

DOI:10.13350/j.cjpb.220209

• 论著 •

# 香菇多糖预处理对急性弓形虫感染小鼠中枢神经系统损伤的保护性作用研究<sup>\*</sup>

陈莹莹<sup>1</sup>, 管益涛<sup>1\*\*</sup>, 王霞<sup>2</sup>, 聂清<sup>1</sup>, 刘海涛<sup>2</sup>

(1. 潍坊市疾病预防控制中心, 山东潍坊 201061; 2. 陆军第八十集团军医院)

**【摘要】** **目的** 探究香菇多糖预处理对急性弓形虫感染小鼠脑中中枢神经系统的保护性作用。 **方法** 将 C57BL/6 小鼠随机分为对照组(NC)、模型组(TDI)和香菇多糖预处理组(pre-10d LNT TDI)。弓形虫感染前 10 d, pre-10d LNT 组小鼠连续 10 d 腹腔注射 LNT(1 mg/kg 体重, 1 次/d), 弓形虫感染后无任何处理; TDI 组小鼠腹腔注射弓形虫悬液 0.5 mL/只鼠; NC 组小鼠感染前 10 d 开始腹腔注射同等体积的生理盐水(1 次/d)。通过观察小鼠的死亡时间及数量计算各组小鼠的存活率, 使用流式细胞仪检测感染后第 8 d 小鼠脑组织中 CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T 细胞百分比, ELISA 法检测感染后第 4 d 和第 8 d 小鼠外周血中 IFN- $\gamma$ 、GABA 和 DA 水平, 应用 SoftMax Pro 4.3.1LS 软件绘制标准曲线计算各项指标的含量(pg/ml)。采用 Grapad 8.0 软件进行处理和分析。 **结果** TDI 组小鼠第 8 d 存活率为 0%, pre-10d LNT TDI 组小鼠第 8 d 存活率为 60%; 与 NC 组相比, TDI 组和 pre-10d LNT TDI 组 CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T 细胞亚群水平均明显增高; 与 TDI 组小鼠相比, pre-10d LNT 预处理明显降低了弓形虫感染的 C57BL/6J 小鼠脑组织中 CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 细胞数量( $P < 0.01$ )、明显降低了小鼠第 4 d 和 8 d 的外周血中 IFN- $\gamma$  产生水平( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ )、第 8 d 小鼠外周血中 DA 和 GABA 的产生水平显著增加( $P < 0.01$ )。 **结论** LNT 预处理可以显著提高急性弓形虫感染小鼠的存活率, 通过减少 CD8<sup>+</sup>T 细胞通过血脑屏障进入 CNS, 降低神经系统的广泛炎症反应, 通过降低脑组织中 CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T 细胞数量, 调节神经递质的分泌水平, 从而改善小鼠脑部的炎症反应, 对急性弓形虫小鼠中枢神经系统的损伤具有明显的保护作用。

**【关键词】** 弓形虫; 香菇多糖; 中枢神经系统损伤**【中图分类号】** R382.5**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2022)02-0170-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Feb;17(2):170-173.]

## Protective effects of lentinan pretreatment on central nervous system injury in mice infected with *Toxoplasma gondii*<sup>\*\*</sup>

CHEN Ying-ying<sup>1</sup>, GUAN Yi-tao<sup>1</sup>, WANG Xia<sup>2</sup>, NIE Qing<sup>1</sup>, LIU Hai-tao<sup>2</sup> (1. Weifang Center for Disease Control and Prevention, Weifang 261061, Shandong, China; 2. Army Hospital of the 80th army group)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the protective effects of lentinan pretreatment on? central nervous system injury in mice with *Toxoplasma gondii* infection. **Methods** The C57BL/6 mice were randomly divided into control group (NC), infection group (TDI) and lentinan 10 days pretreatment group (pre-10d LNT TDI). Mice in pre-10d LNT TDI group were injected with lentinan(1 mg/kg weight, once a day)10 days before *Toxoplasma gondii* infection, then no treatment after infection; each mouse in TDI group were intraperitoneally injected with 0.5 mL *T. gondii*; mice in NC group were injected with the same volume saline every day 10 days before *Toxoplasma gondii* infection. The survival rate was got by recording the number and time of mice deaths; the percentage of CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T cells in the brain tissue of mice on the 8<sup>th</sup> day after *Toxoplasma gondii* infection was detected by flow cytometry; the levels of IFN- $\gamma$ , GABA and DA in peripheral blood plasma of mice on the 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> day after *Toxoplasma gondii* infection were detected by ELISA; SoftMax Pro 4.3.1LS software calculate the levels(pg/mL) of every index by draw the standard curve. Then Grapad 8.0 was used to analyze the data. **Results** The survival rate of mice in TDI group was 0% on 8<sup>th</sup> day, while it was 60% in pre-10d LNT TDI group; compared with NC group, the level of CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells was significantly higher in TDI and pre-10d LNT TDI group ( $P < 0.01$ ); compared with TDI group, pre-10d LNT pretreatment significantly decreased CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells in brain tissue of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii* infection( $P < 0.01$ ) and the level of IFN- $\gamma$  in peripheral blood plasma on the 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> day ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ ), while it significantly increased the levels of DA and GABA ( $P < 0.01$ ) in peripheral blood plasma on the 8<sup>th</sup> day. **Conclusion** Lentinan pretreatment can significantly improve the survival rate of

<sup>\*</sup> **【基金项目】** 2019 年度潍坊市卫生健康委科研计划项目(No. wfwjsk\_2019\_046)。<sup>\*\*</sup> **【通讯作者】** 管益涛, E-mail: 25175526@qq.com**【作者简介】** 陈莹莹(1985-), 女, 本科, 山东潍坊人, 主管技师, 主要从事微生物和寄生虫的检验工作。E-mail: 418391469@qq.com

mice injected with *Toxoplasma gondii*, and reduce the inflammation of brain to protect the central nervous system by decreasing CD8<sup>+</sup> cells to cross the blood-brain barrier into the CNS and reducing the number of CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells to regulate the levels of neurotransmitters.

**【Key words】** *Toxoplasma gondii*; lentinan; central lesion

刚地弓形虫是一种呈世界性分布的机会致病原虫,据估计全世界血清阳性率为10%~60%<sup>[1]</sup>,欧美的一些发达国家感染率甚至高达80%<sup>[2]</sup>。弓形虫感染具有嗜神经细胞性的特点,这种中枢神经系统的趋向性是弓形虫在免疫力低下人群中引起毁灭性疾病的基础。在急性感染期间,弓形虫以速殖子的形式在宿主中传播,可通过血脑屏障进入中枢神经系统(Central Nervous System, CNS)<sup>[3]</sup>。血脑屏障是脑组织与外界进行物质交流的场所,一定程度上延迟或阻隔了弓形虫入侵大脑的过程,弓形虫可通过血脑屏障入侵中枢神经系统,造成宿主脑组织细胞损伤。

弓形虫感染会导致活化的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞大量穿过血脑屏障进入CNS,这些活化的T细胞将大量产生 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )。有研究表明IFN- $\gamma$ 是宿主抗弓形虫的主要细胞因子,可以通过多种作用机制抑制弓形虫的增殖和发育,并且在维持弓形虫包囊中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。另外,有大量的研究显示弓形虫感染会影响CNS内的某些递质( $\gamma$ -氨基丁酸, GABA; 多巴胺, DA; 血清素, 5-HT)的释放,从而改变宿主的行为、学习和记忆能力<sup>[5]</sup>。

香菇多糖(Lentinan, LNT)是从香菇中提取的研究得较透彻的具有多种生物学和免疫学活性的真菌多糖,具有抗病毒、抗细菌、抗肿瘤和抗寄生虫感染的功效<sup>[6-7]</sup>。它被认为是一种胸腺依赖型T细胞导向并有巨噬细胞参与的特殊免疫增强剂,具有调节免疫功能和刺激干扰素形成等功能<sup>[8-9]</sup>。本研究拟通过观察香菇多糖预处理后急性弓形虫感染小鼠脑组织其免疫病理学的改变及神经递质的分泌情况,旨在探讨香菇多糖预处理对急性弓形虫感染小鼠脑中枢神经系统的保护性作用。

## 材料与方法

### 1 材料

雄性SPF级C57BL/6小鼠,6-8周,18-22g,购于南京大学实验动物中心。饲养条件为温度(24±2)℃,湿度30%-60%,光照和黑暗各12h,自由饮食水。RH株速殖子(国际标准强毒株),由中国医科大学寄生虫学教研室提供。

### 2 方法

**2.1 实验动物感染与分组** 小鼠腹腔常规感染RH株弓形虫速殖子,72h后处死,注射0.9%生理盐水5

ml洗涤腹腔,血细胞计数板计数冲洗液中弓形虫速殖子的数量,调整其浓度为 $2 \times 10^4$ 个/ml。C57BL/6小鼠30只,随机分为对照组(NC组),模型组(TDI组)和香菇多糖预处理组(pre-10d LNT TDI组),每组各10只。弓形虫感染前10d,pre-10d LNT组小鼠连续10d腹腔注射LNT(1mg/kg体重,1次/d),弓形虫感染后无任何处理;TDI组小鼠腹腔注射弓形虫悬液0.5ml/只鼠,NC组小鼠感染前10d开始腹腔注射同等体积的生理盐水(1次/d)。

**2.2 小鼠一般状况观察** 注意观察小鼠生存状态、精神状态(拱背、耸毛、拉稀)、饮食情况和死亡情况,记录小鼠死亡时间及数量。

**2.3 脑CD8细胞亚群检测** 感染后第8d,无菌取出小鼠脑组织,常规制备脑细胞悬液。使用含有10%胎牛血清的PBS调整脑细胞终浓度为 $1 \times 10^7$ /mL。流式细胞仪专用染色管预先加入Fc $\gamma$ III/II封闭抗体,随后取脑细胞悬液0.1mL,37℃条件下PMA和伊屋诺霉素刺激2h,再加入Golgi Stop共同培养4h,3%FCS的PBS洗涤后加入FITC-anti-CD8(clone GK1.5)荧光抗体,避光孵育30min,3%FCS的PBS再次洗涤后加入固定透膜剂孵育,然后加入PE-anti-IFN- $\gamma$ (clone XMG1.2)荧光抗体进行细胞内染色。离心弃上清,0.5mL 3%FCS的PBS重悬细胞,流式细胞仪检测脑细胞中CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T细胞百分比。

**2.4 细胞因子和神经递质检测** 感染后第4d和第8d分别取小鼠的外周血,分离血清后检测IFN- $\gamma$ 、GABA和DA水平。采用ELISA试剂盒(购于生工生物工程(上海)股份有限公司)按照说明书进行。酶标仪测定450nm处吸光度(A)值。根据试剂盒提供的标准品,应用SoftMax Pro 4.3.1LS软件绘制标准曲线,计算细胞因子和神经递质的含量(pg/ml)。

**2.5 统计学分析** 采用Grapad 8.0软件进行分析和分析,计量数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析、双尾t检验和LSD-t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结果

### 1 Pre-10d LNT预处理对弓形虫感染C57BL/6J小鼠存活率的影响

TDI组小鼠于感染后第4d急性弓形虫感染小鼠开始死亡(图1),至第8d感染小鼠全部死亡,存活率

为0%；pre-10d LNT 组小鼠在感染后第8 d 出现死亡，存活率为60%。

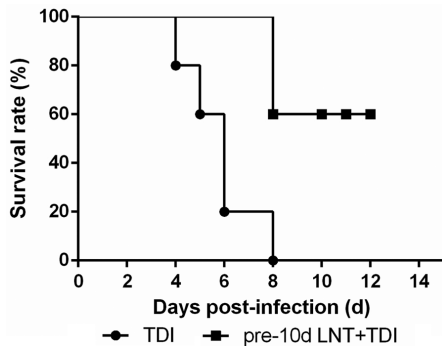
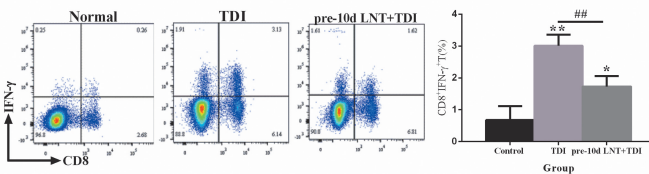


图1 pre-10d LNT 预处理的弓形虫感染 C57BL/6J 小鼠的存活率的变化

Fig.1 The change of survival rate of C57BL/6J mice treated with pre-10d LNT after *T. gondii* infection

### 2 pre-10d LNT 预处理对弓形虫感染 C57BL/6J 小鼠脑组织中 CD8<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup> T 细胞亚群水平的影响

与对照组 (0.25 ± 0.06%) 相比, TDI 组 (3.01 ± 0.12%) 和 pre-10d LNT 预处理组 (1.73 ± 0.08%) CD8<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup> T 细胞亚群水平均明显增高 ( $t = 34.234, 25.634, P < 0.01$ ) (图2); 与 TDI 组小鼠相比, pre-10d LNT 预处理明显降低了弓形虫感染的 C57BL/6J 小鼠脑组织中 CD8<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup> 细胞数量 ( $t = 15.050, P < 0.01$ )。



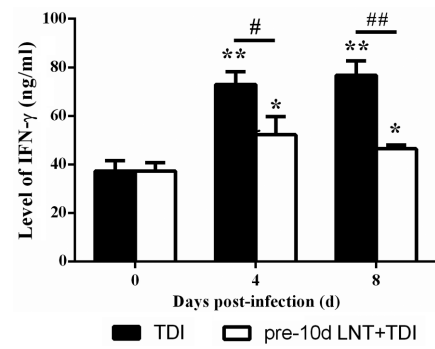
## pre-10d LNT TDI 组与 TDI 组相比 (pre-10d LNT TDI group compared with TDI group),  $P < 0.01$ 。 \* pre-10d LNT TDI 组与 NC 组相比 (pre-10d LNT TDI group compared with NC group),  $P < 0.01$ 。 \*\* TDI 组与 NC 组相比 (TDI group compared with NC group),  $P < 0.01$ 。

图2 pre-10d LNT 预处理的弓形虫感染 C57BL/6J 小鼠脑组织中 CD8<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup> T 细胞水平变化

Fig.2 Changes of CD8<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup> T-cell level of C57BL/6J micetreated with pre-10d LNT after *T. gondii* infection

### 3 pre-10d LNT 预处理对弓形虫感染 C57BL/6J 小鼠外周血中 IFN-γ 水平的影响

与 TDI 组小鼠相比, pre-10d LNT 预处理明显降低了弓形虫感染的 C57BL/6J 小鼠 4 d (TDI 组为 (72.95 ± 5.28) ng/mL, pre-10d LNT 组为 (52.28 ± 7.46) ng/mL ( $t = 3.915, P < 0.05$ ) 和 8 d (TDI 组为 (76.76 ± 5.92) ng/mL, pre-10d LNT 组为 (46.47 ± 1.58) ng/mL ( $t = 8.562, P < 0.01$ )) 的外周血中 IFN-γ 产生水平 (图3)。



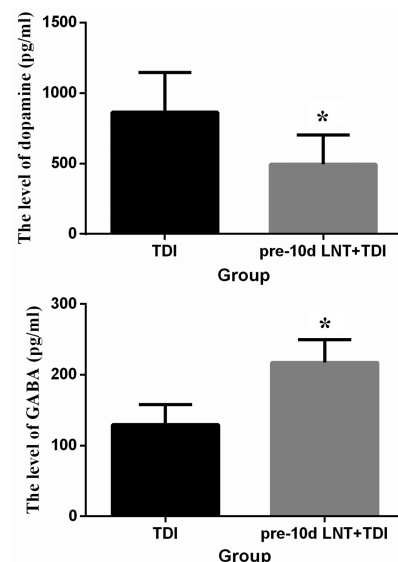
\* pre-10d LNT TDI 组第 4、8 d 与第 0 d 相比 (the 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> day compared with the 0<sup>th</sup> day in pre-10d LNT TDI group),  $P < 0.05$ 。 \*\* TDI 组第 4、8 d 与第 0 d 相比 (the 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> day compared with the 0<sup>th</sup> day in TDI group),  $P < 0.01$ 。 # 第 4 d pre-10d LNT TDI 组与 TDI 组相比 (pre-10d LNT TDI group compared with TDI group on the 4<sup>th</sup> day),  $P < 0.05$ 。 ## 第 8 d pre-10d LNT TDI 组与 TDI 组相比 (pre-10d LNT TDI group compared with TDI group on the 8<sup>th</sup> day),  $P < 0.01$ 。

图3 pre-10d LNT 预处理的弓形虫感染 C57BL/6J 小鼠外周血中 IFN-γ 水平变化

Fig.3 Changes of IFN-γ level in peripheral blood of C57BL/6J mice treated with pre-10d LNT after *T. gondii* infection

### 4 pre-10d LNT 预处理对弓形虫感染 C57BL/6J 小鼠外周血中 DA 和 GABA 水平的影响

与模型组小鼠相比, pre-10d LNT 预处理明显增加了弓形虫感染第 8 天 C57BL/6J 小鼠外周血中 DA (TDI 组为 (355.316 ± 54.317) pg/mL, pre-10d LNT 组为 (478.906 ± 40.608) pg/mL,  $LSD-t = 3.043, P < 0.01$ ) 和 GABA (TDI 组为 (129.416 ± 11.397) pg/mL, pre-10d LNT 组为 (217.39 ± 13.630) pg/mL ( $LSD-t = 6.454, P < 0.01$ )) 的产生水平 (图4)。



\* pre-10d LNT TDI 组与 TDI 组相比 (pre-10d LNT TDI group compared with TDI group),  $P < 0.01$ 。

图4 pre-10d LNT 预处理的弓形虫感染 C57BL/6J 小鼠外周血中 DA 和 GABA 水平变化

Fig.4 Changes of DA and GABA levels in peripheral blood of C57BL/6J mice treated with pre-10d LNT after *To. gondii* infection

## 讨 论

免疫力低下的小鼠感染弓形虫后表现为精神沉郁、食欲下降、颤抖、被毛凌乱等,研究发现弓形虫感染小鼠脑部质量下降,核磁共振成像发现脑室扩大。病理标本显示小鼠脑组织外观充血、水肿、沟回变浅,部分有出血点,大脑皮质空洞<sup>[10]</sup>。切片中神经元变性、坏死,弓形虫包囊附近见噬神经现象,大量嗜酸性细胞增生、集聚<sup>[11]</sup>。刚地弓形虫感染能够激发宿主的免疫反应,引起宿主脑内免疫细胞和分子分布的改变<sup>[12]</sup>。

随着机体内弓形虫感染时间的延长,排泄分泌抗原含量逐渐增加,激活脑内的小胶质细胞和星形胶质细胞,分泌大量细胞因子和趋化因子向免疫系统发出信号,吸引小胶质细胞和巨噬细胞大量聚集<sup>[13]</sup>。如:肿瘤坏死因子- $\gamma$ (tumor necrosis factor- $\gamma$ , TNF- $\gamma$ )、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、IL-6。而这些细胞因子也会通过多种方式影响神经递质,干扰多巴胺代谢的能力;在感染后的7~10 d,大量CD8<sup>+</sup>T细胞通过血脑屏障进入CNS,刺激产生特异性细胞毒性T淋巴细胞,CD8<sup>+</sup>T细胞通过释放穿孔素等细胞毒性物质杀伤靶细胞<sup>[14-15]</sup>,最终共同表现为神经系统的广泛炎症。本研究结果发现,LNT提前10 d处理后小鼠的生存率明显提高,与模型组小鼠相比,生存率达60%。检测小鼠脑组织中CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T细胞的数量变化,结果发现LNT提前10 d处理后小鼠脑组织中CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T细胞数量明显减少,且外周血中IFN- $\gamma$ 的产生水平显著下降。表明LNT预处理可以通过减少CD8<sup>+</sup>T细胞通过血脑屏障进入CNS,降低神经系统的广泛炎症反应。

刚地弓形虫的基因组中含有编码两种芳香族氨基酸羟化酶的基因,能诱导大脑多巴胺系统中各类神经递质浓度的紊乱,包括多巴胺含量的增高和色氨酸含量的降低<sup>[16]</sup>。大脑中多巴胺浓度的升高也能促进刚地弓形虫的增殖、趋化、感染以及转化<sup>[17]</sup>。刚地弓形虫感染还会引起小鼠大脑 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)产生的异常。刚地弓形虫感染使得大脑中GABA生成的关键酶即谷氨酸脱羧酶分布弥散程度变高,从而影响GABA合成过程<sup>[18]</sup>。GABA是大脑中重要的抑制性神经递质,其生成障碍会导致大脑抑制性和兴奋性神经活动失衡。本研究结果发现LNT提前10 d处理后小鼠外周血中DA的水平降低,而GABA的水平则明显升高。表明LNT预处理改善弓形虫小鼠脑部的炎症反应,降低脑组织中CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T细胞数量,调节神经递质的分泌水平,对急性弓形虫小鼠中枢神经系统的损伤具有显著的保护作用。

## 【参考文献】

- [1] Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis[J]. Int J Parasitol, 2009(39):1385-1394.
- [2] Smadja D, Cabre P, Prat C, et al. Loss of psychic auto-activation. Obsessive-compulsive behavior. Toxoplasmic abscess of the basal ganglia [J]. Rev Neurol (Paris), 1995, 151(4): 271-273.
- [3] Mendez OA, Koshy AA. *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system [J]. PLoS Pathog, 2017, 13(7): e1006351.
- [4] Jordan KA, Hunter CA. Regulation of CD8<sup>+</sup>T cell responses to infection with parasitic protozoa [J]. Exper Parasitol, 2010, 126(3): 318-325.
- [5] Parlog A, Schluter D, Dunay IR. *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations [J]. Parasit Immun, 2015, 37(3): 159-70.
- [6] Higashi D, Seki K, Ishibashi Y, et al. The effect of lentinan combination therapy for unresectable advanced gastric cancer [J]. Anticancer Res, 2012, 32(6): 2365-2368.
- [7] Zhou LD, Zhang QH, Zhang Y, et al. The shiitake mushroom-derived immuno-stimulant lentinan protects against murine malaria blood-stage infection by evoking adaptive immune-responses [J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(4): 455-462.
- [8] Williams DL. Overview of (1, 3)-beta-D-glucan immunobiology [J]. Mediat Inflamm, 1997, 6(4): 247-250.
- [9] Fruehauf JP, Bonnard GD, Herberman RB. The effect of lentinan on production of interleukin-1 by human monocytes [J]. Immunopharmacology, 1982, 5(1): 65-74.
- [10] 赵伟男. 弓形虫感染对小鼠脑等组织器官的影响及其临床检测 [D]. 齐齐哈尔: 东北农业大学, 2014.
- [11] 吴升伟, 包怀恩, 李小燕, 等. 小鼠感染弓形虫 Prugniald 株后的组织病理学变化 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(5): 327-332.
- [12] 郑维泓, 窦宁馨, 吕志跃. 弓形虫感染引起精神疾病的机制研究进展 [J]. 热带医学杂志, 2017, 17(1): 119-122.
- [13] 葛可, 仇晓艳, 王丽娟, 等. 刚地弓形虫排泄分泌抗原体外诱导的IFN- $\gamma$ 促CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞凋亡作用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2016, 34(3): 183-188.
- [14] 毛雯倩. 不同毒力株弓形虫排泄-分泌抗原(ESA)对小鼠免疫细胞亚群的影响 [D]. 南京: 南京医科大学, 2012.
- [15] Landrith TA, Harris TA, Wilson TH, et al. Characteristics and critical function of CD8<sup>+</sup>T cells in the *Toxoplasma*-infected brain [J]. Semina Immunopathol, 2015, 37(3): 261-270.
- [16] Flegr J. How and why *Toxoplasma* makes us crazy [J]. Trends Parasitol, 2013, 29(4): 156-163.
- [17] Strobl JS, Goodwin DG, Rzigalinski BA, et al. Dopamine stimulates propagation of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in human fibroblast and primary neonatal rat astrocyte cell cultures [J]. J Parasitol, 2012, 98(6): 1296-1299.
- [18] Brooks JM, Carrillo GL, Su J, et al. *Toxoplasma gondii* infections alter GABAergic synapses and signaling in the central nervous system [J]. MBio, 2015, 6(6): e01428-15.

【收稿日期】 2021-10-15 【修回日期】 2022-01-25