

弓形虫 Chinese 1 基因型虫株感染 对小鼠海马体细胞超微结构的影响

王 崇^{1,2,3}, 蔡亦红^{1,2,3}

摘要 目的 观察弓形虫 Chinese 1 优势基因型 TgCtwh3 和 TgCtwh6 虫株对小鼠海马体细胞超微结构的影响。方法 6 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组:对照组、TgCtwh3 感染组、TgCtwh6 感染组,每组 6 只。对照组腹腔注射无菌 PBS;TgCtwh3 感染组腹腔注射 4 000 个 TgCtwh3 速殖子,饲养 6 d;TgCtwh6 感染组灌胃 20 个 TgCtwh6 包囊,饲养 6 周。所有动物经取材、制片,并用透射电子显微镜观察。结果 与对照组相比,TgCtwh3 感染组海马体细胞出现核皱缩坏死,胞质、轴突肿胀,细胞器消失,轴索断裂等病理变化。与对照组相比,TgCtwh6 感染组海马体细胞出现线粒体肿胀、空泡化、嵴断裂消失、膜破裂,脂褐素沉积,高尔基体扩张等病理变化。结论 TgCtwh3 和 TgCtwh6 感染小鼠均出现海马体细胞超微结构的改变,TgCtwh3 感染组多表现为不可逆的细胞坏死,而 TgCtwh6 感染组表现出线粒体结构破坏为主的慢性细胞损伤,这为探讨弓形虫脑病的致病机制奠定基础。**关键词** 弓形虫;海马;超微结构;小鼠

2022-05-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81572801);安徽医科大学博士科研资助基金(编号:XJ202005)

作者单位:¹ 安徽医科大学公共卫生学院卫生检验与检疫,合肥 230032² 安徽医科大学病原生物学安徽省重点实验室,合肥 230032³ 安徽医科大学人畜共患病安徽高校省级重点实验室,合肥 230032

作者简介:王 崇,女,硕士研究生;

蔡亦红,女,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: yihongcai2022@163.com

中图分类号 R 382.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)10-1564-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.010

刚地弓形虫是一种顶复门胞内寄生原虫,具有广泛的中间宿主(包括人类),其终宿主为猫科动物,在世界各地约有三分之一的人口感染^[1],弓形虫感染可对宿主脑部功能产生严重的不良影响,如神经退行性疾病、弓形虫脑炎和先天性弓形虫脑病等^[1-3]。海马体对生命机体至关重要,其功能异常与癫痫发作^[4]、精神分裂症、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)^[5]、帕金森病^[6]、抑郁症^[5]等多种疾病相关。小鼠慢性感染 ME49 虫株模型初步形态学研究^[7]显示,海马体中存在弓形虫包囊,并伴有神经胶质细胞增生和坏死。因此,课题组选择海马体作为 Chinese 1 优势基因型虫株导致的弓形虫脑病伴精神障碍致病机制的研究靶点。该研究利用透射电镜技术观察弓形虫 Chinese 1 优势基因型中 TgCtwh3 和 TgCtwh6 这两种不同毒力虫株对小鼠海马体细胞超微结构的影响,有助于分析其致病机制,并为弓形虫急性和慢性阶段的脑损伤机制研究提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 虫株 Chinese 1 优势基因型虫株(TgCt-

HRMECs was detected by qRT-PCR. The expression levels of related proteins in HRMECs were detected by Western blot. The number of lumen formation *in vitro* was observed under an inverted microscope to quantify the angiogenesis ability. Cell culture medium of each group was collected, and glucose intake, lactate production and adenosine triphosphate(ATP) content were detected by glucose detection kit, lactate detection kit and ATP detection kit, respectively. **Results** HG induced HRMECs significantly increased the number of blood vessel formation, glycolysis and PKM2 expression, while GRg1 treatment significantly reduced the number of blood vessel formation, glycolysis and PKM2 expression; transfection of si-PKM2 assisted the inhibitory effect of GRg1 on glycolysis and angiogenesis while transfection of OE-PKM2 interfered with the function of GRg1. **Conclusion** GRg1 inhibits angiogenesis by inhibiting PKM2 to reduce glycolysis of HRMECs.

Key words diabetic retinopathy; GRg1; HRMECs; PKM2; glycolysis; angiogenesis

wh3、TgCtwh6),前者为强毒株;后者为成囊株。两种虫株均在安徽医科大学病原生物学安徽省重点实验室中通过小鼠体内保种。

1.1.2 实验动物 18只6周龄SPF级雌性C57BL/6小鼠(15~17 g,无特定病原体)购于杭州子源实验动物科技有限公司(生产许可证号:SCXK2019-004)。实验动物按照安徽医科大学《研究动物护理和使用指导原则》进行饲养,环境温度保持在20~25℃,相对湿度为40%~70%。所有动物实验均经动物伦理委员会许可(No. AMU26-081108)。

1.1.3 主要试剂和仪器 4%多聚甲醛通用型组织固定液、磷酸盐缓冲液(PBS)(pH7.3)购自Biosharp生物技术有限公司;用PBS配制的2.5%戊二醛-2%多聚甲醛固定液购自上海麦克林生化科技有限公司;水合三氯乙醛购自上海麦克林生化科技有限公司。Leica EM UC7超薄切片机构购自德国Leica公司;120 kV透射电镜(Talo L120C G2)购自美国赛默飞公司。

1.2 方法

1.2.1 虫体获取 抽取感染TgCtwh3虫株的保种小鼠腹水,光镜下观察TgCtwh3虫株速殖子运动活跃,状态良好;用血细胞计数板在400倍光镜下计数,再以无菌PBS稀释腹水直至含虫密度为 2×10^4 个/ml。取TgCtwh6虫株保种小鼠脑组织,用5 ml PBS通过200目无菌滤网对脑组织进行研磨匀浆,在光镜下观察计数,再以无菌PBS稀释匀浆直至含包裹密度为100个/ml。

1.2.2 实验分组及处理 将18只小鼠随机均分为3组:对照组、TgCtwh3感染组和TgCtwh6感染组。对照组:每只小鼠腹腔注射无菌PBS 0.2 ml。TgCtwh3感染组:每只小鼠腹腔注射4 000个速殖子^[8],饲养6 d,小鼠出现畏光、弓背竖毛、体质量下降。TgCtwh6感染组:每只小鼠灌胃20个包裹^[7-8],饲养约1周,小鼠出现畏光、弓背竖毛、体质量下降,继续饲养5周,小鼠体质量逐渐恢复,毛发恢复顺滑。

1.2.3 标本的取材、制备和海马体细胞超微结构观察 小鼠称重,腹腔注射10%水合氯醛溶液0.1 ml/20 g进行麻醉;开胸暴露心脏,经左心室插入静脉输液针(0.45 mm×16RW SB),然后剪开右心房,快速灌注PBS至心脏、肝脏等褪去血色,改灌注4%多聚甲醛通用型组织固定液,固定至小鼠全身僵直,取出脑组织,用PBS配制的2.5%戊二醛-2%多聚甲醛固定液在4℃条件下预固定;于冰上钝性剥离

右侧海马体并置于载玻片上,在海马体上滴加用PBS配制的2.5%戊二醛-2%多聚甲醛固定液,取海马体组织1 mm³,将海马体置于含有1.3 ml PBS配制的2.5%戊二醛-2%多聚甲醛固定液的1.5 ml EP管中,在4℃避光条件下继续固定。按透射电镜标本要求常规制备样品,Leica EM UC7超薄切片机构切片,醋酸铀-枸橼酸铅双染色,在120 kV透射电镜下观察海马体细胞超微结构变化并拍照。

2 结果

2.1 光镜下观察小鼠脑组织中的弓形虫虫体 取TgCtwh3感染组和TgCtwh6感染组小鼠脑组织,匀浆后涂片,TgCtwh3感染组用吉姆萨染色后在光镜下观察(图1A),TgCtwh6感染组直接用光镜观察(图1B),可见两组均可从小鼠脑组织中分离出虫体。

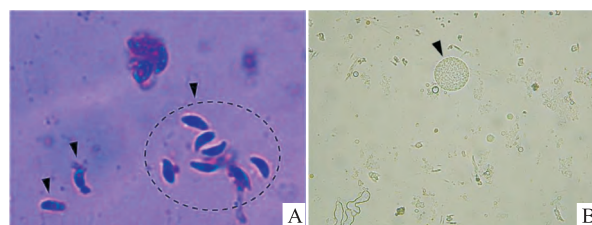


图1 TgCtwh3感染组和TgCtwh6感染组脑组织虫体分离

A: TgCtwh3感染组小鼠脑组织匀浆涂片光镜图×1 000; B: TgCtwh6感染组小鼠脑组织匀浆涂片光镜图×400;黑色三角箭头:弓形虫虫体

2.2 对照组海马体细胞超微结构观察 对照组小鼠脑组织进行电镜标本制备和观察,结果显示正常神经元细胞的细胞膜和核膜完整,可见双层膜,核呈卵圆形,核液中散在分布有常染色质和异染色质,密度较为均一,可见核仁(图2A、2C)。核旁可见线粒体、内质网、核糖体基本正常;线粒体嵴清晰可见,双层膜结构完整(图2B、2D)。

2.3 TgCtwh3感染组海马体细胞超微结构 TgCtwh3感染组小鼠脑组织进行电镜标本制备和观察,细胞发生核皱缩坏死(图3A、3D)。图3A中细胞核居中,核呈不规则状,核膜不完整,细胞质中的细胞器少,细胞边界不清楚,树突和胞质空泡化。图3B中细胞外出现浅亮空泡。图3C可见轴索断裂。图3D中细胞的核质比小于1/4,核皱缩,核双层膜结构模糊不清;胞质肿胀且电子密度低,大量细胞器消失,仅可见一些线粒体结构。

2.4 TgCtwh6感染组海马体细胞超微结构 图

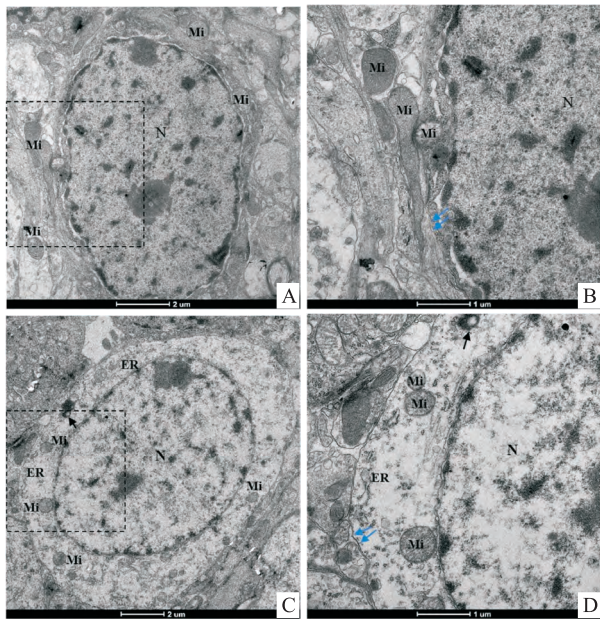


图2 对照组的海马体细胞超微结构

A、C:对照组正常神经细胞电镜图;B:图A中的局部放大;D:图C中的局部放大;N:细胞核;ER:内质网;Mi:线粒体;蓝色双箭头:细胞膜;黑色单箭头:脂褐素

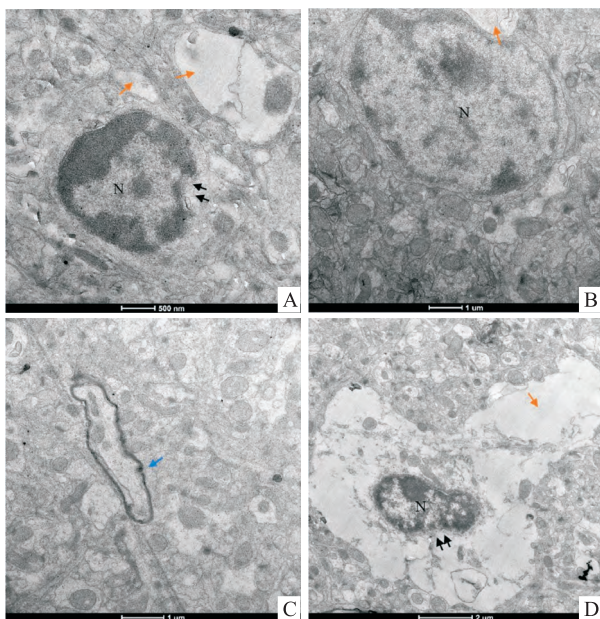


图3 TgCtwh3 感染组的海马体细胞超微结构

A-D:TgCtwh3 感染组海马体细胞电镜图;N:细胞核;黑色双箭头:细胞核异常;橙色单箭头:胞质肿胀;蓝色单箭头:髓鞘断裂

4A 中细胞核呈卵圆形,核仁大而明显,位置居中,核膜完整,细胞核基本正常;细胞器丰富,胞质中可见溶酶体、线粒体、内质网、高尔基体等;胞质中有多处脂褐素沉积;部分线粒体出现嵴断裂消失;高尔基体出现轻微扩张。图 4C 中线粒体出现嵴断裂消失;

高尔基体出现轻微扩张;胞质中颗粒物较多。图 4D 可见胞质中颗粒物较多;线粒体出现肿胀,嵴断裂消失,线粒体膜破裂;胞外出现空泡。图 4E 中细胞核结构完整;胞质中可见髓样小体、脂褐素、线粒体;线粒体出现嵴断裂消失和膜破裂。图 4F 中线粒体嵴消失,可见自噬小体(标尺:1 μm)

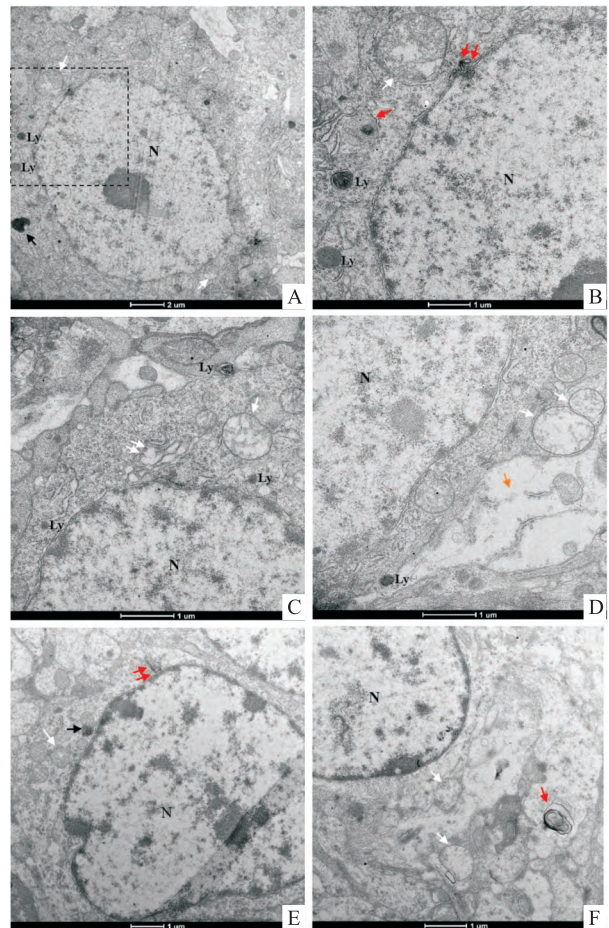


图4 TgCtwh6 感染组的海马体细胞超微结构

A-F:TgCtwh6 感染组海马体细胞电镜图;B:图A的局部放大;N:细胞核;Ly:溶酶体;白色单箭头:线粒体损伤;白色双箭头:高尔基体扩张;橙色单箭头:胞质肿胀;黑色单箭头:脂褐素;红色单箭头:自噬小体;红色双箭头:髓样小体

2.5 三组海马体细胞超微结构表型汇总 如表 1 所示:与 TgCtwh6 感染组相比,TgCtwh3 感染组海马体细胞形态改变更加严重,如核皱缩、细胞器消失、树突和胞质空泡化、细胞坏死等,这些病理改变多为不可恢复的。而 TgCtwh6 感染组更多的出现线粒体嵴断裂溶解、高尔基体轻微扩张等可逆转的病理改变,以及溶酶体残体沉积等累积性的形态学变化。

3 讨论

近年来,世界各地人和动物体内分离虫株的基

表1 三组海马体细胞超微结构改变汇总(例, n=6)

表型	对照组	TgCtwh3 感染组	TgCtwh6 感染组
细胞核皱缩	无	6	无
细胞膜破裂	无	5	2
胞质空泡化	无	6	2
线粒体空泡化	无	2	2
线粒体嵴紊乱	无	2	6
线粒体膜破裂	无	2	2
自噬小体	无	2	6
脂褐素	1	无	6
髓样小体	无	无	6
高尔基扩张	无	无	2

因分型结果显示,世界各地弓形虫具有丰富的遗传多样性^[9]。本课题组分离到来自我国多个省份的51株猫源性和人源性弓形虫虫株,基因分析发现不同于欧美地区原型克隆谱系,结合国内其他学者对动物源虫株的分析结果,命名为 Chinese 1 型(即 ToxoDB#9)。该基因型包含同一基因型、毒力不同的虫株^[10]。TgCtwh3 虫株(强毒株)对于小鼠的毒力介于 I 型和 II 型之间;TgCtwh6 虫株(弱毒株)毒力与 II 型相仿,能在脑组织中形成包囊,具有与 TgCtwh3 相似的宿主细胞侵入能力,但复制率低于 TgCtwh3 虫株^[11]。两种相同基因型毒力不同的虫株所造成的机体损伤存在差异,如对于不良妊娠机制的诱导,然而其脑损伤的机制仍不清楚,但是根据 TgCtwh3 和 TgCtwh6 的表型特征,推测这两种虫株具有迥异的致病机制^[11]。弓形虫对中枢神经系统的影响在超微水平的研究还未见报道,因此,本实验利用透射电镜技术观察 TgCtwh3 和 TgCtwh6 这两种虫株感染对海马体细胞超微结构的影响,为两种虫株的脑损伤机制研究提供形态学依据。

本研究结果显示,TgCtwh3 和 TgCtwh6 对小鼠海马体细胞超微结构的影响不尽相同。TgCtwh3 感染组细胞出现核皱缩坏死、轴突空泡化、细胞器消失等一系列不可恢复的病理变化;此外可观察到明显的轴索断裂,由于轴索恢复能力较差,其断裂将影响细胞的兴奋传递功能。TgCtwh3 虫株的急性感染使海马体细胞发生坏死、溶酶体裂解和细胞自溶,因此坏死细胞中大量细胞器消失,轴突和胞质空泡化,同时,坏死细胞内容物的外溢将进一步促进坏死的发生和实质细胞溶解,给海马体细胞带来不可逆伤害。海马体细胞的损伤将对机体的认知能力、学习能力以及情感控制产生不良影响,有利于癫痫和精神分裂症等疾病的发展^[4]。而免疫低下患者的弓形虫急性发作期间可观察到意识障碍和癫痫发作,提示

海马体细胞坏死可能是 TgCtwh3 虫株急性感染阶段的致病机制之一。

相较之下,TgCtwh6 感染组对于脑组织海马体细胞的影响多表现为慢性的累积性损伤。TgCtwh6 感染组小鼠海马体细胞出现了线粒体嵴断裂、高尔基体轻微扩张等可逆性改变,胞质中存在脂褐素、髓样小体和自噬溶酶体等,表明细胞在 TgCtwh6 包囊存在下一直存在慢性损伤和自我修复。TgCtwh6 感染组细胞中脂褐素的累积会导致细胞代谢缓慢,活性下降,常常在神经退变以及衰老机体中出现,可造成多种不良影响,如记忆力下降、睡眠质量下降等。比较不同感染组整体细胞结构的超微变化显示,TgCtwh6 感染组对于线粒体超微结构的影响尤为明显。线粒体是细胞内的关键细胞器,是细胞的能量中心,不仅涉及细胞的代谢状态,还涉及多种细胞功能,如增殖、钙信号、脂质转运、活性氧产生和凋亡等^[12]。与疾病相关的一般线粒体异常包括线粒体电子传输链损伤、线粒体形态和动力学的改变、mtDNA 突变和钙平衡异常。在 TgCtwh6 感染组中,细胞中可观察到大量的线粒体肿胀,嵴断裂消失,线粒体膜破裂等线粒体损伤。线粒体膜破裂使得线粒体中的 mtDNA 和活性氧泄漏到细胞质中,进入细胞质中的 mtDNA 可以激活各种炎症通路^[13],包括 cGAS-STING 信号、NLRP3 和炎性小体等,导致炎症激活;此外,线粒体活性氧释放到胞质中可导致细胞氧化损伤。线粒体肿胀,嵴断裂消失将影响其功能的发挥,其功能障碍会导致一系列疾病,特别是影响神经系统^[14]。同时,在神经退行性疾病又会严重影响线粒体动力学,线粒体功能障碍与神经系统疾病相辅相成。综上,TgCtwh6 潜伏感染与一些神经和精神疾病相关的致病原因可能为海马体细胞的线粒体损伤、脂褐素累积以及慢性炎症。另外,近年来有研究^[15]证明,线粒体功能异常是铁死亡的主要机制之一,而铁死亡参与多种神经退行性疾病的进程。这再次印证线粒体功能在退行性疾病中的关键作用,也为研究弓形虫脑病致病机制研究提供新的思路。

本研究利用透射电镜技术观察细胞超微结构,探讨弓形虫感染对细胞超微结构的影响及其规律,结果表明我国优势基因型虫株 TgCtwh3 和 TgCtwh6 对于小鼠海马体细胞的主要损伤机制不同,为研究 TgCtwh3 和 TgCtwh6 虫株感染所致脑损伤机制奠定基础,也为急性和慢性弓形虫感染的脑损伤机制研究提供线索。

参考文献

- [1] Pleyer U, Gross U, Schluter D, et al. Toxoplasmosis in Germany [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2019, 116(25): 435–44.
- [2] Sutherland A L, Kuin A, Kuiper B, et al. Driving us mad: the association of *Toxoplasma gondii* with suicide attempts and traffic accidents - a systematic review and meta-analysis[J]. *Psychol Med*, 2019, 49(10): 1608–23.
- [3] Maldonado Y A, Read J S, Committee on Infectious Diseases. Diagnosis, treatment, and prevention of congenital Toxoplasmosis in the United States[J]. *Pediatrics*, 2017, 139(2): e20163860.
- [4] Wu Z, Deshpande T, Henning L, et al. Cell death of hippocampal CA1 astrocytes during early epileptogenesis[J]. *Epilepsia*, 2021, 62(7): 1569–83.
- [5] Berger T, Lee H, Young A H, et al. Adult hippocampal neurogenesis in major depressive disorder and Alzheimer's disease[J]. *Trends Mol Med*, 2020, 26(9): 803–18.
- [6] Low A, Foo H, Yong T T, et al. Hippocampal subfield atrophy of CA1 and subicular structures predict progression to dementia in idiopathic Parkinson's disease[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2019, 90(6): 681–7.
- [7] Galvan-Ramirez M L, Salas-Lais A G, Duenas-Jimenez S H, et al. Kinematic locomotion changes in C57BL/6 mice infected with *Toxoplasma* strain ME49 [J]. *Microorganisms*, 2019, 7(11): 573.
- [8] Cheng W S, Liu F, Li M, et al. Variation detection based on next-generation sequencing of type Chinese 1 strains of *Toxoplasma gondii* with different virulence from China[J]. *Bmc Genomics*, 2015, 16:888.
- [9] Amouei A, Sarvi S, Sharif M, et al. A systematic review of *Toxoplasma gondii* genotypes and feline: Geographical distribution trends [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67(1): 46–64.
- [10] 徐 婷, 王 聪, 罗庆礼, 等. 流行于我国的优势基因型弓形虫株毒力及其棒状体蛋白 ROP5 和 ROP18 蛋白序列差异分析 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(11): 1695–9.
- [11] Li M, Mo X W, Wang L, et al. Phylogeny and virulence divergence analyses of *Toxoplasma gondii* isolates from China[J]. *Parasit Vectors*, 2014, 7: 133.
- [12] Subramaniam S R, Chesselet M F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease[J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 106–107: 17–32.
- [13] Riley J S, Tait S W. Mitochondrial DNA in inflammation and immunity[J]. *EMBO Rep*, 2020, 21(4): e49799.
- [14] Kerr J S, Adriaanse B A, Greig N H, et al. Mitophagy and Alzheimer's disease: Cellular and molecular mechanisms[J]. *Trends Neurosci*, 2017, 40(3): 151–66.
- [15] Gao M, Yi J, Zhu J, et al. Role of mitochondria in ferroptosis [J]. *Mol Cell*, 2019, 73(2): 354–63. e3.

Ultrastructural observations of hippocampal cells in mice infected with Chinese 1 dominant genotype strain of *Toxoplasma gondii*

Wang Chong^{1,2,3}, Cai Yihong^{1,2,3}

(¹Dept of Health Inspection and Quarantine, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Pathogen Biology and Provincial Laboratories of Pathogen Biology and Zoonoses, Hefei 230032; ³Anhui Provincial Laboratory of Zoonoses of High Institutions, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To observe the effects of TgCtwh3 and TgCtwh6, *Toxoplasma gondii* of Chinese 1 dominant genotype, on the ultrastructure of hippocampal of mice. **Methods** Six-week-old female C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: control group, TgCtwh3 infection group and TgCtwh6 infection group, with 6 mice in each group. Control group was intraperitoneally injected with sterile PBS. The TgCtwh3 infected group was intraperitoneally injected with 4 000 TgCtwh3 *Toxoplasma gondii* tachyzoites and fed for 6 days. The TgCtwh6 infected group was given 20 TgCtwh6 *Toxoplasma gondii* cysts by gavage and fed for 6 weeks. Then, all the animals were sacrificed, the brains were obtained for preparing electron microscope specimens and observed. **Results** Compared with the control group, the cells in hippocampal of TgCtwh3 infected group showed nuclear shrinkage and necrosis; cytoplasmic and axon swelling; organelle disappearance; axonotmesis and other pathological changes. Compared with the control group, the cells in hippocampal of TgCtwh6 infected group showed swollen, vacuolated, crista-broken or membrane-broken mitochondria; lipofuscin deposition; dilation of golgi apparatus and other pathological changes. **Conclusion** Both TgCtwh3 and TgCtwh6 infected mice showed ultrastructural changes in hippocampal compared with normal mice. The TgCtwh3 group showed irreversible cell necrosis, while the TgCtwh6 group showed chronic cell damage mainly caused by mitochondrial structure destruction. These results lay a foundation to explore the pathogenesis of toxoplasmosis.

Key words *Toxoplasma gondii*; hippocampus; ultrastructure; mice