技术方法

文章编号:1000-5404(2010)14-1582-03

改进的细粒棘球蚴生发细胞分离培养方法与鉴定

邹晓毅[1,2],叶 彬[1,2],王俊安[1],周潜涛[1],张潞渝[1,2],韩秀敏[3],杨永海[3] (400016 重庆,重庆医科大学:病原生物学教研室[1],肿瘤与分子医学中心[2];811602 西宁,青海省地方病预防控制所[3])

[摘要] 目的 探讨细粒棘球蚴生发细胞原代培养的改进方法。方法 剪碎自然感染的绵羊棘球蚴包囊组织,用胶原酶与胰蛋白酶等比混合液消化解离,对获得的细胞以显微镜、电镜以及免疫荧光试验方法进行形态学研究及鉴定。结果 分离出足量细胞进行体外培养且细胞具有生发细胞样形态和免疫特征。结论 改良的胶原酶消化法是一种简单有效的生发细胞分离培养方法。

[关键词] 细粒棘球绦虫;棘球蚴;生发细胞;原代细胞培养
[中图法分类号] R383.33 [文献标志码] B

细粒棘球蚴是细粒球绦虫(*Echinococcus granulosus*, *Eg*)续绦期幼虫,可寄生于人或多种动物致囊性棘球蚴病(*Cystic Echinococcosis*)。囊性棘球蚴病也称包虫病,是一种呈世界性分布的严重人兽共患慢性寄生虫病[1,2]。2005年中国卫生部将包虫病列为我国需要重点防治的寄生虫病之一[3]。生发层细胞是细粒棘球蚴中具有分裂繁殖力的关键细胞组分,可能后续多向分化发育成原头节、生发囊等棘球蚴组成部分以至发育成完整的细粒棘球蚴全新个体。体外分离、培育的棘球蚴生发细胞,可作为寄生虫细胞生物学、生物化学及抗虫药物的筛选等研究的体外模型。采用目前国内外报道的方法进行棘球蚴生发细胞原代培养,细胞分离困难,体外培养不易成功。本研究尝试用胶原酶消化获取棘球蚴细胞,体外培养细粒棘球蚴生发细胞。

1 材料与方法

1.1 主要试剂器材

改良DMEM培养液:DMEM培养液(Gibco)和0.5%水解乳蛋白液(HyClone)各40%,临用前加入15%体积的优等胎牛血清(杭州四季青),L-谷氨酰胺(HyClone)及终浓度为100 U/ml的青、链霉素。消化液:由0.25%胰蛋白酶(HyClone公司)和0.1%的Ⅰ型胶原酶(Sigma公司)按1∶1等比混合配制而成。棘球蚴感染者阳性血清:青海省地方病预防控制所王虎、韩秀敏同志惠赠,倍比稀释备用。FITC标记羊抗人IgG(Sigma公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 生发细胞的分离培养

细粒棘球蚴包囊采自青海省西宁市乐家湾清真屠宰场包虫自然感染病羊肝,屠宰后2 h内送至实验室,自来水洗净肝脏表面污渍,稍微晾干即置于1 000 ml烧杯中,加75%酒精浸没,消毒10 s即可送入超净工作台。

用注射器吸除大部分囊液,剪开囊壁,分离出棘球蚴内囊,眼科剪充分剪碎,PBS清洗后,加约10倍组织体积量的混合消化溶液,37 ℃恒温摇床消化12 min,加入约等量含血清的完全培养液中止消化。静置1 min待原头节和碎片等大组织块下沉,采集上层液800~1 000 r/min离心5 min,收集细胞HBSS洗1次,加适量完全培养液轻吹打制备成细胞悬液。调整细胞数约为2×10^7/ml,接种于预先鼠尾胶原包被的培养瓶。标记后送入37 ℃,5% CO_2温箱培养。待细胞生长融合成单层细胞后,弃去培养液,加入消化液2~3 ml,倒置显微镜下观察,当细胞回缩变圆后弃去消化液,加入完全培养液5~10 ml终止消化,用巴氏吸管吹打制成细胞悬液,按1∶2比例将细胞悬液接种于培养瓶中,置于培养箱中培养。

1.3 细胞形态观察

倒置显微镜每日观察细胞生长情况,培养液pH变化等。将融合约85%的生长细胞用PBS液清洗3次,1 500 r/min离心20 min。弃上清,2.5%戊二醛4 ℃下固定细胞团块24 h后,锇酸固定1 h,丙酮梯度脱水,Epon812包埋,超薄切片机切片,乙酸双氧铅铀双重染色,透射电镜观察细胞形态。

1.4 免疫荧光试验(immunofluorescence assay,IFA)

预先鼠尾胶原包被的盖玻片置于培养瓶底进行细胞爬片,至细胞融合约85%时取出,PBS洗涤3次,4%多聚甲醛4 ℃固定10 min加入不同稀释度的棘球蚴感染阳性血清覆盖,37 ℃孵育30 min后PBS轻洗细胞3次加FITC标记的羊抗人IgG,37 ℃避光孵育30 min,PBS洗涤3次,洗去未结合荧光抗体,荧光显微镜下观察拍照。同时以健康人血清代替一抗作为阴性对照。

2 结果

2.1 单用胰蛋白酶和改进的混合消化液所收获的单细胞数量比较

分别单用胰蛋白酶和用胶原酶与胰蛋白酶混合液2种消化液进行4次独立实验,消化解离棘球蚴囊壁组织获得细胞,细胞分离重悬后,用细胞计数板计数细胞密度。从实验结果可以看出,在待分离棘球蚴内囊组织总量基本一致的情况下,混合消化液在分离消化原代细胞过程中获得的单细胞数量明显多于原方法,相差23个数量级,见表1。

[基金项目] 国家自然科学基金(30371258, 30972567)
[通信作者] 叶 彬,电话:(023)68485288,E-mail:yebina@sohu.com

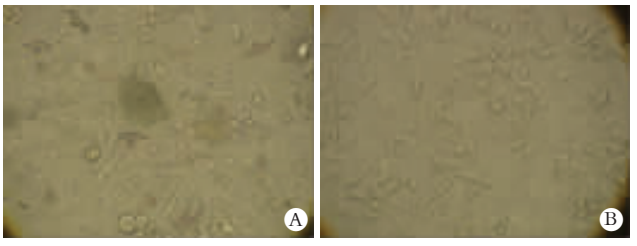
表 1 两种消化液收获的单细胞数量比较

实验次数	单用胰蛋白酶法	用混合液消化法
1	2.5×10^5	4.4×10^7
2	6.5×10^4	3.7×10^7
3	3.3×10^5	4.1×10^7
4	8.0×10^4	3.5×10^7

2.2 细胞形态

倒置显微镜下可见,采用棘球蚴生发层通过消化制备的培养材料中碎片较多,含有头钩、活头节,钙小体等组织杂质,刚分离细胞大小差异较大,圆形或类圆形,胞膜边缘清晰,细胞核清晰可见。培养第 10 ~ 15 天开始贴壁,随着换液次数增加,贴壁细胞的培养瓶内杂质逐渐减少,最后形成较为均一的贴壁细胞,贴壁后细胞为扁平多角形,边界清楚,细胞质丰富,胞核清晰可见,为圆形或椭圆形,偶可见多核细胞(图 1)。

电镜观察细胞呈圆形或椭圆形,细胞质丰富,细胞质内可见有较多的空泡,细胞膜表面可见到绒毛结构。该种细胞的胞核体积中等,异染色质分散、细小,呈颗粒状,可见到核仁,有空泡和大小不等的颗粒(图 2)。



A:刚分离的生发层细胞,含杂质较多;B:培养 10 d 逐渐贴壁的生发细胞

图 1 倒置显微镜观察生发细胞的形态(×200)

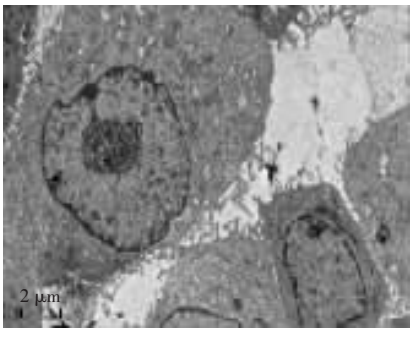
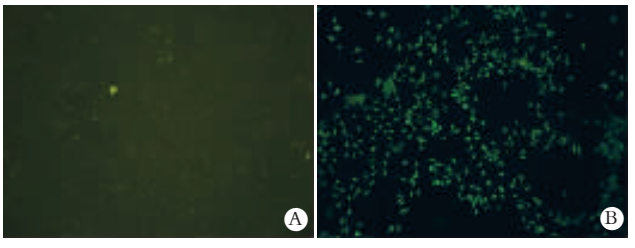


图 2 透射电镜观察生发层细胞

2.3 细胞 IFA 结果

用健康人血清孵育的细胞全无或有极微弱荧光(图 3A),可能为非特异性染色;而当阳性血清稀释度为 1∶80 时,荧光显微镜下观察到所培养细胞的表面显示有较强的荧光(图 3B),说明细胞的表面含有细粒棘球蚴抗原成分。



A:阴性血清孵育的细胞;B:阳性血清孵育的细胞

图 3 免疫荧光实验鉴定生发细胞 (×100)

3 讨论

细粒棘球绦虫体外培养,包括成虫培养、包囊培养、原头节培养和生发细胞培养等几种[4,5]。棘球蚴生发细胞原代培养细胞分离困难,体外培养不易成功[6]。最先进行棘球蚴生发细胞培养研究的 Fiori 认为不同供体来源的棘球蚴材料会影响培养成功率,来源于羊和猪的包囊材料和从患者获得的细粒棘球蚴细胞,在体外培养成功的概率是十分低的[7]。目前国内外报道的原代培养生发细胞的方法归纳起来主要有组织植块法和胰蛋白酶消化法两种[8-10]。我们最初进行生发细胞原代培养预实验时,也曾经分别单用这两种方法多次试验,效果也不尽如人意:采用组织植块法时,培养 2 周后能够爬出的细胞极少,完全没有形成“生长晕”;而采用单纯胰蛋白酶热消化分散法时,如消化时间短,细胞数量很少,完全不够进行后续培养,时间长则细胞数量多一些,但体外培养不容易存活,2 ~ 3 d 后完全崩解死亡。分析其原因可能在于:细粒棘球蚴包囊壁的组织结构较为特殊,相对于其他培养材料,包囊组织组成中细胞占有的比例较少而角质层胶原蛋白和细胞间质较多,组织植块时细胞不能很好地从组织内迁移而出;而单纯用胰蛋白酶消化亦难以将解离胶原组织,且胰蛋白酶对细胞有毒性作用,消化时间难以掌握,消化时间长容易损伤细胞,影响细胞体外生长存活;时间短则不能有效消化分离包囊组织获得细胞。所以采用之前报道的方法分离生发细胞确实较为困难。

本研究在传统生发细胞原代培养方法基础上,主要在分离组织的消化液的选择上进行了初步改进,尝试将胶原酶应用于棘球蚴细胞的消化分离,同时在实验中将机械分离与化学消化方法相结合,先行充分剪碎囊壁组织后,再用胶原酶与胰蛋白酶等比混合而成的消化液进行消化解离。机械剪碎乃人为帮助分散大块组织,有利于后续消化酶更好地发挥作用。胶原酶在上皮类细胞原代培养时经常使用,作用的对象主要是胶原组织,能很好地破坏囊壁角质层胶原蛋白,解离细胞外基质,性质相对温和,不容易对细胞产生损伤,与胰蛋白酶结合使用,充分游离细胞。这样的改良既能够有效提高消化离解效率又可以降低消化过程中细胞受损程度。此方法操作简单,短时即可获取细胞,可以尽量保证标本的新鲜度同时有利于预防原代培养中经常容易出现的污染困扰。实验中用此方法获取细胞数量明显增多且体外培养易存活并已传数代,成功培育出了细粒棘球蚴生发细胞体外模型,为进一步进行后续相关实验研究打下了基础。

参考文献：

[1] Zanini F, Suarez C, Perez H, *et al*. Epidemiological surveillance of cystic echinococcosis in rural population of Tierra del Fuego, Argentina, 1997－2006[J]. Parasitol Int, 2009, 58(1):69－71.

[2] Barnes T S, Goldizen A W, Morton J M, *et al*. Cystic echinococcosis in a wild population of the brush-tailed rock-wallaby (Petrogale penicillata), a threatened macropodid[J]. Parasitology, 2008, 135(6):715－723.

[3] 中华人民共和国卫生部. 2006－2015年全国重点寄生虫病防治规划[R]. 2006.

[4] Hemphill A, Stadelmann B, Scholl S, *et al*. Echinococcus metacestodes as laboratory models for the screening of drugs against cestodes and trematodes[J]. Parasitology, 2010, 137(3):569－587.

[5] 袁丽英，张壮志，石保新，等. 细粒棘球蚴-原头蚴体外培养成囊模型的建立[J]. 畜牧与兽医，2009，41(7)：29－31.

[6] 陆家海，郭中敏，余新炳，等. 细粒棘球蚴细胞系培育及其免疫研究[J]. 中山医科大学学报，2001，22(2)：81－84.

[7] Fiori P L, Monaco G, Scappaticci S, *et al*. Establishment of cell cultures from hydatid cysts of Echinococcus granulosus[J]. Int J Parasitol, 1988, 18(3):297－305.

[8] 单骄宇，康金凤，伊滕亮. 细粒棘球蚴原头蚴体细胞的分离及其细胞形态特点[J]. 新疆医科大学学报，2005，28(4)：360－363.

[9] 刘金明，顾惠明，王爱华，等. 细粒棘球蚴生发层细胞系的建立[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，1998，16(5)：353－356.

[10] 陆家海，程维兴，郭中敏，等. 细粒棘球蚴生发细胞体外培养的实验观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，1997，15(6)：392－394.

（收稿：2009-12-10 修回：2010-01-25）

（编辑　汪勤俭）

技术方法

文章编号：1000-5404(2010)14-1584-02

DiI染色方法观察视网膜神经节细胞形态

王凌妍，刘　康，王　一，阴正勤　（400038 重庆，第三军医大学西南医院全军眼科中心）

[摘要] 目的　寻求一种简单易行的观察视网膜神经节细胞形态学的染色方法。方法　取30 d(P30) Long Even's大鼠6只，雌雄不限，麻醉处死，取眼球后剥离完整视网膜，置于4%多聚甲醛溶液中固定12 h，取固定好的视网膜行全视网膜铺片后DiI荧光染色，将视网膜再次置于4%多聚甲醛溶液中避光37 ℃固定，6 d后观察神经节细胞形态。结果　染色可见神经节细胞胞体清晰，树突及轴突均匀着色，形态清晰。结论　视网膜铺片行DiI染色可以较好的观察神经节细胞形态。

[关键词] 神经节细胞；视网膜铺片；DiI染色

[中图法分类号] R322.91；R446　　**[文献标志码]** B

视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGCs)是视网膜中的第三级神经元，其轴突是构成视神经的重要组成部分。RGCs是视网膜中唯一一个向高级视觉中枢投射信息的神经元。因此，其形态学特点是研究正常及病理状态下RGCs改变的重要指标[1]。目前对于研究神经节细胞形态学的染色方法有很多种，包括神经逆行染色、单细胞染色等，但这些方法步骤繁琐、实验周期长[2,3]。为了得到一种简单易行，重复性高的染色方法，我们采用荧光染料DiI(1,1-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)行全视网膜铺片染色观察神经节细胞形态，从而寻求一种更好的形态学研究方法。

1　材料与方法

1.1　实验动物

选用30 d(P30) Long Even's大鼠6只，体质量150～200 g，雌雄不限，由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2　方法

1.2.1　取材与固定　大鼠经腹腔注射过量20%乌拉坦处死后，立即取出完整眼球，置于4%多聚甲醛溶液中室温固定30 min。取固定后的眼球，剪去角膜并除去晶状体、玻璃体后，仔细分离出完整的视网膜。按图1所示，将视网膜按4个象限剪开，将剪好的视网膜放入4%多聚甲醛溶液中，4 ℃固定12 h。

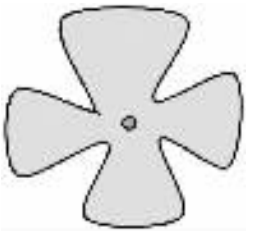


图1　视网膜剪开示意图

1.2.2　视网膜平铺片DiI染色　将固定好的视网膜平铺于干净的载玻片上，并使神经节细胞层向上。用滤纸吸去视网膜周边多余水分后，用干净的注射器针头在4个象限距视乳头3 mm处各划一小口并埋入一颗直径约为50 μm DiI颗粒。将视网膜浸泡于4%多聚甲醛溶液中，避光37 ℃固定6 d后取出，封片后荧光显微镜观察结果，激光共聚焦显微镜拍照分析。

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划，2007CB512203)

[通信作者] 王　一，E-mail：wangyieye@yahoo.com.cn