

## 基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.001765

## 金诺芬通过促进自噬对弓形虫增殖的影响

张雪薇,魏骏萌,李 锴,邹晓毅,姜 蓉,陆 合,张 静,武卫华

(重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心、重庆医科大学病原生物学系,重庆 400016)

**【摘要】目的:**金诺芬对弓形虫速殖子的作用及对弓形虫感染小鼠的自噬初步探讨。**方法:**透射电子显微镜观察用药前后刚地弓形虫超微结构的变化;采用免疫荧光、免疫组化和免疫印迹法检测感染有弓形虫的脑组织中自噬蛋白 LC3 的变化。HE 染色观察金诺芬作用前后小鼠脑部的弓形虫速殖子变化。**结果:**透射电镜显示 10  $\mu\text{g/mL}$  组(B 组)的弓形虫速殖子内部结构被破坏,虫体细胞膜破裂,细胞质均质样改变,20  $\mu\text{g/mL}$  组(C 组)的虫体内容物溢出,线粒体及粗面内质网消失,核固缩,核膜断裂,细胞质出现许多空泡,严重者虫体崩解呈均质样改变。免疫荧光结果显示实验组( $77.49 \pm 15.68$ )的 LC3 蛋白的表达量较对照组( $53.81 \pm 15.24$ )明显增加( $P=0.001$ )。免疫组化结果显示用药后( $1\ 208.55 \pm 580.07$ )的 LC3 蛋白表达量比对照组( $544.54 \pm 225.04$ )明显增高( $P=0.000$ )。免疫印迹法检测结果显示用药后( $41\ 738.52 \pm 0.00$ )的 LC3 蛋白表达量比对照组( $25\ 383.88 \pm 607.34$ )明显增高( $P=0.000$ )。用药后( $218.80 \pm 21.17$ )寄生在小鼠脑部的弓形虫速殖子增殖数量明显少于对照组( $495.40 \pm 31.91$ )( $P=0.000$ )。**结论:**金诺芬在体外有破坏弓形虫速殖子的作用,同时金诺芬可以提高弓形虫感染小鼠的自噬水平从而抑制弓形虫增殖。

**【关键词】**刚地弓形虫;金诺芬;超微结构;自噬**【中图分类号】**R382.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-03-13Effects of Auranofin on the proliferation of *Toxoplasma gondii* by promoting autophagy

Zhang Xuewei, Wei Junmeng, Li Kai, Zou Xiaoyi, Jiang Rong, Lu He, Zhang Jing, Wu Weihua

(Research Center for Molecular Medicine and Tumor of Chongqing Medical University;

Department of Pathogenic Biology, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To study the effect of Auranofin on *Toxoplasma gondii* tachyzoites and the autophagy in mice infected with *Toxoplasma gondii*. **Methods:** The changes of *Toxoplasma gondii* ultrastructure were observed before and after treatment by transmission electron microscopy. The changes of autophagy protein LC3 in brain tissue with *Toxoplasma gondii* were detected by immunofluorescence, immunohistochemistry and immunoblotting. The changes of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the brain of mice were observed by HE staining. **Results:** The transmission electron microscopy showed that in 10  $\mu\text{g/mL}$  group (group B), the internal structure of *Toxoplasma tachyzoite* was destroyed, the cell membrane of the worm was ruptured, and the cytoplasm structure changed, while in 20  $\mu\text{g/mL}$  group (group C), the insect body content overflowed, the mitochondria and rough endoplasmic reticulum disappeared, karyopyknosis was shown, nuclear membrane was ruptured, many vacuoles presented in the cytoplasm, and in more serious situation, the insect body collapsed and presented a homogenous change. The results of immunofluorescence showed that the expression of LC3 protein in the experimental group ( $77.49 \pm 15.68$ ) was significantly higher than that in the control group ( $53.81 \pm 15.24$ ) ( $P=0.001$ ). The results of immunohistochemistry showed that the expression of LC3 protein was significantly increased after treatment ( $1\ 208.55 \pm 580.07$  vs.  $544.54 \pm 225.04$ ) ( $P=0.000$ ). The results of immunoblotting assay showed that after treatment, the expression of LC3 protein was significantly higher ( $41\ 738.52 \pm 0.00$ ) than that in the control group ( $25\ 383.88 \pm 607.34$ ) ( $P=0.000$ ). After treatment, the proliferation of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites in the brain of mice was significantly less ( $218.80 \pm 21.17$ ) than that in the control group ( $495.40 \pm 31.91$ ) ( $P=0.000$ ).

**Conclusions:** Auranofin can destroy *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro, and meanwhile promote the autophagy of mice infected with *Toxoplasma gondii* to inhibit the proliferation of *Toxoplasma gondii*.

**【Key words】** *Toxoplasma gondii*; Auranofin; ultrastructure; autophagy

作者介绍:张雪薇, Email: 948022891@qq.com,

研究方向:寄生虫方向。

通信作者:张 静, Email: zhangjingcq@sohu.com。

基金项目:重庆市科学技术委员会资助项目(编号: cstc2015jcyjA10017)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180528.1020.010.html>

(2018-05-29)

弓形虫病是一种人兽共患疾病。在免疫功能正常的个体中通常是无症状的,但免疫功能低下的病人感染后往往出现严重的临床表现<sup>[1]</sup>,包括脑脊髓炎和多器官功能衰竭,在大多数情况下,如果不及治疗可能会导致死亡<sup>[2]</sup>。另外,在新生儿的先天性弓形虫病可造成脑积水、小头畸形、各种中枢神经系统疾病<sup>[3]</sup>,以及经常性脉络膜视网膜炎<sup>[4]</sup>。目前,针对弓形虫脑病治疗的典型药物以乙胺嘧啶结合氨苯磺胺为主<sup>[5]</sup>,但疗效不佳,且多数人难以耐受长期化疗,乙酰螺旋霉素<sup>[6]</sup>虽副作用小,但不能有效杀灭弓形虫,对弓形虫病的治疗作用不大,故选用适当的免疫调节剂或者联合用药就起到很重要的意义<sup>[7]</sup>。金诺芬<sup>[8]</sup>目前被证实有对炎症通路和硫醇的氧化还原酶有双重抑制作用,成为肿瘤治疗和微生物感染治疗的一个新的候选药物<sup>[9]</sup>,最近已显示出广阔的抗寄生虫活性如抗血吸虫<sup>[10]</sup>、溶组织阿米巴,因此希望探索金诺芬对于弓形虫的作用。自噬<sup>[11]</sup>是一种十分保守且普遍存在真核细胞内的通过溶酶体降解受损蛋白质、受损细胞器或病原微生物的过程。随着对自噬的深入研究<sup>[12]</sup>,研究者发现自噬也存在于寄生性原虫中并在其生长、发育、繁殖及感染过程中发挥重要作用。实验主要是在探索金诺芬对于宿主细胞自噬的影响,观察金诺芬是否能够提高宿主自噬功能,为以后金诺芬作用于弓形虫的研究提供新的方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 试剂与仪器 金诺芬购于鼎国生物技术有限公司,批号:MB7354;RPMI1640 培养液、新生胎牛血清、二甲基亚砷(DMSO)、组织蛋白提取试剂、CA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 配胶试剂盒、封闭液、抗体稀释液、兔抗 LC3 多克隆抗体、小鼠抗  $\beta$ -action 单克隆抗体、HRP 标记山羊抗小鼠的 IgG 抗体、Cy3 标记山羊抗兔 IgG 抗体及 ECL 化学发光液、SP 法免疫组化试剂盒均购于鼎国生物技术有限公司。共聚焦显微镜(TCS SP2,德国)、冰冻切片机(CM1850,德国)、透射电镜(Hitachi-7500,Hitachi)、日本显微生物照相系统(Olympus-45,日本)。

1.1.2 实验细胞 人乳腺癌 231 细胞(MDA-MB-231)由重庆医科大学基础医学院病原生物学实验室提供及保种。

1.1.3 刚地弓形虫虫株 RH 速殖子虫株由重庆医科大学基础医学院病原生物学实验室提供,由本实验室通过液氮冻存法和小鼠腹腔接种法进行传代保存。

1.1.4 昆明小鼠 24 只,雌性,平均体质量 18~22 g,购自重

庆医科大学实验动物中心。

### 1.2 实验方法

1.2.1 弓形虫感染动物模型建立 从液氮中取出 RH 虫株,迅速置于 37 ℃水浴中温育 30 min,复苏速殖子,经离心洗涤,接种于小鼠腹腔,3 次传代后纯化弓形虫速殖子,用含 3% 小牛血清的 RPMI1640 培养液调整其浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL。弓形虫 RH 株感染小鼠连续传 2~3 代后,冲洗发病小鼠腹腔收集弓形虫速殖子,显微镜下计数,调整虫体密度为  $5 \times 10^3$  个/mL,建立小鼠感染模型,每只小鼠接种 0.2 mL(即小鼠感染弓形虫  $1 \times 10^3$  个/只)。将 24 只小鼠随机分成对照组和药物组,感染 24 h 后开始对小鼠进行药物干预(1 mL/d),对照组小鼠注射等量的生理盐水,连续干预 7 d。

1.2.2 细胞培养制备 MDA-MB-231 细胞在 RPMI1640 培养基中培养,待细胞生长至密度达瓶底 90% 时进行传代。倒掉旧培养液,以 PBS 冲洗细胞 2 次,每个 T25 培养瓶内再加入 1 mL 细胞消化液,室温下静置 2~5 min,于倒置显微镜下观察细胞回缩,细胞之间间隙明显时,立即加入 3 mL 细胞培养液中止消化,吸管充分吹打使细胞分散并从瓶壁上脱落,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,再加入 1 mL 细胞培养液反复吹打形成单个分散细胞悬液,以 1:3~1:4 分瓶传代。及时观察细胞生长情况,需要时进行传代,平均 1~3 d 传代 1 次。

1.2.3 各浓度金诺芬的配制 取 100 mg 药物溶解在 40 mL 二甲基亚砷(DMSO)中,加入 RPMI1640 培养基 60 mL,配成浓度为 1 mg/mL 的储备液,使用时用 RPMI1640 培养基稀释成不同浓度溶液。分别配制了 5、10、20、100、200、500  $\mu$ g/mL 6 个浓度,留存备用。通过预实验的结果分析,体内实验选取 20  $\mu$ g/mL 浓度对小鼠的伤害性较小。

1.2.4 超微结构的观察 将  $1 \times 10^6$  个弓形虫速殖子接种于细胞培养瓶内,待虫体进入细胞开始增殖后,分别加入金诺芬终浓度为 10  $\mu$ g/mL(B 组)、20  $\mu$ g/mL(C 组)的药液,并设置对照组(A 组),置于细胞培养箱内培养,24 h 后收集弓形虫滋养体,先将虫液装入 10 mL 离心管,4 000 r/min 离心 10 min,离心底部将形成松散的虫体团块,吸去上清液,保留 1.5 mL 虫液,再将虫体团块吹散,均匀分布于虫液中。将重悬的虫液装入 1.5 mL 的 EP 管中,10 000 r/min 离心 15 min,EP 管底部将形成虫体团块,吸去上清液,沿管壁缓慢加入 1% 锇酸固定液,切勿破坏虫体团块。将已加入固定液的 EP 管置于 4 ℃过夜,次日送到电镜室做透射电镜。

1.2.5 免疫组化检测 LC3 蛋白的变化 乙醚麻醉小鼠,断颈处死小鼠后,无菌取出新鲜脑组织置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,送去切片室做石蜡切片(片厚 10  $\mu$ m),将石蜡切片置于 60 ℃ 2 h,以使切片紧密粘附,用二甲苯常规脱蜡,将脱蜡的切片经各级浓度的酒精至水,柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)热修复抗原,滴 3%  $H_2O_2$ -甲醇溶液 15 min,以灭活内源性过氧化物酶,10% 山羊血清封闭 30 min,兔抗 LC3 多克隆抗体(1:200)4 ℃孵育过夜,HRP 标记山羊抗兔 IgG(1:50)抗体 37 ℃湿盒孵育 30 min,DAB 显色,苏木素复染,脱水,中性树胶封片,镜下观察,并用 Image-Pro Plus6.0 进行分析。

**1.2.6 免疫荧光检测 LC3 蛋白的变化** 乙醚麻醉小鼠,自左心室灌注生理盐水,4%多聚甲醛灌注固定,取出脑组织,20%蔗糖 4℃脱水过夜,冰冻切片连续横切片(片厚 10 μm),10%山羊血清封闭 1 h,兔抗 LC3 多克隆抗体(1:200)4℃孵育过夜,Cy3 标记山羊抗兔 IgG(1:50)抗体 37℃湿盒孵育 1 h,DAPI 染色,抗荧光淬灭封片液封片,激光共聚焦显微镜下观测,并用 Image-Pro Plus6.0 进行分析。

**1.2.7 Western blot 检测 LC3 蛋白的变化** 断颈处死小鼠后,无菌环境取出脑组织,用组织蛋白提取试剂盒提取脑组织总蛋白,BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量蛋白浓度,相同质量的样品(50 μg),5%~12% SDS-PAGE 凝胶恒压分离,湿转到 PVDF 膜上,封闭液室温封闭 2 h,兔抗 LC3 多克隆抗体(1:500)和小鼠抗 β-actin 单克隆抗体(1:1 000)4℃孵育过夜,加入 HRP 标记山羊抗兔的二抗(1:2 000),室温孵育 2 h,化学发光液显影,并用 Image J 图像分析软件进行分析,对照组和实验组每组设置两个复孔,进行 3 次重复实验。

**1.2.8 脑组织病理切片** 乙醚麻醉小鼠,断颈处死小鼠后,用灭菌的新的无油污锋利的组织剪分别剪下正常感染组和实验组小鼠的脑组织。用眼科剪挑破包膜,置于干净的青霉素安剖瓶中,加瓶体积 2/3 的新鲜配制的 4%多聚甲醛,常温下密闭固定 24~48 h,然后送去切片室做组织切片及 HE 染色,然后在显微镜下进行观察计数。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 24.0 进行统计学分析,所得到的数值均以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,方差齐的组采用两独立样本 *t* 检验,方差不齐的组采用 *t'* 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 金诺芬体外作用于弓形虫速殖子超微结构的变化

金诺芬作用于弓形虫 24 h 后虫体的细胞膜破裂,细胞质均质样改变,内容物溶出,线粒体及粗面内质网消失(B 组),核固缩,核膜断裂,细胞质出现许多空泡,严重者虫体崩解呈均质样改变(C 组)。结果如图 1 所示(箭头所示)。

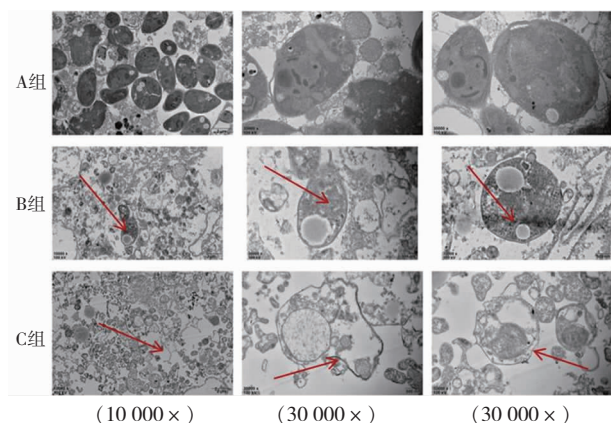


图 1 透射电镜观察刚地弓形虫的超微结构

### 2.2 LC3 蛋白的变化

免疫组化法检测 LC3 蛋白的阳性表达量,用积分光密度值(IOD)作为观测指标,可见实验组的胞浆棕色颗粒数目明显多于对照组,经 *t'* 检验,实验组的 LC3 蛋白表达高于对照组,差异有统计学意义( $P=0.001$ ;图 2);免疫荧光法检测 LC3,共聚焦显微镜下显示细胞成梭型紧密排列,DAPI 作为对照,中间有圆形细胞核,可见实验组胞浆内的红光反应相比于对照组更明显,经两独立样本 *t* 检验,实验组的 LC3 蛋白表达高于对照组,差异有统计学意义( $P=0.000$ ;图 3);Western blot 检测 LC3 蛋白表达水平,显示实验组在 18 kD 处条带的反应较对照组明显,经 *t'* 检验,实验组的 LC3 蛋白表达高于对照组,差异有统计学意义( $P=0.000$ ;图 4)。免疫组化、免疫荧光及 Western blot 均显示金诺芬作用后 LC3 蛋白表达水平较对照组高。见表 1。

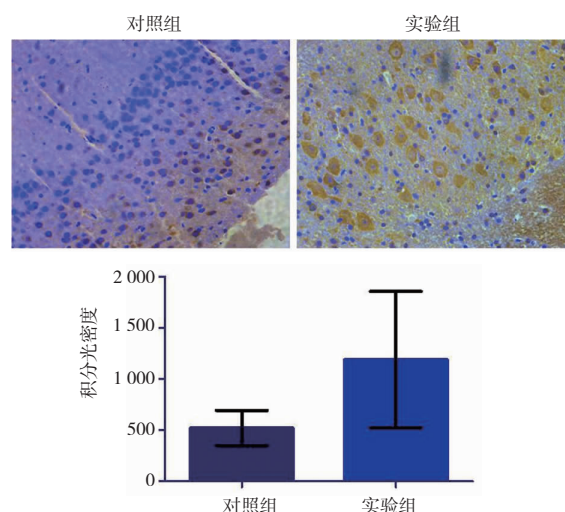


图 2 免疫组化图片显示实验组(20 μg/mL)和对照组的积分光密度值的数值

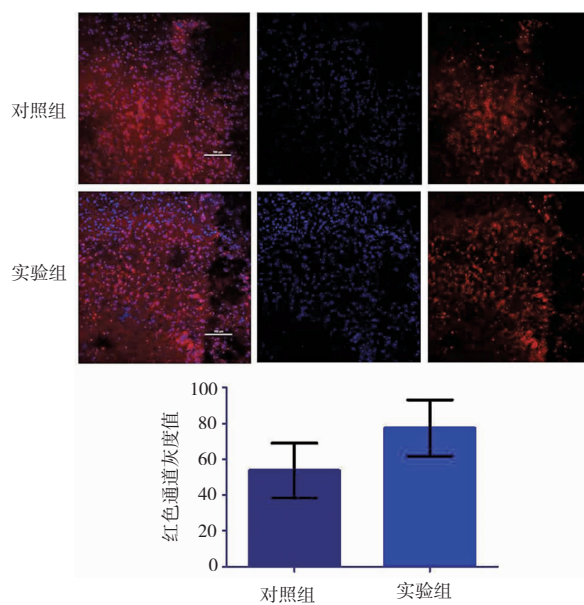
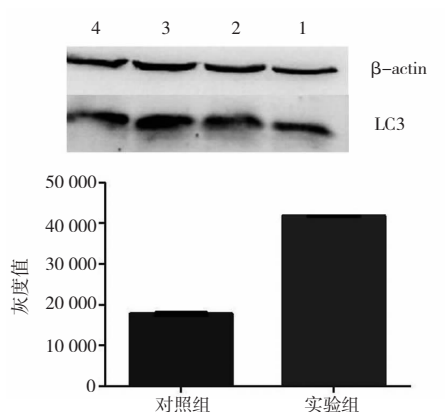


图 3 共聚焦成像显示实验组(20 μg/mL)和对照组的红色通道的灰度值



1、2 为对照组脑组织;3、4 为实验组脑组织(20 μg/mL)

图 4 金诺芬治疗前后小鼠脑组织自噬 LC3 蛋白表达水平变化

表 1 检测两组 LC3 蛋白的平均灰度值

| 组别           | 免疫组化法             | 免疫荧光法         | Western blot       |
|--------------|-------------------|---------------|--------------------|
| 对照组          | 544.54 ± 225.04   | 53.81 ± 15.24 | 25 383.88 ± 607.34 |
| 实验组          | 1 208.55 ± 580.07 | 77.49 ± 15.68 | 41 738.52 ± 0.00   |
| <i>t</i> ' 值 | -4.133            | 4.052         | 53.856             |
| <i>P</i> 值   | 0.001             | 0.000         | 0.000              |

注:与对照组比较, $P < 0.05$ 

### 2.3 脑组织病理切片变化

高倍视野下观察用药前寄生在小鼠脑部的弓形虫速殖子增殖数量明显,周围浸润有炎症细胞。用药后( $218.80 \pm 21.17$ )寄生在小鼠脑部的弓形虫速殖子增殖数量较对照组( $495.40 \pm 31.91$ )明显减少。经两独立样本 *t* 检验,差异有统计学意义( $t = -16.151, P = 0.000$ )。周围有少量炎症细胞浸润(图 5,红圈所示为弓形虫速殖子结构,呈月牙形状)。

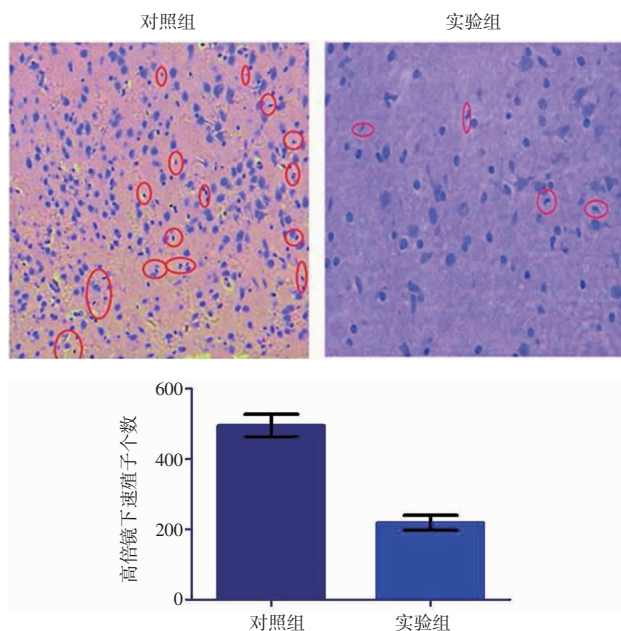


图 5 HE 染色显示小鼠脑组织的组织病理学变化

## 3 讨论

弓形虫是一种专性细胞内寄生的顶复门寄生虫,只能在人和动物的有核细胞内生长繁殖,不能单独培养,目前常用动物或细胞为载体进行培养增殖,所以建立稳定的体内外培养体系对后续进行弓形虫相关研究显得尤为重要。因癌症患者具有免疫力下降、常使用糖皮质激素,易突发急性弓形虫感染等特点,所以在细胞选择中特意选择乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞。

自噬是真核生物进化中高度保守的细胞内过程,其功能是降解和回收细胞内大分子物质和受损细胞器<sup>[13]</sup>。选择性自噬<sup>[14]</sup>在对抗病原生物的过程中扮演了重要角色,是宿主细胞重要的免疫应答反应,但刚地弓形虫也可诱导表皮生长因子受体激活而防止自噬蛋白介导的寄生虫杀伤作用<sup>[15]</sup>。因此,需要寻找一些可以促进自噬的药物,让自噬一直保持在一个高表达水平,通过自噬来降解和杀伤原虫<sup>[16]</sup>。LC3 蛋白是与自噬相关的一个极其重要的蛋白<sup>[17]</sup>,当自噬发生的时候,LC3 的表达增加。通过检测 LC3 的表达情况,从而判断出自噬发生的水平。在实验结果中看到,金诺芬处理组较正常感染组 LC3 表达增加,而通过透射电镜也可以比较直观地观察金诺芬体外作用于弓形虫之后,其结构所发生的破坏。将弓形虫转到小鼠体内之后,在金诺芬的作用下,小鼠脑部的速殖子数量降低,推测金诺芬是可以作为一种自噬诱导剂<sup>[16]</sup>来影响弓形虫在宿主细胞内的寄生。细胞自噬<sup>[12]</sup>具有保守性且可诱导自噬性细胞死亡,为疾病治疗提供了新的潜在药物靶点。通过研究细胞自噬与寄生虫原虫的关系,进一步探索自噬在弓形虫感染过程中的作用,可以为研究抗弓形虫新药提供新的方向。最近的研究表明,金诺芬对恶性疟原虫、利什曼原虫、溶组织内阿米巴等寄生虫都有相当好的治疗效果,对于以上寄生虫的破坏,主要是作用于硫氧还蛋白系统<sup>[18]</sup>。因为弓形虫对于机体的伤害主要有弓形虫脑炎的发生,所以后续可以从金诺芬能否透过血脑屏障<sup>[19]</sup>来研究。如果金诺芬能够进入血脑屏障,那么可以推测出它的起效浓度及起效时间的范围,全面评估金诺芬在影响弓形虫感染的功效。

## 参 考 文 献

[1] 唐纯海,廖振南,吴明伟,等. 脑弓形虫病的临床分析研究[J]. 中