

文章编号:1002-2694(2012)03-0209-04

高纯度日本血吸虫卵的分离及活性鉴定*

钟政荣¹,徐云侠²,宫继勇¹,罗庆礼³,闻慧琴³,宋晓蓉³,沈继龙³

摘要:目的 探讨制备高纯度、高生物活性的日本血吸虫卵分离方法。**方法** 将匀浆后的血吸虫感染的兔肝组织悬液分级过滤,再将滤液离心,去除组织碎片,分离的虫卵再次经过325目分样筛过滤,收集筛上虫卵,最后将收集的虫卵用密度1.070的Percoll分离液梯度离心,吸取下层Percoll液中的纯化虫卵;显微镜观察分离虫卵的纯度,吖啶橙染色观察虫卵的死活,环卵沉淀试验鉴定虫卵的分泌活性。**结果** 每个肝脏获得约1g左右的虫卵,分离的虫卵纯度高,吖啶橙染色和环卵沉淀试验结果显示,分离的活虫卵比例高、生物活性好。**结论** 该虫卵分离方法操作简单、用时短、效果好,分离的虫卵完全满足各种研究的需要。

关键词:日本血吸虫;虫卵;分离;纯化;活性**中图分类号:**R383.2 **文献标识码:**A

Isolation and identification of viability of *Schistosoma japonicum* eggs with high purity

ZHONG Zheng-rong, XU Yun-xia, GONG Ji-yong, LUO Qing-li, WEN Hui-qin, SONG Xiao-rong, SHEN Ji-long

(Laboratory of Clinical Medicine, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China)

ABSTRACT: To modify the isolation methods of *Schistosoma japonicum* eggs with high purity and high biological activity, the liver tissues from rabbits 6 weeks post-infection were homogenized before the resulting suspensions were consecutively fractional filtration. The filtrate was centrifuged, the supernatant fluid and tissue-containing layer thus produced were removed and the lower, egg-containing layer was diluted in a small amount of 1.2% saline and passed through a 325-mesh nylon net. The crude eggs preparation collected from above the net were layered over a dilution of Percoll with a density of 1.070 and centrifuged at 3 000 r/min for 20 min, and then the purified eggs in lower layer were collected. Furthermore, the purity of the separated eggs was detected under light microscope, the viability was identified by staining with acridine orange dye and circumoval precipitation test. The experiments had showed that about 1 gram eggs were recovered from a schistosoma-infected rabbit liver, the purity of the egg population was substantially improved, and the rate of live and viable eggs was much greater than more conventional filtration-centrifugation techniques. Therefore, the technique presented offers a simple and rapid method of obtaining highly purified preparations of *Schistosoma japonicum* eggs. The isolated eggs maintain their morphological, functional, and antigenic integrity. This method holds promise of being suitable for adaptation and expansion to a variety of experimental purposes.

KEY WORDS: *Schistosoma japonicum*; eggs; isolation; purification; viability

血吸虫病是以Th2优势应答为主的肝肉芽肿和纤维化为主要病理特征的免疫性疾病^[1],但是血吸虫病的致病机制仍然不清,对血吸虫病的致病机

制研究现已成为血吸虫病的研究热点^[2-3]。此外,大量的研究显示,目前血吸虫病作为一种Th2免疫应答模型,应用于Th1型免疫应答为主的自身免疫病的干预以及免疫细胞的发育和功能研究^[4-6]。因此,血吸虫卵作为一种研究材料被广泛应用于上述研究^[4,7],而血吸虫卵的产量、纯度和活性对这些研究的结果至关重要。目前血吸虫卵的分离方法众多,但是这些方法操作繁琐,血吸虫卵回收率低,最重要的是血吸虫卵的纯度不高、成熟虫卵比例和分泌活性较低。为此,本研究在以前研究基础上,对血吸虫

* 国家自然科学基金(No. 81071376);安徽省教育厅自然科学基金重点项目(No. KJ2011A205);安徽省自然科学基金(No. 090413089)

通讯作者:钟政荣,Email:zrzhong@126.com

作者单位:1. 安徽省蚌埠医学院第一附属医院检验科,蚌埠233004;
2. 安徽省蚌埠医学院第一附属医院神经内科,蚌埠233004;
3. 安徽医科大学病原生物学教研室,安徽省病原生物学省级实验室,安徽省人兽共患病重点实验室,合肥230032

卵的分离方法做了一些简化和改进,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 普通光学显微镜和倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)、组织捣碎机(上海标本模型厂)、各种孔径的样品筛(河南安平筛网厂),Percoll 细胞分离液(美国 Pharmacia 公司)、吖啶橙(美国 Amersco 公司)、NaCl(国产分析纯),新西兰大白兔购自安徽医科大学实验动物中心,尾蚴感染钉螺购于江苏省血吸虫病防治研究所。

1.2 方法

1.2.1 血吸虫感染动物模型 将日本血吸虫尾蚴感染的阳性钉螺置于去氯水中,25 ℃、光照下 2 h,逸出尾蚴。用接种环从水面挑取尾蚴,移至盖玻片上,在解剖镜下计数,固定新西兰大白兔,剃除腹部体毛,以去氯水湿润皮肤,将附有尾蚴的盖玻片覆于其上,保留 20 min。每兔感染日本血吸虫尾蚴 1 000 条左右,清洁级饲养。

1.2.2 血吸虫卵的分离 在尾蚴感染后 6~7 w,麻醉状态下剖杀新西兰大白兔,取出肝脏,去除肝内大血管、胆管及结缔组织,将肝脏剪成碎块,于组织捣碎机中,加入 1.2% NaCl 高渗盐水至 1/2 处,先低速匀浆 1 min,再高速匀浆 2 次,每次 30~60 s,每次间隔 3~5 min,以免温度过高。将匀浆液分别依次经过 80、120、200 目样品筛,过筛同时用 1.2% 高渗盐水冲洗筛网;收集的滤液自然沉降 30~60 min,弃上清,再加入一定量的高渗盐水稀释重悬,自然沉淀后弃上清;最后将沉淀物置硬质玻璃离心管中 2 000 r/min 离心,去除上层液体和组织碎片,保留底层金黄色虫卵,用 1.2% 高渗盐水重悬并合并各离心管中的虫卵层,重复离心再次去除上层残渣,最后将初步分离的虫卵经过 325 目样品筛进一步去除细小组织残渣,收集筛上虫卵。

1.2.3 血吸虫卵的纯化 按照 Percoll 试剂说明书配制密度 1.070 的 Percoll 分离液,加入玻璃试管中底部,将上述收集的血吸虫卵用生理盐水(0.9% NaCl)重悬,覆于 Percoll 液上层,3 000 r/min,离心 20 min 后,小心吸取试管最底层虫卵悬液,再用 1.2% NaCl 洗涤 3 次备用。

1.2.4 叩啶橙染色 蘸取少许上述纯化的虫卵,加入 0.5~1.0 mL 0.01% 叩啶橙溶液中摇匀,置 37℃ 温箱内染色 2 h,用 pH7.4 PBS 洗涤两次后置载玻片上,覆以盖玻片,在荧光显微镜下观察。

1.2.5 环卵沉淀试验 在载玻片上滴加血吸虫感染的兔血清两滴,用牙签挑取虫卵 100~150 个于血清滴中,混匀后用 24×24 mm 盖片覆盖,石蜡密封四周,置湿盒中 37℃ 孵育 48 h,显微镜下观察结果。

2 结果

2.1 分离和纯化的日本血吸虫卵 图 1 显示,两只血吸虫感染的兔肝经分离后获得了高达近 2 g 金黄色的血吸虫卵(图 1A)。经过连续的样品筛过滤和离心分离后的血吸虫卵粗制品中,仍然含有大量的组织碎片和其它杂质(图 1B),而再次经过 Percoll 液密度梯度离心纯化后的血吸虫卵纯度极高,除了少许剪碎的虫卵壳碎片外,几乎没有组织碎片等杂质(图 1C)。而且试验证明,利用密度为 1.070 的 Percoll 液,经过梯度离心后,收集的虫卵损失最小,纯度最好。

2.2 血吸虫卵核酸活性鉴定 叩啶橙染色结果证实(图 2),所有的血吸虫卵都被染成绿色和红色荧光,也就是说所有虫卵都含有丰富的、有活性的 DNA 和 RNA,表明虫卵内的核酸没有被降解,否则虫卵不被叩啶橙着色。



图 1 分离和纯化的日本血吸虫卵

Fig. 1 Isolation and purification of *Schistosoma japonicum* eggs

A: *Schistosoma japonicum* eggs after isolation and purification. B: *Schistosoma japonicum* eggs passed through nylon ... under light microscope (100×). And the arrows indicate the cell debris and the impurity. C: *Schistosoma japonicum* eggs after purified with Percoll under light microscope (100×)

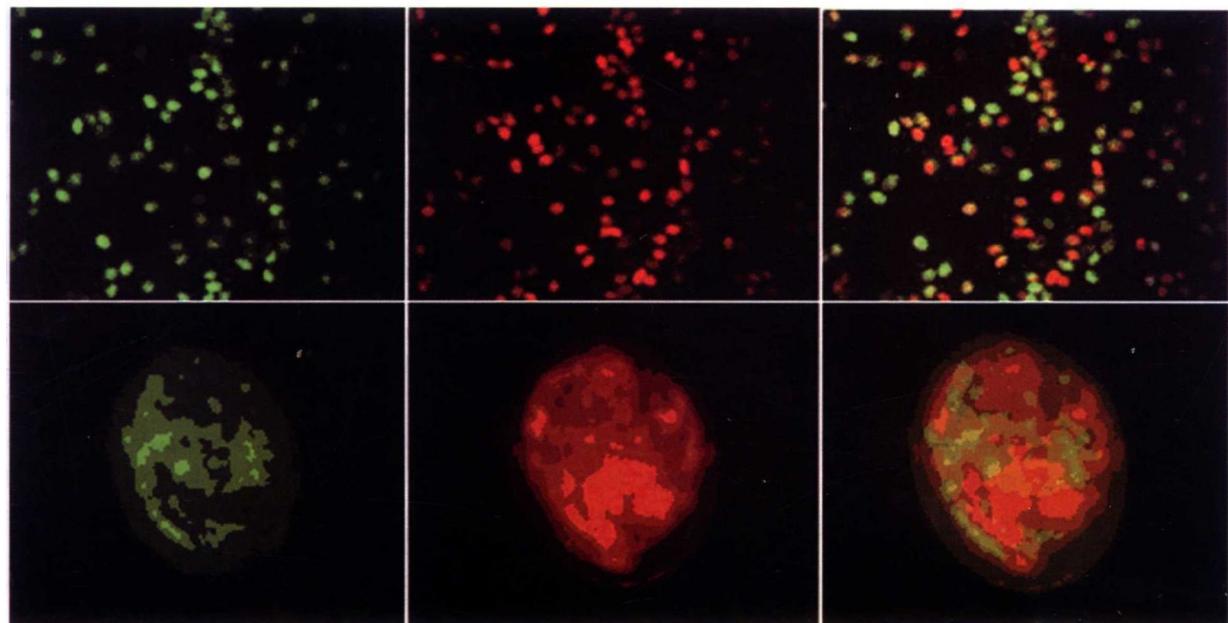


图 2 吡啶橙染色鉴定血吸虫卵核酸活性

Fig. 2 Identification of nucleic acid viability of *Schistosoma japonicum* eggs with acridine orange staining

Upper row: *Schistosoma japonicum* eggs were almost stained by acridine orange dye, 100×. Lower row: Miracidium in eggs was stained by acridine orange dye, 640×. Left: Green DNA in *Schistosoma japonicum* eggs. Mid: Red RNA in *Schistosoma japonicum* eggs. Right: Merged image of the left and the middle

2.3 血吸虫卵的分泌活性鉴定 环卵沉淀试验(COPT)结果表明(图3),在血吸虫卵周围,均出现大小不等、形态各异的免疫复合物沉淀。



图 3 环卵沉淀试验检测血吸虫卵分泌或排泄活性

Fig. 3 Circumoval precipitation test for secretion and excretion ability of *Schistosoma japonicum* eggs (all of eggs were surrounded by immunocomplex, 400×)

3 讨 论

血吸虫成虫寄生于宿主门静脉及肠系膜静脉内,其能在血管内生活数年至数十年,每条雌虫每天产卵因虫种而异,从几百(如曼氏血吸虫)到几千(如日本血吸虫),每对血吸虫通过一个生活周期,能够产生高达6 000亿个童虫^[8],血吸虫卵有的穿过肠壁随粪便排出体外,有的随血流进入肝脏形成肝肉芽肿。肝脏肉芽肿是血吸虫病最严重的病理损害,然而由虫卵沉积引起肝脏肉芽肿的免疫病理机制仍

有待阐明,因此阐明血吸虫卵的致病机制、解析虫卵中何种抗原在宿主与血吸虫相互联系中起着关键的作用是目前研究热点,而制备高纯度、高生物活性的血吸虫卵是这些研究获得可靠的实验结果的重要前提和保证。

目前血吸虫卵分离方法各异,最常用的方法是肝组织匀浆过筛后再离心去除肝组织碎片,这种方法操作相对简单,但制备的虫卵杂质较多,纯度较差,一般适用于教学和要求不高的试验;有学者经过反复过筛来提高纯度^[9-10],但笔者经过多次的实验证实,反复过筛并不能够明显改善虫卵的纯度,而且虫卵损失较多,操作也相对繁琐;此外,有不少文献报道,分离虫卵时使用胰蛋白酶或胶原酶来消化肝组织碎片^[11],分离的虫卵纯度确实有了改进,但是消化时间必须严格控制,时间过长严重损伤虫卵以及虫卵的活性。Stephanie L 使用不同稀释度的泛影钠沉淀分离成熟血吸虫卵^[12],分离的虫卵的纯度和活性得到了较大的改善,但是该方法操作繁琐,耗时长。

Percoll是一种包有乙烯吡咯烷酮的硅胶颗粒,渗透压低,粘度小;由于Percoll扩散常数低,所形成的梯度十分稳定。此外,Percoll不穿透生物膜,对细胞无毒害,广泛用于分离细胞、亚细胞成分、细菌及病毒等,还可将受损细胞及其碎片与完好的活细胞分离,因此笔者选用Percoll分离液对初筛的血吸

虫卵进一步进行了纯化。本研究在上述方法的基础上做了一定程度的改进,本方法不仅操作简单(只需一次过筛),虫卵损失少,收获率高,而且梯度离心时也仅需配制一种密度的Percoll分离液,多次重复试验证明,Percoll分离液密度为1.070时,分离的虫卵纯度最好,回收率最高(数据没有显示)。此外,在离心去除肝组织碎片操作过程中,如何最大程度的去除组织杂质,这对后续分离制备高纯度的虫卵也至关重要。首先,离心时应使用硬质玻璃离心管,玻璃管透明度高,能很好的分清灰色的组织碎片层和金黄色虫卵层,而塑料管能够吸收光线,几乎分不清组织碎片和虫卵层,难以分离;其次,在去除组织碎片前,离心后不要弃尽上清,留下少量、便于吸管搅起组织碎片成悬液,利于吸除;最后,离心速度不宜过高,大约2000 r/min,过高使沉淀结实,不利于分离组织碎片与虫卵层。

本研究结果显示,笔者利用Percoll分离液获得了高纯度的日本血吸虫卵,为了进一步鉴定获得的虫卵是否具有活性,首先我们用核酸染料吖啶橙对虫卵进行了染色,结果显示,几乎所有的虫卵都被吖啶橙着色,表明分离的虫卵核酸活性良好,均为活虫卵;但是活虫卵不一定具有分泌活性,进一步,笔者的COPT结果表明,分离的虫卵分泌活性较强。以上结果证明,本方法分离的虫卵纯度高、生物活性好。

总之,该方法用时短,操作简便,分离的虫卵纯度高,且具有很好的分泌活性,为虫卵的抗原制备、蛋白质组学和分泌组学研究提供重要的质量保证,同时为血吸虫病的致病机制探讨和药物疫苗的开发奠定重要的物质基础。

参考文献:

- [1] Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, et al. Immunopathology of schistosomiasis[J]. *Immunol Cell Biol*, 2007, 85(2): 148-154.
- [2] van der Werf N, Redpath SA, Phythian-Adams AT, et al. Th2 responses to helminth parasites can be therapeutically enhanced by, but are not dependent upon, GITR-GITR ligand costimulation in vivo[J]. *J Immunol*, 2011.
- [3] Ferret-Bernard S, Curwen RS, Mountford AP. Proteomic profiling reveals that Th2-inducing dendritic cells stimulated with helminth antigens have a 'limited maturation' phenotype[J]. *Proteomics*, 2008, 8(5): 980-993.
- [4] Hulstijn M, Barros LD, Neves RH, et al. Parasitological and morphological study of *Schistosoma mansoni* and diabetes mellitus in mice[J]. *Exp Parasitol*, 2011.
- [5] Sun X, Liu YH, Lv ZY, et al. rSj16, a recombinant protein of *Schistosoma japonicum*-derived molecule, reduces severity of the complete Freund's adjuvant-induced adjuvant arthritis in rats model[J]. *Parasite Immunol*, 2010, 32(11-12): 739-748.
- [6] Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, et al. *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators[J]. *Int J Parasitol*, 2009, 39(4): 457-464.
- [7] Hathaway JJ, Adema CM, Stout BA, et al. Identification of protein components of egg masses indicates parental investment in immunoprotection of offspring by *Biomphalaria glabrata* (gastropoda, mollusca)[J]. *Dev Comp Immunol*, 2010, 34(4): 425-435.
- [8] Gryseels B, Polman K, Clerinx J, et al. Human schistosomiasis [J]. *Lancet*, 2006, 368(9541): 1106-1118.
- [9] 帅连云, 曹建平, 仇锦波. 日本血吸虫纯净活虫卵的制备[J]. 镇江医学院学报, 1998, 8(4): 574-575.
- [10] 刘兰英, 余新炳, 罗树红. 快速分离和纯化感染6wk兔肝组织中的日本血吸虫虫卵[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1997, 9(2): 97-98.
- [11] Mathieson W, Wilson RA. A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions[J]. *Int J Parasitol*, 2010, 40(5): 617-628.
- [12] James SL, Colley DG. A method for the isolation of *Schistosoma mansoni* eggs[J]. *J Parasitol*, 1974, 60(6): 1043-1044.

收稿日期:2011-07-18;修回日期:2011-10-05