

鼠腹腔中弓形虫的增殖发育及 S. D. 对其的影响

汪琦¹, 林宇光¹, 杨文川¹, 黎之静²

(1. 厦门大学寄生动物研究室, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 对鼠腹腔中弓形虫速殖子的增殖发育的方式、过程及 S. D. 对其的影响作了详细的考察, 结果表明弓形虫的无性生殖方式有内二裂殖、纵二裂殖、裂殖生殖等, 虫体以鼠腹腔内巨噬细胞的胞壁作为假包囊壁在其中增殖发育, 经过 72 h 的增殖生长, 虫体成熟后突破假包囊逸出, S. D. 可部分抑制速殖子增殖.

关键词: 弓形虫; 增殖发育; S. D.

中图分类号: S 851.34⁺ 7.103; S 851.34⁺ 7.203 **文献标识码:** A

由弓形虫(*Toxoplasma gondii*)感染所引起的弓形虫病, 是一种人兽共患病(Zoonosis), 分布于世界五大洲的各地区, 人群和畜禽的感染率相当高, 虽然人群感染弓形虫后, 常引起无症状的人体疾病, 多数属隐性感染, 然而免疫功能低下病人慢性感染活动及孕期原发性感染所引起的先天性弓形虫病, 后果很严重甚至威胁生命. 近年来, 由于爱滋病的泛滥及优生优育工作的深入, 弓形虫病对胎儿、新生儿、婴幼儿及成人的损害逐渐被人们所认识, 本病所引起的多种先天性畸形、智力发育缺陷、视力障碍、以及孕妇的早产、流产、死产已屡见不鲜, 免疫缺陷患者也常因弓形虫性脑炎而导致死亡, 但是至今尚无治疗弓形虫的良好药物. 弓形虫速殖子入侵宿主细胞后, 快速的增殖发育, 成熟后突破宿主细胞逸出, 是导致宿主急性感染的主要原因. 为此, 作者对弓形虫增殖的方式、增殖发育的过程及磺胺嘧啶对其的影响作了详细的考察, 以期对弓形虫病的防治提供科学的依据.

1 材料和方法

- 1) 虫株: RH 国际标准株, 购于福建省卫生防疫站.
- 2) 动物: 昆明种小白鼠, 购于厦门大学抗癌中心.
- 3) 方法: 实验鼠分成两组, 每组小鼠 12 只, 一组为感染组, 一组为治疗组. 每组小鼠均以浓

收稿日期: 2001-02-27

作者简介: 汪琦(1972-), 女, 博士, 现在中山医科大学寄生虫学研究所攻读博士后, 邮编: 510089.

通讯联系人: 杨文川

度为 10^8 个/mL 的速殖子 0.2 mL 腹腔感染, 治疗组的小鼠在感染后 24 h 口腔喂饲 S. D. 10 mg/d, 直至死亡. 两组小鼠均在感染后 24 h 起, 每隔 24 h 抽取腹腔液, 涂片, Giemsa 染色后镜检, 测量记录.

2 结果与分析

2.1 鼠腹腔巨噬细胞中速殖子增殖方式观察

内二芽殖: 虫体在细胞核的前沿先长出两个花蕾样的突起物, 也即虫体子细胞在母体形成, 两芽逐渐伸展, 母核破坏, 在子核内出现了核内体之后, 两子代出现核仁, 形成完整的核, 并恢复所有的细胞器, 在母核残体部前端裂开, 于是细胞逐渐分离形成两个新的子成熟体, 破空泡而游离为弓形虫, 此时弓形虫的排列方式为典型的“八”字型.

纵二裂殖: 有些虫体进入宿主细胞后, 在细胞质空泡内移动, 不进入细胞核, 并远离胞核, 这种情况下的虫体多呈纵分裂方式繁殖. 最初的虫体由原来的月牙型逐渐变为卵圆形或圆形, 然后拆散自己的细胞器, 在圆周直径对称交点处慢慢形成马蹄样, 虫体中央核一分为二, 原生质随之分成两部分, 中线逐渐明显, 各自形成的细胞膜为半圆状, 两个繁殖体随即形成, 后二再分为四, 四再分为八. 若呈等同步分裂并能排成一条长链, 则称为“长队型群落”; 若排成弧形, 则称为“半环型群落”; 排成圆形, 则称为“环型群落”.

在鼠腹腔液涂片中还发现了一种非正常状态下弓形虫的纵二裂殖方式. 进行分裂的虫体常游离于细胞外, 个体较正常虫体大(图版 1), 有些甚至大小为普通虫体的两倍, 其核染色呈两个块状, 位于虫体中后部, 发育成熟后, 从前端以纵二裂的方式裂开, 形成两个子代虫体. 此现象说明, 弓形虫在不利条件下也可在胞外增殖.

裂殖繁殖: 弓形虫常见的繁殖方式, 胞浆和胞核中的虫体也都可以进行此种方式的繁殖. 虫体细胞核经多次分裂而形成多核体, 每个小核形成各自相应的原生质和细胞膜, 成堆成团地聚集在一起, 称为“终末集团落”, 常形成簇形、不规则型、玫瑰花型等群落.

2.2 鼠腹腔巨噬细胞中速殖子的增殖发育

感染后 24 h: 此期假包囊大小各异, 内含速殖子数目也较大差异, 最大的假包囊直径为 $13 \mu\text{m}$, 内含速殖子数为 32 个, 其中的速殖子排列不规则, 且运动活跃. 最小的假包囊直径仅 $1.5 \mu\text{m}$, 内含速殖子数仅 2 个, 且呈典型的“八”字形排列, 此期假包囊的平均直径为 $5 \mu\text{m}$, 内含速殖子数平均为 12 个. 速殖子在假包囊内的排列方式多种, 活体观察时, 以圆周形排列最常见, 90% (180-200) 的假包囊中速殖子呈圆周形排列, 且分布在靠近假包囊壁的地方, 排列非常规则, 且无剧烈的活动, 仅在假胞囊壁附近移动, 有时形成星状突起(图版 2), 此时的速殖子部分呈弓形, 也有部分呈椭圆形. 进入胞浆内的速殖子, 形态常逐渐变为椭圆形, 活体观察时常见速殖子的一端红色颗粒状物质, 占虫体总体积的 $1/3$ 大小, 根据其大小推测, 疑为锥形体. 此期腹腔液中偶见单个速殖子.

感染后 48 h: 假包囊的直径明显大于感染后 24 h 的假包囊. 最大直径为 $31 \mu\text{m}$, 最小直径 $3 \mu\text{m}$, 假包囊的平均直径为 $7.8 \mu\text{m}$, 内含速殖子数平均为 14 个. 活体观察时可见速殖子排列多不规则, 且运动活跃. 此期弓形虫速殖子多远离假包囊壁, 在胞浆内自由活动, 速殖子的形态仍然为椭圆形、圆形, 且在一端有占虫体 $1/3$ 大小的红色颗粒. 此期腹腔液中偶见单个速殖子.

感染后 72 h: 小鼠腹腔内可见大量散在的单个速殖子, 运动活跃, 假包囊数明显减少, 每

个视野中(10×100)约 2~3 个假包囊,假包囊大小不等,形状也不一定呈圆形,直径的均值为 $9\times 7.4(11\sim 7\times 9\sim 7)$,内含速殖子数常为 12 或 18 个。活体观察曾观察到假包囊从一点裂开,成熟的速殖子相继散出(图版 3)。成熟的速殖子呈橘瓣状或月牙形,橘瓣状的虫体居多(70%, 140~200)。速殖子一端尖锐,一端钝,胞核常位于钝端,大小约为虫体的 $1/3\sim 1/4$,虫体平均大小为 $4.21\times 1.44\ \mu\text{m}(3\sim 7\ \mu\text{m}\times 1\sim 2.5\ \mu\text{m})$ (图版 4)。

2.3 磺胺嘧啶(S. D.)对鼠腹腔内弓形虫发育的影响

感染后 48 h(治疗后 24 h):假包囊的平均直径为 $5.6\ \mu\text{m}$,内含速殖子平均数为 12 个,假包囊中的速殖子活体观察时多呈现圆周形规则排列,且靠近假包囊壁,运动不活跃。染色后虫体呈椭圆形,单个散在的速殖子未见,假包囊着色深。

感染后 72 h(治疗后 48 h):腹腔内单个散在的速殖子数远远少于未用 S. D. 口腔喂饲的同期小鼠,而假包囊数则明显高于未用 S. D. 口腔喂饲的同期小鼠,平均每个视野中(10×100)中,假包囊数为 8 个,假包囊的大小平均为 $6.8\times 6.8(11\sim 3.5\times 11\sim 3.5)$,内含速殖子数平均为 10 个(4~14 个)。单个速殖子多呈月牙型(62%, 124:200),橘瓣状速殖子少,速殖子大小为 $4\times 1.4\ \mu\text{m}(3\sim 7\times 1\sim 2)$,少数速殖子形状发生了变异(图版 5),体长变短,体宽增大,变异速殖子的核有些位于钝端,有些位于虫体中部,大小为虫体的一半,变异速殖子的大小均值为 $3\times 2\ \mu\text{m}(3\sim 3.2\times 1.5\sim 2.5)$,速殖子变异比率为 15%(30:200),变异速殖子染色深。

2.4 讨 论

巨噬细胞是弓形虫感染宿主的重要效应细胞,除了加工处理和呈递抗原、释放免疫调节因子如 IL-1、IFN 等外,另一重要的作用是直接杀伤弓形虫。但是未被激活的正常巨噬细胞却是弓形虫的宿主细胞,主要原因有以下几点:

- 1) 虫体侵入巨噬细胞后,纳虫小泡不与溶酶体结合,吞噬溶酶体不能形成;
- 2) 虫体不能有效地触动巨噬细胞的呼吸暴发而产生活性氧;
- 3) 虫体内含有丰富的过氧化氢酶和谷胱甘酞过氧化氢酶,能消除巨噬细胞内活性氧的杀虫作用。

但经淋巴因子或抗体激活的巨噬细胞均能杀死入侵的弓形虫速殖子,或降低其在宿主细胞内的增殖速率,使弓形虫的免疫逃避机制失效。淋巴因子对速殖子的生长抑制及杀虫作用,是通过巨噬细胞和 NK 细胞等终末效应细胞完成的,而抗体介导的巨噬细胞杀虫作用是由于特异性抗体可以增强虫体与溶酶体的结合,并易触动巨噬细胞的吞噬依赖性呼吸暴发。急性弓形虫感染阶段患者的免疫调节细胞在数量上和功能上都有明显的变化。因此,很多学者对过继免疫和应用细胞因子对体内外的弓形虫感染的保护作用进行了研究,但却存在不同的结果。Suzuki, Y.^[5]报道,在小鼠体内应用 rTNF- α 不能抑制弓形虫的感染,并与 IFN- γ 具有协同作用。Langermans, JAM.^[6]应用抗 TNF- α 抗体阻断了 IFN- γ 在鼠体内的抗弓形虫效应。蒋早立等^[1]测定了口腔弓形虫感染时小鼠巨噬细胞吞噬功能和溶菌酶活力,结果显示感染早期的小鼠腹腔巨噬细胞的溶菌酶活力和吞噬功能均明显增强,提示在急性弓形虫病早期,巨噬细胞的非特异功能是增强的。Daubener, W.^[7]等建立的弓形虫抗原特异性 Th2 克隆上清对 IFN- γ 诱导的抗弓形虫效应无明显影响。Roberts, OW. 等^[8]报道,IL-4 增加弓形虫在小鼠脑组织内的复制,弓形虫感染可导致机体以细胞免疫为主的功能低下,伴有 IL-2 降低。李永华等^[2]研究了重组 IL-2 的抗弓形虫作用,结果表明:IL-2 虽可明显延长存活时间,但并不能逆转强毒株感染

后小鼠的死亡命运. 郑春福等^[3]探讨了增加细胞 L-精氨酸浓度是否可提高活化巨噬细胞诱生 NO 的产量及其对细胞内抑制或杀伤弓形虫速殖子的能力. 结果证明, 在生理水平 L-精氨酸浓度(80 $\mu\text{m}/\text{L}$)下, IFN- γ 活化的巨噬细胞诱生的 NO 可降低弓形虫的感染力及其在细胞内的增殖力, 却不能完全预防弓形虫的感染及在细胞内的增殖.

目前治疗弓形虫病的化学药物主要有以下几种: 乙胺嘧啶、S. D.、螺旋霉素、氯林可霉素、复方新诺明等. 但是, 目前的化学治疗药物虽然对滋养体有抑制作用, 治疗后血清抗体滴度下降, 病情停止发展, 临床症状改善明显, 甚至有可能达到治愈的要求. 但对包囊无作用, 故易于复发, 且治疗疗程长, 一般总疗程至少 4~6 周或更长, 药物的毒副作用重, 对中枢神经系统弓形虫病的疗效不好, 一些虫株还有耐药性. 因此, 寻找新的防治弓形虫病的方法成了许多学者的研究目标. 目前国内学者开始尝试用植物提取液进行弓形虫病的防治, 如松萝酸(U snic acid), 它是广泛存在于地衣类植物中的一种有机酸, 具有抗菌、抗疟原虫和抗阴道毛滴虫的作用. 吴杰等^[4]进行了体外松萝酸杀弓形虫速殖子的实验, 并以螺旋霉素作为对照组. 结果表明, 松萝酸治疗后虫体着色率显著升高, 加松萝酸后 1 h, 速殖子胞质和胞核染色加深, 胞质着色不均匀, 出现深染团块或粗大颗粒, 部分虫体变形、固缩. 用药后 4 h, 部分速殖子固缩, 虫体椭圆形或圆形. 随着松萝酸对速殖子作用时间的延长, 发生病变的虫体增加, 病变程度加重. 本次实验以 S. D. 作为弓形虫的治疗药物, 实验中也发现弓形虫速殖子在治疗后, 成熟的虫体发生变形, 呈椭圆形或圆形, 胞质和胞核染色加深, 且发生变异的比率也随治疗时间的延长而增加. 因此松萝酸是否具有和 S. D. 相同的作用机理, 有待进一步的考察.

一般认为弓形虫是严格的细胞内寄生原虫, 不能在细胞外进行生殖, 但作者在感染组腹腔液涂片中却观察到有少数弓形虫速殖子繁殖可在胞外进行, 其繁殖的主要方式为纵二分裂和内二芽殖. Ferguson, D. J. P^[9]. 等在比较弓形虫无性生殖的方式时, 也观察到胞外进行等裂殖的虫体, 他所观察到的虫体胞外增殖发生的几率高达 24%, 因此推测了两种原因:

- 1) 宿主细胞分裂后破裂, 导致虫体散出, 但胞外的物质不足以使虫体进行典型的内裂殖;
- 2) 宿主细胞的重寄生(Hyperparasitization)使少数虫体失去了穿透能力, 所以虫体试图在不利的环境中分裂.

作者所观察的胞外生殖的发生几率仅为 0.5% (1/200), 远远低于 Ferguson, D. J. P. 等的观察. 因此作者认为, 胞外生殖不是弓形虫的正常生殖方式, 可能是在不利条件下, 弓形虫采取的非正常生殖方式.

在治疗组小鼠腹腔液涂片中未发现单个的速殖子, 推测 S. D. 对胞外的速殖子具杀灭作用.

本文得到了厦门大学寄生动植物研究室洪凌仙教授的亲切指导, 在此表示衷心的感谢

参考文献:

- [1] 蒋早立, 李师永, 黄敏君, 等. 急性弓形虫感染小鼠腹腔巨噬细胞功能的变化[J]. 中国人兽共患病杂志, 1994, 10(3): 17-18.
- [2] 李永华, 程玉沆, 古钦民, 等. 重组白细胞介素-2 抗弓形虫作用的实验研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1996, 9(2): 89-92.

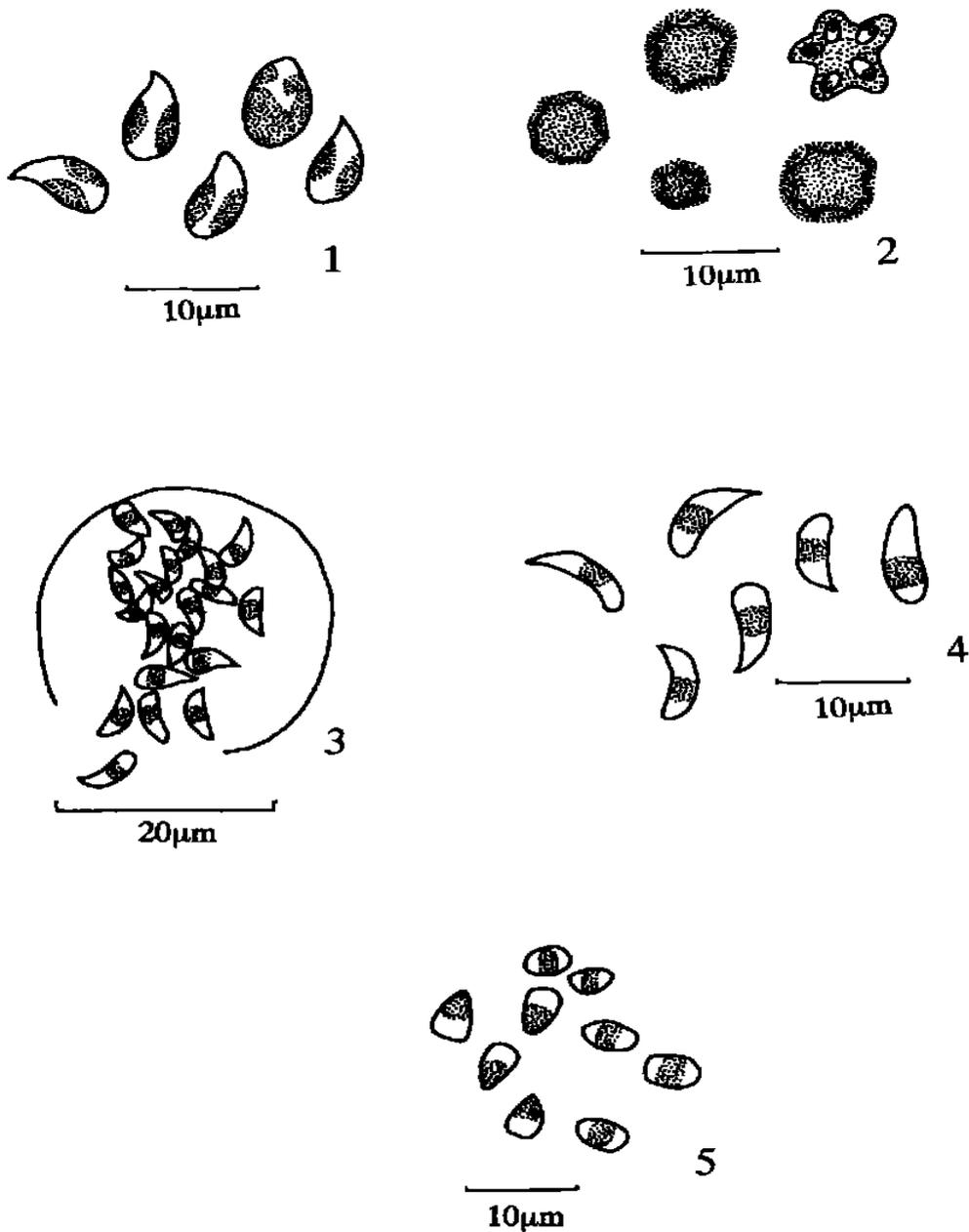
- [3] 郑春福, 林建银. L-精氨酸和 L-瓜胺酸在体外活化巨噬细胞抗弓形虫感染中的作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998, 16(5): 326- 330.
- [4] 吴杰, 程彦斌, 杨少毅. 松萝酸抗弓形虫速殖子作用的体外实验和电镜观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1996, 14(1): 58- 62.
- [5] Suzuki Y, Orellana M A, Schreiber R D. Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*[J]. Science, 1988, 240: 516- 519.
- [6] Langermans JAM, Van Der Hust MEB, Niberring P H. IFN- γ induced dependent toxoplasma static activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α [J]. J. Immunol., 1992, 148: 568.
- [7] Daubener W, Bell A D, Smith T C. Establishment of T-helper type 1 and T-helper type 2 like human *Toxoplasma* antigen-specific T-cell clones[J]. Immunol., 1995, 86: 79- 86.
- [8] Roberts OW, Ferguson D J P, Jebbari H. Different roles for IL-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection[J]. Infect. Immun., 1996, 64: 897- 904.
- [9] Ferguson D J P, Roberts O W, Jebbari H. Comparison of the methods of asexual multiplication undergone by *Toxoplasma gondii*[J]. Brit Soc. Parasitol: proceeding, 1972, 36(增刊): 13.

Studies on Proliferation of *Toxoplasma gondii* and Effect of S. D. on Its Process

WANG Qi¹, LIN Yu-guang¹, YANG Wen-chuan¹, LI Zhi-jing²
(1. Parasitology Res. Lab. of Xiamen Univ., Xiamen 361005, China;
2. Medical College of Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

Abstract: The proliferation of the tachyzoites of RH strain *Toxoplasma gondii* was studied in mice. And the effect of S. D. on the process of proliferation was also investigated. The results showed that the ways of proliferation were binary fission, budding, schizogony. In mice, the tachyzoites matured after 72 hours and fled out of the host cell. S. D. could inhibit the proliferation partially.

Key words: *Toxoplasma gondii*; proliferation; S. D.



图版说明

- 1. 胞外增殖的肥大速殖子
- 2. 感染后 24 h 速殖子在假包囊壁附近移动形成星状突起
- 3. 成熟的速殖子从假包囊中散出
- 4. 正常速殖子
- 5. 发生变异的速殖子