

【实验报道】

文章编号: 1000-7423(2001)-01-0045-03

日本血吸虫成虫培养液中氨基酸及葡萄糖含量的动态变化*

范虹** 董惠芬 蒋明森 钟沁萍 明珍平

【摘要】 目的 观察培养过程中日本血吸虫成虫细胞培养液中氨基酸(AA)、葡萄糖(Gluc)及甘油三酯(TG)含量的动态变化。方法 用氨基酸自动分析仪、自动生化分析仪分别测定培养液在培养 0~6 d 过程中 AA、Gluc 及 TG 含量变化。结果 精氨酸(Arg)、苏氨酸(Thr)、蛋氨酸(Met)、赖氨酸(Lys)及 Gluc 含量有不同程度下降;天门冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)及游离氨(Amm)有明显上升;TG 变化不明显。结论 在日本血吸虫成虫细胞培养液中适当增加 Arg、Thr、Met、Lys 和 Gluc,同时减少 Asp 和 Ala 的含量,及时更换培养液有利于维持血吸虫细胞生长。

【关键词】 日本血吸虫成虫;细胞培养;氨基酸;葡萄糖;甘油三酯

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

Dynamic Changes in Amino Acid and Glucose in Culture Medium with Adult *Schistosoma japonicum**

FAN Hong**, Dong Hui-fen, JIANG Ming-sen, ZHONG Qin-ping, MING Zhen-ping

(Department of Parasitology and Laboratory of Schistosomiasis, Medical School of Wuhan University, Wahan 430071)

【Abstract】 Objective To observe the dynamic changes in the contents of amino acid(AA), glucose(Gluc) and triglyceride(TG) in the culture medium containing adult *Schistosoma japonicum*. **Methods** The contents of AA, Gluc and TG in the culture medium during the incubation period from d₀ to 6 d were detected by amino acid automatic analyzer and automatic biochemical analyzer. **Results** The contents of Arg, Thr, Met, and Lys and Gluc were reduced, Asp and Ala increased apparently. **Conclusion** Increasing the levels of Arg, Thr, Met Lys and Gluc, reducing the levels of Asp and Ala, and changing the culture medium in time might be in favor of the *in vitro* cultivation of *S. japonicum*.

Key words: adult *Schistosoma japonicum*, cell culture, amino acid, glucose, triglyceride

* Supported by Chenguang Project of Wuhan City(No.9757082357), Natural Science Foundation of Hubei Province(No.97J075) and Educational Committee of Hubei Province.

** Present address: Department of Microbiology and Parasitology, Hubei Traditional Medical College, Wuhan 430061

营养成分是影响血吸虫细胞在体外培养条件下生存及生长繁殖的重要因素, Hobbs 等^[1]在培养曼氏血吸虫童虫细胞时发现该种细胞在低浓度 KCl 及葡萄糖(Gluc)的 DMEM 无血清培养基中存活时间较长。董惠芬等^[2]报道合成培养基 TC-199 分别与 10%、20% 小牛血清及 RPMI 1640 与 5% 小牛血清组成的培养基可使日本血吸虫成虫细胞存活 150 d 以上。陈晓蓓等^[3]以正交试验法研究日本血吸虫童虫细胞的培养条件时发现童虫在 RPMI 1640、5% 小牛血清及 0.85% 盐水组合中存活时间最长。

本文通过测定培养过程中日本血吸虫成虫细胞培养液中氨基酸(AA)、Gluc、甘油三酯(TG)含量的动态变化,了解培养细胞的物质代谢规律,为寻求

更合理及更完善的培养基提供有利条件。

材料与方法

1 成虫的收集

取阳性钉螺(湖南省寄生虫病研究所提供),常规逸出尾蚴。取家兔经皮感染 1 800~2 000 条尾蚴。感染后 28 d 以灌注法冲虫,收集的成虫在含青霉素 1 000 IU/ml、链霉素 1 000 μg/ml 的 PBS(-) 溶液中洗涤 2 h 备用。

2 日本血吸虫成虫细胞培养

参照董惠芬等^[4]的方法。细胞培养基为 RPMI 1640 和 10% 小牛血清,加常量抗生素(终浓度青霉素为 100 U/ml,链霉素为 100 μg/ml),其 pH 值为 7.2~7.4。将备用的虫体剪碎,用 0.25% 的胰蛋

基金项目: * 武汉市晨光计划(No. 975708235)和湖北省自然科学基金(No. 97J075)、湖北省教委资助项目

作者单位: (武汉大学医学院人体寄生虫学教研室和血吸虫病研究室,武汉 430071) ** 现工作单位: 湖北中医学院微生物寄生虫学教研室,武汉 430061

白酶和 0.02 % EDTA 消化、离心。然后用培养基重悬浮, 成为细胞含量为 2.5×10^5 /ml 的细胞悬液, 接种于培养瓶中, 每瓶接种 1 ml, 置 37 °C 培养。

3 培养液收集

分别于 1、2、3、4、5 和 6 d 时收集细胞培养液, 每次收集样品 3 瓶, 置 -18 °C 保存备用。

4 AA 含量测定

细胞培养液经 5% 磺柳酸去蛋白质后由武汉大学氨基酸工程中心用 Hitachi 835-50 型自动氨基酸分析仪检测。

5 Gluc 及 TG 含量的测定

用 Hitachi/BM747 型自动生化分析仪, 分别以己糖激酶法和酶法 (GPO 法) 测定。

结 果

1 AA 含量

随着培养时间的延长, 苏氨酸 (Thr)、精氨酸 (Arg)、蛋氨酸 (Met) 和赖氨酸 (Lys) 含量明显下降; 谷氨酸 (Glu)、丝氨酸 (Ser)、组氨酸 (His)、苯丙氨酸 (Phe)、异亮氨酸 (Ile) 及胱氨酸 (Cys) 含量有一定程度的下降; 游离氨 (Amm)、天门冬氨酸 (Asp)、丙氨酸 (Ala) 含量则明显上升; 甘氨酸 (Gly)、缬氨酸 (Val)、酪氨酸 (Tyr) 和脯氨酸 (Pro) 无明显变化。

根据 Thr、Arg 含量作图 1, 由图 1 可见 Thr 及 Arg 水平在 d_0 时最高, 分别为 21.85 mg/100 ml 和

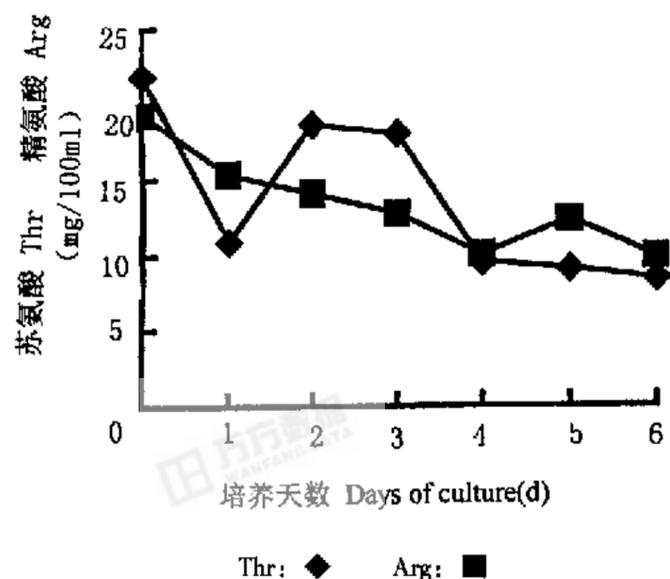


图 1 不同培养时期细胞培养液 Thr 和 Arg 含量
Fig. 1 Levels of Arg and Thr in culture medium at different times (d)

19.29 mg/100 ml, 此后逐渐下降, 均在 6 d 时至最低

水平, 分别为 8.40 mg/100 ml 和 9.86 mg/100 ml, 降幅在 50% 以上。根据 Asp、Amm 含量作图 2, 由图 2 可见, Asp 及 Amm 含量在 d_0 时分别为次低及最低水平, 后逐渐上升, 分别在 d_5 及 d_5 达最高峰, 为 2.3 mg/100 ml 和 4.76 mg/100 ml, 升幅在 30% 以上。根据 Ala 含量作图 3, 由图 3 可见 Ala 在 d_0 时为 1.39 mg/100 ml, d_4 时升至最高峰 1.70 mg/100 ml, 此后 d_5 和 d_6 保持较高水平。

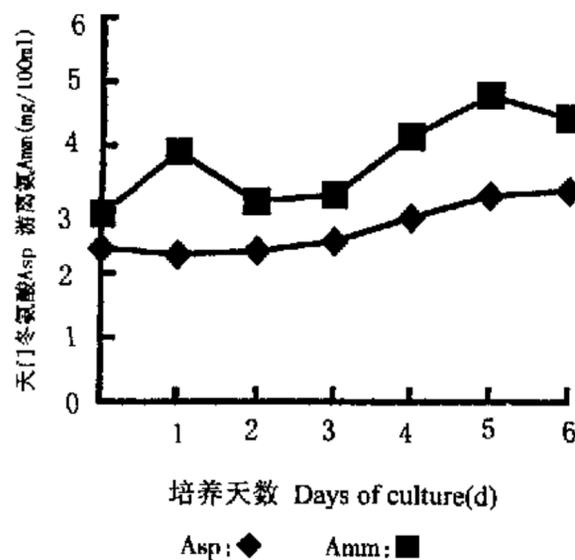


图 2 不同培养时期细胞培养液 Asp、Amm 含量
Fig. 2 Levels of Asp and Amm in culture medium at different times (d)

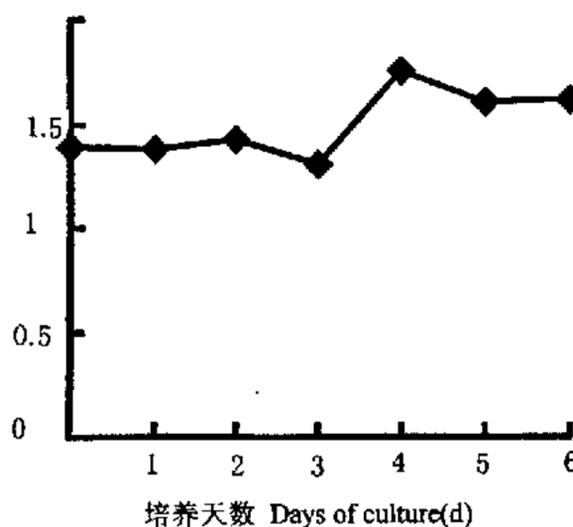


图 3 不同培养时期细胞培养液 Ala 含量
Fig. 3 Levels of Ala in culture medium at different times (d)

2 Gluc 含量

Gluc 含量变化见图 4, 由图 4 可知随培养时间延长 Gluc 含量逐日下降。在 d_1 时最高, 此后逐渐下降, 至 d_6 时达最低, 其差别有高度显著性 ($P < 0.01$)。对 1~6 d 各组 Gluc 含量进行两两比较, 经 Q 检验, 表明培养第 1 天与第 2、4、5 和 6 天之间、第 2 天与第 6 天之间及第 3 天与第 5 和 6 天之间培养液中 Gluc 含量的差别有显著性意义 ($P < 0.05$)。培养时间相差 2 d 及 2 d 以上的对比组, 除

d₄/d₆ 组外, Gluc 含量的差别均有显著性意义 ($P < 0.05$); 而培养时间相差 1 d 的对比组, 除 d₂/d₃ 组外, Gluc 含量差别均无显著性 ($P > 0.05$)。

3 TG 含量

不同培养时期细胞培养液 TG 含量见图 5。由图 5 可知 TG 含量变动很小, 其均值波动幅度仅 0.1 mmol/L, 经统计学处理其差别无显著性。

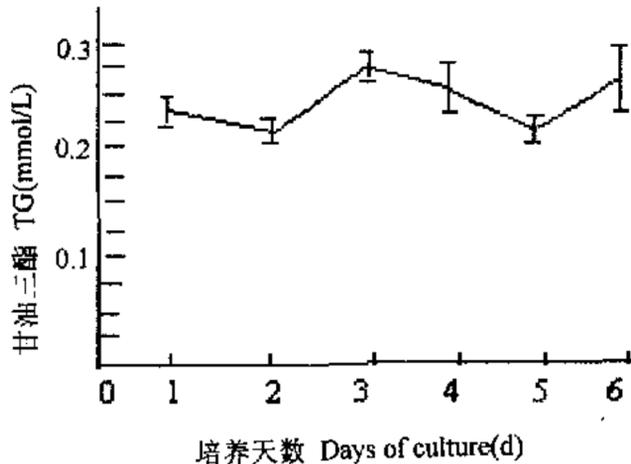


图 4 不同培养时期细胞培养液 Gluc 含量
Fig. 4 Levels of Gluc in culture medium at different time (d)

(注: $S = 1.61$, $n = 3$ 经 F 检验, $F > F(7.63)$, $P < 0.01$ Note: $S = 1.61$ F test, $F > F(7.63)$, $P < 0.01$)

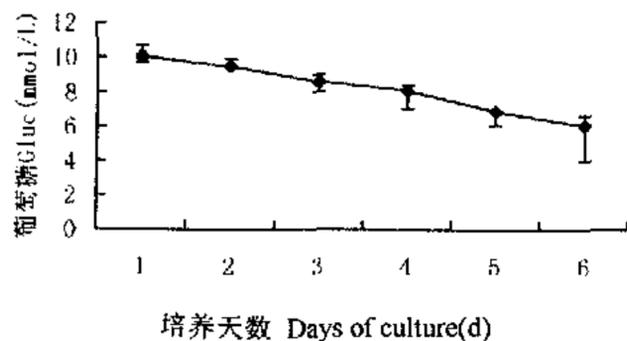


图 5 不同培养时期细胞培养液 TG 含量
Fig. 5 Levels of TG in culture medium at different time (d)

注: $S = 0.1$ 经 F 检验, $F < F(0.41)$, $P > 0.05$ Note: $S = 0.1$ F test, $F < F(0.41)$, $P > 0.05$

讨 论

日本血吸虫成虫细胞培养液中 Thr、Arg、Gluc、Ile、Lys、His、Phe、Ser、Met 和 Cys 含量随培养时间延长而下降, 其中 Thr、Arg、Met 和 Lys 下降明显, 提示血吸虫细胞有可能从培养液中摄取多种 AA 尤其是 Arg 和 Thr 供自身代谢需要。日本血吸虫和曼氏血吸虫具有高活力精氨酸酶。Arg 被虫体摄入后, 可很快被转化为 α -氨基戊醛酸, 形成谷氨酸和脯氨酸的中间代谢产物。

培养过程中细胞培养液中 Asp、Ala 及 Amm 含量明显增加, 推测可能与血吸虫向周围环境分泌

Asp、Ala 等 AA 和 Amm 有关。有资料表明血吸虫可利用糖酵解产生的大量丙酮酸与氨结合形成 Ala 作为氨的最终代谢产物排出体外^[5]。

血吸虫能迅速通过体壁利用外源性 Gluc。Hobbs 等^[1]发现曼氏血吸虫童虫细胞在含 Gluc 的 DMEM 中存活时间较长。Weller 等^[6]采用 1779 培养基, 可在细胞水平为血吸虫细胞存活提供近似生理需要的条件, 该培养基中含有较高浓度的 Gluc (12 g/L)^[7]。本文结果提示日本血吸虫成虫细胞在生存与生长的过程中有较强的利用 Gluc 的能力, 培养基中 Gluc 含量迅速减少可导致日本血吸虫成虫细胞能量供应不足。

脂类是构成血吸虫虫体的重要成分之一。从本文结果图 5 所见, 细胞培养液中 TG 含量在 1~6 d 的培养期中变动幅度仅 0.1 mmol/L, 其差别无显著性 ($P > 0.05$), 推测成虫从外界摄取 TG 的能力很低。

综上所述, 我们认为适量补充培养基中 Gluc、Arg、Thr、Met 和 Lys 等营养物质, 及时更换培养液以补充迅速消耗的营养, 同时清除过量的 Amm 等代谢终产物, 对维持和促进血吸虫细胞生长繁殖有重要作用。

由于 Gluc、Arg、Thr、Met 和 Lys 等营养成分在培养第 4 天至第 5 天时下降迅速或达最低点, 而 Asp、Ala 和 Amm 也在培养第 4 天至第 5 天时上升迅速或达最高点, 因此在第 3 天, 最迟第 4 天时更换培养液有利于维持细胞生长。

参 考 文 献

- [1] Hobbs DJ, Fryer SE, Duimstra OR, et al. Culture of cells from juvenile worms of *Schistosoma mansoni*. J Parasitol, 1993, 79: 913-918.
- [2] 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探讨. 中国血吸虫病防治杂志, 1995, 7: 257-261.
- [3] 陈晓蓓, 董惠芬, 蒋明森, 等. 正交试验法研究日本血吸虫童虫细胞的培养条件. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13: 41-42.
- [4] 董惠芬, 蒋明森, 李瑛, 等. 日本血吸虫细胞培养方法初探. 水生生物学报, 1995, 4: 382-383.
- [5] 赵慰先主编. 人体寄生虫学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 215.
- [6] Weller TH, Wheeldon SK. The cultivation *in vitro* of cells derived from adult *Schistosoma mansoni* methodology criteria for evaluation of culture and development of media. Amer J Trop Med Hyg, 1982, 31: 335-340.
- [7] 陈佩惠, 周述龙主编. 医学寄生虫体外培养. 北京: 科学出版社, 1995: 390.

(收稿日期: 2000-06-26 编辑: 庄兆农)