

· 综述 ·

弓形虫株毒力差异的分子机制

马 鑫 陈晓光

第一军医大学寄生虫学教研室 广州 510515

目前认为全球分布的刚地弓形虫是弓形虫属唯一的一个种可分为强毒株和弱毒株。Makioka 等发现强毒株 RH 株的 DNA 聚合酶活性要比弱毒株 ME49 株高很多^[1], 这说明虫株间毒力差异是有其分子机制的。然而, 究竟是什么决定了虫株的毒力?

近年来, 学者们利用免疫学和分子生物学手段, 如同工酶谱、限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism RFLP)、随机扩增多态性 DNA-聚合酶链式反应 (random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction, RAPD-PCR) 等, 试图阐明虫体基因型与毒力表型之间的关系, 现就这些方面的研究进展进行综述。

同工酶谱分析

Darde 等^[2]根据聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳的磷酸葡萄糖异构酶 (glucose phosphate isomerase, GPI)、淀粉酶 (amylase, AMY)、谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GSR)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, ASAT)、丙酮酯酶 (propionyl esterase, PE) 和酸性磷酸酯酶 (acid phosphatase, ACP) 等6种同工酶谱, 将35株弓形虫分为5组。第1、2、3组与 Darde 等^[3]报道的相同, 使用酶数量的增加并未改变对分离株的分类。第1组属 I 型酶谱, 有包括 RH 株在内的6个强毒株, 不能产生卵囊; 第2组的20株属 II 型酶谱, 其中 ASAT 和 GSR 与 I 型酶谱不同, 导致小鼠慢性感染, 可以产生卵囊, 某些株经长期传代后, 可引起小鼠急性感染; 第3组的4株都引起小鼠的慢性感染; 第4组的4株都可产生卵囊, 其中3株引起小鼠慢性感染, 1株引起小鼠急性感染; 第5组酶谱只有1株强毒株。

第1组中, 所有分离株都是强毒株, 都丧失了有性生殖能力, 在自然界中只能靠在中宿主中来保存, 从而限制了它们在自然界中的分布。其它组的大多数分离株, 在小鼠中先引起慢性感染, 即使某些分离株的致病力经传代后会增加, 而引起小鼠急性或亚急性感染, 但这些组虫株引起的急性感染与第

1组不同, 受染小鼠腹水中, 速殖子较少而炎症细胞较多。并且, 第4组中引起急性感染的分离株 ELG 株仍能产生卵囊。在所调查的35株中超过半数的分离株属于第2组 (共20株), 包括了来自英、美、法等国的分离株。35株中24株分离自人, 每组谱型都有。这说明没有哪一种酶谱是区域特异性或种属特异性。第4组酶谱型中既有来自致命的先天性弓形虫病的分离株, 也有来自无症状先天性弓形虫病和艾滋病并发弓形虫脑炎的分离株, 在酶谱型和人弓形虫病的临床表现中未发现明显的相关性。

RFLP 分析

Sibley 等对五大洲28株弓形虫分布在各染色体上的9个主要位点作 RFLP 分析, 发现10个强毒株的基因型惊人的一致, 而弱毒株基因型呈一定的多态性。说明尽管经过全球广泛传播和有性生殖循环, 由同一无性系起源的强毒株始终保持了遗传的同一性^[4]。

Howe 等^[5]的研究发展了上述观点。他对来自欧洲和北美的106个流行病学上无关联的分离株, 用 RFLP 分析6个主要位点的等位基因类型, 发现大多数虫株是3种极相似的基因型中的一种。许多自不同宿主和不同地区分离的虫株, 有相同的基因型。I、II 和 III 型分别有15、50和24个分离株 (分别对应于同工酶谱 I 型, II 和 IV 复合型, V 型), 余为复合基因型。其中, I 型株与人体先天性弓形虫病的关系显著, I 型株在先天性弓形虫病人中出现频率显著高于感染动物。I 型株都是强毒株, 在鼠模型中, 该株毒性极大, 产生高度虫血症, 可使经胎盘传播的危险性增加; II 型株与慢性感染激活关系明显, 占艾滋病患者的65%; 并使模型鼠产生高负荷的包囊; III 型株在动物体内的出现频率高于艾滋病和非艾滋病患者。在人弓形虫病中, 病情严重程度似乎受虫体基因型影响。因此, 作者认为弓形虫具有特殊的无性系种群结构, 大于95% 以上的分离株为3型不同无性系的生物体。但同型株之间也有遗传差异。即使各无性系间在这6个位点上的等位基因类型有明显差别, 弓形虫各株间最大遗传差异仍较低 (小于1%)。与 I 型

相比, 呈弱毒株表型的 II 型和 III 型间遗传距离更近, 它们有一共同的祖先^[5]。

RAPD-PCR 分析

Guo 等^[6]用 RAPD-PCR 分析了 11 个不同毒力虫株的遗传多样性, 发现当用引物 B5 扩增时, 有 1 条 DNA 带仅在弱毒株中出现。根据用 7 个随机引物扩增弓形虫基因组 DNA 的结果, 用不同的系统学方法建立的弓形虫种内树状关系图, 都可将这 11 株分成两组, 一组由 6 个强毒株构成, 另一组由 5 个弱毒株构成^[6]。

最近 Guo 等^[7]用 18 个随机引物进行 RAPD-PCR 分析时, 发现至少有 4 个引物产生的 DNA 片段可将 35 个分离株分为强毒株基因型和弱毒株基因型两种。引物 B12 产生 243 bp 的强毒株特异性片段, 引物 B5、C8 和 C20 分别产生 1 792 bp、395 bp 和 442 bp 的弱毒株特异性片段。对这 4 个引物做同源性分析, 揭示 4 个引物与任何已知序列都不相似。用不同的系统学方法所建立的种内遗传关系图是完全一致的, 都将这 35 株分成与毒力相关的两个无性系: 一组由 17 个强毒株构成, 平均遗传距离为 0.105; 另一组由 18 个弱毒株构成, 平均遗传距离为 0.121。同一无性系内遗传多样性无显著差异 ($P > 0.05$), 两无性系间的平均遗传距离为 0.349, 系间的遗传多样性显著高于系内的 ($P < 0.05$)。说明弓形虫的确由两个与毒力相关的无性系组成, 很可能这两个无性系自起初分离后已分支演化。弓形虫种群明显的连锁不平衡不能用地理分离或选择压力来解释。Guo 等认为是生殖周期长期选择的结果^[7]。

强毒株与弱毒株的株特异性抗原

Ware 等^[8]描述了弓形虫虫株间具有特异性抗原。Gross 等^[9]用免疫荧光和免疫杂交的方法, 发现单抗 5B10 只识别强毒株 RH 株和 BK 株上的 23 kDa 膜抗原。在弱毒株上检测不到这种 23 kDa 的膜抗原。作者认为这种 23 kDa 的膜抗原是强毒株特异性抗原。

在 Gross^[10]研究的基础上, Pamley^[11]的研究发现 23 kDa 膜抗原正是表面抗原 P22 (surface antigen 2, SA G2)。他用 4 种抗 P22 的单抗 (包括 5B10) 对 25 株弓形虫 (4 株强毒株, 21 株弱毒株) 进行免疫杂交, 其中 12 个虫株可被这 4 种单抗全部识别, 其余 13 株 (全部是弱毒株) 均不能识别, 测序证实这 13 株表达的是改变了的 P22, 包括 5 个核苷酸的替换和 1

个三联密码子 GGT 的插入。对 P22、弓形虫主要表面抗原 1 (surface antigen 1, SA G1) 和 850 (位于 V 号染色体上的未知编码功能的单拷贝基因) 3 个基因位点的联合分析, 将这 25 株分成 3 组, A 组 (4 个强毒株) 和 C 组 (8 个弱毒株) 表达的 P22 是等位基因 1 型, 可被这 4 种单抗全部识别, B 组 (13 个弱毒株) 表达的是改变了的 P22, 是 2 型等位基因, 4 种单抗均不能识别。可见, 由于抗 P22 的单抗不能区分 A 组和 C 组虫株, 所以 P22 不能作为强毒株的特异性抗原。

Bohne 等^[10]发现抗 27 kDa 胞浆抗原的单抗 TB6G5 只与 8 个弱毒株反应, 不与强毒株 RH 株和 BK 株反应。这种 27 kDa 抗原在速殖子和缓殖子中都表达。据此, 作者认为这个 27 kDa 的胞浆蛋白是弱毒株特异性抗原^[10]。

毒力相关蛋白

热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 和 SA G1 是研究较多的与弓形虫虫株毒力有关的蛋白。

1 热休克蛋白是在包括感染等各种压力环境下细胞产生的用于保持细胞功能的一组高度保守的多肽。Nagasawa 等^[12]用抗分支杆菌 HSP65 的单抗在被弱毒株 Beverley 株感染的小鼠腹腔巨噬细胞中检测到 65 kDa HSP 的存在, 在强毒株 RH 株感染小鼠中却没测到这种 65 kDa HSP, 并且在对强毒株和致死剂量弱毒株感染获得抗性的小鼠中都有这种 65 kDa HSP 的存在。表明 HSPs 在体内形成抗弓形虫感染的有效防御中起重要作用。

Lyons 等^[13]对弓形虫 3 个强毒株 (RH、ENT 和 P 株) 和 3 个弱毒株 (Beverley、ME 和 Fukaya 株) 表达的热休克蛋白作了进一步研究。与 Nagasawa 的报道不同, 强、弱毒株感染小鼠后, 鼠巨噬细胞均表达出 HSP65, 弱毒株的表达远强于强毒株。这可能是由于采用了 ECL 检测系统而提高了敏感性所致。体内试验仅在强毒株中测到高水平的 HSP70, 弱毒株中 HSP70 表达量很低。所有虫株的体内、外试验都有 65 kDa 蛋白, 这种蛋白与 HSP70 有一个共同的抗原决定簇, 目前还不清楚它是否为 HSP70 类成员。他们假设: 弓形虫强毒株由免疫应答所诱导的 HSP70 的表达可能为这些虫株提供了抗细胞损伤的保护作用, 增强其在宿主巨嗜细胞中生存和繁殖的能力, 而弱毒株则发育成包囊或被宿主的免疫系统消灭。

2 Pam ley 等^[11]和 Sibley 等^[4]分别发现 SA G1 基因等位基因 I 型与弓形虫强毒株相关, W indeck 等^[14]研究发现强毒株中 SA G1 基因启动子上游的 5 个 27 bp 的重复顺序, 在弱毒株里只重复 4 次, 并且强毒株里 SA G1 的表达水平是弱毒株的 4 倍。由于胞外的速殖子更易受到免疫系统的攻击, 快速侵入细胞内对虫体是至关重要的, SA G1 在细胞附着和入侵中起重要作用, 由于它在强毒株中的稳定状态的高水平表达, 所以 SA G1 可能是弓形虫毒力的一个决定因子^[14]。

R inder^[15]检测了 9 株弓形虫 SA G1 基因 3' 端 315 bp (包括 98 编码区及相邻的 217 非编码区) 中的 5 个多态性位点, 发现有 3 个与致病性相关, 1 个多态性位点将强毒株与弱毒株联系起来。

Howe 等^[16]发现他分离到的 3 个天然重组株, 都是 SA G1 等位基因 I 型, 并且除了在第 V、VIII 和 IX 号染色体末端, ROD 株和 G622M 株基因型几乎完全一致, 都是典型的属于弱毒株的 III 型基因型, 但 ROD 株却是强毒株, 而 G622M、P89 是弱毒株, 这说明仅靠 SA G1 等位基因 I 型并不能完全确定强毒株的表型。在 SA G1 基因起始密码子上游, 第 2 个开放阅读框之后有 5 处碱基变化 (分别命名为 F1 和 R1-R4), 其中在 F1、R1 和 R3 处的变化将 RH 和 ROD 这两个强毒株与 G622M、P89、CEP 和 PLK 这些弱毒株区分开来。R3 处碱基的改变产生了 PVU II 酶限制性片段的多态性, 16 株弱毒株 (基因型为 II 型或 III 型) 都没有这个 PVU II 酶的限制性位点, 而 19 株强毒株 (基因型为 I 型) 中 18 株都有这个 PVU II 限制性位点。虽然这 5 处碱基变化位于非编码区, 对表型不可能有直接作用, 但至少说明在 VIII 号染色体末端存在毒力表型的决定子^[16]。

目前, 唯一性的毒力因子是入侵增强因子 (penetrating enhancing factor, PEF), 它位于虫体前部, 是 66 kDa 的分泌抗原^[9]。

毒力与进化

Luton 等^[17]对 8 株弓形虫 18SRNA 基因顺序的分析由于异质性太低未能建立株之间的联系。Shaw^[18]发现 20 株弓形虫的内转录间隔区 I 是相同的, 表明弓形虫强毒株与弱毒株这两个无性系进化时间相对较晚, 所以往往是通过大量虫株的大量位点分析才能建立株之间的正确联系。由于虫株在不断地进化, 现在的毒力表型可能并未反映起初分离时的表型^[18]。

从人和动物刚分离的虫株毒力较弱, 经过传代后, 毒力提高^[19]。

有些弱毒株, 经多次传代后会引小鼠急性感染, 但研究证实, 对大多数虫株来说, 毒力与实验室传代频率无关, 即使经多次传代后, 其强毒株或弱毒株的表型也不会发生改变^[4, 5]。

弓形虫在自然环境中主要是无性繁殖^[20]。从存在两个无性系角度来考虑弓形虫种, 就可以解释强、弱毒株的许多不同点。大多数强毒株较少产生组织包囊或卵囊, 而弱毒株却不是。在自然环境下两个无性系的虫株甚至连生活周期都不相同。已知在弓形虫种内确实存在生活周期的不同, 这符合分类学上对种的某些描述^[21], Tibayrenc^[20]提出刚地弓形虫的强毒株系可能是一个种。

在自然界中, 有性循环在弱毒株繁殖中的作用尚不清楚, 尽管在实验室通过同时摄入两种虫株的包囊, 实现了弱毒株间的有性重组, 但这种情况在自然界是非常少见的。即使有, 先摄入的包囊引起的免疫, 往往减少第 2 种卵囊的排出。虽然在猫肠上皮细胞存在有性周期, 但在自然界中无性繁殖最为普遍, 从而使弱毒株得以保持自己的无性系。

上述研究表明, 弓形虫株的遗传多样性决定了虫株间毒力的差异。它既决定了小鼠的急性感染与慢性感染, 在一定程度上也决定了人弓形虫病的类型。弓形虫毒力差异的分子决定机制相当复杂, 它不是由单一的基因或蛋白所决定, 而是由许多基因和蛋白共同参与相互作用的结果。但究竟是哪些基因和蛋白与毒力有关以及其作用机制, 目前尚不清楚。随着分子生物学新技术和动物模型的应用以及人们对弓形虫毒力研究的广泛与深入, 弓形虫株毒力差异的分子机制, 在不久的将来, 可望得到深入的揭示。

参 考 文 献

- 1 Makioka A, Hiroshi O. An increased DNA polymerase activity associated with virulence of *Toxoplasma gondii* J Parasitol 1995; 81:1021
- 2 Darde ML, Bouteille B, Pestre A, Alexander M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates: biology and epidemiological implications J Parasitol 1992; 78:786
- 3 Darde ML, Bouteille B, Pestre A, Alexander M. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels Am J Trop Med Hyg 1988; 39:551
- 4 Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage Nature 1992; 359:82
- 5 Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease J Infect Dis 1995; 172:1561

- 6 Guo ZG, Johnson AM. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitology* 1995; 111:127
 - 7 Guo ZG, Gross U, Johnson AM. *Toxoplasma gondii* virulence markers identified by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 1997; 83:458
 - 8 Ware PL, Kasper LH. Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 1987; 55:778
 - 9 Gross U, Muller WA, Knapp S, et al. Identification of a virulence-associated antigen of *Toxoplasma gondii* by use of a mouse monoclonal antibody. *Infect Immun* 1991; 59:4511
 - 10 Bohne W, Gross U, Heesenann J. Differentiation between mouse-virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii* by a monoclonal antibody recognizing a 27-kilodalton antigen. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1641
 - 11 Pamley SF, Gross U, Sucharczuk A, et al. Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 1994; 80:293
 - 12 Nagasawa H, Oka M, Maeda KI, et al. Induction of heat shock protein closely correlates with protection against *Toxoplasma gondii* infection. *Proc Natl Acad Sci U SA* 1992; 89:3155
 - 13 Lyons RE, Johnson AM. Heat shock proteins of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immun* 1995; 17:353
 - 14 Windeck T, Gross U. *Toxoplasma gondii* strain-specific transcript levels of SA G1 and their association with virulence. *Parasitol Res* 1996; 82:715
 - 15 Rinder H, Thom schke A, Darde ML, et al. Specific DNA polymorphisms discriminate between virulence and non-virulence to mice in nine *Toxoplasma gondii* strains. *Mol Bio Parasitol* 1995; 69:123
 - 16 Howe DK, Summers BC, Sibley LD. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 1996; 64:5193
 - 17 Luton K, Gleeson M, Johnson AM. rRNA gene sequence heterogeneity among *Toxoplasma gondii* isolates. *Parasitol Res* 1995; 81:310
 - 18 Shaw J, Camargo EP. Are trees real? *Parasitol Today* 1995; 11:347
 - 19 于恩庶. 弓形虫病学. 第1版. 福州: 福建科学技术出版社, 1992: 44~ 49
 - 20 Tibayrenc M. *Entamoeba*, *Giardia* and *Toxoplasma*: clonal or cryptic species? *Parasitol Today* 1993; 9:102
 - 21 Sluys R. Species concepts, process analysis, and the hierarchy of nature. *Experientia* 1991; 47:1162
- 1997年10月20日收稿 1998年3月23日修回
(编辑: 庄兆农)

云南省西双版纳勐滩河沿岸疟疾调查

云南省疟疾防治研究所 思茅 665000 李兴亮 杨沧江 李宗惠

为了解勐滩河岸疟疾的流行程度, 1994年7月~ 10月对红江和批沙村的当地居民(以下简称居民), 贺兰东5个队的新垦区垦殖农民(以下简称垦民)以及垦区发热病人进行了血片检查和血清学调查。同时作脾肿、死亡情况、社会经济及防治情况等调查。

方法

采耳垂血, 涂制厚血片、薄血片和镜检疟原虫, 同时制作滤纸干血滴, 作间接荧光抗体试验(IFA), 用云南省疟疾防治研究所制作的食蟹猴疟原虫抗原片及羊抗人 IgG 荧光抗体, 用 Olympus 荧光显微镜观察结果。

结果与讨论

血检和间接荧光抗体试验结果见表1。经 χ^2 检验, 两者间差别具有极显著性意义 ($\chi^2 = 286.92, P < 0.01$)。由表1可见垦民用上述两种方法检查, 小于15岁与大于15岁的检出率间的差别无显著意义 ($\chi^2_{血检} = 1.13, \chi^2_{IFA} = 1.08$, 其 P 值均 > 0.05)。而居民中小于15岁与大于15岁人群的检出率间的差别具有显著意义 ($\chi^2_{血检} = 7.94, \chi^2_{IFA} = 5.92$, 其 P 值均 < 0.05)。垦民以感染恶性疟为主, 而居民则均为间日疟, 表明垦民区的疟疾流行程度高于居民区。7月~ 10月, 垦民中发热病人的疟原虫检出率为32.2% (127/394), 而抗体阳性率达88.6% (327/369)。上述结果均与普查疟原虫检出率和抗体阳性率一致。

表 1 垦民和居民疟原虫检出与抗体阳性率

人群	年龄(岁)	疟原虫血检					间接荧光抗体试验			GMRT
		检查人数	阳性例数			阳性率(%)	检查例数	阳性例数	阳性率(%)	
			恶性疟	间日疟	合计					
垦民	< 15	85	12	1	13	15.3	83	71	85.5	101.9
	> 15	163	26	8	34	20.9	156	125	80.1	75.1
居民	< 15	85	-	4	4	4.7	85	36	42.4	20.0
	> 15	44	-	9	9	20.4	43	28	65.1	43.4

勐滩河系澜沧江支流, 位于西双版纳景洪市的中缅边境, 原属高度疟疾流行区。沿河岸地区, 现有7个村3190人。1992年~ 1994年, 先后从景谷、澜沧、普洱和墨江等县贫困无疟区或低疟区, 迁入12户农民垦殖队共703人, 从事开发种植依兰、橡胶和香茅等热带经济作物。垦民住房均为竹篱草顶的简陋棚屋。当地居民均为哈尼族, 住房多为木板墙瓦顶房。调查65户垦民除部分养有少量猪, 人均0.3头(91/299)外, 无养牛者。当地居民中人均有牛0.4头(136/315), 猪1.3头(421/315), 垦民和居民人均拥有蚊帐分别为0.4顶(107/299)和0.3顶。抽查的两个居民村, 于当年6月以 DDT 加

DDVP 进行1次灭蚊喷洒, 8月以防疟2号片预防服药1次, 服药率为33.2% (85/256)。调查结果表明, 勐滩河沿岸疟疾呈不同程度流行, 垦区疟疾流行程度高于居民区。同时, 人群中配子体携带者不断增多。当地主要媒介为微小按蚊, 该蚊占人房总捕获蚊数的55.0% (105/191), 由此而形成疟疾的高度传播状态。虽开展了一些疟疾防治工作, 但近年来疟疾发病仍呈现回升趋势, 应加强对疟疾的监测。

1997年7月5日收稿 1997年10月18日修回
(编辑: 李雅卿)