

文章编号: 1000-7423(2008)-04-0295-04

【实验研究】

5-羟色胺体外对日本血吸虫母胞蚴运动性与体长的影响

周响玲, 董惠芬*, 蒋明森, 李霞, 黄晶晶

【摘要】 目的 研究 5-羟色胺(5-HT)体外对日本血吸虫母胞蚴运动性和体长的影响, 并筛选 5-HT 作用的最适浓度与时间。方法 取感染 6~8 周日本血吸虫的小鼠肝脏, 碾磨后沉淀, 孵化收集毛蚴, 于 1/2 RPMI 1640 培养基(含 10% 小牛血清和常量抗生素)中培养 48 h。待毛蚴转化为母胞蚴后, 将一部分母胞蚴分别培养于浓度为 0、0.1、1、10、100 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-HT 培养基中 48 h, 另一部分母胞蚴用 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 分别培养 0.16、6、24 和 48 h, 测定母胞蚴的活动率、体长与琥珀酸脱氢酶活力。结果 用不同浓度 5-HT 培养母胞蚴 48 h, 随着 5-HT 浓度的增加, 母胞蚴的活动率及体长均逐渐增加, 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时两者均达到最大, 分别为 $(65.6\pm 1.5)\%$ 和 $(131.4\pm 9.2) \mu\text{m}$ 。用 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 培养时, 随着培养时间的延长, 母胞蚴的活动率、体长、琥珀酸脱氢酶活力均逐渐增加, 24 h 时活动率最大, 48 h 时体长最长和琥珀酸脱氢酶活力最强。结论 5-HT 能显著影响体外培养的日本血吸虫母胞蚴的运动性和体长, 其作用的适合浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

【关键词】 日本血吸虫; 母胞蚴; 体外培养; 5-羟色胺; 运动性; 体长

中图分类号: R532.21 文献标识码: A

In vitro Effect of 5-Hydroxytryptamine on Motility and Length of *Schistosoma japonicum* Primary Sporocysts

ZHOU Xiang-ling, DONG Hui-fen*, JIANG Ming-sen, LI Xia, HUANG Jing-jing

(Department of Medical Parasitology and Research Laboratory of Schistosomiasis, School of Basic Medical Science, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

【Abstract】 **Objective** To study *in vitro* the effect of 5-hydroxytryptamine (5-HT) on the motility and length of primary sporocysts of *Schistosoma japonicum* and select the optimal concentration and time of 5-HT. **Methods** Eggs of *S. japonicum* were harvested from livers of the infected mice 6–8 weeks after infection, which were then incubated with water. The miracidia were axenically cultured in 1/2 RPMI 1640 containing 10% calf serum and a moderate amount of antibiotics (100 U/ml penicillin G and 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin) for 48 hours. They became mother sporocysts and were divided into two groups. Parasites in the first group were treated by 5-HT under concentrations of 0, 0.1, 1, 10, 100 and 1 000 $\mu\text{mol/L}$ for 48 hours, respectively. Those parasites in the second group were treated by 5-HT of 10 $\mu\text{mol/L}$ for 0.16, 6, 24 and 48 hours, respectively. The motility, length and succinic dehydrogenase(SDH) activity of the parasites were measured under Olympus microscope. **Results** Along with the increase of 5-HT concentration, the motility and length of the mother sporocysts all increased gradually. With the 5-HT concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$, both of them reached a maximum value, being $(65.6\pm 1.5)\%$ and $(131.4\pm 9.2) \mu\text{m}$ respectively. Meanwhile, along with the prolongation of treatment time, the motility and length also increased gradually. The motility reached a maximal value at 24 hours post-treatment. So did the length and SDH activity of the parasites at 48 hours post-treatment. **Conclusion** 5-HT shows a significant effect on the motility and length of mother sporocysts of *S. japonicum* and its optimal concentration is 10 $\mu\text{mol/L}$ under *in vitro* conditions.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; Mother sporocyst; *In vitro*; 5-Hydroxytryptamine; Motility; Length

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30771876)

* Corresponding author, E-mail: hfdong@whu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30771876)

作者单位: 武汉大学基础医学院, 武汉 430071

* 通讯作者, E-mail: hfdong@whu.edu.cn

寄生虫的体外培养,一直是医学和兽医寄生虫学研究诊断试剂、化疗药物、疫苗和寄生虫与宿主相互作用的一个极具价值的技术平台^[1]。日本血吸虫的体外培养已有长足进展,迄今可将终宿主体内阶段——尾蚴转变为童虫、童虫培养至性成熟产卵。在中间宿主钉螺体内阶段,通过与光滑双脐螺胚胎(Bge)细胞共培养,使日本血吸虫毛蚴成功转变为母胞蚴、并观察到有子胞蚴从母胞蚴逸出^[2],但尚不能培养至尾蚴。有研究发现,曼氏血吸虫幼虫在其发育过程中必须大量摄取螺宿主的 5-羟色胺(5-HT),使螺体内的 5-HT 水平降低^[3]。血吸虫从宿主体内摄取的 5-HT 对其生存与运动是必需的^[4]。由此推断,体外培养过程中,加入适量的外源性 5-HT 可促进血吸虫的生长发育。为此,本文通过研究 5-HT 对日本血吸虫母胞蚴运动性与体长的影响,以证实 5-HT 在日本血吸虫母胞蚴生长发育过程中的作用,筛选出体外培养时 5-HT 作用的适合浓度,为进一步完成日本血吸虫在中间宿主——钉螺体内发育阶段的培养奠定基础。

材料与方 法

1 虫卵获取与毛蚴孵化

取阳性钉螺(购自湖南省血吸虫病防治研究所),常规逸蚴法逸出日本血吸虫尾蚴,感染健康昆明系小鼠(30~40 条/只),6~8 周后无菌条件下解剖小鼠,取肝脏研磨,用含常量抗生素(青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μg/ml)的 1.2% 盐水沉淀肝脏组织以获取血吸虫卵,按文献^[5]方法孵化、收集毛蚴,备用。

2 毛蚴的处理与转化

参照文献^[6,7]方法将备用毛蚴用预冷的无菌毛蚴洗涤液洗涤,离心 2 次后,用 1/2 RPMI 1640 培养基(含 10% 小牛血清和常量抗生素)中培养 48 h,毛蚴即转化为母胞蚴。

3 5-HT 配制与处理

3.1 5-HT 母液与工作液的配制 5-HT 母液用灭菌双蒸水配制成 10 mmol/L 浓度,过滤后避光保存于 -80 °C 冰箱。5-HT 工作液用上述毛蚴转化培养基稀释母液至所需浓度,现配现用。

3.2 5-HT 处理 将上述转化的母胞蚴参照文献^[8]方法分两个实验进行处理:①母胞蚴在不同浓度 5-HT(分别为 0、0.1、1、10、100 和 1 000 μmol/L)处理 48 h,测定母胞蚴活动率与体长;②母胞蚴在 10 μmol/L 5-HT 分别处理 0.16、6、24 和 48 h,测定母胞蚴活动率、体长和琥珀酸脱氢酶活力。

4 母胞蚴运动性与体长测定

4.1 活动率测定 在倒置显微镜(×100, Olympus IM, 日本)下随机计数约 100 个母胞蚴,观察有伸缩运动或摆动的虫体数目,计算其活动率。计算公式为:活动率=(可见活动的母胞蚴数量/计数母胞蚴总数)×100%。

4.2 体长测量 将母胞蚴用 0.08% 多聚甲醛稍作固定后,在带目测微尺的显微镜(×200, Olympus, 日本)下测量体长。

4.3 酶活力测定 参照文献^[9]方法用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT 法),对培养于 96 孔培养板中的母胞蚴进行琥珀酸脱氢酶(SDH)活性测定。母胞蚴密度为 1 000 条/孔,MTT 的终浓度为 0.8 mg/ml,TECAN 荧光酶标仪(Sunrise RC, 奥地利)比色测定吸光度(A_{570} 值)。

5 统计学分析

用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,采用方差分析进行组间比较,进一步两两比较采用 Fisher LSD-*q* 检验。

结 果

1 不同浓度 5-HT 对母胞蚴运动性与体长的影响

不同浓度的 5-HT 处理日本血吸虫母胞蚴 48 h,随着其浓度的升高母胞蚴的活动率与体长均逐渐增大。当浓度为 10 μmol/L 时,活动率最大、体长也最长,分别为 (65.6±1.5)% 与 (131.4±9.2) μm。随后,随着 5-HT 浓度的继续升高,母胞蚴活动率减小、体长缩短。与对照组比较,0.1 μmol/L 浓度组的母胞蚴活动率($q_{0.1/0}=0.2817, P>0.05$)和体长($q_{0.1/0}=0.8549, P>0.05$)均无显著差别,但其余各浓度组之间的活动率($q_{1/0}=3.1438, P<0.05$; $q_{10/0}=9.0871, q_{100/0}=8.1390, q_{1000/0}=4.9908, P<0.01$)和体长($q_{1/0}=4.6164, q_{10/0}=7.0102, q_{100/0}=6.4972, q_{1000/0}=5.4713, P<0.01$)的差异均有统计学意义。5-HT 各处理组间两两比较,母胞蚴活动率除 1 μmol/L 与 1 000 μmol/L、100 μmol/L 与 10 μmol/L 浓度组间差异无统计学意义($q_{1/1000}=1.8469, q_{10/100}=0.9503, P>0.05$)外,其余各组间差异均具有统计学意义($q_{0.1/1}=3.4233, q_{1/1000}=4.0986, q_{100/1000}=3.1505, P<0.05$; $q_{0.1/10}=9.3688, q_{0.1/100}=8.4208, q_{0.1/1000}=5.2703, q_{1/10}=5.9455, q_{1/100}=4.9952, q_{10/1000}=4.0986, q_{100/1000}=3.1505, P<0.01$);母胞蚴体长除 0.1 μmol/L 组与各浓度组间的差异有统计学意义($q_{1/0.1}=3.7615, q_{10/0.1}=6.1553, q_{100/0.1}=5.6423, q_{1000/0.1}=4.6164, P<0.01$)外,其余各浓度组间两两比较变化不明显(表 1)。

表 1 不同浓度 5-HT 对培养 48 h 母胞蚴活动率及体长的影响
Table 1 *In vitro* effect of 5-HT of different concentrations on activity ratio and length of *S. japonicum* mother sporocysts treated for 48 h

5-HT 浓度 5-HT Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	母胞蚴活动率 Activity ratio of mother sporocysts (%)	母胞蚴体长 Length of mother sporocysts (μm)
0	25.0 \pm 0.8	110.3 \pm 7.8
0.1	23.7 \pm 1.0	112.9 \pm 10.4
1	39.0 \pm 0.5	124.2 \pm 10.4
10	65.6 \pm 1.5	131.4 \pm 9.2
100	61.4 \pm 0.4	129.9 \pm 10.0
1 000	47.3 \pm 0.8	126.8 \pm 9.2

2 同浓度 5-HT 处理不同时间对母胞蚴运动性与体长影响

用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-HT 处理 0.16、6、24 和 48 h 后,随着 5-HT 作用时间的延长,活动的母胞蚴数目逐渐增多、体长逐渐增长,至 24 h 时活动的虫体数目达到最多,为(85.7 \pm 1.0)%;48 h 时又有下降,但虫体的体长达最长,为(132.1 \pm 5.0) μm 。统计分析显示,在 5-HT 作用的 48 h 内,活动的母胞蚴数目显著多于对照组 ($t_{0.16}=4.925$, $t_6=8.859$, $t_{24}=9.674$, $t_{48}=12.080$, $P<0.01$);其体长与对照组的比较也均具统计学意义 ($t_{0.16}=13.083$, $t_6=7.395$, $t_{24}=13.337$, $t_{48}=8.984$, $P<0.01$)。进一步分析显示,除处理 6 h 与 24 h、24 h 与 48 h 间的差异无统计学意义外 ($q_{6/24}=2.3860$, $q_{48/24}=1.8437$, $P>0.05$),其余各组间的差异均有统计学意义 ($q_{60.16}=3.0367$, $P<0.05$; $q_{240.16}=5.4227$, $q_{480.16}=7.2664$, $q_{648}=4.2297$, $P<0.01$)(表 2)。

表 2 5-HT 处理不同时间对日本血吸虫母胞蚴活动率及体长的影响
Table 2 *In vitro* effect of 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT on activity ratio and length of *S. japonicum* mother sporocysts at different time

培养时间 Culture time (h)	母胞蚴活动率 Activity ratio of mother sporocysts (%)		母胞蚴体长 Length of mother sporocysts (μm)	
	实验组 # Test group	对照组 Control	实验组 # Test group	对照组 Control
0.16	65.0 \pm 1.4	30.5 \pm 1.0	120.61 \pm 3.5	82.0 \pm 8.7
6	75.8 \pm 1.1*	32.4 \pm 0.8	125.43 \pm 6.5	102.6 \pm 7.3
24	85.7 \pm 1.0**	37.3 \pm 0.9	129.21 \pm 4.5	106.4 \pm 3.0
48	77.9 \pm 0.7**	32.9 \pm 0.7	132.12 \pm 5.0	100.8 \pm 9.8

注:不同处理时间, # 实验组与对照组比较, $P<0.01$; 实验组中母胞蚴活动率比较, * 6 h 与 0.16 h, $P<0.05$, ** 24 h、48 h 与 0.16 h, 48 h 与 6 h, $P<0.01$ 。

Note: For treatment time, # Test group vs control, $P<0.01$; For activity ratio of mother sporocysts among test groups, * 6 h vs 0.16 h, $P<0.05$, ** 24 h & 48 h vs 0.16 h, 48 h vs 6 h, $P<0.01$.

随着 5-HT 处理时间的延长,对照组和实验组母胞蚴 SDH 活性的 A_{570} 值均升高,实验组升高明显,

处理 48 h 时达到最大值,为 0.64。各时间点实验组与对照组之间的 A_{570} 值差异均有统计学意义($P<0.05$);实验组各时间点 A_{570} 值之间也具有统计学意义($P<0.05$)(表 3)。

表 3 5-HT 处理不同时间对母胞蚴活力的影响(A_{570} 值)
Table 3 *In vitro* effect of 5-HT on viability of *S. japonicum* mother sporocysts(A_{570} value)

培养时间 Culture time (h)	母胞蚴 SDH 活性 SDH activity of mother sporocysts	
	实验组 Test group	对照组 Control
0.16	0.38	0.31
6	0.47	0.33
24	0.53	0.39
48	0.64	0.37

注:不同处理时间,实验组与对照组比较, $P<0.05$; 实验组中,不同处理时间的比较, $P<0.05$ 。

Note: For treatment time, test group vs control, $P<0.05$; Different treatment time among test groups, $P<0.05$.

讨 论

5-HT 作为一种重要的神经传递介质,在曼氏血吸虫幼虫的生长发育过程中起着重要的生理学作用。5-HT 不仅能增强体外培养母胞蚴的运动性、增长体长,有利于血吸虫的生长发育^[8];而且可明显增加子胞蚴的产生量^[9],影响血吸虫的增殖。本研究结果显示,培养基中加入不同浓度 5-HT,对日本血吸虫母胞蚴的活动率与体长均有不同程度的促进作用;当浓度高于 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时,可显著增长母胞蚴的体长、增加母胞蚴活动的数目。结果显示,随着 5-HT 浓度的增加,母胞蚴的活动率及体长均逐渐增加,浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,两者均达到最大,分别为(65.6 \pm 1.5)%与(131.4 \pm 9.2) μm ;随后随着 5-HT 浓度的增加,母胞蚴的活动率和体长反而降低和缩短。为促进日本血吸虫幼虫的生长发育,培养基中加入浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 比较适合。

5-HT 之所以能增加日本血吸虫母胞蚴活动的数目与频率,是由于 5-HT 可通过促进血吸虫神经肌肉的收缩,以增加母胞蚴的运动性;同时,还因为其可影响葡萄糖的摄取与糖原的利用^[8],以增加母胞蚴活动的能量供应,从而促进母胞蚴的活动率。而体长增长主要是由于 5-HT 对肌肉种类(环状肌和纵行肌)的作用具有选择性,5-HT 主要作用于母胞蚴的纵行肌而使母胞蚴体长增长。

5-HT 是曼氏血吸虫新陈代谢的重要调节物质,其促进母胞蚴的生长被认为是通过促进细胞的分裂实现的^[8]。MTT 法^[10]广泛用于测定细胞的活性及增殖。本

研究结果显示,随着 5-HT 处理时间的延长,日本血吸虫母胞蚴的 SDH 活性随之增强,表明 5-HT 可促进母胞蚴的细胞分裂。由此推测,5-HT 可通过促进日本血吸虫母胞蚴的细胞分裂而促进其生长发育。综上所述,体外培养日本血吸虫幼虫时,添加一定量的 5-HT 有利于幼虫的生长发育。

参 考 文 献

[1] Coustau C, Yoshino TP. Flukes without snails: advances in the *in vitro* cultivation of intramolluscan stages of trematodes[J]. *Exp Parasitol*, 2000, 94(1): 60-66.

[2] Coustau C, Ataev G, Jourdan J, *et al.* *Schistosoma japonicum*: *in vitro* cultivation of miracidium to daughter sporocyst using a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line[J]. *Exp Parasitol*, 1997, 87(2): 77-87.

[3] Manger P, Li J, Christensen BM, *et al.* Biogenic monoamines in the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*: Influence of infection by the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*[J]. *Comp Biochem Physiology*, 1996, 114A(3): 227-234.

[4] Patocka N, Ribeiro P. Characterization of a serotonin transporter in the parasitic flatworm, *Schistosoma mansoni*; Cloning, expression and functional analysis[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2007, 154(2): 125-133.

[5] Luo JP. Improvement of hatching test for *Schistosoma japonicum*

miracidia[J]. *J Xianning College (Med Sci)*, 2005, 19(6):464. (in Chinese)
(罗金萍. 血吸虫毛蚴孵化法的改进[J]. 咸宁学院学报(医学版), 2005, 19(6): 464.)

[6] Chen PH, Zhou SL. *In Vitro* Cultivation of Medical Parasites[M]. Beijing: Science Press, 1995. 277-293. (in Chinese)
(陈佩惠, 周述龙, 主编. 医学寄生虫体外培养[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 277-293.)

[7] Mei BS, Zhou SL. Effects of nutritive factors on *Schistosoma japonicum* miracidial transformation and mother sporocyst culture *in vitro* [J]. *Acta Hydrobiologica Sin*, 1989,13 (4): 326-334. (in Chinese)
(梅柏松, 周述龙. 营养因素对日本血吸虫毛蚴人工转变母胞蚴及体外培养的影响[J]. 水生生物学报, 1989, 13(4): 326-334.)

[8] Boyle JP, Zaide JV, Yoshino TP. *Schistosoma mansoni*: effect of serotonin and serotonin receptor antagonists on motility and length of primary sporocyst *in vitro*[J]. *Exp Parasitol*, 2000, 94 (4): 217-226.

[9] Boyle JP, Yoshino TP. Serotonin-induced muscular activity in *Schistosoma mansoni* larval stages: Importance of 5-HT transport and role in daughter sporocyst production[J]. *J Parasitol*, 2005, 91(3): 542-550.

[10] Jiang B. *Empirical Methods of Molecular Biology*[M]. Beijing: People's Military Medical Press, 1996. 101-102. (in Chinese)
(姜泊主编. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 101-102.)

(收稿日期: 2007-04-12 编辑: 盛慧锋)

(上接第 294 页)

[5] Brooker S. Schistosomes, snails and satellites[J]. *Acta Trop*, 2002, 82(2): 207-214.

[6] Liu FG, Meng XJ. Annual reports on county-level economics in China (2005)[M]. Beijing: Social Sciences Academic Press, 2006. 95, 168-250. (in Chinese)
(刘福刚, 孟宪江. 中国县域经济年鉴(2005 卷)[M]. 北京: 社会科学文献出版社, 2006. 95, 168-250.)

[7] Congdon P. *Applied Bayesian Modelling*[M]. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons, Ltd., 2003. 1-30.

[8] Box GEP, Jenkins GM, Reinsel GC. *Time series analysis: forecasting and control* [M]. 3rd ed. San Francisco, CA: Holden-Day, 1994. 46-88.

[9] Staubach C, Schmid V, Knorr-Held L, *et al.* A Bayesian model for spatial wildlife disease prevalence data [J]. *Prev Vet Med*, 2002, 56(1): 75-87.

[10] Spiegelhalter DJ, Best NG, Carlin BP, *et al.* Bayesian measures of model complexity and fit (with discussion)[J]. *J Roy Statist Soc B*, 2002, 64(4): 583-639.

[11] Smith AFM, Roberts GO. Bayesian computation via the Gibbs sampler and related Markov chain Monte Carlo methods[J]. *J Roy Statist Soc B*, 1993, 55(1): 3-24.

[12] Ashby D. Bayesian statistics in medicine: a 25 year review[J]. *Stat Med*, 2006, 25(21): 3589-3631.

[13] Brooker S. Spatial epidemiology of human schistosomiasis in Africa: risk models, transmission dynamics and control[J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2007, 101(1): 1-8.

[14] Yang GJ, Vounatsou P, Zhou XN, *et al.* A Bayesian-based approach for spatio-temporal modeling of county level prevalence of *Schistosoma japonicum* infection in Jiangsu Province, China[J]. *Int J Parasitol*, 2005, 35(2): 155-162.

[15] Zhou XN, Zhang Y, Hong QB, *et al.* Science on *Oncomelania* snail[M]. Beijing: Science Press, 2005. 148-168. (in Chinese)
(周晓农, 张仪, 洪青标, 等. 实用钉螺学 [M]. 北京: 科学出版社, 2005. 148-168.)

(收稿日期: 2007-10-09 编辑: 盛慧锋)

文章编号: 1000-7423(2008)-04-0298-01

【消息】

关于授予本刊论文作者继续医学教育学分的通知

根据中华预防医学会《继续医学教育学分授予与管理办法》,从 2008 年 8 月 1 日起,在中华预防医学会系列杂志上发表的论文可授予作者 II 类学分,学分的授予标准可登录本刊网站 (www.jsczz.cn) 的“新闻公告栏”查看。

本刊在每期刊发后,在纸质版印刷的同时,电子版已上传至本刊网站,当期论文作者根据需要务必在单月的 15 日前提出申请,登录本刊网站下载“继续医学教育学分申请表”填写

(包括序号、姓名、邮编、单位、联系电话、文章题目、作者排序和学分)后,通过 E-mail 发送至当期责任编辑的邮箱,逾期不候。“继续医学教育学分申请表”由编辑部汇总审核后统一提交给中华预防医学会申请。工本费 10 元/本由编辑部统一代缴,为免于邮寄将从稿费中扣除。特此告知。

《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》编辑部

二〇〇八年七月三十日