

文章编号: 1000-7423(2013)-02-0104-04

【论著】

孕晚期鼠感染弓形虫 Prugniaud 株对子一代学习记忆能力的影响

王正蓉¹, 包怀恩^{2*}

【摘要】 **目的** 研究孕晚期鼠感染弓形虫 prugniaud (PRU) 株对其生殖毒性及子一代学习记忆能力的影响。**方法** 受孕 15 d (孕晚期) 的 25 只 ICR 鼠随机分为两组。实验组 (13 只) 灌胃含弓形虫包裹的小鼠脑组织匀浆液 (10 个包裹/鼠), 对照组 (12 只) 灌胃等量生理盐水, 记录孕鼠产子时间和数量。实验组和对照组于受孕 20 d 后分别处死 3 只, 取胎盘组织和产出死胎的胎盘组织制作切片, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色和免疫组织化学检测, 同时提取胎盘组织 DNA, 进行 PCR 扩增弓形虫 B1 基因。实验组和对照组子代进行水迷宫实验, 观测两组子鼠学习记忆能力的差异。**结果** 实验组和对照组小鼠分别于受孕后 (19.2±1.751) d 和 (21.0±1.732) d 产子 ($P<0.05$), 产子数分别为 70 只和 85 只 ($P>0.05$)。实验组胎盘组织, HE 染色后镜下见, 绒毛间呈现多灶弓形虫, 绒毛周围霍夫包尔细胞增多, 血管扩张充血, 可见有核红细胞; 免疫组织化学检测结果显示, 胎盘组织中有弓形虫抗原颗粒; PCR 可在胎盘组织中扩增出弓形虫特异性 DNA 片段 (194 bp)。水迷宫测试结果显示, 学习第 3 天和第 4 天, 实验组子鼠的逃避潜伏期时间分别为 (29.92±4.28) s 和 (27.69±6.23) s, 对照组的分别为 (24.07±5.32) s 和 (22.25±7.94) s, 前者长于后者 (均 $P<0.05$); 实验组和对照组子鼠的目标象限寻找路程分别为 (384.66±41.33) cm 和 (426.12±46.48) cm, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论** 孕晚期鼠感染弓形虫 PRU 株后, 可导致生殖毒性, 并影响子一代的学习记忆能力。

【关键词】 刚地弓形虫; Prugniaud 株; 生殖毒性; 学习记忆

中图分类号: R382.5

文献标识码: A

Effect of *Toxoplasma gondii* Prugniaud Strain Infection in Pregnant Mice on the Learning Ability of the F1 Generation

WANG Zheng-rong¹, BAO Huai-en^{2*}

(1 Department of Clinic Laboratory Medicine; 2 Department of Parasitology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

【Abstract】 **Objective** To study the effect of *Toxoplasma gondii* prugniaud strain infection on female reproductive toxicity in mice and learning ability of their F1 generation. **Methods** Thirteen ICR mice were each infected intragastrically with 10 *T. gondii* cysts on the 15th day of pregnancy (late stage pregnancy). 12 mice were treated with physiological saline as control. The time from conception to birth and the number of offspring were recorded. Three mice from each group were sacrificed when pregnant 20 d, placentas from the sacrificed and output stillbirth mice were examined by using histopathology and immunohistochemistry. DNA extraction was performed from placenta tissue, and then *T. gondii* B1 gene was amplified by PCR. The F1 generation mice from experiment group and control group were tested by Morris water maze test. Statistical analysis on learning and memory ability was made by SPSS 13.0 software. **Results** The time from conception to birth in experiment group [(19.2±1.751)d] was shorter than that in control group [(21.0±1.732)d] ($P<0.05$). No significant difference was found in the number of offspring between experiment group (70) and control group (85) ($P>0.05$). Microscopic examination with HE staining showed multiple *T. gondii* among placental villi, the increase of the number of Hofbauer cells, blood sinus expansion and hyperemia, and visible nucleated erythrocytes. Immunohistochemically, *T. gondii* antigen was detected in placenta tissue. *T. gondii* B1 gene was detected in placenta tissue (194 bp). On the third and fourth day of the Morris water maze test, the latency of experiment group [(29.92±4.28) s, (27.69±6.23) s] was longer than that of the control [(24.07±5.32) s, (22.25±7.94) s] ($P<0.05$). In the spatial probe test, the distance across the platform quadrant of experiment group [(384.66±41.33) cm] was shorter than that of the

基金项目: 贵州省高层次人才特助经费 (No. 2004)

作者单位: 贵阳医学院 1 临床检验学教研室; 2 寄生虫教研室, 贵阳 550004

* 通讯作者, E-mail: bhe@gmc.edu.cn

control [(426.12±46.48) cm]($P<0.05$). **Conclusion** *T. gondii* Prugnialud strain infection in late stage pregnancy of mice may induce reproductive toxicity and affect the learning and memory capability of the F1 generation.

[Key words] *Toxoplasma gondii*; Prugnialud strain; Reproductive toxicity; Learning and memory

Supported by a Special Fund for High-level Talents of Guizhou Province (No. 2004)

* Corresponding author, E-mail: bhe@gmc.edu.cn

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是一种机会性专性细胞内寄生原虫, 可感染包括人在内的所有哺乳动物、鸟类和爬行动物^[1], 导致严重的人兽共患弓形虫病。本病呈世界性分布, 人群普遍易感。孕妇感染弓形虫可致流产、死胎和胎儿畸形, 或新生儿先天性弓形虫病, 影响子代的生长发育^[2]。中国临床上已常规开展孕妇孕早期弓形虫感染 (TORCH) 的血清学筛查, 但对孕晚期感染仍未引起足够重视。从对弓形虫所致生殖毒性及子代智力影响的动物实验发现, 虫体基因型和毒力不同, 所致的病理改变也不同。

弓形虫根据基因型不同可分为 I、II 和 III 型^[3], 中国对弓形虫所致生殖毒性的研究大多为基因 I 型 RH 株, 弓形虫 Prugnialud (PRU) 株属于基因 II 型, 毒力弱于 RH 强毒株的成囊株^[4], 是北美和欧洲人以及动物感染的优势基因型之一^[5,6]。近年来中国对弓形虫 PRU 株的研究主要涉及侵入机制^[7]、智力改变、机体免疫调节和诊断抗原等方面, 而针对宿主孕晚期感染弓形虫 PRU 株后对生殖毒性和子代的影响鲜见报道。本实验对基因 II 型 PRU 株感染孕晚期小鼠进行研究, PCR 扩增在不同弓形虫分离株中都具有高度保守性的 B1 基因^[8], 以快速获得孕晚期小鼠胎盘弓形虫感染的情况, 并观察 PRU 株是否会导致孕晚期雌鼠生殖毒性及对子一代学习记忆能力造成的影响。

材料与方法

1 材料

1.1 弓形虫虫株和实验动物来源 弓形虫 PRU 株由蚌埠医学院孙新教授和南京医科大学陈锡慰教授惠赠, 在昆明小鼠体内传代保种。取感染的昆明鼠脑组织, 放入无菌匀浆器内研磨, 以无菌生理盐水制备成脑组织匀浆液。6~8 周龄 SPF 级 ICR 小鼠 48 只, 体重 20~25 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [许可证编号 SCXK (京) 2006-0009]。

1.2 主要试剂和仪器 兔抗弓形虫多克隆抗体购自美国 ViroStat 公司, 兔抗体免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 2×Taq MasterMix (2×DNA 酶聚合物) 和 DNA Marker I (DNA 分子量标志物) 购自北京康为世纪生物科技有限公司, 琼脂糖购自西班牙 Electrop Grade 公司, B1 基因引物由生工生物工

程 (上海) 股份有限公司合成。自动组织脱水机 (TP1020)、生物组织石蜡包埋机 (YB-6LF 型) 和切片机 (RM2145) 均为德国莱卡公司产品。PCR 扩增仪 (TECHNE-TC-512 型)、凝胶成像仪 (Image Quant 400 型) 和 Morris 水迷宫 (DNS-2 型) 由中国医学科学院药物研究所提供。

2 方法

2.1 动物模型建立 ICR 雌鼠 32 只、雄鼠 16 只按 2:1 随机合笼交配, 每笼 6 只。次晨开始查阴栓, 查到阴栓者计为孕 0 d, 共有孕鼠 25 只, 于受孕 15 d 时 (孕晚期) 分为实验组 (13 只) 和对照组 (12 只)。实验组小鼠灌胃含弓形虫包囊的小鼠脑组织匀浆液 (10 个包囊/鼠), 对照组灌胃等量生理盐水, 实验期间分笼饲养, 小鼠正常取食和饮水, 并记录孕鼠产子鼠时间和数量。

2.2 苏木素-伊红染色 (HE 染色) 和免疫组织化学检测 对照组和实验组分别于孕 20 d 处死 3 只, 取胎盘组织和产出死胎的胎盘组织于 10% 中性甲醛溶液固定 24 h, 常规脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色和免疫组织化学检测, 镜下观察胎盘组织的病理学改变。免疫组织化学结果判定: 在抗原定位处见棕褐色沉淀为阳性反应。

2.3 PCR 扩增弓形虫 B1 基因 取方法 2.2 中的胎盘组织, 常规酚-氯仿提取胎盘组织 DNA。PCR 扩增弓形虫 B1 基因 (GenBank 登录号为 AF179871.1) 特异性片段^[9], 片段预计大小 194 bp, 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳 (120 V, 20 min) 检测, 紫外检测仪下观察结果。

2.4 水迷宫试验 子鼠 2 月龄后, 实验组和对照组各取 17 只进行 Morris 水迷宫实验^[10,11]。包括定位航行试验 (学习功能检测) 和空间探索试验 (记忆功能检测) 两部分, 历时 7 d, 测定子鼠的学习记忆能力。

3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验结果分别进行方差齐性检验和独立样本 *t* 检验。

结 果

1 孕鼠产子鼠时间和数量

实验组 10 只孕鼠于受孕后 (19.2±1.751) d 产子鼠 70 只, 其中死胎 4 只。对照组 9 只孕鼠于受孕后 (21.0±1.732) d 产子鼠 85 只, 未见死胎。结果显示, 孕晚期小鼠感染 PRU 株后, 会导致母鼠产子时间提前 ($P<0.05$), 但产子数变化不大 ($P>0.05$)。

2 胎盘组织的 HE 染色和免疫组织化学结果

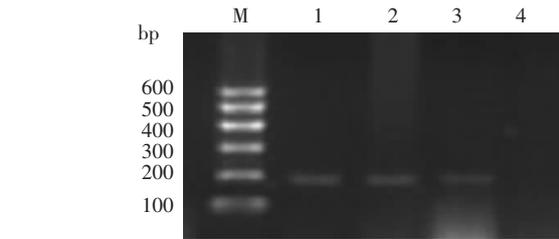
HE 染色和免疫组织化学检测可见, 实验组胎盘母体面蜕膜表面可见灶性钙化, 部分区域蜕膜细胞坏死, 血管扩张, 疏松水肿, 绒毛周围霍夫包尔细胞增多, 血窦扩张充血, 可见有核红细胞。部分胎盘绒毛间可见多灶弓形体 (图 1A、B)。胎盘组织的免疫组织化学染色弓形虫虫体强阳性, 呈深棕褐色。部分胎盘细胞胞浆表现较浅的棕褐色沉淀, 为弱阳性, 说明弓形虫感染后, 可进入胎盘组织, 弓形虫抗原还可表达在宿主细胞浆内 (图 1C)。对照组胎盘组织 HE 镜检: 胎盘结构正常, 羊膜绒毛膜结构正常。胎盘主体由绒毛组成, 绒毛间质为毛细血管, 血管被覆内皮细胞, 血管腔内见较多成熟红细胞, 未见有核红细胞, 霍夫曼细胞未见增生, 未见炎症细胞浸润。

3 弓形虫 B1 基因特异性片段

实验组胎盘 DNA 可扩增出弓形虫特异性片段, 在 194 bp 处可见一条带。而对照组未扩增出条带 (图 2)。

4 子鼠水迷宫实验结果

从第 1 天至第 6 天, 实验组子鼠逃避潜伏期分别



M: DNA 标志物; 1~3: 感染弓形虫的孕鼠胎盘; 4: 阴性对照。

M: DNA marker; 1-3: Placenta of *Toxoplasma gondii*-infected pregnant mice; 4: Negative control.

图 2 弓形虫 B1 基因特异性片段扩增

Fig. 2 Amplification of B1 gene of *Toxoplasma gondii*

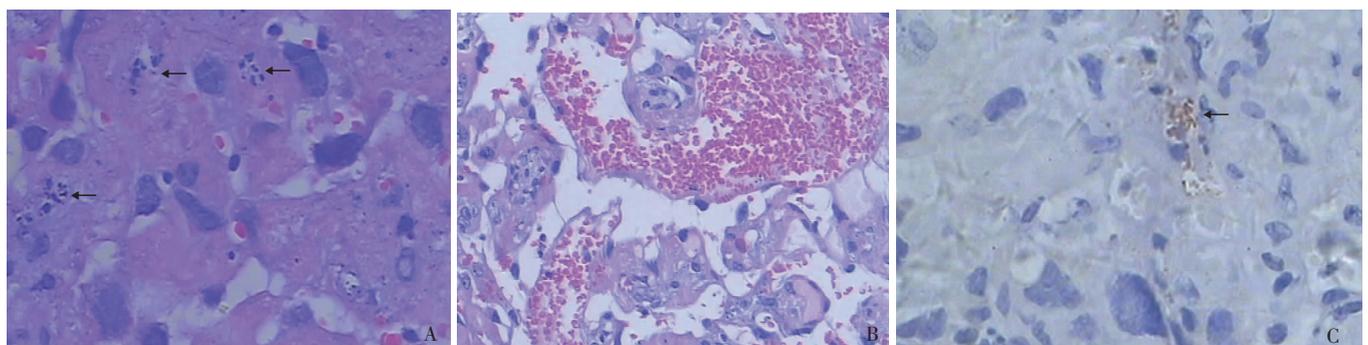
为 (41.74±6.60)、(26.29±4.95)、(29.92±4.28)、(27.69±6.23)、(24.17±5.43) 和 (20.79±5.79) s; 对照组的则分别为 (37.97±6.03)、(22.70±6.23)、(24.07±5.32)、(22.25±7.94)、(20.77±4.73) 和 (18.60±3.94) s, 实验组子鼠逃避潜伏期均高于对照组, 第 3~4 天, 两组差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

空间探索试验结果显示, 当撤去平台, 实验组子鼠在目标象限寻找的路程为 (384.66±41.33) cm, 而对照组则为 (426.12±46.48) cm, 前者明显短于后者, 表现出空间记忆能力的差异 ($P<0.05$)。

讨 论

妊娠期感染弓形虫, 孕妇大多呈无临床症状的亚临床感染状态, 对胎儿可能产生潜在的危害和致残效应, 感染造成的危害除与宿主免疫状态、虫体的基因型、感染方式和时间有关外, 虫体本身的毒力也是重要因素^[12]。

本研究证实, 弓形虫 II 型 PRU 株能在孕晚期进入胎盘, 说明 PRU 株感染小鼠后, 仍可很快侵入组



A: 霍夫包尔细胞增多 (HE 染色, ×400); B: 血窦扩张充血 (HE 染色, ×200); C: 弓形虫速殖子 (免疫组织化学染色, ×400), 箭头所示为弓形虫虫体。

A: The number of Hofbauer cells increased (HE staining, ×400); B: Blood sinus expansion and hyperemia (HE staining, ×200); C: *T. gondii* tachyzoites (IHC staining, ×400), arrow showing *T. gondii* tachyzoites.

图 1 孕鼠的胎盘病理切片

Fig. 1 Histopathological observation of mouse placenta

织,造成宫内感染,使胚胎生长环境发生改变。胎盘是母胎间物质和营养交换的场所,其绒毛结构和功能的正常是妊娠得以继续的基础。本研究发现胎盘组织的变性坏死和炎症改变,可导致雌鼠生殖系统损伤,推测弓形虫及其抗原物质可直接对胎盘和子鼠产生毒性作用、以及刺激母体免疫系统产生免疫活性物质等导致母体提前生产,但由于孕晚期胚胎基本发育成熟,且该弓形虫株的自然毒性较弱故产子数量上影响不大。

子鼠出生 2 个月后,进行水迷宫实验发现,两组子鼠都具有一定的空间记忆能力,但实验组子鼠学习的第 3、4 天与对照组相比具有差异性,而在第 5、6 天的学习中,子鼠都已学会找到平台,但在记忆能力试验中,对照组在目标象限寻找的路程远超过实验组,可见弓形虫感染对子代记忆能力有一定的影响。结果和部分学者^[13,14]报告相近,但 Wang 等^[15]认为孕晚期感染 PRU 株所产的子鼠学习记忆能力没有改变。可能是由于实验所用小鼠品系不同,对弓形虫的易感性不同和所选用测定子鼠学习记忆能力的实验方法不同等有关。

本研究证明,弓形虫 PRU 株毒性虽比强毒株弱,但孕晚期母鼠感染仍能导致其生殖毒性的发生,一定程度上可造成子代学习记忆能力降低,但后者是由于弓形虫通过影响子代脑内某些神经递质的水平而影响其脑功能和行为,还是弓形虫毒性导致子代的神经系统的异常所致,其确切机制尚待进一步研究。同时,本研究还提示,应重视对孕晚期弓形虫病的预防和治疗,适当采取干预措施,以达到优生优育的目的。

参 考 文 献

- [1] Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*[J]. Front Biosci, 2000, 1(5): 391-405.
- [2] 凌云, 冯春颜, 胡琴, 等. 孕妇妊娠各期弓形虫感染与垂直传播的临床研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(6): 455-457.
- [3] Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites[J]. Int J Parasitol, 2006, 36(7): 841-848.
- [4] 孙新, Cozon G, Gandillon F, 等. 刚地弓形虫细胞培养的研究 III. 不同毒力株速殖子培养检出时间的差异[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1995, 8(2): 114-116.
- [5] 王家传, 蒋作君, 沈继龙, 等. 一个具有诊断价值的弓形虫基因的发现[J]. 临床输血与检验, 2005, 7(3): 184-186.
- [6] Robbins JR, Zeldovich VB, Poukchanski A, et al. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii* [J]. Infect Immun, 2012, 80(1): 418-428.
- [7] 吴升伟, 包怀恩, 李小燕, 等. 小鼠感染弓形虫 PRU 株后的组织病理学变化[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(5): 327-332.
- [8] 朱祥明, 杨通汉, 杨国庆, 等. 弓形虫 SYBR-Green1 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2007, 2(6): 428-432.
- [9] 吴升伟, 包怀恩, 葛爽, 等. 弓形虫 Prugniald 株感染小鼠后脑组织病理学动态观察[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(9): 796-800.
- [10] 王惠玲, 包安裕, 王高华, 等. 弓形虫(RH 株)慢性感染小鼠空间学习记忆能力的初步研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(2): 114-118.
- [11] 张志华, 段希玲, 杨晓红. 弓形虫感染对大鼠氧化应激与学习记忆能力的影响[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(8): 1010-1012.
- [12] Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans[J]. Int J Parasitol, 2000, 30(12-13): 1217-1258.
- [13] 苑文英, 马凯, 王辉, 等. 孕鼠感染弓形虫对子代的影响[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2005, 18(2): 96-98.
- [14] 殷国荣, 郑金平, 侯玉英, 等. 不同孕期弓形虫感染对 C57BL/6J 小鼠胚胎发育和子鼠学习能力的影响[J]. 中国公共卫生, 2001, 17(9): 811-812.
- [15] Wang T, Liu M, Gao XJ, et al. *Toxoplasma gondii*: the effects of infection at different stages of pregnancy on the offspring of mice[J]. Exp Parasit, 2011, 127(1): 107-112.

(收稿日期: 2012-11-28 编辑: 衣凤芸)

文章编号: 1000-7423(2013)-02-0107-03

【研究简报】

重庆沙坪坝区土源性线虫感染现况调查

刘虹宏^{1*}, 杨连建¹, 陈敏¹, 李廷荣¹, 陈音汁²

【提要】 2009 年 12 月~2010 年 2 月采用分层随机整群抽样法,按重庆沙坪坝区东南西北 4 个方位,随机抽取 2 个街道和 2 个乡镇,按《全国人体重要寄生虫病现状调查实施细则》开展调查。采用改良加藤厚涂片法检查 12 周岁以上常住居民肠道土源性线虫感染情况,以透明胶纸肛拭法检查 12 周岁及以下儿童蛲虫感染情况。共检查 2 121 人,感染率为 9.6% (203/2 121),其中钩虫、蛔虫和鞭虫的感染率分别为 9.3% (197/2 121)、0.4% (8/2 121) 和 0.1% (2/2 121),均以轻度感染为主;年龄组 50 岁以上感染率最高,为 15.5% (160/1 030);职业以农民感染率最高,为 22.3% (113/506);文化程度越高,感染率越低 ($P<0.01$)。城市人口感染率 (2.1%) 远低于农村人口感染率 (17.3%) ($\chi^2=140.443 5$, $P<0.01$)。提示重庆市沙坪坝区人群中土源性线虫的感染率远低于 II 类地区标准,且以钩虫感染为主。

作者单位: 1 重庆市沙坪坝区疾病预防控制中心,重庆 400038; 2 第三军医大学,重庆 400038

* 通讯作者, E-mail: lhh361@163.com