

调控宿主细胞自噬对弓形虫在宿主细胞内增殖的影响

张 婧¹, 高冬梅², 汪学龙¹

摘要 目的 研究细胞自噬在弓形虫增殖复制中的作用。方法 分别用自噬抑制剂 Bafilomycin A1 及自噬诱导剂氯化锂作用于人胚胎成纤维细胞 (HEF), 然后将弓形虫 (RH 株) 速殖子悬液分别以虫/细胞 2 : 1、4 : 1、8 : 1、16 : 1 感染 HEF 细胞, 作用 1、2、4、8、24、48、96 h。采用吖啶橙 (AO) 荧光染色和丹酰尸胺 (MDC) 荧光染色检测 HEF 细胞自噬情况, 采用 Giemsa 染色检测不同时间点的弓形虫感染复制动力学。结果 AO 和 MDC 荧光染色结果表明自噬抑制剂 Bafilomycin A1 及自噬诱导剂氯化锂可分别抑制和促进 HEF 细胞自噬, Giemsa 染色结果显示使用自噬诱导剂氯化锂可以促进弓形虫在 HEF 细胞内的增殖, 使用自噬抑制剂 Bafilomycin A1 可以抑制弓形虫在 HEF 细胞内的增殖。结论 调控宿主细胞自噬可调控弓形虫增殖复制。

关键词 弓形虫; 自噬; 增殖

中图分类号 R 382.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)03-0290-04

弓形虫病是由专性细胞内寄生的弓形虫病原体引起的一种人兽共患寄生虫病, 广泛流行于我国和世界各地^[1-2]。传统的抗弓形虫药物包括乙胺嘧啶、磺胺嘧啶等, 但由于这些药物的毒副作用较大, 用药时间长, 只能杀死速殖子, 停药后易复发, 因此极大限制了应用, 至今仍没有理想的治疗弓形虫病的药物^[3-4]。所以掌握弓形虫在宿主细胞内增殖、致病机制以及与宿主细胞之间的相互作用也是解决弓形虫感染的必要途径。自噬是细胞通过单层或双层膜包裹待降解物形成自噬体, 自噬体与溶酶体的融合形成自噬溶酶体, 接着进行多种酶的消化和降解, 以实现细胞自身的代谢需要和某些细胞器的更新。自噬是细胞中初级溶酶体处理内源性底物的重要过程, 同时参与维持内环境的稳定和细胞内蛋白代谢的平衡, 在清除废物、结构重建以及细胞的生长

发育中起着突出作用^[5]。有研究^[6]表明细胞自噬在弓形虫感染增殖过程中很可能起重要作用。该研究通过检测弓形虫感染诱导宿主细胞自噬的程度, 使用抑制剂、促进剂分别抑制和促进细胞自噬情况下, 检测自噬对弓形虫感染增殖的影响; 该研究将掌握自噬在弓形虫感染致病中的作用, 建立弓形虫感染致病机制新的理论基础, 并为有效的干预和治疗提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 人胚胎成纤维 (human embryonic fibroblasts, HEF) 细胞 HEF 细胞购自安徽医科大学病原生物学教研室。

1.2 实验动物 5~7 周龄雌性昆明小鼠购自安徽医科大学实验动物中心。室温 20~22℃ 下给予自由进食、饮水, 标准颗粒饲料喂养。

1.3 主要试剂和器材 胎牛血清、DMEM 培养基购于美国 HyClone 公司; 胰蛋白酶、双抗、Giemsa 染色粉剂等购于上海生物工程公司; 培养瓶购于美国 Corning 公司; 自噬抑制剂 Hydroxychloroquine、Bafilomycin A1、自噬诱导剂氯化锂、Carbamazepine 以及吖啶橙 (acridine orange, AO) 和丹酰尸胺 (monodansylcadaverine, MDC) 荧光染色试剂均购于美国 Sigma 公司。

1.4 方法

1.4.1 弓形虫 RH 株的保种和纯化 生理盐水适当稀释后接种小鼠腹腔, 每鼠约接种 3×10^6 个速殖子, 体内常规转种 2 代后用于实验。无菌抽取小鼠腹水以 PBS (pH 7.2) 缓冲液洗涤 2 次, 纯化速殖子后备用。

1.4.2 MDC 荧光染色检测细胞自噬 MDC 是自噬空泡的标志物, 通过 MDC 染色可以观察判断细胞自噬过程的发生。取对数生长期 HEF 细胞, 经消化制成细胞悬液, 以 5×10^4 细胞/孔数接种于 24 孔板中, 细胞贴壁后, 按照实验分组: ① 正常组 (HEF 细胞); ② 对照组 (RH 株 + HEF 细胞); ③ 自噬抑制剂组 (自噬抑制剂 + RH 株 + HEF 细胞); ④ 自噬诱导剂组 (自噬诱导剂 + RH 株 + HEF 细胞)。在药物处理 24 h 后, PBS 洗 2 遍, 弃上清液, PBS 洗 2 遍, 加

2014-11-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81101273); 安徽省教育厅高校省级自然科学研究项目 (重点) (编号: KJ2013A149)

作者单位: ¹ 安徽医科大学病原生物学教研室, 合肥 230032

² 安徽医科大学第三附属医院 (合肥市第一人民医院) 检验科, 合肥 230061

作者简介: 张 婧, 硕士研究生;

汪学龙, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wan-gx1964@163.com

入终浓度 $50 \mu\text{g/L}$ MDC 37°C 孵育 60 min , PBS 洗 2 遍。激光共聚焦显微镜观察细胞自噬空泡的变化并进行荧光定量分析。

1.4.3 AO 荧光染色检测细胞自噬 AO 荧光染色 取 AO 粉末溶于 PBS (0.01 mmol/L , pH 7.4) 中 终浓度 $0.5 \mu\text{g/ml}$, 分装后 4°C 保存备用。取 $22 \text{ mm} \times 22 \text{ mm}$ 的盖玻片用无水乙醇浸泡去脂 , 紫外线消毒后放入 6 孔培养板中。取对数生长期 HEF 细胞以 1×10^6 细胞/孔密度接种于 6 孔板内盖玻片上培养 , 每孔 2 ml , 加药组加入自噬抑制剂使终浓度达 10 nmol/L , 处理 24 h 后 , 倾去培养液 , 用 PBS 洗涤 2 次 , 加入 AO 染色液使终浓度为 $0.5 \mu\text{g/ml}$, 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中孵育 10 min , 用 PBS 洗涤 2 次 , 取出盖玻片 , 激光共聚焦荧光显微镜下观察、拍照。

1.4.4 Giemsa 染色 称取 Giemsa 粉末 0.5 g , 加几滴甘油研磨 , 再加入甘油 , 使加入的甘油总量为 33 ml 。 56°C 中保温 $90 \sim 120 \text{ min}$ 。加入 33 ml 甲醇 , 置棕色瓶中保存 , 此为 Giemsa 原液。使用时按要求用 PBS 稀释。一般稀释 10 倍。

2 结果

2.1 MDC 荧光染色检测细胞自噬空泡的变化

MDC 是自噬空泡的标志物 , 通过 MDC 染色可以观察判断细胞自噬过程的发生。MDC 染色结果表明单独应用弓形虫作用于 HEF 细胞时 , 细胞内无明显自噬空泡出现。MDC 染色结果表明单独应用弓形虫感染 HEF 细胞时 , 细胞内无明显自噬空泡出现 , 荧光定量分析平均荧光强度为 $(99.1 \pm 15.3) \%$, 与对照组 $(109.6 \pm 35.2) \%$ 平均荧光强度相比 , 差异无统计学意义。使用自噬诱导剂作用 24 h , 细胞内大量自噬空泡积聚 , 平均荧光强度为 $(209.8 \pm 62.8) \%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) , 表明有自噬发生; 当加入自噬抑制剂作用 , 与对照组相比 , 自噬空泡明显减少 , 平均荧光强度为 $(88.2 \pm 24.1) \%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) , 见图 1。

2.2 AO 染色检测自噬泡的变化 细胞酸性自噬泡 (acidic vesicular organelles , AVO) 的形成是细胞自噬的特异过程。AO 染色将细胞内的酸性部分染成亮红色 , 红色荧光的亮度表明酸性强度。单独应用弓形虫感染 HEF 细胞时 , 细胞内无明显自噬泡出现 , 荧光定量分析平均荧光强度为 $(88.6 \pm 13.1) \%$, 与对照组 $(99.3 \pm 21.5) \%$ 平均荧光强度相比差异无统计学意义。使用自噬诱导剂作用 24 h , 细胞内大量红色酸性泡积聚 , 平均荧光强度为

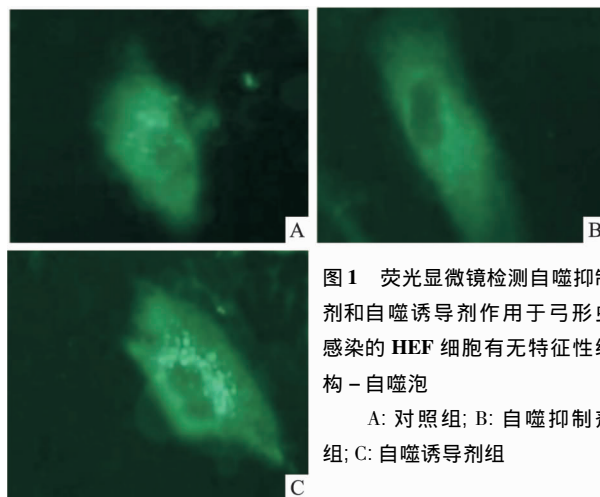


图 1 荧光显微镜检测自噬抑制剂和自噬诱导剂作用于弓形虫感染的 HEF 细胞有无特征性结构—自噬泡

A: 对照组; B: 自噬抑制剂组; C: 自噬诱导剂组

$(196.8 \pm 43.2) \%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) , 表明有自噬发生; 当加入自噬抑制剂作用 , 与对照组相比 , 酸性小泡明显减少 , 平均荧光强度为 $(70.6 \pm 36.1) \%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) , 见图 2。荧光显微镜下观察酸性自噬小体的形成 , 流式细胞仪检测酸性自噬小体的形成随时间的延长数量越来越多 , 96 h 细胞被弓形虫破坏殆尽 , 见表 1。

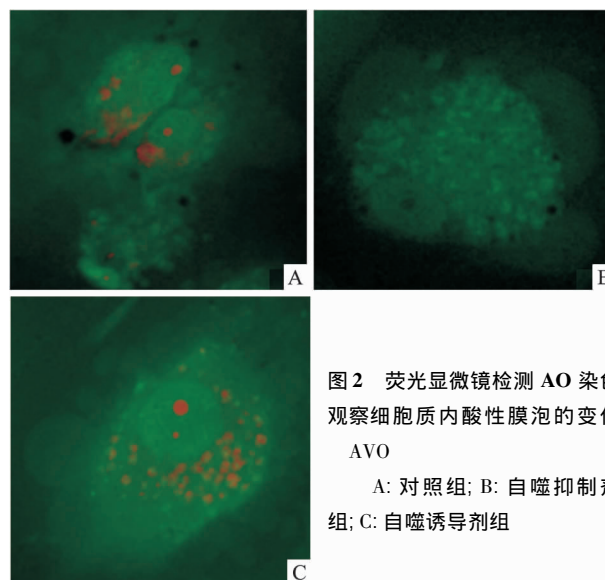


图 2 荧光显微镜检测 AO 染色观察细胞内酸性膜泡的变化 AVO

A: 对照组; B: 自噬抑制剂组; C: 自噬诱导剂组

表 1 AO 荧光染色流式细胞仪检测 HEF 细胞 AVO 的形成 ($\bar{x} \pm s$)

时间 (h)	AVO (%)
1	8.1 ± 2.3
8	$18.2 \pm 4.6^*$
24	$24.0 \pm 3.8^*$
48	$36.3 \pm 4.2^{**}$
96	0^{**}

与感染 1 h 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

结果显示 , 在不同时间段 AO 荧光染色流式细

胞仪检测 HEF 细胞酸性小泡形成的过程中,在作用 8 h 组、24 h 组和 48 h 组、96 h 组与感染 1 h 组相比自噬泡形成数量差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) ,表明酸性自噬小体的形成随时间的延长数量越来越多,直到 96 h 细胞被弓形虫完全破坏。

2.3 弓形虫速殖子在细胞内增殖动力学检测 分别加入 HEF 细胞于含 1 块盖玻片 18 mm × 18 mm 6 孔板内,当细胞融合至 80% 时,另换 2% FCS 的 DMEM 高糖培养液(含 2 mmol/L L-谷氨酰胺 25 mmol/L),12 h 各培养孔加入纯化的速殖子 1×10^4 个于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养,共培养 1、4、8、12、24、48 和 96 h 后取出 6 孔板内盖玻片以 PBS(pH 7.2)洗涤 2 次,甲醇固定后吉氏染色 30 min,油镜观察细胞内虫体增殖情况并照相记录,抑制细胞形态略有残缺。HEF 细胞与弓形虫共培养 8 h 绝大多数速殖子进入 HEF 细胞;随着细胞内虫体的进一步增殖,24 h 可见虫体在 HEF 细胞中形成明显的“假包囊”排列成菊花状,虫体在 HEF 明显增殖,有少量速殖子胀破细胞游离于培养液中;96 h HEF 细胞被破坏殆尽,见图 3。

为了进一步探讨自噬抑制剂和自噬诱导剂作用后对弓形虫增殖的影响,在弓形虫接种 HEF 细胞的不同时间点里本实验选取 24 h 为检测时间点,3 组细胞内的弓形虫速殖子个数所占百分比。自噬抑制剂组细胞内弓形虫速殖子个数主要以 2~8 个为主,自噬诱导剂组细胞内弓形虫速殖子个数主要以 4~8 个为主,前者与后者相比,增殖速率明显放慢,见图 4。

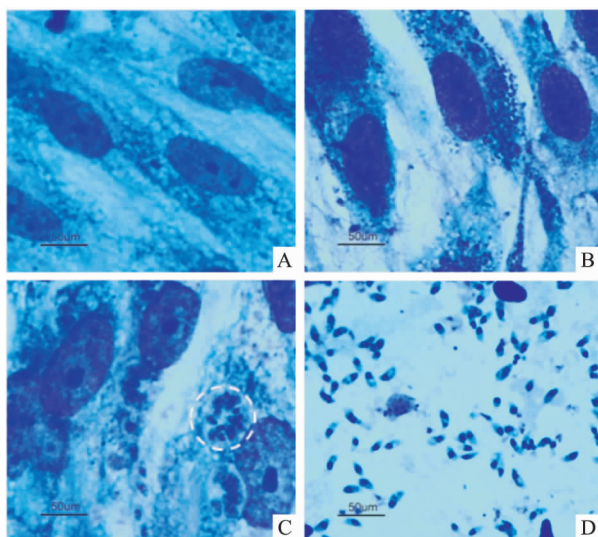


图 3 油镜下 Giemsa 染色不同时间点弓形虫增殖情况 ×200

A: 正常细胞; B: HEF 细胞与弓形虫共培养 8 h; C: HEF 细胞与弓形虫共培养 24 h; D: HEF 细胞与弓形虫共培养 96 h

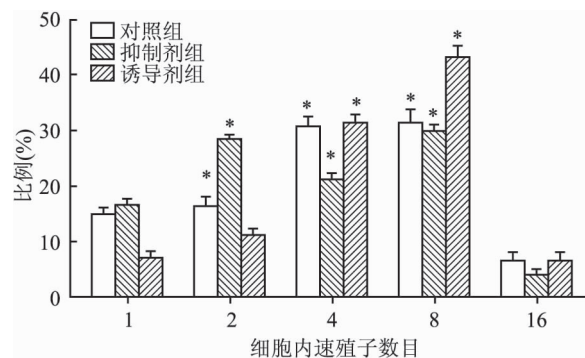


图 4 自噬作用 24 h 带虫空泡中速殖子的数目及所占比例与细胞内速殖子个数为 1 和 16 个所占百分数比较: * $P < 0.05$

3 讨论

在弓形虫感染的过程中,通过影响宿主细胞自噬信号通路很可能改变弓形虫的复制及其致病效应。程序性细胞死亡是病原体一种重要的致病机制以及病原体与宿主细胞相互作用的途径^[7]。程序性细胞死亡作为宿主细胞机体免疫的一部分,现已发现对许多病原体都有作用,有些病原体能够被细胞程序性死亡直接杀伤,也可以通过获得性免疫被间接消灭,但是也有某些病原体通过进化能够逃避程序性细胞死亡的识别,甚至通过程序性细胞死亡为自身的复制和发育提供便利^[8-9]。程序性细胞死亡分为两种:Ⅰ型为细胞凋亡,Ⅱ型是自噬性细胞死亡。自噬和凋亡在一些情况下相互联系,并可能有着共同的调节机制:①自噬可能是细胞凋亡的一种前提—自噬发生于细胞凋亡之前并进一步上调后者的活性;②在一些细胞内环境,促进自噬可抑制凋亡,同样抑制自噬可能增加细胞对凋亡信号的敏感性;③细胞自噬和细胞凋亡在一些环境下可相互转化^[10]。

在自噬的检测方面,MDC 染色法和 AO 染色法等是目前使用较多的方法,常被认为是自噬检测的金标准之一。MDC 是自噬空泡的标志物,通过 MDC 染色可以观察判断细胞自噬过程的发生;AO 是一种弱碱性荧光染料,可选择性滞留在酸性的溶酶体及自噬小体中。荧光显微镜下可进行定性判断,若配合流式细胞仪,则可进行定量分析,因而也被用于自噬的检测^[11]。本研究通过利用 MDC 荧光染色和吖啶橙荧光染色的方法证明相同细胞在不同时间点不同诱导因素可诱发不同的自噬结果^[12-13]。

使用自噬抑制剂、促进剂作用后不同时间点的弓形虫感染复制动力学检测以及形态检测,判断自

噬在弓形虫增殖复制过程中的作用; 进行弓形虫形态学检测: Giemsa 染色观察弓形虫速殖子在各组细胞内的寄生; 弓形虫增殖检测: Giemsa 染色观察弓形虫速殖子在细胞内的胞内平均增殖数; 观察分析并记录 Giemsa 染色检测弓形虫在不同时间点不同诱导因素下的增殖情况。结果显示, 8 h 的共培养绝大多数速殖子进入 HEF 细胞, 随着细胞内虫体的进一步增殖, 24 h 可见虫体在 HEF 细胞中形成明显的“假包囊”在细胞内排列成菊花状, 虫体在 HEF 明显增殖, 有少量速殖子胀破细胞游离于培养液中, 在 96 h HEF 细胞被完全破坏。所以选取 24 h 为检测点发现 3 组细胞内的弓形虫速殖子个数所占百分比, 结果显示诱导剂组比抑制剂组增殖速率明显加快。结果表明弓形虫感染后可促进 HEF 细胞自噬, 促进 HEF 细胞自噬可以促进弓形虫在宿主细胞内的增殖, 调控宿主细胞自噬可调控弓形虫增殖复制。

参考文献

- [1] Hide G, Morley E K, Hughes J M, et al. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii* [J]. *Parasitol*, 2009, 136(14): 1877–85.
- [2] Elmore S A, Jones J L, Conrad P A, et al. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention [J]. *Trends Parasitol*, 2010, 26(4): 190–6.
- [3] Feldman D M, Timms D, Borgida A F. Toxoplasmosis, parvovirus and cytomegalovirus in pregnancy [J]. *Clin Lab Med*, 2010, 30(3): 709–20.
- [4] Pereira-Chioccia V L, Vidal J E, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients [J]. *Future Microbiol*, 2009, 4(10): 1363–79.
- [5] Boothroyd J C. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field [J]. *Int J Parasitol*, 2009, 39(8): 935–46.
- [6] Da Silva R C, Langoni H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation [J]. *Parasitol Res*, 2009, 105(4): 893–8.
- [7] 孔晓霞, 张宏宇, 钟加滕, 等. 自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤在 H₂O₂ 引起的神经胶质瘤 U251 细胞损伤中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(4): 695–8.
- [8] Lüder C G, Gross U. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, 289: 219–37.
- [9] Subauste C S. Autophagy in immunity against *Toxoplasma gondii* [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2009, 335: 251–65.
- [10] Harr M W, Distelhorst C W. Apoptosis and autophagy: decoding calcium signals that mediate life or death [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(10): a005579.
- [11] Walsh C M, Edinger A L. The complex interplay between autophagy, apoptosis, and necrotic signals promotes T-cell homeostasis [J]. *Immunol Rev*, 2010, 236: 95–109.
- [12] Hedrick S M, Chen I L, Alves B N. Intertwined pathways of programmed cell death in immunity [J]. *Immunol Rev*, 2010, 236: 41–53.
- [13] 赛克, 陈忠平. STAT3 信号转导通路抑制剂诱导胶质瘤干细胞产生自噬的研究 [J]. *中国神经肿瘤杂志*, 2011, 9(2): 88–92.

Influence of regulation of host cell autophagy on the proliferation of *Toxoplasma gondii* in host cells

Zhang Jing¹, Gao Dongmei², Wang Xuelong¹

(¹ Dept of Parasitology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ² Dept of Laboratory, The First People's Hospital of Hefei, Hefei 230061)

Abstract Objective To study the role of autophagy in the replication process of *Toxoplasma* proliferation. **Methods** As the experimental groups, these cells were infected by *Toxoplasma gondii* tachyzoites at given MOI (2:1, 4:1, 8:1, 16:1). Host cell autophagy was detected through acridine orange staining and MDC fluorescence staining at different time points (1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 hs post infection). Detect the condition of HEF cells autophagy with acridine orange fluorescence staining and MDC fluorescence staining, and detect the replication kinetics of *Toxoplasma gondii* infection at different time points using Giemsa staining. **Results** The results of acridine orange and MDC fluorescence staining showed that autophagy inhibitors and inducers could inhibit and promote the autophagy of HEF cells respectively. From the results of Giemsa staining, it was found that the proliferation of *Toxoplasma gondii* in HEF cells could be promoted with autophagy inducers and be inhibited with autophagy inhibitors. **Conclusion** The regulation on autophagy of host cell could regulate the proliferation and replication of *Toxoplasma gondii*. **Key words** *Toxoplasma gondii*; autophagy; proliferation