

文章编号: 1000-7423(2009)-01-0039-04

【实验研究】

# RH株弓形虫速殖子体外入侵大鼠肠上皮细胞与增殖的动态观察

孟晓丽, 殷国荣\*, 刘红丽, 王海龙

**【摘要】** 目的 动态观察弓形虫 RH 株速殖子(简称速殖子)体外入侵大鼠肠上皮细胞(IEC-6 细胞)及其增殖过程。方法 取 24 孔培养板, 设实验组及对照组各 3 孔, 每孔放置经预处理的盖玻片。将常规传代培养的 IEC-6 细胞接种于各培养孔, 于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h, 吸弃培养液, 实验组每孔加入 1 ml 速殖子悬液(含 1×10<sup>6</sup> 个速殖子), 对照组每孔加入 1 ml 无抗生素培养液, 共培养。用倒置显微镜连续观察速殖子粘附、入侵 IEC-6 细胞及其增殖过程, 并分别于共培养 5~30 min、1~48 h 后取出盖玻片, 经吉氏-瑞氏染色后光镜观察其入侵和增殖情况, 计算入侵率。结果 共培养 5 min, 速殖子即可入侵 IEC-6 细胞, 随着共培养时间的延长入侵的速殖子逐渐增多, 1 h 为 1~5 个, 入侵率为 (55.0±6.6) %。2 h 入侵率高达 (81.8±10.2) %, 有假包囊形成, 速殖子可入侵细胞核并在核内增殖。4 h 入侵率降为 (80.8±9.2) %, 假包囊破裂释出成簇排列的速殖子。6 h 入侵率为 (75.1±8.2) %, 成簇排列的速殖子显著增多。12 h 成簇排列的速殖子减少, 多数速殖子游离细胞外, 完整的 IEC-6 细胞明显减少。24 h 只见部分 IEC-6 细胞和假包囊存在, 有大量游离的速殖子。48 h 见大量游离速殖子, 未见贴壁细胞。结论 体外培养的弓形虫速殖子可迅速入侵 IEC-6 细胞, 并可在细胞质及细胞核内增殖。增殖周期为 6~12 h。

**【关键词】** 刚地弓形虫; 大鼠肠上皮细胞; 体外培养; 入侵; 增殖; 吉氏-瑞氏染色

中图分类号: R382.5 文献标识码: A

## Kinetic Observation on the Invasion into and Proliferation in IEC-6 Cells of *Toxoplasma gondii* RH Strain Tachyzoites *In vitro*

MENG Xiao-li, YIN Guo-rong\*, LIU Hong-li, WANG Hai-long

(Institute of Medical Parasitology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

**【Abstract】 Objective** To study the invasion and proliferation in IEC-6 cells of *Toxoplasma gondii* RH strain tachyzoites *in vitro*. **Methods** *T. gondii* tachyzoites of RH strain were co-cultured with IEC-6 cells *in vitro*, the process of cell adhesion, invasion and proliferation by tachyzoites was observed consecutively with inverted microscope. At 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 1, 2, 4, 6, 12, 24 and 48 h after co-culture, the tachyzoite invasion to IEC-6 and intracellular proliferation were observed with Giemsa-Wright's staining, respectively. The invasive rate of tachyzoites to IEC-6 was counted. **Results** *T. gondii* tachyzoites invaded the IEC-6 cells 5 min after culture, thenceforth the invasive rate increased gradually. The invasive rate was about 55.0% at the first hour after culture with 1-5 tachyzoites in one cell. In the second hour after culture, the rate reached highest with 81.8 % and there were many pseudocysts emerging. At the same time, tachyzoites invaded the cell nucleus and proliferated in the nucleus. At the 4th hour after culture, the invasive rate began to decrease (80.8±9.2)%, the pseudocysts began to break and tachyzoites were released to cluster. The clustering tachyzoites increased significantly at the 6th hour. At the 12th hour the clustering tachyzoites decreased and most tachyzoites were free, the number of complete cells decreased obviously. There were only a few cells and pseudocysts left at the 24th hour, and a great quantity of free tachyzoites existed out of the IEC-6 cells. There were plenty of mobile tachyzoites while none of IEC-6 cells existed after 48 h culture. **Conclusion** IEC-6 cell may be the suitable target cell of *Toxoplasma gondii* tachyzoite. The tachyzoites can invade the IEC-6 cells quickly *in vitro* and proliferate in the plasma and nucleus with a reproductive cycle of about 6 to 12 hrs.

**【Key words】** *Toxoplasma gondii*; IEC-6 cell; Culture; Invasion; Proliferation; Giemsa-Wright's staining

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30640057) and Natural Science Foundation of Shanxi (No. 20051045)

\* Corresponding author, E-mail: guorongyin@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30640057); 山西省青年科技基金 (No. 20051045)

作者单位: 山西医科大学医学寄生虫学研究所寄生虫学教研室, 太原 030001

\* 通讯作者, E-mail: guorongyin@163.com

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是一种专性细胞内寄生原虫, 可感染多种哺乳动物的有核细胞, 引起人兽共患弓形虫病。人群感染极为普遍, 全球约 20 亿人感染<sup>[1]</sup>, 我国人群血清阳性率达 7.88%<sup>[2]</sup>。随着免疫缺陷性疾病发病率的增加和免疫抑制剂的广泛使用, 弓形虫作为一种机会性致病原虫而倍受关注。弓形虫经口感染, 入侵肠黏膜上皮, 在肠上皮细胞 (intestinal epithelial cells, IEC) 内大量增殖, 随循环系统播散至全身致病<sup>[3,4]</sup>。Rescigno 等<sup>[5]</sup>提出黏膜固有层内的树突状细胞 (dendritic cell) 可将树突伸出肠上皮外直接摄取肠腔内的病原体; 而有些病原体是通过派伊尔淋巴结 (Peyer's patche) 内的微褶皱细胞进入肠上皮。Hopkins 等<sup>[6]</sup>证实病原体可通过派伊尔淋巴结内微褶皱细胞入侵与之相邻的树突状细胞, 进而在机体内播散。Pron 等<sup>[7]</sup>证实树突状细胞是李斯特菌入侵肠黏膜的最早靶细胞, 且在其播散过程中起一定作用。所以, 肠腔内病原体可能是通过肠上皮固有层内、肠系膜淋巴结 (mesenteric lymphocyte node) 以及派伊尔淋巴结内的树突状细胞和微褶皱细胞入侵机体, 但弓形虫经过肠黏膜屏障的方式及其所入侵的细胞尚存争议。

本研究采用 RH 株弓形虫速殖子与大鼠肠上皮细胞 (IEC-6) 共培养, 观察速殖子对 IEC-6 的粘附、入侵以及细胞内增殖过程, 为进一步研究其入侵机制和体外制备弓形虫速殖子抗原提供实验依据。

## 材料与方法

### 1 材料

大鼠小肠上皮细胞 (IEC-6) 引自中国协和医科大学基础医学细胞中心。国际标准 RH 强毒株弓形虫, 引自北京大学医学部寄生虫学教研室, 本室液氮保种。BALB/c 小鼠 (微生物级别二级), 引自中国医学科学院实验动物研究所。

### 2 方法

2.1 RH 株弓形虫速殖子分离及与 IEC-6 细胞共培养 常规复苏 RH 株弓形虫速殖子 (以下简称速殖子), 腹腔注射接种 BALB/c 小鼠, 传种 3 代, 收集腹腔冲洗液, 447×g 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次。取沉淀, 加入适量无抗生素的极限必需培养基 (DMEM 培养液) 111×g 离心 5 min (去除腹腔细胞) 收集上清, 调整速殖子浓度为 1×10<sup>6</sup> 个/ml。按常规传代培养 IEC-6 细胞<sup>[8]</sup>。取 24 孔培养板, 设实验组和对照组各 3 孔。每孔置放经预处理的盖玻片 (18 mm×18 mm), 将 IEC-6 细胞接种于培养孔, 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h。吸弃培养

液, 实验组每孔加入 1 ml 速殖子悬液 (含 1×10<sup>6</sup> 个速殖子), 对照组每孔加入 1 ml 无抗生素培养液, 共培养。

2.2 速殖子入侵及增殖过程观察 在共培养过程中, 用倒置显微镜连续观察速殖子粘附、入侵 IEC-6 细胞及其增殖过程, 起初每隔 5 min 观察 1 次, 2 h 后每隔 1 h 观察 1 次。

2.3 吉氏-瑞氏染色观察法 分别于共培养 5~30 min、1~48 h 取出盖玻片, 甲醇固定 1 min, 吉氏-瑞氏染色, 二甲苯透明, 封片, 光镜观察速殖子入侵 IEC-6 细胞及其在细胞内增殖过程, 观察 100 个 IEC-6 细胞计算入侵率<sup>[9]</sup>。入侵率 = (速殖子入侵的 IEC-6 细胞数/观察的 IEC-6 细胞总数) × 100%。

### 3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件, 进行单因素方差分析。

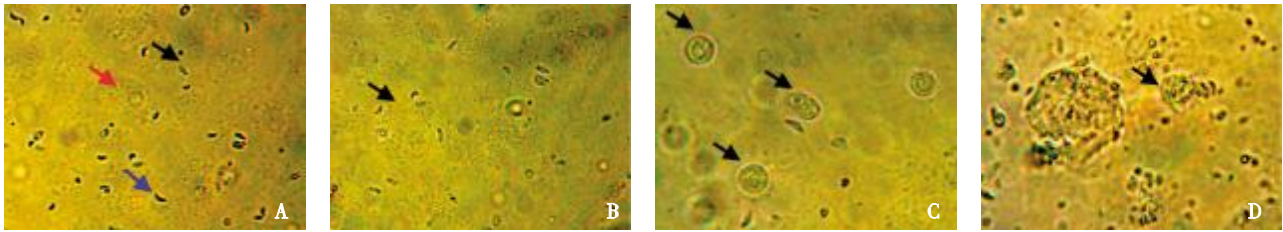
## 结 果

### 1 速殖子入侵 IEC-6 细胞的动态变化

速殖子加入培养孔后, 即见其迅速接近 IEC-6 细胞, 并以顶端或侧面粘附 IEC-6 细胞。共培养 5 min, 大多数速殖子游动, 在 1 个 IEC-6 细胞周围有 1 或多个速殖子粘附, 并有个别速殖子入侵 IEC-6 细胞 (图 1 A)。15 min 速殖子活动变缓, 大多数粘附于 IEC-6 细胞周围。30 min 可见 IEC-6 细胞内有 2~3 个速殖子。培养 1 h, 游离速殖子明显减少, 大多数 IEC-6 细胞均有 5~6 个速殖子寄生 (图 1 B)。培养 2 h, IEC-6 细胞内速殖子明显增多, 并有假包囊形成 (图 1 C)。培养 4 h, 假包囊显著增大, 有的破裂, 释出成簇排列的速殖子 (图 1 D)。培养 6 h, 成簇排列的速殖子显著增多, 仍有部分完整的寄生速殖子的 IEC-6 细胞存在。培养 12 h, 成簇排列的速殖子减少, 多数速殖子游离, 完整的 IEC-6 细胞明显减少。培养 24 h, 只有部分细胞和假包囊存在, 细胞外有大量游离的速殖子。培养 48 h, 无完整的 IEC-6 细胞, 可见大量游离速殖子和漂浮的细胞碎片。

### 2 染色观察速殖子入侵 IEC-6 细胞及细胞内增殖

速殖子与 IEC-6 细胞共培养 5 min, 即见 1 个虫体入侵 IEC-6 细胞质 (图 2 A), 而细胞核仍致密规整; 培养 1 h, 速殖子靠近 IEC-6 细胞核, 虫体增至 3 个 (图 2 B); 培养 2 h, 速殖子入侵细胞核, 并在核内增殖 (图 2 C); 培养 4 h, 增殖的速殖子成对从细胞核内逸出, 细胞核结构疏松 (图 2 D)。随着培养时间的延长入侵率逐渐上升, 由于 IEC-6 细胞数逐渐减少, 入侵率只计数至 6 h。培养 5、10、20 和 30 min,

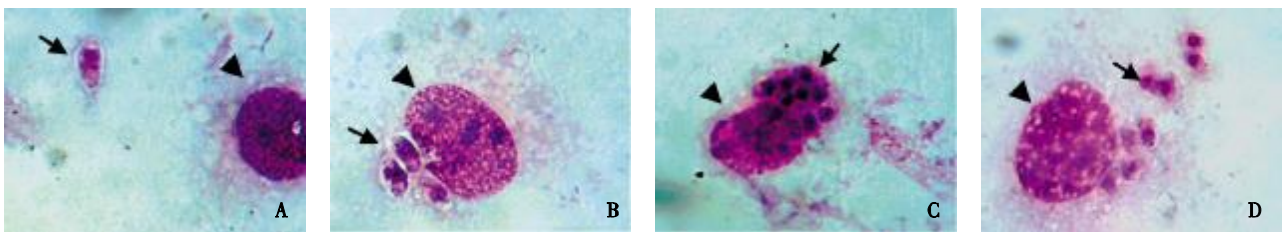


A: 培养 5 min, 大量速殖子接近 IEC-6 细胞 (↑), 正在粘附的速殖子 (↑), 入侵的速殖子 (↑); B: 培养 1 h, 大部分速殖子入侵 IEC-6 细胞, 细胞核内和核周有多个速殖子入侵 (↑); C: 培养 2 h, 大量假包囊形成 (↑); D: 培养 4 h, 假包囊逐渐增大并开始破裂, 大量速殖子被释放并成簇排列 (↑)。

A: At 5 min after co-culture, a plenty of tachyzoites close to IEC-6 cell: the nucleus of IEC-6 (↑), the tachyzoites attacking the host cell (↑) and the invaded tachyzoites (↑); B: On 1 h, most tachyzoites invaded the IEC-6 cells (↑); C: On 2 h, emerging pseudocysts (↑); D: On 4 h, enlarger pseudocyst began to break out and tachyzoites released and clustered (↑).

图 1 弓形虫速殖子入侵 IEC-6 细胞的动态变化 (×400)

Fig.1 Kinetic change of invasion of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to IEC-6 cell (×400)



A: 培养 5 min, 入侵 IEC-6 细胞质 (▼) 的单个弓形虫速殖子 (↑); B: 培养 1 h, 入侵 IEC-6 细胞核 (▼) 的 3 个弓形虫速殖子 (↑); C: 培养 2 h, 速殖子 (↑) 在 IEC-6 细胞核 (▼) 内增殖; D: 培养 4 h, 增殖的速殖子 (↑) 从 IEC-6 细胞核 (▼) 内释出。

A: At 5 min after co-culture, single tachyzoite (↑) invaded the IEC-6 cell, and the cell nucleus (▼); B: On 1 h, 3 tachyzoites invaded the IEC-6 cell (↑), and the nucleus (▼); C: On 2 h, tachyzoites (↑) proliferated in the cell and the nucleus (▼); D: On 4 h, the proliferated tachyzoites released (↑) from the nucleus (▼).

图 2 吉氏-瑞氏染色观察速殖子入侵 IEC-6 细胞及其增殖情况 (×1000)

Fig.2 The invasion and proliferation in IEC-6 cells of *Toxoplasma gondii* tachyzoites (Giemsa-Wright's staining, ×1000)

以及 1、2、4 和 6 h, 入侵率分别为 (1.40±0.54)%、(2.00±0.70)%、(9.40±2.30)%、(28.20±6.09)%、以及 (55.00±6.59)%、(81.80±10.16)%、(80.80±9.23)% 和 (75.12±8.24)%。培养 2 h 入侵率最高 ( $P<0.05$ )。

## 讨 论

作者曾采用 RNA 原位杂交技术, 观察到弓形虫速殖子灌胃感染小鼠 15 min 即可入侵小肠黏膜上皮细胞层和固有层, 并发现主要位于小肠黏膜上皮细胞层的吸收细胞内<sup>[10]</sup>。Morisaki 等<sup>[11]</sup>证实弓形虫在体外可迅速入侵适宜的宿主细胞 (吞噬细胞和非吞噬细胞), 入侵过程发生在与宿主细胞相接触的 20 s 内。Carruthers 等<sup>[12]</sup>研究表明, 速殖子在接触、入侵宿主细胞之前, 先发生极化, 并通过其顶端粘附于宿主细胞; 弓形虫能识别广泛分布的细胞表面分子和细胞外基质的多种成分, 并通过配体-受体结合方式粘附于多种细胞, 进而迅速入侵宿主细胞。本研究将速殖子与 IEC-6 细胞共培养, 速殖子便迅速靠近 IEC-6 细胞, 并以顶端或侧面粘附; 在共培养 5 min 即有速殖子进入 IEC-6 细胞。共培养 5 min 后取样、固定,

经吉-瑞氏染色后, 同样观察到少数 IEC-6 细胞内有速殖子入侵。结果表明 IEC-6 细胞是弓形虫的适宜靶细胞, 但具体的入侵机制尚不清楚。

弓形虫是细胞内寄生原虫, 入侵宿主细胞后可在胞内增殖, 达到一定数量即可使宿主细胞破裂, 释放出速殖子, 再入侵新的宿主细胞, 如此反复破坏宿主细胞。Jones 等<sup>[13]</sup>研究表明入侵细胞内的弓形虫存在于纳虫泡内, 以 5~10 h 为增殖周期, 最终导致宿主细胞破裂和速殖子的释放。本研究直接观察到弓形虫速殖子在 IEC-6 细胞内的增殖情况。从共培养 5 min 入侵 IEC-6 细胞开始, 随着时间的延长, 被入侵的 IEC-6 细胞逐渐增多, 胞内虫体数量也逐渐增多。共培养 1 h, 大部分细胞内有 5~6 个虫体寄生; 2 h 假包囊形成, 虫体增殖; 4 h 假包囊破裂, 释放出速殖子; 12 h 细胞开始破裂, 24 h 只有部分细胞和假包囊存在; 48 h 无贴壁细胞。染色后观察到的结果与直接观察到的结果一致, 共培养 2 h 速殖子入侵率高达 81.8%, 表明速殖子在 IEC-6 细胞内迅速增殖。随后 IEC-6 细胞逐渐被迅速增殖的速殖子破坏。推测速殖子在 IEC-6 细胞内的增殖周期可能为 6~12 h。

计浩<sup>[4]</sup>将幼地鼠或猪传代系肾上皮细胞中注入弓形虫速殖子 NT114 (汤山 114 代), 观察到速殖子可在细胞核内繁殖。本研究观察到在共培养 2 h 后, 速殖子即可在宿主细胞内增殖, 通过染色进一步观察到速殖子在入侵宿主细胞后, 逐渐靠近细胞核, 并入侵细胞核, 在细胞核内增殖, 增殖后从核内逸出, 致使宿主细胞核变得结构疏松, 出现这种情况的细胞很多, 不是偶发, 故推测速殖子可入侵宿主细胞核并在核内增殖。

目前国内对于弓形虫入侵宿主细胞内形态及增殖方面的研究, 大多采用共培养一定时间后终止培养, 吉-瑞氏染色, 显微镜下观察的方法<sup>[9,15]</sup>。此法可观察虫体感染宿主细胞情况, 但不能观察其动态变化。Morisaki 等<sup>[11]</sup>应用显微镜下视频观察弓形虫速殖子入侵吞噬细胞和非吞噬细胞的过程。本研究用倒置显微镜直接观察速殖子对 IEC-6 细胞粘附、入侵及胞内增殖过程, 不仅操作简单易行, 而且还可染色法进一步证实和计数其入侵率。可加深对弓形虫和 IEC-6 细胞之间的相互作用的认识, 为以后的研究提供参考。

#### 参 考 文 献

[1] Bout DT, Mevelec MN, Velge-Roussel F, et al. Prospects for a human *Toxoplasma* vaccine[J]. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2002, 2(3): 227-234.

[2] Coordinating Office of the National Survey on the Important Human Parasitic Diseases. A national survey on current status of the important parasitic diseases in human population[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2005, 23(5): 332-340. (in Chinese)  
(全国人体重要寄生虫病现状调查报告办公室. 全国人体重要寄生虫病现状调查报告[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2005, 23(5): 332-340.)

[3] Kasper L, Courret N, Darche S, et al. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity[J]. *Int J Parasitol*, 2004, 34(3): 401-409.

[4] Courret N, Darche S, Sonigo P, et al. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain[J]. *Blood*, 2006, 107(1): 309-316.

[5] Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, et al. Dendritic cells ex-

press tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(4): 361-367.

[6] Hopkins SA, Niedergang F, Corthesy-Theulaz IE, et al. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells[J]. *Cell Microbiol*, 2000, 2(1): 59-68.

[7] Pron B, Boumaila C, Jaubert F, et al. Dendritic cells are early cellular targets of listeria monocytogenes after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host[J]. *Cell Microbiol*, 2001, 3(5): 331-340.

[8] Rodríguez-Serrano F, Marchal JA, Ríos A, et al. Exogenous nucleosides modulate proliferation of rat intestinal epithelial IEC-6 cells[J]. *J Nutr*, 2007, 137(4): 879-884.

[9] Li LW, Shao ZX, Yan J. Comparative study on the invasion of *Toxoplasma gondii* to different kinds of cell lines *in vitro*[J]. *Chin J Zoonoses*, 2006, 22(7): 597-600. (in Chinese)  
(李立伟, 邵浙新, 严杰. 刚地弓形虫对 HUVEC、Vero 和 J774A.1、THP-1 入侵的比较研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22(7): 597-600.)

[10] Ma XM, Meng XL, Yin GR, et al. Dynamic observation on attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* tachyzoites into murine intestinal mucosa by RNA *in situ* hybridization[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2008, 26(4): 272-276. (in Chinese)  
(马晓明, 孟晓丽, 殷国荣, 等. RNA 原位杂交法动态观察弓形虫速殖子在小鼠小肠黏膜的粘附及入侵[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2008, 26(4): 272-276.)

[11] Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell[J]. *J Cell Sci*, 1995, 108(6): 2457-2464.

[12] Carruthers VB, Håkansson S, Giddings OK, et al. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(7): 4005-4011.

[13] Jones TC, Yeh S, Hirsch JG. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite[J]. *J Exp Med*, 1972, 136(5): 1157-1172.

[14] Ji H. An observation on the asexual reproduction of *Toxoplasma gondii* in tissue culture[J]. *Sci Agri Sin*, 1980, 13(4): 75-78. (in Chinese)  
(计浩. 弓形体在细胞核内外无性繁殖的研究[J]. *中国农业科学*, 1980, 13(4): 75-78.)

[15] Shu HP, Jiang LP, Wu X, et al. Observation on the morphology of the intracellular and extracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites[J]. *Chin Trop Med*, 2002, 2(3): 301-302. (in Chinese)  
(舒衡平, 蒋立平, 吴翔, 等. 细胞内外弓形虫速殖子的形态观察[J]. *中国热带医学*, 2002, 2(3): 301-302.)

(收稿日期: 2008-05-14 编辑: 富秀兰)

**感谢寄生虫病科研、防治、教学工作者  
多年来对本刊的大力支持！欢迎继续投稿！**