

文章编号: 1000-7423(2012)-06-0423-05

【论著】

田鼠巴贝虫实验动物模型的建立

卢艳, 蔡玉春, 陈韶红, 陈家旭, 郭俭, 陈木新, 艾琳, 储言红, 陈卓, 周晓农*

【摘要】 目的 建立田鼠巴贝虫 (*Babesia microti*) 的实验动物模型。方法 自感染田鼠巴贝虫的种鼠取血, 腹腔注射接种 3~4 周龄雌性 BALB/c 小鼠 (7 只)、免疫抑制 BALB/c 小鼠 (4 只)、雄性 SCID 小鼠 (4 只) 和 NOD-SCID 小鼠 (4 只)。感染后每天采血, 涂制薄血片, 吉氏染色, 油镜下观察田鼠巴贝虫的生长、增殖情况, 记录红细胞的感染率。解剖 3 只不同红细胞感染率的 BALB/c 小鼠, 油镜下观察心、肝、脾、肺、肾、脑和骨髓等组织的感染情况。记录各组织中红细胞的感染率, 并分析与外周血红细胞感染率的关系。取红细胞感染率大于 40% 的 BALB/c 小鼠血液, 冷冻保存 2 个月后用同样的方法接种小鼠, 观察田鼠巴贝虫的增殖情况。结果 BALB/c 小鼠、免疫抑制 BALB/c 小鼠、SCID 小鼠和 NOD-SCID 小鼠接种后, 末梢血液中均检测出田鼠巴贝虫。BALB/c 小鼠的红细胞感染率在 d7 达到峰值 (82.4%), 免疫抑制 BALB/c 小鼠的红细胞感染率在 d5 达到峰值 (73.2%), SCID 小鼠和 NOD-SCID 小鼠的红细胞感染率均在 d8 达到峰值 (86.4% 和 72.5%)。红细胞感染率达到峰值后, BALB/c 小鼠的红细胞感染率迅速下降, 免疫抑制 BALB/c 小鼠的红细胞感染率缓慢降低, SCID 小鼠和 NOD-SCID 小鼠的红细胞感染率则出现震荡变化。感染的 BALB/c 小鼠的心、肝、脾、肺、肾、脑和骨髓等组织内均可观察到田鼠巴贝虫, 虫体主要位于红细胞内, 各组织内的红细胞感染率随外周血红细胞感染率的升高而增高。冷冻保存的虫种复苏后可感染健康 BALB/c 小鼠, 末梢血中出现虫体的时间与新鲜含虫血液感染鼠的比较滞后 2 d, 达到感染高峰的时间滞后 1 d。结论 成功建立田鼠巴贝虫的小鼠模型, 红细胞的感染情况与机体的免疫状态相关。

【关键词】 田鼠巴贝虫; 小鼠; 动物模型

中图分类号: R382.9 文献标识码: A

Establishment of the Experimental Animal Model of *Babesia microti*

LU Yan, CAI Yu-chun, CHEN Shao-hong, CHEN Jia-xu, GUO Jian, CHEN Mu-xin, AI Lin,
CHU Yan-hong, CHEN Zhuo, ZHOU Xiao-nong*

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Key laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH; WHO Collaborating Center of Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 Objective To establish the experimental animal model for the study of *Babesia microti*. **Methods** BALB/c mice, immunosuppressive BALB/c mice, SCID mice and NOD-SCID mice were inoculated with *B. microti*-infected red blood cells (RBC) by intraperitoneal injection respectively. After inoculation, thin blood smears were prepared every day, stained with Giemsa staining and examined for the presence of parasitemia. Three mice were dissected to examine the infectivity in bone marrow, brain, spleen, heart, lung, kidney and liver tissues. The infection rate of erythrocytes in different tissues was recorded, and the relationship between the infectivity of tissues and infection rate in peripheral blood was analyzed. Blood samples infected with *B. microti* were preserved in liquid nitrogen with dimethyl sulfoxide (DMSO) for 2 months. The thawed parasitized blood was injected into the BALB/c mice by same route and the parasitemia was monitored. **Results** The four kinds of mice were all infected by *B. microti* with parasitemia. The percentage of parasitized red blood cells from peripheral blood were 82.4% (BALB/c mice, d7), 73.2% (immunosuppressive BALB/c mice, d5), 86.4% (SCID mice, d8) and 72.5% (NOD-SCID mice, d8) at the maximum, respectively. Parasitemia decreased rapidly in BALB/c mice, whereas decreased slowly in immunosuppressive BALB/c mice. Only the parasitemia in SCID mice and NOD-SCID mice decreased significantly and tended to picking up again. The parasites were observed in RBCs from bone marrow, brain, spleen, heart, lung, kidney and liver tissues. The infection rate of erythro-

基金项目: 卫生行业科研专项 (No. 201202019); 国家科技重大专项 (No. 2012ZX10004-220, 2008ZX10004-011)

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025

* 通讯作者, E-mail: xiaonongzhou1962@gmail.com

cytes in tissues increased with an increase of infection in peripheral blood. After cryopreservation, the parasites proliferated in BALB/c mice. Parasitemia appeared after inoculation with frozen infected blood two days later than that of fresh infected blood. The infection rate reached its peak after inoculation with frozen infected blood one day later than that of fresh infected blood. **Conclusion** The experimental animal model of *B. microti* has been established. The infection rate of erythrocytes is related to the immune status of the host mice.

【Key words】 *Babesia microti*; Mouse; Animal model

Supported by the Special Fund for Health Research in the Public Interest (No. 201202019) and the National S & T Major Program (No. 2012ZX10004-220 and 2008ZX10004-011)

* Corresponding author, E-mail: xiaonongzhou1962@gmail.com

巴贝虫是一种经蜱传播寄生于宿主红细胞内的原虫, 属于孢子虫纲 (Sporozoa) 巴贝科 (Babesiidae)^[1]。常见虫种包括双芽巴贝虫 (*Babesia bigemina*)、牛巴贝虫 (*B. bovis*)、马巴贝虫 (*B. equi*)、驴巴贝虫 (*B. caballi*) 和犬巴贝虫 (*B. canis*) 等, 该类寄生虫可引起马、牛、羊、猪和犬等多种动物的巴贝虫病^[1-3]。巴贝虫需要通过 2 个宿主的转换才能完成其生活史, 且具有较严格的宿主特异性, 但这种特异性并非绝对, 少数虫种如田鼠巴贝虫 (*B. microti*) 既可在鼠体内寄生, 也可感染人体^[2,4]。人巴贝虫病的病原主要是分歧巴贝虫 (*B. divergens*) 和田鼠巴贝虫, 近年来还分离到可感染人的 WA1、CA1 和 MO1 型巴贝虫。在欧洲多个国家、美国和日本均有该病的病例报道^[5-7]。人一般通过带虫蜱的叮咬而感染致病, 其临床表现类似疟疾, 多表现为隐性感染, 但机体抵抗力低下者可导致急性发作, 甚至死亡^[4,8]。目前, 国内也有人感染巴贝虫的病例报道, 患者出现反复发热、贫血和肝脾肿大等症状^[9]。

Ruebush 等^[10]将分离自患者的田鼠巴贝虫成功接种到 CF1、BALB/c、C57、CBA 和 C3H 小鼠体内, 其中 C3H 和 BALB/c 小鼠可达到相对较高的染虫率。Arai 等^[11]用置换犬红细胞的 SCID 小鼠成功感染了犬巴贝虫。张守发等^[12]用 SCID 小鼠建立了吉氏巴贝虫的实验动物模型。已有的报道表明, 小鼠是研究巴贝虫较为理想的实验动物。

本实验利用 BALB/c 小鼠、免疫抑制的 BALB/c 小鼠、SCID 小鼠和 NOD-SCID 小鼠建立田鼠巴贝虫实验动物模型, 为揭示田鼠巴贝虫的形态、生理、生化和增殖的生物学特性, 以及开展药物筛选、分子生物学和免疫学的相关研究提供依据。

材料与方法

1 材料

1.1 田鼠巴贝虫 由中国医学科学院实验动物学研究所提供, 虫株为 *Babesia microti* ATCC[®] PRA-99[™]。

1.2 实验小鼠 3~4 周龄雌性 BALB/c 小鼠、雄性 SCID 小鼠和雄性 NOD-SCID 小鼠 [(18±2) g] 均购自中国科学院上海实验动物中心, 饲养于隔离器中, 室温 22~25℃。喂饲 γ 射线照射的颗粒饲料和高压灭菌的自来水。

1.3 主要试剂和仪器 地塞米松购自山东淄博市新华制药公司, 0.9%生理盐水购自上海长富制药公司, 吉氏染液购自上海怡成生物科技有限公司, 二甲基亚砜 (DMSO) 购自美国 Sigma-Adrich 公司。

2 方法

2.1 免疫抑制 BALB/c 小鼠 在常规饲养条件下, 取 5 只 BALB/c 小鼠, 每只腹腔注射免疫抑制剂地塞米松 0.5 mg, 每 d 1 次, 连续注射 5 d, 以降低小鼠的免疫力, 5 d 后按常规方法进行接种感染。

2.2 人工接种感染田鼠巴贝虫 从种鼠 (红细胞感染率约为 60%) 眼眶取血, 乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝, 按 1:2 比例与无菌 0.9%生理盐水混合后, 分别经腹腔注射感染 BALB/c 小鼠 (7 只)、免疫抑制 BALB/c 小鼠 (4 只)、SCID 小鼠 (4 只) 和 NOD-SCID 小鼠 (4 只), 每鼠接种 100 μl。动物接种当天记为第 0 天 (d0), 接种次日开始观察记为第 1 天 (d1)。自 d1 开始每天通过尾静脉采血, 涂制薄血片, 吉氏染色, 油镜下观察田鼠巴贝虫的生长、增殖情况, 记录红细胞的感染率, 并观察小鼠的状态。每组同时均设立 1 只未感染的健康小鼠作为对照。

2.3 田鼠巴贝虫感染 BALB/c 小鼠的组织印片观察 选择 3 只不同红细胞感染率的 BALB/c 小鼠, 解剖后分别取心、肝、脾、肺、肾和脑等组织, 用手术刀片切取组织切面, 将组织压印至载玻片上, 甲醇固定, 吉氏染色后, 油镜下观察。骨髓组织取自小鼠后肢股骨骨干部位, 用 0.9%生理盐水冲洗后, 2 000×g 离心 10 min, 取沉淀涂片, 吉氏染色后, 油镜下观察。根据油镜下组织印片观察的结果, 记录各组织中红细胞的感染程度 (感染率≤5%为“+”, 5%<感染率≤10%

为“++”，10%<感染率≤20%为“+++”，>20%为“++++”），分析与外周血红细胞感染率的关系。

2.4 含虫血液的冷冻保存和复苏 自红细胞感染率大于 40%的小鼠取血，置于抗凝管中，缓慢加入等量 24%二甲基亚砷（DMSO）作为保护剂，充分混匀后分装于冻存管中，液氮中冷冻保存。2 个月后取出血样，室温解冻，无菌生理盐水稀释后，接种 BALB/c 小鼠 4 只，接种和观察方法同 2.2，比较冷冻后复苏的含虫血液与新鲜含虫血液（接种 4 只小鼠）对小鼠的感染力。

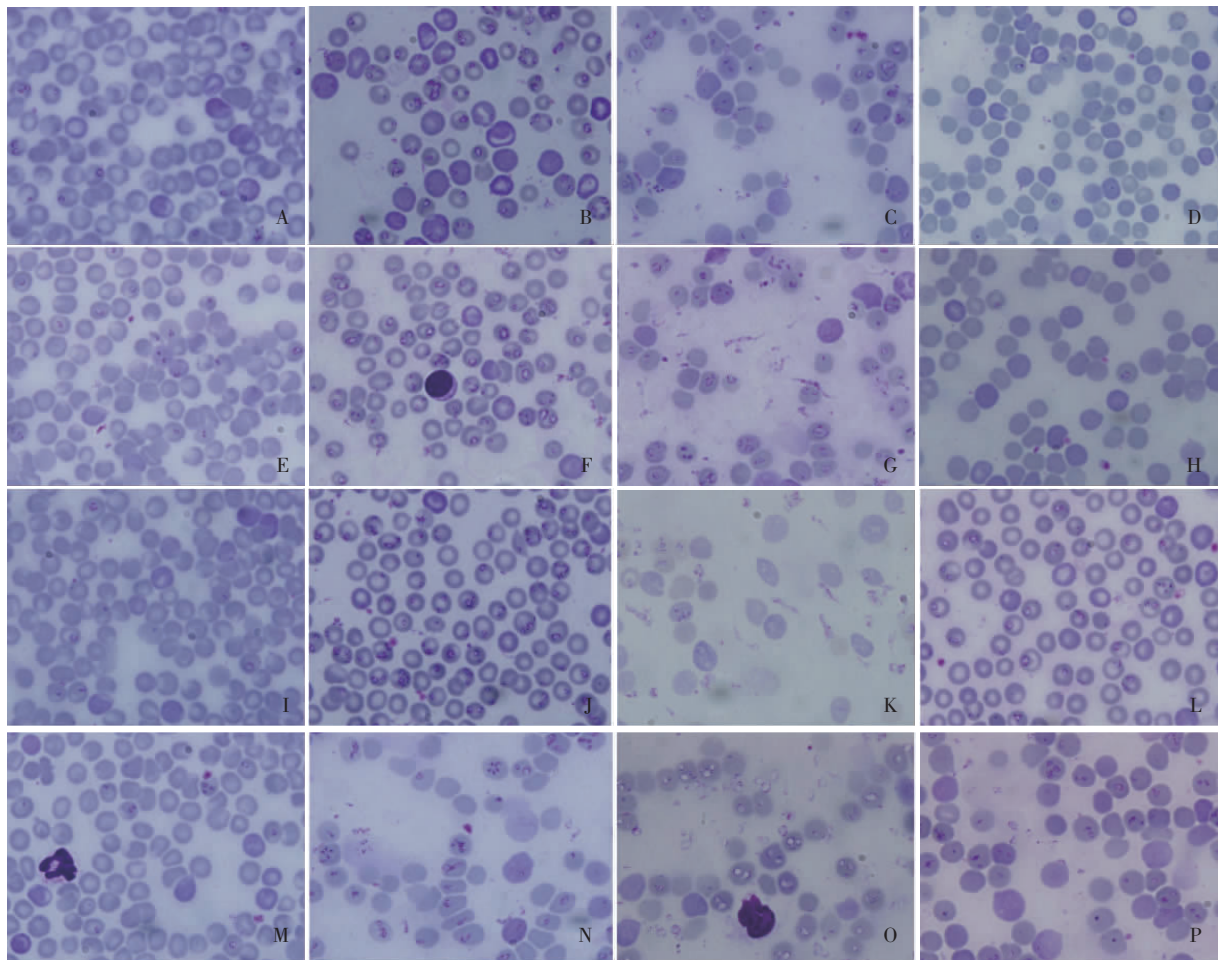
待 BALB/c 小鼠的红细胞感染率达到 40% 以上，眼眶取血再转种健康 BALB/c 小鼠，进行传代，观察田鼠巴贝虫的增殖情况。

结 果

1 田鼠巴贝虫动物模型的建立

实验结果表明，接种后的 BALB/c 小鼠、免疫抑制 BALB/c 小鼠、SCID 小鼠和 NOD-SCID 小鼠的末梢血液在 d1 均可检测出田鼠巴贝虫。BALB/c 小鼠的红细胞感染率在 d7 达到高峰（82.4%），并出现溶血现象，之后末梢血液中的虫体开始减少，d12 红细胞感染率下降到 20% 以下，d20 红细胞感染率下降到 2% 以下。免疫抑制 BALB/c 小鼠的红细胞感染率在 d5 达到高峰（73.2%），d17 红细胞感染率降至 20% 以下，d24 红细胞感染率下降到 2% 以下。SCID 小鼠和 NOD-SCID 小鼠的红细胞感染率分别在 d8 达到高峰（86.4% 和 72.5%），随后出现震荡变化（图 1）。

红细胞内的虫体具有多型性的特征，可呈现为点状、环形、梨形、阿米巴形、杆形和马耳他十字等，虫体内有深色染色质团，并且可在红细胞内观察到多



A~D: BALB/c 小鼠感染初期（d3）、感染高峰（d7）、溶血现象（d8）和感染后期（d20）；E~H: 免疫抑制 BALB/c 小鼠感染初期（d3）、感染高峰（d5）、溶血现象（d6）和感染后期（d22）；I~L: SCID 小鼠感染初期（d3）、感染高峰（d8）、溶血现象（d23）和感染后期（d29）；M~P: NOD-SCID 小鼠感染初期（d3）、感染高峰（d8）、溶血现象（d22）和感染后期（d29）。

A~D: Initial stage and peak period after infection, hemolysis and later stage in BALB/c mice; E~H: Initial stage and peak period after infection, hemolysis and later stage in immunosuppressive BALB/c mice; I~L: Initial stage and peak period after infection, hemolysis and later stage in SCID mice; M~P: Initial stage and peak period after infection, hemolysis and later stage in NOD-SCID mice.

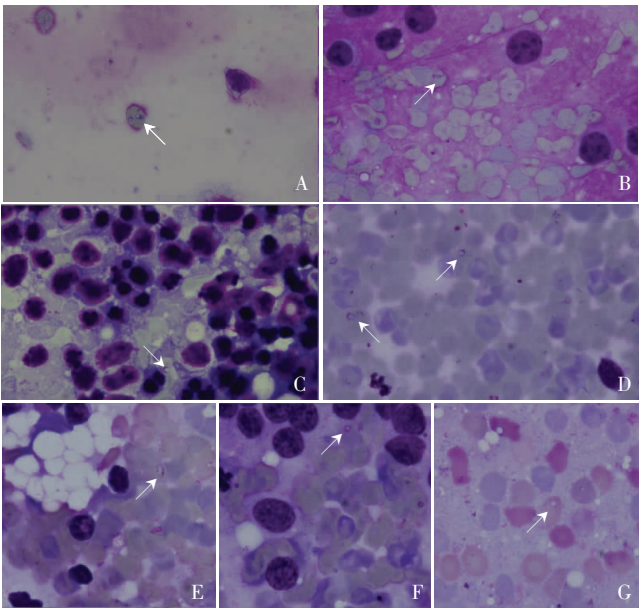
图 1 不同品系小鼠感染田鼠巴贝虫的血涂片（×100）

Fig. 1 Thin blood smears of mice infected with *B. microti* (×100)

个虫体（图 1）。感染高峰期小鼠出现溶血、尿液颜色加深、活动力下降等体症。未感染的各品系对照小鼠体内均未检出田鼠巴贝虫。

2 感染小鼠的组织印片结果

感染的 BALB/c 小鼠解剖后分别取心、肝、脾、肺、肾、脑和骨髓组织，染色后的各组织内均观察到田鼠巴贝虫的虫体，虫体主要位于红细胞内（图 2）。外周血红细胞感染率为 0.2% 时，心脏、肺脏和肝脏红细胞感染率均≤5%；外周血红细胞感染率为 6.8% 时，该 3 组织红细胞感染率均增加至 5%~10%；外周血红细胞感染率为 33.6% 时，该 3 组织红细胞感染率最高，均为 10%~20%。脑组织红细胞在外周血红细胞感染率为 0.2% 时未观察到虫体，随外周血红细



A: 骨髓; B: 脑; C: 脾脏; D: 心脏; E: 肺脏; F: 肾脏; G: 肝脏。
A: Bone marrow; B: Brain; C: Spleen; D: Heart; E: Lung; F: Kidney; G: Liver.

图 2 感染小鼠各组织内红细胞中的虫体 (×100)

Fig. 2 *B. microti* in RBCs of different tissues from infected BALB/c mice (×100)

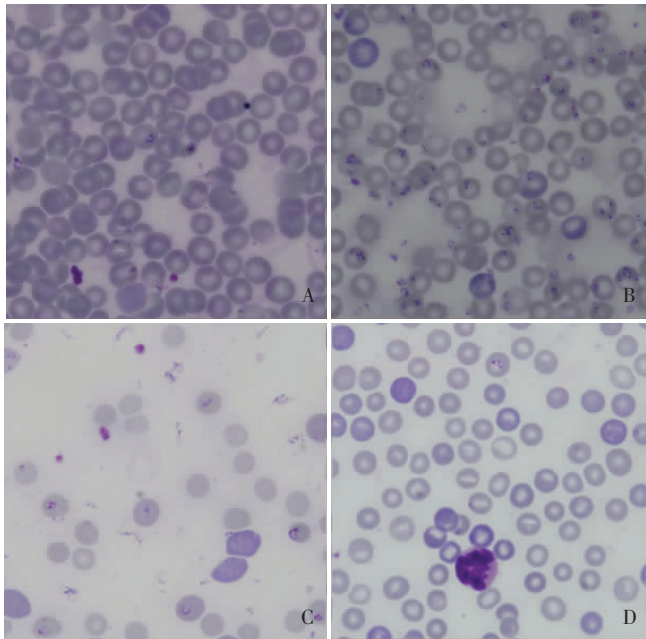
表 1 不同外周血红细胞感染率小鼠各组织内红细胞感染程度
Table 1 Infection relation between tissues and peripheral blood in mice

组织 Tissue	红细胞感染程度 Infection intensity of erythrocyte		
	外周血感染率 Infection rate of 33.6%	外周血感染率 Infection rate of 6.8%	外周血感染率 Infection rate of 0.2%
骨髓 Bone marrow	+	+	+
脑 Brain	+++	++	—
脾脏 Spleen	++	++	+
心脏 Heart	+++	++	+
肺脏 Lung	+++	++	+
肾脏 Kidney	+++	+	+
肝脏 Liver	+++	++	+

胞感染率升高其感染程度迅速增加（表 1）。

3 冷冻保存的复苏效果

冷冻保存 2 个月的含虫血样接种 BALB/c 小鼠后，d3 可在末梢血中观察到虫体，d8 红细胞感染率达到高峰（78.3%），之后末梢血液中的虫体开始逐渐减少，d23 红细胞感染率降至 2% 以下（图 3）。自接种感染的小鼠眼眶取血再转种健康 BALB/c 小鼠传代后，d1 即可在 BALB/c 小鼠的末梢血液中观察到虫体，d7 达到感染高峰（79.4%）。与新鲜的含虫血液直接感染相比，冷冻保存的含虫血液感染小鼠后末梢血液中出现虫体的时间滞后 2 d，达到感染高峰的时间滞后 1 d。



A: 感染初期; B: 感染高峰; C: 溶血现象; D: 感染后期。
A: Initial stage after infection; B: Peak period after infection; C: Hemolysis; D: Later stage of infection.

图 3 冷冻复苏后接种 BALB/c 小鼠的血涂片 (×100)

Fig. 3 Thin blood smears of BALB/c mice infected with *B. microti* by freezing-thawing (×100)

讨 论

田鼠巴贝虫是一种既可感染鼠又可引起人巴贝虫病的血传原虫。本实验成功建立田鼠巴贝虫的 BALB/c 小鼠、免疫抑制 BALB/c 小鼠、SCID 小鼠和 NOD-SCID 小鼠动物模型，在所有感染的小鼠末梢血液中均可检测到虫体。红细胞内的虫体形态具有多态性的特征，可呈现为点状、环形、梨形、阿米巴形、杆形和马耳他十字等，且在虫体增殖过程中可观察到不同大小的环状体。感染的单个红细胞内可同时可见 2~6 个虫体，随着感染程度的增加，这种增殖型虫体所占

的比例不断增多,与已有的研究报道相类似^[1,4]。

地塞米松对小鼠的免疫系统具有明显的抑制作用,夏生林等^[13]发现免疫抑制的小鼠感染低剂量隐孢子虫发病的风险更大,潜伏期更短、感染后粪便白细胞排出量增加。本研究的结果也表明,免疫抑制的 BALB/c 小鼠接种田鼠巴贝虫后,红细胞的感染率迅速升高,比健康感染鼠的红细胞感染率达到高峰的时间早 2 d。免疫抑制感染鼠在高峰期后的 12 d 仍维持 20% 以上的红细胞感染率,而健康感染鼠仅在高峰期后的 5 d 维持 20% 以上的红细胞感染率。

人感染巴贝虫后的症状主要表现为发热、寒战、溶血性贫血、头痛、咽痛、肌肉痛、关节痛和脾肿大等。HIV 感染者、肿瘤患者、服用免疫抑制剂的患者以及其他免疫力低下者感染田鼠巴贝虫会表现较严重的症状,且长时间不能自愈,甚至危及生命^[1,6,14]。本研究观察到,随红细胞感染率的升高,小鼠出现溶血、尿液颜色加深和活动力下降等体征。结果同时显示,健康感染鼠可表现自限性,红细胞感染率达到高峰后不断下降,虫体逐渐消失。免疫缺陷的感染鼠(SCID 小鼠和 NOD-SCID 小鼠)则不会自愈,由于免疫系统的作用缺失,田鼠巴贝虫可在鼠体内长期存活,而不被清除,并可感染新生成的红细胞,至实验结束仍维持较高的红细胞感染率。提示田鼠巴贝虫的感染和发病与机体的免疫状态密切相关,免疫缺陷的小鼠不需传代即可长期保种田鼠巴贝虫。

田鼠巴贝虫是类似于疟原虫的血传原虫,本实验也建立了相应的冷冻保存的保种方法。冷冻保存 2 个月的含虫血液接种 BALB/c 小鼠后 d3,可在末梢血液中观察到虫体,d8 红细胞感染率达到峰值,之后末梢血液中的虫体开始逐渐减少,d23 红细胞感染率下降至 2% 以下。表明冷冻保存的虫种复苏后可感染健康 BALB/c 小鼠,虽虫种存活率稍有下降,但不影响其感染力。

实验动物模型在一些疾病的病原确定方面起到不可替代的作用,针对性地建立简单、经济的小型动物模型,在有关的免疫诊断、药物防治和疫苗评价等方

面都有较好的应用前景。本研究成功建立了田鼠巴贝虫的实验小鼠模型和保种方法,为后续的相关研究奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS. Babesiosis: recent insights into an ancient disease[J]. Int J Parasitol, 2008, 38(11): 1219-1237.
- [2] Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR 3rd, et al. Babesiosis[J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(3): 451-469.
- [3] Ma YH, Qiao J. Immunoprophylaxis against *Babesia* and Babesiosis [J]. Livestock Poul Ind, 1999, 10(11): 12-13. (in Chinese) (马永红, 乔军. 巴贝斯虫与巴贝斯虫病的免疫预防 [J]. 畜禽业, 1999, 10(11): 12-13.)
- [4] Kjemtrup AM, Conrad PA. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease[J]. Int J Parasitol, 2000, 30(12-13): 1323-1337.
- [5] Chiang E, Haller N. Babesiosis an emerging infectious disease that can affect those who travel to the northeastern United States[J]. Travel Med Infect Dis, 2011, 9(5): 238-242.
- [6] Vannier E, Krause PJ. Human babesiosis [J]. N Engl J Med, 2012, 366(25): 2397-2407.
- [7] Schnittger L, Rodriguez AE, Florin-Christensen M, et al. Babesia: A world emerging[J]. Infect Genet Evol, 2012[Epub ahead of print]
- [8] Vannier E, Gewurz BE, Krause PJ. Human babesiosis [J]. Infect Dis Clin North Am, 2008, 22(3): 469-488.
- [9] Yao LN, Ruan W, Zeng CY, et al. Pathogen identification and clinical diagnosis for one case infected with *Babesia*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2012, 30(2): 118-121. (in Chinese) (姚立农, 阮卫, 曾长佑, 等. 1 例人感染巴贝虫的诊断与病原体鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30(2): 118-121.)
- [10] Ruebush MJ, Hanson WL. Susceptibility of five strains of mice to *Babesia microti* of human origin[J]. J Parasitol, 1979, 65(3): 430-433.
- [11] Arai S, Tsuji M, Kim SJ, et al. *Babesia canis* infection in canine-red blood cell-substituted SCID mice [J]. Int J Parasitol, 1998, 28(9): 1429-1435.
- [12] Zhang SF, Xuan XN. Study on the experimental animal model of *Babesia gibsoni* [J]. Chin J Vet Parasitol, 2002, 10 (2): 11-13. (in Chinese) (张守发, 玄学南. 吉氏巴贝斯虫实验动物模型的研究 [J]. 中国兽医寄生虫病, 2002, 10(2): 11-13.)
- [13] Xia SL, Song H, Zhou H, et al. Study on the efficacy of low amount *Cryptosporidium* infection to immunocompetent and immunosuppressed mice [J]. Chin J Pathogen Biol, 2006, 1 (2): 120-122. (in Chinese) (夏生林, 宋宏, 周海, 等. 低剂量隐孢子虫感染正常和免疫抑制小鼠的效应研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2006, 1(2): 120-122.)
- [14] Vannier E, Krause PJ. Update on babesiosis [J]. Interdiscip Perspect Infect Dis, 2009, 2009: 984568.

(收稿日期: 2012-06-26 编辑: 张争艳)