

网络出版时间: 2016-8-10 11:04:48 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160810.1104.006.html>

徐州猫源弓形虫株基因型及其毒力研究

朱长东^{1,2}, 程维晟¹, 罗庆礼¹, 沈继龙¹

摘要 目的 了解猫源弓形虫株基因型和毒力,为研究其致病机制奠定基础。方法 自江苏徐州诱捕采集 40 只流浪家猫,昆明小鼠腹腔接种分离弓形虫;采用 PCR-RFLP 法对 10 个基因分型位点(SAG1、SAG2、SAG3、BTUB、GRA6、c22-8、c29-2、L358、PK1 及 Apico)进行 PCR 扩增,扩增产物用相应的限制性核酸内切酶水解后观察分析电泳图谱;将分离的虫株分别感染 SPF 级 BALB/c 小鼠和昆明鼠,观察其存活时间和存活率,分析毒力强弱。选取弓形虫的毒力相关效应分子 ROP16 和 GRA15,PCR 扩增出基因序列,比较其多态性。结果 共获得 6 株猫源弓形虫株,基因分型结果显示,两株为 Chinese 1 型(即 ToxoDB#9 型),4 株为 ToxoDB#205 型;此 6 株弓形虫株对 BALB/c 小鼠和昆明鼠均有较强的毒性,两种小鼠分别在感染后 5~7 d 和 9~12 d 均 100% 死亡。毒力相关基因 GRA15 和 ROP16 的分析显示,Chinese 1 型虫株为 GRA15_{II} 和 ROP16_{I/III} 型,ToxoDB#205 型虫株为 GRA15_{II} 和 ROP16_{II} 型。结论 徐州地区猫源弓形虫株具有有限遗传多态性,且均为强毒的虫株。ToxoDB#205 型虫株的主要毒力效应分子 ROP16_{II} 不同于 Chinese 1 型虫株,这一毒力相关基因的多态性与其毒力的关系尚待深入研究。

关键词 弓形虫;基因型;毒力;GRA15;ROP16

中图分类号 R 382.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)10-1421-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.006

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是一种专性有核细胞内寄生的机会致病性原虫,全球广泛传播,可以感染几乎所有温血动物,严重危害人类健康和畜牧业生产。世界各地人和动物体内分离的弓形虫株基因型具有丰富的遗传多态性和地域差异,且在不同地域具有不同的优势基因型^[1]。近年来的研

究^[2]表明,流行于我国不同地区的动物源性弓形虫株具有有限的遗传多态性,且优势基因型为 Chinese 1 型。弓形虫侵入宿主细胞分泌的多态性效应分子主要包括棒状体蛋白 ROPs 家族如 ROP16 和 ROP18 等,以及致密颗粒蛋白 GRA 家族如 GRA15、GRA5 和 GRA3 等。其中研究较多的有 ROP16 和 GRA15。该研究采用 PCR-RFLP 法对徐州猫源弓形虫株进行基因分型,分析该地区弓形虫株基因型和毒力及其毒力相关分子 ROP16 和 GRA15 的多态性,为深入探讨其基因型相关的毒力效应分子多态性与虫株致病性的关系,以及完善我国弓形虫株的遗传资源库,提供重要理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和参考虫株 成年流浪猫 40 只,采自江苏徐州,雌雄不限,经麻醉后无痛处死,取全部脑组织进行弓形虫虫株分离。4~6 周龄,雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠 60 只,昆明鼠 180 只,均购自安徽省实验动物中心,室温下标准饲养。3 种参考虫株 DNA 为 type I 型(GT1)、type II 型(PTG)和 type III 型(CTG),由美国田纳西大学微生物教研室苏春雷教授惠赠。

1.2 主要试剂和仪器 DNA 提取试剂盒购自原平皓(天津)生物技术有限公司;PCR 预混液购自生工生物工程(上海)有限公司;琼脂糖购自西班牙 GENE 公司;限制性核酸内切酶购自美国 Ferments 公司;PCR 纯化试剂盒购自 Axygen 公司;基因分型引物由生工生物工程(上海)有限公司合成;温度梯度基因扩增仪购自德国 MIONETRA 公司;电泳仪和电泳槽购自美国 BIO-RAD 公司;凝胶成像系统购自江苏省捷达科技发展有限公司。

1.3 猫源弓形虫的分离 按照参考文献^[3]方法,无菌取猫脑组织 50 g,加入 125 ml 无菌生理盐水,组织匀浆器搅碎制备形成匀浆液;按照 1:1 的比例,加入 37℃ 预热的盐酸胃蛋白酶消化液,置恒温摇床,37℃、150 r/min,消化 1 h。以 1 200 r/min 将滤液离心 10 min,弃上清液,加入约 20 ml 的 PBS (PH 7.2),1 200 r/min 离心 10 min,弃上清液;氨苄

2016-06-12 接收

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号:2010CB530001);国家自然科学基金(编号:81471983)

作者单位: ¹安徽医科大学病原生物学教研室、安徽病原生物学省级实验室、人兽共患病安徽省重点实验室,合肥 230032

²安徽省庐江县人民医院检验科,庐江 231500

作者简介: 朱长东,男,硕士研究生,主管检验师;

沈继龙,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: shen-jilong53@126.com;

罗庆礼,男,助理研究员,责任作者,E-mail: luqingli@ahmu.edu.cn

西林和链霉素灭菌生理盐水稀释,制成 1:10 混悬液(氨苄西林 1 000 U/ml、链霉素 100 μ g/ml)。将上述组织悬液腹腔接种昆明小鼠 3 只,每只小鼠接种 1 ml。每天观察,如小鼠有竖毛、弓背、厌食等明显表现时,收集腹腔灌洗液涂片,镜检。如果接种小鼠存活,待 40 d 后,取脑组织压片镜检。

1.4 弓形虫 DNA 的提取 分别取弓形虫感染小鼠腹水, PBS 洗涤 3 次,离心收集速殖子后,用 DNA 提取试剂盒提取弓形虫基因组 DNA,于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 弓形虫株 RFLP-PCR 基因分型 参考文献^[4]中的 10 个分型标志物基因特异性引物 SAG1、SAG2、SAG3、BTUB、GRA6、c22-8、c29-2、L358、PK1 及 Apico,以本次分离的虫株及参考虫株的基因组 DNA 为模板,扩增上述 10 个基因片段。反应体系如下:弓形虫 DNA 模板 1.5 μ l,上下游引物各 1 μ l,PCR Premix Taq 25 μ l,总体积为 50 μ l。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,60 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 结束后,1% 琼脂糖凝胶观察反应结果。纯化 PCR 产物,并用相应的限制性核酸内切酶酶切,酶切后产物采用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳观察并记录结果。

1.6 虫株的毒力检测 分离的弓形虫株感染昆明小鼠,出现明显症状后收集腹水,按照本实验室的常规方法^[5],PBS 洗涤 3 次后经梯度离心法纯化速殖子,纯化后速殖子经 PBS 稀释至 2 ml 置显微镜下计数,按 1×10^3 个/只分别腹腔感染 SPF 级 BALB/c 小鼠和昆明鼠,每组各 10 只。逐日观察小鼠状态并计算死亡率和存活时间;若实验小鼠长期存活,则至感染后 45 d,麻醉颈椎脱臼处死各组存活小鼠,脑组织压片观察包囊是否形成。累积死亡率(%) = 死亡小鼠个数/感染小鼠个数 $\times 100\%$ 。

1.7 毒力相关基因分析 依据基因库中弓形虫虫株的毒力相关基因 ROP16 和 GRA15 的全长,设计 PCR 扩增引物,对分离的虫株进行 PCR 扩增,扩增产物纯化后,送生工生物工程(上海)有限公司进行测序,根据测序结果,比较 ROP16 和 GRA15 的核苷酸序列差异。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析。根据小鼠感染不同弓形虫株的存活时间、死亡率,采用 χ^2 检验对小鼠感染各虫株反应有无差异,不同虫株两两检验。

2 结果

2.1 弓形虫基因分型 上述 40 只流浪猫共分离出 6 株弓形虫株。采用通用的 10 个基因分型遗传位点,对此 6 株猫源弓形虫株(按猫的编号分别为 TgCtxz9、34、37、38、39、40)进行基因分型,共发现 Chinese 1 型(即 ToxoDB#9 型)2 株,ToxoDB#205 型 4 株。见图 1、表 1。在 SAG3 位点,虫株 TgCtxz34 和 TgCtxz38 与 III 型相同,而虫株 TgCtxz9、TgCtxz37、TgCtxz39 和 TgCtxz40 与 I 型相同;在 c29-2 位点,虫株 TgCtxz34 和 TgCtxz38 与 III 型相同,而 TgCtxz9、TgCtxz37、TgCtxz39 和 TgCtxz40 与 II 型相同。这一谱型显示虫株 TgCtxz34 和 TgCtxz38 为 Chinese 1 型,而虫株 TgCtxz9、TgCtxz37、TgCtxz39 和 TgCtxz40 为 ToxoDB#205 型。

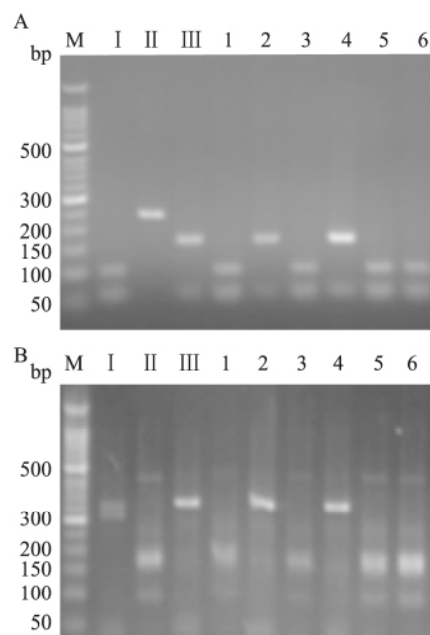


图 1 2.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定 SAG3 和 c29-2 基因 PCR 产物酶切结果

M: 50 bp DNA Ladder Marker; A: SAG3; B: c29-2; I: GT1; II: PTG; III: CTG; 1: TgCtxz9; 2: TgCtxz34; 3: TgCtxz37; 4: TgCtxz38; 5: TgCtxz39; 6: TgCtxz40

2.2 虫株毒力 每个分离虫株取 1×10^3 速殖子经腹腔接种 BALB/c 小鼠后,第 5 天开始出现竖毛、腹水、抽搐等明显症状,至第 7 天完全死亡。昆明小鼠腹腔接种同样数量速殖子后,存活时间略长于 BALB/c 小鼠,但在 12 d 之内亦全部死亡(表 2)。实验中未发现小鼠能长期存活的成囊虫株。各虫株之间的毒力差异无统计学意义。在两种品系小鼠之间,感染同一虫株的昆明小鼠存活时间明显长于 BALB/c 小鼠($P < 0.01$),表现出同一虫株对不同品

表1 中国徐州6株猫源性弓形虫株基因分型

虫株	PCR-RFLP 基因分型遗传位点										基因型
	SAG1	SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	
GT1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	ToxoDB#10(Type I)
PGT	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	ToxoDB#1(Type II)
CTG	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	ToxoDB#2(Type III)
TgCtx34	u-I	II	III	III	II	II	III	II	II	I	ToxoDB#9(Chinese 1)
TgCtx38	u-I	II	III	III	II	II	III	II	II	I	ToxoDB#9(Chinese 1)
TgCtx9	II	II	I	II	II	II	II	I	II	II	ToxoDB#205
TgCtx37	II	II	I	II	II	II	II	I	II	II	ToxoDB#205
TgCtx39	II	II	I	II	II	II	II	I	II	II	ToxoDB#205
TgCtx40	II	II	I	II	II	II	II	I	II	II	ToxoDB#205

表2 小鼠分别感染6株弓形虫株后存活时间比较

虫株	小鼠累积死亡率(%) (死亡个数 / 感染个数)	BALB/c 小鼠感染后 存活天数(d)	昆明鼠感染后存活 天数(d)	基因型	χ^2 值	P 值
TgCtx34	100(10/10)	5 ~ 7	10 ~ 12	ToxoDB#9(Chinese 1)	20. 169	< 0. 01
TgCtx38	100(10/10)	5 ~ 6	9 ~ 12	ToxoDB#9(Chinese 1)	18. 579	< 0. 01
TgCtx9	100(10/10)	5 ~ 6	9 ~ 12	ToxoDB#205	18. 234	< 0. 01
TgCtx37	100(10/10)	5 ~ 6	10 ~ 12	ToxoDB#205	18. 234	< 0. 01
TgCtx39	100(10/10)	5 ~ 7	10 ~ 12	ToxoDB#205	19. 300	< 0. 01
TgCtx40	100(10/10)	5 ~ 7	10 ~ 12	ToxoDB#205	20. 073	< 0. 01

系的小鼠有着不同的毒力。

2.3 毒力相关基因 通过 PCR 扩增 6 株弓形虫的毒力相关分子 GRA15 和 ROP16,并测序。结果显示,Chinese 1 型 2 个虫株携带 GRA15_{II} 和 ROP16_{I/III};而 ToxoDB # 205 型 4 个虫株携带 GRA15_{II} 和 ROP16_{II},表现出明显的差异性(表 3)。

表3 毒力相关基因 GRA15 和 ROP16 多态性分析

虫株	GRA15	ROP16	基因型
RH	I	I / III	Type I
PRU	II	II	Type II
Wh3	II	I / III	Chinese 1
TgCtx34	II	I / III	ToxoDB#9(Chinese 1)
TgCtx38	II	I / III	ToxoDB#9(Chinese 1)
TgCtx9	II	II	ToxoDB#205
TgCtx37	II	II	ToxoDB#205
TgCtx39	II	II	ToxoDB#205
TgCtx40	II	II	ToxoDB#205

3 讨论

近年来,随着对于弓形虫广泛深入的研究,其基因型也得到充分的认识,研究^[1]表明,世界各地的弓形虫株基因型具有丰富的遗传多态性,可分成 A ~ F 6 个进化枝(Clade)。目前已知全球人兽分离的弓形虫基因型具有地域的显著变异。北美和欧洲主要分为 I 型、II 型和 III 型 3 个基因型^[4]。南美洲的弓形虫基因型十分复杂,大致包括 Br I ~ IV 等 4

个基因型^[5]。我国的弓形虫基因分型及其与致病的关系研究较晚。本实验室以及国内其他学者的研究^[5,8-10]显示,相对于世界各地弓形虫虫株的多态性,流行于中国的弓形虫虫株具有有限的遗传多态性,且以 Chinese 1 型(ToxoDB#9)为其优势基因型,约占总分离株的 70% 以上。此外,尚有少数其他的基因型,如: ToxoDB#1(Type II 型)、ToxoDB#3、ToxoDB#10(Type I 型)、ToxoDB#205 和 ToxoDB#213 等。本次的实验结果显示,徐州流行的猫源弓形虫虫株主要有两种基因型即 Chinese 1 型和 ToxoDB#205 型,与既往研究^[4]结果相符。

研究^[11]显示,弓形虫不同的基因型对宿主细胞的入侵过程具有显著差异。弓形虫入侵宿主细胞其实是一系列虫体分泌蛋白协助肌动蛋白动作入侵的过程,分泌的蛋白包括 ROPs、GRAs、MICs、RONs 等多种效应分子,主要由致密颗粒(dense granule)、棒状体(rhoptry)与微线体(microneme)这 3 类分泌器分泌,这些效应分子在虫体识别、黏附、入侵、PVM 形成、增殖、出胞以及诱导宿主免疫应答,甚至感染结局等方面起到关键的作用,且 ROPs 和 GRAs 具有多态性^[12-13]。

GRAs 家族蛋白成员 GRA15 与 ROPs 家族的蛋白成员 ROP16 具有丝氨酸 - 苏氨酸蛋白激酶样活性,并同时具有基因型或虫株的多态性^[11]。其中 I 型与 III 型虫株的 ROP16_{I/III} 高度同源,可以限制

Th1 型免疫反应,抑制 IFN- γ 的表达和 IRGs 的募集,导致虫体过度增殖甚至宿主死亡;而 II 型虫株的 ROP16_{II} 则无此作用。II 型虫株的 GRA15_{II} 基因较 I、III 型 C 末端具有完整的 AA312 ~ 550 的片段,可以促进宿主细胞 IL-12 分泌,可以诱导巨噬细胞向经典途径激活的巨噬细胞(classic activated macrophages, M1)极化,抑制精氨酸合成,高表达诱导性 NO 合酶(iNOS),ROS 与 NO 释放增加,杀伤虫体,并且活化 NK、Th1 和 Th17 细胞,扩大炎症反应,使宿主获得强力免疫力,而 I、III 型虫株的 GRA15_{I/III} 则无此作用。

本次的研究显示,流行于徐州的弓形虫 Chinese 1 型虫株携带有多态性的 GRA15_{II} 基因和 ROP16_{I/III} 基因,和既往的研究^[2]结果一致。提示其毒力和致病性既不同于欧美的 I 型虫株,也不同于 II 型虫株,其毒力相关分子的功能及作用机制值得深入研究。而 ToxoDB#205 虫株不同于 Chinese 1,前者携带有 GRA15_{II} 基因和 ROP16_{II} 基因,与 II 型虫株一致。本实验中感染小鼠均在急性期死亡,两个基因型虫株感染同品系小鼠后死亡时间未见显著差异,提示均为强毒虫株。因此,我国流行的弓形虫不同基因型的虫株毒力上存在其他毒力相关分子。

本研究对弓形虫虫株的采集和基因分型,丰富了我国现有的弓形虫虫株基因型的数据,提示不仅有我国优势基因型 Chinese 1 型流行,而且 ToxoDB#205 也有广泛的分布,同时也为进一步探讨我国弓形虫虫株基因资源研究和弓形虫基因型相关的致病机制的研究提供了理论依据和实验依据。GRA15_{II} 和 ROP16_{I/III} 诱导宿主的差异性免疫应答特点及机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 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 U S A*, 2012, 109(15): 5844–9.
- [2] Wang L, Chen H, Liu D, et al. Genotypes and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* isolates from animals and humans in China [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53483.
- [3] Dubey J P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues [J]. *Vet Parasitol*, 1998, 74(1): 75–7.
- [4] Ferreira I M, Vidal J E, de Mattos C de C, et al. *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes [J]. *Exp Parasitol*, 2011, 129(2): 190–5.
- [5] Chen Z W, Gao J M, Huo X X, et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from cats in different geographic regions of China [J]. *Vet Parasitol*, 2011, 183(1–2): 166–70.
- [6] Blader I J, Saeij J P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence [J]. *APMIS*, 2009, 117(5–6): 458–76.
- [7] Rajendran C, Su C, Dubey J P. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations [J]. *Infect Genet Evol*, 2012, 12(2): 359–68.
- [8] 孟德娣,王林,楼研,等. 贵州猫源弓形虫株基因分型及毒力研究 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2014, 30(2): 150–4.
- [9] Zhou P, Sun X T, Yin C C, et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in southwestern China [J]. *J Parasitol*, 2011, 97(6): 1193–5.
- [10] 沈继龙,王林. 弓形虫的基因型及其主要效应分子的致病机制 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2015, 33(6): 429–35.
- [11] Hunter C A, Sibley L D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10(11): 766–78.
- [12] Mercier C, Cesbron-Delauw M F. *Toxoplasma* secretory granules: one population or more? [J]. *Trends Parasitol*, 2015, 31(2): 60–71.
- [13] Saeij J P, Boyle J P, Collier S, et al. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis [J]. *Science*, 2006, 314(5806): 1780–3.

Genotypes and virulence of *Toxoplasma gondii* isolates from cats in Xuzhou

Zhu Changdong^{1,2}, Cheng Weisheng¹, Luo Qingli¹, et al

(¹Dept of Microbiology and Parasitology of Anhui Medical University,

Anhui Provincial Laboratory of Pathogen Biology, Anhui Key Laboratory of Zoonoses,

Hefei 230032; ²Dept of Clinical Laboratory of Lujiang People's Hospital, Lujiang 231500)

Abstract Objective To investigate the genotype and virulence related effectors of the *Toxoplasma gondii* isolates from cat in Xuzhou. **Methods** The strains of *T. gondii*, which had been isolated from Xuzhou in Eastern China, were genotyped with PCR-RFLP at 10 genetic markers. At the same time, the virulence was analyzed via observa-

网络出版时间: 2016-8-10 11:04:48 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160810.1104.007.html>

两种支架材料搭载骨髓间充质干细胞 联合高压氧修复海水浸泡兔桡骨骨缺损

张 淦¹, 程迅生¹, 陈聪聪¹, 陈肖松¹, 马武秀¹, 王 崎², 符来想²

摘要 目的 探讨 n-HA/明胶、 β -TCP/明胶搭载骨髓间充质干细胞(BMSCs)联合高压氧修复海水浸泡兔桡骨开放性骨缺损的效果。方法 45只新西兰大白兔,在兔双侧桡骨中段制作15 mm的骨缺损区,双前肢人工海水浸泡3 h,制成海水浸泡开放性骨缺损模型。将实验兔随机分成3组即对照组、n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组,每组15只。伤口浸泡于人工海水3 h,彻底清创后,对照组在骨缺损区单纯植入BMSCs,n-HA/明胶组植入n-HA/明胶/BMSCs, β -TCP/明胶组植入 β -TCP/明胶/BMSCs。手术后立即进行高压氧疗,每天1次,连续14 d。于手术后第4、8、12周摄片后分批处死后取材,行组织学和生物力学检测。比较各组缺损修复的效果。结果 ① X线片检查:术后4周对照组、n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组骨缺损区有薄云状骨痂阴影,阴影区域n-HA/明胶组> β -TCP/明胶组>对照组。术后8周,对照组少量骨痂形成;n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组新生骨痂大量形成。术后12周,对照组骨缺损未完成修复;n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组皮质连续性良好,髓腔再通,基本完成修复;② 骨痂灰度值测量:相同时间观察点,骨痂灰度值n-HA/明胶组> β -TCP/明胶组>对照组。术后第12周时,对照组、n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组骨痂灰度值差异有统计学意义

($P < 0.05$);③ 组织学观察:术后第4周,n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组有新生骨小梁生成,骨小梁形成量n-HA/明胶组> β -TCP/明胶组>对照组,可见部分移植的支架材料残余;术后第8周,对照组未见板层骨形成,n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组有大量板层骨形成,术后第12周,对照组少量板层骨,n-HA/明胶组、 β -TCP/明胶组大量板层骨形成,两组移植的支架材料均消失;④ 生物力学检测:术后12周各组最大抗折力n-HA/明胶组> β -TCP/明胶组>对照组,n-HA/明胶组和 β -TCP/明胶组抗折力接近于正常骨。结论 n-HA/明胶/BMSCs联合高压氧和 β -TCP/明胶/BMSCs联合高压氧均能修复海水浸泡开放性骨缺损。n-HA/明胶/BMSCs效果优于 β -TCP/明胶/BMSCs。

关键词 海水浸泡;骨缺损;高压氧;骨髓间充质干细胞;n-HA/明胶; β -TCP/明胶

中图分类号 R 683.41

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)10-1425-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.007

海水浸泡开放性骨缺损是一个新的研究领域。由于海水浸泡后骨膜成骨能力下降^[1],相关生长因子表达延迟并减弱^[2],导致海水浸泡骨缺损比单纯的骨缺损的治疗更复杂和困难,纳米羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite,n-HA)/明胶和 β -三磷酸钙(β -tricalciumphosphate, β -TCP)/明胶在治疗单纯的骨缺损中取得良好的效果。将n-HA/明胶支架移植入SD大鼠的颅骨缺损处,8周后成功修复颅骨缺损^[3]。研究^[4]表明 β -TCP/明胶作为支架搭载自体

2016-05-19 接收

基金项目:南京军区医学科科技创新重点课题(编号:11Z011)

作者单位:安徽医科大学解放军临床学院¹ 骨一科、² 骨三科,合肥 230031

作者简介:张 淦,男,硕士研究生;

程迅生,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:18909696280@163.com

tion of the survival time and survival rate after techyzoites inoculation, and BALB/c mice and Kunming mice were infected respectively with *T. gondii*. The coding sequences of virulence related effectors of GRA15 and ROP16 were amplified by PCR, and the polymorphism was compared. **Results** A total of 6 strains of *T. gondii* were isolated from cats, and genotyping results showed that 2 strains belonged to type Chinese 1(ToxoDB#9) and 4 strains were found to be ToxoDB#205. All of the six isolates exhibited strong virulence, leading to 100% death after 5~7 days in BALB/c mice and 9~12 days in Kunming mice post-infection. The analysis of virulence related GRA15 and ROP16 genes showed that the Chinese 1 strains possessed the polymorphic GRA15_{II} and ROP16_{I/III}, whereas the ToxoDB#205 strains carried GRA15_{II} and ROP16_{II}. **Conclusion** The *T. gondii* isolates collected from Xuzhou have limited genotypes which share the polymorphic virulence effectors.

Key words *Toxoplasma gondii*; genotyping; virulence; GRA15; ROP16