

郑瑞珠,罗杨志,张生元,等. 中型指环虫的体外培养方法的建立[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):187-189,195.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.048

中型指环虫的体外培养方法的建立

郑瑞珠¹, 罗杨志¹, 张生元^{1,2}, 喻运珍^{1,2}, 张立强², 艾桃山^{1,2}

(1. 武汉中博水产生物技术有限公司,湖北武汉 430070; 2. 武汉市农业科学技术研究院水产科学研究所,湖北武汉 430207)

摘要:从培养液、抗生素、寄生载体 3 个方面摸索了中型指环虫体外培养的条件,成功建立了中型指环虫体外培养方法,中型指环虫成虫在体外成功存活 6 d。结果表明,适合中型指环虫体外培养的寄生载体为 EPC 细胞,合适培养液浓度为用生理盐水等倍稀释的 M199 培养基(含 10% 胎牛血清),抗生素工作浓度为 50 U/mL 的青霉素及 50 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素。本研究首次解决了指环虫无法离体长期存活的问题,对指环虫的基础理论研究、驱杀药物筛选均具有非常重要的指导作用。

关键词:中型指环虫;体外培养;EPC 细胞

中图分类号: S941.52⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)23-0187-03

指环虫是一类引发鱼类寄生虫疾病的重要病原^[1],指环虫种类繁多,主要寄生于鱼鳃部,对鱼的致病力有较大的种属差异性^[2]。中型指环虫(*Dactylogyrus intermedius*)是寄生于鲫(*Carassius auratus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)鳃部一种较常见的指环虫,国内外均有报道,该虫的寄生不仅会破坏鳃的完整性^[3]、刺激黏液分泌亢进、引起鳃丝黏连及坏死,导致鱼类呼吸加速^[4-6],还能和其他种属的寄生虫共同侵染同一宿主的鱼并引起致病细菌和真菌的继发性感染,造成鱼类“烂腮病”临床症状,引起养殖鱼类大量死亡^[2]。

指环虫的驱虫药主要有甲苯咪唑、吡喹酮、阿维菌素、辛硫磷等,由于这些药物长期大规模地使用,导致指环虫产生了不同程度的抗药性,新药研制已迫在眉睫。而目前,指环虫驱虫药物的筛选主要通过观察鱼鳃上指环虫数量的方法^[7-12],但因指环虫的感染、发育受环境影响较大^[13],且指环虫必须寄生在鱼鳃或幼鱼鳍条上^[2],离体无法长期存活,这些因素极大地限制了该方法的实用性,因此合适的指环虫体外培养模型对指环虫的研究及其防治技术研究具有重要的应用价值和意义。目前,还没有指环虫体外培养的研究报道,本试验将以金鱼(*Carassius auratus*)鳃部的中型指环虫为研究对象,从培养液、抗生素及寄生载体 3 方面摸索中型指环虫体外培养条件,研究其在体外培养的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验鱼 本试验金鱼均购自于湖北省武汉市武昌区八一路花鸟市场,养在武汉市农科院水产所山南鱼池,试验前均养在盛有 24 h 曝气的自来水中。

收稿日期:2017-07-28

基金项目:湖北省重大科技创新计划(编号:2013ABA004)。

作者简介:郑瑞珠(1990—),女,湖北仙桃人,硕士,工程师,主要从事资源与环境微生物研究。E-mail:371265318@qq.com。

通信作者:艾桃山,正高职高级工程师,主要从事水产病害研究。E-mail:ats888@126.com。

1.1.2 细胞 本试验所用鲤鱼上皮瘤细胞(epithelima popuassum cuprini,EPC)为华中农业大学水产学院赠予。

1.1.3 培养基和主要试剂 M199 培养基(1 \times ,with L-glutamine & 15 mmol/L HEPES),购于 HyClone 公司;胎牛血清(FBS)和细胞胰酶消化液(1 \times ,0.25% Trypsin-EDTA),购于 Gibco 公司;其他化学试剂,均购于进口或国产分析纯。

细胞培养液:将 M199 细胞培养基与胎牛血清按 9:1(体积比)混匀,然后加入 1% 抗生素氨苄青霉素和链霉素,青霉素工作浓度为 100 U/mL,链霉素的工作浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

稀释液:无菌条件下,细胞培养液用灭菌的生理盐水(两栖类动物生理盐水为 0.65% 的 NaCl 溶液)稀释。

1.1.4 试验仪器 细胞培养皿、24 孔板,均购于 NEST 公司;细胞培养瓶,购于 NUNC 公司;细胞培养箱,购于 Thermo 公司;解剖镜 SMZ745T,购于 Nikon 公司,数码倒置显微镜 Dsz2000x,购于重庆留辉科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 EPC 细胞培养 无菌条件下,将经传代培养的 EPC 细胞重悬于细胞培养液中,调整细胞密度为 1.0×10^6 个/mL,取 1 mL 接种于 24 孔板中,置于细胞培养箱中培养,温度 25 $^{\circ}\text{C}$,通气 5% CO_2 。待细胞贴壁形成单层细胞后,弃去细胞培养液,用生理盐水洗 2 遍,加入 1.5 mL 稀释液,备用。

1.2.2 中型指环虫的收集 用 MS-222 将金鱼麻醉后,超净工作台用 75% 乙醇擦拭鱼体表面,取下鳃片用无菌水轻柔地漂洗 2 次,放在盛有少量无菌生理盐水的培养皿中,在解剖镜下将中型指环虫成虫从鱼鳃上剥离。

1.2.3 中型指环虫体外培养液摸索

1.2.3.1 细胞培养液对中型指环虫的影响 取 25 个从鱼鳃剥离的指环虫,分为 5 组,每组 5 个指环虫,置于等倍稀释(2 倍)不含抗生素的稀释液中培养,温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,每隔 24 h 显微镜下观察 1 次。

1.2.3.2 抗生素对中型指环虫的影响 取 55 个从鱼鳃剥离的指环虫,分为 11 组,每组 5 个指环虫,置于抗生素浓度逐步稀释的细胞培养液中培养,温度 25 $^{\circ}\text{C}$,每隔 24 h 显微镜下观察 1 次,其中,抗生素的工作浓度为 100 U/mL 青霉素和

100 μg/mL 链霉素为 1 ×。

1.2.3.3 中型指环虫的培养液摸索 取 55 个从鱼鳃剥离的指环虫,分为 11 组,每组 5 个指环虫,置于逐步稀释的稀释液中培养,温度为 25 ℃,每隔 24 h 显微镜下观察 1 次。

1.2.4 中型指环虫与 EPC 细胞共培养 将“1.2.2”节中剥离的虫体转至“1.2.1”节中 24 孔板于细胞培养箱中共培养,温度 25 ℃,每 24 h 于倒置显微镜下观察 1 次。

2 结果与分析

2.1 细胞培养液对中型指环虫的影响

由表 1 可知,细胞培养液(无抗生素)稀释后虽然可以延缓细菌繁殖速度,但最终还是无法控制,仍需添加抗生素;推测高浓度的细胞培养液可能不适合指环虫的生长。

表 1 细胞培养液(无抗生素)对中型指环虫的影响

组别	细胞培养液(无抗生素): 生理盐水(体积比)	结果
第 1 组	1 : 0	1 d,染菌,虫死
第 2 组	1 : 1	1 d,染菌,虫死
第 3 组	1 : 3	1 d,无菌,虫活;2 d,染菌,虫死
第 4 组	1 : 7	1 d,无菌,虫活;2 d,染菌,虫死
第 5 组	0 : 1	1 d,虫死

2.2 抗生素对中型指环虫的影响

由表 2 可知,未经生理盐水稀释的细胞培养液(无论是否添加抗生素)对中型指环虫的生存均有伤害;抗生素浓度在 0.3 × ~1.0 × 时,均有较好的抑菌效果。

表 2 抗生素浓度对指环虫的影响

组别	抗生素浓度	结果
第 1 组	0.0	1 d 后,染菌,虫死
第 2 组	0.1 ×	1 d 后,染菌,虫死
第 3 组	0.2 ×	1 d 后,菌少,虫死
第 4 组	0.3 ×	1 d 后,无菌,虫死
第 5 组	0.4 ×	1 d 后,无菌,虫死
第 6 组	0.5 ×	1 d 后,无菌,虫死
第 7 组	0.6 ×	1 d 后,无菌,虫死
第 8 组	0.7 ×	1 d 后,无菌,虫死
第 9 组	0.8 ×	1 d 后,无菌,虫死
第 10 组	0.9 ×	1 d 后,无菌,虫死
第 11 组	1.0 ×	1 d 后,无菌,虫死

2.3 中型指环虫的培养液摸索

由表 3 可知,体外培养条件适宜的为试验第 6、7 组,但考虑到高浓度抗生素和高浓度细胞培养液对中型指环虫的不利影响,故选择第 6 组为之后中型指环虫体外培养的培养液(细胞培养液与生理盐水体积比为 5 : 5,抗生素工作浓度为

表 3 不同浓度稀释液对中型指环虫的影响

组别	细胞培养液:生理 盐水(体积比)	结果
第 1 组	0 : 10	1 d:虫死
第 2 组	1 : 9	1 d:无菌,虫活;2 d:虫死
第 3 组	2 : 8	1 d:无菌,虫活;2 d:虫死
第 4 组	3 : 7	1 d:无菌,虫活,活力较好;2 d:虫死
第 5 组	4 : 6	1 d:无菌,虫活,活力较好;2 d:虫死
第 6 组	5 : 5	1 d:无菌,虫活,活力较好;2 d:无菌,虫活;3 d:虫死
第 7 组	6 : 4	1 d:无菌,虫活,活力较好;2 d:无菌,虫活;3 d:虫死
第 8 组	7 : 3	1 d:无菌,虫活,活力较好;2 d:虫死
第 9 组	8 : 2	1 d:虫死
第 10 组	9 : 1	1 d:虫死
第 11 组	10 : 0	1 d:虫死

50 U/mL 青霉素及 50 μg/mL 链霉素)。

2.4 中型指环虫与 EPC 细胞共培养

“2.3”节中,与生理盐水相比,中型指环虫可以在稀释液中存活 2 d,但仍时间不够长,推测中型指环虫离体培养的难点不仅是营养因素,还存在缺乏寄生载体的原因。

为了模拟鱼鳃表面,选择培养至形成单层细胞的鲤鱼上皮细胞(EPC)作为寄生载体,设计以下试验:取 30 个从鱼鳃剥离的中型指环虫,分为 6 组,包括 4 个对照组和 2 个试验组,每组 5 个指环虫,25 ℃ 培养,每隔 24 h 于显微镜下观察中型指环虫的状态。由表 4 可知,比较对照组 1、2,发现在没有 EPC 细胞作为寄生载体时,即便培养体系中添加培养液,5% CO₂ 仍会造成指环虫的死亡;比较对照组 3、4,发现在有或无 5% CO₂ 下,培养液可长期维持 EPC 细胞的形态不变;对比试验组 1、2,发现中型指环虫可以黏附在 EPC 细胞上,EPC 细胞可作为中型指环虫体外培养的寄生载体,并且在无 5% CO₂ 环境下的 EPC 细胞上附着存活更长时间。此外,图 1 为光镜下中型指环虫与 EPC 细胞体外共培养的形态观察图,80 倍目镜下拍摄,图 2 为光镜下中型指环虫体外作尺蠖运动的形态观察截图,80 倍目镜下拍摄,图 2 - A ~ 图 2 - L 分别为光镜下中型指环虫体外作尺蠖运动 0 ~ 11 s 时形态观察截图。

3 讨论

指环虫为卵生单性世代吸虫,结合前期研究者对单殖吸虫的生活史(除少数寄生在海水鱼体上的单殖吸虫具有中间宿主外,其他单殖吸虫生活史只有 1 个宿主)及食性研究(食物为上皮细胞、腺体分泌物、血液中的 1 种或几种)^[14],参考人类日本血吸虫的体外培养方法^[15],选择鲤鱼上皮瘤细胞作

表 4 EPC 细胞对中型指环虫的影响

组别	EPC	虫	培养液	生理盐水	5% CO ₂	结果
对照组 1	×	√	×	√	√	1 d 后虫死亡
对照组 2	×	√	√	×	√	1 d 后虫死亡
对照组 3	√	×	√	×	√	培养液维持 EPC 细胞形态长期不变
对照组 4	√	×	√	×	×	在无 CO ₂ 条件下,培养液可维持 EPC 细胞形态长期不变
试验组 1	√	√	√	×	√	1 d 后,部分虫可吸附在 EPC 细胞上;2 d 后,虫死亡
试验组 2	√	√	√	×	×	1 d 后,部分虫可吸附在 EPC 上;6 d 后,虫仍存活

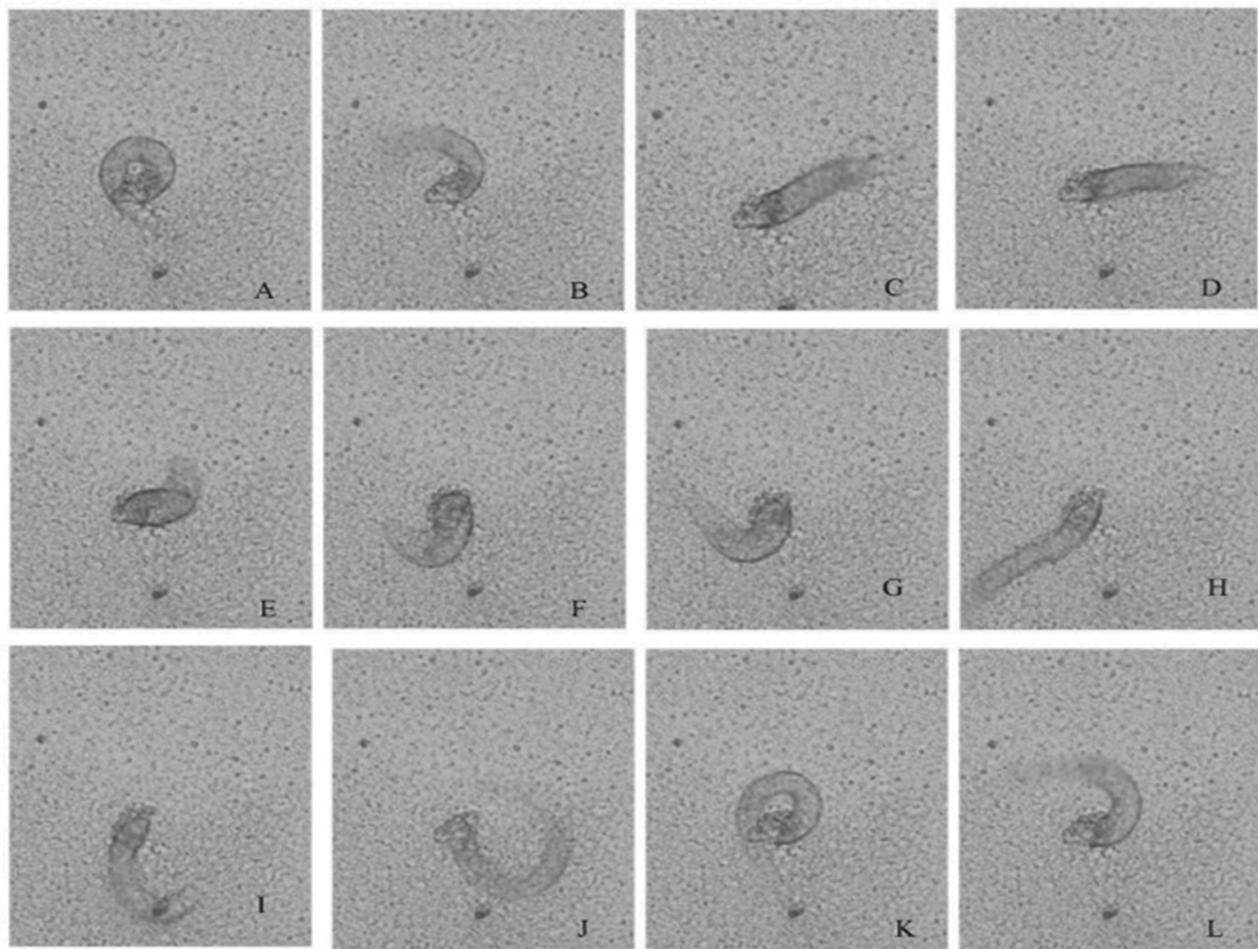
注:√表示在培养体系中含有该物质;×表示在培养体系中缺乏该物质。



图1 光镜下中型指环虫与 EPC 细胞体外共培养形态(80×)

为寄生载体,符合上皮细胞特性,且该细胞培养温度与指环虫最适生存温度一致。M199 培养基是培养鲤鱼上皮细胞的培养基,富含各种营养成分,并且试验过程发现,相同试验条件下,M199 培养基的稀释液比 RPMI1640 培养基稀释液培养出的中型指环虫活力更强。本研究在体外模拟指环虫在鱼鳃上寄生形态,成功构建了中型指环虫体外培养的方法及模型,并能让中型指环虫成虫在体外存活 6 d 以上。

本研究在体外中型指环虫与 EPC 细胞的共培养过程中



A~L 表示光镜下中型指环虫体外作尺蠖运动 0~11 s 时的形态观察截图(80×)

图2 光镜下中型指环虫体外作尺蠖运动的形态观察截图(80×)

发现,中型指环虫在无 5% CO_2 环境下,寄生在 EPC 细胞上的存活时间更长,推测这与指环虫在鱼鳃表面寄生而非体内寄生有关,推测指环虫对氧气浓度有需求,与指环虫耐低氧性较差^[16-17]一致。

中型指环虫和坏鳃指环虫是寄生在金鱼鱼鳃上的 2 种寄生虫,根据相同的方法在体外进行坏鳃指环虫与 EPC 细胞共培养,结果发现与中型指环虫相比,坏鳃指环虫较难附着在 EPC 细胞上,并且存活时间短于中型指环虫,推测可能与指环虫对宿主有较强的特异性有关^[18]。

本研究在中型指环虫与 EPC 细胞的共培养过程中,观察到在 EPC 细胞上附着的中型指环虫虽然具有很好的活性,但很少或几乎不排卵,并保持成虫形态直至死亡,这种现象与人体血吸虫体外培养产卵数量少且均为不正常卵的结果^[19]类似。现有研究结果表明,人工干扰或不利的环境条件通常会

导致单殖吸虫虫体集中大量产卵^[20],并且离体条件下的产卵速率通常与在体条件下的不同^[14],推测本研究的体外培养方法虽为中型指环虫的生存提供比较好的营养条件及生存环境,但不能满足中型指环虫生殖的生理需求,因而中型指环虫产卵少或不产卵。

该方法的建立解决了指环虫必须寄生在鱼鳃或幼鱼鳍条上^[2],无法离体长期存活的问题。如果可以在体外培养指环虫 1 个世代周期,不仅有利于克服指环虫研究采样难的限制,还能缩短指环虫驱杀药物创制研究的周期。

参考文献:

- [1] Woo P K. Fish diseases and disorders: protozoan and metazoan infections[M]. London: CAB International, 2006: 791.

(下转第 195 页)

一个合理的水平,没有过高或过低。

血清碱性磷酸酶活性常作为重要的生化检测指标,与骨骼组织的钙磷代谢及肠道中钙结合蛋白含量有关,血清碱性磷酸酶活性低意味着肌肉组织三磷酸腺苷(ATP)的分解减少,同时血钙和血磷水平相继下降^[13-14]。本试验结果与之吻合,在日粮代谢能水平相同的情况下,血清碱性磷酸酶含量随粗蛋白质水平的降低而逐渐减少,说明其碱性磷酸酶活性进一步降低,血清中钙和磷的含量也处于较低水平。试验鸭血清钙、血清磷含量在不同组间存在着显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)的差异,且都是日粮钙水平为1.06%、总磷水平为0.76%的A₅组最高,但是没有随着日粮钙、磷水平变化而变化的趋势。可能是因为血清钙水平受日粮钙含量影响极小,当血清钙含量低时,刺激甲状旁腺激素把骨中的钙释放入血,减少尿中排泄,增强肠道对钙的吸收,维持血清中钙平衡^[15]。

4 结论

日粮中不同代谢能、粗蛋白质、钙和磷的水平能够对1~21日龄黑羽番鸭生长性能和血液生化指标产生一定的影响,可以通过营养调控来提高黑羽番鸭的生长发育,且1~21日龄黑羽番鸭代谢能、粗蛋白质、钙、有效磷和总磷的营养需要量分别为11.72 MJ/kg、20.49%、1.05%、0.6%和0.71%。

参考文献:

- [1]王光瑛,李 昂,王长康. 番鸭养殖新技术[M]. 福州:福建科学技术出版社,1999:25-27.
- [2]孙国波,吉文林,陈章言,等. 黑羽番鸭肌肉矿物元素、营养物质
- [3]Jalali B, Barzegar M. Dactylogyrids (Dactylogyridae: Monogenea) on common carp (*Cyprinus carpio* L.) in freshwaters of Iran and description of the pathogenicity of *D. sahuensis* [J]. Journal of Agricultural Science & Technology, 2005, 7: 9-16.
- [4]Reed P A, Francis - Floyd R, Klinger R C. FA28/FA033: monogenean parasites of fish[M]. [S. l.]: [s. n.], 2009: 36-48.
- [5]汪开毓,姚 璐,谢嘉宾,等. 独活活性单体对中型指环虫的杀灭作用及其成分鉴定[J]. 水生生物学报, 2012, 36(1): 93-101.
- [6]Rahanandeh M, Sharifpour I, Jalali B, et al. Survey on Dactylogyrosis in Caspian Frisian Roach (*Rutilus frisii kutum*) caused by *Dactylogyrus frisii* [J]. Global Veterinaria, 2010, 4: 515-518.
- [7]王高学,程 超,陈安良,等. 22种植物提取物及其6种化合物对鱼类指环虫的杀灭研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(12): 2567-2573.
- [8]王高学,徐 钰,王建华,等. 29种天然植物提取物对指环虫杀灭作用的研究[J]. 淡水渔业, 2006, 36(3): 3-8.
- [9]王高学,赵良炜,李 军. 17种天然植物提取物杀灭鱼类指环虫研究[J]. 动物医学进展, 2009, 30(6): 21-24.
- [10]王高学,赵云奎,申烨华,等. 25种植物提取物杀灭鱼类指环虫活性研究[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2011, 41(1): 73-76.
- [11]Schmahl G, Mehlhorn H. Treatment of fish parasites: 1. Praziquantel

- 含量测定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 209-211, 243.
- [3]吉文林,段修军,董 颺,等. 黑羽番鸭屠宰性能及肉品质的研究[J]. 西南农业学报, 2013, 26(2): 795-797.
- [4]钱建中,段修军,卞友庆,等. 不同性别黑羽番鸭屠宰性能、常规肉品质分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 164-166.
- [5]林上槐,李海峰,阮美英,等. 商品代黑番鸭饲料适宜蛋白质水平的试验[J]. 饲料广角, 2009(11): 31-32.
- [6]张建华,戴求仲,蒋桂韬,等. 1~3周龄黑羽公番鸭代谢能和粗蛋白质需要量的研究[J]. 动物营养学报, 2012, 24(8): 1469-1476.
- [7]王福林,陈胜昌,罗 欢. 早养模式黑番鸭0~21 d能量与粗蛋白需要的研究[J]. 饲料工业, 2017, 38(2): 50-54.
- [8]薛志成. 法国番鸭饲养要点[J]. 农家科技, 2006(1): 17.
- [9]刘星亮,杨敏成. 法国番鸭及杂一代商品鸭饲料适宜蛋白质水平的研究[J]. 湖南畜牧兽医, 1999(4): 7-9.
- [10]陶争荣,卢立志,沈军达,等. 番鸭的特性与饲养管理[J]. 中国家禽, 2005, 27(11): 44.
- [11]余红心,刘 丽,贾俊静,等. 不同蛋白水平饲料对云南武定鸡生长性能及血液生化指标的影响[J]. 饲料博览(技术版), 2008(2): 5-8.
- [12]李 振. 鸡蛋中胆固醇含量的营养调控措施[J]. 饲料工业, 2004, 25(3): 13-16.
- [13]杨文正. 动物矿物质营养[M]. 北京:中国农业出版社, 1996.
- [14]史东杰,梁拥军,饶 青,等. 锦鲤胚胎发育过程中几种代谢酶活性及丙二醛含量的变化[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(11): 120-122.
- [15]王凤来,张曼夫,陈清明,等. 日粮磷和钙磷比例对小型猪(香猪)血清、肠、骨碱性磷酸酶及血清钙磷的影响[J]. 动物营养学报, 2001(1): 36-42.
- effective against Monogenea (*Dactylogyrus vastator*, *Dactylogyrus extensus*, *Diplozoon paradoxum*) [J]. Zeitschrift Fur Parasitenkunde, 1985, 71: 727-737.
- [12]Katharios P, Papandroulakis N, Divanach P. Treatment of *Microcotyle* sp. (Monogenea) on the gills of cage-cultured red porgy, *Pagrus pagrus* following baths with formalin and mebendazole [J]. Aquaculture, 2006, 251(2/3/4): 167-171.
- [13]Koskivaara M. Environmental factors affecting monogeneans parasitic on freshwater fishes [J]. Parasitology Today, 1992, 8(10): 339-342.
- [14]张效平. 坏鳃指环虫人工感染系统的建立和杀虫药物的筛选[D]. 北京:中国科学院大学, 2014.
- [15]周述龙. 血吸虫学[M]. 北京:科学出版社, 2001.
- [16]Chubb J C. Seasonal occurrence of helminths in freshwater fishes. Part I. Monogenea [J]. Advances in Parasitology, 1977, 15: 133-199.
- [17]吴宝华,朗 所,王俊伟. 中国动物志[M]. 北京:科学出版社, 2000: 756.
- [18]Lambert A, Gharbi S E. Monogenean host specificity as a biological and taxonomic indicator for fish [J]. Biological Conservation, 1995, 72: 227-235.
- [19]周述龙. 日本血吸虫体外培养的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1989, 7(1): 61-63.
- [20]Bychowsky B E. Monogenetic trematodes, their classification and phylogeny [M]. Moscow: Leningrad, 1957: 85-107.

(上接第189页)