

# 刚地弓形虫感染致 Th1/Th2 细胞因子变化对大鼠生精细胞的影响

杨瑞\* 夏婵 杜联峰 金明哲

**【摘要】** 目的 研究弓形虫感染后雄性大鼠 Th1、Th2 细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-4 及一氧化氮(NO)水平的变化,探讨其对雄性睾丸生精细胞损伤的影响。方法 选用 9~10 周龄雄性 SD 大鼠 132 只,按随机数字表法分为 3 组:正常对照组、低剂量感染组( $1 \times 10^2$  个速殖子)、高剂量感染组( $1 \times 10^4$  个速殖子),感染后第 0、3、6、9、……30 天,感染组和对照组分别取 4 只大鼠,检测大鼠血清 IFN- $\gamma$ 、IL-4 及 NO 的水平,并且做睾丸的病理学检查和精子计数。结果 弓形虫感染组大鼠血清 IFN- $\gamma$  显著升高,低剂量组及高剂量组在第 6 天达峰值,分别为( $286.3 \pm 45.3$ ) pg/ml 和( $506.6 \pm 34.3$ ) pg/ml;血清 NO 亦显著升高,高剂量组第 9 天达峰值( $77.7 \pm 7.0$ )  $\mu\text{mol/L}$ ,低剂量组第 12 天达峰值( $59.5 \pm 5.3$ )  $\mu\text{mol/L}$ ,之后均迅速降低;感染组大鼠血清 IL-4 逐渐升高,低剂量组及高剂量组于第 15 天达峰值( $233.3 \pm 36.9$ ) pg/ml、( $366.7 \pm 52.4$ ) pg/ml 后逐渐降低。以上指标至实验末期均未恢复正常水平。病理检查显示,正常对照组大鼠生精小管层次清晰,细胞丰富,精子计数为  $175.7 \pm 23.7$ ,感染组大鼠生精小管层次混乱,精母细胞、精子细胞明显减少,低剂量组及高剂量组至第 15 天达谷值  $84.5 \pm 23.5$ 、 $47.3 \pm 14.7$ ,至实验末期无明显恢复。结论 弓形虫感染导致的早期 Th1 细胞因子 IFN- $\gamma$  极化及 NO 显著升高,随后引起 Th2 细胞因子 IL-4 反应性增高,并介导以精母细胞为主的生精细胞损伤及生精障碍。

**【关键词】** 刚地弓形虫;Th1/Th2;一氧化氮;生精细胞

## Effect of Th1/Th2 cytokines fluctuation on spermatogenic cells caused by *Toxoplasma gondii* infection

YANG Rui\*, XIA Qiang, DU Lian-feng, JIN Ming-zhe. Zhuhai Campus of Zunyi Medical College, Guizhou Province Immunology Graduate Education Innovation Base, Zhuhai 519041, China

\* Corresponding author; YANG Rui, Email: raying1980@sina.com

Supported by Zunyi Medical College Scientific Research Foundation(F-345)

**【Abstract】** **Objective** To study the effect of fluctuation of Th1, Th2 cytokines IFN- $\gamma$ , IL-4 and nitric oxide on spermatogenic cells in male rats after *Toxoplasma* infection. **Methods** 132 male SD-rats(9-10 week) were randomly divided into three groups; negative control group, low dose infection group( $1 \times 10^2$  tachyzoites) and high dose infection group ( $1 \times 10^4$  tachyzoites). Four rats of control group and infection groups were excuted on the 0, 3, 6, 9, . . . and 30 day after infection, then the levels of serum IFN- $\gamma$ , IL-4, NO were detected, the pathology of spermatogenic cells examined and sperms counted. **Results** IFN- $\gamma$  in serum increased significantly in infection groups, low dose infection group and high dose infection group reaching the peak on 6 d, respectively ( $286.3 \pm 45.3$ ) pg/ml and ( $506.6 \pm 34.3$ ) pg/ml; NO in serum increased significantly too, high dose group on 9 d( $77.7 \pm 7.0$ )  $\mu\text{mol/L}$  while low dose group got to peak on 12 d( $59.5 \pm 5.3$ )  $\mu\text{mol/L}$ , then both decreased rapidly. IL-4 in serum of infection groups rats increased gradully, low dose group( $233.3 \pm 36.9$ ) pg/ml and high dose group( $366.7 \pm 52.4$ ) pg/ml reaching the peak on 15 d and then deceased. However, the levels of above cytokines did not return to normal till the termination of experiment. Pathological examination showed clear seminiferous tubules layers and rich cells in normal control group rats with sperm counted  $175.7 + 23.7$ , while in infection group rats' seminiferous tubules layers were in disorder and spermatocytes, spermatids reduced significantly, which counted as low dose group ( $84.5 + 23.5$ ) and high dose group ( $47.3 + 14.7$ ) to valley value on 15 d. Those changes did not recover at the end of the experiment. **Conclusion** *Toxoplasma gondii* infection led to Th1 cytokines IFN- $\gamma$  polarization and NO increasing in early stage, followed by Th2 cytokine IL-4 increasing reactively. As a result, spermatogenic cells mainly spermatocytes were

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2012.04.002

基金项目:遵义医学院科研启动基金(F-345)

作者单位:519041 珠海,遵义医学院珠海校区,贵州省免疫学研究生教育创新基地

\* 通信作者:杨瑞,Email: raying1980@sina.com

damaged and spermatogenesis impaired.

**【Key words】** *Toxoplasma gondii*; Th1/Th2; Nitric oxide; Spermatogenic cells

弓形虫作为一种重要的专性细胞内寄生原虫,能侵入多种脏器甚至免疫豁免区域(如神经系统、眼睛等)引起疾病<sup>[1]</sup>。Terpsidis 等<sup>[2]</sup>研究发现弓形虫感染大鼠后同样能损伤雄性生殖系统,导致大鼠的精子减少、畸形率增加。周永华等<sup>[3]</sup>的调查也表明男性不育者的弓形虫感染率明显高于正常人群。弓形虫对男性生殖健康的损害已经日渐引起人们的关注,但确切的损伤机制目前仍不完全明确。弓形虫侵入人体后引起复杂的免疫应答,刺激 CD4<sup>+</sup>T 细胞分化为 Th1、Th2 两个细胞亚群<sup>[4]</sup>。Th1 细胞产生白细胞介素-2(IL-2)、 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )等细胞因子, Th2 细胞产生 IL-4、IL-10 等细胞因子,正常情况下两种因子维持免疫平衡。因此本研究主要通过细胞因子的变化和生精细胞损伤的观察,探讨弓形虫感染后睾丸免疫微环境的改变和生精细胞损伤的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

一氧化氮(NO)试剂盒, IFN- $\gamma$ 、IL-4 ELISA 检测试剂盒购于厦门慧嘉生物科技有限公司。

国际标准刚地弓形虫强毒株 RH 株,由液氮中取出后常规复苏,小鼠内连续转种 3 代后,取腹水用 0.25% 胰蛋白酶消化后进行速殖子计数。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组及处理

9~10 周龄 SD 雄性大鼠 132 只,按随机数字表法分为 3 组(44 只/组)。正常对照组大鼠腹腔注射 0.01 mol/L PBS (pH 7.3);低剂量感染组大鼠腹腔注射纯化的弓形虫速殖子  $1 \times 10^2$  个,高剂量感染组大鼠腹腔注射  $1 \times 10^4$  个速殖子,注射体积均为 0.2 ml/只。于感染后第 0、3、6、9、12、……30 天取感染组和对照组大鼠各 4 只,腹腔麻醉后,颈动脉取血,450 × g 离心 10 min,取血清置 -20 °C 冰箱保存。

#### 1.2.2 细胞因子检测

血清 IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平的检测采用双抗体夹心 ELISA 法,按照试剂盒说明书操作,酶标仪测定

450 nm 波长的吸光度值( $A_{450}$ ),依据标准曲线计算出各样品的细胞因子含量。NO 检测采用硝酸还原酶法,酶标仪测定 540 nm 波长的吸光度值( $A_{540}$ ),依据标准曲线计算各样品的 NO 含量。

#### 1.2.3 病理学检测及精子计数

大鼠睾丸采用 4% 甲醛(NBF 液)预固定 18 h,再用 Bouin's 液(苦味酸饱和水溶液 75 ml,冰醋酸 5 ml,甲醛 25 ml)后固定 8 h,取出后以 70% 乙醇浸洗睾丸组织 3 次,每次 1 h,取出标本修整为 1 cm<sup>3</sup> 组织块并常规组织包埋、5  $\mu$ m 切片,最后进行苏木素伊红(HE)染色、光学显微镜观察。

取睾丸 HE 染色标本,在显微镜下把睾丸组织的横切面分成上、下、左、右、中央 5 个区,每个区抽取 3 个圆形生精小管计精子数,共计数 15 个生精小管内精子数量。

#### 1.2.4 统计方法

实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件处理,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IFN- $\gamma$ 、IL-4 的测定

正常对照组大鼠在整个实验期间血清 IFN- $\gamma$  稳定于  $(32.9 \pm 5.6)$  pg/ml, IL-4 稳定于  $(19.6 \pm 2.8)$  pg/ml;高剂量组大鼠血清 IFN- $\gamma$  在感染后显著升高,在第 6 天达到峰值  $(506.6 \pm 34.3)$  pg/ml,之后迅速降低并在第 12 天后维持相对稳定水平;高剂量组大鼠血清 IL-4 在感染后缓慢升高,在第 9 天后急剧升高并在第 15 天达峰值  $(366.7 \pm 44.2)$  pg/ml,在第 18 天迅速降低;低剂量组大鼠的细胞因子出现相似变化规律,在第 6 天达到峰值  $(286.3 \pm 45.3)$  pg/ml,之后迅速降低;血清 IL-4 在第 15 天达峰值  $(233.3 \pm 36.9)$  pg/ml,之后逐渐降低。对第 30 天三组大鼠血清 IFN- $\gamma$ 、IL-4 数据进行单因素方差分析,感染组与正常对照组相比差异均有统计学意义 ( $F = 44.654, P < 0.01; F = 34.77, P < 0.01$ ) (表 1)。

表 1 感染组大鼠血清中 IFN- $\gamma$ 、IL-4 水平( $\bar{x}$ , pg/ml)

Table 1 Serum level of IFN- $\gamma$  and IL-4 in rats of infection groups( $\bar{x}$ , pg/ml)

分组 Groups	样本数 <i>n</i>	感染后天数 Days after infection											
		0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d	24 d	27 d	30 d	
IFN- $\gamma$	对照组 Control group	4	32.7	35.6	26.5	21.4	38.9	36.8	34.6	35.8	37.7	29.1	36.6
	低剂量组 Low dose group	4	41.7	83.9	286.3	236.8	83.4	74.5	58.5	72.1	63.5	54.7	61.4 <sup>a</sup>
	高剂量组 High dose group	4	40.9	136.6	506.6	276.9	151.9	113.0	86.7	881.0	70.2	63.6	69.6 <sup>a</sup>
IL-4	对照组 Control group	4	19.6	15.3	23.5	18.4	20.8	21.8	17.4	18.5	25.4	17.8	21.9
	低剂量组 Low dose group	4	22.2	47.5	55.2	73.7	90.7	233.0	155.0	117.0	87.1	72.1	52.4 <sup>a</sup>
	高剂量组 High dose group	4	27.5	43.2	53.6	123.0	255.8	366.7	174.0	98.8	68.7	65.7	54.5 <sup>a</sup>

a: 正常对照组 IFN- $\gamma$  水平:  $32.9 \pm 5.6$ , IL-4 水平:  $19.6 \pm 2.8$ ; 与正常对照组相比,  $P < 0.01$

a: normal control group IFN- $\gamma$ :  $32.9 \pm 5.6$ , IL-4:  $19.6 \pm 2.8$ ; compared with normal control group,  $P < 0.01$

### 2.2 NO 的测定

正常组大鼠血清 NO 稳定于 ( $30.0 \pm 3.36$ )  $\mu\text{mol/L}$ ; 低剂量组大鼠血清 NO 水平升高, 在第 12 天达峰值 ( $59.5 \pm 5.3$ )  $\mu\text{mol/L}$ , 之后迅速降低, 21 天后保持稳定, 高剂量组大鼠血清 NO 水平变化相似, 只是在第 9 天达峰 ( $77.7 \pm 7.0$ )  $\mu\text{mol/L}$ , 在第 12 天后迅速降低。对第 30 天三组大鼠 NO 数据进行单因素方差分析, 感染组与正常对照组相比有统计学意义 ( $F = 13.484, P < 0.01$ ) (图 1)。

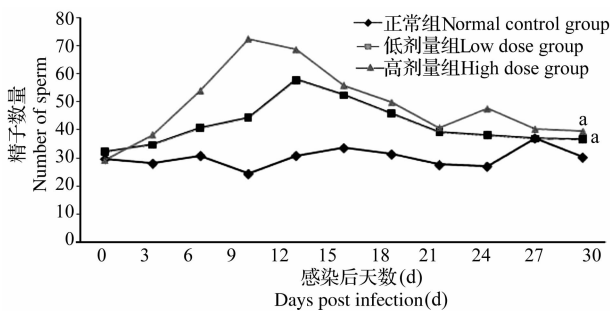


图 1 各实验组大鼠血清中 NO 水平的动态变化

a: 与正常对照组相比,  $P < 0.01$

Fig. 1 The dynamic change of serum NO in rats of each group

a: Compared with the normal control group,  $P < 0.01$

### 2.3 病理学检查

正常对照组大鼠睾丸生精小管上皮细胞层次丰富, 各级生精细胞排列规则紧密, 精原细胞规律的排列于基膜上, 从精原细胞至精子各阶段发育良好, 初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞数量多, 绝大部分管腔内有较多的精子 (图 2A)。低剂量感染组大鼠睾丸生精小管上皮细胞层次减少虽不明显, 但细胞层次混乱, 精原细胞与基膜距离增加, 精子散乱分布于从基膜至管腔的整个区域, 各

级生精细胞间隙明显, 初级精母细胞及管腔内精子明显减少 (图 2B)。高剂量组大鼠部分生精小管的生精细胞层次已经完全消失, 初级精母细胞、次级精母细胞明显减少甚至消失, 管腔内精子生成十分稀少, 并且有大量的脱落的各级生精细胞 (图 2C), 还有部分生精小管十分混乱, 管腔已经闭塞, 生精小管基膜也明显变薄 (图 2D)。两组感染组大鼠睾丸病理改变在实验末期并没有明显改善。

### 2.4 精子计数

正常对照组大鼠睾丸组织切片精子数量在实验期间保持稳定于  $175.7 \pm 23.7$  个; 低剂量组大鼠感染后精子数量逐渐降低, 在 15d 后保持稳定于  $84.5 \pm 23.5$  个; 高剂量组与低剂量组相比则降低更为迅速, 程度也更加明显, 在 9d 天后保持在  $50.2 \pm 16.7$  个。对第 30 天三组大鼠精子计数数据进行方差分析, 感染组与正常对照组相比有统计学意义 ( $F = 64.085, P < 0.01$ ) (图 3)。

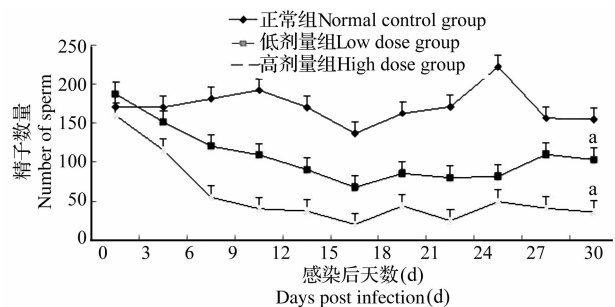


图 3 各组大鼠睾丸精子计数的动态变化

a: 与正常对照组相比,  $P < 0.01$

Fig. 3 The dynamic change of the sperm quantity in rat of each groups

a: Compared with normal control group,  $P < 0.01$

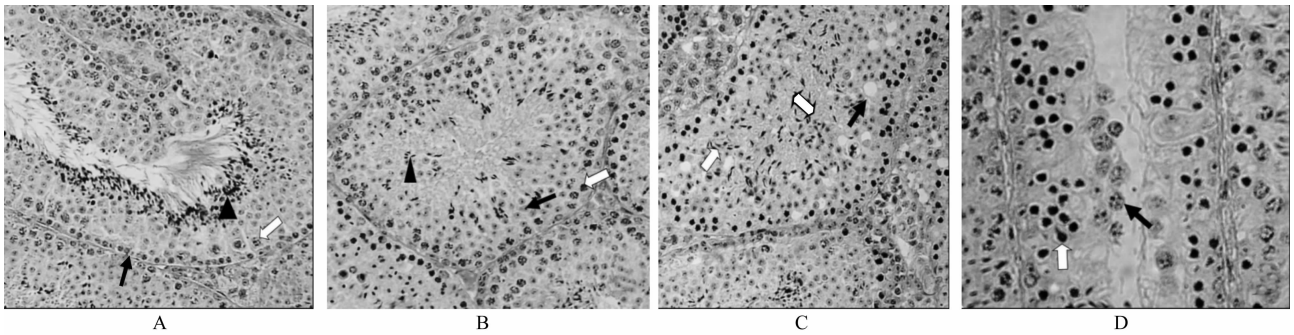


图 2 正常对照组和感染组大鼠睾丸 HE 染色图片

A: 对照组 (400 ×), ↑ 示紧贴基膜的精原细胞, ↗ 示初级精母细胞, ▲ 示近管腔的精子, B: 低剂量感染组 (感染后第 3 天, 400 ×), ↑ 示精子细胞, ↗ 示精母细胞, ▲ 示精子, C: 高感染组 (感染后第 6 天, 400 ×), ↑ 示脂肪空泡, ↗ 示混乱的精子, ↓ 示管腔闭塞, D: 高感染组大鼠睾丸组织图片 (感染后第 6 天, 600 ×), ↑ 示脱入管腔的初级精母细胞, ↗ 示脱离基膜的精原细胞

Fig. 2 HE staining pictures of rats testis from normal control and infection groups

A: normal control group (400 ×), ↑ indicating the spermatogonia close to the base membrane, ↗ indicating primary spermatocytes, ▲ indicating sperms near the lumen, B: low dose infection group (3 d post-infection, 400 ×), ↑ indicating spermatid, ↗ denotes spermatogonia, ▲ indicating sperms, C: high dose infection group (6 d post-infection, 400 ×), ↑ indicating fat vacuoles, ↗ indicating sperms disordered, ↓ indicating luminal occlusion, D: high dose infection group (6 d post-infection, 600 ×), ↑ indicating the primary spermatocytes off into the lumen, ↗ indicating the spermatogonia off the basement membrane

## 2 讨论

弓形虫感染可刺激 CD4<sup>+</sup> T 细胞分化为 Th1、Th2 两个亚群, Th1 细胞主要分泌 IFN-γ、IL-2、TNF-α 等细胞因子, 介导细胞免疫应答; Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6 等细胞因子, 辅助体液免疫应答。其中, IFN-γ 是机体抑制弓形虫生长的主要细胞因子, 但过量的 IFN-γ 可能导致免疫应答过度, 加重组织的炎症反应甚至导致组织坏死等。IL-4 对宿主抗弓形虫 RH 株感染具有重要的保护作用, 可抑制 IFN-γ 的生成从而抑制炎症损伤。多种免疫细胞及其细胞因子之间相互作用, 形成调节网络抵抗弓形虫感染。

Parker 等<sup>[5]</sup> 研究发现 IFN-γ 作为主要的抗弓形虫炎症性细胞因子, 可以激活 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞和刺激巨噬细胞分泌 NO, 本研究中弓形虫感染组大鼠的血清 IFN-γ、NO 水平在急性期急速升高的结果与其一致, IFN-γ 第 6 天达峰值, NO 在第 9 天达峰值, 同期 IL-4 水平虽也有保护性升高, 却不足以抵消早期 IFN-γ 的作用, 导致在感染早期 Th1/Th2 向 Th1 应答极化。Mordue、Gavrilescu 等<sup>[6-7]</sup> 研究也发现弓形虫 RH 强毒株可致宿主血清 Th1 细胞因子 (IFN-γ、TNF-α 等) 急剧升高, 并可造成肝脏、脾脏等器官的损伤, 而本研究早期 Th1 细胞因子的大量分泌, 亦可能作为始动因素造成大量生精细胞损伤, 出现病理

观察中的精子计数减少、生精小管结构混乱、精子减少甚至管腔内含大量脱落细胞的现象, 并且本研究还发现弓形虫感染引起的生精细胞以精母细胞为主, 可能与精母细胞复制分裂活跃、对致病因素较为敏感有关。感染组大鼠血清 IL-4 在第 9 天急速升高并在第 15 天达峰值, Th2 应答增强以拮抗 Th1 反应, 同时 IFN-γ 水平迅速降低, 使实验中后期以 Th2 细胞介导的免疫抑制为主, 以使机体存活并平安度过急性期。但 Roberts 等<sup>[8]</sup> 发现 IL-4、IL-10 等 Th2 细胞因子虽可抑制 IFN-γ 的水平, 增加宿主存活率, 但同时也促进慢性感染的形成, 因此本实验的第 30 天, 弓形虫感染组大鼠的血清 IFN-γ/IL-4 虽重新趋于平衡, 但依然明显高于正常对照组 IFN-γ、IL-4 的水平, NO 水平亦高于正常, 提示 Th2 应答造成的免疫抑制可能造成急性弓形虫感染慢性化, 进而造成在本实验末期细胞因子未能恢复正常, 睾丸病理损伤及精子数量亦无明显恢复。综上, 弓形虫感染早期为 Th1 细胞因子极化, 介导生精细胞的免疫损伤; 中后期为 Th2 细胞因子极化, 造成弓形虫慢性感染及生精细胞的慢性损伤, 损伤细胞均以精母细胞群为主。

鉴于睾丸属于免疫豁免区, 且其生精过程受一系列生殖激素 [促黄体生成素 (LH)、卵泡雌激素 (FSH)、睾酮 (T) 等] 的调控, 生精过程十分复杂。

Weissman<sup>[9]</sup> 研究发现 Leydig 细胞分泌睾酮的过程对 NO 十分敏感,而本研究中 NO 在急性期的急剧升高可能在局部影响睾酮的分泌,并且可与其他 Th1 细胞因子共同促使生精细胞凋亡或死亡。因此,细胞因子的异常对于睾丸的损伤可能涉及激素分泌、凋亡、自身免疫等多个方面,细胞因子极化在弓形虫致生精障碍中的作用机理以及对其他调节因素的影响还需进一步研究,为免疫干预治疗提供理论依据。

参 考 文 献

[1] Tardieux I, Menard R. Migration of apicomplexa across biological barriers; the *Toxoplasma* and *Plasmodium* rides[J]. Traffic, 2008, 9(5):627-635.

[2] Terpsidis KI, Papazahariadou MG, Taitzoglou IA. *Toxoplasma gondii*: reproductive parameters in experimentally infected male rats [J]. Exp Parasitol, 2009, 121(3):238-241.

[3] 周永华, 陆永娟, 王瑞兵, 等. 苏州市农村不孕症夫妇弓形虫感染调查中[J]. 中华男科学杂志, 2002, 8(5):350-352.

[4] Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease[J]. Altern Med Rev, 2003, 8(3):223-246.

[5] Parker SJ, Rorberts CW, Alexander J. CD8<sup>+</sup> T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice[J]. Clin Exp Immunol, 1991, 84(2):207-212.

[6] Mordue DG, Monroy F, LaRegina M, et al. Acute *toxoplasmosis* leads to lethal overproduction of Th1 cytokines[J]. J Immunol, 2001, 167(8):4574-4584.

[7] Gavrilescu LC, Denkers EY. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection[J]. J Immunol, 2001, 167(2):902-909.

[8] Roberts CW, Ferguson DJ, Jebbari H, et al. Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection[J]. Infect Immun, 1996, 64(3):897-904.

[9] Weissman BA, Niu E, Ge R, et al. Paracrine modulation of androgen synthesis in rat leydig cells by nitric oxide[J]. J Androl, 2005, 26(3):369-378.

(收稿日期:2012-03-08)

(本文编辑:卢延鑫,陈勤)

· 消息 ·

关于中华医学会系列杂志投稿网址的声明

为维护广大读者和作者的权益以及中华医学会系列杂志的声誉,防止非法网站假冒我方网站诱导作者投稿、并通过骗取相关费用非法获利,现将中华医学系列杂志稿件管理系统网址公布如下,请广大作者加以甄别。

1. “稿件远程管理系统”网址

中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>)首页的“业务中心”栏目、中华医学会杂志社网站(<http://www.medline.org.cn>)首页的“稿件远程管理系统”以及各中华医学会系列杂志官方网站接受投稿。作者可随时查阅到稿件处理情况。

2. 编辑部信息获取

登录中华医学会杂志社网站(<http://www.medline.org.cn>)首页,在《中华医学会系列杂志一览表》中可查阅系列杂志名称、编辑部地址、联系电话等信息。

3. 费用支付

中华医学会系列杂志视杂志具体情况,按照有关规定,酌情收取稿件处理费和版面费。稿件处理费作者在投稿时支付;版面费为该稿件通过专家审稿并决定刊用后才收取。

欢迎投稿,并与编辑部联系。

特此声明。

中华医学会杂志社

2012 年 5 月