

## 研究报告

## 细粒棘球蚴细胞系培育及其免疫研究

陆家海<sup>1</sup>, 郭中敏<sup>2</sup>, 余新炳<sup>1</sup>, 冯德元<sup>3</sup>, 李德昌<sup>4</sup>, 程维兴<sup>3</sup>

(中山医科大学 1. 病原生物学部, 2. 实验动物中心, 广东 广州 510089; 3. 兰州军区乌鲁木齐总医院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 4. 解放军农牧大学寄生虫学教研室, 吉林 长春 130062)

**摘要:** 从细粒棘球蚴病人体内获取生发层和原头节作为培养材料, 采用改良 DMEM 培养液和鼠胶原蛋白包被的培养瓶进行细胞培养, 建立了适合人源细粒棘球蚴细胞体外培养的方法, 并探讨棘球蚴细胞培养的制约因素。首次成功培育出一株人源细粒棘球蚴细胞系(13G-5), 至 1997 年 3 月 1 日为止该细胞系已培养了 140 d, 其间传了 21 代。该细胞系主要以成纤维型细胞为主, 呈贴壁生长; 用该细胞系细胞接种于昆明(Km)小鼠腹腔内, 能形成具包囊样结构的类似包囊; 接种鼠产生对囊液抗原的特异性抗体; ELISA 能够检测出细胞系细胞代谢物中特异性抗原; 该细胞系细胞和 *E. granulosus* 原头节、包囊液具有相同的 EST 酶带; 使用该细胞系细胞的代谢物作为粗制抗原进行免疫预防接种, 能使 60% 的 Km 小鼠获得完全抵抗 *E. granulosus* 感染的能力; 该抗原能使 43.33%~77.42% 的包虫病人诊断出来。此外, 检定了人源细粒棘球蚴染色体, 染色体数为 14~18 条, 并首次对其进行了 G、C-带分析。

**关键词:** 棘球属/细胞学; 13G-5 细胞系/免疫学; 细胞培养; 染色体

**中图分类号:** R383.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2001)02-0081-04

The Cell Line Establishment and Immunogenic Study of *Echinococcus granulosus*LU Jia-hai<sup>1</sup>, GUO Zhong-min<sup>2</sup>, YU Xin-bing<sup>1</sup>, FENG De-yuan<sup>3</sup>, LI De-chang<sup>4</sup>, CHENG Wei-xing<sup>3</sup>

(1. Department of Parasitology, 2. Experimental Animal Centre, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China; 3. Wulumuqi General Hospital of Lanzhou Command, Wulumuqi 830000, China; 4. Department of Parasitology of University of Agriculture and Animal Sciences, Changchun 130062, China)

**Abstract:** The germinal layer and protoscoleces of larval *Echinococcus granulosus* excised surgically from a patient with liver hydatid disease were isolated and grew in the modified DMEM in collagen-coated culture flasks. The optimal condition for larval *E. granulosus* growth *in vitro* was established, and effect factors for larval *E. granulosus* growth were analyzed. The cells were continuously grew in the modified DMEM over 140 days and past 21 passages. The cells grew with the fibroblast-like cells dominating and attached to the glass surface. The results indicated that the cell line of larval *E. granulosus*, 13G-5, was established. The Km mice were inoculated intraperitoneally with cells of 13G-5 and cyst-like structures which proved to be cyst under microscope. The mice produced specific antibody against hydatid cyst-fluid antigens. The specific antigen was found in the excretory products of 13G-5 by ELISA. The same EST isoenzyme band as that of *E. granulosus* protoscoleces was identified in 13G-5. After the mice were vaccinated with the crude antigen, the excretory products of 13G-5, 60% Km mice have no cyst formed when infected with *E. granulosus*. When excretory products of 13G-5 were used as diagnostic antigen, the sensitivity is 43.33%~77.42%. The chromosome of larval *E. granulosus* were numbered 14 to 18 and G-band and C-band were analyzed for the first time.

**Key words:** echinococcus/cytology; cell line of 13G-5/immunology; cell culture; chromosome

收稿日期: 2000-12-20

基金项目: 军队医药卫生青年基金项目(96Q023); 中国博士后基金项目(1999[17])

作者简介: 陆家海(1964-), 男, 河南济源人, 博士, 现在中山医科大学作博士后研究。E-mail: jahailu@yahoo.com.cn

包虫病/棘球蚴病是一种严重危害人类健康的最重要的人兽共患寄生虫病之一。其分布于世界各地,在我国主要流行于西北地区如青海、内蒙古、宁夏、甘肃、新疆,尤以新疆和内蒙古牧区危害最为严重。对新疆部分地区从事畜牧业人员感染调查显示,包虫病感染率在3%~32%不等,患病率为1.4%。目前我国包虫病现症患者100万,受威胁人口几千万,每年给我国畜产品造成的经济损失逾8亿元,该病已成为西部牧区群众因病致贫因病返贫的重要原因<sup>[1]</sup>。在近日由卫生部、农业部、国务院扶贫办及西部11个省、自治区、直辖市地方病防治部门和畜牧兽医部门专家、学者召开的“西部重大寄生虫病防治策略研讨会”上与会专家、学者一致提出,中国西部包虫病防治一定要与国家开发西部的战略部署结合起来,把包虫病防治提上各级政府发展西部工作的议事日程,为人民的健康和改善良好的西部投资环境做出贡献。

目前对包虫病人主要以手术切除为主,内科保守治疗(如药物化疗)为辅,同时结合综合防控措施,如严格加强对农、牧犬的管理和定期驱虫,对包虫病羊脏器的无害化处理,开展定点屠宰和屠宰检疫以及对包虫病科普知识的宣传教育等,但往往难以从根本上消除本病,为此,必须坚持“预防为主,防重于治”的原则,才能达到控制与消除本病。

从30年代开始研究者就试图通过免疫接种途径来预防绦虫病,用于制备疫苗的抗原主要为两大类:一类来自绦虫和/或六钩蚴人工培养时的代谢产物,另一类来自射线照射致弱的活虫。Osborn [Res Vet Sci, 1982, 33(1): 132]将体外培养的细粒棘球蚴六钩蚴的排泄分泌产物制成抗原,给羔羊接种可使其获得抗细粒棘球蚴卵的免疫力(抗棘球蚴)。但这里应当指出的是,作为实验室试验则可以,如何获得大量的六钩蚴才足以供应制备疫苗的需要,是一个极其关键的实际问题。因为用上述方法制备疫苗就需要大量的绦虫卵,以获得足够的六钩蚴,那样就需要大量感染绦虫成虫的犬,并且需要饲养大量感染绦虫的羊或其它中间宿主。如以新西兰为例,要给所有的羊只注苗就需要25万只犬,这还不包括其它中间宿主。因此用此方法制备疫苗显然不切合实际<sup>[2]</sup>。

为解决取得大量免疫原以生产疫苗的途径之一就是走基因工程之道。应用DNA重组技术分离细粒棘球蚴六钩蚴23~25kDa抗原组分,制备特

定重组抗原,初步实验结果显示该抗原具有高水平保护力。由于寄生虫免疫的复杂性(阶段性免疫,免疫逃避等)及重组抗原在结构等方面的差异,用其制备疫苗用于包虫病的预防仍有许多工作要做。另一途径就是通过细胞工程,体外培养带科绦虫细胞系,利用传代细胞制备疫苗。蠕虫细胞的体外培养在寄生虫学领域越来越受到重视。从寄生虫分离细胞,培育能在体外进行大量稳定繁殖的细胞系(株),不仅能够不受限制地提供抗原,还可作为模型用于寄生虫细胞生物学、生物化学及抗虫药物的筛选等研究。建立棘球蚴细胞体外培养的相关资料十分有限。研究棘球蚴细胞的体外培养,以培育棘球蚴细胞系(株),可以不受限制地提供特异性抗原(细胞系细胞及其代谢/分泌产物),为研制疫苗开展免疫预防提供条件,而且可以观察棘球蚴的发育代谢特性和建立药物筛选的体外模型。本研究基于上述目的,从包虫病人的包囊分离培养材料,在建立一整套体外培养方法的基础上,以分离培养出细粒棘球蚴细胞系为目标,进行了一系列相关研究。

## 1 人源细粒棘球蚴细胞系的培育

我们首次从包虫病人的包囊分离棘球蚴细胞,培育一株细粒棘球蚴细胞系(13G-5),并对其进行了系列相关研究<sup>[3~7]</sup>。该13G-5细胞系至1997年3月1日为止已培育了140d,传了21代,目前仍生长良好。该细胞系是从18例包虫病人的包囊材料进行36批次细胞培养才培育成功的,说明棘球蚴细胞体外培养成功的概率是十分低的。Fiori曾认为不同供体来源的棘球蚴培养材料影响成功率,来源于羊和猪的包囊材料和从病人获得的细粒棘球蚴细胞,在体外培养成功的可能性极小[Int J Parasitol, 1988, 18(3): 297]<sup>[4]</sup>。我们培育13G-5细胞系的过程,也说明棘球蚴细胞体外培养的困难程度。同时,即使培养材料都来源于相同宿主,由于棘球蚴在宿主体内寄生时间的长短、不同部位及包囊类型等因素,亦对培养成功与否产生影响。本研究最终从一7岁细粒棘球蚴病人的包囊材料培育出一株13G-5细胞系,其它培养材料未能成功。我们认为包囊的质量是影响培养成功不可忽视的因素。本研究培育成功的13G-5细胞系,从初培养到第一次传代,需要35d,传代时以1:1~2比例分

瓶为佳。在第10代以前,一般每3~5 d传一代,11代开始,细胞生长变得缓慢,仍按上述比例分瓶,一般7~10 d传一代,第18代生长又开始变快。

## 2 棘球蚴细胞培养的影响因素

多种细胞贴附在胶原蛋白包被的玻璃上生长好于不包被胶原的玻璃。细粒棘球蚴细胞亦是如此。由此可见胶原蛋白在细粒棘球蚴细胞贴附、繁殖方面起着十分重要的作用,特别是前几代细胞。细粒棘球蚴细胞起初不易贴壁,这可能是制约培养成功的另一不可忽视的因素,但贴壁后则较牢固。不贴壁呈悬浮生长的可能性几乎很小,我们在多次培养中亦未见到悬浮状态下分裂增殖的棘球蚴细胞。这一点十分重要,也是作者对其它国内有关文献相左的主要依据之一。实际上,体外培养的细胞,处于二倍体阶段,悬浮生长是不大可能的,尤其对于棘球蚴细胞更是如此。另外用胰酶消化头节制备培养细胞,消化作用的时间长短十分关键,消化时间超过30 min,头节全部成碎片,这种状态实际上也不利于培养。根据我们的实验,消化时间在15~20 min,效果最好。此时,一部分头节成碎片,一部分头节仍存活,被消化的头节碎片如果贴壁,则易于培养成功。活的头节在培养液内有的出现外翻,尽管加速了培养液中营养的消耗,亦可通过生长发育分泌到培养液中的物质具有给培养的细胞提供一定营养物质的功能。

## 3 细胞系的鉴定

对培育的人源细粒棘球蚴细胞系(13G-5)进行鉴定,进一步确证细胞系细胞的种属来源是十分必要的。这些鉴定方法包括:用不同代次的细胞系细胞接种于昆明(Km)小鼠腹腔内,观察是否形成包囊或类似包囊;测定接种小鼠的特异抗体效价和酯酶同工酶。结果细胞系细胞在小鼠腹腔能形成包囊或类似包囊,包囊结构清楚;接种鼠特异抗体滴度为1:320~5 120之间;酯酶同工酶结果:细粒棘球蚴原头节、13G-5细胞系细胞、包囊液在同一位点出现相同的一条酶带。上述鉴定指标确证了13G-5细胞系来源于细粒棘球蚴细胞<sup>[4~9]</sup>。

## 4 细胞系的免疫学研究

应用培育成功的人源细粒棘球蚴细胞系(13G-5)细胞的代谢产物作为抗原,给Km小白鼠进行免疫接种1次,于免疫后第14天用人源细粒棘球蚴原头节约1 000个进行攻击,于第200天剖检观察有无包囊形成,以测定其抵抗棘球蚴的能力,结果能使60%的免疫鼠获得完全保护,未完全获得保护的小鼠形成包囊的数量、大小较对照组明显减少,且为不育囊。由于使用的免疫接种抗原为粗抗原,实验结果尚需进一步确证。绦虫免疫常常呈现阶段性,由于培养成功的细胞系细胞主要来自生发层,该细胞系细胞应具备象胚胎细胞一样所包含的所有信息,但能否对中间宿主(人和绵羊)和终末宿主(犬)产生完全保护,有待进一步研究证实。

目前,免疫学方法诊断包虫病所使用抗原均为包囊液。由于其成分复杂,常出现非特异性反应和敏感性低等因素,而使其受到一定限制,尤其是在囊虫病流行地区更是如此。为此不少研究者通过对包囊液抗原进行提纯和改进检测方法来消除非特异性和提高敏感性,以求提高包虫病免疫诊断的价值,但往往仍不能使结果满意。近年来,研究者都在致力于抗原的研究,如使用虫体重组抗原和六钩蚴体外培养的代谢分泌物作为抗原等。本试验使用细胞系细胞代谢物作为抗原,来探讨其诊断包虫病的价值尚未见报道,探讨了细粒棘球蚴细胞系(13G-5)细胞代谢产物作为诊断抗原的可能性<sup>[6,7]</sup>。

## 5 棘球绦虫染色体研究

棘球绦虫(*Echinococcus*)染色体研究文献较少,国内尚未见报道。应用遗传学技术开展棘球绦虫染色体的研究,不仅能够用于虫种鉴定,也是对体外培养的细粒棘球蚴细胞的种属来源等进行分析所不可缺少的指标,同时也是检定细胞系在体外培养条件下是否趋于稳定或是否转化的可靠指标。本试验用原头节(protozoocoeles)和生发层细胞(germinal cell)进行了染色体测定。由于细粒棘球蚴细胞的体外培养十分困难,从生发层和原头节细胞获取大量分裂相亦不容易。本试验先后共进行数批次染色体标本的制作,才获得细粒棘球蚴细胞染色体较为理想的结果,建立了制备棘球蚴染色体较为理想的方法。首次在国内测定了细粒棘球蚴细胞染色体数目,染色体分带技术对染色体组型的建

立和染色体模式图的绘制以及亲缘关系、远缘杂交与染色体工程中的细胞学鉴定等具有广阔前景,在棘球绦虫的染色体研究中,有关分带研究的报道尚未见到。本试验对人源细粒棘球蚴进行染色体数目测定时,探讨了G-带、C-带,这将给棘球绦虫的遗传分类研究提供借鉴作用<sup>[8,9]</sup>。

应用现代分子生物学技术对细粒棘球蚴细胞系在分子水平上进行深入研究,必将推动包虫病的免疫预防研究。目前已经成功构建细粒棘球蚴全长cDNA文库,并筛选和克隆一些具有免疫原性和反应原性的基因,这必将为包虫病的免疫预防和免疫诊断开辟新的途径<sup>[10~17]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 陆家海, 郭中敏, 李德昌, 等. 棘球蚴细胞系(株)的培育及其在免疫预防中的应用研究. I. 人源细粒棘球蚴细胞培养[J]. 中国兽医学报, 1997, 17(5): 473.
- [2] 陆家海, 程维兴, 郭中敏, 等. 细粒棘球蚴体外培养的实验观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, 15(6): 392.
- [3] 陆家海, 程维兴, 郭中敏, 等. 细粒棘球蚴细胞系 13G-5 培育[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(5): 479.
- [4] 陆家海, 余新炳, 李德昌, 等. 细粒棘球蚴细胞系(13G-5)鉴定[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(4S): 30.
- [5] 陆家海, 许键, 宫荣荣, 等. 酯酶同工酶鉴定细粒棘球蚴细胞系(13G-5)种属来源[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(3): 56.
- [6] 陆家海, 李雄, 宫荣荣, 等. 细粒棘球蚴细胞系代谢抗原检测[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(6): 113.
- [7] 陆家海, 李德昌, 郭中敏, 等. 细粒棘球蚴细胞系(13G-5)细胞代谢抗原的免疫原性和反应原性[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(6): 566.
- [8] 陆家海, 孔长青, 钱若筠, 等. 人源细粒棘球蚴染色体测定[J]. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(5): 73.
- [9] 陆家海, 冯德元, 郭中敏, 等. 人源细粒棘球蚴染色体G-、C-带初步分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18(4): 249.
- [10] 陆家海, 余新炳, 高劲松, 等. 细粒棘球蚴抗原 B 亚单位前体蛋白基因的扩增和序列分析[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(4S): 27.
- [11] Lu J H. *Echinococcus granulosus* isolate EGL1 12S Ribosomal RNA gene [DB/OL]. GenBank/NCBI; AF288824. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez, 2000-08-08 / 2000-12-20>.
- [12] Lu J H. *Echinococcus granulosus* isolate EGL1 12S Ribosomal RNA gene [DB/OL]. GenBank/NCBI; AF288825. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez, 2000-08-08 / 2000-12-20>.
- [13] Lu J H. *Echinococcus granulosus* isolate EGL1 12S Ribosomal RNA gene [DB/OL]. GenBank/NCBI; AF288826. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez, 2000-08-08 / 2000-12-20>.
- [14] Lu J H. Cloning and identification of cDNA encoding an EF-1 from *Echinococcus granulosus* [DB/OL]. GenBank/NCBI; AF246979. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez, 2000-04-17 / 2000-12-20>.
- [15] Lu J H, Yu X B, Chen H H, et al. *Echinococcus granulosus* cytochrome c oxidase subunit II (COX2) [DB/OL]. GenBank/NCBI AF302409. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez, 2000-10-05 / 2000-12-20>.
- [16] Lu J H. Cloning and identification of *Echinococcus granulosus* antigen B [DB/OL]. GenBank/NCBI; AF252859. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez, 2000-04-17 / 2000-12-20>.
- [17] 陆家海, 余新炳, 冯德元, 等. 细粒棘球蚴文库的构建及初步鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(3): in press.

(编辑 张敏瑞)

#### ·简讯·

### 我校梁秀龄教授、洪明晃副教授参加国家科学技术奖励大会

2月19日上午,党中央、国务院在北京人民大会堂召开国家科学技术奖励大会,我国5大国家科学技术奖同时揭晓并颁奖。这次会议是我国科学技术发展史上的一次盛会,是对我国科学技术水平的一次检阅。我校梁秀龄教授等完成的《Wilson病的分子生物学研究》及闵华庆教授、洪明晃副教授等完成的《鼻咽癌防治系列研究》两项科技成果获得国家科技进步二等奖。梁秀龄教授及洪明晃副教授为代表参加了大会,并与国家领导人合影留念。为学校赢得了荣誉,创下了迄今为止我校在同一年同获两项的最高奖励:国家科技进步二等奖的记录。

Wilson病(WD),是我国较常见的神经系统染色体隐性遗传病。梁秀龄教授等经历了10多年的研究,从基因定位、基因结构、基因突变等基础研究进而紧密结合临床,为临床提供了准确的直接基因诊断法,为降低WD发病作出重要贡献。从70年代开始,闵华庆教授等就开始了鼻咽癌的防治研究工作,该成果提出的鼻咽癌筛查方案,92分期和分层治疗方案,已取得显著疗效,达国际领先水平。

(陈丽芳, 黄小珍)