

文章编号: 1000-7423(2010)-02-0139-04

【实验研究】

RNA 原位杂交法检测灌胃接种弓形虫速殖子小鼠体内虫体的早期动态分布

孟晓丽¹, 马晓明¹, 殷国荣^{1*}, 刘红丽¹, 殷丽天², 申金雁¹, 王海龙¹

【摘要】 目的 观察经灌胃接种弓形虫 RH 株速殖子后, 虫体在小鼠体内的早期动态分布。方法 弓形虫 RH 株速殖子经灌胃接种 BALB/c 小鼠 20 只(2×10⁴/只), 用 RNA 原位杂交法观察感染后 1、2、4、6 和 8 d 小鼠的肠系膜淋巴结(MLN)、肝、脾、肺和脑组织内速殖子的数量及分布趋势。同时设 PBS 空白对照组(5 只)。结果 感染后 1 d, 在 MLN、肝和脾组织内均检测到速殖子, 分别于感染后 4 d 和 6 d 在肺和脑组织内检测到速殖子。感染后 6~8 d, 各组织间虫荷差异均有统计学意义(P 值均 <0.05), 组织内虫荷依次为 MLN>肝>脾>肺>脑, 各组织内虫体数量呈时间依赖性。结论 弓形虫 RH 株速殖子经灌胃接种后, 首先侵入 MLN、肝和脾, 其次为肺, 最后为脑, 且虫体在 MLN 内增殖较快。

【关键词】 弓形虫; RNA 原位杂交; 宿主组织

中图分类号: R382.5 文献标识码: A

Early Kinetics of *Toxoplasma gondii* Infection in Mice Infected Intragastrically with Tachyzoites by Chromogenic *in situ* Hybridization Targeting SAG2 mRNA

MENG Xiao-li¹, MA Xiao-ming¹, YIN Guo-rong^{1*}, LIU Hong-li¹,
YIN Li-tian², SHEN Jin-yan¹, WANG Hai-long¹

(1 Institute of Medical Parasitology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2 Department of Physiology, Key Laboratory of Cellular Physiology Co-constructed by Province and Ministry of Education, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Objective To observe the early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice inoculated with tachyzoites of RH strain. **Methods** Twenty BALB/c mice were administered intragastrically with tachyzoites of RH strain (2×10⁴/mice). Parasite burdens in mesenteric lymph node (MLN), liver, spleen, lung and brain were determined by chromogenic *in situ* hybridization targeting SAG2 mRNA at 1, 2, 4, 6 and 8 days postinfection. Five mice were inoculated with PBS as blank control. **Results** The MLN, liver and spleen were the first organs where tachyzoites were found on the first day after infection, followed by the lungs on the 4th day and the brain on the 6th day. On days 6 to 8 after infection, there was a significant difference on parasite load among the tissues ($P<0.05$), and the parasite load in MLN was highest, followed by that of liver, spleen, lungs and brain. The number of tachyzoites in various tissues was time-dependent. **Conclusion** *T. gondii* tachyzoites were first detected in MLN, liver and spleen, then in the lungs, and finally in the brain. The number of tachyzoites in the MLNs increased more rapidly.

【Key words】 *Toxoplasma gondii*; RNA *in situ* hybridization; Host tissue

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30640057)

* Corresponding author, E-mail: guorongyin@163.com

刚地弓形虫是一种细胞内寄生原虫, 可感染多种哺乳动物的有核细胞, 引起人兽共患弓形虫病。随着免疫缺陷性疾病发病率的增加和免疫抑制剂的广泛使用, 弓形虫作为一种机会致病原虫而倍受关注。研究

弓形虫在宿主体内的移行和分布对了解其致病机制和制定防治策略具有重要意义。

弓形虫自然感染途径是经口感染, 感染后侵入肠道黏膜上皮, 在肠黏膜上皮细胞内大量繁殖, 随后通过循环系统播散至全身^[1]。刘俊燕等^[2]采用免疫组织化学法观察经腹腔感染的弓形虫 RH 株速殖子在小鼠组织内的分布。Conley 和 Dubey 等应用免疫组织化学动态观察到经口感染弓形虫弱毒株缓殖子^[3]、包囊^[4]和

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30640057)

作者单位: 1 山西医科大学医学寄生虫学研究所, 寄生虫学教研室, 太原 030001; 2 山西医科大学生理学系, 细胞生理学省部共建教育部重点实验室, 太原 030001

* 通讯作者, E-mail: guorongyin@163.com

卵囊^[5]后,弓形虫首先侵入小肠上皮细胞然后到达肠系膜淋巴结(MLN),最后出现在脑组织内。作者前期研究结果显示,弓形虫速殖子经口感染后,15 min即可侵入小肠上皮细胞,随后通过固有层播散至全身而致病^[6]。申金雁等^[7]采用组织印片吉-瑞氏染色法观察经口感染弓形虫 RH 株速殖子在小鼠组织内的分布。本实验采用 RNA 原位杂交法观察灌胃接种弓形虫 RH 株速殖子后小鼠组织内虫体的动态分布,为进一步探究弓形虫在机体内的播散途径提供实验基础。

材料与方法

1 动物和虫株

清洁级 BALB/c 小鼠 25 只,雌性,7~8 周龄,购自中国医学科学院实验动物研究所。弓形虫国际标准强毒 RH 株,由北京大学医学部高兴政教授惠赠,本室液氮保种。

2 主要试剂

焦碳酸二乙酯(DEPC)、十二烷基磺酸钠(SDS)、蛋白酶 K、鲑鱼精子 DNA、聚蔗糖-400 和甘氨酸购自美国 Pharmacia 公司。牛血清白蛋白购自瑞士 Roche 公司。去离子甲酰胺、硫酸葡聚糖和三羟甲基氨基甲烷(Trisbase)购自美国 Amresco 公司。地高辛标记探针检测试剂盒 I 购自武汉博士德生物有限公司。

3 探针及标记

参考文献^[8]的弓形虫速殖子表面抗原 2(SAG2) mRNA(GenBank 登录号为 M33572)特异性寡核苷酸探针序列(5'-GGT CTC GCA GGT TTG TTG ATC ACG TTT GT-3'),将地高辛加尾标记于 3'末端。探针由上海生工生物工程技术有限公司合成。

4 动物分组与处理

25 只 BALB/c 小鼠随机分为感染组(20 只)和对照组(5 只),感染组小鼠用弓形虫 RH 株速殖子灌胃感染(2×10^4 只,悬于 0.2 ml PBS),对照组给予 0.2 ml PBS。感染后 1、2、4、6 和 8 d,分别颈椎脱臼处死感染组小鼠 4 只和对照组小鼠 1 只,取 MLN、肝、脾、肺和脑,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,按 7 μ m 厚度切片,用于 RNA 原位杂交实验。

5 RNA 原位杂交及结果判定

按照文献^[8]的方法原位杂交,将地高辛标记探针剂量增至 1 ng/ μ l。标记物检测按照地高辛标记探

针检测试剂盒 I 说明书操作。苏木素轻度复染,常规脱水、透明,中性树胶封片^[6]。

以常规感染弓形虫速殖子后 72 h 的小鼠腹水涂片为阳性对照,对照组小鼠组织切片为阴性对照。光镜下弓形虫速殖子呈棕黄色颗粒为杂交阳性。每张组织原位杂交切片在高倍镜($\times 400$)下计数 50 个视野内的速殖子数,计算平均值,再计算每组同批处死的 4 只小鼠感染速殖子的平均值。

6 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件,进行重复测量方差分析。

结 果

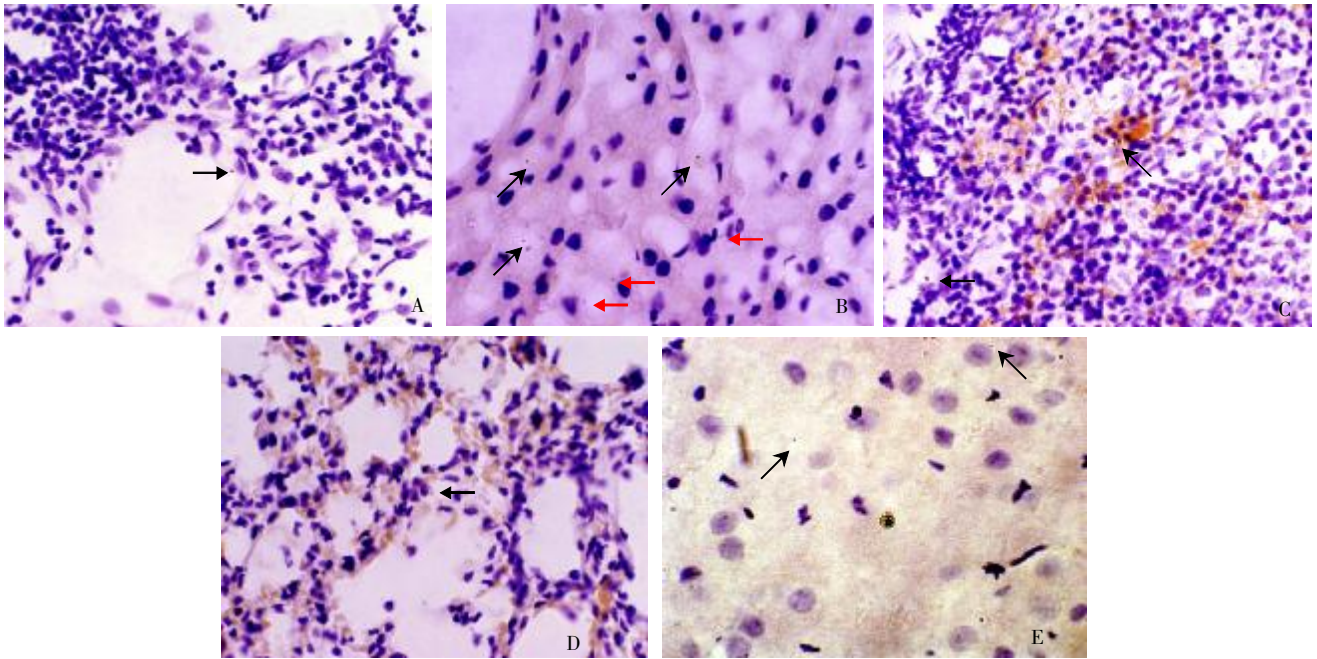
1 组织内速殖子的分布

对照组小鼠组织内均未发现速殖子。感染组于感染后 1 d,观察到单个游离速殖子出现在 MLN、肝和脾组织中。MLN 内速殖子始见于被膜下淋巴窦及髓窦内(图 1A),感染后 2 d 速殖子已侵入 MLN 皮质区。在肝组织,感染后 1 d 速殖子主要集中于门管区周围肝细胞胞浆及肝窦内(图 1B),感染后 2 d,肝内速殖子侵入肝细胞核并播散至肝组织被膜下。在脾组织,速殖子始见于红髓的脾血窦内(图 1C)及血窦周围的脾索内,感染后 2 d 达脾白髓。感染后 4 d 速殖子可见于肺内,游离的速殖子分布于肺血管腔周围,肺泡上皮细胞(图 1D)、肺泡间质、肺泡腔、支气管黏膜和平滑肌中。感染后 6 d,于脑组织皮质内检获虫体(图 1E)。

2 各组织内虫荷的动态变化

统计学分析显示,随感染时间推移,MLN、肝、脾、肺和脑等 5 种组织内的虫荷均明显增加(图 2)。MLN、肝和脾的虫荷于感染后相邻时间点的差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。自感染后 4 d 起,相邻时间点肺内虫荷差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。脑组织内感染后 8 d 的虫荷显著高于感染后 6 d($P < 0.05$),其他时间点差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

同一感染时间内,MLN、肝、脾、肺和脑组织间的虫荷亦有差别。感染后 1~8 d 内,MLN、肝和脾内的虫荷均显著高于肺与脑(均 $P < 0.05$)。感染后 1 d,MLN 内虫荷显著高于肝和脾(均 $P < 0.05$);感染后 2~4 d,MLN 和肝内的虫荷均显著高于脾(均 $P < 0.05$)。感染后 6~8 d,各组织间虫荷的差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),感染后 6~8 d 各组织内虫荷顺序为 MLN>肝>脾>肺>脑。



A: 感染后 1 d 速殖子侵入 MLN 髓窦 (↑), B: 感染后 1 d 速殖子侵入肝门管区附近肝细胞 (↑) 及肝窦 (↑), C: 感染后 1 d 速殖子侵入脾红髓内 (↑), D: 感染后 4 d 速殖子侵入肺泡上皮细胞 (↑), E: 感染后 6 d 速殖子侵入大脑皮质内 (↑)。
 A: On the first day after infection, tachyzoites in medullary sinus of mesenteric lymph nodes (↑), B: Tachyzoites in hepatocytes (↑) and hepatic sinusoid (↑) near portal area on the first day after infection, C: Tachyzoites in splenic red pulp on the first day after infection (↑), D: Tachyzoites in the epithelium of pulmonary alveolus on the 4th day after infection (↑), E: Tachyzoites in cerebral cortex on the 6th day after infection (↑).

图 1 弓形虫速殖子在小鼠体内的分布 (×400)
 Fig. 1 *Toxoplasma gondii* tachyzoites in mouse tissues (×400)

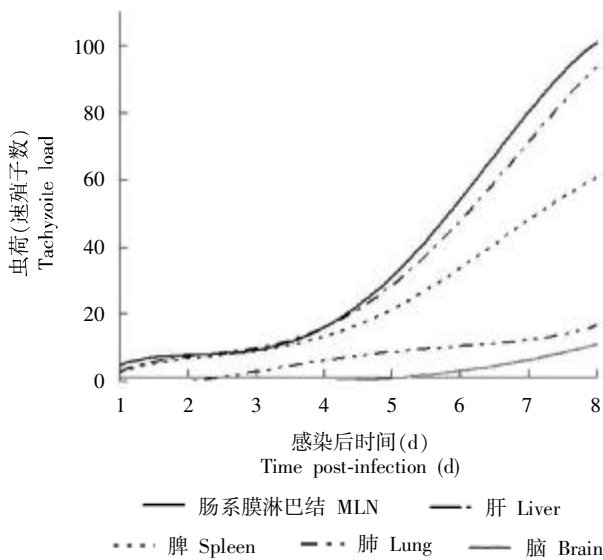


图 2 小鼠组织内虫荷 (速殖子数) 动态变化
 Fig.2 Dynamic changes of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in mouse tissues

讨 论

RNA原位杂交法是一种简便准确的弓形虫病理检测方法。史晓燕等^[8]使用 RNA 原位杂交、免疫组化和苏木素-伊红染色(HE)等不同方法检测小鼠组织内

弓形虫, 并进行比较, RNA 原位杂交法于感染后 2 d 即在肝脏内检测到弓形虫, 而免疫组化法于感染后 3 d 检测到虫体, 常规 HE 染色难于清楚辨认组织内的单个虫体, 且使用 RNA 原位杂交法组织内弓形虫的检出率高于免疫组化和 HE 染色法。本实验结果显示采用 RNA 原位杂交法于感染后 1 d, 即可在 MLN、肝和脾组织中检测到虫体, 且弓形虫形态清晰, 无背景着色。

Dubey 等^[4,5]观察到灌胃感染Ⅲ型缓殖子后 2 d, 于小鼠 MLN 发现虫体, 感染后 6 d 在脑组织检测到; 而灌胃感染卵囊后 8 h, 虫体至 MLN, 感染后 4 d 虫体播散至其他脏器组织, 于感染后 8 d 脑组织内可见组织包囊。申金雁等^[7]采用组织印片发现速殖子经口感染小鼠后 2 d, 小肠组织内出现大量虫体, 肺和心脏有少量速殖子, 感染后 4 d 在脾、6 d 在肾和肝脏发现虫体, 脑内未见虫体。刘利等^[9]经静脉注射弓形虫 RH 株速殖子后, 采用直接涂片法观察到感染后 8 d 在脑组织中开始发现虫体。本实验结果显示, 感染后 1 d, 速殖子已达 MLN、肝和脾组织, 2 d 即已播散至 MLN 皮质内以及肝、脾组织被膜下, 感染后 4 d 速殖子可见于肺内, 感染后 6 d 于脑组织间质内检测到虫体。结果基本与文献报道一致, 不同虫株、不同感染方式和不同的检测方法可能略有差异。

弓形虫 RH 株速殖子经口感染宿主后, 可经血循环播散, 淋巴途径可能也是其播散途径之一。Zenner 等^[10]研究发现经口感染 Pru 株弓形虫包囊后, 弓形虫首先到达 MLN、脾和肺组织, 然后播散至其他脏器。本研究结果表明, 灌胃感染后 1 d, 速殖子已达 MLN、肝和脾组织, 且弓形虫在 MLN 始见于被膜下淋巴窦及髓窦内; 在肝组织内主要集中于门管区周围肝细胞胞浆及肝窦内; 在脾见于红髓的脾血窦内及血窦周围的脾索内。Dubey 等^[11]和 Sumyuen 等^[12]认为, 位于小肠固有层内、与上皮细胞邻近、并可迅速更新的树突状细胞以及来自于血循环中的粒细胞有助于弓形虫经淋巴途径播散。也有研究^[13]表明, 弓形虫可侵入特异性树突状细胞, 经感染的树突状细胞快速地转移至 MLN 和脾。本研究发现经灌胃接种弓形虫 RH 株速殖子首先侵入 MLN, 且虫体在 MLN 内增殖较快, 提示在弓形虫经口感染中 MLN 可能是弓形虫入侵机体的一个重要途径, 通过 MLN 的增殖再播散至血液或淋巴组织, 继而侵入其他组织器官。但其具体作用机制以及其他淋巴器官在扩散中的作用, 尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Schulthess J, Fourreau D, Darche S, et al. Mucosal immunity in *Toxoplasma gondii* infection[J]. Parasite, 2008, 15(3): 389-395.

[2] Liu JY, Yang XZ, Wu ZQ, et al. Study on the distribution of *Toxoplasma gondii* Fukaya strain in main organs of chronically infected mice[J]. Chin J Pathogen Biol, 2007, 2(3): 180-182. (in Chinese)
(刘俊燕, 杨秀珍, 吴增强, 等. 弓形虫 Fukaya 株在慢性感染小鼠体内分布的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2007, 2(3): 180-182.)

[3] Conley FK, Jenkins KA. Immunohistological study of the anatomic relationship of *Toxoplasma* antigens to the inflammatory response in the brains of mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*[J]. Infect Immun, 1981, 31(3): 1184-1192.

[4] Dubey JP. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed brady-

zoites of different strains of *Toxoplasma gondii*[J]. J Eukaryot Microbiol, 1997, 44(6): 592-602.

[5] Dubey JP, Speer CA, Shen SK, et al. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts[J]. J Parasitol, 1997, 83(5): 870-882.

[6] Ma XM, Meng XL, Yin GR, et al. Dynamic observation of attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to intestinal mucosa in BALB/c mice by chromogenic *in situ* hybridization targeting SAG2 mRNA [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2008, 26(4): 272-276. (in Chinese)
(马晓明, 孟晓丽, 殷国荣, 等. RNA 原位杂交法动态观察弓形虫速殖子对 BALB/c 小鼠小肠黏膜的黏附及侵入[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(4): 272-276.)

[7] Shen JY, Yang SS, Yin GR, et al. Distribution of *Toxoplasma gondii* in tissues of mice following oral infection[J]. J Trop Med, 2008, 8(6): 533-535. (in Chinese)
(申金雁, 杨莎莎, 殷国荣, 等. 经口感染弓形虫在小鼠组织内的动态分布[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(6): 533-535.)

[8] Shi XY, Zhao HM, Zeng XZ, et al. Experimental study on the detection of *Toxoplasma* on the paraffin section of liver by RNA *in situ* hybridization[J]. Chin J Zoonoses, 2004, 20(3): 214-216. (in Chinese)
(史晓燕, 赵恒梅, 曾宪忠, 等. RNA 原位杂交法检测组织内弓形虫的实验研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(3): 214-216.)

[9] Liu L, Dong GJ, Gao ZP, et al. Dynamic distribution of RH strain *Toxoplasma gondii* in brain tissue of experimentally infected mice[J]. Chin J Pathogen Biol, 2009, 4(9): 670-671. (in Chinese)
(刘利, 董国军, 高振平, 等. 弓形虫 RH 株在实验小鼠脑组织内的动态分布[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(9): 670-671.)

[10] Zenner L, Darcy F, Capron A, et al. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats [J]. Exp Parasitol, 1998, 90(1): 86-94.

[11] Dubey JP, Frenkel JK. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts[J]. J Parasitol, 1973, 59(3): 505-512.

[12] Sumyuen MH, Garin YJ, Derouin F. Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain[J]. J Parasitol, 1995, 81(2): 327-329.

[13] Lambert H, Hitziger N, Dellacasa I, et al. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination[J]. Cell Microbiol, 2006, 8(10): 1611-1623.

(收稿日期: 2009-10-23 编辑: 瞿麟平)

文章编号: 1000-7423(2010)-02-0142-01

【消息】

本刊获第四届华东地区优秀期刊奖



在主编的领导下, 各位副主编和编委(专家)的大力支持下, 及编辑部全体人员的共同努力下, 《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》又一次获得了殊荣, 荣誉的获得是对我们杂志工作的肯定和鼓励。在此感谢大家给予的大力支持和帮助!