

文章编号:1000-7423(2004)-02-0126-01

蛔虫感染期幼虫提取液对人肺上皮细胞的细胞毒作用

袁铿¹ 彭国华¹ 彭卫东¹ 周宪民² 胡银英¹ 袁芳¹ 戴志芳¹

中图分类号:R383.11

文献标识码:B

蛔虫是危害地域最广、感染人数最多的病原生物之一,全球蛔虫感染者约 14 亿,我国感染人数近全国人口的一半,遍及各省^[1]。蛔虫感染可造成变态反应、肠功能障碍等,并可引起严重并发症。本研究利用人蛔虫感染期幼虫提取液,对体外培养的人肺上皮细胞(A₅₄₉细胞)进行干预,观察其对 A₅₄₉细胞的细胞毒性作用及其与浓度的关系,探讨蛔虫感染引起宿主病变的发病机制。

1 材料与方法

1.1 标本来源 对江西省新建县农村社区小学生用双羟萘酸噻嘧啶驱虫,获取雌性成虫,解剖子宫收集受精蛔虫卵。A₅₄₉细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);四甲基偶氮唑盐(MTT,美国 Sigma 公司);小牛血清(杭州四季青生物有限公司)。

1.3 感染期幼虫提取液的制备 按彭国华等^[2]方法收集感染期幼虫。于冰浴中将人蛔虫感染期幼虫制成匀浆,反复冻融 3 次,离心后取上清即为感染期幼虫提取液。经核酸蛋白分析仪测得蛋白质含量为 2.4 mg,置 -30℃ 冰箱冻存备用。

1.4 A₅₄₉细胞的培养与传代 将复苏后的 A₅₄₉细胞置含 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素及 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,调整细胞浓度为 1 × 10⁵/ml,置 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,待细胞铺满瓶壁后,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.5 细胞毒性试验(MTT法)^[3] 调整细胞浓度为 1 × 10⁵/ml,移入 96 孔培养板中。对照组每孔加入培养液 100 μl;实验组提取液按 1 200、600、300、150、75、37.5、18.8 和 9.4 μg/ml 倍比稀释后,每孔加入 100 μl,每组设 5 个孔,置 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中过夜,加入 15 μl MTT 反应液(5 mg/ml)后培养 4 h,上机前每孔加入 150 μl 二甲基亚砷(DMSO),振荡 5 min 后测定 A₅₇₀值。

1.6 形态学观察 倒置相差显微镜下观察对照组、实验组细胞形态变化,透射电子显微镜超微结构观察。

2 结果

不同浓度的蛔虫感染期幼虫提取液,在和 A₅₄₉细胞共同孵育 24 h 后,所产生的细胞毒性作用不同。经统计软件包 SPSS10.0 作单因素方差分析,当浓度为 1 200 μg/ml 及 600 μg/ml 时表现出极显著细胞毒作用(P < 0.01),此时细胞毒作用(CTE)为 42% ~ 32%;当浓度为 300 μg/ml 及 150 μg/ml 时

有显著细胞毒作用(P < 0.05),CTE 为 23% ~ 14%;而浓度 ≤ 75 μg/ml 则无显著细胞毒作用。稀释浓度与 A 值呈正相关,Pearson 相关系数(r = 0.577),差异具显著性(P < 0.01)。

当提取液浓度为 1 200 μg/ml 及 600 μg/ml 时,在倒置相差显微镜下可见贴壁细胞明显减少,细胞溶解并有大量脱落细胞;在透射电镜下观察到的贴壁细胞大多为坏死细胞,其细胞膜、核膜及细胞器结构不清晰,包膜可见局灶性降解;当其浓度为 300 μg/ml 和 150 μg/ml 时,可见许多贴壁细胞圆缩,培养上清中仍可见较多的脱落细胞,其细胞核染色体发生边聚、核固缩,细胞体积变小、胞浆浓缩、胞膜出泡及凋亡小体等;而浓度为 75 μg/ml 之后的低浓度组及对照组细胞增殖正常,形态大小均一,绝大多数细胞的细胞核体积大小正常、完整,电子密度均匀,为正常细胞特征。

3 讨论

有学者对猪蛔虫感染期幼虫分泌排泄物抗原进行测定,发现其成分复杂,相对分子质量 14 000 是具有强烈变应原性的蛔虫体腔液蛋白谱中的主要分子,是 L2、L3 的 ES 抗原与体腔液的惟一共同抗原,也是诱发宿主产生抗体反应的免疫原^[4,5]。本研究中,人蛔虫感染期幼虫提取液对 A₅₄₉细胞所产生的毒性作用是否与其有关及其作用机制,还有待于深入研究。另外本研究发现,细胞凋亡现象是该提取液对 A₅₄₉细胞所产生毒性作用的一种表现形式,而细胞凋亡是机体细胞在分化与发育过程中受一系列基因调控而发生的主动自发性死亡方式,即当宿主感染蛔虫后有可能触发一系列相关基因的启动,导致机体细胞发生凋亡。

本实验结果表明,人蛔虫感染期幼虫提取液对 A₅₄₉细胞具有细胞毒作用,提示蛔虫病的发病机制中可能存在细胞毒作用的参与,这可能有助于从一个新的角度阐明感染蛔虫后宿主发生的病理变化。

参 考 文 献

- [1] Peng WD, Zhou XM, Crompton DWC. Ascariasis in China [J]. Adv Parasitol, 1998, 41:109-148.
- [2] 彭国华,袁铿,周宪民,等. 蛔虫感染期幼虫的分离 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21(1):封3.
- [3] 钱旻,张秀华,梅兵,等. 棘阿米巴滋养体对 HeLa 细胞的细胞毒性作用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19:37-40.
- [4] Kennedy MW, Qureshe J, Haswell-Elkins M, et al. Homology and heterology between the secreted antigens of the parasitic larval stages of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* [J]. Clin Exp Immunol, 1987, 67:20-30.
- [5] Kennedy MW. The nematode polyprotein allergens/antigens [J]. Parasitol Today, 2000, 16:373-380.

基金项目:江西省自然科学基金(No. 0340120)

作者单位:1 江西省医学科学研究所,南昌 330006;2 江西医学院寄生虫学教研室,南昌 330006

(收稿日期:2003-09-08 编辑:庄兆农)