

Phagocytosis Ability and Toxicity Analysis of *Entamoeba gingivalis* in Vivo

Bo Wang, Rui Wang, Yuling Wang, Rong Huang, Fuai Feng, Yuan Hu

Life Science College, University of Science and Technology of Anhui, Chuzhou Anhui
Email: shijun960@163.com

Received: Apr. 6th, 2017; accepted: Apr. 24th, 2017; published: Apr. 27th, 2017

Abstract

Entamoeba gingivalis (*E.g.*) with phagocytosis ability can cause an immune response and then provide protection to the body. We cultured separated *E.g.* *in vitro* and prepared the *E.g.* suspension, and then by intraperitoneal injection method to detect the phagocytosis of mice celiac exogenous cells, and observe the *in vivo* environment for the phagocytosis of foreign cells. Results show that the *E.g.* in the body still has strong phagocytosis ability, but also the attack on the body produce certain effect; the double effect is the inevitable result of the long-term symbiosis with the body.

Keywords

Entamoeba gingivalis, Exogenous Cells, Phagocytosis

齿龈内阿米巴体内吞噬能力与毒性分析

王波, 王瑞, 王钰玲, 黄荣, 冯付霭, 胡媛

安徽科技学院生命科学学院, 安徽 滁州
Email: shijun960@163.com

收稿日期: 2017年4月6日; 录用日期: 2017年4月24日; 发布日期: 2017年4月27日

摘要

齿龈内阿米巴具有吞噬作用, 在机体内可引发免疫反应, 对机体提供保护。本研究通过分离口腔齿龈阿米巴, 利用体外培养技术制备齿龈阿米巴悬液, 通过腹腔注射的方法检测其对小鼠腹腔外源细胞的吞噬作用, 并观察其在体内环境下对外源细胞的吞噬能力。结果表明, 齿龈阿米巴在体内仍然具有较强的吞噬能力, 同时也对机体产生一定的攻击作用, 其双重效应是与机体长期共生的必然结果。

关键词

齿龈内阿米巴, 外源细胞, 吞噬作用

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

齿龈内阿米巴属于原生动植物, 主要寄生在人体口腔, 原本被认为非致病性的共栖型阿米巴, 然而流行病学调查显示, 牙周病患者 *E.g.* 的感染率显著高于健康人群[1]。从进化医学角度考察寄生现象, 是当前医学研究的新趋势。在现代口腔清洁技术出现以前, 齿龈内阿米巴已经在人类口腔中长期存在, 以食物残渣与细菌为食, 与口腔细菌形成了一个微型生态圈[2]。从某种意义上说, 可以把齿龈内阿米巴与人体之间看作共生关系, 齿龈内阿米巴对于保持口腔健康事实上应该起到一定的促进作用。但这个生态圈存在微妙的平衡, 齿龈内阿米巴在吞食口腔细菌的同时, 对齿龈也有一定的攻击作用, 一旦人体免疫力低下, 就会引发齿龈内阿米巴相关的疾病。但齿龈内阿米巴在攻击齿龈的过程中, 也会产生肿瘤抑制因子, 可能对于人体抑制肿瘤产生具有一定的作用。牙龈癌发生率较低, 可能与此不无关系。进一步挖掘齿龈内阿米巴与生物体共生过程中的行为, 是值得研究的课题。

本文探讨齿龈阿米巴在小鼠腹腔内的吞噬能力与致病性, 对于认识齿龈内阿米巴的寄生价值, 具有一定的理论意义。

2. 材料与方法

2.1. 菌种培养

菌种取自牙周病患者牙周袋内容物。

采用改良 Locke-egg-serum (LES)培养基培养, 配方如下: 3 个全蛋加 2 个蛋黄, 加入琼脂 1 g, Ringer 液 75 ml, 蒸馏水 50 ml, 用 KH_2PO_4 调 pH 为 6.4~6.7, 80℃加热 1 小时[3]。改良的 LES 培养基, 固体成分主要是鸡蛋, 更易制备且虫体不悬浮于培养基中, 有利于虫体收集。

齿龈阿米巴接种后培养 3 天, 吸取吸管底培养物过滤, 无菌生理盐水离心洗涤 3 次, 调节齿龈阿米巴滋养体数, 等量加入各管, 每个样本各有 2 管。吸取 10 μl 培养物显微计数, 计算各管虫体均数。然后置 36℃连续培养, 经不同时间取样计数[4]。以培养 90 h 为繁殖高峰, 阿米巴数量达到 1856 个/ μl 。

2.2. 鸡红细胞悬液

取鸡静脉血, 加入等量微孔过滤的 Alsever's 液: 葡萄糖 2.46 g, 柠檬酸钠 0.96 g 和氯化钠 0.504 g, 溶解在 120 ml 双蒸馏水中, 调节 pH 至 6.1, 4℃贮存, 加入肝素)。实验时, 红细胞悬液 2500 rpm 离心 5 min, 洗涤三次, 调节红细胞数至 $2 \times 10^8/\text{ml}$ 备用。

2.3. 动物分组

实验小鼠, 昆明系, 体重 20~24 g, 雄性, 安徽科技学院实验动物中心提供。随机选择 40 只体重 20~24 g 的健康小鼠, 分为 4 组, 每组 10 只。

2.4. 吞噬功能测定[5]

处理前禁食 12 小时，每只小鼠腹腔注射阿米巴液 1.0 ml，低浓度组为 1000 个/ μl ，中浓度组为 2000 个/ μl ，高浓度组为 3000 个/ μl ，对照组注射等量生理盐水。两小时后，每只小鼠腹腔注射 1% 鸡红细胞悬液 0.5 ml，轻轻揉腹部使外源细胞分散。0.5 小时后颈椎脱臼处死小鼠，无菌打开腹腔，取腹腔液涂片，瑞氏染色，镜检，每片计数 100 个阿米巴细胞，计算吞噬百分率和吞噬指数。

吞噬百分率 = (吞噬鸡红细胞数的阿米巴/阿米巴总数) \times 100%。

吞噬指数 = (被吞噬的鸡红细胞数/阿米巴总数) \times 100%。

2.5. 数据处理

SPSS11.0 统计软件进行 t 检验，数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

3. 结果

见表 1。结果表明，随着阿米巴浓度上升，吞噬百分率和吞噬指数都同步上升，但与空白组相比，低浓度组的吞噬指数存在一定的降低现象。不同级别之间，差异达到显著水平。

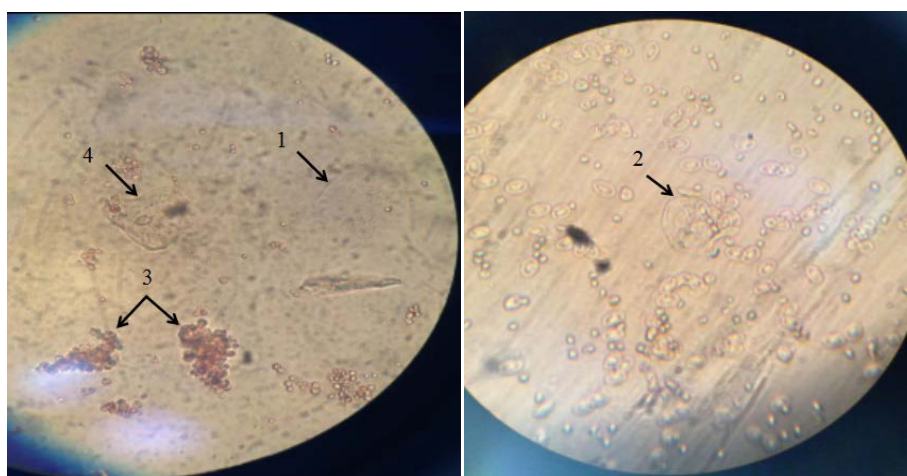
鸡血细胞表面粘附着许多阿米巴，鸡血细胞明显减少，可以观察到阿米巴正在吞噬鸡血细胞。随着鸡血细胞的减少，阿米巴的数量不断增加，阿米巴呈现聚集的趋势。由于鸡血细胞大量减少。图 1 可以清楚地看出这种趋势(放大倍数：10 \times 40)。

Table 1. The gum Amiba phagocytic function within the abdominal cavity in mice ($\bar{x} \pm s$)

表 1. 齿龈阿米巴在小鼠腹腔内的吞噬功能($\bar{x} \pm s$)

组别	阿米巴浓度(个/ μl)	小鼠个数(只)	吞噬百分率	吞噬指数
空白组	0	10	2.3 \pm 0.05	0.4 \pm 0.02
低浓度组	1000	10	3.9 \pm 0.08**	0.3 \pm 0.03
中浓度组	2000	10	3.2 \pm 0.05*	0.6 \pm 0.02
高浓度组	3000	10	4.1 \pm 0.06*	0.7 \pm 0.05*

与空白组比较：*P < 0.05，**P < 0.01。



图注：1. 未吞噬鸡血红细胞的齿龈阿米巴。2. 齿龈阿米巴吞噬鸡血红细胞的初级阶段。3. 吞噬了大量的鸡血红细胞的齿龈阿米巴。4. 鸡血红细胞已被齿龈阿米巴逐渐消化。

Figure 1. *Entamoeba gingivalis* phagocytosis of chicken red blood cells

图 1. 齿龈阿米巴吞噬鸡血红细胞的情况

4. 讨论

自从 Gannon 等[6]成功在体外培养 *E.g.* 以来,对齿龈阿米巴的研究也得到了进一步提高。齿龈内阿米巴伪足内外质分明,活动迅速,形变能力发达,常呈现出球状、舌状及其他很不规则的形状。齿龈内阿米巴在小鼠腹腔内的速度各不相同,经历相同培养时间的阿米巴在视野中往往呈现出不同的吞噬状态。阿米巴的生存条件不是很高,它可以在低温度,偏碱等条件下生存。

导致齿龈内阿米巴处于不同吞噬状态的情况可能有两种:1、每个齿龈内阿米巴周围的鸡血红细胞浓度或酵母细胞浓度不同所导致;2、齿龈内阿米巴自身在培养基上的生长成都不同。在体表有损伤的情况下,*E.g.*可诱发自由基大量生成,引起病理性脂质过氧化反应,生成有细胞毒性的脂质自由基和 MDA 等,加速生物膜的破坏,促使细胞崩溃[7]。

溶组织内阿米巴具有某些表膜特性,拥有吞噬不同物质的能力[8]。早在 100 年前 Lesh 便证实在阿米巴痢疾患者粪便中分离的阿米巴滋养体含有红细胞[9],认为其致病株可摄取和吞噬红细胞,并被公认为致病性虫株的最重要的鉴别特征。致病性虫株可在短时间内吞噬大量红细胞,吞噬过程远比非致病性虫株迅速而有效[10],而较高的红细胞吞噬率又与其表面特性有关。

5. 结论

本研究表明,齿龈内阿米巴在小鼠腹腔中表现出高度吞噬红细胞作用,并出现了溶胶原作用,对小鼠腹腔有不同程度的攻击作用。

基金项目

本文受到安徽科技学院大学生创新创业训练计划项目资助,项目编号:108792015047。

参考文献 (References)

- [1] 林仲民,吴之芳. 604 人齿龈内阿米巴的调查分析:初步探讨原虫与牙周炎的关系[J]. 实用口腔医学杂志, 1987(3): 14-16.
- [2] 林山,王贵云. 人齿龈内阿米巴的生态学作用分析[J]. 中外口腔医学, 1993(5): 18-21.
- [3] 陈佩惠,孔德芳,李慧珠,等. 人体寄生虫学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1988: 37-38.
- [4] 陈金富,刘光英,温旺荣. 齿龈内阿米巴的连续培养及其生长情况[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999(17): 209-211.
- [5] 张淼涛,王秋芳,李效梅,等. 中草药对小白鼠巨噬细胞吞噬力的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2000, 28(12): 26.
- [6] Gannon, J.T. and Linke, H.A.B. (1989) Studies on the Microflora Associated with Xenic Cultures of *Entamoeba gingivalis*. *Microbiology*, **85**, 95-100.
- [7] 谭颖徽,李中禹,蒋和田,等. 重型颌伤血中脂质过氧化物和超氧化物歧化酶早期改变及意义[J]. 华西口腔医学杂志, 1993(11): 10-12.
- [8] 黄翔,陈金富,温旺荣. 齿龈内阿米巴培养方法的研究[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1998(6): 32-34.
- [9] 刘光英,陈金富,温旺荣,等. 齿龈内阿米巴致病作用的动物实验[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 19(4): 229-232.
- [10] Bartold, P.M. (1984) The Effect of Oxygen-Derived Free Radicals on Gingival Proteoglycans and Hyaluronic Acid. *Journal of Periodontal Research*, **19**, 390-400. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1984.tb01012.x>

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：hjbm@hanspub.org