失, 因缺失潘氏细胞及其分泌的抗菌物质, 大肠杆菌数量急剧扩张, 肠道菌群内稳态失调, 进而引起严重的回肠炎反应及病理损伤。Villeret等^[15]发现, 抑制IL-1R1信号途径, 可去除弓形虫感染引起的潘氏细胞缺失。但是在弓形虫经回肠感染过程中, 潘氏细胞缺失的机制及其在弓形虫致病过程中的影响还不明确。

随着昆明小鼠感染弓形虫时间的延长, 弓形虫在肠道内的增殖速度越来越快, 且虫体可侵袭肠道各层。弓形虫阳性面积越大的肠段对应的H&E切片中肠道的损伤也越严重, 特别是黏膜层的损伤, 说明弓形虫的繁殖对小鼠肠道各层尤其是黏膜层的损伤有着密切的关系。潘氏细胞数量的变化与回肠弓形虫分布面积的变化负相关, 特别是回肠后段。可推断弓形虫的繁殖对小肠隐窝及潘氏细胞都有影响, 弓形虫可诱使小鼠潘氏细胞脱颗粒并破坏潘氏细胞, 从而导致隐窝内潘氏细胞的缺失。弓形虫在昆明小鼠小肠内的数量于3 DAI前变化不明显, 3 DAI后显著增多, 这正与潘氏细胞数量的大量减少时间相对应, 说明潘氏细胞对弓形虫的入侵有一定的保护作用, 但弓形虫引起潘氏细胞缺失的机制及潘氏

细胞抵御弓形虫入侵的作用还需进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. Int J Parasitol 2004; 34(3): 423-32.
- 2 Wang L, Chen H, Liu D, Huo X, Gao J, Song X, et al. Genotypes and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* isolates from animals and humans in china. PLoS One 2013; 8(1): e53483.
- 3 Dubey JP. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. J parasitol 1996; 82(6): 957-61.
- 4 Schreiner M, Liesenfeld O. Small intestinal inflammation following oral infection with *Toxoplasma gondii* does not occur exclusively in C57BL/6 mice: Review of 70 reports from the literature. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(2): 221-33.
- 5 Nevalainen TJ, Gronroos JM, Kallajoke M. Expression of group II phospholipase A2 in the human gastrointestinal tract. Lab Invest 1995; 72(2): 201-8.
- 6 Horneff MW, Pütsep K, Karlsson J, Refai E, Andersson M. Increased diversity of intestinal antimicrobial peptides by covalent dimer formation. Nat Immunol 2004; 5(8): 836-43.
- 7 Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI. Angiogenins: A new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. Nat Immunol 2003; 4(3): 269-73.
- 8 Foureau DM, Mielcarz DW, Menard LC, Schulthess J, Werts C, Vasseur V, et al. TLR9-dependent induction of intestinal alpha-defensins by *Toxoplasma gondii*. J Immunol 2010; 184(12): 7022-9.
- 9 Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and humans, second edition. Taylor and Francis Group, CRC Press: Boca raton, 2010, 1-313.
- 10 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.
- 11 王志峰, 梁宏德, 康静静, 张蕊, 杨玉荣. 新生BALB/c小鼠肠道潘氏细胞的分布规律. 中国细胞生物学学报(Wang Zhifeng, Liang Hongde, Kang Jingjing, Zhang Rui, Yang Yurong. The pattern of distribution of paneth cells in intestine of newborn BALB/c mice. Chinese Journal of Cell Biology) 2011; 33(7): 772-6.
- 12 Martinez Rodriguez NR, Eloi MD, Huynh A, Dominquez T, Lam AH, Carcamo-Molina D, et al. Expansion of paneth cell population in response to enteric *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection. Infect Immun 2012; 80(1): 266-75.
- 13 Raetz M, Hwang S, Wilhelm CL, Kirkland D, Benson A, Sturge CR, et al. Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ -dependent elimination of Paneth cells. Nat Immunol 2013; 14(2): 136-42.
- 14 Wilhelm CL, Yarovinsky F. Apicomplexan infections in the gut. Parasite Immunol 2014; 36(9): 409-20.
- 15 Villeret B, Brault L, Couturier-Maillard A, Robinet P, Vasseur V, et al. Blockade of IL-1R signaling diminishes paneth cell depletion and *Toxoplasma gondii* induced ileitis in mice. Am J Clin Exp Immunol 2013; 2(1): 107-16.