

## 细粒棘球蚴细胞系(13G-5)鉴定

陆家海<sup>1</sup>, 余新炳<sup>1</sup>, 李德昌<sup>2</sup>, 单志新<sup>1</sup>, 郭中敏<sup>1</sup>, 潘兴华<sup>3</sup>

(1. 中山医科大学寄生虫学教研室, 广东 广州 510089; 2. 解放军农牧大学, 吉林 长春 130062;  
3. 昆明总医院医学实验科, 云南 昆明 650032)

**摘要:**【目的】鉴定 13G-5 细胞系细胞是否来源于细粒棘球蚴细胞。【方法】用不同代次的细胞系细胞接种 Km 小鼠腹腔, 观察是否形成包囊或类似包囊, 病理切片证实; 用形成的包囊材料进行体外培养; 测定接种小鼠的特异抗体效价; 用酯酶同工酶鉴定细胞系。【结果】细胞系细胞在小鼠腹腔能形成包囊或类似包囊, 病理切片观察包囊结构清楚, 体外培养, 未能见到细胞贴壁生长和活原头节, 将培养悬液涂片, 吉姆萨染色后镜检, 只见到极少量细胞(类似于生发层细胞), 也未见到原头节。实验鼠抗体滴度的倒数为 320~5 120 之间; 酯酶同工酶检测结果: 细粒棘球蚴原头节、13G-5 细胞系细胞、包囊液含有相同的酯酶同工酶谱, 在同一位点出现相同的一条酶带。【结论】13G-5 细胞系来源于细粒棘球蚴细胞。

关键词: 细粒棘球蚴; 细胞系; 鉴定

中图分类号: R383.3 文献标识码: A 文章编号: 100-257X(2000)04S0-0030-04

## The Identification of the Cell Line of *Echinococcus granulosus*

LU Jia-hai<sup>1</sup>, YU Xin-bing<sup>1</sup>, LI De-chang<sup>2</sup>, SHAN Zhi-xin<sup>1</sup>, GUO Zhong-min<sup>1</sup>, PAN Xing-hua<sup>3</sup>

(1. Department of Parasitology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China;  
2. Agraculture and Animal Sciences University of PLA, Changchun 130062, China;  
3. Medical Experimental Department of Kunming General Hospital, Kunming 650032, China)

**Abstract:** 【Objective】To identify the origin of 13G-5 cell line. 【Methods】13G-5 cells come from different passages were inoculated intraperitoneal into mice and the potentiality of the subculture cell to develop into a hydatid cyst in mice was examined by pathological method(or the cysts or cysts-like were observed macroscopically and microscopically). The cysts formed in mice were culture *in vitro*. The specific antibody for cyst fluid in the serum of the infected mice were measured by IHA. The cell line was confirmed furtherly by inspect its isoenzyme EST. 【Results】The cysts were found clearly in the peritoneal cavity by macro- and microscopiy examination and this indicated that cysts were formed when the cells were inoculated into mice. The viable protoscolex were not found when the cells were culture *in vitro*, only a few cells can be found when the cultural material was examined by Giemsa's stain (the cells like the germinal cells in morphology). The antibody titer of cysts fluid were varied from 1:320~1:5 120. The isoenzyme EST of *E. granulosus* protoscolex, 13G-5 cell line and cyst fluid appeared in the same position when inspected by electrophoresis. 【Conclusions】13G-5 cell line was derived from *E. granulosus*.

**Key words:** *Echinococcus granulosus*; 13G-5 cell line; identification

体外培养细粒棘球蚴细胞并培育成传代细胞系, 将有可能不受限制地提供寄生虫抗原, 并用于

诊断、免疫预防研究<sup>[1]</sup>。本实验是基于从包虫病人体内分离棘球蚴细胞, 首次培育成功人源细粒棘球

收稿日期: 2000-05-15

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

作者简介: 陆家海(1964-)男, 河南济源人, 博士。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

蚴细胞系(13G-5), 在进行一系列研究的基础上<sup>[2~7]</sup>, 对细胞系细胞进行接种感染和同工酶鉴定。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞系细胞接种实验

1.1.1 实验动物 普通级昆明小白鼠 5 只, 体重 18~22 g, 雌性, 由新疆军区医学实验动物中心提供。

1.1.2 接种细胞的制备及接种方法 分别收集 13G-5 细胞系第 7 代、第 15 代细胞, 用无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 Hanks 液洗 3 次, 用 1 g/L 的结晶紫染色进行活细胞计数, 第 7 代活细胞共计 1 300 万, 第 15 代活细胞共计 3 000 万, 用 Hanks 液将第 7 代细胞稀释成 2 mL (650 万活细胞/mL), 腹腔接种 2 只小白鼠, 每只腹腔注射 1 mL, 即每只小鼠腹腔接种活细胞 650 万; 第 15 代细胞用 Hanks 液稀释成 3 mL (1 000 万/mL), 接种给 3 只小白鼠, 每只腹腔注射 1 mL, 即活细胞 1 000 万/只。然后分别放入笼中饲养。第 7 代细胞于接种后第 355 天, 第 15 代细胞于接种后第 250 天, 先眼球采血, 分离血清, 然后将小白鼠拉颈处死, 剖检观察。

1.1.3 病理检查 实验鼠剖检后, 观察每只鼠腹腔内有无包囊或类似包囊形成, 并观察包囊或类似包囊的位置、大小、数量、有无囊液、重量等, 然后将部分包囊或类似包囊用体积分数为 10% 甲醛固定, 石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜下观察包囊或类似包囊的结构。

1.1.4 包囊材料的体外培养 将其中一只实验鼠腹腔内形成包囊的一部分在无菌条件下剪碎, 按文献<sup>[2]</sup>的方法制备细胞培养材料, 加入适量的改良 DMEM 应用培养液, 37 °C 温箱培养。

1.1.5 实验鼠抗体效价检测 从包虫病人的包囊内无菌采取囊液用于制备抗原, 用间接血凝试验 (IHA), 将实验鼠血清从 1:10 进行倍比稀释, 测定抗体滴度<sup>[8,9]</sup>。

### 1.2 同工酶检测

1.2.1 样品及其制备 制备细粒棘球蚴病人血清、细粒棘球蚴原头节, 以及 13G-5 细胞系细胞和包囊液。13G-5 细胞系细胞为第 16 代细胞, 用含 9 g/L NaCl 的 0.06 mmol/L EDTA (pH 7.1) 洗细胞 3 次, 然后用超声波破碎细胞, 离心后取上清, 置一

70 °C 储存备用。

1.2.2 检测方法 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法<sup>[10]</sup>。

## 2 结 果

### 2.1 细胞感染实验

2.1.1 病理检查 细胞系第 7 代细胞接种的 2 只小白鼠在第 355 天剖检时, 只见到其中的一只腹腔内有类似包囊存在, 类似包囊附着在小肠上, 突出小肠表面, 另一只小白鼠未能见到包囊。细胞系第 15 代细胞接种的 3 只小白鼠, 剖检发现有 2 只小白鼠腹腔内有包囊形成, 其中一只小白鼠腹腔内有 4 个大小不等的包囊连在一起呈葡萄状, 位于腹腔中央, 和肠系膜相连, 包囊直径在 0.5~1.2 cm 之间, 内含透明囊液 (图 1)。另一只腹腔内只有一个包囊, 位于腹腔左侧, 单独存在, 内含透明囊液 (表 1)。



图 1 细胞系细胞接种小鼠腹腔形成的包囊

Fig. 1 Cysts seen in the peritoneal cavity of mouse with 13G-5 cells

表 1 13G-5 细胞系细胞对小白鼠的感染特性比较

Table 1 Compard with the cysts of infection of mice for 13G-5 cell line

No.	Inoculated Cells ( $\times 10^6$ )	Number of cyst (n/D)	Weight(g) (m/g)	Diameter (D/cm)	Days after inoculation (t/d)
1	6.5	1	0.2	0.4	355
2	6.5	—	—	—	355
3	10	4	4.7	0.5~1.2	250
4	10	1	0.4	0.5	250
5	10	—	—	—	250

2.1.2 包囊的结构 病理切片, 镜下观察包囊结构清楚, 主要有两层构成。囊壁外层为无细胞的结构呈板状的角质层, 此层厚; 角质层外有大量细胞积聚, 主要有腹腔巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞和多核巨细胞等, 并有结缔组织增生; 内层为一十分薄的生发层, 生发细胞散在; 未见到头节及其结构 (图 2)。

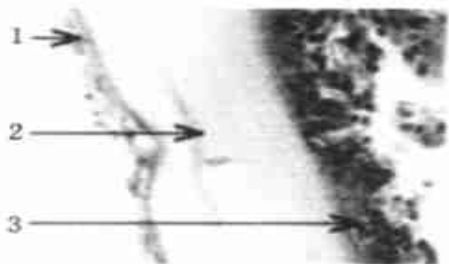


图2 实验鼠腹腔形成包囊结构

Fig. 2 A histological section of the cyst specimen from infectivity mouse

1. Germinal cell; 2. Cyst; 3. Inflammatory invasive cells



图3 同工酶图谱

Fig. 3 The map of isozymograms enzymes EST

1, 2; Protocolex; 3, 4; Cyst fluid; 5, 6; Cells of 13G-5; 7, 8; Serum of patient

2.1.3 体外培养观察 用细胞系第15代细胞接种小白鼠,其腹腔内形成的包囊连同囊液一同用于体外培养,未能见到细胞贴壁生长和活原头节。在制备培养材料时,将培养悬液涂片,吉姆萨染色后镜检,只见到极少量细胞(类似于生发层细胞),也未见到原头节。

2.1.4 实验鼠的抗体效价 用包虫病人的包囊液作为抗原,采用IHA法检测接种细胞的实验鼠特异抗体效价。结果表明,实验鼠抗体滴度的倒数为320~5120之间。未形成包囊的2只实验鼠的抗体滴度的倒数小于320(表2)。

液进行培养,用来源于牛的包囊分离的细胞培养了720 d。但Howell等(1988)对Fiori等(1988)分离的细胞提出质疑,认为是牛的细胞系或是宿主的细胞和预先缺失染色体的寄生虫细胞融合而形成的体细胞杂交体(Fruya 1991)。Fruya(1991)<sup>[11]</sup>从*E. multilocularis*病人的包囊培育成功一株细胞系,并用该细胞系细胞接种棉鼠腹腔,形成包囊或类似包囊。为了鉴定我们培育的13G-5细胞系是否来源于细粒棘球蚴细胞,用该细胞系细胞感染Km小鼠,并测定了酯酶同工酶。

13G-5细胞系细胞接种感染实验结果表明:细胞系细胞在小鼠腹腔能形成包囊或类似包囊,病理切片观察包囊结构清楚,生发细胞散在,但未见到头节;用形成的包囊连同囊液一同用于体外培养,尽管未能见到细胞贴壁生长和活原头节,将培养悬液涂片,吉姆萨染色后镜检,则见到极少量细胞(类似于生发层细胞)。检测接种细胞的实验鼠血清的效价,结果表明,实验鼠产生了特异性抗体。这些结果说明:用该细胞系细胞接种小鼠所形成的包囊和病体内所形成的包囊结构有差异,但能够说明13G-5细胞系细胞来源于细粒棘球蚴细胞,且能在体内形成类似包囊。

同工酶是表达遗传信息的分子,是包括等位基因和多位点基因表达的产物。由于同工酶分子多样形式完全是由遗传基因所决定,所以各种同工酶的出现无一不受基因的控制。因此,同工酶表现出明显的组织、种属和发育的特异性。在细胞培养中,对不同种属的细胞系细胞匀浆进行同工酶分析,不仅可用作细胞系表型的标记,鉴定细胞种属来源;还可作为细胞系特征的指标以及鉴定细胞系细胞是否转化、检验细胞系在培养过程中是否交叉污染等,已是一项不可缺少的指标。本实验通过检

表2 用包囊液抗原测定接种鼠IHA血清效价

Table 2 Antibody titers of cyst fluid in serum of mice measured by IHA

No.	Titers of cyst fluid in serum									
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
1	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
2	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

2.2 酯酶同工酶检测

细粒棘球蚴原头节、13G-5细胞系细胞、包囊液含有相同的酯酶同工酶谱。在同一位点出现相同的一条酶带;而包虫病人血清则有6条酶带,且有一条酶带和*E. granulosus*原头节及细胞系细胞的酯酶带处在同一位置(图3)。

3 讨论

Fiori等(1988)<sup>[11]</sup>从不同来源的*E. granulosus*包囊生发层分离细胞,用含包囊液的DMEM培养

测人源细粒棘球蚴原头节、13G-5 细胞系细胞、包裹液及包虫病人血清的酯酶同工酶谱含有相同迁移率(RF 值)的区带, 表明 13G-5 细胞系是来源于细粒棘球蚴细胞。严雷等<sup>[10, 12]</sup>对新疆不同地区的羊源、牛源的 *E. granulosus* 原头节的酯酶同工酶(EST)、苹果酸脱氢酶(MDH)、苹果酸酶(ME)、葡萄糖磷酸异构酶(GPI)、酸性磷酸酶(ACP)等同工酶进行了测定, 并比较了不同地区和来源的 *E. granulosus* 原头节之间同工酶在区带数目、排列形式、Rf、Sm 值、等电聚焦分析, 以及对细粒棘球蚴是否存在种间差异提供依据。严雷结果提示: 不同地区来源于不同宿主的 *E. granulosus* 原头节在酯酶同工酶谱的区带数目不同, 但有 3 个 Rf 值相等的共同酶带。本实验检测 *E. granulosus* 原头节、包裹液和细胞系细胞酯酶同工酶, 得到一条相同位置的酯酶区带, 而包虫病人血清除含有相同位置的一条区带外, 至少还有另外 5 条酯酶区带。尽管这一结果和文献[10, 12]中 *E. granulosus* 原头节酯酶酶谱有差异, 却能够说明 13G-5 细胞系来源于细粒棘球蚴细胞。

#### 参考文献:

- [1] Fruya K. An Established cell line of larval *Echinococcus multilocularis* [J]. *Int J Parasitol*, 1991, 21(2): 233.
- [2] 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.
- [3] 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. 1. 人源细粒棘球蚴细胞培养 [J]. *中国兽医学报*, 1997, 17(5): 473.
- [4] 陆家海, 程维兴, 郭中敏, 等. 细粒棘球蚴生发细胞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.
- [5] 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.
- [6] 陆家海, 官荣荣, 郭中敏, 等. 应用 ELISA 检测细粒棘球蚴代谢抗原 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 1999, 15(6): 131.
- [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*, 1998, 19(6): 566.
- [8] Rickard M D. The immunological diagnosis of hydatid disease [J]. *Aus Vet J*, 1979, 55: 99.
- [9] Todorov T, Dakov I, Kosturkova M, *et al*. Immunoreactivity in pulmonary echinococcosis. I. A comparative study of immunodiagnostic tests. *Bull WHO*, 1978, 57: 735.
- [10] 严雷, 张文林, 翟群, 等. 新疆不同地区不同来源细粒棘球蚴原头节的几种同工酶谱比较研究 [J]. *地方病通报*, 1992, 7(增刊): 76.
- [11] Fiori P L, Monacon G, Scappaticci S, *et al*. Establishment of cell cultures from hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* [J]. *Int J Parasitol*, 1988, 18(3): 297.
- [12] 严雷, 张文林, 翟群, 等. 新疆不同地区不同来源细粒棘球蚴原头节的几种同工酶的等电聚焦分析 [J]. *地方病通报*, 1992, 7(增刊): 82.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 29 页)

- [3] Fernandez V, Ferreira H B, Fernandez C, *et al*. Molecular characterisation of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B [J]. *Mol Biochem Parasitol* 1996, 77(2): 247.
- [4] Leggatt G R, Yang W, McManus D P. Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis [J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992, 86(2): 189.
- [5] Frosch P, Hartmann M, Muhlschiegel F, *et al*. Sequence heterogeneity of echinococcal antigen B [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1994, 64: 171.
- [6] Leggatt G R, McManus D P. Identification and diagnostic value of a major antibody epitope on the 12 kDa antigen from *Echinococcus granulosus* (hydatid disease) cyst fluid [J]. *Parasite Immunol*, 1994, 16(2): 87.

(编辑 张敏瑞)