

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*

梅柏松 周述龙

(湖北医学院寄生虫学教研室 血吸虫病研究室, 武汉)

提 要

本文报道了4种培养基、4种血清、不同浓度的半乳糖、二巯基苏糖醇及部分三羧酸循环中间产物对日本血吸虫毛蚴体外转变为母胞蚴及其存活的影响。发现稀释一倍的 RPMI 1640 加 10% 兔血清为较适宜的培养基。上述添加剂对毛蚴转变和母胞蚴存活均无有益作用, 其中柠檬酸可显著抑制毛蚴的转变。文中描述了毛蚴在体外转变成母胞蚴的过程, 对血吸虫的糖代谢途径进行了讨论。

关键词 日本血吸虫, 毛蚴, 母胞蚴, 体外培养

体外培养方法是研究血吸虫的重要手段, 对寄生于钉螺体内的幼虫期更是如此。但值得注意的是, 血吸虫童虫至成虫的体外培养研究已取得了较大的进展^[4,25], 而幼虫期体外培养的研究却仍然进展缓慢^[45]。国外自 1964 年就开始曼氏血吸虫幼虫体外培养的研究^[11,22]。目前, 在曼氏血吸虫, 毛蚴可在体外转变成母胞蚴并存活 3 周, 见胚球发育^[24]; 子胞蚴在体外可产生第二代子胞蚴^[44]; 3—4 期的尾蚴胚胎在体外可发育成不完全正常的 7 期尾蚴^[6]。在日本血吸虫, 仅对毛蚴体外转变和母胞蚴的培养作过一些探索, 毛蚴可在体外转变为母胞蚴并存活 55 天, 达胚球发育阶段^[15]。Muftic (1969)^[17] 曾报道曼氏血吸虫毛蚴可在体外培养至尾蚴, 但因其结果无重现性而未得公认^[7]。国内迄今尚未见血吸虫幼虫期体外培养的报道。

我室对日本血吸虫童虫、成虫体外培养的研究已取得一些进展, 为探索适宜的幼虫体外培养系统, 我们研究了营养因素对日本血吸虫大陆株毛蚴体外转变为母胞蚴及其培养的影响。

材 料 与 方 法

(一) 试剂和血清

RPMI 1640 培养基(美国), Tc 199 培养基(美国), BME 培养基(日本), 二巯基苏糖

* 国家自然科学基金资助项目。实验设计和统计学处理曾蒙本院人口卫生统计学教研室王圣基副教授指正, 谨致谢忱!

1987年7月16日收到。

醇 (DTT, Serva 公司), 半乳糖, 柠檬酸, α -酮戊二酸, 苹果酸, 琥珀酸钠(均为国产)。

O 型人血清(武汉市中心血站), 小牛血清(上海市食品公司牛羊肉经营部), 兔血清和绵羊血清(分别取自雄性家兔和绵羊, 无菌抽血分离血清)。所有血清均经 56℃ 的 30 分钟灭活。

(二) 毛蚴的获取和洗涤

取人工感染日本血吸虫尾蚴的家兔肝脏, 常规提卵, 用抗菌素溶液洗涤后孵化。孵出的毛蚴以冰浴-离心法收集, 毛蚴洗涤液洗涤。毛蚴洗涤液系林格氏蛙溶液 (Ringer's frog solution, Taylor 和 Backer, 1978)^[23] 改良而成(表 1)。

表 1 毛蚴洗涤液成分

Tab. 1 Composition of miracidial washing solution

成 分 Component	含量 Amount	成 分 Component	含量 Amount
NaCl	6.50 g/l	CaCl ₂	0.12 g/l
KCl	0.14 g/l	NaHCO ₃	0.20 g/l
水解乳白蛋白 lactalbumin hydrolysate	5.00 g/l	青霉素 G penicillin G	300 iu/ml
链霉素 streptomycin	300 iu/ml	庆大霉素 gentamycin	150 iu/ml

(三) 培养条件

分别在不同商品培养基中加入不同种类血清 (10%, v/v) 和不同浓度的其它添加剂, 配制不同成分的培养液。培养液中均加 HEPES 缓冲剂, 浓度为 20 mmol/L。过滤除菌后, 用无菌 8.4% NaHCO₃ 将培养液调至 pH 7.4。每个培养瓶接种 200 或 400 只毛蚴, 加 2 ml 培养液, 每周换培养液 2 次, 培养液在 pH 7.0—7.4 之间。CO₂ 浓度为 2%, 培养温度为 27±0.5℃。

(四) 观察方法和指标

1. 方法 用倒置显微镜每天作活体观察一次, 部分虫体作活体测量, 或以 0.1% 中性红作活体染色。对毛蚴转变早期作了录相观察。室温 20℃ 以下时, 观察在保温罩中进行。

2. 指标 ①转变率: 将毛蚴纤毛完全脱净作为已转变成母胞蚴^[5,16], 培养 12 小时, 随机观察 30 只虫体, 计算完全脱纤毛虫体的百分率; ②最长存活天数: 各培养瓶中虫体存活的最长天数; ③虫体存活标准: 透光均匀柔和, 蠕动活跃, 静止时可见焰细胞纤毛活动。

(五) 实验设计和统计学处理

由于本实验涉及多因素、多水平的研究, 我们采用了正交设计。按中国科学院数学研究所统计组 (1973)^[1] 的方法, 分别采用了 L₈(2⁷)、L₁₂(2¹¹) 和 L₁₆(4⁵) 等正交表, 以直观

和方差分析相结合来判断结果。为了减少信息丢失,对于方差分析为 $0.05 < P < 0.10$ 的结果也作了慎重的讨论。

结 果

(一) 营养因素对毛蚴转变的影响

1. 培养基和血清

4种培养基 (RPMI 1640, BME, Tc 199 及稀释一倍的 RPMI 1640) 和 4 种血清 (人、兔、小牛、绵羊血清) 对转变率均无显著性影响 ($P > 0.30$), 转变率的均值变动在 0.8—11.7% 之间(图 1)。

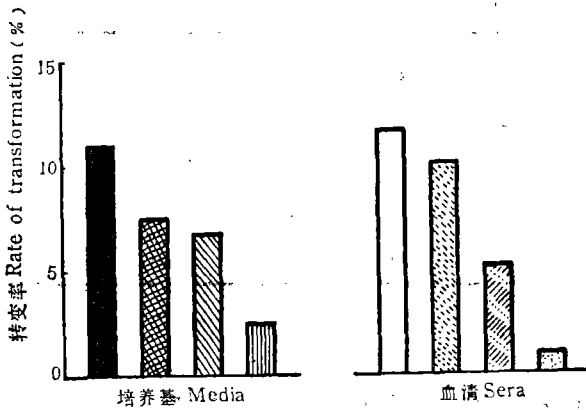


图 1 不同培养基和血清对转变的影响

Fig. 1 Effect of different media and sera on transformation

培养基 Media: ■ RPMI 1640 ▨ BME ▤ Tc 199 ▧ HS 1640
(稀释一倍的 RPMI 1640, half strength RPMI 1640)
血清 Sera: □ 小牛 Calf ▨ 兔 Rabbit ▤ 人 Human ▧ 绵羊 Sheep

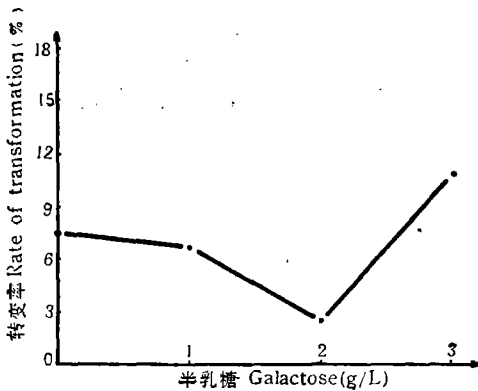


图 2 半乳糖对转变的影响

Fig. 2 Effect of galactose on transformation

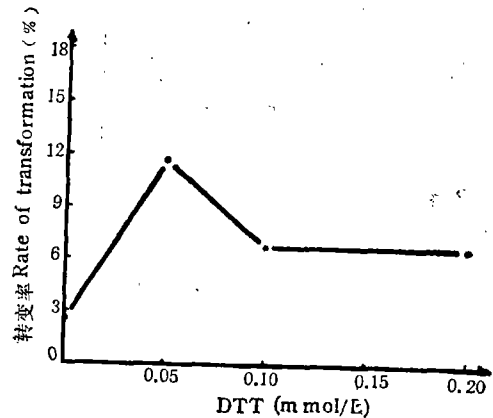


图 3 DTT 对转变的影响

Fig. 3 Effect of DTT on transformation

2. 半乳糖和二巯基苏糖醇 (DTT)

加不同浓度半乳糖和 DTT, 转变率无显著性差异 ($P > 0.50$), 转变率分别为 2.5—10.9% 和 2.5—11.7% (图 2, 3)。

3. 有机酸(盐)

4 种有机酸(盐)均可抑制毛蚴的转变, 其中柠檬酸有显著性抑制作用

($0.01 < P < 0.025$),

不加柠檬酸时转变率为 75.2%, 加柠檬酸 (10 mg/L) 时 35.83% (图 4)。

(二) 营养因素对母胞蚴存活的影响

1. 培养基和血清

母胞蚴在稀释一倍的 RPMI 1640 中最长存活时间平均为 5 天, 较其它 3 种培养基为长 ($0.10 < P < 0.20$) (图 5)。

在培养基中分别加 4 种血清, 以加兔血清对母胞蚴存活最有益, 平均最长存活 6.25 天 ($0.05 < P < 0.10$) (图 5)。

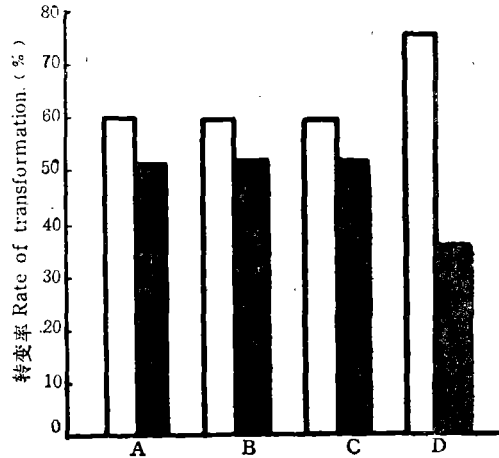


图 4 有机酸(盐)对转变的影响

Fig. 4 Effect of organic acids (salt) on transformation

A: 苹果酸 malate B: α -酮戊二酸 α -ketoglutarate
C: 琥珀酸钠 sodium succinate D: 柠檬酸 citrate

□ A、B、C、D 浓度均为零 Concentrations are all zero; ■ A、B、C、D 浓度依次为 40 mg/L, 30 mg/L, 10 mg/L, 10 mg/L

Concentrations of A B C D are 40mg/L, 30 mg/L, 10 mg/L, 10 mg/L respectively

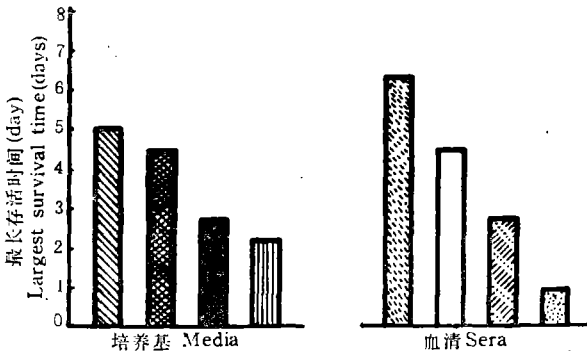


图 5 不同培养基和血清对母胞蚴存活的影响

Fig. 5 Effect of different media and sera on sporocyst survival

图例同图 1 The legend is same as Fig. 1

2. 半乳糖和 DTT

加不同浓度半乳糖和 DTT 对母胞蚴存活均无有益影响, 而以不加这两种物质时存

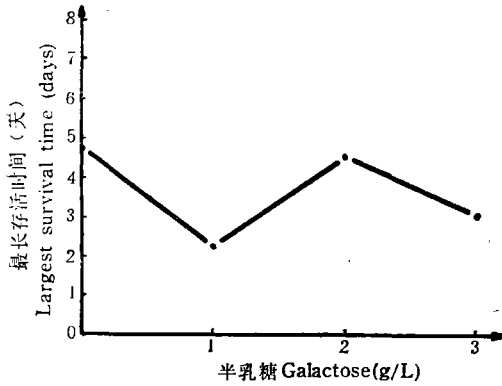


图6 半乳糖对母胞蚴存活的影响

Fig. 6 Effect of galactose on sporocyst survival

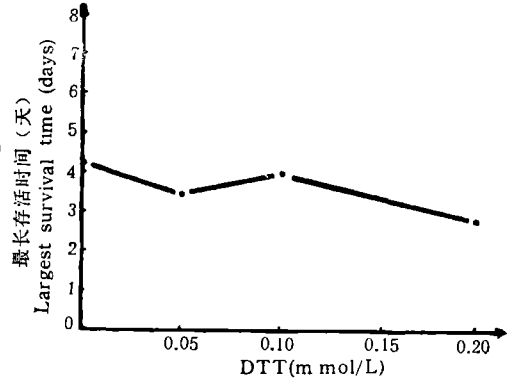


图7 DTT 对母胞蚴存活的影响

Fig. 7 Effect of DTT on sporocyst survival

活时间较长,平均最长存活时间分别为 4.75 天(图 6)和 4.25 天(图 7),但均无显著性意义 ($P > 0.20$)。

3. 有机酸(盐)

在稀释一倍的 RPMI 1640 中加苹果酸(图 8A)和琥珀酸钠(图 8C)对母胞蚴的存

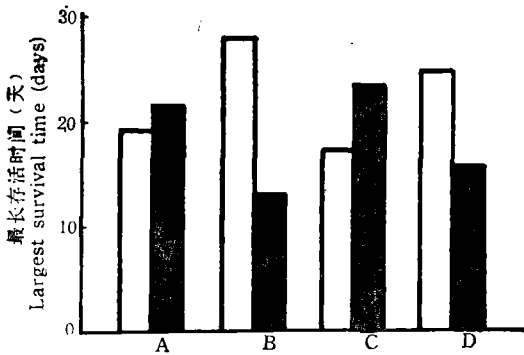


图8 有机酸(盐)对母胞蚴存活的影响

Fig. 8 Effect of organic acids (salt) on sporocyst survival

图例同图 4 The legend is same as Fig. 4

活有一定的促进作用, α -酮戊二酸(图 8B)和柠檬酸(图 8D)有一定抑制作用,不加 α -酮戊二酸时平均最长存活时间为 27.8 天,加 α -酮戊二酸 (30 mg/L) 时为 13 天,但均无统计学意义 (A: $P > 0.50$; C: $P > 0.50$; B: $0.05 < P < 0.10$; D: $0.10 < P < 0.20$)。

(三) 一般观察

在稀释一倍的 RPMI 1640 培养液中,虫体开始为快速而频繁的蠕动,内部结构不清,难以分清前后端。培

养 3 小时,中性红染色见侧腺腺管 (lateral gland duct) 已断裂,但腺体仍固着于前端。培养 14 小时仍见侧腺残余,随虫体蠕动而在虫体内前后流动(图版 I:1)。培养 3 小时,几乎 100% 的虫体均开始脱纤毛,但程度不一。用中性红染色确定前后端,发现一般第三或第二列纤毛板先脱落,第一列纤毛板总是最后脱落而常见其粘于虫体前端,呈玫瑰花状。培养第三天,几乎所有虫体的纤毛都已脱净。随纤毛板的逐步脱落,虫体的蠕动幅度由小变大,而速度由快变慢,次数明显减少。培养过程中未见虫体有明显的主动位移,只在培养 3 小时时,录相后仔细观察,才见虫体可向前端作极小范围的移动。参考周述龙

(1958)^[2]的观察,可将虫体活动分为4种形式:①突然性收缩;②伸缩活动(图版I:2);③折叠活动(图版I:3);④摇摆活动。静止时可见活跃的焰细胞纤毛活动。

培养36小时,虫体内部可见大量团状的胚球样结构,随虫体蠕动而前后流动。第七天,大约可见20个胚团,大的约24 μm (图版I:4,5)。随母胞蚴的生长发育,虫体呈长椭圆形(图版I:6,7)。培养24天时,有的母胞蚴体壁增厚并出现皱折(图版I:8),与在钉螺体内的情形甚为相似^[3]。母胞蚴在培养基中的生长是不同步的,在稀释一倍的RPMI 1640加10%小牛血清的培养液中,培养34天时虫体最长可增加近一倍,达164 μm ,母胞蚴存活最长可达48天。

讨 论

我们的结果提示,较适于日本血吸虫毛蚴体外转变和母胞蚴存活的培养液为稀释一倍的RPMI 1640加10%兔血清。DTT、半乳糖及几种有机酸(盐)不但对毛蚴体外转变和母胞蚴存活无益,有的反而有抑制作用。

在本实验中,4种血清对日本血吸虫毛蚴的转变无明显影响($P > 0.30$),而对母胞蚴的存活有一定显著性影响($0.05 < P < 0.10$),以兔血清为好。王薇等^[25]曾报道兔血清对体外培养日本血吸虫童虫、成虫及其产卵都较人或小牛血清为好;Kawanaka等(1985)^[15]、Wang和Zhou(1986)^[22]曾指出,血清可提供蛋白质和其它营养因子以利于虫体在体外生长发育。推测兔血清中可能有某种特殊因子能促进日本血吸虫的生长发育。此外,本结果还支持Voge和Seidel(1972)^[24]及Kawanaka等(1985)^[15]的观点:血清对毛蚴转变影响不大,而与转变后的生长发育密切相关。

我们考察了部分三羧酸循环的中间产物。发现它们对毛蚴转变和母胞蚴存活均无促进作用,且柠檬酸对毛蚴转变有显著抑制作用($0.01 < P < 0.025$)。不少学者在毛蚴和子胞蚴的培养中曾添加这些有机酸^[5,15,24],但未探讨它们在培养中的作用。血吸虫的能量供给主要来自糖类。不同发育阶段存在着不同的糖代谢状况,成虫主要是无氧酵解,感染期幼虫(毛蚴和尾蚴)则是需氧代谢占优势,而寄生期幼虫(胞蚴)又是以无氧酵解为主。其它一些寄生虫也存在类似的糖代谢状态的改变^[8-10,20,21]。我们的结果表明,在体外培养条件下,毛蚴和母胞蚴不能利用上述三羧酸循环中的有机酸增加能量供给、促进耗能的脱纤毛转变过程和母胞蚴的存活。这间接提示它们的三羧酸循环水平很低,毛蚴在培养条件下糖代谢由需氧代谢为主转为以无氧酵解为主,支持了母胞蚴糖代谢是以无氧酵解为主的假说。导致糖代谢状况改变的机制尚不清楚,温度和 CO_2 分压改变可能是其主要原因,渗透压、 O_2 分压、pH及氧化还原电位的改变可能也参与其调节^[10]。

柠檬酸抑制毛蚴转变的机理可能与限制虫体的糖酵解有关。Chappell(1980)指出^[10],寄生虫的糖酵解与人类相似。在血吸虫,它也具有活跃的丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶^[12],己糖激酶与人类的一样是糖酵解的限速酶^[18],磷酸葡萄糖异构酶和丙酮酸激酶也与哺乳类的相似^[13,19]。因此,我们设想糖酵解中最主要的限速酶——磷酸果糖激酶在血吸

1) 华先欣、周述龙,营养因素对体外培养日本血吸虫成虫产卵影响的研究。动物学报(待发表)。

虫也与在人类一样可被柠檬酸抑制,使糖酵解速率减慢,而此时虫体三羧酸循环水平很低,所以,能量供给减少,虫体脱纤毛转变率降低。

目前,血吸虫体外培养的方法尚未完善,还需进一步研究。建立新的较为完善的培养体系需要考察多种因素和多个水平的作用,采用一般的分组设计方法,工作量是十分庞大的。而正交设计是研究多因素、多水平问题的十分合理、效率很高的设计方法。本实验由于采用正交设计,功效为一般分组设计的4倍以上。我们认为正交设计可作为研究培养基成分,建立新培养体的首选设计方法,在这方面它具有广泛的适应性。

血吸虫幼虫体外培养的研究,自 Chernin (1964)^[11] 至今已历经 20 余年,但由于对螺类宿主的体液成分和生化状况了解甚少,关于幼虫本身营养代谢的知识也同样贫乏,因而仍然进展不大。要取得突破性进展,除需深入研究螺类宿主的生理、生化状况外,利用现有培养条件进一步研究幼虫的生化代谢和营养需要也是十分重要的。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院数学研究所统计组, 1973. 常用数理统计方法. 第一版. 科学出版社。
- [2] 周述龙, 1958. 日本血吸虫幼虫在钉螺体内发育的观察. 微生物学报, **6**: 110—126。
- [3] 周述龙、林建银、孙楚毫, 1985. 日本血吸虫胞蚴期超微结构的初步观察. 动物学报, **31**: 143—149。
- [4] Basch, P. F., 1981. Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. II. Production of infertile eggs by worm pairs cultured from cercariae. *J. Parasitol.*, **67**: 186—190.
- [5] Basch, P. F. & DiConza, J. J., 1974. The miracidium-sporocyst transition in *Schistosoma mansoni*: Surface change in vitro with ultrastructural correlation. *J. Parasitol.*, **60**: 935—941.
- [6] Basch, P. F. & DiConza, J. J., 1977. In vitro development of *Schistosoma mansoni* cercariae. *J. Parasitol.*, **63**: 245—249.
- [7] Bayne, C. J., 1972. On the reported occurrence of an ecdysone-like steroid in the freshwater snail, *Biophalaria glabrata* (Pulmonata; Basommatophora), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, **64**: 501—509.
- [8] Bruce, J. I., Weiss, E., Stirewalt, M. A. & Lincicome, D. R., 1969. *Schistosoma mansoni*: Glycogen content and utilization of glucose, pyruvate, glutamate, and citric acid cycle intermediates by cercariae and schistosomules. *Exp. Parasitol.*, **26**: 29—40.
- [9] Bruce, J. I., Ruff, M. D. & Howard, L., 1971. *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*: Oxygen uptake by miracidia. *Exp. Parasitol.*, **30**: 124—131.
- [10] Chappell, L. H., 1980. *Physiology of Parasites*. Blackie & Son Limited, Glasgow and London.
- [11] Chernin, E., 1964. Maintenance in vitro of larval *Schistosoma mansoni* in tissues from the snail, *Austro-lorbia glabrata*. *J. Parasitol.*, **50**: 531—545.
- [12] Coles, G. C., 1975. Fluke biochemistry—*Fasciola* and *Schistosoma*. *Helminthol. Abstr.*, **44A**: 147—162.
- [13] Coles, G. C., 1984. Recent advances in schistosome biochemistry. *Parasitology*, **89**: 603—637.
- [14] Hansen, E. L., Perez-Mendez, G., Yarwood, C. & Buecher, E. J., 1974. Second-generation daughter sporocysts of *Schistosoma mansoni* in axenic culture. *J. Parasitol.*, **60**: 371—372.
- [15] Kawanaka, M., Sidner, R. A. & Carter, C. E., 1985. In vitro transformation of *Schistosoma japonicum* miracidia to young sporocysts in a culture system for egg maturation. *J. Parasitol.*, **71**: 368—370.
- [16] Meuleman, E. A., Lyaruu, D. M., Khan, M. A., Holzmann, P. J. & Sminia, T., 1978. Ultrastructural changes in the body wall of *Schistosoma mansoni* during the transformation of the miracidium into the mother sporocyst in the snail host *Biophalaria pfeifferi*. *Z. Parasitenkd.*, **56**: 227—242.
- [17] Muftic, M., 1969. Metamorphosis of miracidia into cercariae of *Schistosoma mansoni* in vitro. *Parasitology*, **59**: 365—371.
- [18] Shapiro, T. A. & Talalay, P., 1982a. *Schistosoma mansoni*: Mechanism in regulation of glycolysis. *Exp. Parasitol.*, **54**: 379—390.
- [19] Shapiro, T. A. & Talalay, P., 1982b. *Schistosoma mansoni*: Inhibition of glucosephosphate isomerase and glycolysis by sugar phosphates. *Exp. Parasitol.*, **54**: 196—201.
- [20] Smith, T. M. & Brown, J. N., 1977. Tricarboxylic acid cycle enzyme activities in adult *Schistosoma*

- mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71: 329—330.
- [21] Stjernholm, R. L. & Warren, K. S., 1974. *Schistosoma mansoni*: Utilization of exogenous metabolites by eggs in vitro. *Exp. Parasitol.*, 36: 222—232.
- [22] Targett, G. A. T. & Robinson, D. L. H., 1964. Observations on the in vitro survival of miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 58: 453—456.
- [23] Taylor, A. E. R. & Backer, J. R., 1978. *Methods of Cultivating Parasites in vitro*. Academic Press, London.
- [24] Voge, M. & Seidel, J. S., 1972. Transformation in vitro of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* into young sporocysts. *J. Parasitol.*, 58: 699—704.
- [25] Wang, W. (王薇) & Zhou, S. (周述龙), 1986. In vitro cultivation of *Schistosoma japonicum* from cercariae to egg-producing adult worms. *Chin. Med. J.*, 99: 713—716.

EFFECTS OF NUTRITIVE FACTORS ON *SCHISTOSOMA JAPONICUM* MIRACIDIAL TRANSFORMATION AND MOTHER SPOROCYST CULTURE *IN VITRO*

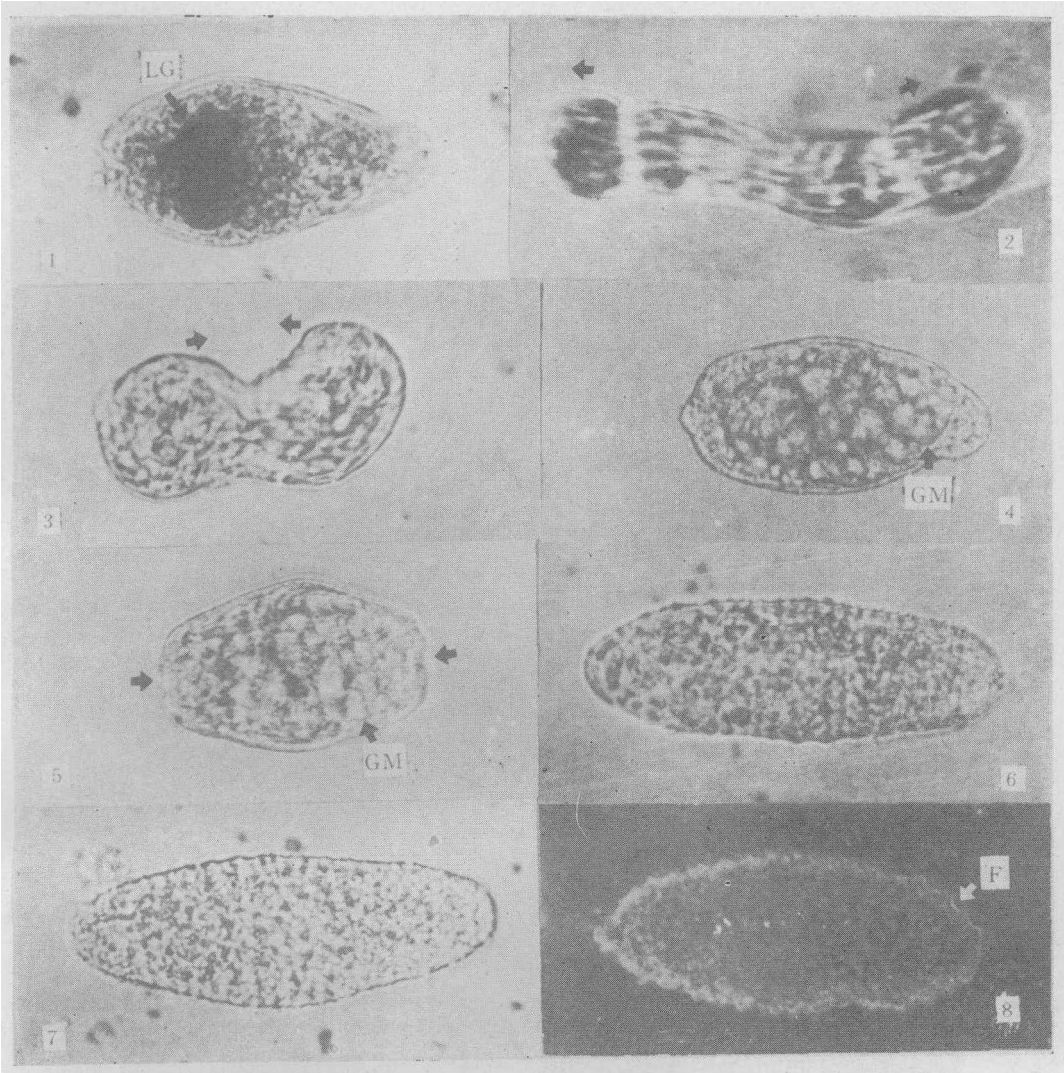
Mei Baisong and Zhou Shulong

(Department of Parasitology & Research Laboratory
of Schistosomiasis, Hubei Medical College, Wuhan)

Abstract

This paper observed the effects of several factors on the transformation of miracidia of *Schistosoma japonicum* and on the culture of young mother sporocysts of *S. japonicum in vitro*. The results showed: Different media (RPMI 1640, Tc 199, BME, and half strength RPMI 1640) and different serums (calf, sheep, rabbit, and "O" type human serum) did not affect the transformation. The longest survival seen in half strength RPMI 1640 was 48 days. The development of germinal balls was observed. The length of some parasites was nearly doubled, at 164 μm . The serum of rabbit was most beneficial to the survival of the parasites. Galactose and DTT could not promote the transformation and the survival. Citrate, -ketoglutarate, malate and sodium succinate were not helpful to the survival of parasites. They inhibited the transformation and the effect of citrate was significant. The process of miracidial transformation *in vitro* was described and the ways of carbohydrate metabolism in mother sporocysts were discussed. Authors suggested "Latin square" as an optimum design in studying the composition of medium.

Key words *Schistosoma japonicum*, miracidium, mother sporocyst, culture *in vitro*



1. 毛蚴培养 14 小时, 中性红染色, 示纤毛板已脱净, 侧腺 (LG) 残余在体内呈游离状态。×500; 2. 培养 15 天的母胞蚴, 示虫体的伸缩运动, 箭头示运动方向。×500; 3. 培养 16 天, 示虫体的折叠运动, 箭头示运动方向。×500; 4. 培养 7 天, 示胚团 (GM)。×500; 5. 培养 18 天, 示胚团增多, 虫体处于收缩状态, 箭头示运动方向。×500; 6. 培养 27 天, 虫体呈长椭圆形。×500; 7. 培养 32 天; 8. 培养 24 天, 示体壁皱折 (F)。×500

1. Miracidium cultured for 14hrs, stained with neutral red. The cilia have shed and the remnant of lateral gland (LG) was free in the parasite. ×500; 2. Mother sporocyst (MS) cultured for 15 days, showing expending movement. The arrows indicate directions of movement. ×500; 3. MS cultured for 16 days, showing folding movement. The arrows indicate directions of movement. ×500; 4. MS cultured for 7 days, showing germinal masses (GM). ×500; 5. MS cultured for 18 days, GM have increased. The parasite was contracting and the arrows indicate directions of movement. ×500; 6. MS cultured for 27 days. ×500; 7. MS cultured for 32 days. ×500; 8. MS cultured for 24 days, showing the folds (F) of the body wall. ×500