文章编号:1000-5404(2011)07-0679-03

论著

异源接种建立小鼠和兔包虫病动物模型的初步探讨

张 静[1,2],叶 彬[1,2],邹晓毅[1,2],武卫华[1,2],韩秀敏[3] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院:病原生物学教研室[1],分子与肿瘤研究中心[2];811602 西宁,青海省地方病预防控制所[3])

【摘要】 **目的** 采用人工接种羊源细粒棘球绦虫原头蚴感染法建立小鼠与兔包虫病动物模型。**方法** 6周龄昆明小鼠经皮穿刺腹腔内接种羊源细粒棘球绦虫原头蚴悬液,新西兰大白兔于腹部手术后肝脏接种羊源细粒棘球绦虫原头蚴悬液。接种原头蚴6个月后剖检动物,观察小鼠腹腔和新西兰大白兔肝脏内包虫囊生长情况。**结果** 接种羊源细粒棘球绦虫原头蚴6个月后,小鼠腹腔内包囊生成率为95%,新西兰大白兔肝内包囊生成率为50%。光镜观察见在小鼠腹腔和兔肝脏形成的囊泡具有与羊肝脏棘球蚴囊壁类似的类上皮细胞层和板层状结构。3种动物体内棘球蚴均有原头蚴。**结论** 以羊源细粒棘球绦虫原头蚴悬液接种昆明小鼠腹腔和新西兰大白兔肝脏,可以建立小鼠和兔包虫病动物模型。

【关键词】 异源接种;包虫病;动物模型
【中图法分类号】 R-332;R532.32 【文献标志码】 A

Establishment of laboratory animal models of hydatid disease through inoculating mice and rabbits with echinococcus granulosus protoscolices

Zhang Jing[1,2], Ye Bin[1,2], Zou Xiaoyi[1,2], Wu Weihua[1,2], Han Xiumin[3] ([1]Department of Pathogenic Biology, [2]Research Center for Molecular Medicine and Tumor, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Qinghai Institute for Endemic Diseases Prevent and Control, Xining, Qinghai Province, 811602, China)

【**Abstract**】 Objective To establish laboratory animal models of hydatid disease in mice and rabbits with sheep-derived *Echinococcus granulosus protoscolices*. Methods Kunming mice at 6 weeks of age were inoculated with the suspension of sheep-derived *Echinococcus granulosus protoscolices* in the abdomen. New Zealand rabbits were inoculated with the suspension of sheep-derived *Echinococcus granulosus protoscolices* in the liver after surgical operation in the abdominal region. The hydatid cysts in the animals were observed by naked eyes and optical microscopy in 6 months after inoculation. Results At the observation time point, the hydatid cysts were found in the abdominal cavities of 95% experimental mice (19/20) and in the liver of 50% experimental rabbits (4/8). Compared with those derived from the sheep liver, the hydatid cysts had similar epithelioid cell layer and lamellar structure but thinner cyst wall. Protoscolices were found in the hydatid cysts derived from all animals. Conclusion The animal models of hydatid disease can be established by inoculating mice and rabbits with the suspension of *Echinococcus granulosus protoscolices* derived from sheep liver. The rabbit model of hydatid disease is more suitable for further study with high-intensity focused ultrasound.

【**Key words**】 heterogenetic inoculation method; hydatid disease; animal models

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(30371258). Corresponding author: Ye Bin, Tel: 86-23-68485288, E-mail: yebina@sohu.com

细粒棘球绦虫的棘球蚴可寄生于人和多种食草家畜(牛、羊、骆驼等)的脏器(如肝、肺、腹腔等),引起严重的棘球蚴病(又称包虫病),已成为全球性的公共卫生和经济问题[1]。目前,我国西北部地区的棘球蚴病流行尤其严重,随着西部开发,产业结构调整,畜牧业的发展,包虫病可能不断扩散。因此,疫苗与药物研究都需要制备合适的动物模型。目前有3种方法制备包虫病动物模型,即继发性感染动物模型、同种连续传代动物模型、异种多次移植动物模型,多采用继发性感染动物模型[2]。影响动物模型建立的因素较多,其中转

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(30371258)
【通信作者】 叶 彬,电话:(023)68485288,E-mail:yebina@sohu.com

染动物(即中间宿主的种类、年龄及种株)最重要。易感的中间宿主主要是鼠类,如长爪沙鼠、C57L株小鼠、棉鼠等,其次为兔。已有印度学者报道在1只笼养家兔的胸腔内发现了自然感染包虫囊肿[3]。各种动物各有特点,需根据实验客观需要选择合适动物[4-5]。目前多采用小鼠腹腔接种模型动物进行药物或免疫学研究[6-7],而较少用兔作为动物模型。本研究拟采用羊源原头蚴接种小鼠和兔,通过检测包虫囊在这2种动物体内的生长情况,对比羊肝脏内棘球蚴,以期为包虫病防治研究找到合适的动物模型建立方法。

1 材料与方法

1.1 原头蚴的收集和鉴定

细粒棘球蚴采自青海省西宁市某屠宰场包虫感染的羊肝。无菌采集囊液和原头蚴,离心沉淀,用含青霉素、链霉素各1 000 IU/ml的生理盐水,将原头蚴冲洗4次(或用pH 7.2的PBS洗涤2次),用倒置相差显微镜观察原头蚴活力>95%(0.4%台盼蓝或用美蓝染色鉴别虫体死活并计数),筛取有活力的原头蚴,制成含4 000~6 000个原头蚴的悬液,4 ℃冰箱保存备用。

1.2 建立动物模型

1.2.1 实验动物 雌性健康成年新西兰大白兔共12只,体质量1.5~2.0 kg(SPF级),购自重庆市渝达实验兔场[许可证号:SCXK(渝)2005011]。雌性昆明小鼠共25只,6周龄,体质量18~20 g(SPF级),购自重庆医科大学实验动物中心,实验动物生产证号:SCXK(渝)200-0011,动物使用许可证号:SYXK(渝)2005-0011。以上动物均饲养于重庆医科大学实验动物中心。

1.2.2 实验动物接种 6周龄雌性小鼠20只分别腹腔接种接种原头蚴悬液(含2 000个原头蚴,青霉素1 000 U/ml,链霉素1 000 U/ml,生理盐水0.5 ml),另5只未接种原头蚴小鼠作为对照。新西兰大白兔8只经乙醚麻醉,腹部手术充分暴露腹腔,于肝脏右叶接种原头蚴悬液(含4 000个原头蚴,青霉素1 000 U/ml,链霉素1 000 U/ml,0.5 ml生理盐水),另4只未接种原头蚴的家兔作为对照。以上实验动物均饲养6个月后剖检。

1.3 接种原头蚴后观察实验动物生存情况

1.3.1 (不分段)肉眼观察 饲养6个月后处死实验动物,剖开小鼠和家兔腹腔观察动物体内成囊情况,测量包囊大小并计数。

1.3.2 光镜观察 选取从小鼠腹腔和家兔肝脏取出的棘球蚴囊,用10%多聚甲醛固定,石蜡包埋,HE染色并切片,光镜下观察囊壁结构并拍照。

2 结果

2.1 原头蚴接种后动物生存情况

正常对照组全部存活,状态良好。接种原头蚴小鼠2个多月后死亡1只,解剖未见腹腔内有囊泡样结构,剩余存活19只小鼠,腹部逐渐增大,行动迟缓,精神萎靡;家兔接种后3个月陆续死亡,至6个月时只剩4只,腹部增大不明显。

2.2 动物病变

2.2.1 小鼠接种结果 存活小鼠于喂养6个月后剖检,无菌操作打开腹腔,均见腹腔有囊泡样结构形成(图1),存活率和感染成功率为95%(19/20)。小鼠腹腔内有葡萄串样囊状物,与周围脏器无黏连,包囊呈乳白色,圆形,直径大小不等,大者近10 mm,最小者3 mm左右,平均大小4.6 mm;囊内充满透明液体;包囊数最少为1个,最多为52个,平均22个。正常对照组小鼠同样于喂养6个月后剖检,腹腔内未见囊泡样结构。

2.2.2 家兔接种结果 家兔喂养6个月后剖检,无菌操作打开腹腔,肝脏内有囊泡样结构,呈乳白色,直径5~10 mm,嵌在肝组织内(图2)。存活率和感染成功率为50%(4/8)。正常对照组肝脏未见囊泡样结构。



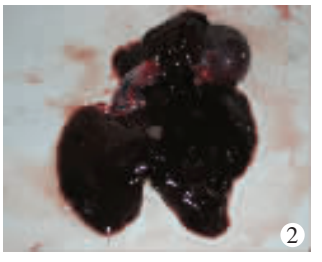


图1 原头蚴接种后6个月小鼠腹腔内囊泡大体观察

图2 原头蚴接种后6个月兔肝脏内囊泡大体观察

2.3 光镜观察

小鼠腹腔内形成的囊泡可见一层由类上皮细胞组成的单细胞层,细胞核染成蓝色,呈板层状的无细胞层,细胞层内侧上可见原头蚴(图3)。

家兔肝脏内的囊泡连同部分肝组织经切片染色后由里向外可见类上皮细胞层、透明的无细胞板层状结构、薄纤维层及肝组织层,类上皮细胞层内见颗粒样原头蚴(图4)。

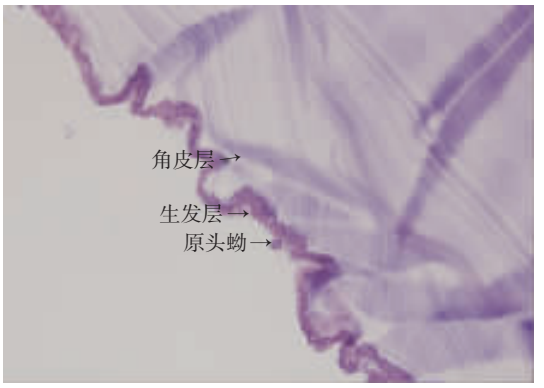


图3 光镜观察接种原头蚴6个月后小鼠腹腔内囊状结构 (HE ×100)



图 4 光镜观察接种原头蚴 6 个月后家兔肝脏内囊状结构 (HE ×100)

3 讨论

本实验证明,昆明小鼠腹腔感染棘球蚴原头蚴,感染成功率可达 95%,且在生发层内侧有原头蚴,这与有关文献报道的结果一致[8];接种原头蚴 2 个月后死亡的小鼠腹腔内未发现囊泡样结构,可能与接种时间太短以及小鼠自身不耐受有关,但其量大及易饲养的优点仍不适为良好包虫病动物模型。本实验用羊源棘球蚴分离的原头蚴人工接种至新西兰大白兔肝脏内,发现肝脏内有囊泡样结构,且与小鼠腹腔内棘球蚴和羊肝棘球蚴囊结构类似,即表现为生发层均为具有分泌功能的类上皮细胞,角皮层为典型的板层状结构,生发层内侧亦有原头蚴;虽部分兔于接种后陆续死亡,经解剖肝脏囊泡样结构尚未形成,推测可能与经历了手术创伤和其自身对病原的敏感性有关。对比 3 种动物体内形成的棘球蚴结构,本实验发现其棘球蚴生发层均由具有分泌功能的类上皮细胞构成,生发层细胞的多少与棘球蚴的成熟度有关,早期棘球蚴虽然原头蚴较少,但生发层细胞多,互相重叠,细胞呈低分化,但显示了极强的生长潜力;角皮层厚度以小鼠最薄、兔次之、羊肝内棘球蚴囊壁最厚,而原头蚴大小亦似有同样的规律,推测可能与实验动物体型有关。小鼠是传统的进行包虫病研究的适合模型[9],包括昆明小鼠、BALB/c 鼠及长爪沙鼠均可不同程度感染原头蚴[10-11],其具有易饲养、存活率高等优点,但由于小鼠体型较小,能获取的体液量也非常少,不能获得较多的血清;又加之其体内的棘球蚴没有原头蚴,囊液少,不能满足某些实验的要求。兔是啮齿类反刍动物,在生活史上与牛、羊处于同一级别,常常作为各种疾病的动物模型[12]。如果实验能选用兔作为包虫病模型,可获得较多的体液或者血清量用于进一步实验,而因其经济、便宜,也比羊、狗及猴等动物实验节省时间、人力、物力和财力,因此有关兔是否作为包虫病合适动物模型的研究有必要继续进行下去。由于棘球蚴自身生长慢,动物模型制备周期顺利者短至半年,长至 1 年或更久,感染棘球蚴后的动物若喂养不当极易死亡,实验进度极易受影响,所以有关动物包虫病动物模型饲养条件、饲料成分及营养等还需进一步探索。

参考文献:

[1] 许隆琪. 中国人体寄生虫分布与危害[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:230-241.

[2] 魏泓. 医学实验动物学[M]. 成都:四川科学技术出版社, 1998:378-384.

[3] Heinzmann D, Barbour A D, Torgerson P R. Compound processes as models for clumped parasite data[J]. Math Biosci, 2009, 222(1):27-35.

[4] Torgerson P R, Ziadinov I, Aknazarov D, *et al*. Modelling the age variation of larval protoscoleces of Echinococcus granulosus in sheep[J]. Int J Parasitol, 2009, 39(9):1031-1035.

[5] Sreekumar C, Kirubakaran A, Venkataramanan R, *et al*. Spontaneous primary intrathoracic, extrapulmonary hydatid cyst in a broiler rabbit[J]. Helminthologia, 2010, 47(3):193-195.

[6] Dailey M D, Sweatman G K. The taxonomy of Echinococcus granulosus in the donkey and dromedary in Lebanon and Syria[J]. Ann Trop Med Parasitol, 1965, 59(4):463-477.

[7] Connor R J. Experimental infection of mice with Echinococcus granulosus equinus of British origin[J]. Ann Trop Med Parasitol, 1980, 74(1):97-99.

[8] Verit A, Ozbilge H, Yeni E, *et al*. The experimental model of hydatidosis in rabbit testis. A preliminary study[J]. Urol lnt, 2004, 72(4):341-343.

[9] Hildreth M B, Granholm N H. Effect of mouse strain variations and cortisone treatment on the establishment and growth of primary echinococcus multilocularis hydatid cysts[J]. J Parasitol, 2003, 89(3):493-495.

[10] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗诱导小鼠的免疫保护力观察[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(13):1276-1279.

[11] Rosol T J, Tannehill-Gregg S H, LeRoy B E, *et al*. Animal models of bone metastasis[J]. Cancer, 2003, 97(3 Suppl):748-757.

[12] 夏宇, 黄英, 袁红欣, 等. 肥胖哮喘动物模型的建立[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(21):2055-2057.

(收稿 2010-10-11 修回 2010-12-29)

(编辑 王 红)