

# 旋毛虫肌幼虫细胞传代培养及超微结构观察

李宛青<sup>①②</sup> 王中全<sup>①\*</sup> 王睿<sup>①</sup> 侯小君<sup>①</sup> 赵桂花<sup>①</sup> 崔晶<sup>①</sup>

(<sup>①</sup> 郑州大学医学院寄生虫学教研室 郑州 450052; <sup>②</sup> 郑州师范高等专科学校生命科学系 郑州 450044)

**摘要:** 消化、分离观察旋毛虫(*Trichinella spiralis*) 肌幼虫, 获得肌幼虫细胞, 用含 10% 胎牛血清的 RPM-1640 培养液培养原代细胞, 胰酶 (含 0.02% EDTA) 消化法进行传代, 透射电镜观察培养细胞超微结构, 用多重 PCR 鉴定培养细胞。结果表明, 在培养 24~72 h 原代细胞开始贴壁, 7~8 d 形成单层细胞, 细胞间融合现象不明显, 10~12 d 传一代。透射电镜显示旋毛虫细胞核为椭圆形, 核膜、核仁清晰, 核内染色质较丰富, 胞浆含丰富的线粒体。细胞主要有两种类型, 椭圆形和多角形, 以椭圆形为主。多重 PCR 扩增培养细胞 DNA, 可见 1 条与旋毛虫肌幼虫 DNA 扩增产物相同的条带 (173 bp)。结果表明, 旋毛虫肌幼虫细胞可在含 10% 胎牛血清的 RPM-1640 培养液中传代培养。

**关键词:** 旋毛虫; 肌幼虫; 细胞培养; 超微结构; 多重 PCR

中图分类号: R383.15 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2007)06-85-05

## Passage Cultivation and Ultrastructure of *Trichinella spiralis* Muscle Larval Cells Cultured *in Vitro*

LI Wan-Qing<sup>①②</sup> WANG Zhong-Quan<sup>①\*</sup> WANG Rui<sup>①</sup> HOU Xiao-Jun<sup>①</sup> ZHAO Gui-Hua<sup>①</sup> CU Jing<sup>①</sup>

(<sup>①</sup> Department of Parasitology, Zhengzhou University Medical College, Zhengzhou 450052;

<sup>②</sup> Life Science Department, Zhengzhou Teachers' College, Zhengzhou 450044, China)

**Abstract:** Muscle larvae of *Trichinella spiralis* were isolated by digestion method, the cells were separated through homogenization, the primary cells were cultured in RPM-1640 medium containing 10% fetal bovine serum, and passage cultivation was carried out after trypsin (containing 0.02% EDTA) digestion. The cellular ultrastructure was observed by using transmission electron microscope, and the cultured cells were identified by multiplex PCR. The results showed that the primary cells began to adhere to the bottom of culture flask 24-72 hours after inoculation. The cell monolayer formed 7-8 days after culture and distinct fusion among cells was not observed. Each passage could be completed within 10-12 d. The results of transmission electron microscopy showed that the cell nucleus of *T. spiralis* muscle larvae was elliptic. There were clear karyotheca, nucleolus and abundant chromatin in the nucleus, and plentiful mitochondria in the cytoplasm. There were mainly two types of cells, elliptic and polygonal cells, and most of them were elliptic. The DNA extracted from the cultured cells was amplified by multiplex PCR and the band (173 bp) was the same as the DNA from *T. spiralis* muscle larvae. The results show that the passage cultivation of *T. spiralis* muscle larval cells could be maintained in RPM-1640 medium containing 10% fetal bovine serum.

**Key words:** *Trichinella spiralis*; Muscle larvae; Cell culture; Ultrastructure; Multiplex PCR

旋毛虫病是一种严重的人兽共患寄生虫病, 目前在世界各地仍常有此病暴发, 现已列为再度肆虐的疾病(re-emerging disease)<sup>[1]</sup>。近年来不少学者开展了旋毛虫病疫苗研究<sup>[2]</sup>, 但迄今为止尚未完全解决旋毛虫抗原的来源、成本、纯度等问题, 即使应用旋毛虫 DNA 疫苗免疫小

基金项目 河南省基础与前沿技术研究计划项目(No. 072300450110);

\* 通讯作者, E-mail: wangzq@zzu.edu.cn;

第一作者介绍 李宛青, 女, 博士研究生, 副教授; 研究方向: 旋毛虫生物学; E-mail: wanqingedu@yahoo.com.cn。

收稿日期 2007-06-12, 修回日期 2007-09-19

鼠,攻击感染后的减虫率也仅有38%<sup>[3]</sup>。国内外有关血吸虫和绦虫细胞培养的研究较多<sup>[4,5]</sup>,但尚未见有关旋毛虫细胞培养的报道。本文采用细胞培养方法对旋毛虫(*Trichinella spiralis*)肌幼虫细胞进行体外培养,观察其生长状况及超微结构,以揭示旋毛虫细胞的形态学特征,并为旋毛虫病的免疫诊断及免疫预防提供抗原奠定基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 40日龄健康雄性昆明小鼠,体重15~18g。购自河南省实验动物中心。

**1.2 旋毛虫来源** 旋毛虫来自河南省南阳猪源,由本教研室小鼠传代保种。

**1.3 实验仪器和试剂** 透射电镜(日立H-7500型)观察在河北医科大学电镜中心完成;胎牛血清由中国医学科学院生物工程研究所生产;胃蛋白酶为北京芳草试剂公司进口分装(活性为1:30000);胰蛋白酶为吉诺生物技术有限公司生产。

**1.4 肌幼虫的收集** 昆明小鼠感染旋毛虫(300条/只)后40d拉颈处死,去皮及内脏,肌肉粉碎后加人工消化液(0.1%胃蛋白酶,0.9%NaCl,0.7%HC1),肌肉与人工消化液之比为1:10(w/v)。置39℃恒温摇床消化4~6h,按贝氏法收集肌幼虫<sup>[6]</sup>。

**1.5 肌幼虫细胞的分离** 将收集的肌幼虫在无菌条件下反复清洗5次,然后在含双抗(青霉

素1000IU/ml,链霉素1000μg/ml)的PBS中静置2h,吸去PBS,加RPMI-1640在玻璃匀浆器中研磨,过320目筛网2次,PBS洗涤3次,每次洗涤后1000r/min离心5min,即获得旋毛虫肌幼虫细胞。

**1.6 肌幼虫细胞的体外培养及传代** 将分离的细胞以 $1 \times 10^6$ 个/ml接种于含0.5%胎牛血清的RPMI-1640培养液中,在5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养2d后用含10%胎牛血清的培养液替换。每3~5d换液1次,每次半换液。当细胞布满瓶底时,吸出所有培养液,用无菌PBS反复冲洗3次,用0.25%胰蛋白酶(含0.02%EDTA)消化,以1/2量作传代接种培养。每10~12d传代一次。

**1.7 透射电镜标本的制备和观察** 取培养12d的肌幼虫细胞,先用pH7.0PBS清洗3次,消化、离心、去上清液,沉淀培养细胞用2.5%戊二醛固定,1h后换新鲜固定液。然后经后固定、清洗、脱水、浸透、环氧树脂包埋、聚合,Leica超薄切片机切片、醋酸铀和柠檬酸铅双重电子染色,H-7500型透射电镜观察。

**1.8 培养细胞DNA的提取和多重PCR鉴定** 参照Zarlenga等<sup>[7]</sup>文献,根据不同种旋毛虫的rDNA扩展片段V区(expansion segment V region,ESV)和内部转录间区(internal transcribed spacers)ITS1和ITS2基因序列合成5对引物,由上海生工生物工程有限公司合成,其序列如下:

多重PCR 引物对	引物序列	扩增片段
I	5' GTTCCATGTAACAGCAGT3' 5' CGAAAACATACGACAACCTGC3'	ESV
II	5' GCTACATCCTTTTGATCTGTT3' 5' AGACACAATATCAACCACAGTACA 3'	ITS1
III	5' GCGGAAGGATCATTATCGTGTA3' 5' TGGATTACAAAGAAAACCATCACT3'	ITS1
IV	5' GTGAGCGTAATAAAGGTGCAG3' 5' TTCATCACACATCTTCCACTA3'	ITS2
V	5' CAATTGAAAACCGCTTAGCGTGTTT3' 5' TGATCTGAGGTCGACATTTCC3'	ITS2

收集第4代传代细胞,3 000 r/min 离心后加入30  $\mu\text{l}$  裂解液,55  $^{\circ}\text{C}$  水浴过夜,酚氯仿异戊醇抽提DNA,无水乙醇沉淀,13 000 r/min 离心5 min,干燥后加入20  $\mu\text{l}$  无菌双蒸水作为模板DNA。用HITACH 20001型紫外分光光度计测定DNA纯度,用PCR仪进行扩增。反应体系总体积为25  $\mu\text{l}$ ,包括dNTPs(2.5 mmol/L)、 $\text{MgCl}_2$ (1.5 mmol/L)、I、II、III、V引物终浓度均为0.25 mmol/L,IV引物终浓度为0.5 mmol/L,模板DNA 10 ng, *Taq* DNA聚合酶(2 U)。进行多重PCR反应时是将所有5对引物同时加入反应体系,同时对模板DNA中的不同片段扩增多出不同的条带,据此可对不同种的旋毛虫进行鉴定。PCR反应条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性5 min,94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,60  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  2 min,共40个循环,最后72  $^{\circ}\text{C}$  延伸7 min。本实验设阴性对照,反应体系中不加模板DNA,其他成分均同上。将扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳分离,每份

样品加样量为5  $\mu\text{l}$ ,电压160 V,电泳时间30 min。经GeneFinder染色,Gene Genius生物成像系统拍照。

## 2 结果

### 2.1 肌幼虫细胞培养和传代

接种后3 d内,光镜观察可见圆、亮、折光度较强的细胞(图1A)漂浮在培养基中。从培养第4 d开始,在培养瓶底壁上可见亮而饱满的细胞呈单个分布,但仍有许多细胞漂浮在培养基中。培养7 d,整个瓶底布满多个圆亮细胞,培养12 d左右用无菌PBS反复冲洗后仍可见单层排列细胞,细胞间融合现象不明显(图1B)。传代后细胞贴壁速度明显较原代慢,约需10 d左右,且始终有部分细胞悬浮于培养基中,偶见成对细胞存在。图1C是接种后第45 d的细胞,视野中出现少量呈亚铃状细胞。目前旋毛虫肌幼虫细胞已培养70 d,传代4次,仍生长良好。

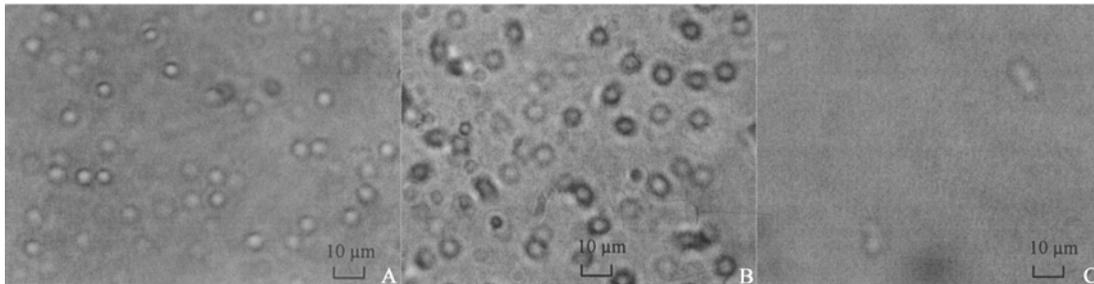


图1 培养的旋毛虫肌幼虫细胞( $\times 400$ )

Fig.1 *T. spiralis* muscle larvae cells cultured *in vitro*

A. 培养3 d; B. 培养12 d; C. 亚铃状细胞。

A. Cells cultured for 3 d; B. Cells cultured for 12 d; C. Dumbbell-like cells.

### 2.2 培养细胞的超微结构

旋毛虫培养细胞的透射电镜显示(图2),旋毛虫细胞主要有2种类型:椭圆形、多角形,其中以椭圆形为主。椭圆形细胞表面光滑,细胞膜无突起,边界比较规则,且细胞核占细胞比例较小;核也为椭圆形,核膜、核孔( $\uparrow$ )清晰,核仁明显,核内染色质( $\uparrow\uparrow$ )较丰富;胞浆内含非常丰富的线粒体(M),大部分线粒体双层膜结构清晰可见,细长型内嵴明显,而有的则出现不同程度的溶解,严重者呈空泡状,嵴大多消失。此外,细胞内可见

粗面内质网(ER)、核糖体(R)。有的细胞含有囊泡、糖原颗粒(图2A)。多角形细胞膜有2~4个突起(图2B、C),根据形态不同又可分为两种类型,图2B所示细胞核仁(Nu)较明显,染色质( $\uparrow\uparrow$ )较丰富,一个突起( $\blacktriangle$ )较明显;图2C所示细胞具有一个较长的突起( $\blackstar$ ),并发生折叠。多角形细胞的细胞核占整个细胞的比例较大,线粒体(M)等细胞器明显少于椭圆形细胞,且细胞器的结构没有椭圆形细胞清晰。

### 2.3 培养细胞的多重PCR鉴定

第4代传代

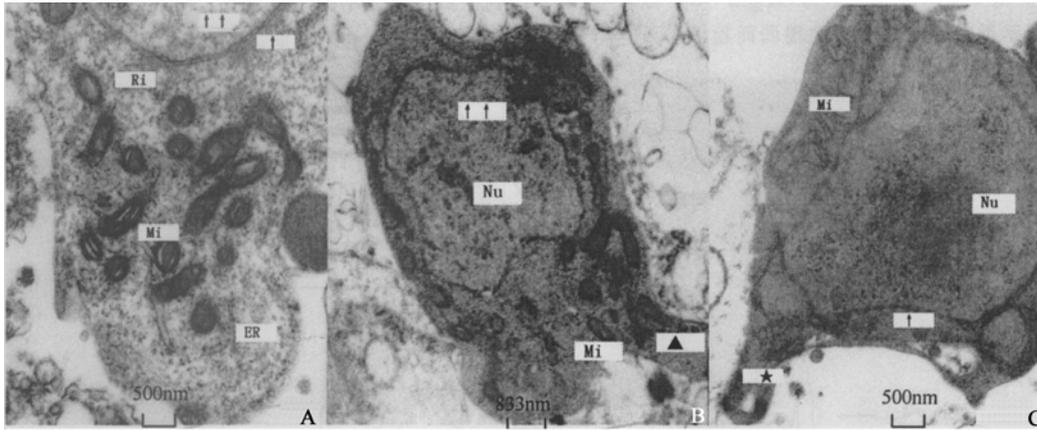


图2 旋毛虫肌幼虫培养细胞的超微结构

Fig.2 Ultrastructure of *T. spiridis* muscle larval cells cultured *in vitro*

A. 椭圆形细胞 (×20 000) ; B. 多角形细胞1 (×12 000) ; C. 多角形细胞2 (×40 000) .  
A. Elliptic cell (×20 000) ; B. Polygonal cell 1 (×12 000) ; C. Polygonal cell 2 (×40 000) .

细胞提取DNA后,与旋毛虫肌幼虫DNA在相同PCR体系内对基因组DNA进行扩增,电泳结果表明培养细胞和旋毛虫肌幼虫DNA的扩增产物在约173 bp处出现相同的条带(图3)。

### 3 讨论

尽管国内外不少学者对旋毛虫生物学特性开展了较深入的研究<sup>[8]</sup>,但迄今为止有关旋毛虫细胞特征的研究未见报道。对旋毛虫肌幼虫细胞进行体外培养并观察其传代细胞的超微结构特征,对进一步研究旋毛虫病疫苗、免疫诊断抗原及药物筛选等均具有重要意义。猪囊尾蚴免疫细胞系的建立及血吸虫细胞培养的成功,为旋毛虫细胞培养提供了可借鉴的方法<sup>[9,10]</sup>。张中庸等<sup>[11]</sup>应用含0.5%胎牛血清的RPM-1640培养液对日本血吸虫尾蚴细胞进行了初期培养。本研究应用含0.5%胎牛血清的RPM-1640培养液对旋毛虫肌幼虫细胞进行早期培养以利于细胞贴壁,随后更换为含10%胎牛血清的培养液,结果发现旋毛虫细胞可长时间存活,但尚不能大量增殖。培养45 d后培养瓶中出现亚铃状细胞,可能是处于分裂状态的细胞。笔者曾在培养基中加入β-巯基乙醇,亚铃状细胞明显增多(结果中未显示),提示β-巯基乙醇对旋毛虫培养细胞可能具有促分裂作用。其他具刺激分裂作用的物质(如PHA)能否促进旋毛虫培养细胞的分裂和繁殖有待进一步研究。

在透射电镜下,旋毛虫肌幼虫培养细胞具

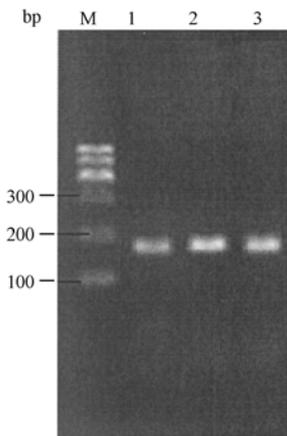


图3 旋毛虫第4代传代细胞的多重PCR鉴定 (2%琼脂糖凝胶电泳)

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of multiplex PCR products of the fourth passage cells of *T. spiridis*

M.100 bp DNA 分子量标记; 1. 旋毛虫第4代传代细胞; 2 3. 旋毛虫肌幼虫。  
M.100 bp DNA marker ; 1. The fourth passage cells of *T. spiridis* ; 2 3. *T. spiridis* muscle larvae

有普通真核细胞的形态结构,且线粒体比一般真核细胞丰富。线粒体作为一种相对独立的细胞器,一般在经过5~10 d 的功能活动以后会自然地衰竭,故正常细胞内经常有老的线粒体不断衰亡,又有新的线粒体不断生成来加以补充<sup>[12]</sup>。本研究中培养12 d 的旋毛虫细胞中虽然出现有不同程度溶解的线粒体,但正常的线粒体仍占多数,表明此时的培养细胞在培养基中生命活动处于正常状态。由于旋毛虫细胞培养的研究刚刚起步,故本研究中所观察到的2种类型细胞来源于虫体的何种细胞目前尚不清楚。透射电镜下对旋毛虫培养细胞进行分型,对今后进一步确认培养细胞的来源有一定参考价值。多重PCR 的优点是可节省模板DNA、操作简单、节省时间和费用,已被广泛用于旋毛虫的虫种鉴定和分子流行病学调查<sup>[13]</sup>。本文提取旋毛虫肌幼虫第4 代传代细胞和旋毛虫肌幼虫DNA 后的扩增产物在约173 bp 处出现相同的条带,在分子水平证实了培养细胞是来自旋毛虫肌幼虫。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Cui J, Wang Z Q, Kennedy M W. The re-emergence of trichinellosis in China? *Trends in Parasitology*, 2006 **22**(2): 54 ~ 55.
- [ 2 ] 崔晶,王中全,李雍龙. 旋毛虫病疫苗. 国外医学寄生虫病分册 2004 **31**(5) 216 ~ 222.
- [ 3 ] Wang Z Q, Cui J, Wei H Y, *et al*. Vaccination of mice with DNA vaccine induces the immune response and partial protection against *T. spiralis* infection. *Vaccine* 2006 **24**(8): 1 205 ~ 1 212.
- [ 4 ] Hobbs D J, Fryer S E, Di mstra J R, *et al*. Culture of cells from juvenile worms of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology*, 1993 **79**(6) 913 ~ 921.
- [ 5 ] 陆家海,郭中敏,余新炳等. 细粒棘球蚴细胞系培育及其免疫研究. 中山医科大学学报 2001 **22**(2) 81 ~ 84.
- [ 6 ] 王中全,崔晶,晋雪香. 旋毛虫幼虫收集方法的探讨. 河南医学研究, 1993 **2**(1) 65 ~ 66.
- [ 7 ] Zarlenga D S, Chute M B, Martin A. A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. *International Journal for Parasitology*, 1999 **29**(11) :1 859 ~ 1 867.
- [ 8 ] Kapel C M. Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. *Veterinary Parasitology* 2000 **93**(3-4) 263 ~ 278.
- [ 9 ] 李靓如,张中庸,张京等. 猪囊尾蚴cc-97 免疫细胞系的建立及生物学性质研究. 中国农业大学学报, 1998 **3**(增刊) :140 ~ 141.
- [ 10 ] 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. 中国血吸虫防治杂志, 1995 **7**(5) :257 ~ 261.
- [ 11 ] 张中庸,曾宪芳,李靓如等. 日本血吸虫尾蚴细胞传代培养及抗原性检测. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002 **20**(6) 332 ~ 334.
- [ 12 ] 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. 动物学报, 1999 **45**(1) :1 ~ 7.
- [ 13 ] Pozio E, Murrell K D. Systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Advance in Parasitology* 2006 **63** 367 ~ 439.