

文章编号: 1000-7423(2014)-03-0225-04

【论著】

# 隐孢子虫感染昆明小鼠后肠道病理变化及螺旋霉素治疗效果

王东<sup>1\*</sup>, 张媛媛<sup>2</sup>

**【摘要】** 目的 观察隐孢子虫感染小鼠后的症状、病程和治疗后改善情况, 为隐孢子虫病的临床研究提供依据。方法 昆明小鼠 70 只随机分为 4 组, A 组 (10 只) 为健康对照组, 实验组 (B、C 和 D 组, 每组 20 只) 小鼠分别在其饮水中加入地塞米松 5.0、7.5 和 10.0 mg/L, 连续 2 周, 制备隐孢子虫感染小鼠模型。免疫抑制后每天观察小鼠的症状, 粪检计数隐孢子虫卵囊。2 周后处死各组 50% 小鼠, 取小鼠肠黏膜观察隐孢子虫的寄生部位, 镜下观察病理变化并测定肠黏膜分泌型免疫球蛋白 A (sIgA) 水平。剩余小鼠停用免疫抑制剂 2 周后, 粪检阳性的小鼠随机分为治疗组 (6 只) 和对照组 (7 只), 治疗组给与螺旋霉素 2 mg/d (溶于 1 ml 生理盐水中) 灌胃治疗, 连续 10 d, 观察小鼠治疗后表现并计数卵囊排出量的变化, 对照组灌胃等量生理盐水。结果 各实验组小鼠免疫抑制第 6 天粪检隐孢子虫卵囊呈阳性, B 组和 D 组小鼠的每克粪虫卵数分别于第 10 d (31.9±2.4) 和第 12 天 (70.3±4.0) 达高峰, 两组之间卵囊排出数量差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 各实验组均有小鼠出现明显的消化道症状。该虫主要寄生在小肠上段 (27/54 只)。病理结果显示, D 组病变较重, 肠黏膜充血、水肿, 伴局灶性出血; B 和 C 组仅见少量炎细胞浸润。各实验组肠黏膜肠液 sIgA 含量均下降, D 组 [(2.7±0.6)  $\mu\text{g/ml}$ ]、C 组 [(3.2±0.8)  $\mu\text{g/ml}$ ]、B 组 [(4.9±1.3)  $\mu\text{g/ml}$ ] 与 A 组 [(6.1±1.2)  $\mu\text{g/ml}$ ] 之间差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。免疫抑制剂停止应用后, 小鼠腹泻、稀便等症状减轻 56.7% (17/30 只)。免疫抑制剂停用 2 周后, 粪检阳性的小鼠经螺旋霉素治疗后症状改善, 治疗组 (0) 和对照组 (11.3±8.1) 小鼠卵囊排出数量差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。结论 隐孢子虫感染小鼠卵囊排出数量、持续时间和对肠黏膜的损伤程度与免疫状态密切相关, 螺旋霉素治疗有效。

**【关键词】** 隐孢子虫; 小鼠; 病理变化; 治疗

中图分类号: R382.9 文献标识码: A

## Intestinal Pathological Changes of Kunming Mice Infected by *Cryptosporidium* and the Therapeutic Efficacy of Spiramycin on Infected Mice

WANG Dong<sup>1\*</sup>, ZHANG Yuan-yuan<sup>2</sup>

(1 Department of Pathogen Biology and Immunology, Henan Medical College, Zhengzhou 451191, China; 2 The Fourth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450044, China)

**【Abstract】** **Objective** To observe the symptom, disease course of *Cryptosporidium*-infected mice, and the therapeutic effect of spiramycin on infected mice. **Methods** Seventy Kunming mice were randomly divided into normal control group (A,  $n=10$ ) and 3 experimental groups (B, C, and D). Mice in groups B, C, and D ( $n=20$ ) were immunosuppressed with 5, 7.5, and 10 mg/L dexamethasone in drinking water for two weeks, respectively. The mice were observed and the number of oocysts in fecal sample was counted daily after immunosuppression. Two weeks post immunosuppression, 50% of mice in each group were sacrificed, and small intestine was removed for observation of parasitic site. The pathological changes of mucous membrane were observed under microscope, and sIgA level in intestinal fluid was determined. Immunosuppression was withdrawn in the rest mice, and after two weeks unrecovered mice were divided into treatment group ( $n=6$ ) and control group ( $n=7$ ). Mice in treatment group were each given 2 mg/d spiramycin for 10 d. Each mouse in control group was given same amount of normal saline. The mice were observed and the oocysts shedding in fecal pellets were counted after treatment. **Results** On the 6th day post immunosuppression, *Cryptosporidium* sp. positive fecal samples were found in the experimental groups. The number of oocysts per gram of feces in groups D (70.3±4.0) and B (31.9±2.4) reached a peak on the 12th day and 10th day post immunosuppression, respectively ( $P<$

作者单位: 1 河南医学高等专科学校, 郑州 451191; 2 郑州大学第四附属医院, 郑州 450044

\* 通讯作者, E-mail: wangyininggoal@163.com

0.05). The conspicuous enteron symptom was observed in each experimental group. *Cryptosporidium* parasitized mainly in upper jejunum. Pathological examination of intestinal mucous membrane showed that swollen mucous membrane and hemorrhages were observed in group D, and less inflammatory cell occurred in groups B and C. sIgA level in intestinal fluid of experiment mice descended, there was a statistical significance between groups D [(2.7±0.6) μg/ml], C [(3.2±0.8) μg/ml], B [(4.9±1.3) μg/ml] and A [(6.1±1.2) μg/ml] ( $P<0.05$ ). After withdrawal of immunosuppression, out of 30 positive mice, symptoms including diarrhea and loose stools improved in 17 mice. After treated with spiramycin, status of the mice got improved, and there was statistical significance in the level of oocyst shedding between treatment group (0) and control group (11.3±8.1) ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The level of oocyst shedding, disease course, and pathological change of intestinal mucosa membrane are closely related to immune status of *Cryptosporidium*-infected mice. Spiramycin is effective in treating of *Cryptosporidium* infection.

**[Key words]** *Cryptosporidium*; Mouse; Pathology; Therapy

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

隐孢子虫 (*Cryptosporidium*) 是一种重要的引起人和动物腹泻的机会致病性原虫<sup>[1]</sup>。人对该虫普遍易感, 在婴幼儿、老年人和免疫功能低下者感染发病率较高, 尤其是艾滋病患者更易感<sup>[2]</sup>。隐孢子虫病为人兽共患寄生虫病, 主要表现为腹痛、急性腹泻或黏液便, 严重者可发生水样腹泻、发热等全身表现。在免疫力低下人群除引起严重的消化道症状外, 还可并发肠外感染, 是艾滋病患者的主要致死原因<sup>[1,3]</sup>。隐孢子虫病的发病机制, 因该虫独特的生活史特性, 目前尚不明确。该病治疗也尚无特效药物和疫苗预防, 以对症治疗为主<sup>[4,5]</sup>。本实验拟通过观察隐孢子虫感染小鼠发病过程和治疗情况, 旨在为该病的临床研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 昆明小鼠70只, 6周龄, 雌雄各半, 体重(16±2) g, 购自河南省实验动物中心, 实验前连续3 d粪检, 排除隐孢子虫感染。

1.1.2 主要试剂和仪器 地塞米松片(批号为20100607)购自河南前锋药业科技有限公司, 螺旋霉素片(批号为20101126)购自昆明制药集团股份有限公司, 小鼠分泌型免疫球蛋白A (sIgA) 检测试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司。高速台式离心机(TGL-16B型)为上海安亭科学仪器厂产品, 自动多功能酶标仪(SUNRISE型)为瑞士TECAN公司产品, 电子天平(DT-500型)为北京医用天平厂产品。

### 1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 70只昆明小鼠随机分为4组, A组(10只)为健康对照组, 实验组(B、C、D组, 每组20只)小鼠饮水中分别加入地塞米松5.0 mg/L、7.5 mg/L和10.0 mg/L, 连续2周, 制备隐孢子虫感染小

鼠模型。

1.2.2 粪检计数隐孢子虫卵囊 免疫抑制后每天收集各实验组小鼠粪便, 经滤网过滤后除去杂质, 采用不连续蔗糖密度梯度离心法收集卵囊, 吸取10 μl卵囊液金胺酚-改良抗酸染色后镜下(×400)计数, 计算小鼠粪便卵囊数量。每克粪便中卵囊的数量=[(5个视野的卵囊数量/10 μl) × 卵囊液体积(μl)] / 粪便重量(g)。

1.2.3 肠腔内环境检测 免疫抑制后2周随机剖杀各组50%小鼠, 取小肠上、中、下各段肠腔内黏膜刮取物, 镜下观察隐孢子虫的寄生部位。取病变较重的小肠上段肠黏膜经HE染色后进行病理观察, 同时取空肠近端肠管4 cm, 加入PBS缓冲液(PH7.4)反复洗涤, 收集洗涤液, 2 500 ×g离心15 min。收集上清液检测, 应用小鼠分泌型免疫球蛋白A (sIgA) 试剂盒检测sIgA水平。

1.2.4 病程观察及治疗 剩余小鼠继续观察病程, 停止免疫抑制后2周粪检阳性的小鼠随机分为治疗组(6只)和对照组(7只), 治疗组给予螺旋霉素2 mg/d(溶于1 ml生理盐水)灌胃治疗, 连续10 d, 观察小鼠治疗后表现, 并计数卵囊排出数量的变化, 对照组灌胃等量生理盐水。

1.3 统计学分析 采用SPSS 15.0进行统计学分析, 实验数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用 $\chi^2$ 检验。检验水平为 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

2.1 感染后小鼠表现 免疫抑制后各实验组部分小鼠出现进食和饮水量减少、反应迟钝, 有不同程度的消化道症状, 包括腹泻、稀便, 部分小鼠出现黏液脓血便。特别是D组小鼠出现嗜睡, 背部体毛无光泽、脱落、减少, 第10天死亡2只。各组出现明显症状的

小鼠数, D组 (18只) 多于B组 (8只) ( $P<0.05$ ), B组和A组 (0只) 之间差异也具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。各实验组小鼠免疫抑制后第6天粪检隐孢子虫卵囊呈阳性, 并维持在较高水平, B组和D组小鼠EPG分别于第10天 ( $31.9\pm 2.4$ ) 和第12天 ( $70.3\pm 4.0$ ) 达高峰, D组小鼠卵囊排出数量高于B和C组 ( $P<0.05$ ) (表1)。

表1 免疫抑制后隐孢子虫卵囊排出量的变化 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Changes of the number of oocysts shedding following immunosuppression induced by dexamethasone ( $\bar{x}\pm s$ )

组别 Group	免疫抑制不同时间卵囊排出量 Number of oocysts shedding by time				
	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d
A	0	0	0	0	0
B	$24.2\pm 5.1$	$28.9\pm 5.8$	$31.9\pm 2.4$	$27.8\pm 4.4$	$24.6\pm 1.5$
C	$39.7\pm 1.4$	$45.4\pm 2.4$	$56.7\pm 7.6$	$50.5\pm 1.3$	$47.8\pm 2.0$
D*	$52.7\pm 3.6$	$56.1\pm 4.7$	$60.1\pm 3.5$	$70.3\pm 4.0$	$66.8\pm 4.2$

注: 与B组比较, \*  $P<0.05$ 。Note: vs. group B, \*  $P<0.05$ 。

2.2 肠腔内环境变化 剖杀小鼠后, 观察虫体在小肠的寄生部位, 上段 (27只) 与中 (15只)、下段 (12只) 寄生的小鼠数量之间差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。肠黏膜病理结果显示, D组小鼠肠黏膜充血、水肿, 伴局灶性出血, 微绒毛数量减少, 固有层腺体排列紊乱 (图1A); B和C组小鼠肠黏膜完整, 仅见少量炎症细胞浸润 (图1B)。

肠液sIgA水平检测结果显示, D组小鼠sIgA含量下降明显 [ $(2.7\pm 0.6) \mu\text{g/ml}$ ], 与B组 [ $(4.9\pm 1.3) \mu\text{g/ml}$ ] 间差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), B组和A组 [ $(6.1\pm 1.2) \mu\text{g/ml}$ ] 间差异也有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (表2)。

2.3 小鼠病程的观察 剩余各实验组小鼠随着免疫抑制剂的停用, 除D组外症状逐渐好转, 活动力增

表2 小鼠肠液sIgA水平和隐孢子虫在小肠不同部位寄生的鼠数 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 sIgA level in intestinal fluid and the number of mice infected with *Cryptosporidium* in different sites of small intestine ( $\bar{x}\pm s$ )

组别 Group	sIgA $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	隐孢子虫在小肠不同部位寄生的鼠数 Number of mice infected with <i>Cryptosporidium</i> in different sites of small intestine		
		上段 Upper section	中段 Middle section	下段 Lower section
		A	$6.1\pm 1.2$	0
B*	$4.9\pm 1.3$	9	6	3
C*	$3.2\pm 0.8$	8	5	4
D**	$2.7\pm 0.6$	10	4	5

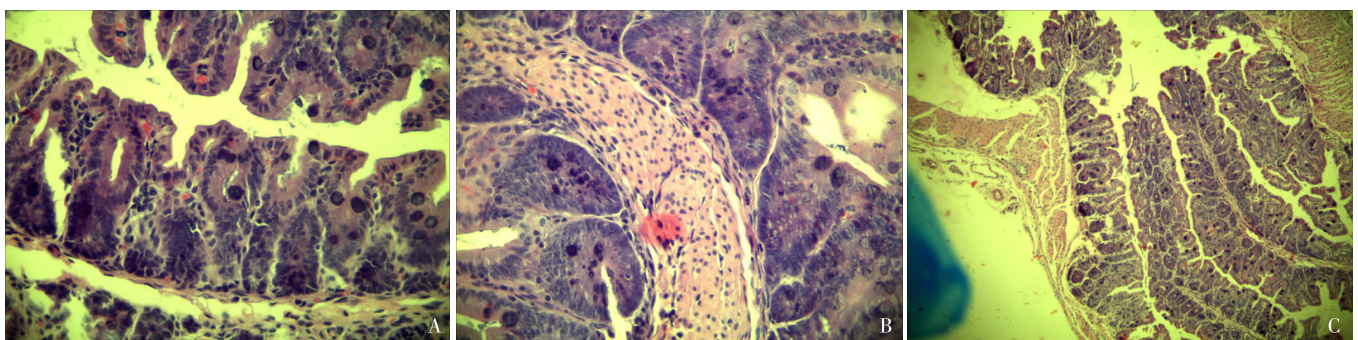
注: 与A组比较, \*  $P<0.05$ ; 与B组比较, #  $P<0.05$ 。

Note: vs. group A, \*  $P<0.05$ ; vs. group B, #  $P<0.05$ 。

强, 消化道症状减轻56.7% (17/30只)。粪检显示随着免疫抑制剂停用时间的延长, 各实验组小鼠卵囊排出数量逐渐下降 ( $P<0.05$ ) (表3)。小鼠经螺旋霉素连续治疗10 d后症状改善, 粪检隐孢子虫卵囊计数显示治疗组小鼠卵囊排出数量逐渐下降, 与对照组比较差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (表4)。

### 3 讨论

隐孢子虫病的病程与宿主免疫力和营养状况密切相关, 不同人群感染隐孢子虫后病程表现差异很大, 在免疫力正常人群中症状较轻, 为一种自限性疾病<sup>[6]</sup>。在免疫力低下人群, 如艾滋病患者等, 则表现为严重的消化道症状, 甚至并发肠外感染<sup>[7,8]</sup>, 但未见从不同免疫抑制程度解释患者出现不同症状的报道, 本实验中小鼠处于不同程度免疫抑制状态, 结果显示随着免疫抑制剂的停用, 低免疫抑制组小鼠症状逐步改善、卵囊排出数量减少, 而高免疫抑制组小鼠症状较重, 卵囊排出数量维持在较高水平, 这与高免



A: D组, 肠黏膜充血、水肿, 伴局灶性出血; B: B组和C组, 少量炎症细胞浸润; C: A组, 健康对照组小鼠肠黏膜。

A: Group D, swollen mucous membrane and small hemorrhages; B: Group B and C, less inflammatory cell infiltration; C: Group A, intestinal mucosa of normal control mice.

图1 隐孢子虫感染小鼠肠黏膜病理变化(HE染色,  $\times 400$ )

Fig.1 Pathological changes of intestinal mucosa in mouse infected with *Cryptosporidium* (HE staining,  $\times 400$ )



表3 停止免疫抑制后小鼠隐孢子虫卵囊排出量的变化 ( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 3 Changes of the number of oocysts shedding after withdrawal of immunosuppression ( $\bar{x}\pm s$ )

组别 Group	停止免疫抑制后不同时间卵囊排出量 Number of oocysts shedding after withdrawal of immunosuppression						
	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d
A	0	0	0	0	0	0	0
B*	21.8±3.9	17.9±1.0	12.1±4.3	9.3±4.0	10.8±2.4	7.5±3.0	4.1±2.8
C*	29.6±5.7	28.4±0.6	19.3±2.5	21.8±2.3	16.2±2.1	11.2±4.8	5.7±4.8
D*	58.2±6.4	44.7±2.1	29.9±1.6	32.1±2.4	25.7±8.1	22.3±5.1	16.1±6.2

注：与对照组比较，\*  $P<0.05$ 。Note: vs. control, \*  $P<0.05$ 。

表4 螺旋霉素治疗后小鼠卵囊排出数量的变化 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 4 Changes of the number of oocysts in mouse infected with *Cryptosporidium* after spiramycin treatment ( $\bar{x}\pm s$ )

组别 Group	治疗不同时间卵囊排出量 Number of oocysts shedding by treatment time					
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	10 d
治疗组 Treat- ment	15.9±4.5	13.3±3.8	8.3±9.5	4.1±7.3	1.3±3.3	0
对照组 Control*	15.1±3.4	14.6±2.1	13.7±4.3	12.4±7.6	12.8±5.0	11.3±8.1

注：与治疗组比较，\*  $P<0.05$ 。Note: vs. treatment group, \*  $P<0.05$ 。

疫抑制组和低免疫抑制组小鼠肠黏膜病变程度相关。病理结果显示高免疫抑制组小鼠肠黏膜充血、水肿，伴局灶性出血，微绒毛数量减少，固有层腺体排列紊乱，而低免疫抑制组小鼠肠黏膜完整，仅见少量炎细胞浸润。

隐孢子虫的致病机制与多种因素相关，该虫主要寄生在小肠上皮细胞内，分泌的蛋白水解酶和磷脂酶等导致肠黏膜的屏障结构减弱<sup>[9]</sup>。机体的免疫力减弱特别是肠黏膜的局部防御能力下降是患者出现消化道症状的主要原因<sup>[10]</sup>。高免疫抑制组小鼠较低免疫抑制组小鼠症状重，卵囊排出数量多，小鼠肠黏膜sIgA测定显示，高免疫抑制组小鼠较低免疫抑制组和健康对照组小鼠下降明显。提示sIgA在肠黏膜的局部防御能力起着重要作用。sIgA为分泌型抗体，主要存在于黏膜黏液层中，通过中和作用防止病原体的感染。有研究表明，在已治愈隐孢子虫感染的HIV阳性个体的唾液中，sIgA抗体滴度较艾滋病和隐孢子虫病患者明显

增高<sup>[11]</sup>，提示肠黏液中sIgA可促进隐孢子虫患者的康复。

螺旋霉素为大环内酯类抗生素，通过抑制蛋白质的合成而发挥作用，其治疗隐孢子虫病临床效果报道不一<sup>[12]</sup>。本实验应用螺旋霉素连续治疗10 d后，小鼠症状缓解、卵囊排出数量逐渐下降，从而缩短病程。

综上所述，隐孢子虫病病程与免疫抑制状态密切相关，低免疫抑制小鼠病程具有自限性，与高免疫抑制小鼠比较，在卵囊排出数量、持续时间和对肠黏膜的损伤方面具有明显差异，该虫可导致小鼠肠黏膜局部防御能力下降，螺旋霉素治疗有效。

参 考 文 献

[ 1 ] Ungar BL, Burris JA, Quinn CA, et al. New mouse models for chronic *Cryptosporidium* infection in immunodeficient hosts [J]. Infect Immun, 1990, 58(4): 961-969.  
[ 2 ] 王东, 张媛媛. 隐孢子虫对不同免疫状态小鼠肠黏膜超微结构的损伤[J]. 现代预防医学杂志, 2013, 40(15): 2889-2991.  
[ 3 ] Rehg JE. Activity of azithromycin against cryptosporidia in immunosuppressed rats[J]. J Infect Dis, 1991, 163(6): 1293-1296.  
[ 4 ] Kimata I. Chemotherapeutic effect of azithromycin and lasalocid on *Cryptosporidium* infection in mice [J]. J Protozool, 1991, 38 (6): 232.  
[ 5 ] 王东, 张媛媛. 大蒜素和阿奇霉素治疗隐孢子虫感染小鼠的效果观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 31(6): 81-83.  
[ 6 ] Cama V, Gilman RH, Vivar A, et al. Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(6): 1025-1028.  
[ 7 ] Tian LG, Wang TP, Chen JX, et al. Co-infection of HIV and parasites in China: Results from an epidemiological survey in rural areas of Fuyang City, Anhui Province, China [J]. Front Med Chin, 2010, 4(2): 192-198.  
[ 8 ] Pinlaor S, Mootsikapun P, Pinlaor P, et al. Detection of opportunistic and non-opportunistic intestinal parasites and liver flukes in HIV-positive and HIV-negative subjects [J]. Southeast Asian J Trop Med Pub Health, 2005, 36(4): 841-845.  
[ 9 ] 陈玉凤, 秦元华, 郑莉莉, 等. 补骨脂和双氢青蒿素合剂治疗小鼠隐孢子虫病的实验研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(1): 67-69.  
[ 10 ] 汲蕊, 崔巍, 梁瑞文, 等. 苦参合剂对隐孢子虫感染小鼠空肠黏膜肥大细胞的影响 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2013, 25(3): 280-283.  
[ 11 ] 郑士荣. 地黄合剂对免疫抑制小鼠T细胞亚群及白介素-2的调节作用[J]. 中医研究, 1993, (5): 57.  
[ 12 ] Tzipori S, Widmer G. A hundred year retrospective on cryptosporidiosis[J]. Trend Parasitol, 2008, 24(4): 184-189.

(收稿日期: 2013-12-13 编辑: 衣凤芸)