

痛,大便稀;3例表现为腹膜炎,腹水征阳性,腹水检查:外观淡黄色,蛋白定量 0.5~2.5g/L,有核细胞数  $(0.2\sim 2.57) \times 10^9/L$ ,嗜酸粒细胞 29%~32%。粪便或/和腹水检查均未见并殖吸虫卵。其中 6 例误诊为病毒性肝炎、5 例误诊为肝硬化、1 例曾误诊为肠结核、2 例误诊为结核性腹膜炎。

1.3.3 脑脊髓型 21 例中 13 例表现为蛛网膜下腔出血,8 例表现为脑膜脑炎。蛛网膜下腔出血者均有头痛、呕吐、颈抵抗、布氏征阳性、克氏征阳性,发热 11 例,嗜睡 3 例,浅昏迷 2 例;脑脊液外观呈血性,镜检可见皱缩红细胞,嗜酸粒细胞为 32%~92%;脑电图轻度异常,CT 检查 10 例有蛛网膜下腔出血典型表现。以脑膜脑炎表现的患儿有头痛、呕吐、抽搐、意识障碍、巴氏征阳性及布氏征阳性、克氏征阳性;脑电图轻、中度异常,CT 检查 2 例未见有异常改变,脑脊液外观淡黄色,嗜酸粒细胞为 10%~45%,蛋白定量为 0.4~0.6 g/L,糖、氯化物正常;1 例血糖增高 (28.6 mmol/L) 同时尿糖阳性。21 例痰、粪便和脑脊液检查均未见并殖吸虫卵。入院时 9 例误诊为原发性蛛网膜下腔出血,3 例误诊为病毒性脑炎,2 例分别误诊为化脓性脑膜炎和糖尿病酮症酸中毒昏迷。

1.3.4 皮下结节型 22 例表现为皮下结节型。其中 11 例除有皮下结节外无其它表现。结节大多为游走性的,以躯干部为多,2 例在下颌缘皮下触及约  $(0.3 \times 1.0) \text{ cm} \sim (3.2 \times 4.0) \text{ cm}$  的肿块,呈椭圆形,质硬,无粘连。外周血白细胞总数  $(10\sim 15.6) \times 10^9/L$ ,嗜酸粒细胞 12%~45%,痰和粪检均未见并殖吸虫卵。其中对 2 例的皮下结节进行病理检查:呈嗜酸性肉芽肿或嗜酸性脓肿,并有夏科-雷登氏结晶,1 例结节中可见并殖吸虫虫体。2 例均被误诊为嗜酸粒细胞增多症。

## 2 治疗

106 例患儿使用硫氯酚或吡喹酮抗并殖吸虫并辅助予卧床休息和对症、支持治疗,对有胸腔、腹腔和心包腔积液患儿同时加强的松 [1 mg/(kg·d), 2 周后逐渐减量,至 4 周停用],以减少渗出和减轻粘连。结果:治愈 96 例,好转 7 例,无效 3 例,总有效率为 97.1%。其中 56 例用硫氯酚治疗,50 mg/(kg·d),分 3 次服,15 d 为 1 疗程,每疗程间隔 5~7 天,共 2 个疗程,治愈 49 例,好转 4 例,无效 3 例;50 例用吡喹酮治疗,总剂量 180~200 mg/kg,分 3 天服,每疗程间隔 7 天,共 2 个疗程,治愈 47 例,好转 3 例 (3 例好转出院者,院外

继续用药 1 疗程,1 个月后复查无异常),1 例蛛网膜下腔出血者留有智能低下后遗症。

## 3 讨论

由于临床医务人员对并殖吸虫幼虫移行症缺乏认识,对患者流行病学史了解不详细,体格检查不全面以致造成误诊。对以心脏、胸膜、肝和脑脊髓等损害为主要表现者,而痰、粪便及各种体液检查又未见并殖吸虫卵的患儿误诊率更高,本组误诊率达 46.2%。本病主要须与各类结核病如结核性胸膜炎、结核性心包炎、结核性腹膜炎和肠结核及化脓性心包炎、肝硬化、原发性蛛网膜下腔出血、病毒性脑炎和化脓性脑膜炎等鉴别诊断。总结对该病的诊治体会,凡是来自并殖吸虫流行区的患儿,有食生或半生溪蟹史,若出现下列表现之一者应考虑患本病的可能:①游走性皮下结节;②不明原因慢性咳嗽、消瘦、乏力、腹痛等,而外周血白细胞总数、嗜酸粒细胞明显增高,血沉增快;③胸腔、心包腔或腹腔积液检查嗜酸粒细胞增高而细菌培养和抗酸染色找抗酸杆菌阴性;④肝脏损害,以  $\gamma$ -球蛋白升高为主,但无法用其他慢性肝病解释;⑤有脑脊髓损害症状,脑脊液内嗜酸粒细胞明显增高者,痰、粪和各种体液检查并殖吸虫卵阴性者,也不能排除本病。需作进一步检查:①并殖吸虫皮试或酶联免疫吸附试验,②有皮下结节者活检做病理学检查。

本病使用硫氯酚或吡喹酮治疗效果良好,后者优于前者,且副作用小<sup>[4]</sup>。对胸腔、腹腔和心包腔积液的患儿在应用抗并殖吸虫药物治疗的同时加用强的松,以减少渗出和减轻粘连。对于表现为蛛网膜下腔出血者,绝对卧床休息不少于 5~6 周,过早活动有再次出血的危险,应特别注意。

## 参考文献

- [1] 胡亚美,江载芳,主编. 诸福棠实用儿科学[M]. 第 7 版. 北京:人民卫生出版社,2002. 1112-1115.
- [2] 邵向云. 肝型并殖吸虫病的临床特点及误诊分析[J]. 中国人兽共患病杂志,2002,19(5):133.
- [3] 王建湘. 小儿肺吸虫性胸腔积液 41 例[J]. 中国人兽共患病杂志,2003,19(2):118.
- [4] 姚国忠,曾力强. 并殖吸虫病 6 例报告[J]. 中国寄生虫与寄生虫病杂志,2002,20:228.

(收稿日期:2004-12-17 编辑:盛慧锋)

文章编号:1000-7423(2005)-03-0185-02

【简报】

# 旋毛虫培养液对人白血病细胞 K562 凋亡和坏死的影响

李继红<sup>1</sup>, 崔茜<sup>2</sup>, 李小丹<sup>3</sup>, 伍杨<sup>1</sup>, 林平<sup>1</sup>, 刘锦红<sup>1</sup>, 熊茂来<sup>1</sup>

中图分类号:R383.15

文献标识码:B

在对旋毛虫的研究过程中,有研究者曾对旋毛虫与肿瘤的关系进行了探讨。发现感染旋毛虫的小鼠再接种某些肿瘤细胞

后,肿瘤细胞生长缓慢,甚至完全不生长,提示旋毛虫感染可以提高小鼠对肿瘤的防御机能。为了解旋毛虫致死肿瘤细胞的相关机制,本实验观察旋毛虫培养液对 K562 细胞凋亡和坏死的影响,现将结果报告如下。

作者单位:1 湖北民族学院医学院寄生虫学教研室,恩施 445000;

2 湖北民族学院附属医院妇产科,恩施 445000;

3 湖北恩施州中心医院传染科,恩施 445000

### 1 材料与方法

1.1 实验动物 感染旋毛虫的 Wistar 大鼠和昆明小鼠为本院寄生虫室保种。

1.2 主要设备及试剂 流式细胞仪 (FACS Calibur) 为美国 Becton Dickinson 公司产品, PI 为美国 Sigma 公司产品, 磷酸酰丝氨酸结合蛋白(Annexin V)为德国 Boehringer-Mannheim 公司产品, 人白血病 K562 细胞引自上海第二医科大学, 本院免疫室冻存, RPMI1640 完全培养液为美国 Gibco 公司产品, 细胞培养耗材购自武汉亚法生物技术有限公司。

1.3 旋毛虫排泄分泌物制备 将感染旋毛虫的大鼠处死后, 取全身肌肉剪碎, 每克肌肉中加入 60 ml 人工胃液消化, 置 38℃温箱中消化 12~14 h, 去上清, 沉淀过滤, 用水洗涤 3 次, 从沉淀中分离幼虫并计数。取昆明小鼠 10 只称重, 按 10 条/g 给小鼠口饲, 感染后 5 周处死, 取全身肌肉按上法收集旋毛虫幼虫。将所收集的幼虫用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次, 在无菌状态下将约 50 条幼虫加入 25 ml 培养瓶中, 加入 5 ml 培养液 (含 20%小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 待用时加入青霉素 800 U/ml、链霉素 1 000 U/ml), 置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养, 每 3 d 换液 1 次, 将换出的液体倒入离心管中, 2 000×g 离心 3 min, 弃上清液, 加 1 ml 新鲜培养液于离心管中备用。

1.4 K562 细胞培养 按文献[1]复苏 K562 细胞, 复苏后分别移入 20 瓶 5 ml 的螺口细胞培养瓶中, 将其分为 A、B 两组(各 10 瓶), 以 2×10<sup>5</sup>/ml 接种于含 10%新生小牛血清的 RPMI 1640 培养基(含青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 U/ml)中, 置 37℃、5%

CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养, 每 3 d 换液 1 次, 换液时 A 组只加新鲜培养液(作为正常对照), B 组加入上述制备的旋毛虫培养液 1 ml 并用新鲜培养液补足。同时取适量含细胞的培养液经萘酚蓝染色计数活细胞。

1.5 细胞凋亡和死亡检测 A、B 两组 K562 细胞经培养后, 分别在 6、9、12 和 15 d 取样检测, 参照文献[2]用膜联蛋白(AV)法测定, 分别取 A、B 两组 K562 细胞 10<sup>6</sup> 个用 PBS 洗涤, 3 600 ×g 离心 5 min, 去上清, 测定 DNA 含量 [2]。再分别取 A、B 两组 K562 细胞 10<sup>6</sup> 个加入 1 ml PI 染液, 置冰箱 30 min 后用流式细胞技术(FCM)检测, 对染色标本进行定量分析, 每次获取 30 000 个细胞, 保存数据后用 Cell Quest 软件进行处理。

1.6 结果判定及计算 AV 和 PI 染色均为阴性的为正常活细胞, AV 阳性而 PI 阴性的为凋亡细胞, AV 和 PI 染色均为阳性的为坏死细胞。细胞凋亡率 (或坏死率)=(凋亡 (或坏死细胞数) / 细胞总数)×100%。

### 2 结果

B 组从第 9 天起细胞凋亡率和坏死率开始上升, A、B 两组比较细胞凋亡率和坏死率差异均有统计学意义 (P<0.05), 12 d 后差异有显著的统计学意义 (P<0.01), 差异程度与培养时间呈正相关 (9d:12d, P<0.05, 9d:15d, P<0.01)。表明旋毛虫培养液中含有诱导 K562 细胞凋亡和坏死的有效物质。培养时间越长诱导凋亡和坏死作用越强(表 1)。

表 1 两组 K562 细胞凋亡及坏死率

组别	6 d		9 d		12 d		15 d	
	凋亡率(%)	坏死率(%)	凋亡率(%)	坏死率(%)	凋亡率(%)	坏死率(%)	凋亡率(%)	坏死率(%)
A	3.24±0.18	0.69±0.05	3.73±0.13	0.76±0.06	3.82±0.13	0.82±0.03	4.12±0.82	1.02±0.071
B	3.32±0.26	0.72±0.06	4.57±1.04	0.81±0.08	6.67±1.27	0.93±0.09	2.43±0.55	2.14±0.08
P*	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

\* B 组与 A 组相比

### 3 讨论

宿主在肿瘤的发生、发展过程中, 具有自身重要的防御体系, 巨噬细胞 (Mφ) 是防御机制的关键所在, 体内 Mφ 激活后具有杀伤肿瘤细胞的功能, 其效应方式是通过直接对肿瘤细胞杀伤和产生溶解肿瘤细胞的效应分子而实现的 [3]。Meerovitch 等 [4] 在研究中发现, 在旋毛虫感染过程中, 小鼠体内的 Mφ 被激活, 活化的 Mφ 可能是感染旋毛虫小鼠对肿瘤细胞产生免疫的效应细胞。推测旋毛虫感染时虫体自身和表面抗原以及虫体代谢产物、排泄分泌物和杆细胞分泌颗粒抗原均可激活活主体内的抗原提呈细胞——Mφ, 诱导宿主产生免疫应答。李文桂等 [5] 对旋毛虫病患者血清中细胞因子和 NO 水平进行了检测, 发现旋毛虫病患者血清中肿瘤坏死因子 (TNF-α)、白细胞介素-1β (IL-1β) 和 NO 有所升高或显著升高, 这些细胞因子可能与感染旋毛虫后抗肿瘤能力提高有一定的关系。为了排除上述因素的影响, 探明旋毛虫分泌物、代谢物对肿瘤细胞的作用, 作者等将 K562 细胞加入旋毛虫培养液中培养, 结果发现 K562 细胞的凋

亡率和坏死率较对照组明显高, 且与培养时间呈正相关。表明旋毛虫培养液中含有某种活性成分, 可直接诱导 K562 细胞的凋亡和坏死, 推测感染旋毛虫后, 可提高机体对肿瘤的防御机制。有关感染旋毛虫后抑制肿瘤细胞生长的有效成分及诱导凋亡和坏死的机制有待于进一步深入研究。

### 参 考 文 献

[1] 薛善庆, 主编. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 134-135.

[2] 胡庆柳, 朴英杰, 周美娟. 一种检测早期凋亡细胞的方法 [J]. 细胞生物学杂志, 2000, 22: 155-157.

[3] Liu CY, Wang CH, Lin TC. Increased level of exhaled nitric oxide and up-regulation of inducible nitric oxide synthesis in patients with primary lung cancer [J]. Br J Cancer, 1998, 78: 534-541.

[4] Meerovitch E, Bomford R. Macrophage potentiation by *Trichinella spiralis* [J]. Ann Trop Med Parasitol, 1977, 71: 245-246.

[5] 李文桂, 陈雅棠, 蒋霞, 等. 旋毛虫病患者血清细胞因子和一氧化氮水平检测 [J]. 中国地方病杂志, 2002, 21: 220-221.

(收稿日期: 2004-10-08 编辑: 盛慧锋)