

华支睾吸虫在小鼠体内的发育观察

刘继鑫, 孙艳宏*, 郭家, 姚淑娟, 孙艳, 张浩, 张春晶

【提要】 从嫩江流经齐齐哈尔的水域捕捞野生淡水鱼, 采用人工胃蛋白酶消化法获取淡水鱼体内华支睾吸虫囊蚴, 灌胃感染昆明小鼠 50 只 (35~40 个/鼠), 同时设对照组 (10 只), 给予等量生理盐水。分别于感染后第 5、10、15、20、25 和 30 天处死小鼠, 每次 8~9 只, 解剖后分离虫体, 固定染色后镜下观察。同时收集小鼠粪便, 漂浮集卵法收集虫卵。结果发现, 感染组小鼠感染成功率为 96% (48/50), 感染后第 5、10、15、20、25 和 30 天的虫体回收率分别为 42.1%、52.6%、63.2%、62.2%、63.3% 和 63.2%, 感染后第 20 天粪便中开始发现虫卵。镜下观察发现, 感染后第 15 天的虫体子宫内可观察到虫卵, 第 20 天的虫体可观察到睾丸分支明显。

【关键词】 华支睾吸虫; 小鼠; 发育

中图分类号: R383.22

文献标识码: B

The Development of *Clonorchis sinensis* in Mice

LIU Ji-xin, SUN Yan-hong*, GUO Jia, YAO Shu-juan, SUN Yan, ZHANG Hao, ZHANG Chun-jing

(Department of Clinical Pathogen Biology, Qiqihaer Medical University, Qiqihaer 161006, China)

【Abstract】 Freshwater fish were caught from Nenjiang River in Qiqihaer City, and examined for metacercariae of *Clonorchis sinensis* by the artificial digestion (pepsin-HCl) method. The metacercariae (35-40) were given orally into stomach to each Kunming mouse of infection group (50 mice). The mice in control group were given the same amount of normal saline. The mice were sacrificed on the 5th, 10th, 15th, 20th, 25th, and 30th day after infection. Worms were collected, fixed and stained with carmine acetate, and observed under microscope. The egg-laying capacity of *C. sinensis* was observed in mice. 96% (48/50) mice were infected with metacercariae of *C. sinensis*. The recovery rate of adult worms on the 5th, 10th, 15th, 20th, 25th, and 30th day post-infection was 42.1%, 52.6%, 63.2%, 62.2%, 63.3%, and 63.2%, respectively. The first appearance of eggs in utero and feces was on the 15th and 20th day after infection, respectively. The branch of testis in worms was observed after 20 days of infection.

【Key words】 *Clonorchis sinensis*; Mouse; Development

Supported by the order projects on social development in Qiqihaer city (No.SFGG-201333)

* Corresponding author, E-mail: ljx_2000_1979@163.com

华支睾吸虫病是由华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*) 寄生于人或动物肝胆管内引起的一种重要的食源性寄生虫病, 现已成为影响我国食品安全和人民健康的重要因素之一, WHO 确认华支睾吸虫为胆管细胞癌的 I 型人类致癌生物媒介^[1], 该虫已列入我国“十二五”重点防治寄生虫病规划。随着经济社会发展和人民生活饮食方式的多样化, 华支睾吸虫感染人数呈上升趋势^[2,3], 防治形势严峻。中国作为华支睾吸虫感染的高发区^[4,5], 有必要建立满足不同研究需求的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级昆明小鼠, 6~8 周龄, 体重 20~30 g, 雌、雄各半, 由齐齐哈尔医学院动物实验中心提供。

1.2 华支睾吸虫囊蚴来源 采用人工胃蛋白酶消化法, 从嫩

江流域野生淡水鱼体内获取囊蚴。共捕获鲫鱼和麦穗鱼 85 尾, 获得囊蚴 1 956 个, 从囊蚴的形态初步鉴定为吸虫囊蚴, 用其感染动物获取成虫, 根据成虫结构特征鉴定为华支睾吸虫。将野生鱼中获得的囊蚴于 4℃ 保存过夜, 次日用于感染小鼠。

1.3 动物感染 60 只小鼠随机分为感染组 (50 只) 和对照组 (10 只)。于禁食 12 h 后进行灌胃, 感染组经口灌胃感染华支睾吸虫囊蚴 35~40 个/鼠, 对照组给予等量生理盐水。分别于感染后第 5、10、15、20、25 和 30 天收集小鼠粪便, 通过漂浮集卵法查找华支睾吸虫虫卵。同时每次处死部分小鼠, 感染组处死 8~9 只/次, 对照组 1~2 只/次, 分离出肝胆管和肝脏, 收集虫体, 记录获取虫数, 计算回收率。

1.4 虫体和虫卵的观察 将收集的虫体洗净后, 用 5% 甲醛溶液固定 12~24 h, 醋酸洋红染色 8~24 h, 然后进行分色、脱色和透明。采用漂浮集卵法从粪便中分离虫卵。镜下观察虫体和虫卵的形态, 并用镜下标尺测量各部位长度并记录。

基金项目: 齐齐哈尔市社会发展指令性项目 (No.SFGG-201333)

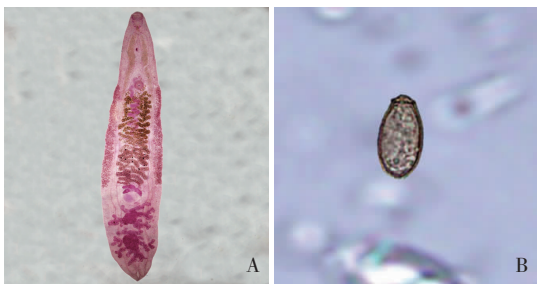
作者单位: 齐齐哈尔医学院临床病原生物学教研室, 齐齐哈尔 161006

* 通讯作者, E-mail: ljx_2000_1979@163.com

2 结果

2.1 小鼠感染情况 感染组小鼠50只, 检出虫体者48只, 感染成功率为96%, 仅感染后第5天剖杀的2只小鼠的肝胆管和肝脏内未发现虫体, 但在其胃内均发现未脱囊的华支睾吸虫囊蚴。对照组小鼠未检获虫体和虫卵。感染后第5、10、15、20、25和30天, 平均检获虫数分别为 19.9 ± 0.1 、 21.5 ± 0.0 、 22.5 ± 0.1 、 21.8 ± 0.2 、 24.5 ± 0.1 和 23.5 ± 0.1 , 回收率分别为42.1%、52.6%、63.2%、62.2%、63.3%和63.2% (表1)。感染第23天的虫体经醋酸洋红染色后, 镜下观察发现, 体形狭长, 扁平, 前端尖细, 后端较钝圆, 口吸盘位于虫体前端, 睾丸分支状, 前后排列, 卵巢细小、分叶, 卵黄腺由颗粒状滤泡组成, 位于虫体两侧, 子宫从卵黄腺开始, 盘绕而上至腹吸盘水平。感染后第20天开始, 在小鼠的粪便中发现虫卵, 卵内毛蚴与卵壳边界不清晰, 感染后第25天和第30天的虫卵大小无明显变化, 但卵壳与毛蚴边界较清晰 (图1)。

2.2 虫体的发育状况 虫体经固定处理后, 镜下观察各部位器官发育变化, 随着感染时间的延长, 华支睾吸虫虫体的长度



A: 感染后第23天小鼠体内检获的华支睾吸虫成虫 (醋酸卡红染色, $\times 4$); B: 感染后第30天小鼠粪便中分离的虫卵 ($\times 40$)。

图1 华支睾吸虫成虫和虫卵

和宽度、口腹吸盘直径、子宫和睾丸长度均明显增长, 虫体长度由1.413 mm发育至6.053 mm, 增长了4倍余 (表1)。感染后第5天, 口吸盘、腹吸盘和咽部清晰可见, 消化系统、排泄系统和生殖系统不明显; 第10天, 可明显辨认消化系统, 尤其是弯曲的肠支, 生殖系统中子宫隐约可见, 子宫内未见其他内容物; 第15天, 虫体两侧的卵黄腺排列较为分散, 弯曲的子宫内容物清晰可见, 但此时弯曲的子宫较细长, 其内虫卵尚处于发育阶段, 难以分清, 睾丸较细, 其分支隐约可见; 第20天, 虫体两侧的卵黄腺集中分布, 呈条索状, 子宫内可见较小的虫卵密集排列, 难以分清, 睾丸分支更为明显; 第25天, 子宫及睾丸分支均较粗大, 卵巢分叶明显, 膨大的受精囊清晰可见; 第30天, 消化系统、排泄系统和生殖系统均清晰可见。

3 讨论

华支睾吸虫病是我国“十二五”规划重点防治的寄生虫病之一, 建立满足不同研究需求的动物模型是开展相关实验研究的基础。国外建立华支睾吸虫动物模型常用的包括大鼠、田鼠和小鼠等^[6], 国内常用的动物包括家兔、豚鼠、大鼠、猫和狗等^[7], 而小鼠作为华支睾吸虫的动物模型国内报道较少。本研究以昆明小鼠作为模型动物感染华支睾吸虫囊蚴, 实验过程中未发生小鼠自然死亡的情况。以往, 国内的研究报道, 昆明小鼠感染华支睾吸虫囊蚴后粪检虫卵阳性率仅37%^[8], 而本实验中96%的小鼠感染成功, 这可能与感染囊蚴的数量、感染时是否空腹以及囊蚴活力有关。

本实验结果显示, 感染第30天的小鼠体内的华支睾吸虫成虫与人体内的寄生华支睾吸虫形态完全吻合, 但体长和体宽明显短于寄生人体内的华支睾吸虫^[9], 推断可能与寄生宿主的个体大小有关。

表1 不同感染时间华支睾吸虫在小鼠体内的发育变化 ($\bar{x} \pm s$)

感染时间/d	虫体长度/mm	虫体宽度/mm	口吸盘直径/mm	腹吸盘直径/mm	子宫团长度/mm	双睾丸长度/mm	平均检获虫数	回收率/%
5	1.413±0.165	0.331±0.088	0.098±0.051	0.069±0.026	0.519±0.112	0.244±0.046	19.9±0.1	42.1
10	1.975±0.288	0.613±0.154	0.138±0.040	0.119±0.020	0.631±0.042	0.300±0.055	21.5±0.0	52.6
15	2.731±0.286	0.869±0.187	0.206±0.059	0.156±0.044	0.869±0.155	0.569±0.170	22.5±0.1	63.2
20	4.041±0.181	1.234±0.210	0.216±0.028	0.181±0.035	1.353±0.154	0.678±0.174	21.8±0.2	62.2
25	4.638±0.170	1.479±0.191	0.313±0.099	0.238±0.027	1.658±0.117	0.833±0.144	24.5±0.1	63.3
30	6.053±0.182	1.722±0.171	0.356±0.052	0.300±0.054	2.338±0.149	1.538±0.141	23.5±0.1	63.2

参 考 文 献

- [1] Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens—part B: biological agents [J]. Lancet Oncol, 2009, 10(4): 321-322.
- [2] WHO. Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: First WHO Report on Neglected Tropical Diseases [M]. Geneva: World Health Organization, 2010.
- [3] 钱门宝, 周晓农, 方悦怡, 等. 加强中国华支睾吸虫病研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(3): 211-214.
- [4] 全国人体重要寄生虫病现状调查办公室. 全国人体重要寄生虫病现状调查报告 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23 (5Suppl): 332-340.
- [5] 方悦怡, 陈颖丹, 黎学铭, 等. 我国华支睾吸虫病流行区感染现状调查[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(2): 99-103.
- [6] Sohn WM, Zhang H, Choi MH, et al. Susceptibility of experimental animals to reinfection with *Clonorchis sinensis* [J]. Korean J Parasitol, 2006, 44(2): 163-166.
- [7] 刘宜升, 陈明. 华支睾吸虫的生物学和华支睾吸虫病防治[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 204-209.
- [8] 付琳琳, 李妍, 刘宜升, 等. 华支睾吸虫感染小鼠模型的建立及比较[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(1): 46-48.
- [9] 李朝品. 华支睾吸虫[M]//沈继龙, 张进顺, 主编. 临床寄生虫学检验. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 83-87.

(收稿日期: 2014-04-22 编辑: 瞿麟平)