

ToxoDB#17型弓形虫感染小鼠引起小肠 潘氏细胞溶菌酶缺失

王 凯 陆瑶瑶 刘振阳 杨玉荣*

(河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450000)

摘要 为探究ToxoDB#17型弓形虫对昆明小鼠小肠潘氏细胞(Paneth cells, PCs)溶菌酶的表达及小肠病理损伤特点, 该研究以8周龄小鼠为研究对象, 灌胃 1×10^6 个ToxoDB#17型弓形虫卵囊, 分别在灌胃后6 HAI(hours after inoculation)、1 DAI(day after inoculation)、3 DAI、8 DAI取小肠各段, 常规方法制作石蜡切片, HE和免疫组化染色, 研究小肠病理损伤、虫体分布、潘氏细胞及溶菌酶表达特点。结果显示, 小鼠弓形虫感染率为100%, 弓形虫虫体抗原分布随时间延长呈增多趋势($P < 0.05$), 小肠的病理损伤随着弓形虫感染时间的延长, 未见明显变化。小肠隐窝数、含潘氏细胞隐窝数、PCs总数和颗粒总数的变化总趋势呈现先减少后增加再减少的趋势, 3 DAI数量较多($P > 0.05$), 潘氏细胞颗粒未观察到溶菌酶阳性染色反应。以上结果表明, ToxoDB#17型弓形虫抑制潘氏细胞溶菌酶的表达, 对肠道损伤较轻, 潘氏细胞及其分泌颗粒对弓形虫有应答反应, 溶菌酶的缺失与ToxoDB#17型弓形虫成功入侵肠道有关。

关键词 ToxoDB#17型; 弓形虫; 昆明小鼠; 病理损伤; 小肠; 潘氏细胞; 溶菌酶

Deficiency of Paneth Cells Lysozyme in Small Intestine of Mice Infected by ToxoDB#17 Strain *Toxoplasma gondii*

Wang Kai, Lu Yaoyao, Liu Zhenyang, Yang Yurong*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450000, China)

Abstract In order to investigate the small intestine pathological lesions and the change of Paneth cells (PCs) lysozyme after infection of ToxoDB#17 strain *Toxoplasma gondii*, 1×10^6 ToxoDB#17 strain *T. gondii* oocysts were fed to Kunming mice orally. Pathological lesions and the distribution of *T. gondii* in small intestine, Paneth cells and expression of lysozyme were observed on 6 hours after inoculation (HAI), 1, 3 or 8 days after inoculation (DAI) by HE and immunohistochemical staining, respectively. The results showed that 100% of the mice fed with 1×10^6 oocysts were infected. The positive area of *T. gondii* in the intestine was increased with prolonged infection time ($P < 0.05$), but the lesions did not change significantly. The number of crypts, crypts containing PCs, PCs and granules in intestine were decreased firstly, then increased, decreased last. They were the highest at 3 DAI, compared to the control group ($P > 0.05$). It was negative staining of lysozyme in granules of PCs after infection of *T. gondii*. These results indicated that ToxoDB#17 strain *T. gondii* infection caused the deficiency of the Paneth

收稿日期: 2016-10-27 接受日期: 2016-12-08

中国博士后科学基金(批准号: 2016M600577)和河南省高校科技创新人才支持计划(批准号: 17HASTIT038)资助的课题

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

Received: October 27, 2016 Accepted: December 8, 2016

This work was supported by the China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2016M600577) and the Program for Science & Technology Innovation Talents in Universities of Henan Province (Grant No.17HASTIT038)

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

网络出版时间: 2017-02-07 15:48:18 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170207.1548.010.html>

cells lysozyme in intestine of mice. The pathological lesions of ToxoDB#17 strain *T. gondii* on small intestine of mice were lightly. PCs and their granules had responded to *T. gondii*. The deficiency of lysozyme in PCs may have relation with succeed invasion intestine of *T. gondii*.

Keywords ToxoDB#17; *Toxoplasma gondii*; Kunming mice; lesion; small intestine; Paneth cells; lysozyme

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是一种分布广泛的细胞内寄生原虫,可感染包括人类在内的几乎所有恒温动物,引起弓形虫病^[1-2]。弓形虫血清型只有1个,基因型已达232个(<http://toxodb.org/toxo>),不同基因型弓形虫的致病性不同。我国分离到的ToxoDB#17型弓形虫对昆明小鼠的病理损伤鲜有报道。食入弓形虫卵囊或包囊是水平传播弓形虫的主要方式,肠道是弓形虫复制和入侵的主要场所,潘氏细胞(Paneth cells, PCs)及其分泌颗粒是肠道黏膜免疫的重要成分。本文研究了ToxoDB#17型弓形虫卵囊对昆明小鼠的肠道病理损伤,小鼠感染后小肠弓形虫抗原分布特点、小肠潘氏细胞及潘氏细胞溶菌酶的变化,为研究弓形虫的肠道入侵机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 弓形虫卵囊及试剂

ToxoDB#17型弓形虫虫株分离于猫组织^[3],本实验室保存。猫粪便中卵囊的分离及纯化方法参阅Dubey^[4]的报道。兔抗弓形虫多克隆抗体由美国农业部寄生虫试验室惠赠。小鼠Specific HRP/DAB(ABC)Detection IHC Kit(货号: ab64264)、抗溶菌酶抗体(货号: ab108508)均购于Abcam公司,按照使用说明书进行操作。

1.2 实验动物及处理

实验组小鼠每只灌胃浓度为 1×10^6 /mL的ToxoDB#17型弓形虫卵囊溶液1 mL,对照组小鼠每只灌胃生理盐水1 mL,每日观察精神状态。感染组小鼠于攻虫后6 h(6 hours after inoculation, 6 HAI)、攻虫后1 d(1 day after inoculation, 1 DAI)、3 DAI、8 DAI各随机乙醚麻醉处死3只,肠系膜淋巴结涂片,取十二指肠、空肠、回肠固定于10%中性福尔马林溶液中。对照组小鼠于灌胃生理盐水3 d后乙醚麻醉处死,与感染组小鼠同样方法处理。实验动物处理遵守河南农业大学动物伦理与福利规定。

1.3 潘氏细胞、潘氏细胞溶菌酶的观察

常规方法制做石蜡切片,进行HE染色和免疫组

织化学染色(溶菌酶抗体、弓形虫抗体)。对小肠损伤的情况采用炎症评分、病变深度评分、隐窝损伤程度评分与病变范围评分乘积的和来表示^[5]。每个样品选择染色良好的肠管横切面,Leica DFC320数码显微镜下观察并摄片,并用Leica QWin v3图像软件分析系统对肠腺进行计数,对整个肠管横切面中溶菌酶的表达、隐窝的数量、含潘氏细胞的隐窝数、潘氏细胞总数、颗粒总数、单个隐窝中潘氏细胞的数量、单个潘氏细胞中的颗粒数进行统计^[6]。

1.4 弓形虫抗原分布特点与肠道病理损伤关系

应用显微图像分析系统观察免疫组织化学染色(弓形虫抗体)切片,每张切片随机选取6个视野,测定弓形虫阳性面积比值。

1.5 数据处理

运用GraphPad Prism 5软件进行统计学处理、作图,比较各组间差异,数据以“平均值 $\pm$ 标准误”表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 昆明小鼠ToxoDB#17型弓形虫感染情况及临床症状

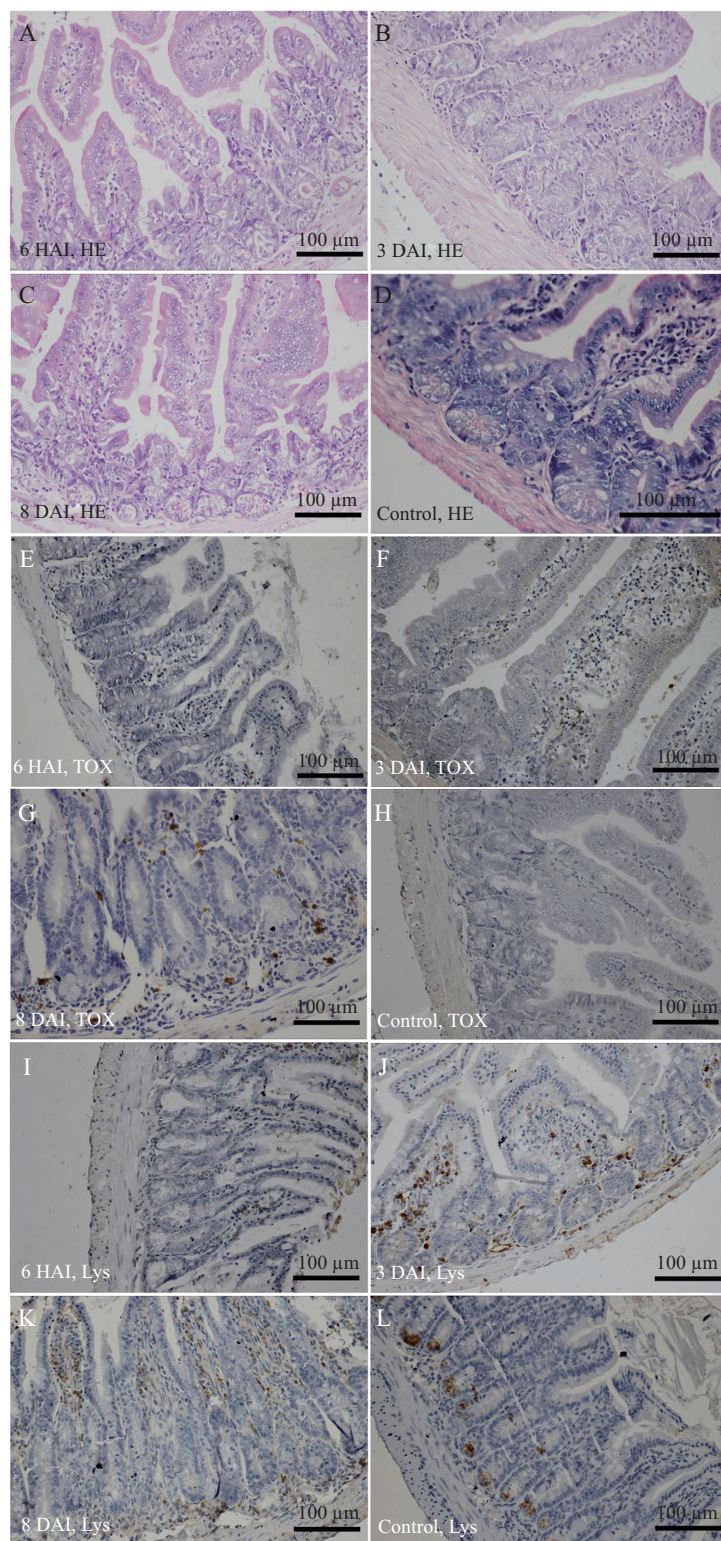
弓形虫卵囊灌胃后,小鼠在3 DAI出现一过性活动减少、精神沉郁,在5 DAI时精神恢复正常,均存活至8 DAI。分别于6 HAI、1 DAI、3 DAI、8 DAI时处死的小鼠,肠系膜淋巴结涂片均检测到弓形虫速殖子,弓形虫感染率为100%。

2.2 弓形虫对小鼠小肠的病理损伤

弓形虫卵囊灌胃后6 h,小鼠小肠病理损伤表现为黏膜上皮细胞脱落,潘氏细胞及其颗粒减少,但随着时间的延长,损伤情况未呈现明显加重的趋势,炎症反应较缓和(图1A~图1D)。组织学评分(histological index, HI)显示,弓形虫感染后,肠道组织损伤呈现先升高后降低又升高的趋势,但无统计学差异($P > 0.05$)(表1)。

2.3 弓形虫抗原在小鼠小肠的分布

弓形虫阳性面积随着感染时间延长逐渐增加。



A: 潘氏细胞颗粒减少; B: 潘氏细胞颗粒增生; C: 潘氏细胞脱颗粒; D: 对照组; E: 固有层可见少量弓形虫; F: 固有层可见弓形虫; G: 黏膜层弓形虫; H: 对照组; I: 潘氏细胞颗粒染色阴性; J: 潘氏细胞颗粒染色阴性; K: 潘氏细胞颗粒染色阴性; L: 对照组, 潘氏细胞颗粒染色阳性。A~D: HE染色; E~H: 弓形虫IHC染色; I~L: 溶菌酶IHC染色。

A: decreased granules of Paneth cells; B: Paneth cells granules hyperplasia; C: degranulation of Paneth cells; D: control group; E: little *T. gondii* in lamina propria; F: *T. gondii* in lamina propria; G: *T. gondii* in mucosa; H: control group; I: negative staining of granules in Paneth cells; J: negative staining of granules in Paneth cells; K: negative staining of granules in Paneth cells; L: control group, positive staining of granules in Paneth cells. A~D: HE staining; E~H: *T. gondii* IHC staining; I~L: lysozyme IHC staining.

图1 昆明小鼠感染ToxoDB#17型弓形虫后回肠病理变化

Fig.1 Pathological changes of the ileum in Kunming mice after infected with ToxoDB#17 *T. gondii*

表1 小鼠感染ToxoDB#17型弓形虫虫株后小肠组织学评分

Table 1 Histological index score of intestines of mice after infection ToxoDB#17 *T. gondii*

小肠 Small intestine	攻虫后6 h 6 HAI	攻虫后1 d 1 DAI	攻虫后3 d 3 DAI	攻虫后8 d 8 DAI	对照组 Control
Duodenum	9.33±2.67	9.33±2.91	8.33±1.67	12.67±0.67	—
Jejunum	9.33±2.67	6.00±2.00	6.00±2.00	10.67±3.33	—
Ileum	13.33±1.33	11.00±6.51	10.00±1.15	11.33±3.71	—

“—”表示未见损伤。
“—” means no lesion.

表2 小鼠感染ToxoDB#17型弓形虫虫株的小肠弓形虫抗原阳性面积(%)

Table 2 The positive area of *T. gondii* antigen in intestines of mice after infection ToxoDB#17 *T. gondii* (%)

小肠 Small intestine	攻虫后6 h 6 HAI	攻虫后1 d 1 DAI	攻虫后3 d 3 DAI	攻虫后8 d 8 DAI	对照组 Control
Duodenum	0.16±0.02	0.23±0.07	0.56±0.13*	0.89±0.15*	—
Jejunum	0.14±0.04	0.31±0.08*	0.48±0.12**	0.73±0.14**	—
Ileum	0.29±0.09	0.35±0.08**	0.46±0.12**	0.88±0.18**	—

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与6 HAI组相比较。“—”表示未见阳性抗原。
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the 6 HAI group. “—” means no positive antigen.

8 DAI组的肠道弓形虫抗原量明显高于6HAI组, 1 DAI组或3DAI组($P<0.01$ 或 $P<0.05$)(表2)。6 HAI组的单个或几个虫体分布于肠黏膜固有层。1 DAI组和3 DAI组的多个虫体分布在肠黏膜层。8 DAI组的大量弓形虫分布在黏膜层(图1 E~图1H)。

2.4 弓形虫对小鼠小肠隐窝、潘氏细胞及其颗粒的影响

与对照组比较, 小鼠感染弓形虫卵囊后肠道隐窝数、含PCs隐窝数、PCs总数、颗粒总数、单个隐窝中PCs数呈现低于对照组的趋势。十二指肠和回肠隐窝、PCs及其颗粒数呈现先减少再增多又减少的趋势, 3 DAI组最多, 8 DAI组或1 DAI组各参数最低($P>0.05$)。空肠的含PCs的隐窝数、PCs总数在8 DAI组明显低于对照组($P<0.05$)(图2)。

小鼠感染弓形虫卵囊后, 对肠道组织进行溶菌酶抗体染色, 在小肠隐窝潘氏细胞可观察到清晰的颗粒, 但溶菌酶染色显示阴性反应(图1I~图1K), 而对照组小鼠肠道潘氏细胞颗粒则显示有溶菌酶阳性表达(图1L)。

3 讨论

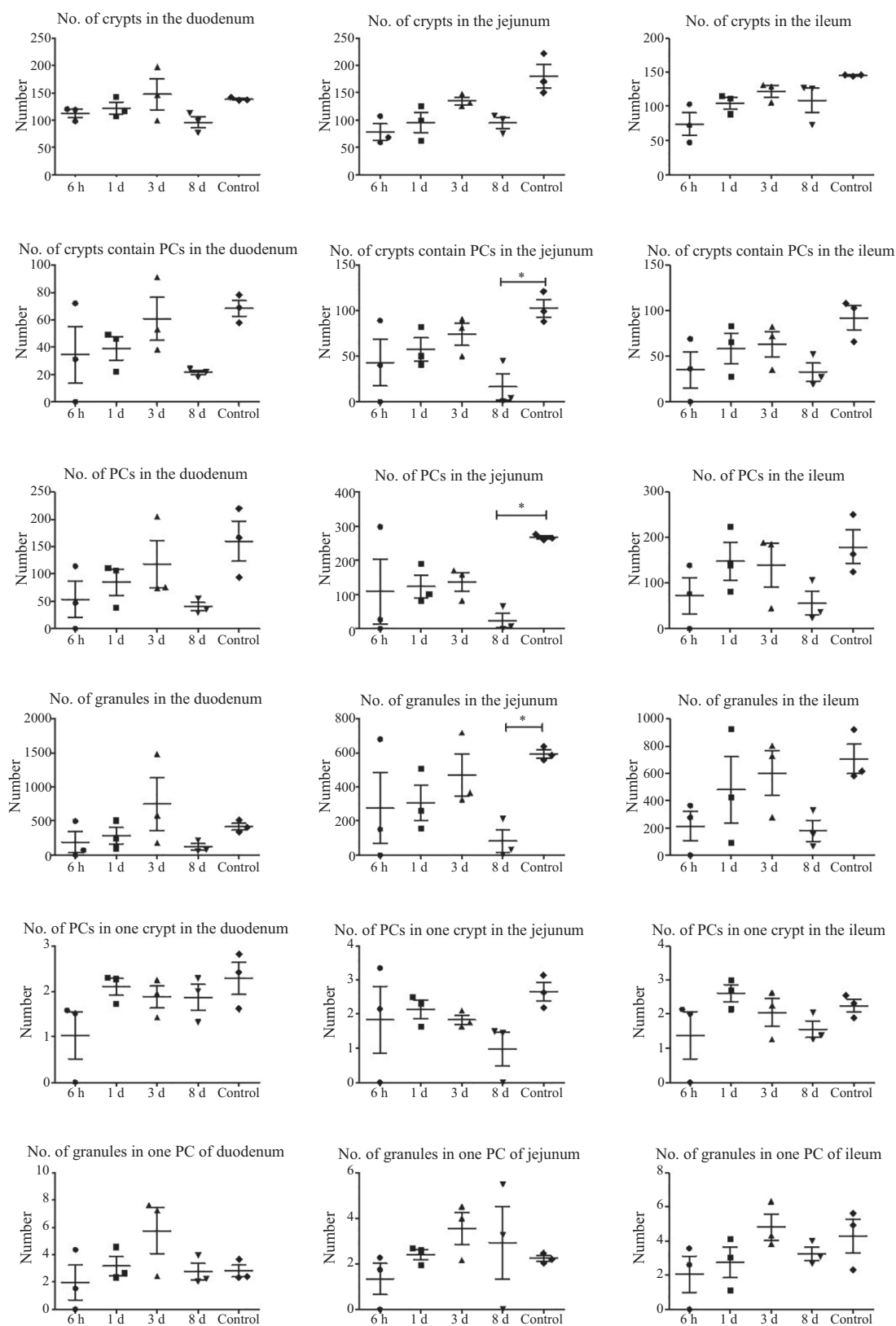
对世界各地人和动物体内分离的弓形虫基因分型结果显示, 弓形虫具有丰富的遗传多态性。我国已分离到93株弓形虫, 11个基因型, 其对昆明小鼠的致病性研究仅有少量报道。ToxoDB#17型已从法

国、巴西、阿根廷、秘鲁(<http://toxodb.org/toxo>)和中国^[3]等分离, 但其对小鼠肠道的病理损伤, 还未见报道。

本研究结果显示, 小鼠感染ToxoDB#17型弓形虫卵囊, 随着感染时间的增加, 弓形虫在小肠的阳性面积呈现增大的趋势, 损伤并未随感染时间延长而加重, 说明ToxoDB#17型弓形虫对小肠的损伤与其在肠道内的增殖情况并不是正相关关系, 可能是由于弓形虫入侵小鼠肠道后, 启动免疫逃逸机制, 机体的炎症反应和损伤均未明显加重, 从而能够成功入侵机体, 感染ToxoDB#17型弓形虫小鼠存活时间超过1年^[7]。ToxoDB#17型弓形虫对小鼠的肠道病理损伤与ToxoDB#216型弓形虫不同^[8], ToxoDB#216型弓形虫虫体在肠道的分布与损伤呈正相关, 感染后第6 d, 虫体在肠道的分布面积、深度及肠道的损伤均达到最高值, 小鼠因弓形虫感染而100%死亡, 弓形虫也就失去了寄生的宿主, 这种现象也解释了自然界分离到的弓形虫虫株多以弱毒株II、III型为主的原因。

潘氏细胞是肠道黏膜天然免疫中的关键细胞之一, 细胞顶部含有丰富的嗜酸性分泌颗粒, 颗粒内含有 α -防御素、溶菌酶、血管生成因子等具有抗菌活性的成分^[9], 这些多肽类物质在维护隐窝及肠道干细胞与肠道内环境稳态方面发挥了重要作用。

小鼠感染ToxoDB#17型弓形虫卵囊后, 小肠各



●: 弓形虫感染后6 h; ■: 弓形虫感染后1 d; ▲: 弓形虫感染后3 d; ▼: 弓形虫感染后8 d; ◆: 对照组。* $P < 0.05$, 与对照组比较。

●: 6 hours after infected with *T. gondii*; ■: 1 day after infected with *T. gondii*; ▲: 3 days after infected with *T. gondii*; ▼: 8 days after infected with *T. gondii*; ◆: control group. * $P < 0.05$ compared with the control group.

图2 小鼠感染ToxoDB#17型弓形虫后小肠隐窝、潘氏细胞及其颗粒的变化

Fig.2 The change of crypts, Paneth cells and granules in intestines of mice after infected with ToxoDB#17 *T. gondii*

段的隐窝总数、PCs总数及其颗粒数总体未见明显变化,其变化趋势呈现先减少后增多再减少的趋势,6 HAI迅速减少,3 DAI增多达到最高,到8 DAI又减少,可见弓形虫入侵小鼠小肠黏膜时,首先消耗了一部分PCs及其颗粒,随后刺激了潘氏细胞的增殖以及潘氏细胞颗粒的合成,然后又破坏了潘氏细胞,诱导潘氏细胞脱颗粒。Rodriguez等^[10]报道,肠道沙门氏菌感染时潘氏细胞数量明显增多,在这个过程中短暂增殖的细胞是最早做出反应的细胞,类似全身感染时中性粒细胞的增生。本研究结果说明,PCs及其颗粒对弓形虫的入侵有一定的防御反应。

本研究发现,感染ToxoDB#17型弓形虫的小鼠潘氏细胞中溶菌酶均未表达,但是可以清晰地看到潘氏细胞颗粒,而对照组小鼠潘氏细胞中可观察到明显的溶菌酶阳性表达,说明ToxoDB#17型弓形虫可能会抑制小肠潘氏细胞中溶菌酶的表达。这与II型弓形虫的表现一致,感染ME49型弓形虫虫株的小鼠肠道潘氏细胞缺失溶菌酶和防御素^[11]。但关于弓形虫感染后溶菌酶表达缺失的机制还不太清楚。研究发现,弓形虫入侵会导致肠道内稳态失衡和潘氏细胞缺失,而潘氏细胞的缺失又会导致抗菌多肽类物质的缺失,加剧肠道内环境紊乱^[11]。

综上,对昆明小鼠灌胃ToxoDB#17型弓形虫卵囊,可引起小鼠100%的感染。感染后,弓形虫在小肠中的感染面积呈现增大的趋势,但病理损伤较弱。潘氏细胞总数及颗粒数呈现先减少再增多后减少的趋势,潘氏细胞溶菌酶的表达被完全抑制,可见潘氏细胞对弓形虫的入侵作出反应,但对弓形虫的入侵无决定性作用。ToxoDB#17型弓形虫是一种毒力较弱的虫株,可与机体(小鼠)达到一种适度的平衡,因此,这种弱毒寄生虫有很高的生存率及很大的生存范围,有一定的潜伏性,危害较大,免疫系统功能低下时可爆发出弓形虫急性感染,应该引起足够的重视,进一步探究其肠道免疫逃逸机制。

参考文献 (References)

- 1 Louis MW, Kami K. *Toxoplasma gondii*. New Jersey: Elsevier 2014, 62-89.
- 2 Lorenzi H, Khan A, Behnke MS, Namasivayam S, Swapna LS, Hadjithomas M, *et al*. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nat Commun* 2016; 7: 10147.
- 3 Yang Y, Ying Y, Verma SK, Cassinelli AB, Kwok OC, Liang H, *et al*. Isolation and genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* from tissues and feces of cats from the central region of China. *Vet Parasitol* 2015; 211(3/4): 283-8.
- 4 Dubey JP. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, 2nd edition. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group 2010; 1-313.
- 5 Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993; 69(2): 238-49.
- 6 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.
- 7 王凯, 冯永杰, 付晓莹, 陆瑶瑶, 梁宏德, 杨玉荣. ToxoDB#17型弓形虫卵囊对昆明小鼠致病性的研究. *中国人兽共患病学报*(Wang Kai, Feng Yongjie, Fu Xiaoying, Lu Yaoyao, Liang Hongde, Yang Yurong. Virulence and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* ToxoDB#17 strain oocysts in Kunming mice. *Chinese Journal of Zoonoses*) 2017; 33(1): 56-9.
- 8 张琼方, 付晓莹, 王凯, 梁宏德, 杨玉荣. 潘氏细胞在昆明小鼠弓形虫病发病过程中的变化. *中国细胞生物学学报*(Zhang Qiongfang, Fu Xiaoying, Wang Kai, Liang Hongde, Yang Yurong. The change of Paneth cells in the *Toxoplasmosis* of Kunming mice. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(10): 1381-5.
- 9 Vaishnav S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(52): 20858-63.
- 10 Martinez Rodriguez NR, Eloi MD, Huynh A, Dominguez 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.
- 11 Raetz M, Hwang SH, 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.