

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.006.html>

II型弓形虫和血吸虫重叠感染对小鼠肝纤维化作用的实验研究

郭玉娟^{1,2}, 谢园园¹, 储德勇¹, 徐元宏³, 沈继龙^{1,3}

摘要 目的 观察II型弓形虫和日本血吸虫重叠感染对小鼠肝纤维化的影响,探讨弓形虫感染诱导的抗感染免疫对血吸虫感染致小鼠肝脏纤维化的免疫调节作用。方法 BALB/c小鼠建立重叠感染模型:预先感染血吸虫(模型I组);预先感染PRU株弓形虫(模型II组);对照:只感染尾蚴组和正常对照组。取上述小鼠血液及肝脏,HE和Masson胶原纤维染色法观察肝脏虫卵肉芽肿大小和肝纤维化面积;检测纤维化指标透明质酸(HA)和肝脏羟脯氨酸(HYP)含量。结果 模型I组小鼠肝脏病理及纤维化指标检测与相应对照组未见显著差异;模型II组动物血清HA和肝脏HYP显著低于相应对照组($P < 0.001$),肝脏虫卵肉芽肿大小和纤维化面积均显著减小($P < 0.001$)。结论 预先感染II型弓形虫可能诱导机体的Th1型应答的偏移,在此微环境下可负向调控血吸虫肝脏纤维化状态的Th2应答,从而延缓和减弱肝纤维化的发生和发展。

关键词 II型弓形虫;日本血吸虫;双重感染;肝纤维化

中图分类号 R 382.33; R 383.2+4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0161-05

日本血吸虫病主要由沉积于组织的虫卵内活毛蚴分泌的可溶性虫卵抗原(soluble egg antigens, SEAs)引起的免疫性疾病^[1]。在血吸虫感染感染后4~6周,机体以Th1免疫反应为主;在感染后6~8周虫卵成熟后,其分泌的SEA抗原促使Th2免疫反应加强^[1]。最终因促纤维生成和溶解因素不平衡而导致细胞外基质(extracellular matrix, ECM)大量沉积^[2],从而继发肝纤维化和肝硬化。刚地弓形虫是一种专性有核细胞内寄生的机会致病性的原虫,血清学调查显示,全球约30%的人口均有不同程度感染,欧美国家感染率更高^[3]。弓形虫感染后,在机体的固有免疫后,机体以持续的Th1免疫反应为

主^[4]。感染血吸虫和弓形虫可以介导宿主产生不同的免疫反应,建立重叠感染的小鼠模型,观察先感染血吸虫再感染弓形虫以及先感染弓形虫再感染血吸虫,是否可以导致宿主免疫调节状态发生改变,并观察能否最终减弱日本血吸虫病肝纤维化程度。

1 材料与方法

1.1 实验动物及钉螺 SPF级BALB/c小鼠,雌性6~8周龄,18~20g,室温20~22℃,标准饲料及普通自来水喂养,购自北京维通利华实验动物技术有限公司;感染日本血吸虫尾蚴的阳性钉螺,购自江苏省血吸虫病防治研究所。

1.2 II型弓形虫包囊 本实验室长期在小鼠内传代保存的type II型PRU株弓形虫。取口服感染PRU包囊30d以上的小鼠,麻醉后无痛处死,酒精消毒后,取出脑组织,将脑组织匀浆,涂片计数包囊备用。

1.3 试剂 羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)试剂盒(南京建成生物工程研究所);透明质酸(hyaluronic acid, HA) ELISA试剂盒(武汉华美生物工程有限公司);Masson染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);甲醛和无水乙醇(上海化学试剂公司)。

1.4 实验仪器 Minispin小型离心机和台式冷冻离心机(德国Eppendorf);电子天平(上海天平仪器厂);隔水式电热培养箱(江苏东台县电器厂);超声细胞粉碎机(宁波科声仪器厂);光学显微镜(日本Nikon公司)。

1.5 实验分组 取小鼠84只,随机分成7组,建立模型I和模型II重叠感染模型,并设置对照。模型I组:预先感染血吸虫,感染血吸虫尾蚴后16周处死,1%水合氯醛麻醉小鼠后固定,腹部剃毛,尾蚴置玻片计数(15 ± 2)条,贴于小鼠腹部15min。分为I1组(预先感染尾蚴后42d灌胃包囊)、I2组(预先感染尾蚴后56d灌胃包囊)、I3组(尾蚴感染组)、I4组(正常鼠对照)。模型II组:预先感染弓形虫,感染血吸虫尾蚴后8周处死,小鼠预先灌胃PRU包囊10个,再感染血吸虫尾蚴(15 ± 2)条。分为II1组(口服包囊后35d感染尾蚴);II2组(仅感

2015-11-17 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81471983,81171606);安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2014A106)

作者单位:¹安徽医科大学病原生物学教研室,合肥 230032

²安徽省庐江县人民医院检验科,合肥 231500

³安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230032

作者简介:郭玉娟,女,硕士研究生;

沈继龙,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: shen-jilong53@126.com

染尾蚴组)、II 3 组(正常小鼠对照)。

1.6 HA 水平测定 摘取眼球法收集血液于 1.5 ml EP 管,37 °C 孵育 30 min 4 000 r/min 离心 10 min,收集血清。ELISA 法检测血清 HA 水平,按试剂盒说明操作。

1.7 HYP 含量测定 称取小鼠肝脏组织 0.1 g,按 HYP 检测试剂盒说明书操作,测量肝组织中 HYP 含量。

1.8 病理学检查

1.8.1 病理组织学观察 取每只小鼠相同部位的肝脏组织 4% 中性甲醛固定后石蜡包埋 3 μm 连续切片,贴附于经 10% 多聚赖氨酸防脱片剂预处理的载玻片上。常规脱蜡,HE 染色,脱水、透明、封固。光学显微镜下观察肝组织病理变化及测量肉芽肿大小。同等设置条件下拍照,并利用 Image-Pro Plus 软件计算肉芽肿面积 统计分析。

1.8.2 胶原纤维染色分析 Masson 胶原纤维染色石蜡切片常规脱蜡,Masson 复合液 5 min,0.2% 醋酸水溶液轻轻洗;5% 磷钨酸 5 ~ 10 min 0.2% 醋酸水溶液洗两次;苯胺蓝染色液 5 min 0.2% 醋酸水溶液洗 2 次。脱水、透明、中性树脂封固。观察胶原沉积情况并判断肝纤维化程度,同等设置条件下拍照,并利用 Image-Pro Plus 软件计算每张图片纤维化面积 统计分析。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示;两两比较采用 t 检验,多组之间两两比较采用方差分析。

2 结果

2.1 小鼠的存活率统计 与对照组相比 模型 I 的 3 个实验组小鼠存活率有差异。重叠感染提高了小

鼠的死亡率,后期存活的动物出现竖毛、怠动、发抖、厌食和消瘦等现象明显;模型 II 的 2 个实验组小鼠存活率无显著差异,后期存活的小鼠精神状态和饮食情况一般。各组小鼠的存活率分别为 I 1 组 33.3%; I 2 组 41.7%; I 3 组 66.7%; II 1 组 41.7%; II 2 组 50%; 正常对照组 I 4 组和 II 3 组 100%。见图 1。

2.2 肝组织病理学变化 模型 I 的 3 组实验组小鼠肝脏表面布满大量大小不一的肉芽肿结节,质地较硬,肝脏颜色呈深黑褐色,相比于正常肝脏体积缩小。镜下见大量虫卵肉芽肿。肉芽肿周围及汇管区有明显桥样结构,可见大量结节形成,出现肝硬化表现。HE 染色结果显示 3 组小鼠之间肉芽肿大小差异无统计学意义(Levene = 0.911, F = 0.012),Masson 染色结果显示 3 组小鼠之间纤维化面积差异无统计学差异(Levene = 0.206, F = 0.192),见图 2、3。模型 II 的 2 组实验组小鼠肝脏表面布满大量大小不一的颗粒,质地相对于模型 I 要软,肝脏颜色灰褐色,相比于正常肝脏体积增大。镜下见大量虫卵肉芽肿,肉芽肿及汇管区纤维增生明显,大量炎性细胞浸润。但镜下观察可明显发现模型 II 的组 II 1 小鼠相比于组 II 2 虫卵肉芽肿减少,纤维化程度降低,见图 4、5。模型 II 两组小鼠 HE 染色显示,II 1 组相比于 II 2 组小鼠虫卵肉芽肿减少,差异有统计学意义(F = 1.065, P < 0.001);Masson 染色显示 II 1 组相比于 II 2 小鼠纤维化面积减少,差异有统计学意义(F = 5.110, P < 0.001)。

2.3 血清 HA 水平、肝 HYP 含量 模型 II 各组血清 HA 水平、肝 HYP 含量见图 6。模型 II 实验组小鼠 II 1 血清 HA 水平(F = 3.217, P < 0.001)、肝 HYP(F = 0.451, P < 0.001)含量均显著低于 II 2。

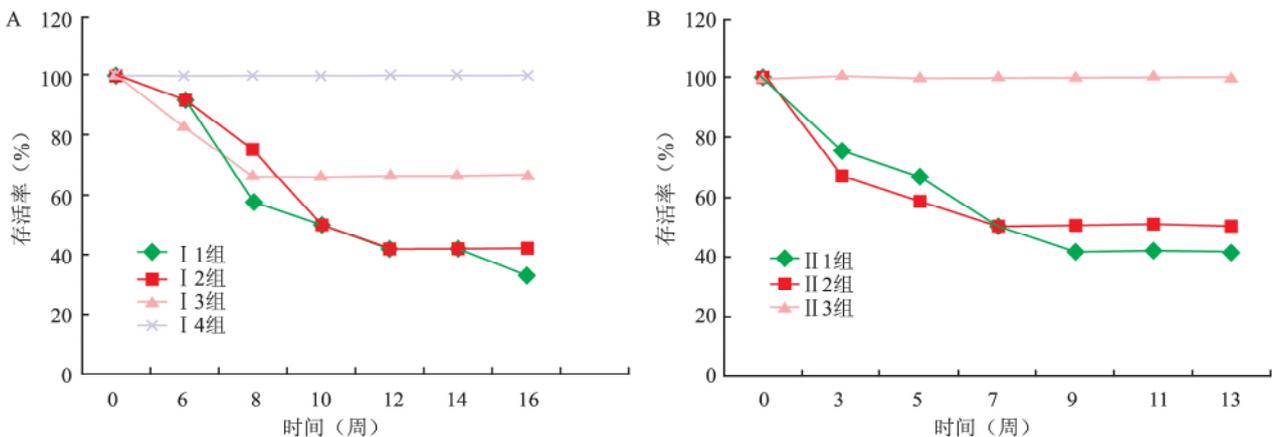


图 1 各组小鼠存活率统计结果

A: 模型 I 组; B: 模型 II 组

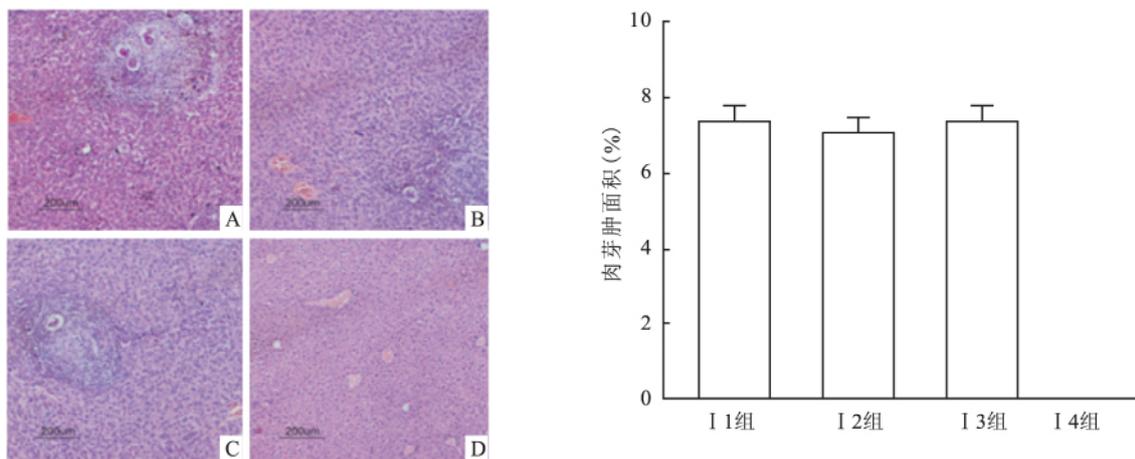


图2 模型 I 组小鼠肝脏肉芽肿病理图 HE × 100

A: I 1 组; B: I 2 组; C: I 3 组; D: I 4 组

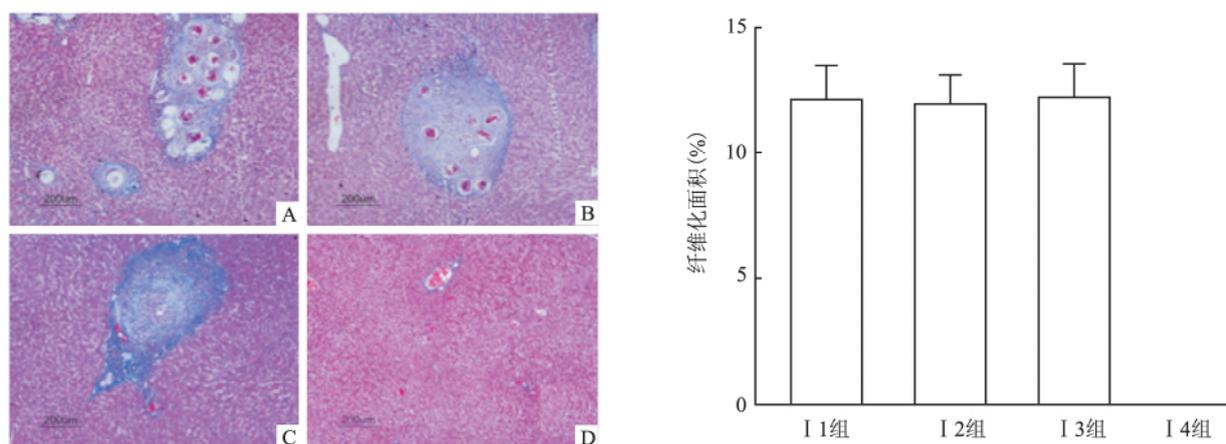


图3 模型 I 组小鼠肝脏纤维化病理图 Masson × 100

A: I 1 组; B: I 2 组; C: I 3 组; D: I 4 组

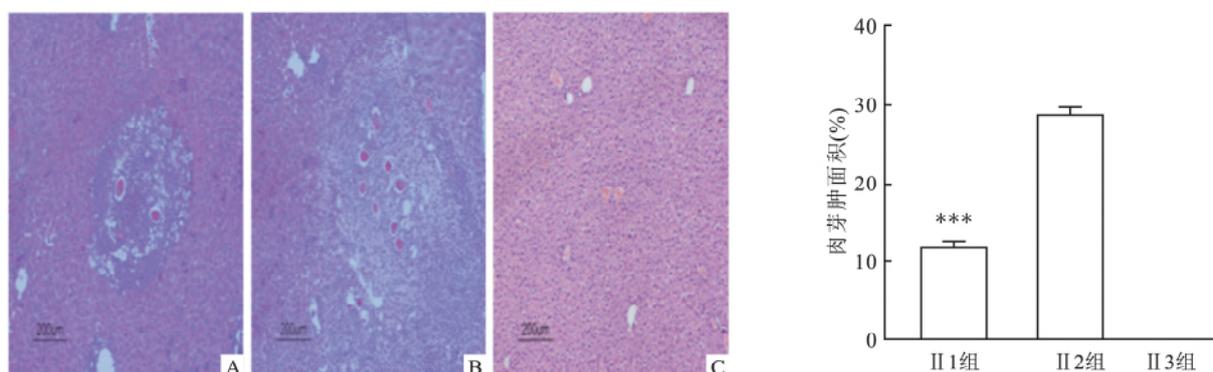


图4 模型 II 组小鼠肝脏肉芽肿病理图 HE × 100

A: II 1 组; B: II 2 组; C: II 3 组; 与 II 2 组比较: *** $P < 0.001$

3 讨论

血吸虫病肝纤维化是虫卵肉芽肿所致胶原合成与降解失衡而使胶原过度沉积的结果。肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 的活化是血吸虫肝纤维化的关键事件^[5]。HYP 是肝脏胶原蛋白的特征性

成分之一,其含量高低可以直接反映肝脏纤维化的严重程度。另外,HA 在肝内由 HSCs 合成并释放入血液,血中的 HA 由肝细胞代谢,肝纤维化时 HSCs 增多,而肝细胞代谢能力下降,因此引起外周血中 HA 水平上升。所以血清 HA 水平也是反映肝纤维化的一项敏感指标^[6]。

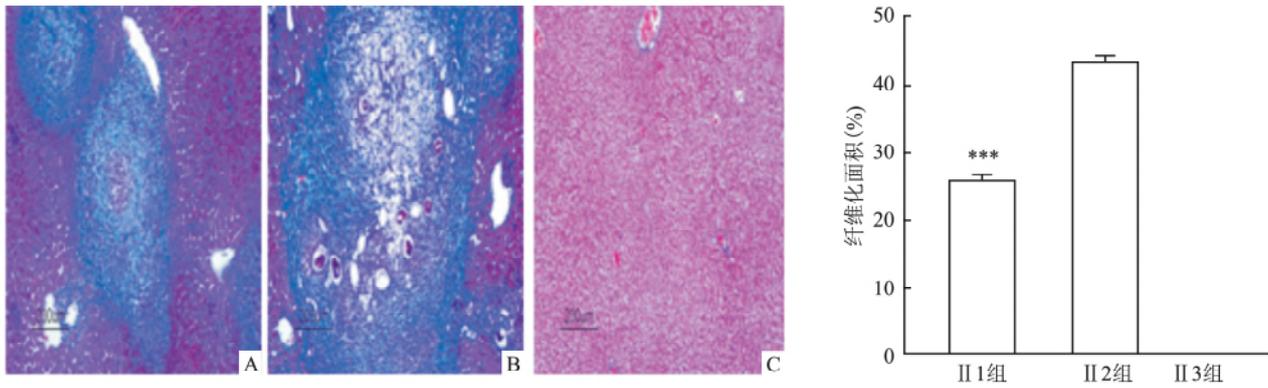


图5 模型II小鼠肝脏纤维化病理图 Masson × 100
A: II 1组; B: II 2组; C: II 3组; 与II 2组比较: *** P < 0.001

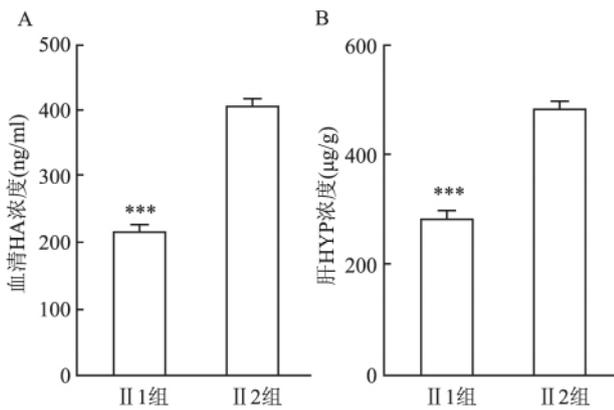


图6 模型II小鼠肝脏纤维化指标HA和HYP浓度
A: 血清HA; B: 肝HYP; 与II 2组比较: *** P < 0.001

血吸虫感染早期,机体的免疫应答以Th1型应答为主。而Th1型细胞因子如IFN- γ 和IL-2等可以诱导炎症反应而抑制胶原沉积^[7-8]。随着病程进展,发生Th1/Th2偏移,因而在血吸虫感染慢性期和晚期以Th2型应答为主^[9]。而Th2优势应答则通常伴随IL-4、IL-5、IL-13、TGF- β 1等细胞因子的高表达。IL-4和IL-13是有效促胶原形成的细胞因子^[9],后者还可通过TGF- β 1依赖和非依赖方式,活化HSCs,促进胶原产生以及纤维化的形成。因此,以虫卵肉芽肿作为始动因子的Th2应答及其细胞因子参与的胶原合成以及ECM的形成,是肝脏纤维化的主要病理过程。

弓形虫是一种有核细胞内专性寄生的原虫。虽然弓形虫属内只有刚地弓形虫一个物种,但是近年来对世界各地人畜分离株的种群结构分析发现,弓形虫具有丰富的遗传多样性,欧洲和北美流行的弓形虫以I型、II型和III型为主^[10]。对不同基因型的多态性效应分子诱导的宿主免疫应答发现,在感染早期的宿主固有免疫应答中,II型弓形虫株(弱毒

株)的GRA15 II可诱导宿主巨噬细胞出现显著的偏移,驱动巨噬细胞向经典途径活化的巨噬细胞(M1)极化^[11]。即使在弓形虫感染宿主的适应性免疫应答中,同样是以M1/Th1优势应答为主^[12]。基于血吸虫病肝脏纤维化病理进程中的Th2应答机制,本实验以弓形虫PRU包囊预先感染小鼠后不同时间,血吸虫尾蚴再行感染,结果表明,小鼠预先经口感染II型弓形虫PRU包囊35 d后,给予血吸虫尾蚴经皮肤感染,小鼠存活率不仅没有受到影响,而且其肝脏纤维化各项检测指标均显著下降。表现为小鼠肝脏虫卵肉芽肿减少,HE染色和Masson染色显示纤维化面积缩小;血清HA水平和肝组织HYP含量均显著低于对照组。以上结果提示,II型弓形虫诱导的宿主Th1型免疫应答可显著抑制小鼠血吸虫病肝脏纤维化的病理进程和严重程度。其机制可能与PRU株弓形虫感染诱导的M1/Th1应答对肝脏纤维化发生发展起重要作用的TGF- β 的抑制作用有关。弓形虫诱导的M1/Th1的偏移与II型虫株的致密颗粒蛋白15(GRA15 II)有关^[13]。用GRA15 II重组慢病毒诱导肝脏kupffer细胞的M1偏移进行早期肝脏纤维化的预防和治疗研究正在进行中。

本研究提示,预先感染弓形虫PRU株建立的宿主的Th1的微环境,可能导致机体Th2应答减弱或迟滞,或者可增强Th1应答中某些促纤维溶解分子的表达。例如Wynn et al^[14]发现在感染血吸虫之前给与小鼠IL-12(M1/Th1型应答的重要细胞因子),预先建立Th1应答免疫环境,可以显著减轻小鼠慢性期纤维化,其肝脏肉芽肿和胶原沉积明显减少。值得关注的是,小鼠感染血吸虫42 d或56 d后再给予弓形虫感染,不但未见肝脏纤维化的明显缓解,反而升高了小鼠的死亡率,其机制尚待深入研究。

参考文献

- [1] Colley D G ,Secor W E. Immunology of human schistosomiasis[J]. *Parasite Immunol* ,2014 ,36(8) : 347 - 57.
- [2] Ramachandran P ,Iredale J P. Liver fibrosis: a bidirectional model of fibrogenesis and resolution[J]. *QJM* ,2012 ,105(9) : 813 - 7.
- [3] Montoya J G ,Liesenfeld O. Toxoplasmosis[J]. *Lancet* ,2004 ,363(9425) : 1965 - 76.
- [4] Dupont C D ,Christian D A ,Hunter C A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis [J]. *Semin Immunopathol* , 2012 ,34(6) : 793 - 813.
- [5] Anthony B ,Allen J T ,Li Y S , et al. Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis [J]. *Parasit Vectors* ,2010 ,3(1) : 60.
- [6] Kopke-Aguiar L A ,Martins J R ,Passerotti C C , et al. Serum hyaluronic acid as a comprehensive marker to assess severity of liver disease in schistosomiasis [J]. *Acta Trop* ,2002 ,84(92) : 117 - 26.
- [7] Tao F F ,Yang Y F ,Wang H , et al. Th1-type epitopes-based cocktail PDDV attenuates hepatic fibrosis in C57BL/6 mice with chronic *Schistosoma japonicum* infection [J]. *Vaccine* ,2009 ,27(31) : 4110 - 7.
- [8] El Ridi R ,Salem R ,Wagih A , et al. Influence of interleukin-2 and interferon-gamma in murine schistosomiasis [J]. *Cytokine* ,2006 , 33(5) : 281 - 8.
- [9] Ramalingam T R ,Pesce J T ,Mentink-Kane M M , et al. Regulation of helminth-induced Th2 responses by thymic stromal lymphopoietin [J]. *J Immunol* ,2009 ,182(10) : 6452 - 9.
- [10] Boothroyd J C ,Grigg M E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? [J]. *Curr Opin Microbiol* ,2002 ,5(4) : 438 - 42.
- [11] Yarovinsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection [J]. *Nat Rev Immunol* ,2014 ,14(2) : 109 - 21.
- [12] Kánková S ,Holán V ,Zajicova A , et al. Modulation of immunity in mice with latent toxoplasmosis—the experimental support for the immunosuppression hypothesis of *Toxoplasma*-induced changes in reproduction of mice and humans [J]. *Parasitol Res* ,2010 ,107(6) : 1421 - 7.
- [13] Rosowski E E ,Lu D ,Julien L , et al. Strain-specific activation of the NF- κ B pathway by GRA15 , a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein [J]. *J Exp Med* ,2010 ,208(1) : 195 - 212.
- [14] Wynn T A ,Cheever A W ,Jankovic D , et al. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection [J]. *Nature* ,1995 ,376(6541) : 594 - 6.

Experimental study on the effects of *Toxoplasma gondii* and *Schistosoma japonicum* overlapping infection on the liver fibrosis in mice

Guo Yujuan^{1,2} , Xie Yuanyuan² , Chu Deyong¹ , et al

(¹Dept of Parasitology and Microbiology , Anhui Medical University , Hefei 230032;

²Dept of Laboratory , The People's Hospital of Lujiang County , Hefei 231500)

Abstract Objective To explore the positive effect of overlapping infection of *Toxoplasma gondii* and *Schistosoma japonicum* on the hepatic fibrosis of mice. **Methods** BALB/c mice (specific pathogen free) were transcutaneously infected with (15 ± 2) larvae of *Schistosoma japonicum* to generate a model of chronic infection after 42 ~ 56 days of larval infection , followed by an intragastric infection of 10 cysts *Toxoplasma gondii* PRU strain (group I) . Simultaneously , mice received 10 cysts infection of *Toxoplasma gondii* to establish a chronic infection with 35 days , followed by (15 ± 2) larvae infection of *Schistosoma japonicum* (group II) . Equal number of normal animals were taken as control. Blood and liver tissue samples were collected for HE and Masson staining respectively. The size of liver egg granulomas and fibrosis areas were measured. Additionally , hyaluronic acid (HA) and hydroxyproline (HYP) in sera were tested. **Results** Pre-infection of PRU strain of *Toxoplasma* before *Schistosoma japonicum* infection resulted in a remarkable amelioration of hepatic fibrosis in mice , presenting the reduced size of egg granulomas and tissue fibrosis ($P < 0.001$) . And HA and HYP levels were significantly decreased in the mice with *Toxoplasma* pre-infection ($P < 0.001$) . In contrast , the established chronic infection of schistosomiasis of mice , followed by oral reinfection with 10 cysts of *Toxoplasma* , did not show any inhibitory effects on hepatic fibrotic procession. **Conclusion** Pre-establishment of Th1 immune response induced by *Toxoplasma* may help the animals which were infected with *Schistosoma japonicum* to ameliorate the procession of hepatic fibrosis.

Key words *Toxoplasma gondii*; *Schistosoma japonicum*; overlapping infection; liver fibrosis