

## 日本血吸虫尾蚴细胞的传代培养及抗原性检测

张中庸<sup>1,2</sup> 曾宪芳<sup>1</sup> 李靛如<sup>1,2</sup> 易新元<sup>1</sup> 曾庆仁<sup>1\*</sup> 张京<sup>2</sup> 言敢威<sup>1</sup> 章洁<sup>1</sup>

【摘要】目的 探索体外培养日本血吸虫尾蚴细胞的增殖与传代技术。方法 无菌收集日本血吸虫活尾蚴 5 000~10 000 条,置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,用组织刀快速割切尾蚴使成组织碎裂物,加入 250 U 蟹胶原酶在 26 ℃ 下孵育 30 min,然后离心去酶,加入含有青霉素(100 U/ml)、链霉素(0.1 mg/ml)、两性霉素 B(0.25 μg/ml)和适量促细胞生长物的 RPMI 1640 改良培养基中作原代培养,当贴壁细胞增殖长满瓶底时,以 1:2 的接种率进行传代培养;获取第 5 代培养细胞作 ELISA 检测血吸虫病患者的血清中抗体。结果 在原代培养的第 3 天可见尾蚴组织的周围有呈单个存在或索状排列的发亮细胞,第 10 天可见单层细胞形成,第 14 天贴壁细胞长满瓶底并作传代培养;在传代培养中可见细胞呈均匀生长,每 7~14 d 传代一次;用第 5 代培养细胞作抗原,检测 31 例患者的阳性率为 90.3%,检测 30 名正常人血清的假阳性率为 6.7%。结论 日本血吸虫尾蚴细胞体外传代培养至第 5 代,可用于免疫学研究。

【关键词】 日本血吸虫; 血吸虫尾蚴; 细胞传代培养

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

### Passage Cultivation and Immunological Identification of *Schistosoma japonicum* Cercaria Cells

ZHANG Zhong-yong<sup>1,2</sup>, ZENG Xian-fang<sup>1</sup>, LI Jing-ru<sup>1,2</sup>, YI Xin-yuan<sup>1</sup>, ZENG Qing-ren<sup>1\*</sup>, ZHANG Jing<sup>2</sup>, YAN Gan-wei<sup>1</sup>, ZHANG Jie<sup>1</sup>

(1 Laboratory of Schistosomiasis, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078;

2 Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384)

【Abstract】 Objective To study the methods of *in vitro* proliferation and passage cultivation of the cells of *Schistosoma japonicum* cercariae. Methods Between 5 000 and 10 000 cercariae of *Schistosoma japonicum* were collected under aseptic condition and placed into RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum. The cercariae were disrupted swiftly using a tissue tearer, and the disrupted material was incubated for 30 min in 250 U crab collagenase at 26 ℃. After centrifugation, the enzyme solution was removed, and modified RPMI 1640 medium was added containing penicillin (100 U/ml), streptomycin (0.1 mg/ml), and amphotericin B (0.25 μg/ml), and certain amount of cell growth enhancing material. When adhesion cells proliferated and grew fully on the bottom, subculture was in progress according to 1:2 split ratio. Cells cultivated by 5 passages were used to detect the specific antibody in sera of patients with chronic schistosomiasis through ELISA. Results On the 3rd day of primary cultivation, bright cells, both individual and clustered, were seen around the disrupted cercariae. A monolayer of cells formed on the 10th day. Adhesion cells grew fully on the bottom and subculture was in progress on the 14th day. Cells were found to grow evenly in passage cultivation, within every 7-14 days another passage could be made. Using cells of the fifth passage cultivation as antigen, the antibody positive rate was 90.3% in patients with chronic schistosomiasis and the false positive rate was 6.7% in healthy controls. Conclusion The *in vitro* passage cultivation of *S. japonicum* cercaria cells has been successful to the 5th generation and the cultured material could be used in the immunological research.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*, cercaria, cell passage cultivation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30170840) and the Project of Major Diseases Control, Ministry of Agriculture (No. 20014704)

\* Corresponding author, Email: qingrenz@hotmail.com

近年来,国内外不少学者对血吸虫病疫苗开展了深入研究,但尚未解决材料来源、成本、纯度等问题。为解决血吸虫病疫苗、免疫诊断、生物学和药物筛选等研究的材料来源或探索新型研究材料等问题,我们正试图采用细胞工程技术对日本血吸虫在体外进行细胞培养研究。血吸虫尾蚴是对人兽的感染阶段,也是

疫苗研究、预防药物筛选的重要靶子,因此,选择尾蚴细胞作体外培养具有非常重要的意义。

### 材料与方 法

#### 1 培养物制备

将阳性钉螺(购自湖南省血吸虫病防治所)浸浴于消毒、去氯水中,释放尾蚴;收集 5 000~10 000 条尾蚴,置于含有 10% 胎牛血清的培养基中,然后,漂浮于 1 ml 含有 0.2% 胰酶的 1 mmol/L 二乙胺四乙酸(ED-TA)0.5 ml 的 RPMI 1640 培养液中,待尾蚴沉于瓶底时,将培养液量减少至 200 μl;用微型组织刀速将尾

基金项目:国家自然科学基金(No. 30170840)和农业部重大疾病防治项目(No. 20014704)

作者单位:1 中南大学湘雅医学院寄生虫学教研室,长沙 410078;

2 天津农学院,天津 300384

\* 通讯作者:Email: qingrenz@hotmail.com

蜗切成组织碎裂物,加入 250 U 蟹胶原酶在 26 ℃ 下解育 30 min 后,离心(除去酶溶液及尾蚴碎裂物)。所有操作均在 12 mm × 75 mm 硅玻璃管内进行。继后将尾蚴碎裂物置于含有青霉素(100 U/ml)、链霉素(0.1 mg/ml)、两性霉素 B(Sigma 可溶于水的产品,0.25 μg/ml)的 RPMI 1640 改良培养基中。

## 2 细胞培养与传代

每组组织培养瓶接种 1 500 条尾蚴组织碎裂物,瓶内 RPMI 1640 改良培养基中含 0.5% 胎牛血清(此低浓度有助于贴壁)和适量促细胞生长物,37 ℃ 孵育。第 2 天更换新制备的含有 5% ~ 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 改良培养基。在原代培养第 10 天,发现组织周边细胞贴壁增殖生长良好,在第 14 天贴壁细胞长满瓶底时开始传代。传代均以 1:2 的接种率进行培养。传代细胞可在 7~15 d 内长满瓶底,作下步传代。

## 3 抗原特异性鉴定

日本血吸虫尾蚴原代培养细胞,由于含有较多尾蚴碎裂物而未考虑作抗原鉴定试验。本鉴定仅采用了体外培养第 5 代日本血吸虫尾蚴细胞,制成 3 种不同抗原(整体细胞、超声后离心上清液、超声后离心沉渣),对 31 例慢性血吸虫病患者(粪卵阳性者)血清和 30 份正常人(本校无疫水接触史学生)血清作常规

ELISA 检测。抗原包被于 ELISA 条微孔内(抗原包被量或浓度:整体细胞抗原约 180 个细胞/孔、超声后离心上清液 0.01 μg/ml、超声后离心沉渣 0.05 μg/ml)。检测血清稀释度 1:50;酶标物为 HRP-SPA;底物显色剂为 TMB;用 Sigma 酶标仪读取 OD 值数据。病人血清和正常人血清平行检测,并设阴性、阳性和空白对照。OD 值数据 ≥ 阴性对照的两倍者定为阳性。

## 结 果

### 1 细胞培养

1.1 原代培养 初期(第 3 天),在培养瓶的侧壁可见成对的细胞,在尾蚴碎片的周边,可见发亮而饱满呈单个分布或呈索状排列的细胞。继后,可见不同细胞构成的多个细胞小岛,呈无序分布。随后细胞小岛互连接而出现细胞岛(图 1A),显示细胞增殖。第 10 天细胞单层形成(图 1B),随后细胞增殖生长旺盛,并可见贴壁与悬浮的细胞同时存在。随着细胞不断增殖,在第 14 天左右可见细胞贴壁生长布满瓶底,此时显示需作传代培养。

1.2 传代培养 从原代培养物中获取大小相似的细胞,以 1:2 的接种率进行传代培养。在传代培养第 10 天左右,可见培养物中形成密集、大小相近、分布均匀的细胞(图 1C)。每 7~14 d 传代一次,现已进入第 5 代传代培养。

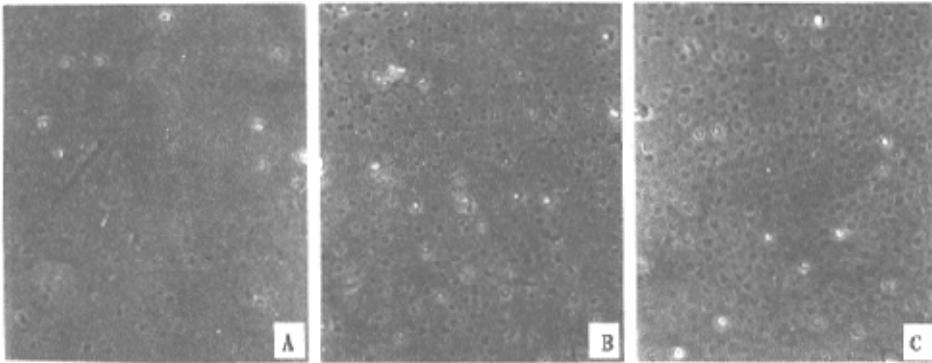


图 1 日本血吸虫尾蚴细胞原代培养及其传代生长 A 原始培养出现的细胞岛(×66) B 细胞单层形成(×66) C 传代培养细胞(×66)

Fig. 1 The primary and passage cultivation of cells from cercariae of *Schistosoma japonicum* A The cell islet in primary cultivation (×66) B The monolayer cells in primary cultivation (×66) C The cells in passage cultivation (×66)

## 2 ELISA 检测血吸虫病患者血清中抗培养细胞抗体

将第 5 代传代培养细胞制成 3 种不同抗原分别包被 ELISA 固相。各自检测参考阴性、阳性血清结果表明:用培养细胞检测的阴性、阳性血清的 OD 值数据相差最大,但包被好的固相仅能保存 2 d;用超声后离心沉渣(经 8 mol/L 尿素处理)检测的效果不理想;用培

养细胞超声后上清液检测的结果最稳定,用于检测 31 例血吸虫病患者血清,阳性率为 90.3%。30 例正常人中,2 例阳性,假阳性率为 6.7%。

## 讨 论

寄生虫细胞是进行分子生物学、细胞生物学以及

发育生物学、药理学、免疫学和其它学科研究的有力工具或材料。血吸虫细胞培养一直是一个难题,近 20 年来,国内外学者以组织细胞培养的方法对曼氏血吸虫<sup>[1,2]</sup>和日本血吸虫进行了大量研究工作。我们于 1997 年以细胞工程学技术完成了猪囊尾蚴细胞系的建立及其生物学性质的研究<sup>[3]</sup>,并且通过了鉴定,产生了一个寄生蠕虫细胞系。2000 年,我们开始采用相同的技术对日本血吸虫尾蚴细胞进行了体外培养研究<sup>[4]</sup>。

本研究对日本血吸虫尾蚴细胞培养及其初步鉴定的结果表明:对尾蚴细胞培养已突破传代培养技术难关;进入第 5 代传代培养的细胞用于检测血吸虫病患者血清中特异性抗体,显示有一定的免疫学研究价值,为进一步建立该细胞系(包括生长指数与生长曲线测定、一般形态与超微结构观察、染色体与细胞化学及蛋白质分析等)的研究提供了条件。

本研究对日本血吸虫尾蚴细胞获得传代培养成功的技术关键在于:在 RPMI 1640 培养基中加有适量细胞生长物;在培养中调整胎牛血清浓度和培养条件。但该条件是否适合继续传代培养,确保培养细胞生物遗传性状稳定,则有待于进一步观察研究。

### 参 考 文 献

[1] Weller TH, Wheelodon SK. The cultivation *in vitro* of cells derived from adult *Schistosoma mansoni*. I. Methodology; criteria for evaluation of cultures; and development of media[J]. Am J Trop Med Hyg, 1982, 31: 335-348.

[2] Bayne CJ, Menino JS, Hobbs DJ, et al. *In vitro* cultivation of cells from larval *Schistosoma mansoni* [J]. J Parasitol, 1994, 80: 29-35.

[3] 李靛如, 张中庸, 张京, 等. 猪囊尾蚴 CC-97 免疫细胞系的建立及其生物学性质研究[J]. 中国农业大学学报, 1998, 3(增刊): 140-141.

[4] 血吸虫病研究室. 血吸虫细胞培养首次获得成功[J]. 湖南医科大学学报, 2000, 25: 600.

(收稿日期: 2002-01-24 编辑: 庄兆农)

文章编号: 1000-7423(2002)-06-0334-01

## 【简报】

# 慢性血吸虫病并发周围神经和植物神经功能障碍

金梅<sup>1</sup> 林军华<sup>2</sup> 王士列<sup>3</sup> 金辉<sup>2</sup>

中图分类号: R532.21

文献标识码: D

慢性血吸虫病并发周围神经和植物神经功能紊乱较为少见,现将 1978 年 6 月~1998 年 6 月作者诊治的 36 例报告如下。

### 1 临床资料

1.1 一般资料 36 例中,男 34 例,女 2 例。年龄 13~20 岁 8 例,21~30 岁 6 例,31~40 岁 6 例,41~50 岁 10 例,51~60 岁 6 例。全部病例均来自血吸虫病重疫区,有血吸虫疫水接触史;农民 28 例,渔民 6 例,居民 2 例。24 例直肠粘膜活检找到血吸虫虫卵,粪便集卵阳性 4 例,孵化阳性 10 例,血清间接血凝试验或胶乳试验阳性 6 例,脑脊液阳性 2 例。

1.2 临床表现 ①颅神经病变 12 例,其中左侧动眼神经损害 2 例,三叉神经痛 4 例,单侧外展神经麻痹 2 例,单侧周围性面神经麻痹 4 例。12 例中,头痛、头晕各 6 例,呕吐 2 例,局限性运动型癫痫 6 例,癫痫大发作 2 例。②脊神经病变 4 例,其中右侧坐骨神经痛 2 例,左侧臂丛神经炎 2 例。③多发性神经炎 6 例,其中末梢神经炎 4 例;四肢远端感觉、运动和营养障碍、手

林套式痛觉减退、格林巴里综合征 2 例。④植物神经功能障碍 14 例,均有头痛、头晕、心慌、气短、多汗等症状,其中有红斑肢痛症、贺纳氏综合征、直立性低血压、大小便失禁各 2 例,间脑癫痫样发作 1 例,右侧面部、上肢及胸部大汗淋漓,而对侧干燥无汗,心率加快,血压升高,上述表现持续约 20 min 可自行缓解或用抗惊厥药中止,但常复发,有时发作 5~6 次/d。给予抗血吸虫治疗后,发作消失。

1.3 治疗 全部病例均给予口服吡喹酮治疗,总量 60 mg/kg,3 次/日,连服 3 日。治疗后 1~2 个月,治愈 31 例,明显好转 3 例,无效 2 例。无效的 2 例在 3 个月后再口服吡喹酮一疗程,其中 1 例治愈,1 例明显好转。

### 2 讨论

在诊断此类疾患时,应依靠血吸虫病史,排除性诊断及试验性治疗,特别要注意与颅内各种病变、糖尿病等相关病因所致的神经病变鉴别。对于初诊病例,如抗血吸虫药物治疗后症状或体征消失或明显好转,可以确诊本病;对于可疑病例,若患者来自血吸虫病疫区,在排除上述相关病因后,要考虑血吸虫病引起神经损害的可能,必要时可作诊断性抗血吸虫药物治疗进行诊断。

作者单位: 1 中国人民解放军第一军医大学南方医院神经内科(研究生),广州 510515;  
2 中国人民解放军第一七一医院,九江 332000;  
3 九江市第一人民医院,九江 332000

(收稿日期: 2002-03-15 编辑: 庄兆农)