

日本血吸虫卵黄培养细胞超微结构动态的研究

董惠芬 蒋明森 杨孟祥 杨明义 李 瑛 周述龙

(湖北医科大学寄生虫学教研室, 武汉 430071)

摘要: 从超微结构水平研究日本血吸虫卵黄细胞培养的动态。在体外培养过程中, 卵黄细胞对外界环境的改变比日本血吸虫的其它体细胞更加敏感。随着培养时间的延长, 卵黄细胞发生不同程度的变性, 成熟卵黄细胞比未成熟卵黄细胞先发生变性。变性主要表现在核和胞质的电子密度降低; 卵黄球相互融合, 或卵黄球与膜之间的空隙逐步增大, 最终卵黄球从中释放出来, 变成裸露体; 脂滴数目增多, 体积增大; 粗面内质网扩大和囊泡变, 其上的核糖体脱颗粒等。由此认为, 未成熟卵黄细胞在体外培养过程中超微结构的变化可以作为评价培养条件优劣的一个指标。

关键词: 日本血吸虫, 卵黄培养细胞, 超微结构, 动态变化

中图分类号: R383.2⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2000)01-04

血吸虫细胞培养的研究虽然已有一些报道^[1-9], 但至今尚未能在体外建立一个无限增殖的培养细胞系, 究其原因是因为血吸虫是具有复杂生活周期的复殖目吸虫, 体外培养特别困难。血吸虫雌虫的生殖器官尤其是卵巢和卵黄腺对体外培养条件的改变最为敏感^[10], 在观察日本血吸虫成虫培养细胞超微结构基础上^[8], 研究体外培养过程中日本血吸虫卵黄细胞超微结构的动态变化, 旨在研究培养细胞的老化过程, 探讨老化机理, 评价培养条件的优劣。

1 材料与方法

1.1 培养组织的获取 取阳性钉螺(湖南省寄生虫病防治研究所药物室提供)常规逸蚴法逸出尾蚴, 用100条尾蚴感染健康昆明系雌性小白鼠(湖北医科大学动物室提供), 感染42d时, 用含肝素(最终浓度为10U/mL)的无菌生理盐水心脏灌注法冲虫, 收集成虫, 分离雌、雄虫体, 用解剖刀切下卵巢后段虫体, 收集虫体。将收集的虫体在含较高抗菌素浓度(最终浓度为青霉素1000IU/mL, 链霉素1000 μ g/mL)的PBS中处理至少2h备用。

1.2 培养方法 按董惠芬^[3]介绍的联合法接种培养。

1.3 培养条件 按董惠芬等^[8]。

收稿日期: 1997-11-17; **修订日期:** 1999-09-03

基金项目: 湖北省基金和省教委资助项目, 武汉市青年科技晨光计划。

作者简介: 董惠芬(1964-), 女, 浙江省萧山人, 硕士, 副教授, 研究方向: 血吸虫的生物学与血吸虫病免疫学。

1.4 透射电镜标本的制备和观察 接种时留部分细胞作对照制备标本;接种培养后每隔 6d 为一周期,定期取两瓶培养的卵黄细胞,先用 PBS 清洗细胞 3 次,然后用 2.5% 戊二醛预固定,0.5h 后换新鲜固定液,再用橡皮刮刀刮下培养细胞,离心后经缓冲液洗涤,1% 锇酸固定,按常规的透射电镜标本制样要求制样、观察并拍照。

2 结果

2.1 对照组卵黄细胞的超微结构

卵黄细胞的形状可分多角形、三角扇形、圆形、椭圆形等,表面较光滑,大小为 $2.5 \sim 8.8 \times 5.5 \sim 22.5 \mu\text{m}$ 。核通常呈圆形,也有不定形的,核膜由一单位膜构成,核孔明显,切到的核仁一般较大,呈卵圆形,电子致密程度高,分布均匀;核内异染色质丰富,核膜内缘常有呈斑块状的异染色质聚集,常染色质均匀分布在异染色质之间;胞质中具线粒体、糖原颗粒、丰富的游离核糖体和电子密度十分稠密的卵黄球所组成的卵黄滴。根据卵黄滴的大小、数量与滴内卵黄球的分布情况以及有无脂滴,将卵黄细胞分为未成熟和成熟卵黄细胞。未成熟卵黄细胞胞质内开始出现卵黄滴,卵黄滴是由单一的或数量较少的卵黄球构成,直径一般在 $1.1 \sim 1.2 \mu\text{m}$ 之内;粗面内质网十分丰富,有的围绕核周围呈长环形排列,而有的分布在卵黄滴附近;胞质中未见脂滴。成熟卵黄细胞的胞质内出现较多的卵黄滴,其直径一般在 $1.1 \sim 1.2 \mu\text{m}$ 以上,内含的卵黄球数目常在 10 个以上;并开始出现脂滴,有时有溶酶体出现,粗面内质网很少甚至无(图版 I: 1, 2)。

2.2 不同培养时间卵黄细胞超微结构的变化

随着培养时间的延长,卵黄细胞的超微结构发生一系列渐进性变化。培养 6d(图版 I: 3, 4)时,卵黄细胞内除见不到线粒体外,并未观察到其它较明显的变化,如核和胞质的染色都很均匀,与对照相比无明显区别,核仁清晰;未成熟卵黄细胞胞质中粗面内质网仍很丰富,其上的核糖体分布均匀,清晰可数。培养 12~18d(图版 I: 5)时,核和胞质就开始出现电子透亮区,即空泡化,核的空泡化比胞质严重,染色质逐渐变稀淡,核仁染色也逐渐变淡;但胞质中卵黄滴内卵黄球之间的界限清晰,未成熟卵黄细胞内粗面内质网仍较丰富,但已观察不到别的细胞器;此时成熟与未成熟卵黄细胞出现几率几乎均等。培养 24d 时,切到成熟卵黄细胞的数目减少,未成熟卵黄细胞出现几率增加,从图版 I: 6 可清楚地观察到成熟卵黄细胞比未成熟卵黄细胞大,成熟卵黄细胞核中仍可见核仁,胞质中空泡化程度比未成熟卵黄细胞严重,但成熟卵黄细胞质中卵黄滴仍较正常,其外面的膜与滴内卵黄球之间的界限清晰;至 30d(图版 II: 1, 3)时,很少观察到成熟卵黄细胞,核内染色质与核仁已无法区分,核膜有部分缺失,胞质内卵黄滴中卵黄球之间很多已发生融合;但未成熟卵黄细胞相对良好,仍可观察到核仁,核膜完整,卵黄滴中卵黄球之间未见融合,胞质中仍具粗面内质网。

培养 36~48d(图版 II: 2, 4, 5)时,偶见成熟卵黄细胞,胞膜、核膜缺失,核中染色质稀淡,胞质也稀淡,卵黄滴内卵黄球已完全融合在一起,成为一团电子密度高的致密物;趋于成熟的未成熟卵黄细胞内少部分卵黄滴中卵黄球之间也发生融合,粗面内质网轻微扩张,核、胞质空泡化加重;而大部分未成熟卵黄细胞内仍可见明显的核仁,卵黄滴中卵黄球仍未融合,而包围的膜开始涨大,胞质虽有空泡化发生,但没有前者严重,还可见粗面内质

网。至 54~66d(图版 II: 6)时,未成熟卵黄细胞核中异染色质变得很丰富,核膜仍完整;粗面内质网扩张和囊泡变,其上的核糖体有脱颗粒现象,卵黄滴的膜部分涨大,已有卵黄球从中释放出来,成为裸露体。73d(图版 II: 7)时,未成熟卵黄细胞胞质中粗面内质网扩张和囊泡变更加严重,核质、胞质空泡化加重,多数卵黄细胞中的卵黄球已裸露;但仍有一些细胞内卵黄滴被稍涨大的膜包围,卵黄球之间也并未全部融合,胞膜仍完整。在发生以上渐进性变化的过程中,脂滴也发生变化,成熟卵黄细胞内的脂滴数目逐渐增多,体积也逐渐增大;而未成熟卵黄细胞中的脂滴从无到有,数量从少到多发生改变。

3 讨论

从卵黄细胞的超微结构看,对照的细胞结构与周述龙等^[1]描述的卵黄腺细胞的结构一致,基本可分为成熟卵黄细胞和未成熟卵黄细胞两大类,区别的标志主要是卵黄滴的大小和滴内卵黄球的数目以及有无脂滴。卵黄细胞在培养 6d 时,线粒体消失;培养 12~18d 时,就开始发生较明显的变化,大部分细胞器消失,核质、胞质出现电子透亮区。本实验的培养条件与董惠芬等^[8]的培养条件一样,其中观察到的体细胞在培养 13d 时,仍可见正常的线粒体、微饮泡等,并且核和胞质染色均匀,未发生空泡化,表明日本血吸虫的体细胞在培养基中新陈代谢正常,由此可见日本血吸虫的卵黄细胞比其它体细胞受外界环境的影响更加敏感。

在培养过程中发现,随着时间的延长,成熟卵黄细胞出现的几率逐渐减少,未成熟卵黄细胞出现的几率逐渐增多,培养至 30d 时,很少观察到成熟卵黄细胞,且细胞变性较严重;至 36d 时几乎观察不到,即使偶尔见到,细胞变性也相对更严重一些,表明细胞已趋向退化死亡;而未成熟卵黄细胞在培养 30d 时数量较多,受外界环境的影响相对较小,比较正常(图版 II: 3);甚至在培养 73d 时仍有一些卵黄细胞并未退化死亡,意味着卵黄细胞在体外存活时间的长短取决于卵黄细胞的成熟度,这在超微结构水平证实了董惠芬等^[5]得出的结论。

从结果可以看出,成熟卵黄细胞比未成熟卵黄细胞大,并先发生变性,未成熟卵黄细胞中,趋于成熟的细胞先变性。卵黄细胞发生变性的特征主要表现在卵黄球相互融合,成为一团电子密度高的致密物,或与外面包绕的膜之间的空隙逐步增大,最终卵黄球从中释放出来,变成裸露体;脂滴数目增多,体积增大;粗面内质网扩大和囊泡变,其中的核糖体脱颗粒等,这与华先欣等^[10]报道的体外培养日本血吸虫虫体内卵黄腺细胞的变化类似,说明我们所选择的培养条件虽然能维持卵黄细胞在体外较长时间的存活,但最终还是会的退化死亡,可见,能使卵黄细胞在体外发生分裂、繁殖的培养条件,还需进一步的研究。

已经证实,粗面内质网的主要功能是产生构成新膜的脂蛋白,因此未成熟卵黄细胞内具丰富的粗面内质网,而成熟卵黄细胞内粗面内质网很少或无,这是卵黄细胞本身的生理状态决定的。粗面内质网的扩张、囊泡变、脱颗粒变化,在病变最早期,表现为粗面内质网核糖体数目减少,胞浆游离核糖体数目增多;随后,膜结构损害更激烈,发生轻微扩张,甚至囊泡变、断裂或溶解,附着的及游离的核糖体普遍减少,多聚核糖体解聚。这种变化无疑会破坏蛋白质的合成。生化研究证明,在这种病变的同时,分泌蛋白合成受到抑制,它与多聚核糖体解聚及结合氨基酸能力降低有关,结果导致脂蛋白合成障碍,使内质网合成

的甘油三酯贮积增加,从而使成熟卵黄细胞内的脂滴数目逐步增加,体积渐渐增大;未成熟卵黄细胞内脂滴的数目从无到有、从少到多发生变化。综上所述,在体外培养过程中未成熟卵黄细胞内各种细胞器超微结构的变化可以作为评价培养条件优劣的一个指标。

参 考 文 献

- [1] Bayne C J, Menino J S, Hobbs D J. *et al.* In vitro cultivation of cells from larval *Schistosoma mansoni*. [J] *J. Parasitology*, 1994, **80**(1):29—35
- [2] Hobbs D J, Fryer S E, Duimstra J R. *et al.* Culture of cells from juvenile worms of *Schistosoma mansoni*. [J] *J. Parasitology*, 1993, **79**(6):913—921
- [3] 董惠芬 蒋明森 李 瑛 等. 日本血吸虫细胞培养方法初探 [J]. 水生生物学报, 1995, **19**(4): 382—383
- [4] 董惠芬 蒋明森 李 瑛 等. 日本血吸虫培养细胞形态的初步观察 [C]. 见: 中国动物学会寄生虫专业学会编. 中国动物学会寄生虫专业学会成立 10 周年纪念论文集. 北京: 中国科技出版社, 1995, 131—133.
- [5] 董惠芬 蒋明森 李 瑛 等. 日本血吸虫成虫细胞培养条件的初步研究. [J], 中国血吸虫病防治杂志, 1995, **7**(5): 257—261
- [6] 董惠芬 蒋明森 陈晓蓓 等. PHA 诱导日本血吸虫成虫培养细胞增殖的研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1998, **14**(5): 41—44
- [7] 董惠芬 陈晓蓓 蒋明森 等. 日本血吸虫童虫培养细胞的超微结构观察 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1998, **5**(4): 211—216
- [8] 董惠芬 蒋明森 杨明义 等. 日本血吸虫成虫培养细胞的超微结构观察 [J]. 动物学报, 1999, **45**(1): 1—7
- [9] 董惠芬 蒋明森 陈晓蓓 等. 日本血吸虫童虫培养细胞超微结构动态变化的研究 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1999, **12**(2): 140—142
- [10] 华先欣 周述龙. 体外培养日本血吸虫成虫生殖器官超微结构的观察 [J]. 水生生物学报, 1988, **12**(3): 236—240
- [11] 周述龙 杨孟祥 孔楚豪 等. 在超微结构水平初步观察日本血吸虫雌虫生殖系统 [J]. 武夷科学, 1992, **9**: 147—151

ULTRASTRUCTURE OF CULTURED VITELLINE CELLS FROM ADULT *SCHISTOSOMA JAPONICA*

DONG Hui-Fen, JIANG Ming-Sen, YANG Meng-Xiang, YANG Ming-Yi,
LI Ying and ZHOU Shu-Long

(Medical Parasitological Laboratory, Hubei Medical University, Wuhan 430071)

Abstract: The cultured vitelline cells from adult *Schistosoma japonica* were observed ultrastructurally. The cells were more sensitive than somatic cells to the changes of *in vitro* cultured condition, and degenerated in different degrees along with the prolongation of culture. The degeneration was observed earlier in mature vitelline cells than in immature ones. Changes in the cell structure caused by the degeneration were examined with the following characteristics: the electron density of cells became lower, vitelline globules were fused with each other, the space between vitelline globules and

the membrane became larger gradually, vitelline globules were released and uncovered at last. The number and volume of lipid droplets increased. Rough-surfaced endoplasmic reticula enlarged and became vacuolar, and ribosomes left the surface of them. Therefore it was considered that ultrastructural changes of cultured immature vitelline cells could be used to estimate whether the cultured conditions were appropriate.

Key words: *Schistosoma japonica*. Culture cell of vitelline, Ultrastructure, Dynamic change

图 版 说 明

图 版 I

1. 培养 0d 的未成熟卵黄细胞, $\times 10,720$; 2. 培养 0d 的成熟卵黄细胞, $\times 25,000$; 3. 培养 6d 的未成熟卵黄细胞, $\times 17,280$; 4. 培养 6d 的未成熟卵黄细胞, $\times 25,000$; 5. 培养 18d 的未成熟卵黄细胞, $\times 8,000$; 6. 培养 24d 的卵黄细胞, $\times 3,500$.

N: 核; Nu: 核仁; Mi: 线粒体; RER: 粗面内质网; Ri: 核糖体; VD: 卵黄滴; L: 脂滴; Ly: 溶酶体; EL: 电子透亮区; MVC: 成熟卵黄细胞; IVC: 未成熟卵黄细胞。

1. An immature vitelline cell dissected from the worm, $\times 10,720$; 2. A mature vitelline cell dissected from the worm, $\times 25,000$; 3. An immature vitelline cell cultured for 6 days, $\times 17,280$; 4. An immature vitelline cell cultured for 6 days, $\times 25,000$; 5. An immature vitelline cell cultured for 18 days, $\times 8,000$; 6. Vitelline cells cultured for 24 days, $\times 3,500$.

N: nucleus; Nu: nucleous; Mi: mitochondria; RER: rough-surfaced endoplasmic reticula; Ri: ribosomes; VD: vitelline droplets; L: lipid droplets; Ly: lysosome; EL: electron lucent; MVC: mature vitelline cell; IVC: immature vitelline cell.

图 版 II

1. 培养 30d 的成熟卵黄细胞, \downarrow : 核膜有部分缺失, \downarrow : 融合的卵黄球, $\times 12,000$; 2. 培养 36d 的未成熟卵黄细胞, \downarrow : 轻微扩张的粗面内质网, $\times 8,000$; 3. 培养 30d 的未成熟卵黄细胞, $\times 6,000$; 4. 培养 36d 的成熟卵黄细胞, \downarrow : 核膜有部分缺失, $\times 8,000$; 5. 培养 48d 的未成熟卵黄细胞, \downarrow : 粗面内质网扩张, \downarrow : 卵黄球有发生融合趋向, $\times 6,000$; 6. 培养 60d 的未成熟卵黄细胞, *: 卵黄滴的膜与卵黄球间胀大的间隙, \downarrow : 裸露的卵黄球, $\times 8,000$; 7. 培养 73d 的未成熟卵黄细胞, $\times 5,000$.

Nu: 核仁; RER: 粗面内质网; L: 脂滴; EL: 电子透亮区。

1. A mature vitelline cell cultured for 30 days, \downarrow : incomplete nuclear membrane, \downarrow : fused with vitelline globule, $\times 12,000$; 2. An immature vitelline cell cultured for 36 days, \downarrow : slightly enlarged rough-surfaced endoplasmic reticula, $\times 8,000$; 3. Immature vitelline cells cultured for 30 days, $\times 6,000$; 4. A mature vitelline cell cultured for 36 days, \downarrow : incomplete nuclear membrane, $\times 8,000$; 5. An immature vitelline cell cultured for 48 days, \downarrow : enlarged rough-surfaced endoplasmic reticula, \downarrow : vitelline globules in large vitelline droplets tending to fuse, $\times 6,000$; 6. An immature vitelline cell cultured for 60 days, *: enlarged space between vitelline globules and membrane of vitelline droplets, \downarrow : uncovered vitelline globules, $\times 8,000$; 7. Immature vitelline cells cultured for 73 days, $\times 5,000$.

Nu: nucleous; RER: rough-surfaced endoplasmic reticula; L: lipid droplets; EL: electron lucent.