文章编号:1000-7423(2002)-03-0155-03

【论著】

卫氏并殖吸虫染色体制备方法的改进

陈韶红 常正山 陈名刚 张永年 冯正

【摘要】 **目的** 改进卫氏并殖吸虫染色体的制备方法,以利于并殖吸虫染色体核型的分析。 **方法** 将浙江永嘉地区卫氏并殖吸虫成虫通过秋水仙胺作用后分离睾丸,所用试剂均进行预温,通过低渗、固定、制片和染色等处理。 **结果** 浙江永嘉地区卫氏并殖吸虫染色体采用改进后的制备方法,效果好。该虫染色体数 2n = 22,核型公式:2m + 6sm + 14t。 **结论** 改进后的染色体制备方法操作简便,染色体清晰,可读性好,便于进行核型分析。

【关键词】 卫氏并殖吸虫;染色体;核型

中图分类号:R383.232 文献标识码:A

Improvement in the Preparation of *Paragonimus westermani* Chromosome for Karyotype Analysis

CHEN Shao-hong, CHANG Zheng-shan, CHEN Ming-gang, ZHANG Yong-nian, FENG Zheng

(*Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention* *, *Shanghai* 200025)

【Abstract】 **Objective** To improve *Paragonimus westermani* chromosome preparation technique. **Methods** After being exposed to colchicine, the gonadal cells of *P. westermani* were treated by the following procedures: hypotonicity, fixation, dropping onto a slide and staining. **Results** The chromosome number of *P. westermani* is 22, and the karyotype is 2m + 6Sm + 14t chromosome. **Conclusion** The improved technique of chromosome preparation is feasible to operate and the chromosome is clear enough for karyotype analysis.

【Key words】 *Paragonimus westermani*, chromosome, karyotype

Supported by the NIH/TMRC grant (No.1 P50 A139461), USA

* WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health

在我国卫氏并殖吸虫流行区,卫氏并殖吸虫染色体存在二倍体、三倍体和嵌合体几种类型[1,2],临床上一些患者表现为咯痰血和无痰血的症状,国内外学者认为此症状与染色体的核型有关[3]。为了进一步研究卫氏并殖吸虫染色体类型,制备染色体的方法非常关键。我们在参考人体染色体制备的基础上,对以往制备染色体方法作进一步的改进,获得分散较好的卫氏并殖吸虫染色体的核型片,为确定卫氏并殖吸虫虫体核型与流行区患者临床类型的相关性的研究提供重要依据。

材料与方法

1 材料

1.1 卫氏并殖吸虫成虫睾丸 分别从浙江永嘉地区的四都、张溪、大若岩乡采集溪蟹,分离出囊蚴,感染实验狗饲养后,剖杀取出肺囊包中的成虫,经鉴定为卫氏并殖吸虫,用解剖针在解剖镜下分离成虫睾丸。

1.2 试剂 选用秋水仙胺(Fluka 产品)作为睾丸细胞分裂的纺锤体抑制剂,氯化钾溶液为低渗液,3:1 甲醇-冰乙酸混合作为固定液,吉氏液染色,氢氧化钡溶液,2×SSC 溶液用于制备 C 带,0.25% 胰酶溶液制备 G 带。

2 染色体标本的制备

从浙江永嘉 3 地区实验感染狗中,各取 50 条大于 160 日虫龄的新鲜卫氏并殖吸虫成虫,用无菌生理盐水洗涤,分两部分试验,取 25 条成虫直接置于0.01% 秋水仙胺溶液中 37 ℃处理 2 h,取出虫体睾丸。另外 25 条成虫,先取出虫体睾丸,放入 0.01% 秋水仙胺液中处理 2 h(37 ℃)后,两者同时再用 0.075 mol/L 氯化钾低渗处理(37 ℃ ± 0.5 ℃) 45 min,加新鲜固定液,15 min 反复 3 次。

把载玻片置 60 ℃水浴上,加 60% 冰乙酸 1 滴,取 1 个经低渗处理的睾丸放置恒温的载玻片上,充分剥离,滴加固定液,快速过火焰,干燥备用。

C 带处理:把制好的玻片,用 0.2 mol/L HCl 处理 5 min,用预温的双蒸馏水漂洗,放入 56 ℃预温饱和氢氧化钡溶液中 5 min 后,用预温的双蒸馏水漂洗,移入 65 ℃的 2×SSC(预温)处理 1 h,后用预温的双蒸馏水漂洗,晾干。10% 吉氏液染色 20 min,干燥,镜检。

基金项目:美国 NIH/TMRC 基金资助(No. 1 P50 A139461)

作者单位:中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所,世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心,卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室,上海 200025

G带处理:把制好玻片存放1 wk,60 ℃烘烤,放入37 ℃±0.5 ℃预温的0.25% 胰酶液中,再加入0.4%酚红,3% Tris液调节pH至6.8~7.0处理5 min,10% 吉氏液染色20 min,干燥,镜检。

结 果

1 浙江永嘉地区卫氏并殖吸虫成虫睾丸染色体数目

从染色体标本中选取100个分散较好的中期分裂细胞,油镜下观察。结果显示,采用改进后的染色体制备方法,染色体分布均匀清晰,浙江永嘉地区卫氏并殖吸虫染色体数75%以上为22条,即2n=22(表1),另外小于22条的染色体占16%~20%,表现为16、18和20条,可能是制片过程中的丢失。而大于22条的染色体占0~6%,表现为44条,66条,则是多个分裂细胞聚集所致。根据现场多次调查,3个乡、镇均有咯痰血的感染者。

表1 浙江永嘉地区不同乡镇采集的卫氏并殖吸虫成虫睾丸染色体数目的比率

Table 1 The chromosome number of *P. westermani collected* in different town and townships in Yongjia area, Zhejiang

地区 Area	染色体数(%) No. chromosomes(%)		
	22	>22	<22
张溪乡 Zhangxi Township	80	0	20
大若岩镇 Daruoyan Town	76	6	18
四都乡 Sidu Township	78	6	16

2 染色体C带及G带染色

2.1 C带 从染色体中选取10个分散较好的正中期分裂相细胞,油镜下拍片放大,根据C带着丝点分析,No.1号染色体为中部着丝点,No.2~3号染色体为亚端部着丝点,No.4~11号染色体具有分布在着丝点的异染色质区段。用改进的方法制得的染色体C带带型十分清晰。根据着丝点分析其核型公式:2m+6sm+14t(图1)。

2.2 G带 在参考标准模式图的基础上,No.1号染色体短臂有3条显带,长臂有5条显带,No.2~4号染色体短臂有1条显带,长臂有4条显带,No.5~9号染色体短臂近端有1条强带,远端有2条强带,No.10~11号染色体长、短臂各有1条强带(图2)。

3 两部分实验结果比较

将第一部分25条活成虫直接置于0.01%秋水仙胺溶液培养后,再取出睾丸制片,其C带和G带染色体玻片中,分裂相明显增多而且清晰。从第二部分的25条成虫取出睾丸,再把睾丸放入0.01%秋水仙胺溶液中培养,其C带和G带染色体玻片中,分裂相较少,不够清晰。

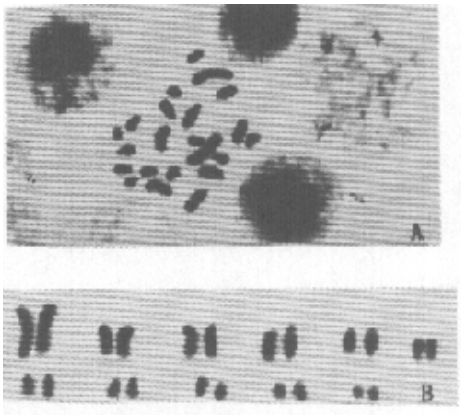

图1 浙江永嘉地区卫氏并殖吸虫染色体C带带型
A 中期分裂相 B 核型排列2n=22,n=11

Fig. 1 Pattern of chromosome C banding of *P. westermani* in Yongjia, Zhejiang A Mitosis metaphase B Karyotype plate 2n=22,n=11

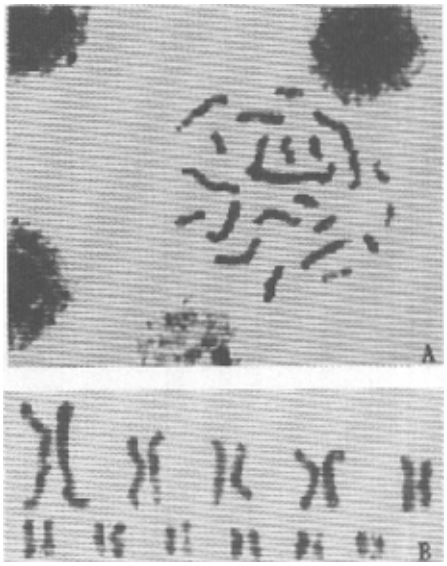

图2 浙江永嘉地区卫氏并殖吸虫染色体G带带型
A 中期分裂相 B 核型排列2n=22,n=11

Fig. 2 Pattern of chromosome G banding of *P. westermani* in Yongjia, Zhejiang A Mitosis metaphase B Karyotype plate 2n=22,n=11

讨 论

我国肖建华、赵吉宾等[4,5]采用空气干燥法,取成虫睾丸在秋水仙素培养液中培养3~6 h(37 ℃),实验时间长,需要生殖细胞量多,为了获得更加清晰的卫氏

并殖吸虫染色体的核型片，我们在参照姚丽君等[6]制备卫氏并殖吸虫染色体的方法后作了 3 点改进：①采用新鲜卫氏并殖吸虫成虫的一只睾丸制一张玻片，调整秋水仙胺浓度为 0.01%，缩短作用时间，以 2 h 最合适。对卫氏并殖吸虫成虫的睾丸离体后，用秋水仙胺作用，发现中期分裂相较少，而活成虫直接用秋水仙胺作用，再取睾丸，中期分裂相明显增多，可能是活成虫可吸收秋水仙胺达到快速布满全身，将细胞终止于分裂中期。②原制备方法中低渗液双蒸馏水均不预温，改进后在制备 C 带、G 带时，低渗液、双蒸馏水、胰酶液在 37 ℃ ±0.5 ℃ 水浴预温，制成的玻片清晰度高。③在制 G 带时，特别是在胰酶液中加入指示剂后能更好控制 pH，使显带更加清晰。制成的玻片采用快速过火焰，这样得到的细胞染色体平铺好，并且牢固、清晰。改进后的卫氏并殖吸虫染色体的制备方法与以往报道的相比较具有操作简便、观察的染色体清晰及便于核型分析等优点。

致谢 蒙上海铁路中心医院沈仲华主治医师和本所朱显因副主任技师指导帮助，谨此致谢

参 考 文 献

[1] Terasaki K. Comparative studies on the karyotypes of *Paragonimus westermani* (s.s.) and *P. pulmonalis* [J]. Jap J Parasitol, 1980, 29: 239-243.
[2] Hirai H, Sakaguchi Y, Habe S, *et al*. C-banding analysis of six species of lung flukes, *Paragonimus* spp. (Trematoda: Platyhelminthes), from Japan and Korea [J]. Z Parasitenkd, 1985, 71:617-629.
[3] He Lian-yin, Zhong Hui-lan, Gao Pei-zhi. Preliminary studies on chromosomes of 9 species and subspecies of lung flukes in China [J]. Chin Med J, 1982, 95:404-408.
[4] 赵吉滨，黄舜毅，赵素云. 卫氏并殖吸虫二倍体型与三倍体型染色体 C 带带型的比较研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，1989，7: 103-104.
[5] 肖建华，陈翠娥. 卫氏并殖吸虫和斯氏狸殖吸虫染色体 G 带带型的比较研究[A]. 现代寄生虫学研究. 广东省寄生虫学会年报[C]，1992，11-13 增刊：20-21.
[6] 姚丽君，林建银，魏雪英. 福建省两地区卫氏并殖吸虫二倍体型染色体 C 带和 G 带带型的研究 [J]. 中国人兽共患病杂志，1996，12(6): 79-81.

（收稿日期：2001-11-29 编辑：富秀兰）

文章编号：1000-7423(2002)-03-0157-01

【简报】

中药囊虫散局部注射治疗皮肌囊尾蚴病的疗效观察

廉辰[1] 刘晨[2]

中图分类号：R532.33 文献标识码：B

囊虫散是我院应用多年治疗脑囊尾蚴病、皮肌囊尾蚴病的自制中成药，临床应用疗效确切。为了进一步验证其杀虫效果，将囊虫散庆大霉素溶液直接进行皮肌囊尾蚴病注射治疗，作进一步观察。

1 临床资料

选择自 1999 年 1 月至 2000 年 10 月期间住院皮肌囊尾蚴病患者 12 例，均经病理检验及囊尾蚴酶免实验确诊。其中男 7 例，女 5 例，年龄 20～55 岁，皮肌囊尾蚴最少 11 个，最多达 121 个，上述病例入院前未经杀虫治疗，入院后先采取皮肌囊尾蚴注射治疗。

2 材料与方法

分设囊虫散组和吡喹酮对照组、庆大霉素对照组。

2.1 *囊虫散组* 囊虫散由雷丸、山甲、僵蚕、仙鹤草、黄连均等份，烘干研末灭菌制成胶囊。取囊虫散 0.05 g，溶于庆大霉素 2 ml(8 万 U)，混匀，自然沉淀 1 h，用无菌注射器抽取 1 ml 上清液备用。

2.2 *吡喹酮对照组* 取吡喹酮研末 0.05 g，溶于庆大霉素 2 ml(8 万 U)放置 1 h，用无菌注射器抽取 1 ml 上清液备用。

2.3 *庆大霉素对照组* 用注射器抽取庆大霉素 1 ml 备用。

2.4 *治疗方法* 每例一次选取 6 个囊尾蚴结节，分别编号，上述每组药物分别选取 2 个结节注射。将选择的囊尾蚴结节消毒，固定，刺入结节后回抽注射器，如有囊液者使囊液与药物混合再注入结节内，每个结节注入 0.5～1 ml，注射药物后 24 h 观察结节变化及有无副作用。并随访 7 d 观察结节变化。

本文 12 例病例分批进行了 20 次药物注射，共注射皮肌囊尾蚴结节 120 个。

3 疗效判定标准

囊尾蚴结节消失或缩小一半以上为有显效。囊尾蚴结节缩小，但未超过原体积一半为有效。无变化为无效。

4 结果与讨论

囊虫散组共 40 个囊尾蚴结节，显效 35 个(87.5%)，有效 4 个(10%)，无效 1 个(2.5%)。副作用：局部有轻度肿痛 6 例。吡喹酮组共 40 个囊尾蚴结节，显效 36 个(90%)，有效 3 个(7.5%)，无效 1 个(2.5%)。副作用：局部有轻度肿痛 3 例。庆大霉素组均无效。

本文结果表明，囊虫散和吡喹酮的庆大霉素溶液局部注射治疗皮肌囊尾蚴病，均有显著的杀虫效果，并且局部注射药物杀虫快速，可作为治疗皮肌囊尾蚴的一种方法。

（收稿日期：2001-07-16 编辑：庄兆农）

作者单位：1 河北省邯郸市中医院，邯郸 056001；2 河北省邯郸市卫生防疫站，邯郸 056001