

DOI:10.13350/j.cjpb.231206

• 论著 •

中国III型弓形虫潜伏性感染前后宿主脑转录组差异分析*

代莉莎,谢环环,解晓曼,朱文菊,孙航,张俊梅,王琦,董宏杰,周贝贝,赵桂华,徐超,尹昆**

(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)

【摘要】目的 分析中国III型弓形虫虫株感染小鼠脑组织前后转录组表达差异,鉴定与小鼠行为变化相关的差异表达基因(differentially expressed genes,DEGs)。**方法** 取感染和未感染中国III型弓形虫LHG株的小鼠脑组织,镜下观察脑包囊;提取总RNA,构建转录组文库,采用Oxford Nanopore Technologies单分子实时测序平台对感染组和对照组文库进行第三代纳米孔高通量测序,以Fold Change ≥ 1.5 且P<0.05作为筛选标准,从测序结果中筛选DEGs并对其进行Gene Ontology(GO)富集分析,Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)富集分析和Protein-Protein interaction network(PPI network)蛋白互作网络分析。**结果** 共检测到722个DEGs,其中708个表达上调,14个表达下调。GO功能注释表明DEGs主要富集在宿主的突触刺激应答和免疫应答过程,同时也与行为调控、成瘾、化学突触传递等生物学过程有关。KEGG富集分析表明,多数DEGs富集在寄生虫和病毒感染相关通路。将基因表达差异幅度大、GO注释和KEGG富集排名均靠前的DEGs取交集,共筛选到10个关键上调基因(Cd74,Ccl5及H2家族的H2-Aa、H2-Ab1、H2-Eb1、H2-D1、H2-Q7、H2-K1、H2-DMb1、H2-Qa基因)和5个关键下调基因(Gng4、Frzb、Hes5、Mfge8、Cartpt基因)。对关键DEGs进行PPI互作分析,H2蛋白家族及CD74的蛋白互作连接度大,节点多。**结论** MHC类分子可能是弓形虫LHG株感染小鼠过程中宿主抵抗其感染的主要因子,弱毒弓形虫株可能通过干扰宿主的神经元干细胞功能和兴奋性神经递质代谢通路导致宿主出现精神行为异常。

【关键词】 刚地弓形虫中国III型;转录组;脑包囊;纳米孔三代测序

【中图分类号】 R382.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)12-1393-08

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Dec;18(12):1393-1400.]

Analysis of host brain transcriptome differences before and after latent infection of *Toxoplasma gondii* Chinese III genotype strain

DAI Lisha, XIE Huanhuan, XIE Xiaoman, ZHU Wenju, SUN Hang, ZHANG Junmei, WANG Qi, DONG Hongjie, ZHOU Beibei, ZHANG Guihua, XU Chao, YIN Kun (Shandong Institute of Parasitic Diseases, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jining 272033, Shandong, China) ***

【Abstract】 Objective To analyze the transcriptome expression differences in the brain tissues of mice before and after infection with the Chinese strain of *Toxoplasma gondii* III, and to identify the differentially expressed genes (DEGs) related to the behavioral changes of mice. **Methods** The brain tissues of mice infected and uninfected with the LHG strain of *T. gondii* were collected, and the brain cysts were observed under a microscope. TotalRNA was extracted to construct a transcriptome library. The third-generation Nanopore high-throughput sequencing was performed on the libraries of the infected and control groups using the Oxford Nanopore Technologies single-molecule real-time sequencing platform. Fold Change ≥ 1.5 and P<0.05 were used as screening criteria. DEGs were screened from the sequencing results and Gene Ontology (GO) enrichment analysis was performed. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis and Protein-Protein interaction network (PPI network) Protein interaction network analysis.

Results A total of 722 DEGs were detected, of which 708 were up-regulated and 14 were down-regulated. GO functional annotation showed that DEGs were mainly enriched in the host synaptic stimulus response and immune response, and were also related to biological processes such as behavioral regulation, addiction, and chemical synaptic

* 【基金项目】 山东省自然科学基金项目(No. ZR2022MH197);济宁市重点研发计划项目(No. 2022YXNS152);山东省医药卫生科技发展计划项目(No. 202101050270);国家卫生健康委寄生虫病原与媒介生物学重点实验室开放研究课题(No. NHCKFKT2022-15);山东省泰山学者项目工程(No. tsqn202103186);山东第一医科大学学术提升计划项目(No. 2019QL005)。

** 【通讯作者】 尹昆, E-mail: kyin@sdfmu.edu.cn

【作者简介】 代莉莎(1995-),女,河南驻马店人,硕士研究生在读,主要从事寄生虫研究。E-mail: 675172057@qq.com

transmission. KEGG enrichment analysis showed that most DEGs were enriched in parasite and viral infection-related pathways. The intersection of DEGs with large differences in gene expression and GO annotation and KEGG enrichment ranking was taken. A total of 10 key up-regulated genes (Cd74, Ccl5 and H2-Aa, H2-Ab1, H2-Eb1, H2-D1, H2-Q7, H2-K1, H2-DMb1, H2-Qa genes) and 5 key down-regulated genes (Gng4, Frzb, Hes5, Mfge8, Cartpt) were screened. PPI interaction analysis of key DEGs showed that H2 protein family and CD74 protein interaction was highly connected and had many nodes. **Conclusion** MHC molecules may be the main factor of host resistance to *T. gondii* infection in mice during the infection with the LHG strain of *T. gondii*. The attenuated *T. gondii* strain may cause mental and behavioral abnormalities in the host by interfering with the neuronal stem cell function and excitatory neurotransmitter metabolism pathway.

【Key words】 *Toxoplasma gondii* type III in China; transcriptome; brain cysts; Nanopore third generation sequencing

弓形虫属于顶复门原虫，胞内寄生，可在全球范围内感染几乎所有温血动物，造成急性或慢性弓形虫病。目前，全球有30%~50%的人接触或感染了弓形虫。从世界分布看，弓形虫在西欧、南美和非洲国家尤为普遍^[1]，部分欧美发达国家人群感染率从美国的10%到法国、哥伦比亚和巴西的50%以上不等^[2-4]。2018年我国的一项弓形虫病调查显示人群感染率为8.2%，动物为23.7%^[5]。

弓形虫感染可分为急性感染期和慢性感染期两个阶段，急性期弓形虫主要以速殖子方式迅速侵染宿主的血液、眼部、内脏等多个器官^[6]，可对免疫缺陷病人造成严重危害，如弓形虫脑炎就是艾滋病人常见的致死病因^[7]。对免疫功能正常的个体来说，急性感染期并不明显，但侵入宿主的弓形虫往往可以从速殖子转化为缓殖子，并形成组织包囊。组织包囊可见于肌肉和脑部，以脑包囊尤为常见。脑包囊可对宿主脑组织产生持续性感染，并诱发宿主的精神行为障碍^[8]。研究表明，在啮齿类动物模型中潜伏性弓形虫感染可导致宿主发生明显的行为改变，包括天然恐惧的丧失、认知功能下降等，但改变方式多集中在被感染动物出现探索欲加强、天然恐惧感下降等可能增加被捕食风险的行为上^[9]。人潜伏性弓形虫感染与精神疾病也具有相关性，相关的精神障碍疾病囊括精神分裂症、抑郁及自杀倾向、老年痴呆、“路怒症”引发的交通事故、甚至创业行为等^[10]。汪涛等^[11]报道弓形虫感染可能改变人类总体人格的发展变化趋势。

弓形虫属只有一个种，即刚地弓形虫，由于遗传的多样性分为众多基因型，通常根据其对小鼠致病力的差异分为I型、II型和III型^[12]。不同基因型虫株具有不同的遗传背景，对宿主的致病力及其在宿主中成囊能力差距极大。其中以I型虫株致病力较强，代表虫株是RH株，仅一个速殖子就可造成小鼠的死亡，会引起人先天性弓形虫病和弓形虫眼病。II型和III型虫株致病力相对较弱，通常致死剂量≥10³个速殖子^[13]。II型代表虫株有PRU和ME49，III型代表虫株有VEG、CTG等。虽然II型和III型虫株低剂量感

染小鼠致病力较弱，但小鼠也会终身呈慢性感染状态^[14]。II型虫株会引起宿主的慢性感染，是多数艾滋病患者感染的主要虫株，而III型虫株主要感染动物，感染小鼠后主要引起神经症状^[15]。Su等^[16]基于基因组单核苷酸多态性分析，将全球弓形虫株分为6个分支(Clade A-F)和16个单倍体型(Type 1-16)。中国弓形虫株的基因分型与欧洲、北美和非洲的原型克隆谱系差异很大，对219份来源于人或动物弓形虫株的分型研究显示，中国弓形虫株共存在至少12个基因型，其中Chinese I (ToxoDB #9)基因型占66.36%，为中国优势虫株，其次为I型和II型(变异型)^[17]。中国III型弓形虫分离株在人及家畜中普遍存在，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，尽管毒力较弱，但其在宿主体内更易形成包囊，且成囊能力高于中国I型分离株^[18-19]。关于中国III型弓形虫分离株对宿主的致病机制尚不明确，特别是慢性感染后，其更强的成囊性是否可对宿主产生更明显的行为操纵能力，以及感染前后III型株脑包囊对宿主脑组织的转录组影响情况均不十分清楚。

本研究拟构建中国III型LHG弓形虫株慢性感染C57BL/6J小鼠的动物模型，观察受感染前后小鼠的脑包囊成囊情况，并在此基础上采用第三代测序技术分析慢性感染前后宿主脑组织的转录组差异，以期有助于更好地理解弱毒型弓形虫株和宿主的相互作用，为深入解析弱毒型弓形虫株的致病机制和作用靶点奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物及虫株 雌雄8周龄C57BL/6J小鼠，购自济南鹏越实验动物育种有限公司。动物许可证号为SCXK(Lu)20190003。动物饲养环境保持恒温恒湿，小鼠饮用水均经高压消毒处理，饲料及垫料经紫外线消毒处理。垫料与饲料购自济南朋悦实验动物繁育有限公司。动物实验均按照山东第一医科大学伦理委

员会颁布的指导方针和规范进行,实验动物伦理批准号:w202103030088。中国Ⅲ型弓形虫LHG株由安徽医科大学沈继龙教授提供,经BALB/c小鼠以脑组织包裹灌胃感染方式传代保种。

1.2 主要试剂和仪器 Keeper保存液购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;Trizol及逆转录试剂盒Maxima H Minus Reverse Transcriptase购自美国Thermo公司;ONT SQKLSK109试剂盒购自英国Oxford Nanopore Technologies公司;NEBNext Quick Ligationg Module试剂盒购自美国NEB公司。光学显微镜购自日本OLYMPUS公司;生物安全柜购自海尔生物医疗股份有限公司;台式高速冷冻离心机购自美国Thermo公司。

2 方法

2.1 慢性弓形虫感染小鼠模型的建立 取雌性8周龄C57BL/6J小鼠10只,随机分为2组,每组5只。以灌胃接种弓形虫包裹的方法建立慢性弓形虫感染小鼠模型。实验组每只小鼠灌胃接种20个LHG脑组织包裹,对照组每只小鼠给予生理盐水灌胃处理。接种45 d后,随机处死小鼠1只,取脑组织,显微镜下观察脑包裹的数量以判断是否接种成功。

2.2 宿主脑组织标本的采集及脑包囊计数 C57BL/6J小鼠感染45 d后,麻醉处死小鼠后迅速取完整脑组织,经无菌PBS洗涤后置于培养皿中,边加PBS边研磨。收集研磨液,取20 μL在显微镜下观察有无包裹并计数。收集对照组及实验组中脑包囊数在2000个及以上的小鼠脑组织标本,将其放入Keeper保存液中,置于液氮中冻存。分别取实验组和对照组的3个脑组织标本委托北京百迈客生物科技有限公司进行全长转录组测序分析。

2.3 RNA的提取及文库构建参照 TRizol试剂盒实验步骤分别提取实验组和对照组的总RNA,采用Maxima H Minus Reverse Transcriptase试剂盒进行反转录,得到cDNA后添加switch oligo,再合成互补链。磁珠纯化cDNA,使用ONT SQKLSK109试剂盒及NEBNext Quick Ligationg Module连接direct-RNA测序接头,利用磁珠纯化cDNA。对构建的cDNA文库进行全长转录组测序,测序平台为PromethION(英国Oxford Nanopore Technologies公司)。

2.4 文库质检和高通量测序 Nanopore测序是新一代基于纳米孔的单分子实时电信号测序技术,基于Oxford Nanopore Technologies单分子实时测序平台,将测序得到的原始电信号采用Guppy软件进行basecall,得到原始序列文件,对原始序列文件进行质量评估并过滤接头、短片段及低质量的reads后,得到

总的Clean Reads,将两端均识别到引物的序列判定为全长转录本序列,对其进行分析得到差异表达基因的数据,整理分析后得到关于差异表达基因的功能注释和富集分析等相关信息。

2.5 差异表达基因(DEGs)的筛选和功能富集分析 采用DESeq2软件分析实验组与对照组的差异基因,以Fold Change ≥ 1.5 且P<0.05作为筛选标准用以选择差异表达基因(DEGs)。对DEG进行GO功能分类以及富集分析、KEGG通路分类及富集分析,筛选出与小鼠行为变化相关的差异表达基因。GO用于评估差异基因所参与富集到的生物功能包括细胞成分(CC)、分子功能(MF)和生物过程(BP)。KEGG分析用于确定DEG所富集的生物学通路。GO和KEGG分析均使用R软件和clusterProfiler软件包(v3.12.0)进行,并通过Fisher精确检验选择重要的GO术语和途径。P<0.05为GO项和富集途径的显著性阈值。

2.6 关键差异表达基因(DEGs)的互作网络分析应用 STRING网站(<https://string-db.org/>)分析候选蛋白之间的相关性,利用cytoscape软件进行PPI网络相互作用分析。

结 果

1 弓形虫脑部慢性感染模型的建立及脑包囊的鉴定

实验组小鼠灌胃感染Ⅲ型弓形虫LHG株7 d后,与对照组相比出现明显的弓背、竖毛、颤抖、活动量减少等急性感染症状。与感染RH I型、PRU II型等弓形虫株的同品系小鼠相比,感染LHG III型的小鼠在急性感染期死亡率大幅降低,感染后45 d存活率为100%。小鼠脑组织中弓形虫包囊在显微镜下清晰可见(图1),平均每只小鼠的包囊数在2 000个以上,且Ⅲ型弓形虫成囊能力强于中国I型虫株。



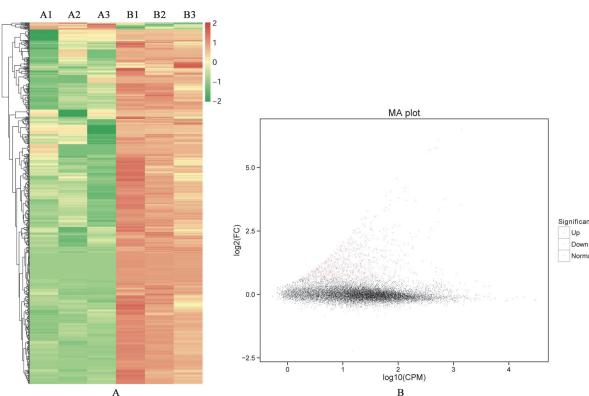
图1 中国Ⅲ型弓形虫感染小鼠脑组织包囊

Fig. 1 Brain cysts of the mouse infected with Chinese III strain of *T. gondii*

2 Nanopore长读段测序数据质控

样本质控结果表明,6个标本总RNA的A_{260/280}的范围均在2.0左右,A_{260/230}的范围均在1.8~2.2之间。RIN值均 ≥ 7.8 ,28S/18S范围均在2.8~3.2之间,Nanopore检测浓度均 >500 ng/ μ L,符合RNA

样品测序的质量要求(表1)。平均每个样品产出的Clean Reads数目为3 378 209。6个样品中的全长测序转录组和小鼠的参考转录组相比,全长序列数目均在2 543 157以上,比对到参考转录组的reads数目均占全长序列的95%以上。不同样品间基因CPM密度分布均在0~5之间,离散程度均在0~2之间,组间各样品的差异表达基因聚类分析热图(图2 A)表明,每组样品的3个生物学重复之间的一致性高于组间样品的一致性。



A 总差异表达基因聚类热图 B 总差异表达基因MA图(红点表示上调基因,绿点表示下调基因)

图2 总差异表达基因测序图

A Cluster results of total differentially expressed genes B MA plot of expression results of total differentially expressed genes (Red dots indicate up-regulated genes and green dots indicate down-regulated genes)

Fig. 2 Transcriptome sequencing results

表1 6个标本的测序质控结果

Table 1 Quality control results of 6 samples

标本 编号 Sample ID	标本 名称 Sample name	检测浓度 Nanodrop detection concentration (ng/ μL)	体积 (μL)	总量 Total amount (μg)	吸光度		RIN value	核糖体 RNA大小 28S/18S (ng/ μL)
					A260/280	A260/230		
A1	对照组 1	1471.7	29	42.6793	2.08	2.25	7.8	2.57
A2	对照组 2	590.3	29	17.1187	2.04	1.81	7.9	2.59
A3	对照组 3	1029.4	32	32.9408	2.12	1.96	8.0	2.91
B1	感染组 1	1139.7	29	33.0513	2.07	2.29	8.0	2.80
B2	感染组 2	774.8	32	24.7936	2.08	2.02	7.8	2.86
B3	感染组 3	791.3	34	26.9042	1.99	2.05	8.2	3.24

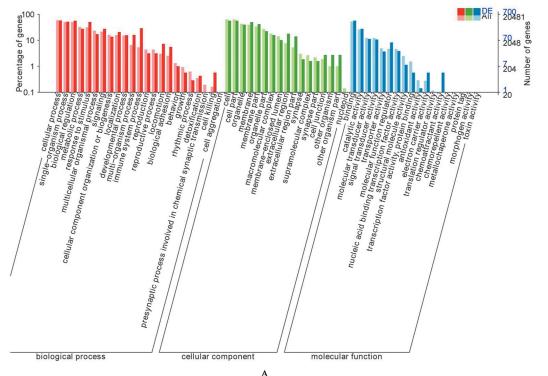
3 差异表达基因(DEGs)的筛选

根据转录组测序结果,以Fold Change(即Log2(FC)) ≥ 1.5 且P<0.05作为差异表达基因的筛选标准。两组共检测到722个DEGs,与对照组相比,感染组中有708个基因表达上调,14个基因表达下调(图2 B)。

4 差异表达基因(DEGs)的功能数据库注释及富集情况

为了明确两组间DEGs的功能,分别对上调和下

调的DEGs进行包括GO、KEGG、KOG、NR、Pfam、Swiss-Prot等多种功能数据库注释。其中GO注释富集的DEGs为700个,KEGG通路富集分析的DEGs为463个(P<0.05)。DEGs富集到58个GO条目和20条KEGG通路(P<0.05)。其中GO条目中属于生物学过程(Biological Process, BP)的有23个,属于细胞组分(Cellular Component, CC)的有17个,属于分子功能(Molecular Function, MF)的有18个。GO功能注释表明,在BP中DEGs主要集中在宿主的突触刺激应答和免疫应答过程。此外,DEGs也参与行为调控、成瘾、化学突触传递、代谢、生殖等方面。DEGs所属的CC主要集中在细胞膜外侧及免疫突触上。参与MF较多的DEGs集中在转录因子活性调控、转录因子与核酸的结合、电子载体活性等功能上(图3 A)。



A GO注释图 B KEGG富集图

图3 差异表达基因的功能富集图

A Results of GO annotation B Results of KEGG enrichment
Fig. 3 Functional enrichment results of differentially expressed genes

KEGG通路富集结果表明,DEGs主要参与大类KEGG通路,分别为细胞过程、环境信息处理、人类疾病和有机系统。在细胞过程通路中,DEGs参与较多的为吞噬体;环境信息处理通路主要表现在免疫应答方面,DEGs参与数目的为细胞因子和其受体的相互作用过程;人类疾病相关通路中除了弓形虫病通路外,多数DEGs富集在寄生虫病和病毒感染相关的通路中,如利什曼原虫病、疱疹病毒以及癌症;DEGs

参与数目较多的有机系统通路为 NOD 样受体信号通路(图 3B)。

5 候选关键差异表达基因(DEGs)及其功能注释

鉴于上调 DEGs 占绝大多数,遂进一步分析上调 DEGs 对应的功能数据库注释和富集情况。结果表明,GO 条目中排名前 20 的 BP 显著富集在免疫反应、细胞对 interferon-beta 和 interferon-gamma 的反应,以及对原生动物的抵抗方面(图 4A)。上调 DEGs 参与 KEGG 通路也集中在对抵抗外界感染的免疫反应过程。排名前 20 的 KEGG 通路显著富集在 EB 病毒感染、利什曼原虫病、弓形虫病、TH17 细胞分化、NOD 样受体信号通路和抗原加工提呈等方面(图 4B)。将基因表达上调幅度大、GO 注释和 KEGG 富集排名均靠前的 DEGs 取交集,排名前 10 的候选关键上调 DEGs 如表 2。



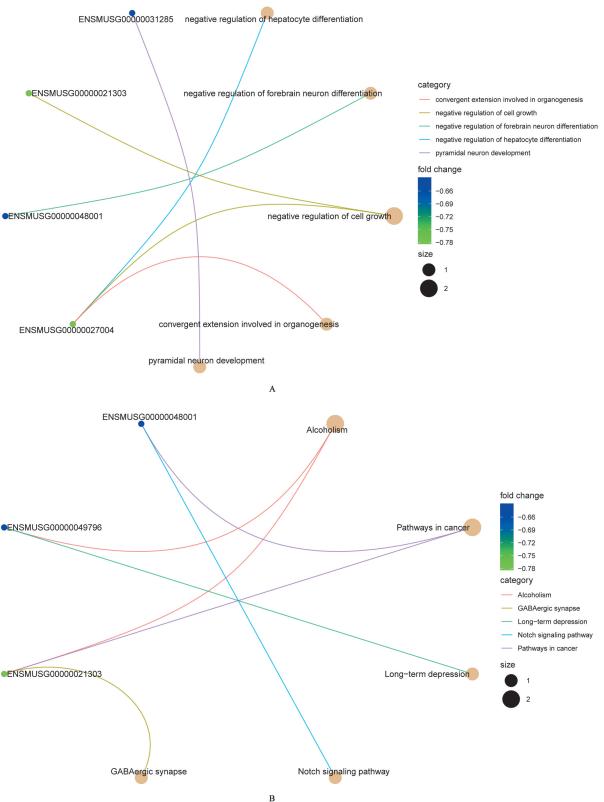
A 上调 DEGs 的 GO 通路 BP 分支富集结果 B 上调 DEGs 的 KEGG 富集结果

图 4 上调 DEGs 的功能注释和富集图

A BP branching enrichment results of GO annotation B Results of KEGG enrichment

Fig. 4 Functional annotation and enrichment results of the up-regulated DEGs

下调的 DEGs 有 14 个,集中富集在器官收敛伸缩、对细胞生长和前脑神经元分化的负向调控、椎体神经元发育等 BP 过程(图 5 A),以及酒精成瘾、GABA 能突触传递、抑郁以及 Notch 信号通路等 KEGG 通路中(图 5 B)。排名前 5 的候选关键下调 DEGs 如表 2。



A 下调 DEGs 的 GO 通路的 BP 分支富集结果 B 下调 DEGs 的 KEGG 富集结果

图 5 下调 DEGs 的功能注释和富集图

A BP branching enrichment results of GO annotation B Results of KEGG enrichment

Fig. 5 Functional annotation and enrichment results of the down-regulated DEGs

6 候选差异表达基因(DEGs)的蛋白相互作用网络分析

应用 STRING 网站(<https://string-db.org/>)分析上调和下调候选关键 DEGs 编码蛋白之间的相关性,利用 cytoscape 软件进行 PPI 网络相互作用分析,结果如图 6。在这些候选蛋白中,H2-Ab1、H2-K1、Cd74、H2-Aa、H2-Eb1、H2-DMb1、H2-D1、H2-Q7、H2-Oa 连接度较大,节点较多,因此 H2 蛋白家族及 CD74 的编码基因可能是小鼠主要的弓形虫 LHG 株易感基因。

讨 论

转录组研究是深入理解病原体与宿主互作过程必不可少的工具之一,与二代测序相比,基于 Oxford Nanopore Technologies 的单分子实时测序技术(ONT 测序技术)是独一无二的基于电信号识别碱基序列的三代测序技术,无须打断 RNA 片段,不存在 PCR 扩增的偏好性,能够读取单条转录本序列的完整信息,有效读长可以达到几十万个碱基,所测即所得,因此本研究采用该技术进行转录组的差异分析。

表2 弓形虫感染宿主前后脑组织的部分候选关键差异表达基因
Table 2 Key differentially expressed genes in brain tissues before and after *T. gondii* infection

基因全称 Full name of gene	基因简称 Gene abbreviation	Log ₂ (FC) Log ₂ (FC)	P 值 P value	变化趋势 Variation tendency	富集通路 Pathway of enrichment
CD74 antigen	Cd74	6.50	0	上调	immune response
histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	H2-Aa	6.07	2.07E-238	上调	immune response
histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	H2-Ab1	5.76	1.81E-216	上调	immune response
histocompatibility 2, class II antigen E beta	H2-Eb1	5.70	4.31E-199	上调	immune response
histocompatibility 2, D region locus 1	H2-D1	3.75	1.72E-127	上调	immune response
histocompatibility 2, Q region locus 7	H2-Q7	4.56	1.29E-100	上调	immune response
C-C motif chemokine ligand 5	Ccl5	4.07	3.06E-72	上调	cellular response to interferon-gamma
histocompatibility 2, K1, K region	H2-K1	3.33	1.26E-53	上调	immune response
histocompatibility 2, class II, locus Mb1	H2-DMb1	3.07	1.97E-45	上调	immune response
histocompatibility 2, O region alpha locus	H2-Oa	2.99	7.09E-38	上调	immune response
guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	Gng4	-0.78	0.00014	下调	negative regulation of cell growth
frizzled-related protein	Frzb	-0.78	0.00063	下调	positive regulation of apoptotic process
hes family bHLH transcription factor 5	Hes5	-0.63	0.00108	下调	positive regulation of smooth muscle cell proliferation
milk fat globule EGF and factor V/VIII domain containing	Mfge8	-0.60	9.72E-05	下调	positive regulation of phagocytosis
CART prepropeptide	Cartpt	-0.62	0.003184	下调	activation of MAPKK activity

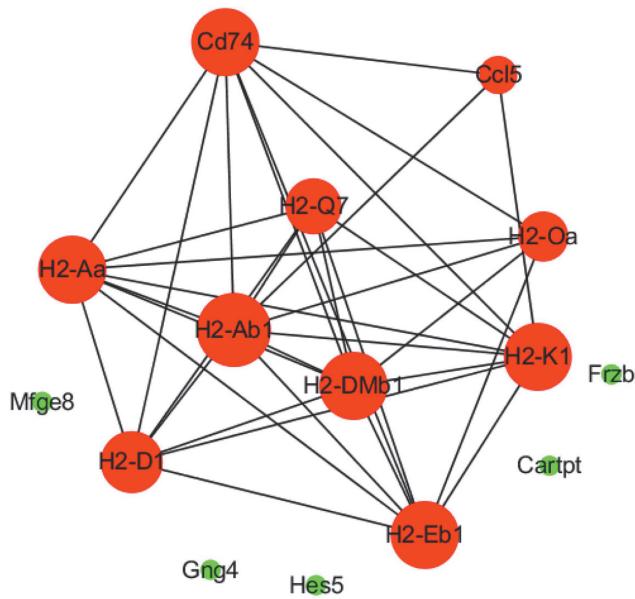


图6 关键差异表达基因编码蛋白互作分析
Fig. 6 Protein interaction analysis of key differentially expressed genes

弓形虫不仅是一种感染率高、分布广泛的胞内寄生原虫，也是一种易于体外培养传代的实验室病原体模式生物。目前，关于弓形虫感染前后宿主的转录组差异研究已有较多报道，但宿主类型多为体外培养细胞系，如巨噬细胞、树突状细胞、小胶质细胞和成纤维细胞系等^[20]。弓形虫感染前后宿主组织器官的转录组差异分析研究主要集中在肝脏、心脏、脑组织等器官^[21-22]，实验室采用的虫株多为强毒Ⅰ型RH株和中等毒性的Ⅱ型ME49株，部分研究涉及中国流行的WH3/WH6株，这些虫株均对小鼠模型有较强的毒

力，例如以10~20个包囊/只剂量灌胃感染小鼠Ⅱ型ME49株和WH6株，均能在不同程度上直接造成小鼠死亡^[23]。而在同等感染剂量下，Ⅲ型LHG分离株对小鼠的毒力大幅降低，潜伏期感染小鼠均可长期存活^[24]。因此，Ⅲ型分离株对啮齿类宿主的影响程度与弓形虫对人类宿主的影响更为相似，但目前鲜有关于Ⅲ型虫株感染前后宿主的比较转录组分析的报道。

弓形虫感染后宿主的转录组表达变化大多与免疫反应相关。Jia等^[25]的研究表明，感染强毒Ⅰ型RH株和中等毒力的Ⅱ型ME49株前后，BALA/c小鼠免疫相关基因的表达均显著上调，且与RH株相比，ME49株感染宿主的T细胞受体信号通路显著上调。因此，Ⅱ型虫株可能更强烈地激发宿主的先天免疫和适应性免疫反应。而通过DEGs分析，RH株对小鼠神经系统的损伤作用强于ME49株。该研究也证明基因型和毒力不同的弓形虫虫株对宿主的神经和免疫系统调节具有显著差异。Hu等^[26]采用中等毒力的Ⅱ型PRU株感染BALA/c小鼠后分别在急性感染期和潜伏性感染期分析了受感染前后小鼠脑组织内的转录组表达差异，结果表明，急性感染期小鼠的干扰素-γ(IFN-γ)应答基因表达显著上调，与T细胞活化、细胞因子产生和免疫细胞增殖相关的基因在潜伏性感染阶段变化显著，进一步证实潜伏性感染阶段宿主脑组织内经历着持续的免疫反应。Pittman等^[27]对中等毒力的Ⅱ型ME49株的研究结果表明，急性和慢性感染期内宿主的上调DEGs大都参与了转录和翻译过程，而慢性感染期间的上调DEGs更多地富集于代谢过程，表明脑包囊对宿主脑组织不仅存在持续性的免疫刺

激,也可能参与了基因的转录调控和翻译后修饰,以及神经递质等的代谢途径。这些结果均表明弓形虫脑包囊对宿主脑组织的持续性影响可能是多方面的^[28]。

本研究用弓形虫弱毒Ⅲ型LHG分离株感染小鼠脑组织后,尽管在表型上不会对受感染小鼠造成致命危害,却能够在宿主脑组织内形成数量更多的脑包囊,因此推测这种更强的成囊能力势必对宿主的精神行为造成更明显的影响。富集分析显示,显著上调的DEGs均富集在免疫相关的生物学过程中,特别是对促炎性细胞因子INF-β和IFN-γ的反应过程,且集中在弓形虫、利什曼原虫等疾病相关通路内。通过差异表达倍数和富集通路的关联分析,选择了Cd74、H2-Aa、H2-Ab1、H2-Eb1、H2-D1、H2-Q7、H2-K1、H2-DMb1、H2-Oa和Clc5等10个基因,其中7个基因均为小鼠MHC的编码基因H2类分子。H2-Aa,H2-Ab1,H2-Eb1,Cd74是MDP衍生的DCMo的特征基因,通过单核细胞表达MHC II分子^[29],表明弱毒虫株感染后小鼠单核细胞的MHC II表达可显著增加,脑组织内的DCMo表达升高。与此同时表达MHC I的H2-Q7和H2-K1也显著升高^[30]。有研究表明该类分子与突触可塑性的改变也密切相关^[31]。提示弱毒株感染介导啮齿类宿主的特异性免疫应答的MHC类分子可能是宿主抵抗弱毒力弓形虫的主要机制,且该抵抗过程可能与宿主的行为改变表型具有相关性。Hu等^[26]报道中等毒力的Ⅱ型PRU株感染BALA/c小鼠其关键DEGs则集中在IFN-γ诱导的GBPs家族蛋白的合成,该研究共检测到11种GBPs的表达显著上调,表明GBPs可能是宿主抗中等毒力弓形虫株的主要效应分子。RH株感染小鼠肺组织试验也表明GBPs和IRGs是宿主经IFN-γ诱导的主要抵抗强毒力弓形虫的主要方式^[32]。以上表明宿主可能通过不同的免疫应答途径抵抗毒力差异较大的不同弓形虫虫株。

本研究中只检测到14种显著下调的DEGs,但DEGs与神经元分化的负向调控,GABA能突触传递等显著相关,提示经弓形虫感染后宿主可能出现神经退行倾向。该结果与Ⅱ型虫株感染结果相一致^[25]。本研究中下调幅度最大的5个基因分别为Gng4、Frzb、Hes5、Mfge8和Cartpt。其中,Gng4(Guanine nucleotide binding-protein gamma subunit-4)为鸟嘌呤核苷酸结合蛋白γ亚单位-4,是G蛋白γ亚基的关键成员,位于染色体1q43-q44上,在跨膜系统中发挥重要作用^[33],也是VHL的靶基因,可在多种肿瘤细胞中过表达,与患者的不良预后有关^[34]。Frzb为卷曲相关蛋白,与血管完整性调控过程密切相关^[35]。有研究表明,Frzb可通过Wnt信号参与神经鞘调节和内皮

质激素代谢^[36]。Hes5的异常表达则与神经干细胞的维持和增殖受损关系密切^[37]。Mfge8(Milk Fat Globule-EGF 8)是吞噬过程起关键作用的因子,可通过结合吞噬细胞上表达的整合素受体αvβ3或αvβ5,促进凋亡细胞的吞噬^[38]。在神经系统中,神经炎症或缺血性损伤时激活的小胶质细胞或星形胶质细胞可分泌Mfge8并吞噬死亡细胞和碎片^[39]。Mfge8表达下调可导致神经干细胞的发育衰竭,不利于维持成年哺乳动物大脑中连续的神经发生^[40]。安非他明调节转录肽(cocaine and amphetamine-regulated transcript peptide, Cartpt)是转录因子Nr4a1(核受体亚家族4a组成员1)的靶基因,可受Nr4a1调控,参与突触分布、突触可塑性调控^[41],与多巴胺能纹状体内的多巴胺水平密切相关^[42-43]。本研究中这5种DEGs显著下调,提示弱毒弓形虫株引起的潜伏性感染可能通过干扰宿主神经干细胞功能以及多巴胺等神经递质代谢途径,导致宿主出现精神行为异常。但具体调控机制尚需深入研究。

本研究对候选的关键DEGs通过进一步的PPI分析,发现MHC类分子的编码基因可能是宿主对弱毒弓形虫株的易感基因。同时,潜伏性脑包囊感染可能损伤宿主的神经干细胞功能,紊乱宿主的兴奋性神经递质代谢途径。这些研究结果可有助于进一步探究操纵性寄生虫造成宿主脑损伤的分子机制,并为研发新的干预靶点提供线索。

【参考文献】

- [1] 王维.不同基因型弓形虫及急性弓形虫感染小鼠RNA修饰特征研究[D].大庆:黑龙江八一农垦大学,2022.
- [2] Canon-Franco WA,Lopez-Orozco N,Gomez-Marin JE,et al. An overview of seventy years of research (1944-2014) on toxoplasmosis in Colombia,South America [J]. Parasit Vectors,2014,7:427.
- [3] Guiguen N,Leon L,Hamane S,et al. Continuous decline of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in hospital: a 1997-2014 longitudinal study in Paris,France [J]. Front Microbiol,2018,9:2369.
- [4] Dubey JP,Lago EG,Gennari SM,Su C,Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology [J]. Parasitology,2012,139(11):1375-1424.
- [5] 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,2018,9:2108.
- [6] 申善良,姚云英,刘敏,等.弓形虫感染引起的情智行为异常及其发生机制[J].中国病原生物学杂志,2013,8(11):1047-1050.
- [7] Hernandez AV,Thota P,Pellegrino D,et al. A systematic review and meta-analysis of the relative efficacy and safety of treatment regimens for HIV-associated cerebral toxoplasmosis: is trimethoprim-sulfamethoxazole a real option? [J]. HIV

- Medicine, 2017, 18(2):115-124.
- [8] 代莉莎, 张丽新, 尹昆. 刚地弓形虫诱导宿主精神行为障碍的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2022, 40(5):642-646.
- [9] Burkinshaw J, Kirman BH, Sorsby A. Toxoplasmosis in relation to mental deficiency[J]. Br Med J. 1953, 1(4812):702-704.
- [10] Flegl J, Horacek J. Negative effects of latent Toxoplasmosis on mental health[J]. Frontiers in Psychiatry, 2020, 41(4):989-998.
- [11] 汪涛, 汤自豪, 赵志军. 隐性弓形虫感染对人行为影响及可能机制概述[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(2):155-157.
- [12] 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):5844-5849.
- [13] Howe DK, Summers BC, Sibley LD. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*[J]. Infect Immun, 1996, 64(12):5193-5198.
- [14] Fuentes I, Rubio JM, Ram rez C, et al. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(4):1566-1570.
- [15] 陈小庆. 不同基因型弓形虫多组学分析及其对小鼠肝脾代谢组的影响[D]. 吉林农业大学, 2018.
- [16] 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):5844-5849.
- [17] 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):429-435.
- [18] Zhao ZJ, Zhang J, Wei J, et al. Lower expression of inducible nitric oxide synthase and higherexpression of arginase in rat alveolar macrophages are linked to their susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection [J]. PLoS One, 2013, 8(5):e63650.
- [19] 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 [J]. Vet Parasitol, 2017, 241:52-60.
- [20] 王龙江, 李瑾, 尹昆, 等. 刚地弓形虫入侵人包皮成纤维细胞前后转录组差异分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2021, 39(4):480-486.
- [21] Jia B, Lu H, Liu Q, et al. Genome-wide comparative analysis revealed significant transcriptome changes in mice after *Toxoplasma gondii* infection [J]. Parasit Vectors, 2013, (6):161.
- [22] Hu RS, He JJ, Elsheikha HM, et al. Transcriptomic profiling of mouse brain during acute and chronic infections by *Toxoplasma gondii* oocysts [J]. Front Microbiol, 2020, 11:570903.
- [23] Zhao GH, Zhang LX, Dai LS, et al. Development of *Toxoplasma gondii* Chinese I genotype Wh6 strain in cat intestinal epithelial cells [J]. Korean J Parasitol, 2022, 60(4):1-6.
- [24] 赵桂华, 代莉莎, 朱进进, 等. 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[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(2):174-179.
- [25] Jia B, Lu H, Liu Q, et al. Genome-wide comparative analysis revealed significant transcriptome changes in mice after *Toxoplasma gondii* infection [J]. Parasit Vectors, 2013, 6:161.
- [26] Hu RS, He JJ, Elsheikha HM, et al. Transcriptomic profiling of mouse brain during acute and chronic infections by *Toxoplasma gondii* oocysts [J]. Front Microbiol, 2020, 11:570903.
- [27] Pittman KJ, Aliota MT, Knoll LJ. Dual transcriptional profiling of mice and *Toxoplasma gondii* during acute and chronic infection [J]. BMC Genomics, 2014, 15(1):806.
- [28] Yin K, Xu C, Zhao GH, et al. Epigenetic manipulation of psychiatric behavioral disorders induced by *Toxoplasma gondii* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12:803502.
- [29] Barman PK, Shin JE, Lewis SA, et al. Production of MHCII-expressing classical monocytes increases during aging in mice and humans [J]. Aging Cell, 2022, 21(10):e13701.
- [30] Melo-Lima BL, Evangelista AF, de Magalhaes DA, et al. Differential transcript profiles of MHC class Ib (Qa-1, Qa-2, and Qa-10) and Aire genes during the ontogeny of thymus and other tissues [J]. J Immunol Res, 2014, 2014:159247.
- [31] Zalocusky KA, Najm R, Taubes AL, et al. Neuronal ApoE upregulates MHC-I expression to drive selective neurodegeneration in Alzheimer's disease [J]. Nat Neurosci, 2021, 24(6):786-798.
- [32] 曹纹侨, 李锴, 喻云, 等弓形虫急性感染小鼠肺组织的转录组分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(3):203-211.
- [33] Hurowitz EH, Melnyk JM, Chen YJ, et al. Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein, and subunit genes [J]. DNA Res, 2000, 7(2):111-120.
- [34] Ancel J, Perotin JM, Dewolf M, et al. Hypoxia in lung cancer management: a translational approach [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(14):3421.
- [35] Oh CK, Ko Y, Park JJ, et al. FRZB as a key molecule in abdominal aortic aneurysm progression affecting vascular integrity [J]. Biosci Rep, 2021, 41(1):BSR20203204.
- [36] Kamel G, Hoyos T, Rochard L, et al. Requirement for frzb and fzd7a in cranial neural crest convergence and extension mechanisms during zebrafish palate and jaw morphogenesis [J]. Dev Biol, 2013, 381(2):423-433.
- [37] Kageyama R, Shimojo H, Ohtsuka T. Dynamic control of neural stem cells by bHLH factors [J]. Neurosci Res, 2019, 138:12-18.
- [38] Raymond A, Ensslin MA, Shur BD. SED1/MFG-E8: a bi-motif protein that orchestrates diverse cellular interactions [J]. J Cell Biochem, 2009, 106(6):957-966.
- [39] Mills EA, Davis CH, Bushong EA, et al. Astrocytes phagocytose focal dystrophies from shortening myelin segments in the optic nerve of *Xenopus laevis* at metamorphosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(33):10509-10514.
- [40] Zhou Y, Bond AM, Shade JE, et al. Autocrine Mfge8 signaling prevents developmental exhaustion of the adult neural stem cell pool [J]. Cell Stem Cell, 2018, 23(3):444-452.e4.
- [41] Shieh KR. Effects of the cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide on the turnover of central dopaminergic neurons [J]. Neuropharmacology, 2003, 44:940-948.
- [42] 陈莹莹, 管益涛, 王霞, 等. 香菇多糖预处理对急性弓形虫感染小鼠中枢神经系统损伤的保护性作用研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(2):170-173.
- [43] Levesque D, Rouillard C. Nur77 and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation [J]. Trends Neurosci, 2007, 30(1):22-30.