

弓形虫感染动物模型的建立及其特异性 IgG 抗体的研究^{*}李林杰¹, 包怀恩² (1. 贵阳护理职业学院检验系 550081; 2. 贵阳医学院寄生虫学教研室 550004)

【摘要】 目的 通过弓形虫 RH 株速殖子不同途径、不同剂量攻击 BALB/c 小鼠和 SD 大鼠, 以获得有效的特异性 IgG 抗体, 为建立体液免疫应答的动物模型提供一定的实验依据。**方法** 将实验动物分成速殖子 1×10^6 个腹腔注射 SD 大鼠组、不同剂量速殖子腹腔注射 BALB/c 小鼠组和速殖子 4×10^4 个灌胃 BALB/c 小鼠组。每组在不同的时间取血查 IgG 抗体, 各组均设对照鼠。**结果** 腹腔注射 SD 大鼠组的实验鼠未出现发病征象; 其血清 IgG 抗体含量逐渐上升, 其抗体水平明显高于对照鼠 ($P < 0.01$)。腹腔注射 BALB/c 小鼠组的实验鼠存活不超过 8 d; 灌胃 BALB/c 小鼠组到第 9 天时实验鼠有 4% 死亡, 其余均可存活至 28 d。且这两组实验鼠和对照鼠的 IgG 抗体水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** BALB/c 小鼠经口或经腹腔感染弓形虫 RH 株速殖子均未产生特异性 IgG 抗体, SD 大鼠经腹腔感染可产生特异性 IgG 抗体。SD 大鼠适于建立体液免疫应答的动物模型。

【关键词】 弓形虫; 速殖子; BALB/c 小鼠; SD 大鼠; IgG 抗体

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 05. 001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)05-0513-02

Establishment of animal model infected with toxoplasma gondii and analysis of specific IgG antibodies^{*} LI Lin-jie¹, BAO Huai-en² (1. Department of Medical Laboratory, Guiyang Nursing Vocational College, Guiyang 550081, China; 2. Department of Parasitology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

【Abstract】 Objective In order to get effective IgG, BALB/c Mice and SD Rats were injected tachyzoites of RH strain in different ways and different doses. This research supplied some bases for creating animal model of humoral immune response. **Methods** The test animals were categorized into three groups; SD rats injected intraperitoneally with 1×10^6 tachyzoites of RH strain, BALB/c mice injected intraperitoneally with tachyzoites of different doses and BALB/c mice had intragastric administration with 4×10^4 tachyzoites. Control rats or mice were set up at each group and the sera from each group were collected at different times. **Results** The experimental group of SD rats didn't have obvious symptom, and the level of specific IgG antibody was gradually increased, which was higher considerably than that in the control rats ($P < 0.01$). The survival time of BALB/c mice injected intraperitoneally with tachyzoites was no more than 8 days, 4% BALB/c mice by intragastrical injection died on the 9th day after infection, the rest of them could live 28 days. The level of IgG weren't significantly different in the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** BALB/c mice could not produce specific IgG by oral or intra-abdominal infection of tachyzoites. SD rats could produce specific IgG by intra-abdominal infection of tachyzoites. SD rats are suitable to establish the animal model of humoral immune response.

【Key words】 toxiplasma gondii; tachyzoite; BALB/c mouse; SD rat; IgG

弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是寄生于人和多种动物组织细胞内的原虫, 估计全球有三分之一的人被感染^[1]。因所使用的虫株毒性不同、宿主对虫体的反应性不同、宿主抑制虫体增殖的能力不同等, 所建立的实验动物模型呈现出一定的多变性^[2]。弓形虫 RH 株是目前世界上广泛采用的强毒株, 且速殖子是弓形虫感染急性期的主要致病阶段, 选择合适的动物模型对于该强毒株的实验及研究意义重大。为了获得有效的特异性 IgG 抗体, 本实验通过 RH 强毒株速殖子不同途径、不同剂量攻击不同鼠种, 对于体液免疫应答的动物模型的建立提供了一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 实验前用间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测大鼠血清中的 IgG 抗体, 用弓形虫 IgG 抗体检测试剂盒检测小鼠血清中的抗体, 选择阴性鼠作为实验用鼠, 排除自然感染。BALB/c 小鼠 30 只, 20~25 g, 6~8 周, 雌雄各半, 引自上

海中科院实验动物中心, 清洁级, 贵阳医学院动物实验中心饲养繁殖, 保持近交。SD 雌性大鼠 50 只, 180~200 g, 引自贵阳医学院动物实验中心, 清洁级。

1.2 虫株 国际标准强毒株 RH 株弓形虫, 购自湘雅医学院寄生虫学教研室, -80 °C 保存。常规复苏, 无菌接种 BALB/c 小鼠, 转种 3 代后, 无菌收集腹腔积液, 洗涤净化后计数速殖子, 备用。

1.3 主要试剂 96 孔酶标板购自加拿大 JET 公司, 吐温-20 (Tween-20) 购自上海生工生物工程有限公司, 辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠 IgG (HRP-IgG) 购自北京博奥森公司, 抗体稀释液、TMB 显色剂、终止液购自南京凯基生物公司, 弓形虫 IgG 抗体检测试剂盒 (小鼠用) 购自深圳市康百得生物科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 实验用鼠的分组及处理 (1) 将 50 只 SD 雌性大鼠分

^{*} 基金项目: 贵州省科学技术基金 (No. 20043084); 贵州省高层次人才特助经费。

为实验组 25 只和对照组 25 只。实验组:将感染速殖子的小鼠腹腔液抽出后,生理盐水冲洗 3 次,用血细胞计数板计数细胞悬液中的弓形虫速殖子。2% 台酚蓝染色观察速殖子活力,用生理盐水调整速殖子细胞悬液的浓度为 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$,25 只 SD 雌性大鼠均腹腔注射 2 mL,每隔 1 周随机选取 5 只大鼠,股动脉放血分离血清;4 周后将剩余 5 只大鼠再次腹腔注射相同剂量速殖子两次,每次间隔 1 周,于第 10 周采集血清,血清于 -80°C 分装保存。对照组:25 只 SD 雌性大鼠均腹腔注射生理盐水 2 mL,也于同样的天数股动脉放血分离血清,血清于 -80°C 分装保存。(2)将 42 只 BALB/c 小鼠分为实验组 28 只和对照组 14 只。实验组:将弓形虫速殖子计数后分成 8×10^4 、 12×10^2 、 8×10^2 、 6×10^2 、 4×10^2 、 2×10^2 、 1×10^2 个虫体/只鼠的剂量,每个剂量腹腔注射 4 只 BALB/c 小鼠。对照组:生理盐水 2 mL 腹腔注射 BALB/c 小鼠,均于小鼠出现濒死状态时立即处死,摘眼球法取血收集血清。血清于 -80°C 分装保存。(3)将 42 只 BALB/c 小鼠分为实验组 30 只和对照组 12 只。实验组:弓形虫速殖子 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$,0.08 mL 虫体灌胃 BALB/c 小鼠。对照组:生理盐水 1 mL 灌胃 BALB/c 小鼠。分别在灌胃后的第 4、8、15、22、28 天处死小鼠,摘眼球法取血收集血清,血清于 -80°C 分装保存。

1.4.2 弓形虫速殖子抗原(tachyzoite antigen,STAg)的制备及浓度测定 将 -80°C 保存的弓形虫速殖子加入蛋白裂解液(8 M 尿素,2 M 硫脲,40 mM 三羟甲基氨基甲烷,4% CHAPS,65 mM 二硫苏糖醇,0.2% pH3~10 IPG buffer,1% Protease Inhibitor Cocktail,1 mmol/L PMSF),反复快速冻融 3 次。冰上超声破碎 5 min。 4°C 放置 1 h,16 000 r/min 离心 30 min。Bredford 法^[3]测定标本的蛋白浓度后分装,放置于 -80°C 保存。

1.4.3 血清中特异性弓形虫 IgG 抗体的检测 实验前棋盘滴定以确定 ELISA 最适条件:抗原浓度为 1:400,抗体浓度为 1:20,酶结合物为 1:3 000。操作步骤为:将弓形虫抗原包被后 4°C 过夜,封闭液 37°C 温育 1 h,洗涤液洗涤后将待测鼠的每份血清样品上复孔, 37°C 温育 1 h。洗涤后加入 HRP 标记的兔抗大鼠 IgG, 37°C 温育 1 h。TMB 在 37°C 避光显色 20~25 min 后,终止液终止反应,酶标仪 450 nm 波长下读取吸光度(A450 值)。小鼠血清中特异性 IgG 抗体的检测严格按照试剂盒说明书进行。

2 结 果

2.1 弓形虫体外感染动物模型的观察

2.1.1 弓形虫腹腔注射 SD 大鼠 SD 大鼠经腹腔注射 RH 株弓形虫速殖子 1×10^6 个后,一直未见明显发病征象,饮水及进食正常。实验各期的腹腔液内见巨噬细胞,未见游离的速殖子。

2.1.2 弓形虫腹腔注射 BALB/c 小鼠 BALB/c 小鼠经腹腔感染 RH 株弓形虫速殖子后,最早第 3 天即开始出现毛较松乱,弓背,尾骨较疏松,大便不成形,精神不振,活动度降低,饮水及进食量减少。其腹腔液内含有游离的速殖子、假包裹,其虫体的浓度随着感染时间的延长而增大,尤其在濒死状态时为大量的游离速殖子。其存活时间较短(腹腔感染量为 1×10^2 个弓形虫速殖子时,最长可存活 8 d;感染剂量较大时只能存活 3~4 d)。

2.1.3 弓形虫灌胃 BALB/c 小鼠 用速殖子 4×10^4 个灌胃

BALB/c 小鼠,第 7 天出现上述发病征象,第 9 天时 4% 小鼠死亡,其余均可存活至 28 d。

2.1.4 各对照组情况 对照组 BALB/c 小鼠、SD 大鼠生长发育及活动未见异常,饮水及进食正常,未出现发病死亡,未发现弓形虫病原体。

2.2 各组血清中抗弓形虫 IgG 抗体含量的动态变化

2.2.1 弓形虫腹腔注射攻击 SD 大鼠组 间接 ELISA 法检测大鼠血清抗体水平,结果显示:对照组各时期 SD 大鼠血清中的 IgG 抗体 A450 值在 0.10~0.14 范围内波动,无明显变化。实验组血清 IgG 抗体含量逐渐上升,第 3 周时 A450 值高达 0.33,随后抗体水平略下降;当再次注射相同剂量虫体后,其抗体含量再次升高,第 10 周时 A450 值高达 0.38。与对照组相比,实验组有明显的升高趋势。采用配对 *t* 检验,实验组和对照组之间的差异具有统计学意义($P < 0.01$)。从抗体产生的动态变化可以看出,该剂量的弓形虫速殖子已经诱导机体产生一定的体液免疫应答(见图 1)。

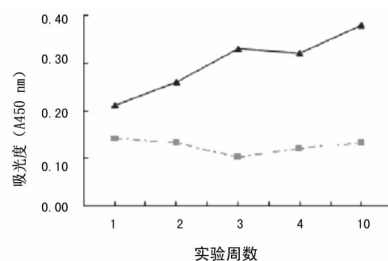


图 1 大鼠血清 IgG 抗体 A450 值的动态变化

2.2.2 弓形虫腹腔注射攻击 BALB/c 小鼠组 ELISA 结果显示该试剂盒共检测了 28 份实验组和 14 份对照组血清,小鼠阳性率为 0%。说明弓形虫在实验小鼠体内未产生特异性 IgG 抗体。实验组和对照组的 IgG 抗体水平之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2.3 弓形虫灌胃攻击 BALB/c 小鼠组 ELISA 结果显示该试剂盒共检测了 30 份实验组和 12 份对照组血清,小鼠阳性率为 0%。说明弓形虫在实验小鼠体内未产生特异性 IgG 抗体。实验组和对照组的 IgG 抗体水平之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

刚地弓形虫是一种重要的机会致病原虫,其发育的全过程有 5 种不同的形态阶段:滋养体、包裹、裂殖体、配子体和卵囊。在宿主免疫功能低下时,感染该原虫可致严重后果。弓形虫有强毒性的 RH 株、中等毒性的 Beverley 株和弱毒性的涤谷株等^[4]。其中,RH 株是国际标准强毒株,对多种实验动物接种少量的弓形虫即可发病,数天后可死亡^[5]。目前国内许多实验室均用此株做相关研究工作。在弓形虫病的相关研究中,动物的选择会影响实验的成败。目前所用的实验动物主要有小鼠、大鼠和兔等。

弓形虫再次进入宿主时,是以高亲和力的 IgG 为主,且持续时间长,在慢性感染中可长期存在。在宿主抗弓形虫感染的保护性免疫中,IgG 抗体参与凝集、调理及补体依赖的细胞毒作用^[6]。因此,对引起大鼠产生 IgG 抗体的抗原采取进一步的研究,以筛选特异性的抗原。由于速殖子是弓形虫感染急性期的主要致病阶段,为了用速殖子攻击动物后,得到较稳定、适于进一步研究的抗体,本实验通过不同的途径及剂量,体外攻击 BALB/c 小鼠和 SD 大鼠后发现:(1)小鼠速殖(下转第 516 页)

3 讨 论

糖尿病是血糖代谢障碍性疾病,近年来,其发病率逐渐升高,糖尿病患者可发生多种并发症,糖尿病可造成多系统和多器官的损伤,在体内可引起慢性炎症反应,微血管病变是其主要表现症状。大量的研究表明,糖尿病患者体内普遍存在凝血状态、纤溶功能及血小板活性的异常,并且随着病情进展而加重^[1-2]。糖尿病患者的高凝状态直接与糖尿病并发症的发生、发展及其病死率密切相关。

糖尿病患者体内高糖、高脂环境促使凝血系统处于活化状态,导致患者体内内源性凝血系统激活,纤维蛋白酶作用下的凝血因子 I 转化为纤维蛋白增多,提高血栓形成的风险。这个系统的改变包括多种凝血因子水平的升高,抗凝血酶Ⅲ的含量减少、活性降低^[3]。同时,纤溶系统的改变以及血小板的改变会激活患者外源性凝血途径。可表现为用于检测内源凝血途径的 APTT、外源性凝血途径的 PT 均明显缩短, FIB 明显增高。由于凝血功能亢进而引起抗凝血功能减退,从而 TT 缩短。

糖尿病在体内可引起慢性炎症反应,微血管病变是其主要表现症状。hs-CRP 浓度的轻度升高,被证实为冠心病或未来冠心病事件危险性的标志,浓度升高与心血管事件发生率相关^[4-5]。hs-CRP 升高可致血液循环中白细胞聚集浸润引起局部组织损伤和炎症反应,造成微血管损害。

本研究中,T2DM 患者 PT、TT、和 APTT 水平明显低于健康人($P < 0.05$),而 FIB 水平较健康对照组显著升高($P < 0.01$)。说明 T2DM 患者凝血系统处于高凝状态,容易形成血栓,堵塞微血管,造成局部缺血,因此,冠心病是糖尿病的主要并发症。另外,T2DM 的 hs-CRP 水平较健康对照组显著升高($P < 0.01$),T2DM 患体内存在慢性炎症反应,由于长期处于高糖环境中,导致胰岛 B 细胞分泌胰岛素功能受损及产生

胰岛素抵抗,刺激巨噬细胞、脂肪细胞和内皮细胞分泌的 IL-6、TNF 等炎症因子,炎症因子刺激肝脏合成 hs-CRP。hs-CRP 及 PT、APTT、TT 水平可以反映 T2DM 患者血糖水平控制情况,如果血糖水平控制不佳,4 项检测指标明显异常。因此,凝血因子 PT、APTT、TT 和炎症因子 hs-CRP 水平的检测对动态观察糖尿病的病情变化、预后估计及治疗均具有重要的临床价值。

参考文献

- [1] Yamada T, Sato A, Nishimori T, et al. Importance of hypercoagulability over hyperglycemia for vascular complication in type 2 diabetes[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2000, 49(1): 23-31.
- [2] Adelstein S, Garnperts ED, Joffe BI, et al. Haemostatic factors in black and white diabetics[J]. S Afr Med J, 1999, 55: 325-328.
- [3] Carr ME. Diabetes mellitus; a hypercoagulable state[J]. J Diabet Complications, 2001, 15(1): 44-54.
- [4] Ridker PM, Cushman M, Stamper MJ, et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men[J]. N Engl J Med, 1997, 336: 973-979.
- [5] Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, et al. C reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women[J]. N Engl J Med, 2000, 342: 836-843.

(收稿日期: 2011-09-01)

(上接第 514 页)

子腹腔注射攻击的模型只作为急性弓形虫病的研究,且是除了细胞培养外能获得大量游离速殖子的常用方法之一。(2)尽管消化道的酸、碱、酶等对游离速殖子有一定破坏作用,但一定数量的速殖子仍可通过经口途径感染侵入肠道部位。刘红丽等^[7]用 5×10^4 个速殖子灌胃 BALB/c 小鼠后,80% 的小鼠在第 8~10 天有发病征象,且第 7、8 天分别有 1 只鼠死亡,其余均存活,该结果与本实验相似。然而,用间接 ELISA 法对其不同时期的血清进行检测时,并未测出其特异性 IgG 抗体,考虑其 IgG 抗体含量较低,不能满足本实验。(3)SD 大鼠腹腔注射速殖子后,一直未出现发病的征象,腹腔液中均未见速殖子。用间接 ELISA 法对其不同时期的血清进行检测时,可看到其特异性抗体有明显的变化。大鼠可作为本实验获得足量特异性抗体的合适动物。用弓形虫速殖子感染大鼠作为实验对象,对研究弓形虫寄生宿主后的免疫学作用和疫苗的设计开发具有更大的价值^[8]。

参考文献

- [1] Weiss LM, Fiser A, Angeletti RH, et al. Toxoplasma gondii proteomics[J]. Expert Rev Proteomics, 2009, 6(3): 303-313.

- [2] 杨培梁, 王元占, 陈晓光. 弓形虫感染实验动物模型的特点及建模方案的选择[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(6): 83-84.
- [3] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Ana Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [4] 方厚华. 医学实验模型动物[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2002: 231-232.
- [5] 于恩庶. 弓形虫病学[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1992: 44-49.
- [6] 于恩庶. 中国弓形虫病[M]. 香港: 亚洲医药出版社, 2000: 18-19.
- [7] 刘红丽, 韩剑峰, 殷国荣, 等. 经口感染弓形虫诱导小鼠黏膜免疫动物模型的建立[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2005, 17(3): 207-210.
- [8] 赖植发, 陈晓光. 弓形虫感染大鼠动物模型的研究进展[J]. 热带医学杂志, 2005, 5(6): 874-875.

(收稿日期: 2011-08-20)