

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00485

刚地弓形虫 ME49 株对体外培养的小鼠胎盘滋养细胞凋亡的影响

葛璞^{1,2}, 车艺^{1,2}, 林玲^{1,2}, 黄开顺³, 叶彬^{2,4*}

1. 重庆医科大学病理生理学教研室, 重庆 400016
2. 重庆医科大学分子医学与肿瘤中心, 重庆 400016
3. 重庆医科大学生命科学院, 重庆 400016
4. 重庆医科大学病原生物学教研室, 重庆 400016

[摘要] **目的** 研究刚地弓形虫 ME49 株对体外培养的孕期小鼠胎盘滋养层细胞凋亡的影响。**方法** 制备小鼠胎盘滋养层细胞并分别接种于不同细胞培养板, 对照组加入 DMEM 高糖培养液孵育, 实验组加入相同体积不同密度 (2×10^6 /ml、 4×10^6 /ml、 8×10^6 /ml) 弓形虫速殖子培养 8 h 后, Annexin V-FITC/PI 染色细胞后上流式细胞仪检测各个时间点细胞凋亡率变化, 以蛋白质印迹法分析凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达。**结果** 流式细胞仪检测弓形虫感染后的滋养层细胞凋亡率较对照组有升高趋势 ($P < 0.05$), 呈量效依赖性, 弓形虫密度 8×10^6 /ml 组 8 h 凋亡率最高, 为 28.37%; 荧光显微镜观察, 随弓形虫感染密度增加, 滋养层细胞凋亡数目增多。蛋白质印迹法检测刚地弓形虫 ME49 株作用于滋养层细胞 8 h 后实验组的 Bax、Bcl-2 蛋白表达 (与 β -actin 比值) 各为 1.24 ± 0.05 、 1.37 ± 0.03 、 1.78 ± 0.04 与 1.15 ± 0.03 、 1.09 ± 0.05 、 0.97 ± 0.01 , 较对照组的比值 (1.17 ± 0.06 和 1.23 ± 0.02) 有明显的改变 ($P < 0.05$)。**结论** 刚地弓形虫 ME49 株可促进体外培养的孕期小鼠滋养层细胞正常凋亡, 其机制可能与滋养细胞 Bax 表达上调和 Bcl-2 表达下调有关。

[关键词] 刚地弓形虫 ME49 株; 寄生虫性妊娠并发症; 滋养细胞; 细胞凋亡

[中图分类号] R 382.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)05-0485-04

Effect of *Toxoplasma gondii* ME49 strain on apoptosis of mouse placental trophoblastic cells

GE Pu^{1,2}, CHE Yi^{1,2}, LIN Ling^{1,2}, HUANG Kai-shun³, YE Bin^{2,4*}

1. Department of Pathophysiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
2. Center for Molecular Medical and Tumor Research, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
3. Department of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
4. Department of Pathobiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of *Toxoplasma gondii* ME49 strain on the apoptosis of mouse placental trophoblastic cells *in vitro*. **Methods** Mouse placental trophoblastic cells (concentration of 5×10^6 /ml) were cultured in the different cell culture vessels. The cells were treated for 8 h with different concentrations of *Toxoplasma gondii* ME49 strain (the concentration of tachyzoites was 2×10^6 /ml, 4×10^6 /ml, and 8×10^6 /ml, respectively). FCM was used to examine the apoptosis rates of the placental trophoblastic cells stained with the fluorescent dye of Annexin V-FITC/PI; fluorescence microscopy was used to observe the changes of cellular morphology, and Western blotting analysis was used to detect the protein levels of Bax and Bcl-2. **Results** The trophoblastic cells infected with *Toxoplasma gondii* ME49 strain showed a higher apoptosis compared to the normal cells ($P < 0.05$), and the apoptosis rates increased with the concentration of tachyzoites in the infected groups. The highest apoptosis rate was 28.37% which was found 8 h after culture with 8×10^6 /ml tachyzoites. Fluorescence microscope observed that the apoptosis of trophoblastic cells increased with the increase of *Toxoplasma gondii*. Western blotting analysis showed that the relative expression levels of Bax and Bcl-2 were 1.24 ± 0.05 , 1.37 ± 0.03 , 1.78 ± 0.04 , and 1.15 ± 0.03 , 1.09 ± 0.05 , 0.97 ± 0.01 , respectively, which were significantly different from those of the control group (1.17 ± 0.06 , 1.23 ± 0.02 , $P < 0.05$). **Conclusion** Infection with *Toxoplasma gondii* ME49 strain can promote the apoptosis of mouse placental trophoblastic cells *in vitro* through up-regulating Bax expression and down-regulating Bcl-2 expression.

[Key words] *Toxoplasma gondii* ME49 strain; parasitic pregnancy complications; trophoblastic cells; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(5):485-488]

[收稿日期] 2010-01-15 **[接受日期]** 2010-03-25

[作者简介] 葛璞, 硕士. E-mail: pu_ge@hotmail.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 023-68485288, E-mail: yebina@sohu.com

弓形虫是一种人兽共患病的机会性细胞内寄生原虫,也是人类宫内感染致胎儿畸形的四大病原体之一。孕妇感染弓形虫可通过胎盘垂直传播进入胎儿体内,造成流产、早产、死胎、畸形等各种严重后果^[1],因此关于孕期弓形虫感染的研究一直是国内外医学研究的热点^[2-3]。目前已证实,包括弓形虫在内的细胞内寄生的原虫可以通过复杂的分子机制来改变宿主细胞的凋亡途径维持生存、逃避免疫^[4]。本实验选用毒力较弱的刚地弓形虫 ME49 株感染妊娠 BALB/c 小鼠滋养层细胞,观察弓形虫 ME49 株对其凋亡率的影响,为探讨不同类型弓形虫与不良妊娠发生的机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 刚地弓形虫 ME49 株由美国马里兰寄生虫研究中心提供, BALB/c 小鼠体质量 (20.0±2.0) g [购自重庆医科大学实验动物中心, SCXK(渝)2007-0001], DMEM 高糖培养液为美国 Gibco 公司产品,胎牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品, CF-11 纤维素为英国 Whatman 公司产品,细胞凋亡 Annexin V-FITC 染色试剂盒为碧云天生物技术研究所国外分装产品, RIPA 裂解液为北京百泰克生物技术有限公司产品,兔抗鼠 Bax、Bcl-2 单克隆抗体(一抗)、硝酸纤维素膜均为 Santa Cruz 公司产品, HRP-羊抗兔 IgG(二抗)、丙烯酰胺均为南京凯基科技发展有限公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 弓形虫速殖子的纯化、培养 取 3×10^6 个弓形虫速殖子接种 BALB/c 小鼠,转种 72 h 后用生理盐水收集腹腔液, $1\ 400 \times g$ 离心 8 min 去上清,加 PBS(pH 7.2)洗 2 次, $1\ 400 \times g$ 离心 8 min 去上清,加 PBS(pH 7.2)制备虫体悬液。CF-11 纤维素加 PBS 溶液搅拌均匀,于 4℃ 冰箱过夜。弃上清,加 PBS(pH 7.2)装柱,高 3 cm,保持柱面有一定液体,将分离到的弓形虫悬液快速过柱,收集滤液, $1\ 400 \times g$ 离心 8 min 去上清,沉淀即为虫体。收集弓形虫虫体镜下计数后用完全 RPMI 1640(含 10% 胎牛血清)重悬,调整速殖子密度分别为 2×10^6 /ml、 4×10^6 /ml、 8×10^6 /ml。

1.3 小鼠胎盘滋养细胞的制备 取发情期雌性 BALB/c 小鼠和 10 周龄雄性 BALB/c 小鼠,等比例合笼,次晨检查,雌鼠出现阴道栓标志交配成功,记为受孕 0.5 d。于受孕 7.5 d 时,无菌条件下取雌鼠妊娠子宫,剥出晶胚,用显微镊和精细针头将外胎盘

锥从胎外外胚层连接处切下。取盖玻片,滴加浓度为 0.1 μg/ml 的 Laminin 100 μl,风干后置于 6 孔板底,将外胎盘锥接种于盖玻片上,加入 DMEM 培养液 2 ml/孔,于 37℃、体积分数 5% CO₂ 条件下培养 3 d,此时可见大量滋养层细胞游出贴壁生长。剔除外胎盘锥组织块,以 2 mg/ml 胰蛋白酶消化贴壁细胞,进行传代培养^[5]。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 取对数生长期滋养层细胞(细胞密度为 5×10^6 /ml)分别接种于 4 个 50 ml 细胞培养瓶内过夜,待细胞贴壁后换液。对照组加入 4 ml 新鲜培养液,实验组分别加入不同密度弓形虫速殖子(2×10^6 /ml、 4×10^6 /ml、 8×10^6 /ml),培养 8 h 后,加入 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次($1\ 000 \times g$,离心 5 min),收集 2×10^5 个细胞后,加入 500 μl 的 Binding Buffer 悬浮细胞,加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μl 碘化丙啶(propidium iodide, PI)混匀,室温避光反应 10 min 后进行 FACScan(Becton-Dickinson 公司生产)检测凋亡率。

1.5 荧光显微镜观察滋养层细胞凋亡 按照 1.4 项下方法取弓形虫感染 8 h 后的滋养层细胞制备细胞悬液,加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μl PI 混匀,室温避光反应 10 min 后荧光显微镜下观察细胞情况。

1.6 蛋白质印迹法检测 Bax 和 Bcl-2 表达 按说明书用裂解液及反复冻融处理收集细胞,以蛋白提取液与凝胶加样缓冲液混匀,进行 SDS-PAGE 后转膜,封闭加入一抗兔抗鼠 Bax、Bcl-2 单克隆抗体, PBS 洗膜 3 次, TBS 洗膜 2 次,每次 10 min。加入二抗 HRP-羊抗兔 IgG 工作液, PBS 洗 2 次, TBS 洗 2 次,每次 10 min。浸于适量 ECL 化学发光试剂中 1 min 取出,室温条件下干燥并用保鲜膜包置于暗盒中,压片曝光 3~60 min,洗片。

1.7 统计学处理 数据采用 SPSS 12.0 统计软件进行组间比较 *t* 检验。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 滋养层细胞分别加入密度为 2×10^6 /ml、 4×10^6 /ml、 8×10^6 /ml 刚地弓形虫 ME49 速殖子作用 8 h 后,用 Annexin V-FITC 与 PI 双染,流式细胞仪分析细胞凋亡情况(右下象限),各实验组凋亡率 21.15%、23.46%、28.37% 均较

空白对照组(19.51%)高($P < 0.05$, 图 1)。

2.2 荧光显微镜观察 将作用 8 h 的不同组滋养层细胞置荧光显微镜下观察, 可见早期凋亡细胞, 细胞膜着绿色, 细胞核拒染(图 2)。结果表明, 随着弓形虫密度增加, 镜下细胞凋亡数目增多。

2.3 蛋白质印迹法检测 Bax 和 Bcl-2 表达 弓形虫作用前滋养层细胞可见 Bax、Bcl-2 蛋白的表达。作用 8 h 后, Bax 表达条带呈浓度依赖性升高, Bcl-2 表达条带呈密度依赖性下降, 以 8×10^6 /ml 密度的弓形虫速殖子组最为明显(图 3、表 1)。

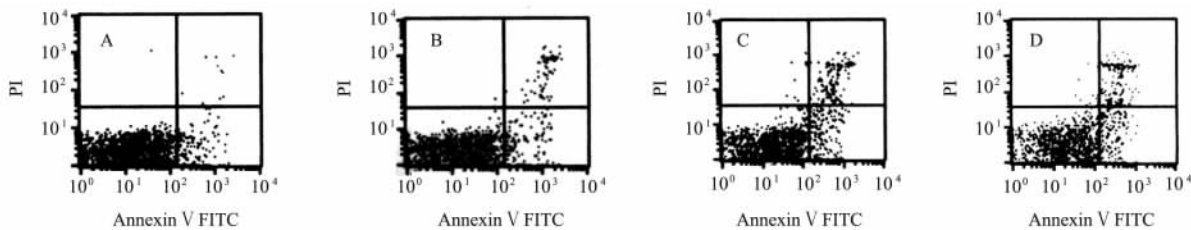


图 1 不同密度刚地弓形虫 ME49 株作用滋养层细胞 8 h 后凋亡率的变化

Fig 1 Apoptotic rate of trophoblast cells treated with different concentrations of *Toxoplasma gondii* ME49 strain after 8 h

A: Blank control (no *Toxoplasma gondii* infection); B-D: Trophoblast cells infected with different concentrations of *Toxoplasma gondii* ME49 strain (the concentration of tachyzoites was 2×10^6 /ml, 4×10^6 /ml, and 8×10^6 /ml, respectively)

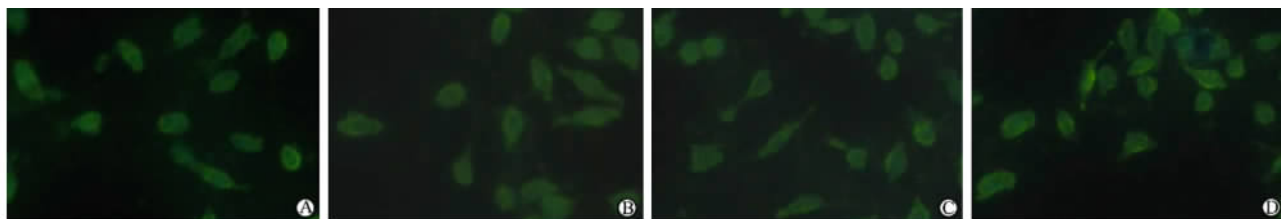


图 2 荧光染色滋养层细胞凋亡形态学变化

Fig 2 Apoptotic morphology of trophoblast cells under fluorescence microscope (stained by Annexin V-FITC)

A: Blank control (no *Toxoplasma gondii* infection); B-D: Trophoblast cells infected with different concentrations of *Toxoplasma gondii* ME49 strain (the concentration of tachyzoites was 2×10^6 /ml, 4×10^6 /ml, and 8×10^6 /ml, respectively). Original magnification: $\times 400$

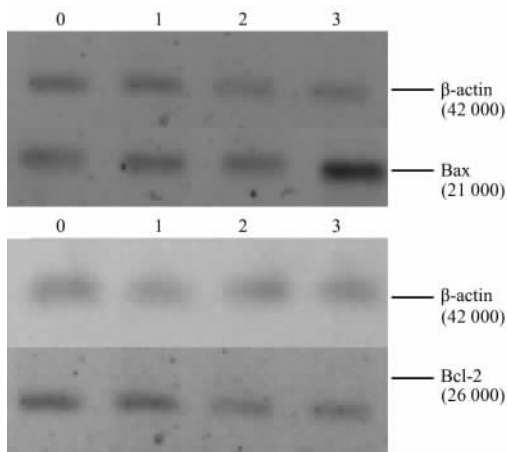


图 3 蛋白质印迹检测滋养层细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达

Fig 3 Expression of Bax, Bcl-2 in trophoblast cells as detected by Western blotting analysis

0: Blank control; 1: 2×10^6 /ml; 2: 4×10^6 /ml; 3: 8×10^6 /ml

3 讨论

细胞凋亡是一个主动的由基因决定的自动结束生命的过程, 对于多细胞生物个体发育的正常进行、自稳平衡的保持起着非常关键的作用。同时它也是

胎盘组织正常的生理现象, 在整个妊娠期, 时空调控的细胞凋亡在绒毛发育和母体对胎儿的免疫耐受中发挥重要作用。Smith 等^[6]研究发现胎盘中大部分细胞凋亡发生在滋养层细胞($>50\%$), 适度的细胞凋亡有利于滋养层细胞正常生长更替。而孕期滋养层细胞的凋亡率改变, 可以导致流产或胚胎的损害。

表 1 刚地弓形虫 ME49 株对滋养层细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

Tab 1 Effect of *Toxoplasma gondii* ME49 strain on expression of Bax, Bcl-2 in trophoblast cells

($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	Bax	Bcl-2
0 (blank control)	1.17 ± 0.06	1.23 ± 0.02
2×10^6 /ml	$1.24 \pm 0.05^*$	$1.15 \pm 0.03^*$
4×10^6 /ml	$1.37 \pm 0.03^*$	$1.09 \pm 0.05^*$
8×10^6 /ml	$1.78 \pm 0.04^*$	$0.97 \pm 0.01^*$

* $P < 0.05$ vs blank control group

刚地弓形虫作为一种专性细胞内寄生的原虫, 可通过系列广泛有效的途径入侵并操控宿主细胞以

存活,感染弓形虫后,宿主细胞内大量涉及代谢、转录、蛋白质的靶向运输等细胞性活动的基因会发生相应的改变。其中,对细胞的增殖与凋亡的影响一直是研究热点^[7-8]。ME49株系刚地弓形虫种弱毒株,妊娠妇女感染ME49株型后,往往无明显临床症状。但其通过胎盘垂直传播率却相当高,达20%~50%,对胚胎造成严重损害^[9]。近年来有关ME49虫株宫内感染的研究已逐渐得到国外专家的高度重视^[9-10],但国内的研究开展较少。

本研究选用毒力较弱的刚地弓形虫ME49株体外复制感染小鼠胎盘滋养层细胞的模型。小鼠胎盘和人类胎盘有着相似的组织源性,一向为研究先天弓形虫感染的理想的模型^[10]。且滋养细胞直接由原代培养而得,细胞生物性状尚未发生很大的变化,能较真实反映体内状态;同时又可以人为控制实验条件,提供合适的实验标本^[11]。本研究采用流式细胞技术和蛋白质印迹法分别检测了各实验组滋养细胞的凋亡率及细胞凋亡基因Bcl-2家族的表达情况,为探讨ME49株与不良妊娠发生的可能相关机制提供更为可靠的理论依据。结果初步表明,刚地弓形虫ME49株能促进小鼠胎盘滋养细胞的凋亡,其机制可能与滋养细胞Bax表达上调和Bcl-2表达下调有关。

[参考文献]

- [1] 苏晓平,祁荣,高晓玲.沈阳市孕妇弓形虫感染的临床研究[J].沈阳医学院学报,2009,11:145-147.
- [2] Senegas A, Villard O, Neuville A, Marcellin L, Pfaff A W, Steinmetz T, et al. *Toxoplasma gondii*-induced foetal reoepsin resorption in mice involves interferon-gamma-induced apopto-

sis and spiral artery dilation at the maternofetal interface[J]. Int J Parasitol, 2009, 39:481-487.

- [3] Cabañas-Cortés M A, Reyes-Maldonado E, Montiel-Cervantes L, Domínguez-López M L, Jiménez-Zamudio L, García-Latorre E. *Toxoplasma gondii*: effect of maternal infection in the development of lymphoid organs of BALB/c neonates[J]. Exp Parasitol, 2009, 121:279-287.
- [4] Lüder C G, Stanway R R, Chaussepied M, Langsley G, Heussler V T. Intracellular survival of apicomplexan parasites and host cell modification[J]. Int J Parasitol, 2009, 39:163-173.
- [5] 刘超,孙宗全,陈家军,苏刚,史嘉玮,刘金平,等.输注负载胎盘滋养层细胞抗原的受者aaDC延长小鼠移植心的存活时间[J].中华器官移植杂志,2009,30:5-9.
- [6] Smith S C, Baker P N, Symonds E M. Placental apoptosis in normal human pregnancy[J]. Am J Obstet Gynecol, 1997, 177:57-65.
- [7] Denkers E Y. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003, 39:193-203.
- [8] Graumann K, Hippe D, Gross U, Lüder C G. Mammalian apoptotic signalling pathways: multiple targets of protozoan parasites to activate or deactivate host cell death[J]. Microbes Infect, 2009, 11:1079-1087.
- [9] Pezerico S B, Langoni H, Da Silva A V, Da Silva R C. Evaluation of *Toxoplasma gondii* placental transmission in BALB/c mice model[J]. Exp Parasitol, 2009, 123:168-172.
- [10] Barbosa B F, Silva D A, Costa I N, Pena J D, Mineo J R, Ferro E A. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys allosus* [J]. Placenta, 2007, 28:624-630.
- [11] 符爱珍,蔡永广,李英勇.两种人早孕绒毛滋养层细胞原代培养方法[J].中国妇幼保健,2008,23:3716-3719.

[本文编辑] 尹茶

· 消息 ·

我校药学院隆重举行合作成立“棒槌岛海洋生物科技研究所”签约仪式

2010年5月7日下午,合作成立“棒槌岛海洋生物科技研究所”签约仪式在我校药学院三楼会议室隆重举行,药学院柴逸峰院长、范小伟政委、张红武副院长等出席了签约仪式。海洋药物研究中心易杨华教授和大连棒槌岛海洋生物科技股份有限公司王天涌总经理分别代表双方在协议上签字。易杨华教授兼任该研究所所长。

大连棒槌岛海洋生物科技股份有限公司是农业产业化国家重点龙头企业,是我国最早开始海参工业化生产、目前国内规模最大的专业海参企业。海洋药物研究中心自1995年至今完成了对我国海域28种海参的系统研究,在海参种类、分离鉴定化合物数、新化合物和活性成分发现、专利授权方面均大大超过了俄罗斯、日本、韩国、加拿大等国。

合作成立棒槌岛海洋生物科技研究所,将充分利用药学院海洋药物研究中心在海参研究方面的科研优势和大连棒槌岛海洋生物科技股份有限公司的企业资源及市场优势,促进产、学、研的有力结合,更好地实现科技创新和提高企业生产力的双赢目标。