

DOI:10.13350/j.cjpb.220210

• 论著 •

人源中国Ⅲ型刚地弓形虫分离株在终末宿主内的发育研究*

赵桂华¹, 代莉莎¹, 朱进^{2,3}, 张丽新¹, 徐超¹, 徐昊志¹, 肖婷¹, 沈继龙^{2,3}, 余莉^{2,3**}, 尹昆^{1**}

(1. 山东省寄生虫病防治研究所(山东第一医科大学, 山东省医学科学院), 山东济宁 272033; 2. 病原生物学安徽省重点实验室(安徽医科大学); 3. 人畜共患病安徽高校省级重点实验室(安徽医科大学))

【摘要】 目的 建立人源中国Ⅲ型弓形虫 LHG 株体外感染猫肠上皮细胞(intestinal epithelial cells, IECs)体系及体内感染开启有性生殖实验动物模型, 观察其在不同感染条件下在终末宿主细胞内的发育情况。 **方法** 人源中国Ⅲ型 LHG 弓形虫分离株经口感染昆明 KM 小鼠 42 d 成囊后, 采用 Percoll 梯度离心法纯化脑组织包囊, 经 0.25% m/v 胰酶消化释放缓殖子后体外感染猫 IECs(1:10, 虫株:IECs)。取含有弓形虫包囊的 KM 鼠脑组织显微镜下计数, 按 600 个包囊/只经口感染 5 只 3 月龄健康家猫, 每天收集猫粪便, 分别采用镜检及 PCR 扩增弓形虫特异性 529 bp 重复序列及 B1 基因检测弓形虫卵囊排泄情况, 采用免疫组化(immunohistochemistry, IHC)和免疫荧光(immunofluorescence assay, IFA)鉴定感染猫小肠内裂殖子的发育, 分析中国Ⅲ型虫株的体内有性生殖规律。 **结果** LHG 弓形虫分离株缓殖子在体外条件下可成功黏附、入侵猫 IECs, 在细胞内形成“玫瑰花”样结构, 4~5 d 细胞破裂释放虫体, 完成无性生殖过程, 但未检测到与有性生殖相关的裂殖体、雌雄配子体及合子, 且其体外黏附入侵宿主细胞效率显著低于 I 型 RH 株; 但其感染 5 只猫后, 4~6 d 猫粪便内均检测到弓形虫卵囊, 其小肠经 IHC 和 IFA 检测在 IECs 内均出现裂殖体样结构, 说明成功开启了有性生殖过程, 且效率高于自然条件下的既往报道数据。 **结论** 成功建立了中国Ⅲ型弓形虫 LHG 株体外感染猫 IECs 体系及高效开启有性生殖实验动物模型, 证实该虫株是我国猫科动物的易感虫株, 为研究弓形虫有性生殖机制及研制阻断弓形虫卵囊排泄传播药物及疫苗奠定基础。

【关键词】 弓形虫; 人源中国Ⅲ型弓形虫分离株; 猫 IECs; 生长发育; 卵囊排泄

【中图分类号】 382.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)02-0174-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Feb;17(2):174-179.]

Development research of *Toxoplasma gondii* Chinese Ⅲ genotype strain isolated from humans in the definitive host

ZHAO Gui-hua¹, DAI Li-sha¹, ZHU Jin-jin^{2,3}, ZHANG Li-xin¹, XU Chao¹, XU Hao-zhi¹, XIAO Ting¹, SHEN Ji-long^{2,3}, YU Li^{2,3}, YIN Kun¹ (1. Shandong Institute of Parasitic Diseases, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jining 272033, Shandong, China; 2. The Key Laboratory of Microbiology and Parasitology of Anhui Province; 3. The Provincial Key Laboratory of Zoonoses of High Institutions in Anhui)***

【Abstract】 Objective To establish an *in vitro* cats IECs experimental infection systems and an efficient *in vivo* infection sexual reproduction animal model using *T. gondii* Chinese Ⅲ isolate, analyze the infection efficiency and its development process in the definitive host *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The brain tissue cysts of *T. gondii* Chinese Ⅲ genotype LHG strain were acquired from 42 days post-infected KM mice and were purified using Percoll gradients method. The bradyzoites were obtained from purified brain tissue cysts by 0.25% m/v trypsin digestion and co-cultured with cat IECs *in vitro* (1:10, parasites: cells). Five experimental cats were orally infected with KM mice brain tissue containing *T. gondii* cysts (600 cysts per cat) and all cats feces were collected every day to detect oocyst by microscopic examination and PCR, and the 529 bp repeat sequence and B1 gene specific expressed in *T. gondii* were selected as target genes. Immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence assay (IFA) were used to identify the schizonts of *T. gondii* in infected cat gut to understand the sexual reproduction of Chinese Ⅲ genotype strain *in vivo*. **Results** The bradyzoites of Chinese Ⅲ LHG strain could adhere and invade cat IECs *in vitro*, form “rose”-like structures, break cat IECs, complete the whole process of asexual reproduction *in vitro* after 4-5 days post infection, but the schizonts, gametophytes and zygotes associating with sexual reproduction were not observed in this systems. Efficiency of its adhesion, invasion to host

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81702026, 81871671); 山东省医药卫生科技发展计划项目(No. 202101050261, 202101050270); 山东省泰山学者项目工程(tsqn202103186); 山东第一医科大学学术提升计划(No. 2019QL005), 山东省医学科学院创新工程。

** **【通讯作者】** 尹昆, E-mail: yinkun0326@163.com

【作者简介】 赵桂华(1980-), 女, 山东济宁人, 硕士, 副研究员, 主要从事弓形虫致病机制研究。E-mail: zhgh20151201@163.com

cells was significantly lower than that of RH strain. In all our experimental cats gut, the parasite were able to complete the sexual reproduction cycle, form schizonts and release oocysts into environment after 5 days of infection. **Conclusion** The LHG strain was confirmed to be susceptible to cats in China. We successfully constructed a cats IECs experimental infection systems *in vitro* and an efficient infection animal model, serving for molecular mechanism studies of *T. gondii* sexual reproduction and the development of drugs and vaccines to block the Toxoplasma oocyst excretion and transmission.

【Key words】 *Toxoplasma gondii*; human Chinese III genotype strain; cat intestinal epithelial cells; development; oocyst excretion

刚地弓形虫是一种人畜共患寄生虫,全球广泛分布,可感染人类、家畜、陆生和水生动物,给人类健康和畜牧业生产带来严重威胁^[1]。世界上人类感染较为普遍,其平均血清阳性感染率在25%~30%间^[2,3],而南美及非洲人群血清阳性率较高,达80%^[3]。我国感染率有逐年上升趋势,由2010年的7.94%上升为2017年的9.69%^[4]。弓形虫感染可对孕妇、新生儿及免疫系统受损者造成严重损伤^[5];近期研究发现潜伏感染还与人类的精神疾病之间存在密切关联,精神障碍、精神病、精神分裂症、双相情感障碍、重度抑郁症和焦虑症等患者中,弓形虫血清IgG阳性率健康对照相比均较高^[6-8]。我国家畜(如绵羊、山羊、猪、鸡、牦牛、牛等)的弓形虫血清阳性率平均可达23.7%^[9]。动物的流行感染,是孕期动物流产及幼崽死亡的主要因素,给畜牧业生产带来巨大的经济损失。

弓形虫生活史复杂,中间宿主众多。猫及猫科动物是其进行有性生殖的唯一物种。有性生殖最大的危害是通过向外界环境排放数百亿的卵囊,污染水、土壤和食物,进而感染人类、畜牧动物及海洋动物。在我国,为数众多的猫在弓形虫病的暴发流行过程中具有更为重要的作用。据2017年统计,我国宠物猫的数量为5310万(不包括流浪猫的数量),位居全球第2位(<http://www.mapsofworld.com/world-top-ten/countries-with-most-pet-cat-population.html>),感染弓形虫的平均血清阳性率为15%~25%,在内陆有些地区的感染率高达79.4%^[10-11],高于世界上平均的感染率30%~40%^[12-16]。目前已确定中国Ⅲ型弓形虫分离株在人及家畜中存在,其毒性较强,在系统发育上与典型的I型强毒RH株和GT1株关系较近,与中国其它分离株关系较远,但其在鼠的体内更易形成包囊,且包囊数量高于中国I分离株^[17-18]。目前,关于中国Ⅲ型株在猫IECs内的生殖发育及卵囊排泄报道较少。本研究前期成功建立了猫IECs体外分离培养体系^[19]的基础上,选用近期从全身性急性弓形虫病患者体内分离的新型中国Ⅲ型LHG分离株,分别从体内和体外条件下建立感染体系,分析中国I型株在终末宿主胞内的发育过程。本研究可对深入了解流行于我国的

优势弓形虫株的有性生殖情况提供实验方案,并有助于制定更为有效的防控措施,也为深入研究弓形虫与终末宿主的互作机制奠定了研究基础。

材料与方法

1 材料

1.1 主要试剂 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium)、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)、0.25% EDTA胰酶(Trypsin-EDTA)、双抗(青霉素/链霉素)等购自美国Gibco公司;血清浓缩试剂盒WA-013购自美国Invent Biotechnologies公司;QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit购自德国Qiagen公司;Pyrobest DNA聚合酶购自宝生物工程(TaKa-Ra,北京)有限公司;CY3山羊抗小鼠荧光二抗、组化试剂盒DAB显色剂购自武汉赛维尔生物科技有限公司;DAPI荧光染料、抗荧光淬灭封片剂购自武汉谷歌生物科技有限公司。

1.2 实验动物及虫株 鲁西南本地家猫由山东省寄生虫病动物养殖场饲养、驯化,经检测排除弓形虫及猫免疫缺陷病毒等感染,繁殖至第二代,选取3月龄健康猫用于试验,伦理批准号:SCXK(Lu)20190003;5~6周的昆明小鼠(KM)购自济南朋悦实验动物管理有限公司;中国Ⅲ型(ChineseⅢ型)LHG弓形虫分离株由安徽医科大学病原生物学安徽省重点实验室保存并赠予山东省寄生虫病防治研究所中心实验室保种传代。

2 方法

2.1 猫IECs的复苏 从液氮中取出保存的猫IECs放入37℃水浴中融化后,加10倍体积预热的DMEM细胞培养液(含10% FBS)洗涤,离心后细胞沉淀用新鲜的DMEM(含10% FBS)培养液重悬接种到细胞培养瓶内,5% CO₂、37℃培养。猫IECs的培养及鉴定如前期我们发表的相关论文中描述的方法^[19]。

2.2 弓形虫脑包囊及缓殖子的制备 以20个包囊/只KM小鼠灌胃建立慢性感染动物模型。42 d后取小鼠脑组织进行匀浆并计数包囊,采用Percoll梯度法(Watts EA描述的方法^[20])纯化脑组织匀浆液中的包囊。纯化的弓形虫包囊用0.25% m/v胰酶在37℃下消化1 min,显微观察缓殖子逸出情况。酶解液经5

μm 的一次性无菌滤器过滤后, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 缓殖子沉淀用含 3% 胎牛血清(FBS)的预温 DMEM 培养基重悬, 用于感染体外培养的猫 IECs。

2.3 弓形虫体外感染猫 IECs 选取生长状态良好的猫 IECs 接种于细胞培养 6 孔板中, 当细胞生长覆盖 6 孔板 80% 时, 按虫株与猫 IECs 1 : 10 的比例接种感染, 建立感染体系, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养。联合瑞氏-吉姆萨染色持续观察体外培养的猫 IECs 中弓形虫的发育状态。

2.4 弓形虫感染鲁西南家猫及卵囊检测 取感染弓形虫 42 d 的 KM 小鼠脑组织, 镜下检测包囊并计数, 按每只猫感染 600 个包囊剂量, 经口感染 3 月龄健康猫 5 只(编号分别为 1-5)。猫感染弓形虫后正常喂养, 每天定时收集粪便以 2% H_2SO_4 溶液将其充分混匀; 显微镜下检测卵囊。选取的特异性标志性目的基因为。使用 QIAamp[®] Fast DNA Stool Mini Kit (Qia-gen) 提取猫粪便中弓形虫卵囊 DNA, 其具体的抽提方法同 Nasiru Wana M 的方法^[21]。扩增弓形虫 529 bp 重复序列和 B1 基因序列, 目的基因引物如表 1^[22]。扩增参考文献^[21-22]的方法。PCR 扩增产物经 1.1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 送进行 DNA 序列测定并比对分析。

表 1 引物序列
Table 1 Primers sequence

目的基因 Target Gene	引物序列(5'-3') Primer Sequence	片段大小 Size (bp)
repetitive 529 bp	F:CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG R:CGCTGCAGACAGTGCATCTGGATT	529
B1 gene	F:GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG R:TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC	194

2.5 免疫组化检测猫肠绒毛内裂殖体 因感染后猫在排卵囊初期, 其肠上皮细胞内多为裂殖体, 配子体较少^[23]。卵囊采用盐酸利多卡因注射麻醉猫, 切除小肠组织进行免疫组化检测, 制备石蜡切片, 用感染弓形虫的小鼠阳性血清(1 : 10)作为一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 然后滴加鼠源二抗 (HRP 标记, 1 : 200), 室温孵育 50 min, 苏木素复染 3 min。显微镜镜检, 图像采集分析。结果判读苏木素染细胞核为蓝色, DAB 显出的阳性表达为棕黄色。

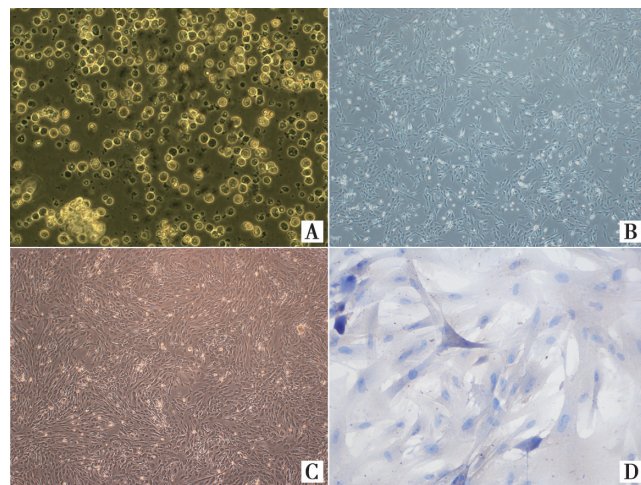
2.6 免疫荧光检测裂殖体 标本从制备到感染弓形虫小鼠血清作为一抗的孵育同上述免疫组化检测, 滴加二抗 CY3(1 : 200 稀释)室温、避光反应 50 min, 滴加 DAPI 染液复染, 室温避光 10 min, 填加抗荧光淬灭封片剂进行封片后荧光显微镜下观察并进行图像采集。结果判读: DAPI 作用后, 细胞核在紫外光的激发下呈蓝色, 阳性样品在 510~560 nm 的激发下荧光素

标记呈红光。

结 果

1 猫 IECs 的复苏及培养

液氮冻存的原代猫 IECs 融化后呈单个游离状态, 边界清晰, 透光性强, 状态良好(如图 1A); 接种复苏后可在 24 h 内贴壁, 细胞呈梭状, 边界清晰, 呈上皮细胞典型的梭状形态, 3~4 d 后可铺满培养瓶形成单细胞层(图 1B, 1C), 经免疫组化鉴定后, 培养的猫 IECs 可被上皮细胞特有的抗角蛋白 18 抗体特异性识别, 整个细胞呈棕色(图 1D); 证明本研究前期建立的猫肠上皮细胞原代分离培养体系稳定, 保存的细胞可成功复苏培养。



A 酶消化后获得的单个肠上皮细胞(100 $\times$) B、C 体外贴壁生长的猫 IECs(40 $\times$) D 猫 IECs 的免疫组化鉴定结果(200 $\times$)

图 1 猫 IECs 的体外培养及鉴定结果

A Singlet IEC cell derived after enzymes digestion (100 $\times$) B, C The adherent cat IECs cultured *in vitro* D The immunohistochemical identification results of cat IECs (200 $\times$)

Fig. 1 The *in vitro* culturing and identification results of cat IECs

2 弓形虫 LHG 分离株包囊及缓殖子的分离制备

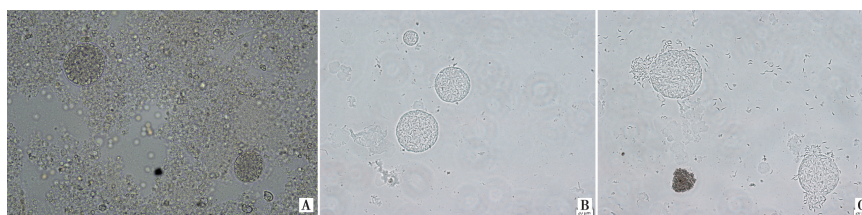
昆明小鼠(KM)于感染 6 周后取脑组织, 镜检显示脑组织匀浆中出现大小不同的弓形虫包囊, 呈圆形或椭圆形, 外周有一层透光性较强的囊壁, 内部折光性较强(图 2A)。经 Percoll 梯度离心后可去除了大部分的脑组织, 脑组织包囊可被初步纯化(图 2B)。经胰酶消化后, 纯化的包囊壁被破坏, 大量的缓殖子从包囊中释放出来(图 2C)。释放的缓殖子离心收集后用于体外感染猫 IECs, 观察其对体外培养的猫 IECs 的入侵及生殖发育情况。

3 LHG 株缓殖子体外发育过程

按 1 : 10 比例(缓殖子 : 猫 IECs)用纯化的缓殖子体外感染猫 IECs。瑞吉染色结果表明, 感染 12 h 后, 缓殖子方可侵入细胞, 被透光性强的囊泡结构包围, 类似纳虫泡 (parasitophorous vacuole, PV) (图

3A)。随着培养时间的延长虫体大量增殖,感染 2 d 后可观察到“玫瑰花”样假包裹结构(图 3B),之后猫 IECs 破裂并释放虫体。感染 4~5 d 后,几乎全部细

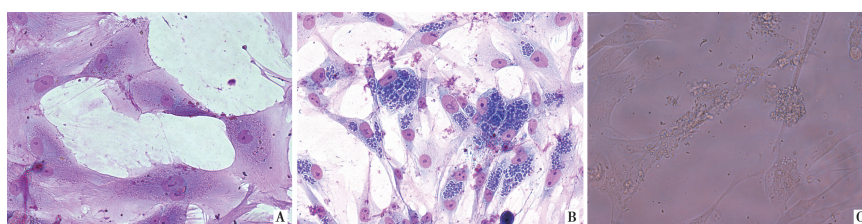
胞破裂,虫体游离(图 3C)。镜下未观察到与弓形虫有性生殖相关的裂殖子、雄、雌配子体、合子等虫体形态。



A 感染弓形虫 6 周的 KM 小鼠脑包囊 B 纯化的脑包囊 C 缓殖子从包囊内逸出
图 2 弓形虫包囊及缓殖子的制备(400×)

A Brain cysts of *T. gondii* in KM mice infected with parasites for 6 weeks B Purified brain cysts C The bradyzoites were released from the brain cysts

Fig. 2 *T. gondii* cysts in mice brain tissue and bradyzoites (400×)



A 共培养 12 h, 虫体入侵细胞 B 共培养 2 d, 出现“玫瑰花”样假包裹结构 C 共培养 4~5 d, 几乎所有的猫 IECs 破裂, 虫体游离
图 3 弓形虫 LHG 分离株与猫 IECs 共培养的发育状况(瑞氏-吉姆萨染色, 400×)

A At 12 hours after infection, parasites began to invaded into cat IECs B 2 days after infection, the parasites in cat IECs form “rose”-like structures C 4-5 days after infection, almost cat IECs burst and the parasite dissociates

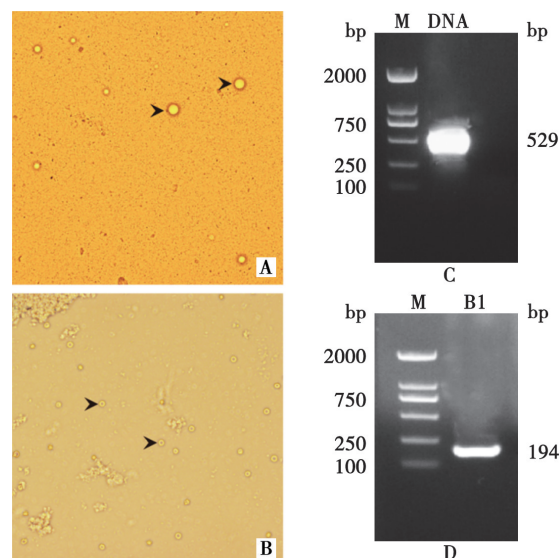
Fig. 3 The development of *T. gondii* LHG strains in cat IECs *in vitro* (Wright-Giemsa staining, 400×)

4 猫粪便卵囊的检测

猫经口感染包囊后,每天收集粪便,感染 4 d 后可检测到卵囊排出,5~6 d 后,全部受感染家猫粪便中均检出卵囊。卵囊呈圆形,囊壁致密透光性差(图 4A)。室温保存 3 d 后内部出现透光性差的物质,卵囊体积变小(图 4B),推测卵囊可能是发生了孢子化并发育为成熟的感染性卵囊。PCR 结果表明,卵囊样本可扩增出符合预期大小的特异性目的条带,即 529 bp 重复序列和 B1 基因(194 bp)(图 4C,4D),测序结果经 BLAST 分析也证明了与两基因序列相符。结果表明人源中国Ⅲ型弓形虫 LHG 分离株在经口感染条件下,可导致全部受试动物阳性感染并排出卵囊,可能是鲁西南家猫的易感虫株。

5 LHG 分离株体内有性生殖检测

刚排出卵囊的猫小肠切片免疫组化鉴定结果显示:小肠绒毛完整,小肠绒毛最外层整齐排列一层 IECs,且细胞在靠近肠腔一侧成透明状,且形态保持良好的完整性,在其细胞内可明显观察到呈棕黄色的弓形虫裂殖体样结构(图 5A)。免疫荧光检测结果显示在小肠的 IECs 亦明显观察到红色的裂殖体样结构(图 5B),裂殖体呈圆形或椭圆形,说明该分离株在猫体内可高效快速发育形成裂殖体,开启有性生殖过程。

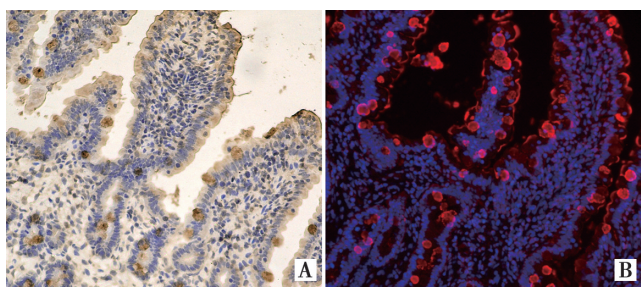


A 猫粪便中刚排出的弓形虫卵囊 B 在室温条件下存放 3 d 的弓形虫卵囊 C、D 猫粪便中弓形虫卵囊的 PCR 鉴定结果 M DL 2000 DNA 分子量标准 529 bp DNA 弓形虫基因组 200~300 个拷贝重复的 DNA 序列 B1 弓形虫 B1 弓形虫基因的第 694 至 887 碱基序列片段

图 4 猫粪便中弓形虫卵囊的检测

A Oocysts of *T. gondii* in newly excreted cat feces (200×) B Oocysts of *T. gondii* in cat feces, stored at room temperature for 3 days (200×) C, D Detection *T. gondii* specific DNA sequences in extracts from cat feces M DNA Marker 529 bp DNA *T. gondii* 529 bp repetitive sequence DNA B1 *T. gondii* B1 gene DNA

Fig. 4 Detection *T. gondii* oocysts in cat feces



A 免疫组化检测含有裂殖体猫肠上皮细胞(200×) B 免疫荧光检测猫肠上皮细胞内的裂殖体(200×)

图5 猫肠上皮细胞内裂殖体的检测

A The immunohistochemical identification results of cat IECs which containing the schizonts(200×) B The IFA results of *Toxoplasma* schizonts located in cat IECs (200×)

Fig. 5 Detection of *Toxoplasma* schizonts located in cat IECs

讨论

弓形虫可在终末宿主猫科动物体内进行有性生殖,并通过粪便向环境排放大量卵囊,是造成我国弓形虫在人和动物间广泛流行的主要原因之一^[9]。因此,合理防控卵囊排泄,是有效防控弓形虫病在人畜间传播的有效方法。但由于弓形虫的有性生殖期虫体分化时间短暂、难以分离及缺少成熟的细胞模型,弓形虫在终末宿主内的有性生殖相关研究一直处于滞后状态。本研究在前期成功分离培养了原代猫 IECs^[19]的基础上,成功复苏并传代培养了冻存的原代猫 IECs,也进一步证实了猫 IECs 原代分离培养体系稳定可重复,能够满足弓形虫有性生殖研究的细胞模型需求。

刚地弓形虫随着地域的差异其基因型及毒力类型也存在着高度的差异,目前典型的毒力类型有 I 型、II 型、III 型(主要在北美、欧洲及非洲流行)和非典型性(主要分布于南美、非洲及中国)^[24-25]。研究表明在北美和欧洲弓形虫大都通过无性繁殖来传播^[26],而我国弓形虫卵囊在弓形虫病的传播中具有重要的作用^[9]。在我国,流行于人类、家畜及猫体内的弓形虫分离株有 Chinese I、Chinese II 和 Chinese III。从目前弓形虫分离虫株的数量上来说,Chinese III 分离株较 Chinese I 分离株少^[27],但其有较强的毒性,且在鼠体内更易形成包囊^[18]。本研究选用的 LHG 弓形虫分离株来源于全身性急性弓形虫病危重病人的血液样本,经分析其基因型属于 III 型虫株(结果尚未发表)。本研究结果表明该虫株在体内和体外条件下对终末宿主均有较强的感染性,能够成功入侵猫 IECs。

弓形虫虽然中间宿主众多,但其有性生殖具有严格的种属性,仅限于猫科动物的 IECs。我们在试验条件下建立的弓形虫体外体内感染猫 IECs 体系的研究结果显示,Chinese III LHG 弓形虫分离株体外条件下共培养 12 h 后,方能成功入侵体外培养的原代猫

IECs,并在细胞内完成无性的分裂生殖过程,但其黏附入侵宿主细胞的效率显著慢于实验室常用的 RH 株速殖子,我们的前期研究表明,RH 株速殖子体外仅需 5 min 即可侵入鼠源巨噬细胞系如 RAW264.7,10 min 之内即可侵入人源上皮细胞系如 HFF 细胞,并能够在 8~24 h 内形成完整的假包囊^[28]。而 LHG 分离株缓殖子需要共培养 2 d 后,才能观察到与 Moura 等采用弓形虫 ME49 株感染体外培养的猫 IECs 一样的“玫瑰花”样假包囊结构^[29]。该虫株感染同种家猫(鲁西南家猫)时,感染 4 d 后即可检出卵囊,并能观察到小肠绒毛内的裂殖体样结构;国外流行病学研究显示,自然状态下仅有约<1%的猫可排出卵囊^[17],我国缺少系统的研究资料进行比对,只查阅到昆明市(4%)及河南省(<1%)的相关报道^[30-31]。表明 LHG 分离株可能是鲁西南家猫的易感虫株。

已有研究表明,猫科动物是唯一一种在其小肠内缺少 β -6-去饱和脂肪酸酶的物种^[32-33],该酶是亚油酸裂解代谢的第一个酶类,所以该酶的缺失导致猫血清内的亚油酸含量(25%~46%)远高于其它物种(3%~10%)^[34-36]。基于上述理论 Bruno Martorelli Di Genova 等开展了弓形虫选择猫及猫科动物作为终末宿主进行有性生殖的分子机制研究,其结果揭示亚油酸是诱导弓形虫在猫体内进行有性生殖的信号因素^[37];本研究的体外感染体系中,LHG 缓殖子的体外发育过程与之相符,缓殖子仅能完成无性增殖阶段,无法体外开启有性生殖过程。目前关于弓形虫在终末宿主内进行有性生殖排出卵囊还存在一个关键的问题,那就是猫首次感染弓形虫时,卵囊很容易随粪便排出;再次感染时,短时间内(2~3 个月)排卵囊失败,出现免疫性,但这种免疫性随着时间延长变弱,其机制尚不清楚^[38-39]。

综上所述,本研究从体内、外培养条件下,明确了 LHG 分离株可能是鲁西南家猫的易感虫株,并观测到了其完整的体外无性增殖和体内有性生殖全过程,可为后续深入研究中国新型弓形虫株与终末宿主的相互作用机制提供研究模型,并有助于总结更为合理有效的阻断卵囊传播的弓形虫防控措施。

【参考文献】

- [1] Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans[J]. Int J Parasitol, 2000, 30(2000): 1217-1258.
- [2] Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and humans[M]. Taylor Francis Group, 2010:1-313.
- [3] Robert-Gangneux F, Darde ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(2):264-296.
- [4] Pan M, Lyu C, Zhao J, et al. Sixty years (1957-2017) of research

- on toxoplasmosis in China-an overview[J]. Front Microbiol, 2017,8(1825):1-16.
- [5] Achaw B, Tesfa H, Zeleke AJ, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and associated risk factors among psychiatric outpatients attending University of Gondar Hospital, Northwest Ethiopia [J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1):581.
 - [6] Lindgren M, Tornaiainen-Holm M, Harkanen T, et al. The association between *Toxoplasma* and the psychosis continuum in a general population setting[J]. Schizophr Res, 2018(193):329-335.
 - [7] Parlog A, Schluter D, Dunay IR. *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations [J]. Parasite Immunol, 2015, 37(3):159-170.
 - [8] Stepanova EV, Kondrashin AV, Sergiev VP, et al. Toxoplasmosis and mental disorders in the Russian Federation (with special reference to schizophrenia) [J]. PLoS One, 2019(14):e0219454.
 - [9] Dong H, Su R, Lu Y, et al. Prevalence, risk factors, and genotypes of *Toxoplasma gondii* in food animals and humans (2000-2017) from China[J]. Front Microbiol, 2108(9):2018.
 - [10] Ding H, Gao YM, Deng Y, et al. A systematic review and meta-analysis of the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cats in mainland China [J]. Parasit Vectors, 2017, 10(1):27.
 - [11] Qiu HY, Zhang XX, Jiang J, et al. *Toxoplasma gondii* seropositivity and associated risk factors in cats (felis catus) in three provinces in northeastern China from 2013 to 2019[J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2020, 20(9):723-727.
 - [12] Koloren Z, Dubey JP. A review of toxoplasmosis in humans and animals in Turkey [J]. Parasitology, 2020, 147(1):12-28.
 - [13] Sroka J, Karamon J, Dutkiewicz J, et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cats in southwestern Poland[J]. Ann Agric Environ Med, 2018, 25(3):576-580.
 - [14] Gebremedhin EZ, Tadesse G. A meta-analysis of the prevalence of *Toxoplasma gondii* in animals and humans in Ethiopia[J]. Parasit Vectors, 2015, 8(291):1-9.
 - [15] Doaa S, Wilawan P, Eiji O, et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and other intestinal parasites in cats in Tokachi subprefecture, Japan[J]. J Vet Med Sci, 2018, 80(6):960-967.
 - [16] Taetzsch SJ, Gruszynski KR, Bertke AS, et al. Prevalence of zoonotic parasites in feral cats of Central Virginia, USA[J]. Zoonoses Public Health, 2018, 65(6):728-735.
 - [17] Zhao ZJ, Zhang J, Wei J, et al. Lower expression of inducible nitric oxide synthase and higher expression of arginase in rat alveolar macrophages are linked to their susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection. PLoS One, 2013, 8(5):e63650.
 - [18] Gao JM, Xie YT, Xu ZS, et al. Genetic analyses of Chinese isolates of *Toxoplasma gondii* reveal a new genotype with high virulence to murine hosts. Vet Parasitol, 2017(241):52-60.
 - [19] Zhao GH, Liu Y, Cheng YT, et al. Primary culture of cat intestinal epithelial cells in vitro and the cDNA library construction [J]. Acta Parasitol, 2018, 63(2):360-367.
 - [20] Watts EA, Dhara A, Sinai AP. Purification *Toxoplasma gondii* tissue cysts using percoll gradients[J]. Curr Protoc Microbiol, 2017(45):20C.2.1-20C.2.19.
 - [21] Nasiru Wana M, Mohd Moklas MA, Watanabe M, et al. Molecular detection and genetic diversity of *Toxoplasma gondii* oocysts in cat faeces from Klang valley, Malaysia, using B1 and REP genes in 2018[J]. Pathogens, 2020, 9(7):576.
 - [22] Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, et al. Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR[J]. Int J Parasitol, 2000, 30(1):69-75.
 - [23] Omata Y, Taka A, Terada K, et al. Isolation of coccidian enteroepithelial stages of *Toxoplasma gondii* from the intestinal mucosa of cats by Percoll density-gradient centrifugation[J]. Parasitol Res, 1997, 83(6):574-577.
 - [24] Su C, Khan A, Zhou P, et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(15):5844-5849.
 - [25] Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease [J]. J Infect Dis, 1995, 172(6):1561-1566.
 - [26] 付晓莹, 冯永杰, 梁宏德, 等. 中国弓形虫分离株基因型及致病性的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 37(5):669-673.
 - [27] Wang L, Cheng HW, Huang KQ, et al. *Toxoplasma gondii* prevalence in food animals and rodents in different regions of China: isolation, genotyping and mouse pathogenicity[J]. Parasit Vectors, 2013(6):273.
 - [28] 张丽新, 赵桂华, 徐超, 等. 刚地弓形虫 RH 株速殖子体外入侵小鼠巨噬细胞系感染模型的构建[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2021, 39(4):494-502.
 - [29] Moura MA, Amendoeira MR, Barbosa HS. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009, 104(6):862-864.
 - [30] Liang Y, Chen J, Meng Y, et al. Occurrence and genetic characterization of GRA6 and SAG2 from *Toxoplasma gondii* oocysts in cat feces, Kunming, China[J]. Southeast Asian J Trop Med Pub Health, 2016, 47(6):1134-1142.
 - [31] Yang Y, Ying Y, Verma SK, et al. Isolation and genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* from tissues and feces of cats from the central region of China[J]. Vet Parasitol, 2015, 211(3-4):283-288.
 - [32] Rivers JPW, Sinclair AJ, Crawford MA. Inability of the cat to desaturate essential fatty acids[J]. Nature, 1975, 258(5531):171-173.
 - [33] Sinclair AJ, McLean JG, Monger EA. Metabolism of Linoleic acid in the cat[J]. Lipids, 1979, 14(11):932-936.
 - [34] Walker RA, Sharman PA, Miller CM, et al. RNA Seq analysis of the *Eimeria tenella* gametocyte transcriptome reveals clues about the molecular basis for sexual reproduction and oocyst biogenesis[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1):1-20.
 - [35] Trevizan L, de Mello Kessler A, Brenna JT, et al. Maintenance of arachidonic acid and evidence of $\Delta 5$ desaturation in cats fed γ -linolenic and linoleic acid enriched diets [J]. Lipids, 2012, 47(4):413-423.
 - [36] Jelinska M, Bialek A, Gielecinska I, et al. Impact of conjugated linoleic acid administered to rats prior and after carcinogenic agent on arachidonic and linoleic acid metabolites in serum and tumors[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2017(126):1-8.
 - [37] Di Genova BM, Wilson SK, Dubey JP, et al. Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction[J]. PLoS Biol, 2019, 17(8):e3000364.
 - [38] Dubey JP. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats[J]. J Parasitol, 1995, 81(3):410-415.
 - [39] Zulpo DL, Sammi AS, dos Santos JR, et al. *Toxoplasma gondii*: A study of oocyst re-shedding in domestic cats[J]. Vet Parasitol, 2018(249):17-20.

【收稿日期】 2021-10-17 【修回日期】 2022-01-11