

文章编号: 1000-7423(2007)-01-0057-04

【实验研究】

人芽囊原虫保存方法的初步研究

田春林, 万孝玲, 刘登宇, 何登贤

【摘要】 目的 观察冻存剂、温度等因素对人芽囊原虫活力的影响, 探索理想的人芽囊原虫保存方法。方法 从患者阳性粪便中分离人芽囊原虫, 分装到 2 ml 无菌冻存管内, 分别加入 10% 二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO)、40% 丙三醇 (GL) 和 15% 乙二醇 (EG) 作冻存剂, 放置于不同的温度下保存, 用台盼蓝染色法和原虫培养法测定细胞的活力和增殖能力。结果 虫体在室温 (18 ℃~20 ℃) 下可存活 3 周, 在 4 ℃~6 ℃ 存活不到 1 周。加入冻存剂后, 置 -20 ℃ 和液氮 (-196 ℃) 下可存活 3 个月以上。用 40% GL 作冻存剂, 于液氮低温下冻存的虫体保存半年后复苏, 活力仍达 41.7%, 培养 72 h 后多见分裂相细胞。结论 应用 40% GL 作为冻存剂, 在液氮中低温保存人芽囊原虫效果较佳。4 ℃ 不适于保存人芽囊原虫。

【关键词】 人芽囊原虫; 保存; 温度

中图分类号: R382.9

文献标识码: A

A Preliminary Study on Preservation Methods of *Blastocystis hominis*

TIAN Chun-lin, WAN Xiao-ling, LIU Deng-yu, HE Deng-xian

(Department of Parasitology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the effect of different cryoprotective agents and temperature factors on the viability of *Blastocystis hominis* so as to explore the ideal method for preservation of *B. hominis*. **Methods** *B. hominis* agents were obtained from a patient's fecal specimen. Having washed by normal saline and divided into tubes, the samples were cryopreserved in -20 ℃ refrigerator or in -196 ℃ liquid nitrogen with 10% DMSO, 40% glycerol and 15% ethylene glycol respectively. The thawed *B. hominis* agents were then used for culture. By trypan blue staining and microscopy, the viability and proliferation of those resuscitative cells were investigated. **Results** *B. hominis* survived for 3 weeks at 18 ℃~20 ℃ while less than 1 week at 4 ℃~6 ℃. When stored in -20 ℃ refrigerator or liquid nitrogen with cryoprotective agents, they survived for more than 3 months. The cryopreservation with 40% glycerol at -196 ℃ for 6 months resulted in 41.7% viability of the revived cells. Cleavage cells were easily observed after culturing for 72 hours. **Conclusion** Preserving *B. hominis* in liquid nitrogen with 40% glycerol is an optimal cryopreservation protocol.

【Key words】 *Blastocystis hominis*; Preservation; Temperature

Supported by the Youth Science Fund of Guangxi Province (No. 0640116)

人芽囊原虫 (*Blastocystis hominis*) 是一种寄生于人和其他高等灵长类动物肠道内的寄生虫, 广泛分布于世界各地, 可引起以自限性腹泻为主要症状的肠道原虫病^[1-3]。自何建国等^[4](1990)首次从 1 例婴儿腹泻粪便标本中检出人芽囊原虫后, 该虫逐渐受到国内寄生虫学和临床医学研究者的关注, 相继进行了形态学与超微结构观察、致病性以及人芽囊原虫感染的流行病学调查等研究。本实验通过对人芽囊原虫低温保存方法的研究, 探索一种简便、实用而又有效的方法, 有助于提供大量活原虫, 为建立原虫库, 了解人芽囊原虫的生物学特性、进行药物筛选和免疫诊断等研究打下基础。

材料与方法

1 人芽囊原虫株

取自广西医科大学第一附属医院门诊患者阳性粪便 (人芽囊原虫“++++”), 以生理盐水离心沉淀, 分离洗涤 3 次, 共获得 4 株人芽囊原虫, 其中 3 株为颗粒型, 1 株为空泡型。用生理盐水将虫体稀释成 2×10^6 ml 浓度, 分装到无菌冻存管内, 每管约 1 ml。

2 实验分组和观察

设常温对照组和低温实验组, 观察常温及低温条件下人芽囊原虫的保存效果。常温对照组分 2 组, 1 组在室温下 (18 ℃~20 ℃), 另 1 组在普通冰箱内 (4 ℃~6 ℃), 均不加冻存剂。光镜每天观察原虫生存状态。

基金项目: 广西青年科学基金 (No. 0542046)

作者单位: 广西医科大学寄生虫学教研室, 南宁 530021

为-20℃组和-196℃组,2组分别加入10%二甲基亚砷(DMSO)、40%丙三醇(GL)和15%乙二醇(EG)冻存剂。每次复苏时,从以上6个冻存剂组中各取出1支冻存管于37℃水浴速融,吸取1滴于载玻片上,显微镜下观察原虫形态和活力,然后用生理盐水洗去冻存剂,将原虫转入含15%新生小牛血清的洛克氏鸡蛋血清双相培养基(locke-egg-serum, LES)中培养72h,观察原虫生长增殖情况。每月解冻观察1次,为期半年。

3 原虫存活的判断

3.1 形态观察 主要观察细胞的一般形态、结构、透明度等。

3.2 细胞活力检测 冻存管解冻后,吸取1滴原虫悬液于载玻片上,加入1滴2%的台盼蓝染液,染色5min,加上盖玻片,油镜下计数死、活细胞数,被台盼蓝染成深蓝色为死细胞,不着色的为活细胞,镜下呈无色透明状。计算活细胞率(即:活细胞数与总细胞数的比值),以保存时间为X轴,活细胞率为Y轴,绘制细胞活力时效曲线,观察复苏细胞的活力。

3.3 细胞生长增殖观察 将原虫转入LES培养基培养72h,观察有无分裂相细胞,检测细胞增殖活力。

4 统计学分析

用SPSS 10.0软件包对实验数据进行 χ^2 检验分析。

结 果

1 形态观察

在室温下放置原虫,可见虫体在1周内显示出良好的生理状态,细胞透亮,胞体饱满,立体感强,周围有明显的光晕,形态完整,结构清晰,第3周后虫

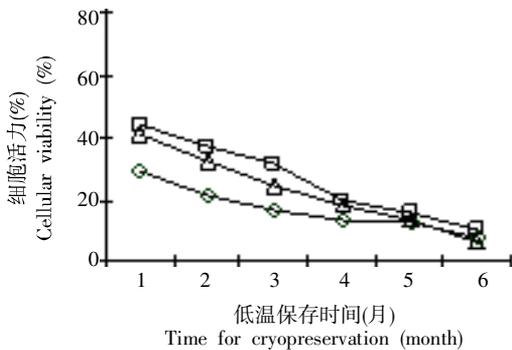
体透明度下降,着色不均匀、光泽消失;细胞内出现边缘着色深、不透明的颗粒和空泡,与颗粒型和空泡型原虫细胞内原有的颗粒和空泡明显不同;细胞扭曲、轮廓不清晰,胞膜内陷或膨出,结构逐渐模糊。普通冰箱(4℃~6℃)保存的原虫,第2天后虫体透明度下降,逐渐出现着色深的颗粒和空泡,与室温下保存第3周后的虫体形态变化类似。-20℃和液氮下保存的虫体,解冻复苏后,可见虫体透亮,形态完整,结构清晰。

2 细胞活力

低温下冻存的人芽囊原虫,用台盼蓝染色法检测复苏原虫存活状况,保存半年后,-20℃和-196℃两个观察组的平均活细胞率分别为21.9%和45.6%。时效曲线显示,随着冻存时间的延长,两个观察组的细胞活力均有所下降,以-20℃组下降较明显;-20℃各冻存剂组的保存效果均不如-196℃组(图1、2)。

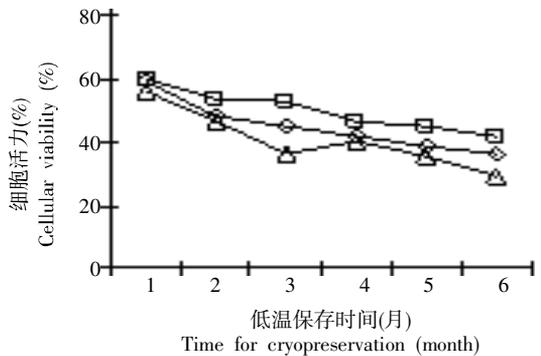
不同低温条件下保存人芽囊原虫3个月后,检测复苏原虫细胞活力,-20℃和-196℃两个观察组的细胞活力较初始冻存时均有所下降,各冻存剂组复苏原虫的细胞活力不同(表1)。通过统计软件分析发现在同一温度不同冻存剂中冻存时,原虫复苏后细胞活力的差异有统计学意义(-20℃: $\chi^2=11.399, P<0.01$;-196℃: $\chi^2=9.351, P<0.01$)。表明低温冻存3个月,不同的冻存液对虫体的保护效果不完全相同。图1的活力曲线显示,40%GL的保存效果优于10%DMSO和15%EG。

不同低温下冻存6个月后复苏人芽囊原虫,-20℃和-196℃两个观察组显示各冻存剂组的细胞活力不相同,用40%GL作冻存剂于液氮低温下冻存的虫体,保存半年后复苏细胞,活力仍可达41.7%,保存效果较好(表1)。用相同冻存剂保存,比较-20℃和



◇ 10%二甲基亚砷 DMSO, □ 40%丙三醇 GL, △ 15%乙二醇 EG

图1 -20℃保存人芽囊原虫复苏细胞活力曲线
Fig.1 The cellular viability curve of thawed *B. hominis* cryopreserved at -20℃



◇ 10%二甲基亚砷 DMSO, □ 40%丙三醇 GL, △ 15%乙二醇 EG

图2 -196℃保存人芽囊原虫复苏细胞活力曲线
Fig.2 The cellular viability curve of thawed *B. hominis* cryopreserved at -196℃

表 1 不同低温冻存 3 及 6 个月后人芽囊原虫复苏细胞的活力
Table 1 Cellular viability of thawed *B. hominis* cryopreserved at different temperatures for 3 and 6 months

冻存时间 (月) Period of cryopreservation (months)	温度 Temperature (°C)	10% 二甲亚砜 DMSO			40% 丙三醇 GL			15% 乙二醇 EG		
		总虫数 Total	活虫数 No. survival	活力(%) Viability	总虫数 Total	活虫数 No. survival	活力(%) Viability	总虫数 Total	活虫数 No. survival	活力(%) Viability
3	-20	182	30	16.5	173	55	31.8	166	40	24.1
	-196	173	78	45.1	169	89	52.7	191	70	36.7
6	-20	159	12	7.5	192	20	10.4	184	12	6.5
	-196	210	76	36.2	180	75	41.7	173	51	29.5

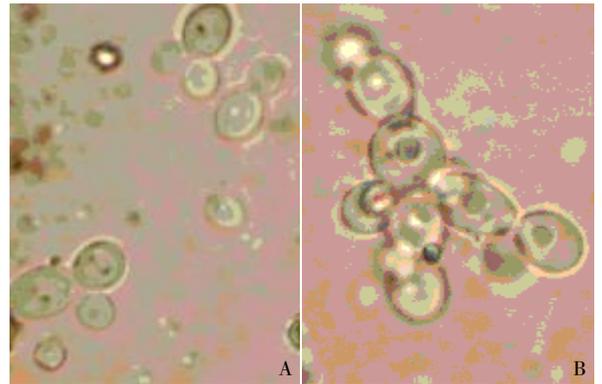
-196 °C 低温冻存后复苏原虫的活力, 差异有统计学意义 (10% DMSO, $\chi^2=40.879$; 40% GL, $\chi^2=47.710$; 15% EG, $\chi^2=32.338$; $P<0.01$)。提示 -196 °C 组冻存复苏细胞的活力高于 -20 °C 组。同样, 在分析冻存 3 个月后的复苏细胞活力数据时这一结论仍然成立 (3 个月时 10% DMSO, $\chi^2=34.281$, $P<0.01$; 40% GL, $\chi^2=15.276$, $P<0.01$; 15% EG, $\chi^2=6.565$, $P=0.01$)。

3 细胞增殖

常温下 (18 °C~20 °C) 保存, 虫体于第 2 天开始分裂繁殖, 逐渐形成较多的细胞岛, 第 2 周后活力下降, 一般可存活 3 周左右。4 °C~6 °C 保存的原虫, 存活时间一般不超过 1 周, 虫体分裂增殖现象也极少见。应用冻存剂在 -20 °C 和 -196 °C 保存, -20 °C 保存的虫体解冻后培养 72 h, 可见 40% GL 和 15% EG 冻存剂组有分裂相细胞, 且 40% GL 组可见芽生细胞, 而 10% DMSO 组中未见分裂相细胞。-196 °C 保存的虫体经解冻后培养 72 h, 各冻存剂组的虫体均可见分裂相细胞, 以 40% GL 组原虫长势较好, 能形成较多的分裂细胞 (图 3 A); 复苏培养 1 周后能形成细胞岛 (图 3 B)。-196 °C 保存半年后复苏, 原虫仍存活并能分裂增殖。

讨 论

如何长期保存活的原虫, 是寄生虫学研究的重要课题, 用体外培养或动物接种方法保存原虫, 不仅耗时费力, 还可能导致虫体存活力降低、毒力减退等生物学特性的改变, 甚至出现虫株变异的现象, 给寄生虫的防治研究带来一定影响。近年来, 国内外研究低温保存技术发现, 适当降低温度可减缓生物新陈代谢, 延长其存活时间, 并在多种原虫的保存实验中得到了验证^[5]。但随着研究的深入, 发现低温保存也能损伤生物细胞, 甚至导致生物体死亡。因为, 在低温保存过程中, 细胞外的水分首先结冰, 使未结冰溶液中的电解质浓度升高, 引起细胞溶质损伤; 此外, 随



A: 40% GL 液氮保存人芽囊原虫复苏培养 72 h (空泡型, $\times 1000$), B: 40% GL 液氮保存人芽囊原虫复苏培养 1 周 (空泡型, $\times 1000$)。A: *B. hominis* cryopreserved at -196 °C with 40% glycerol for months, thawed and inoculated for 72 h (vacuolated form, $\times 1000$), B: *B. hominis* cryopreserved at -196 °C with 40% glycerol for months, thawed and inoculated for 1 week (vacuolated form, $\times 1000$)。

图 3 人芽囊原虫复苏后培养涂片

Fig.3 The smears of thawed *B. hominis* and inoculated in LES

着温度的降低, 细胞内的水分也会结冰, 所形成的冰晶会进一步破坏细胞膜和细胞器, 从而导致细胞冰晶损伤。影响损伤程度的因素较多, 主要有冷冻速度、融冻速度及冷冻保护剂等^[3]。冷冻保护剂能保护细胞免受冷冻损伤, 一般可分为渗透性与非渗透性两类。本研究所选用的 DMSO、GL 和 EG 均为小分子物质, 属于渗透性保存剂, 具有易溶于水、与水分子结合能力强和易穿透细胞膜等特点, 在细胞的冻存与复苏过程中, 能调节细胞内外的水和电解质浓度平衡, 减少冰晶形成和溶质损伤。本实验发现: 3 种冻存剂在低温下均有保护细胞的作用, 人芽囊原虫置于低温冰箱 (-20 °C) 和液氮 (-196 °C) 下可存活 3 个月以上, 以 40% GL 的保存效果最佳, 可较好地保持细胞的活力和增殖潜能。国内外报道超低温保存单细胞原虫, 常选用 GL 和 DMSO, 如疟原虫红内期的超低温保存。有实验证实, 虽然 GL 和 DMSO 均为渗透性保护剂, 但 GL 的膜渗透性明显比 DMSO 快, GL 的冷冻保护作用优于 DMSO^[4], 这一结论与本实验结果相符。还有研究者认为, 用 EG 作为弓形虫速殖子的冻存保护

剂效果较好, 操作简易, 试剂价廉, 还可置普通冰箱内冻存, 适用于一般实验室。本实验应用 EG 在 -20℃ 保存人芽囊原虫, 也显示出一定的保护作用, 但其保存效果不如 GL。

关于保存温度, 一般认为, 保存温度越低越好。原虫在 -20℃ 只能作短期保存, -70℃ 时可保存数月, 在 -196℃ 可使细胞的物质代谢和生长几乎停止。研究表明, 在这样的冻存条件下, 细胞内调节和控制细胞生长代谢的各种酶类受到极大抑制, 生化反应十分缓慢, 从而避免细胞遗传性状的改变, 理论上可用作细胞的长期保存。如红内期疟原虫等经低温保存后, 仍保持原有的生物学特性不变^[6,7]。本实验发现人芽囊原虫在室温(18℃~20℃)下可存活 3 周, 而在冰箱内(4℃~6℃)存活不到 1 周, 显示在常温下无法较好地保存虫体。在应用相同冻存液时, 比较 -20℃ 和 -196℃ 冻存后复苏细胞的活力, 发现两者的差异明显, -196℃ 冻存细胞复苏后的活力高于 -20℃ 组, 且冻存半年后复苏细胞仍具增殖活性, 培养 1 周后能形成细胞岛。因此, 作者认为应用保护剂在液氮低温条件下保存人芽囊原虫是可行的。

参 考 文 献

[1] Rito ZL, Luis H, Náquira C, et al. A simplified culture method for *Blastocystis hominis*[J]. Rev Mex Patol Clin, 2000,47:17-19.

[2] Stenzel DJ, Lee MG, Boreham PF, et al. Morphological differences in *Blastocystis* cysts an indication of different species [J]. Parasitol Res, 1997,83:452-457.

[3] Windsor JJ, Macfarlane L, Hughes-Thapa G, et al. Incidence of *Blastocystis hominis* in faecal samples submitted for routine microbiological analysis[J]. Br J Biomed Sci, 2002,59:154-157.

[4] He JG, Jiang JB, Zhou H, et al. Studies of light microscope appearance and ultrastructure of *Blastocystis hominis* in vitro culture [J]. Acta Univ Sunyatseni: Nat Sci, 1990,29:122-128. (in Chinese) (何建国, 江静波, 周宏, 等. 人芽囊原虫的光学和超微结构研究 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 1990,29:122-128.

[5] Li J, Huang YM. Research progress on the technique of human parasite cryopreservation[J]. J Trop Dis Parasitol, 2005,3:118-120. (in Chinese) (李进, 黄亚铭. 人体寄生虫低温保存技术的研究进展[J]. 热带病与寄生虫学, 2005,3:118-120.)

[6] Kinyanjui SM, Howard T, Williams TN, et al. The use of cryopreserved mature trophozoites in assessing antibody recognition of variant surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes[J]. J Immunol Methods, 2004,288:9-18.

[7] Miyake Y, Karanis P, Uga S. Cryopreservation of protozoan parasites[J]. Cryobiology, 2004,48:1-7.

(收稿日期: 2006-06-29 编辑: 伯韦)

文章编号: 1000-7423(2007)-01-0060-02

【研究简报】

淮南地区毛毕属吸虫自然疫源地调查

郭家^{1,2}, 李朝品^{1*}, 王克霞¹

【摘要】 本文报道毛毕属吸虫(*Trichobilharzia*)可在耳萝卜螺、家鸭或野鸭体内完成其生活史, 人群接触疫水可引起毛毕属吸虫尾蚴性皮炎。淮南地区存在毛毕属吸虫自然疫源地。

【关键词】 毛毕属吸虫; 自然疫源地; 尾蚴性皮炎

中图分类号: R383.29

文献标识码: B

Survey on Natural Nidus of *Trichobilharzia* in Huainan Area

GUO Jia^{1,2}, LI Chao-pin^{1*}, WANG Ke-xia¹

(School of Medicine, Anhui University of Science & Technology, Huainan 232001, China)

【Abstract】 The life cycle of *Trichobilharzia* sp. can be completed in *Radix auricularia* and domestic or wild ducks, and people can contract cercarial dermatitis through water contact. Natural nidus of *Trichobilharzia* exists in Huainan area.

【Key words】 *Trichobilharzia*; Natural nidus; Cercarial dermatitis

* Corresponding author, E-mail: cpli001@126.com

毛毕属吸虫 (*Trichobilharzia*) 成虫寄生于家鸭、野鸭及其他鸟类的门静脉和肠系膜静脉内, 其尾蚴可侵袭人体引起变态

反应性皮炎^[1]。尾蚴性皮炎 (cercarial dermatitis) 在我国的吉林、辽宁、四川、福建、江苏、上海、广东及广西等地均有报道。李朝品等^[2]于 1996 年报道淮河水系发现毛毕属吸虫。为了明确淮南地区是否为其自然疫源地, 作者进行了本项调查, 结果报告如下。

作者单位: 1 安徽理工大学医学院, 淮南 232001;

2 齐齐哈尔医学院, 齐齐哈尔 161042

* 通讯作者, E-mail: cpli001@126.com