

慢性感染阶段弓形虫包囊在小鼠脑组织的动态病理变化

吴梦云^{1,2} 蔡茹¹ 李伊凡², 汪学龙² 姚湧²

摘要 目的 探究弓形虫慢性感染期间弓形虫包囊在感染小鼠脑部各区域的分布与病理变化对小鼠行为与神经精神的影响。方法 使用弓形虫 Prugniald 株灌胃小鼠,记录感染小鼠病情;分别在小鼠感染的第10、30、40、90、120、160天取感染小鼠脑组织,分离出海马下丘脑、前额叶、纹状体和小脑区域,HE染色观察并记录各感染区域的包囊数量和神经病理变化。结果 弓形虫感染小鼠出现竖毛、弓背等症状,在第40天最为显著,随后逐渐恢复,遗留偏瘫和原地打转等症状;在各时间节点,弓形虫包囊的数量均以海马下丘脑最多,前额叶和纹状体次之,小脑最少;弓形虫包囊的直径随着时间推移均呈增大趋势。慢性感染期间,在脑组织各区域均

可观察到弓形虫包囊噬神经现象等特异性病理表现,上述弓形虫脑炎的病理改变在第40天达到顶峰,后逐渐恢复,至第120天增至刺激峰,随后逐渐恢复。结论 弓形虫慢性感染期间的行为和神经精神症状与弓形虫包囊在感染小鼠脑部的定位分布有一定的相关性,并呈现动态变化。

关键词 弓形虫;包囊;脑组织;病理变化;HE染色

中图分类号 R 382.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)02-0184-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.002

弓形虫是一种专性细胞内寄生虫,1909年由法国学者发现^[1]。弓形虫全球分布,几乎可以在所有哺乳动物细胞中入侵并复制^[2]。据估计,全球三分之一的人口被弓形虫感染,且大多数人都处于慢性感染阶段^[3]。弓形虫以“特洛伊木马”的模式通过血脑屏障定植于大脑^[4],在慢性感染阶段,弓形虫在神经元内以包囊形式存在,形成免疫豁免^[5]。寄生在中枢神经系统的弓形虫通过基因调控宿主的神经免疫^[6],分泌效应因子和改变宿主神经信号通路^[7]的途径导致宿主脑部神经生理变化,影响宿主的精神和行为,但却可促进自身的生命周期^[8]。此前的研究^[9]表明,弓形虫对大脑特定区域具有明显

2022-12-27 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2019A0264); 安徽理工大学2021年研究生创新基金项目(编号: 2021CX2121)

作者单位: ¹ 安徽理工大学医学院, 淮南 232001

² 安徽医科大学基础医学院病原生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 吴梦云,女,硕士研究生;

蔡茹,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: lxherh@aliyun.com;

姚湧,男,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: yaoyong@ahmu.edu.cn

system. **Methods** The primers were designed, and the His-GRK2 target gene was amplified by PCR using the Pans-EGFP-GrK2 (full-length) gene as the template. The His-GRK2 target gene was connected to the pcDNA3.1-EGFP eukaryotic expression vector. The pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 plasmid was transfected into HEK 293T cells. 48 h later, the expression of GRK2 protein was detected by Western blot, and the GRK2 protein was purified by nickel chelated magnetic bead method. The purification of GRK2 protein was detected by Coomassie bright blue staining and Western blot, and the activity of GRK2 protein was detected by His pull down. **Results** The results of double enzyme digestion and sequencing showed that pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 eukaryotic expression plasmid was successfully constructed. Western blot analysis showed that the molecular weight of GRK2 protein was about 80 ku, indicating that GRK2 protein was successfully expressed in HEK 293T cells ($t = 6.433$, $P = 0.003$). GRK2 protein was purified by nickel chelated magnetic beads. His pull down experiment results showed that GRK2 was bound to prostaglandin E2 receptor 4 (EP4), suggesting that GRK2 protein had biological activity ($t = 13.5$, $P = 0.0002$). **Conclusion** The pcDNA3.1-EGFP-His-GRK2 eukaryotic expression plasmid was correctly sequenced and the GRK2 recombinant plasmid was successfully constructed. The GRK2 recombinant plasmid was successfully expressed in eukaryotic cells HEK 293T and the protein expressed was biologically active.

Key words G protein coupled receptor kinase 2; HEK 293T cells; eukaryotic expression; protein purification; activity identification

的趋向性 随着时间的推移,包囊在宿主脑组织内的定位分布影响着宿主的精神和行为。该研究旨在动态观察弓形虫对宿主精神与行为的操纵与脑内包囊分布的关系,以及慢性感染阶段宿主精神行为变化的内在原因。

1 材料与方法

1.1 实验动物和弓形虫虫株 50只6~8周龄昆明种雌性小鼠,20~25g,购于安徽医科大学实验动物中心,5只/笼,正常采食饮水。弓形虫 Prugniald 株 (PRU 株) 由安徽医科大学基础医学院病原生物学实验室在昆明种鼠体内保种,传代。

1.2 小鼠脑组织包囊的获取 在无菌条件下,颈椎脱臼处死 PRU 毒株弓形虫保种小鼠,取脑组织,加生理盐水充分研磨过滤制成含弓形虫包囊的组织匀浆,置于5ml EP管中保存。计数包囊后保种。

1.3 PRU 株慢性感染小鼠模型的建立 用含有包囊的组织匀浆制备灌胃液,调制包囊浓度为175个/ml,经口感染50只实验小鼠,每只小鼠灌胃35个包囊。

1.4 感染小鼠模型病情程度的动态记录 分别在小鼠感染的第10、30、40、90、120、160天观察并记录感染小鼠的病情变化,出现以下任一项记为1分:竖毛、弓背、活动低下、原地打转、消化系统影响(腹胀和腹泻)、呼吸系统影响(呼吸浅快)、中枢神经系统影响(偏瘫)。

1.5 心脏灌流取感染小鼠脑组织 分别在感染的第10、30、40、90、120、160天各取4只小鼠,用0.25ml水合氯醛(80mg/kg)注射麻醉小鼠,将生理盐水注射器插入左心室,先灌注生理盐水,右心耳流出的液体澄清时,立即换用4%多聚甲醛灌注20min。待小鼠身体僵硬,内脏变白,将头盖骨剥开,将脑下部连接的神经剪断,剥离完整脑组织放入有4%多聚甲醛溶液的EP管,浸没脑组织,做标记,放入4℃冰箱过夜固定。取出完整大脑组织,对照小鼠解剖图谱分离出海马下丘脑、前额叶、纹状体和小脑组织各4份,每份约40mg,2份切片后用于HE染色,2份制备成2ml组织匀浆,置于5ml EP管中,用BX3正置显微镜及显微成像系统计数包囊数量,记录包囊直径。

1.6 HE 染色 将小鼠各区域脑组织脱水后包埋,制片,切片厚度为20~40μm。将切片置于二甲苯中脱蜡;放入无水乙醇中;苏木精染色10min,用1%的盐酸乙醇分化,加入弱碱性的促蓝液;伊红染

色3min,再进行梯度脱水;将脱水后的组织样本切片用二甲苯浸泡2次,每次持续4min,然后封片,使用全景组织细胞定量分析系统对切片进行拍照。

1.7 统计学处理 使用ImageJ软件分别计数包囊,记录观察各包囊直径。使用SPSS 26.0软件进行统计分析,小鼠感染弓形虫后的病情评分用均数±标准误($\bar{x} \pm s$)表示;感染小鼠脑部各区域的包囊数量组间使用独立样本t检验,组内进行单因素ANOVA检验;针对小鼠包囊的直径在小鼠脑部各区域的分布使用线性回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 弓形虫 PRU 株慢性感染小鼠模型病情程度的动态变化 弓形虫 PRU 株感染小鼠从第10天开始出现感染症状,以竖毛、弓背和活动低下为主,少数小鼠无症状;在感染的第30~40天,小鼠出现大量死亡,病情评分达到峰值,存活的感染小鼠几乎均出现竖毛弓背、活动低下、食欲不振、腹胀腹泻、呼吸浅快,少数小鼠出现原地打转和偏瘫的症状;之后大部分感染小鼠病情逐渐好转,到第90天,小鼠死亡有所减少,遗留症状以活力低下、弓背、毛发缺乏光泽、原地打转和偏瘫为主;在感染第120~160天,小鼠毛发恢复光泽,部分小鼠恢复正常生理状态,遗留症状大部分为偏瘫和原地打转,见表1。

表1 感染小鼠病情程度变化

时间(d)	存活小鼠数量(只)	病情评分($\bar{x} \pm s$)
10	50	1.38 ± 1.02
30	34	5.91 ± 1.07
40	21	6.57 ± 0.90
90	12	3.83 ± 0.69
120	8	2.38 ± 0.99
160	5	1.20 ± 0.40

2.2 计数包囊个数在大脑各区域的动态分布 感染鼠脑部的弓形虫包囊在各时间节点以海马下丘脑分布最多,前额叶和纹状体次之,小脑最少。随着弓形虫感染时间递增,在小鼠脑部各区域的弓形虫包囊数量在30d达顶峰,随后包囊数量呈下降趋势,在第90天时,包囊数量不再下降,重新开始上升,在第120天脑部各个区域的弓形虫包囊量达到次级峰,之后数量又逐步下降。经检验,在弓形虫感染的10~160天,脑部各区域的包囊数量的差异有统计学意义($F = 9.010, P < 0.05$);在弓形虫感染的各时间节点感染小鼠脑部各部位的弓形虫数量差异有统计学意义($F = 5.742, P < 0.05$),见图1。

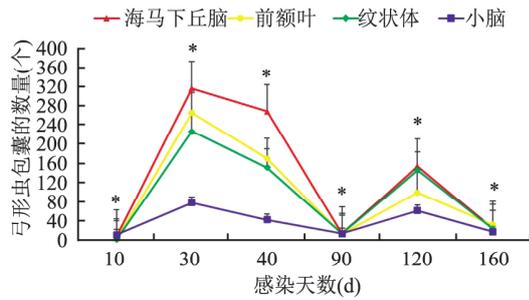


图1 脑部各区域弓形虫包囊数量变化
组间比较: * $P < 0.05$

2.3 小鼠脑部各区域弓形虫包囊直径的动态变化

弓形虫慢性感染期间,弓形虫包囊在小鼠脑部各区域的直径均随着感染时间的增加而呈现增长趋势,在感染小鼠海马下丘脑、前额叶、纹状体、小脑中弓形虫包囊平均直径与感染天数之间均存在相关性 ($R^2 = 0.899, P < 0.05; R^2 = 0.907, P < 0.05; R^2 = 0.895, P < 0.05; R^2 = 0.888, P < 0.05$);组间差异有统计学意义 ($t = 5.965, P < 0.05; t = 6.243, P < 0.05; t = 5.833, P < 0.05; t = 5.637, P < 0.05$),其中小鼠脑部海马下丘脑、前额叶、纹状体和小脑的包囊平均直径与感染天数的相关回归系数分别为:0.055、0.067、0.064、0.013,见图2。

2.4 小鼠弓形虫慢性感染脑部特异性病理动态表现

观察小鼠脑部各部位的 HE 染色切片发现,在

感染的第40天,小鼠海马下丘脑的弓形虫脑炎的神经理病理变化最为显著,脑部炎症情况也最为严重,可观察到弓形虫包囊附近小胶质细胞吞噬死亡的神经元即噬神经现象(图3A);弓形虫包囊附近炎症细胞浸润在血管附近形成“血管袖套现象”(图3B);弓形虫包囊激发的炎症反应致使其周围的血管发生扩张,血管周围大量炎症细胞浸润(图3C);蛛网膜附近弓形虫包囊导致的蛛网膜下隙大范围出血,蛛网膜周围浸润的炎症细胞以淋巴细胞和单核细胞为主(图3D);弓形虫包囊在脑组织中的“卫星样分布”(图3E);弓形虫包囊附近神经胶质细胞的局限性增生(图3F)。

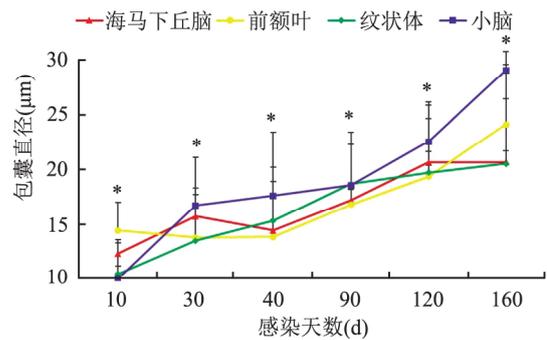


图2 脑部各区域弓形虫包囊平均直径变化
组间比较: * $P < 0.05$

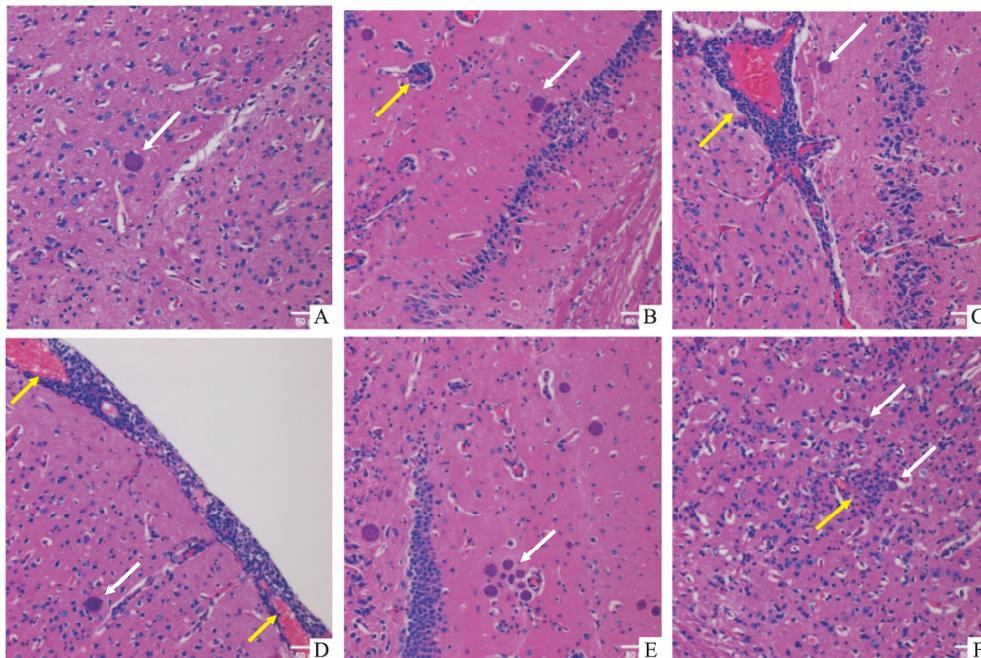


图3 感染小鼠第40天脑部海马下丘脑弓形虫感染病理征 HE × 200

A: 弓形虫包囊噬神经现象; B: 弓形虫包囊附近的血管袖套现象; C: 弓形虫包囊附近血管的扩张和胶质细胞浸润现象(黄色箭头所示); D: 弓形虫包囊附近蛛网膜下隙出血和炎症细胞浸润的现象(黄色箭头所示); E: 弓形虫包囊的卫星样分布; F: 弓形虫包囊附近星形胶质细胞和小胶质细胞局限性的浸润形成胶质细胞结节的现象(白色箭头所示为弓形虫包囊)

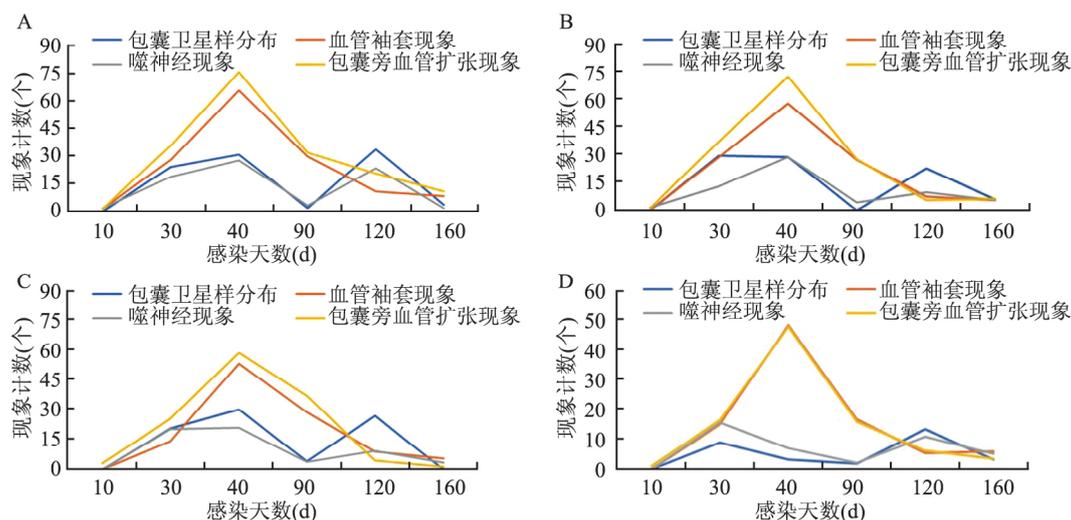


图4 慢性感染小鼠脑部特异性炎症病理动态变化

A: 海马下丘脑中各炎症病理现象动态变化; B: 前额叶中各炎症病理现象动态变化; C: 纹状体中各炎症病理现象动态变化; D: 小脑中各炎症病理现象动态变化

在感染小鼠的海马下丘脑、前额叶、纹状体和小脑区域,弓形虫包裹的卫星样分布、血管袖套现象、弓形虫包裹噬神经现象、弓形虫包裹附近血管的扩张和胶质细胞浸润现象的动态变化见图4。第10~30天,切片中开始观察到程度较轻的脑炎症状且呈上升趋势,病理表现以少数的胶质细胞局限性浸润形成胶质结节为主,蛛网膜下隙出现的出血及炎症细胞浸润现象由少量上升为中等量。至感染第40天,弓形虫脑炎病理变化最为显著,以包裹附近的血管扩张和血管袖套现象为主,胶质细胞出现大面积浸润及大量胶质结节的生成;蛛网膜下隙出现连续大片出血现象,较多量炎症细胞浸润。在感染第40~90天,脑组织中胶质细胞结节的数量大量下降;蛛网膜下隙出血逐步好转为局限连续小面积出血及少量炎症细胞浸润。在感染第90~120天,以包裹附近的血管扩张现象逐渐增加为主,胶质细胞由极少数局限浸润到少量浸润;在第120天,弓形虫包裹卫星样分布的数量增加到顶峰;蛛网膜下隙出血由局限连续的小面积出血及少量炎症细胞浸润,至少量连续出血及中等量炎症细胞浸润,至感染的第160天,感染小鼠脑部炎症病理表现逐渐恢复,仅见少量局限性胶质细胞浸润;蛛网膜下隙几乎不见出血,病理切片见包裹附近的蛛网膜下隙少量炎症细胞浸润。

3 讨论

弓形虫速殖子侵入脑组织神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞^[10]形成包裹。越来越多的证据表

明,弓形虫病的慢性感染可能会影响宿主行为且具有诱发宿主神经精神疾病的可能^[11]。弓形虫的慢性潜伏的感染可能也与精神疾病的临床阳性症状的加重有关^[12-13]。Hermes et al^[14]研究发现,在啮齿类动物中,弓形虫包裹会在大脑中出现选择性定位,从而对宿主的行为产生影响,但是对于包裹中的缓殖子通过何种机制影响宿主行为,仍有待探究。以往的研究因为弓形虫株、动物宿主的不同以及观测天数的局限,少有对宿主脑部包裹定位性分布与症状关联性的动态研究。

本研究动态观察弓形虫慢性感染期间小鼠的病情变化与神经病理学变化,为了更好地监测小鼠脑部的包裹变化对于小鼠行为精神学的影响,选用成囊率较高的弓形虫PRU株以及对弓形虫敏感的昆明种鼠,制造弓形虫慢性感染的动物模型。为了使弓形虫在小鼠脑部成囊率升高,每只小鼠灌胃35个包裹,高于常规用量,这与40d时小鼠大量死亡有关。本研究显示,在感染的第120天,弓形虫包裹在小鼠脑部各个部位均出现了次级峰,这与第87天发现的小鼠啃食死亡小鼠引发二次感染有关。随着感染天数的增加,在小鼠小脑部位的包裹生长速度最快,但炎症程度最低,这一现象提示小鼠小脑部位对弓形虫的免疫应答低于其他部位。本研究揭示了弓形虫慢性感染期间的病理变化与临床表现的内在关联,为弓形虫包裹的定位分布对宿主精神疾病和行为影响的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Ferguson D J P. *Toxoplasma gondii*: 1908 - 2008, homage to

- Nicolle , Manceaux and Splendore [J]. *Mem Inst Cruz* , 2009 , 104 (2) : 133 – 48.
- [2] Milne G , Webster J P , Walker M. *Toxoplasma gondii*: An underestimated threat? [J]. *Trends Parasitol* , 2020 , 36(12) : 959 – 69.
- [3] Zhao X Y , Ewald S E. The molecular biology and immune control of chronic *Toxoplasma gondii* infection [J]. *J Clin Invest* , 2020 , 130(7) : 3370 – 80.
- [4] Schlüter D , Barragana A. Advances and challenges in understanding cerebral Toxoplasmosis [J]. *Front Immunol* , 2019 , 10: 242.
- [5] Watts E , Zhao Y H , Dhara A , et al. Novel approaches reveal that *Toxoplasma gondii* bradyzoites within tissue cysts are dynamic and replicating entities *in vivo* [J]. *mBio* , 2015 , 6(5) : e01155 – 15.
- [7] Hair Dass S A , Vyas A. *Toxoplasma gondii* infection reduces predator aversion in rats through epigenetic modulation in the host medial amygdala [J]. *Mol Ecol* , 2014 , 23(24) : 6114 – 22.
- [8] Pearce B D , Kruszon-Moran D , Jones J L. The association of *Toxoplasma gondii* infection with neurocognitive deficits in a population-based analysis [J]. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* , 2014 , 49(6) : 1001 – 10.
- [9] Haroon F , Handel U , Angenstein F , et al. *Toxoplasma gondii* ac-
- tively inhibits neuronal function in chronically infected mice [J]. *PLoS One* , 2012 , 7(4) : e35516.
- [10] Chew W K , Wah M J , Ambu S , et al. *Toxoplasma gondii*: determination of the onset of chronic infection in mice and the *in vitro* reactivation of brain cysts [J]. *Exp Parasitol* , 2012 , 130(1) : 22 – 5.
- [11] Holub D , Fleege J , Dragomirecka E , et al. Differences in onset of disease and severity of psychopathology between toxoplasmosis-related and toxoplasmosis-unrelated schizophrenia [J]. *Acta Psychiatr Scand* , 2013 , 127(3) : 227 – 38.
- [12] Carruthers V B , Suzuki Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain [J]. *Schizophr Bull* , 2007 , 33(3) : 745 – 51.
- [13] Burkhardt E , Berger M , Yolken R H , et al. *Toxoplasma gondii* , Herpesviridae and long-term risk of transition to first-episode psychosis in an ultra high-risk sample [J]. *Schizophr Res* , 2021 , 233: 24 – 30.
- [14] Hermes G , Ajioka J W , Kelly K A , et al. Neurological and behavioral abnormalities , ventricular dilatation , altered cellular functions , inflammation , and neuronal injury in brains of mice due to common , persistent , parasitic infection [J]. *J Neuroinflammation* , 2008 , 5(48) : 1 – 37.

Dynamic pathological changes of *Toxoplasma* cysts in mouse brain during chronic infection

Wu Mengyun^{1 2} , Cai Ru¹ , Li Yifan² , Wang Xuelong² , Yao Yong²

(¹ *Medical College of Anhui University of Science and Technology , Huainan 232001;*

² *Dept of Parasitology and Microbiology , School of Basic Medicine , Anhui Medical University , Hefei 230032)*

Abstract Objective To investigate the distribution of toxoplasma cysts in the brain of infected mice and the effect of pathological changes on the behavior and neuropsychiatry of the mice during chronic infection with *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). **Methods** Mice were infected with Prugniald strain of *T. gondii* by oral gavage. The brain tissues of infected mice were collected on the days of 10 , 30 , 40 , 90 , 120 and 160 after infection respectively , and the hippocampal hypothalamus , prefrontal lobe , striatum and cerebellum regions were separated. The number of cysts and neuropathological changes in each infected area were observed and recorded by HE staining. The number of cysts and neuropathological changes in each infected area were observed and recorded. **Results** *T. gondii* infected mice showed symptoms of vertical hair and arched back , which were the most significant on the 40th day , and then gradually recovered with hemiplegia and circling in circles. At each time point , the number of toxoplasma cysts was the largest in hippocampal hypothalamus , followed by prefrontal lobe and striatum , and the least in cerebellum. The diameter of toxoplasma cysts increased with time. During chronic infection , specific pathological manifestations of toxoplasma encephalitis , such as neuronophagy , were observed in all regions of the brain tissue. The above pathological changes of toxoplasma encephalitis reached the peak on the 40th day , and gradually recovered , and increased to the stimulation peak on the 120th day , and then gradually recovered. **Conclusion** The behavioral and neuropsychiatric symptoms of *T. gondii* during chronic infection were correlated with the localization and distribution of toxoplasma cysts in the brain of infected mice , and showed dynamic changes.

Key words *Toxoplasma gondii*; cysts of *Toxoplasma gondii*; brain tissue; pathological change; HE dyed