



## 研究简报

# 日本血吸虫细胞培养方法初探

董惠芬 蒋明森 李 瑛 杨明义 周述龙

(湖北医科大学寄生虫学教研室, 武汉 430071)

## PRELIMINARY STUDIES ON THE CULTURAL METHODS OF CELLS FROM *SCHISTOSOMA JAPONICUM*

Dong Huifen, Jiang Mingsen, Li Ying, Yang Mingyi and Zhou Shulong

(Department of Parasitology Hubei Medical University, Wuhan 430071)

**关键词** 日本血吸虫, 细胞培养, 培养方法

**Key words** *Schistosoma japonicum*, Cell culture, Cultural method

血吸虫是具有复杂生活周期的复殖目吸虫, 体外培养困难, 细胞培养更甚。经过十多年的努力, 已有一些曼氏血吸虫细胞培养的研究<sup>[1-4]</sup>, 而日本血吸虫的细胞培养至今仍是空白, 我们分别以日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum* Katsurada) 成虫和童虫为材料, 对其细胞培养的方法作了初步探讨, 现报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 虫体的获取** 取实验室人工感染的钉螺(湖北省医科院寄生虫病研究所提供), 常规逸蚴法逸出尾蚴, 用 100 条尾蚴感染健康昆明系小白鼠(中科院武汉病毒所动物室提供), 分别在 21—42d 后, 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 1000μg/ml)的 PBS 中处理至少 2h 备用。

**1.2 培养条件** 培养液为 RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, New York) 和 20% 小牛血清(杭州四季青材料研究所提供), 附加常量抗菌素(青霉素 100IU/ml, 链霉素 100μg/ml)。培养液的 pH 值为 7.2—7.4, 培养温度为 36—37℃, 接种后每周换液 2 次, 每次弃去 1/2 旧液。

**1.3 组织块贴壁培养法** 将备用的成虫用培养液清洗, 静置片刻后, 去上清液, 用剪刀将虫体剪碎, 按三宅的湿润系统固定法 (Moist system method)<sup>[12]</sup> 接种。

**1.4 冷消化培养法** 将备用的虫体用 0.25% 的胰蛋白酶和 0.02% EDTA 混合液(均用缺钙镁离子的 PBS 配制)清洗 2 次, 剪碎后按虫体和混合液的体积 1:5 的比例加入混合液, 冷消化数小时, 离心, 用培养液重悬浮, 去上清液后, 再加培养液直接接种, 每只小培养瓶约接种 1 只小白鼠中冲出的虫体量。

武汉市青年科技晨光计划资助项目。  
1995 年 4 月 22 日收到。

- 1.5 联合培养法** 将消化的成虫组织,加少量培养液,按组织块贴壁法接种。
- 1.6 观察** 每天用 Olympus 1M 倒置显微镜观察培养细胞的形态,用目镜带测微尺的光学显微镜测量细胞大小。

2 结果

三种培养方法的结果见表1。由表可见,日本血吸虫的细胞,在 RPMI-1640 和 20% 小牛血清附加常量抗菌素的培养基中,联合法接种最适合其体外存活,最长可达 110d,其次是贴壁法接种,细胞在体外最长可存活 60d,而冷消化法,因为细胞不粘附于培养瓶表面,第 3d 就开始退化。用前两种方法培养的日本血吸虫细胞,形态和大小一致,类似于 Weller 等对曼氏血吸虫成虫培养细胞的观察结果,大致可分为多角形、三角扇形、圆颗粒形、鞭毛形等类型,细胞大小约为  $6-30 \times 4-22\mu\text{m}$ , 平均为  $14 \times 11\mu\text{m}$ 。

表 1 培养方法对日本血吸虫培养细胞的影响  
Tab. 1 Effect of cultural methods on cells from *S. japonicum*

方 法 Methods	虫 体 Worms	培养次数 Cultural times	结 果 Results
贴 壁 法	成 虫	3	游离细胞少,贴壁后细胞存活时间较长,最长可达 60 d,然后细胞变圆退化。
冷消化法	成 虫	4	游离细胞多,不贴壁,呈圆形,接种后第 3d 退化。
	童 虫	2	
联 合 法	成 虫	3	游离细胞多,贴壁存活时间最长达 110d。

3 讨论

在进行细胞培养时,我们发现,因为日本血吸虫成虫的体壁由皮层、肌细胞及皮层细胞体构成,体表又有褶嵴、凹窝、感觉乳突和体棘等结构,所以仅仅将虫体剪碎,细胞不易游离出来,也很难从贴壁的组织块边缘向外生长,这样就会因为细胞数量少而影响其存活时间。因此,要延长培养细胞的存活时间,首先就必须提高游离细胞的数量,将剪碎的组织块用酶消化,就可以比较好的解决这一问题。但是,如果组织块经酶消化后直接接种,虽然游离的细胞多,但很难贴壁,因此也不能较好的生长,这就需要进一步地解决消化后的细胞贴壁问题。Bayne 等在研究曼氏血吸虫母胞蚴的细胞培养时认为,在血清含量较低(0.5%)时,可促使细胞粘附于瓶壁表面。Weller 等在曼氏血吸虫成虫细胞的培养时,所用培养基的血清含量也较低,为 2%,并且为了增强细胞的粘附力,在进行接种前,将 Leighton 管加培养基在 35℃ 下处理 24—48h,接种后使成虫细胞在体外存活 28d。另外, Bayne 等和 Hobbs 等还利用宿主细胞作饲养层,来进行曼氏血吸虫的细胞培养,均获得了较好的结果,可使细胞存活数月。本实验所采用的贴壁法也比较好地解决了培养细胞的贴壁问题。而联合法则吸收了冷消化法和贴壁法的优点,既获得了较大数量的游离细胞,又能使细胞贴壁良好,并较好地保持了细胞的活力。因此获得了较为理想的实验结果,使培养细胞的存活时间达到了 110d,大大超过了曼氏血吸虫成虫培养细胞的存活时间,与其幼虫培养细胞的存活时间相接近。

参 考 文 献

[1] Weller J H, Wheeldon S K. The cultivation in vitro of cells derived from adult *Schistosoma mansoni*. I. Methodology, criteria for evaluation of cultures; and development of media. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1982, **31**(2): 335—348.

[2] 大星章一、菅野晴夫主编(吴政安等译)。人癌细胞培养。北京: 科学出版社, 1979: 30—32。