

福建棘隙吸虫与相关虫种随机引物扩增 多态DNA 分析及感染实验观察*

程由注¹ 张耀娟² 林陈鑫¹ 章子豪² 俞小淙² 林金祥¹ 蔡明阶³ 车卫红³

1 福建省寄生虫病研究所 福州 350001

2 南京医科大学寄生虫学教研室 南京 210029

3 湖北省汉川市卫生防疫站 汉川 432300

提要 目的: 探讨福建棘隙吸虫与相关虫种分类问题。方法: 应用 28 个随机引物扩增多态性 DNA, 根据福建棘隙吸虫、藐小棘隙吸虫(安徽)与日本棘隙吸虫(福建和江西)作相似性分析; 现场采检叶形棘隙吸虫(湖北)、藐小棘隙吸虫(安徽)和福建棘隙吸虫囊蚴进行人工感染实验及形态观察。结果: 分析福建、安徽与江西省 3 种棘隙吸虫的 469 个多态 DNA 片段, 福建棘隙吸虫与日本棘隙吸虫福建株、日本棘隙吸虫江西株与福建株、福建棘隙吸虫与安徽的藐小棘隙吸虫间基因组 DNA 的 RAPD 相似率分别为 20.8%、99.7% 及 97.6%。湖北、安徽和福建 3 省均分别获得叶形棘隙吸虫、福建棘隙吸虫及日本棘隙吸虫 3 种棘隙吸虫。结论: 福建棘隙吸虫与日本棘隙吸虫为两个独立虫种, 安徽的藐小棘隙吸虫与福建棘隙吸虫为同一虫种。湖北、安徽与福建 3 省均存在叶形棘隙吸虫、福建棘隙吸虫和日本棘隙吸虫 3 种吸虫的混合感染, 其中福建棘隙吸虫较为常见。

关键词 棘隙吸虫 随机扩增多态 DNA 感染实验 虫种

近年来, 分子生物学技术已广泛应用于寄生虫分类工作, 推动了寄生虫遗传变异分子分类学研究深入发展, 但迄今未见对棘隙吸虫研究报道。本文就先后在福建省发现寄生人体的两种棘隙吸虫^[1, 2]和安徽省发现的藐小棘隙吸虫^[3]及近期从江西省^[4]输入的日本棘隙吸虫进行随机引物扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 相似性分析, 并通过现场调查与人工感染实验, 以期对湖北与安徽两省的叶形棘隙吸虫^[5]及藐小棘隙吸虫病原虫种问题进行探讨分析。

材料与方 法

1 虫体的采集

用从福建省龙海市港尾村人工实验池内麦穗鱼体分离获得福建棘隙吸虫和日本棘隙吸虫囊蚴, 从福州市场购得来自江西省进贤县泥鳅体获得日本棘隙吸虫囊蚴, 从安徽省和县陈桥洲村池鱼分离获得藐小棘隙吸虫囊蚴, 分别感染实验幼犬。1 个月后解剖, 从小肠中分别获得虫体, 经生理盐水洗涤 3 次后, 分装于冷冻管中, 液氮保存备用。

2 虫体 DNA 抽提

按照文献^[6, 7], 采用苯酚-氯仿抽提虫体基因组 DNA。取 0.1 g 虫体在液氮保护下磨碎, 加抽提缓冲

液(10 mmol/L Tris HCl pH 8.0; 0.1 mol/L EDTA pH 8.0; 胰 RNA 酶 20 μg/ml; 0.5% SDS) 0.5 ml, 摇匀, 37℃ 保温 1 h, 加蛋白酶 K (20 μg/ml) 使终浓度为 40 μg/ml, 50℃ 3 h~ 5 h, 其间轻摇数次。加等体积饱和苯酚, 混和 2 min, 4℃ 2 500 g 离心 15 min。取上清液加等体积饱和苯酚重复抽提 1 次, 4℃ 2 500 g 离心 15 min。苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提 1 次, 4℃ 2 500 g 离心 15 min。氯仿/异戊醇(24:1)抽提 1 次, 4℃ 2 500 g 离心 15 min。将上清移至新管, 加 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2)和 2 倍~ 2.5 倍体积无水乙醇, 轻轻混匀, 置 -20℃, 过夜。4℃ 9 000 g 离心 20 min, 弃上清, 用 70% 冷乙醇洗沉淀 2 次。抽干 10 min, 加 200 μl TE (10 mmol/L Tris HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA pH 8.0)置 4℃ 冰箱充分溶解。用分光光度计测定波长为 260 nm 和 280 nm 时的 OD 值, 计算纯度, -20℃ 保存备用。

3 DNA 扩增

3.1 引物 本研究用 28 个随机引物(购自 Operon 公司), 其序列如下:

* 福建省科技计划基金资助项目(No. 98-Z-156); “福建省‘百千万人才工程’人选培养资金资助项目”

| | | | | | |
|------|----------------|------|----------------|------|---------------|
| L 03 | CCA GCA GCTT, | L 04 | GA CTGCA CAC, | L 05 | AC GCA GGCA C |
| L 06 | GA GGGAA GA G, | L 07 | A GGC GGGA AC, | L 10 | GT GCA ACGT G |
| L 12 | GGGCGGTACT, | L 13 | ACC GCTGCT, | L 14 | GT GA CA GGCT |
| L 18 | ACCA CCCACC, | J01 | CCCGCA TAA, | J03 | TCTCCGCTTG |
| J09 | TGA GCCTCAC, | J10 | AA GCCCGA GG, | J11 | ACTCCTGCGA |
| J13 | CCACTACTACC, | J16 | CTGCTTA GGG, | J19 | GGACA CCACT |
| J20 | AA GCGGCCTC, | K04 | CCGCCCAAAC, | K05 | TCTGT CGA GG |
| K07 | A GCGA GCAA G, | K10 | GTGCA ACGTG, | K12 | TGGCCCTCAC |
| K13 | GGTTGTACCC, | K10 | GTGCA ACGTG, | K19 | CACA GGCGGA |
| K20 | GTGTCGCGA G | | | | |

3.2 PCR 反应条件 反应总体积为 15 μl, 其中含基因组 DNA 约 20 μg, 引物 1.2 μl, dNTP 100 μmol/L, MgCl₂ 200 μmol/L, 10×Buffer 1.5 μl, Taq 酶 1.0 U。逐项加入薄壁离心管(0.25 ml), 离心 5 min。反应在 PE 公司 2400 PCR 扩增仪上进行, 反应程序: 预变性 94 5 min, 然后进入三步循环 94 变性 1 min, 36 复性 1 min, 72 延伸 2 min, 共 40 个循环, 结束后 72 延伸 7 min。

3.3 扩增产物电泳 用 1.4% 的琼脂糖(含 0.5 μg/ml 溴乙锭)电泳, 电泳缓冲液为 1×TBE。恒压 2V/cm, 电泳 4 h。紫外透射仪上观察、照相。

3.4 数据处理 随机扩增多态 DNA 片段的有无分别用数字“1”和“0”表示, 将数据输入计算机, 建立一数据库。随机扩增多态 DNA 的片段共享度根据 Nei 和 Li(1979)的公式 $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 计算, 式中 F 为随机扩增多态 DNA 片段共享度, N_x 和 N_y 分别为物种 x 和物种 y 的随机扩增多态 DNA 片段数, N_{xy} 为两物种间相同的片段数, 当 F = 0 时, 则两物种的扩增片段完全不同, 即具有高度相异的遗传性。

4 现场调查

根据抱茎棘隙吸虫、藐小棘隙吸虫和福建棘隙吸虫流行病学调查线索^[1,3,5], 对湖北省汉川市白鱼赛村, 安徽省和县陈桥洲村和福建省龙海市港尾村采检螺及鱼中间宿主的棘隙吸虫标本。

5 人工感染实验

5.1 尾蚴感染 除去铜锈环棱螺外壳后将螺体内组织置镜下检查, 发现棘隙吸虫特征尾蚴进行形态学观察, 然后将之移于玻皿内感染小金鱼, 再用鱼鳃内结成的囊蚴感染小犬(感染前 10 d 两次粪检阴性), 于感染 1 个月解剖检虫, 观测成虫形态。

5.2 囊蚴感染 随机采居民区附近池塘小鱼, 凡检出含棘隙吸虫囊蚴的鱼鳃均感染小犬(不计囊蚴数), 于感染 1 个月解剖检虫, 于镜下进行分类计数, 分别置生理盐水玻皿内收集自然排出的虫卵, 每种虫各检测卵 40 个。成虫(新鲜或死亡)置载片上, 复

上盖片, 轻压, 滴入 5% 的福尔马林溶液固定, 再经卡红染色制成封片标本。每种虫检测 6 条~ 20 条。

结 果

1 基因组 DNA 的 RAPD 相似率分析

28 个引物, 每个引物均重复扩增 1 次, 重复性良好。全部扩增产物共有 469 条扩增片段, 大小在 6 000 bp~ 200 bp, 空白对照结果表明本实验无污染引起的非特异性扩增片段(图 1~ 6)。

按 Nei 公式计算得 4 种棘隙吸虫 RAPD 相似率见表 1。

表 1 4 种棘隙吸虫基因组 DNA 的 RAPD 的比较
Table 1 Comparison of genetic polymorphism analysis of genome DNA of the four species of Echinocasmus

| 组别 Group | 基因组 DNA 的 RAPD 相似率(%) Genetic polymorphism analysis of genome DNA | | | |
|-------------|--|------|------|-----|
| | A | B | C | D |
| A | 100 | 97.6 | | |
| B | 97.6 | 100 | | |
| C | 20.8 | | 100 | |
| D | 20.9 | | 99.7 | 100 |

* A 为福建棘隙吸虫, B 为安徽的藐小棘隙吸虫, C 日本棘隙吸虫福建株, D 日本棘隙吸虫江西株

* A: *E. fujianensis*, B: *E. liliputanus* Anhui, C: *E. japonicus* (Fujian strain), D: *E. japonicus* (Jianxi strain)

2 淡水鱼棘隙吸虫囊蚴感染实验

采自湖北省白鱼赛村、安徽省陈桥洲村和福建省港尾村 3 地淡水鱼标本均查见两类棘隙吸虫囊蚴: 一类囊蚴大小为 75 ± 3 μm × 58 ± 4 μm; 另一类大小 106 ± 5 μm × 82 ± 6 μm。上述两者除大小显著不同外, 其囊内幼虫形态特征基本一致。3 地实验感染犬均检获(活鲜)大(虫体长 3 mm 以上)、中(虫体长 1.5 mm~ 2.0 mm)和小(通常虫体长不足 1 mm 长)3 种成虫。湖北、安徽及福建 3 地自实验犬检获大、中与小 3 种虫比例分别依次为 8.4% (7 条)、50.6% (42 条)、40.9% (34 条); 5.4% (6 条)、52.7% (59 条)、41.9% (47 条); 1.43% (6 条)、68.5% (287 条)和 25.4% (126 条)。根据其成虫与虫卵经形态学观察, 大、中、小 3 种虫分别鉴定为叶形棘隙吸虫

(*E. perfoliatus*)、福建棘隙吸虫 (*E. fujianensis*) 和日本棘隙吸虫 (*E. japonicus*)，见表 2。

3 铜锈环棱螺内尾蚴及其实验感染观察

检查采自湖北省汉川市白鱼赛村池塘的铜锈环棱螺 873 个，仅 1 个螺检出棘口吸虫尾蚴。螺体内尾蚴体部略呈梨形，长 130 μm ~ 140 μm，宽 75 μm ~ 85 μm。口吸盘大 33 μm × 34 μm，口吸盘外侧体表具有 8 根 ~ 9 根细微感觉毛。腹吸盘接近体后部，大小 30 μm × 31 μm。排泄囊位于体末端，其两侧各有 1 条大而弯曲的收集管略平行通往前方，管内各有

10 余个折光性圆形颗粒。排泄囊后端排泄管与尾部相通。成囊细胞占满体后部 2/3。尾蚴尾部长度约与体部长相当，尾基部宽径 25 μm ~ 28 μm。

自实验金鱼体内分离获得已结囊蚴 24 h 的囊蚴 159 个。收集感染犬粪便，镜检结果，于感染后 d₁₂ 的犬粪中查见棘口吸虫虫卵，1 个月后解剖感染犬，于肠道检获成虫 44 条，虫体大小及形态特征与当地棘隙吸虫感染犬所获得的中等体型的棘隙吸虫相同 (表 2)。

表 2 不同地区实验犬体内 3 种棘隙吸虫形态观察结果 (mm)

Table 2 Observation on the morphology of the three species of *Echinochasmus* from experimental dogs in different areas (mm)

| 虫种 Species | 新鲜成虫 Fresh worm | 头领 Head collar | 口吸盘 Oral sucker | 口、腹吸盘间距 Distance between oral sucker and acetabulum | 子宫 Uterus | 虫卵 Egg |
|----------------------------------|--|----------------------------|---|--|---|--|
| 叶形棘隙吸虫 <i>E. perfoliatus</i> | 呈狭长形，长 3.3~5.0 Long and narrow Length 3.3~5.0 | 不甚发达 Not very developed | 无皮棘分布 No spines | 约占体长 1/4 About 1/4 body's length | 子宫较长，内含虫卵数 10~50 Long, with 10~50 eggs | 大小 0.099 ± 0.003 × 0.058 ± 0.002 Size 0.099 ± 0.003 × 0.058 ± 0.002 |
| 福建省棘隙吸虫 <i>E. fujianensis</i> | 短叶形，长 1.5~2.0 Short leaf-shaped length 1.5~2.0 | 发达 Developed | 背棘有 4 列棘，棘大小 0.005 × 0.005 Four rows of spines on the base of the oral sucker Size: 0.005 × 0.005 | 约占体长 1/3 About 1/3 body's length | 子宫较短，内含虫卵数 4~20 个 Short with 4~20 eggs | 大小 0.107 ± 0.007 × 0.068 ± 0.004 Size 0.107 ± 0.007 × 0.068 ± 0.004 |
| 日本棘隙吸虫 <i>E. japonicus</i> | 短叶形，长 0.8~1.1 Short leaf-shaped Length 0.8~1.1 | 发达 Developed | 无皮棘分布 No spines | 约占体长 1/3 About 1/3 body's length | 子宫甚短，内含虫卵数 1~2 个 Very short, with 1~2 eggs | 大小 0.079 ± 0.006 × 0.0051 ± 0.005 Size 0.079 ± 0.006 × 0.0051 ± 0.005 |

讨 论

目前，国内报告寄生人体棘隙吸虫有叶形棘隙 (抱茎棘隙) 吸虫、日本棘隙吸虫、福建棘隙吸虫、藐小棘隙吸虫 (*E. liliputanus*) 和九佛棘隙吸虫 (*E. jiufoensis*) 5 种，但国内学者对各地报道的棘隙吸虫病病原问题尚有争议，认为仍有可能存在同种异名或异种同名的种类。

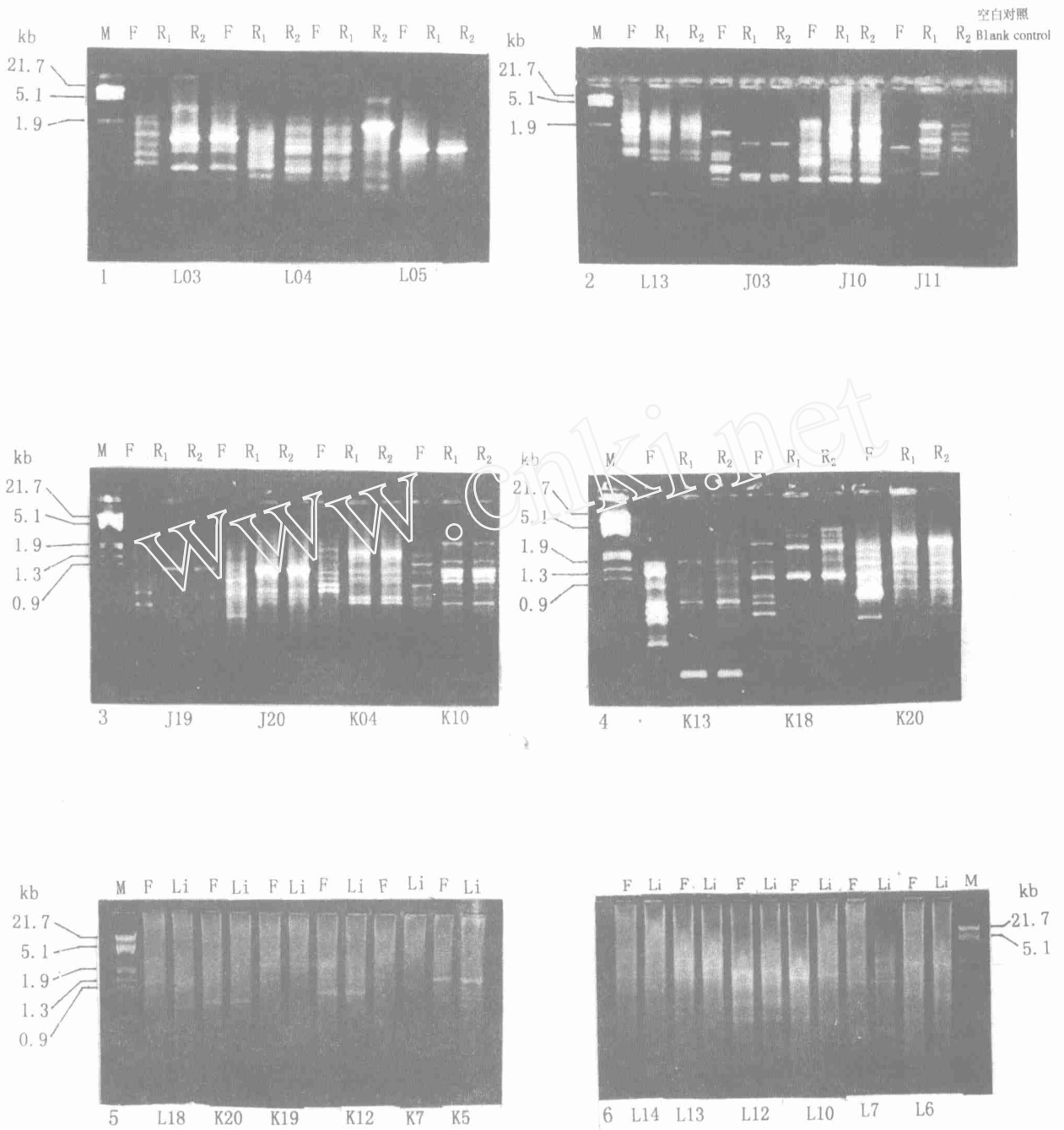
本研究用 28 个引物对福建棘隙吸虫、安徽藐小棘隙吸虫和日本棘隙吸虫福建株、江西株进行了随机扩增多态 DNA 的相似率分析，并与前期生活史及形态学研究和本本次动物感染实验观察结果相互印证，表明湖北、安徽及福建 3 省均存在我国较为常见的叶形棘隙吸虫、福建棘隙吸虫和日本棘隙吸虫，提出了湖北与安徽两省棘隙吸虫病病原虫种的鉴定问题。

1978 年湖北医学院在对一病孩尸检时检虫 1 400 余条，并以此为线索调查白鱼赛村 1 848 人，粪检虫卵阳性率 1.89%，为报告人体感染叶形棘隙吸虫的国内新记录^[5,8]。但根据 Ratz (1908) 首次报告的叶形棘隙吸虫与 Ciauca (1920) 和 Komiya

(1951) 在上海对之进行生活史早期研究的资料^[9,10]，其成虫与虫卵大小及形态特征以及第一中间宿主等均与湖北报告的资料相异，而与福建棘隙吸虫的一致 (表 2)。本研究对湖北白鱼赛村调查与实验感染观察，证明当地有叶形棘隙吸虫、福建棘隙吸虫和日本棘隙吸虫等 3 种，其中以福建棘隙吸虫为优势虫种，其体态酷似叶形棘隙吸虫。因此，湖北报道 (1979) 的叶形棘隙吸虫可能与福建棘隙吸虫相混淆。

1992 年在安徽陈桥洲村发现人体自然感染藐小棘隙吸虫，当地人群感染率高达 13.4% (在此之前国内外未见人体感染的病例报告)^[3,10]。但根据自人体与动物体的成虫标本检测情况与文献资料比较，差异悬殊^[11]。而且福建棘隙吸虫与安徽 (1995) 报道^[12] 的“藐小棘隙吸虫”第一中间宿主均是铜锈环棱螺。从形态学与生物学角度结合本次随机扩增多态 DNA 相似率分析结果也证明上述藐小棘隙吸虫即为福建棘隙吸虫。综合分析认为肖祥等报道的“藐小棘隙吸虫”应为福建棘隙吸虫。

本次在湖北、安徽和福建 3 省原棘隙吸虫病流行区调查，均发现有 3 种棘隙吸虫混合感染。



M: 标志物; F: 福建棘隙吸虫 R₁: 日本棘隙吸虫福建株 R₂: 日本棘隙吸虫江西株 L_i: 安徽的藐小棘隙吸虫

图 1~ 图 4 福建棘隙吸虫和日本棘隙吸虫福建株, 江西株基因组 DNA RAPD 电泳图

图 5~ 图 6 福建棘隙吸虫和安徽的藐小棘隙吸虫基因组 DNA RAPD 电泳图

M: M marker; F: *E. fujianensis*; R₁: *E. japonicus* (Fujian strain); R₂: *E. japonicus* (Jiangxi strain); L: *E. liliputanus* Anhui

Figs 1~ 4 Genome DNA of *Echinocashus fujianensis*, *E. japonicus* (Fujian strain) and *E. japonicus* (Jiangxi strain)

Figs 5, 6 Genome DNA of *E. fujianensis* and *E. liliputanus* Anhui

本研究在采检实验标本中得到安徽省寄生虫病研究所汪天平主任及其研究室同志们大力支持; 本文蒙南京医科大学沈一平教授审修, 谨此一并致谢。

参 考 文 献

- 1 程由 汪, 林金祥, 陈宝建, 等. 寄生人体棘隙吸虫一新种及其感染实验观察. 武夷科学. 1992; 9: 135~ 140
- 2 林金祥, 程由 汪, 梁崇真, 等. 日本棘隙吸虫病流行病学调查与实验感染. 寄生虫学与寄生虫病杂志. 1985; 3: 89~ 91
- 3 肖祥, 汪天平, 吕大兵, 等. 人体自然感染藐小棘隙吸虫首次发现. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志. 1992; 10: 132~ 135
- 4 林陈鑫, 程由 汪. 泥鳅充当日本棘隙吸虫第二中间宿主的发现. 中国人兽共患病杂志. 1996; 12: 242
- 5 武汉医学院寄生虫学教研组. 人体抱茎棘隙吸虫感染首次报告. 武汉医学院学报. 1979; 3: 54~ 55
- 6 Williams JGK et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary

- primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 1990; 18: 6531~ 6534
- 7 Kambhampati S et al. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): Techniques, statistical analysis, and applications. J Med Entomol. 1992; 29: 939
- 8 汉川县血防站. 湖北省汉川县白鱼寨村中华枝睾吸虫与抱茎棘隙吸虫的流行病学调查. 武汉医学院学报. 1979; 3: 1~ 3
- 9 Komiyama Y. The cercaria of *Echinochasmus perfoliatus* Ratz and excretory system. Jpn Med J. 1951; 4: 239~ 244
- 10 陈心陶主编. 中国动物志. 扁形动物门, 吸虫纲, 复殖目(一). 第1版. 北京: 科学出版社, 1985: 427~ 434
- 11 汪天平, 肖祥, 吕大兵, 等. 安徽省和县陈桥桥洲人体藐小棘隙吸虫发现. 中国人兽共患病杂志. 1992; 8(3): 32~ 33
- 12 肖祥, 吕大兵, 汪天平, 等. 藐小棘隙吸虫病感染方式的研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志. 1995; 13: 197~ 199

1998年8月3日收稿 1999年3月5日修回
(编辑: 李雅卿)

TAXONOMIC STUDIES ON ECHINOCHASMUS FUJIANENSIS AND ITS RELATED SPECIES BY RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA ANALYSIS AND EXPERIMENTAL INFECTION*

CHENG Youzhu¹ ZHANG Yaojuan² LIN Chenxin¹ ZHAN Zihao²
YU Xiaozhong² LIN Jinxiang¹ CAI Mingjie³ CHE Weihong³

1 Fujian Provincial Institute of Parasitic Diseases, Fuzhou 350001

2 Department of Parasitology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029

3 Sanitary and Antiepidemic Station of Hanchuan City, Hubei Province, Hanchuan 432300

ABSTRACT

AM: To explore the identification and differentiation of *Echinochasmus fujianensis*, *Echinochasmus japonicus* (Jiangxi strain and Fujian strain), *Echinochasmus liliputanus* Anhui and *Echinochasmus perfoliatus* Hubei. **METHODS:** Random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) and experimental animal infection were performed. **RESULTS:** 469 polymorphic DNA fragments were obtained by 28 primers from 4 *Echinochasmus* species and strains in Fujian, Anhui and Jiangxi. 20.8% and 97.6% of the fragments in *Echinochasmus fujianensis* were the same as those in *Echinochasmus japonicus* Fujian strain and in *Echinochasmus liliputanus* Anhui, respectively, 99.7% of the fragments were the same between *Echinochasmus japonicus* Jiangxi strain and Fujian strain. **CONCLUSION:** *Echinochasmus fujianensis* and *Echinochasmus liliputanus* Anhui are the same species. *Echinochasmus fujianensis* is an independent species different from *Echinochasmus japonicus*. Polyinfection of *Echinochasmus fujianensis*, *Echinochasmus japonicus* and *Echinochasmus perfoliatus* exist in all the 3 provinces, Hubei, Anhui and Fujian, of which *Echinochasmus fujianensis* is a dominant species.

Key Words: *Echinochasmus fujianensis*, random amplified polymorphic DNA, experimental infections, species

* Supported by: The Science and Technology Programme of Fujian (No. 98-Z-156)
Fujian Provincial Training Foundation for "BaiQianwan Talents Engineering"