

# 棘球绦虫分子分类的研究进展

马金友<sup>1,2</sup> 彭文峰<sup>2</sup>

- 1. 453003 河南省 新乡市 河南科技学院动物科学学院
- 2. 361005 福建省 厦门市 厦门大学生命科学学院

**摘要** 目的:本文介绍了基因型分析、分子标记、DNA 杂交及序列测定等技术运用于棘球绦虫分子分类的研究进展。

**关键词:**棘球绦虫 分子分类

**中图分类号:**R532.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1003 - 6245(2007)02 - 0093 - 03

## Research Progress on Molecular Classification of Echinococcus

MA Jin - you<sup>1,2</sup>, PENG Wen - feng<sup>2</sup>

(1. College of Animal Science, Henan Institute of Science Technology, Xinxiang 453003, China;

2. College of Life Sciences, Xiamen University, xiamen 361005, China)

**Abstract:** In this paper, the research progress was summarized that molecular classification of Echinococcus was studied by analysis of genotype, molecular markers, DNA hybridization and sequence analysis, et al.

**Key word:** Echinococcus; Molecular Classification

包虫病是世界上严重危害人畜健康的人兽共患寄生虫病之一<sup>[1,2]</sup>。据资料记载,最早发现的棘球绦虫是寄生于人体内的棘球绦虫幼虫(棘球蚴),当时称其为“充满了水的肝脏”。十七世纪报道了动物的棘球蚴病后才猜测到人体包虫病是由动物寄生虫所引起,并从囊肿的里面发现了带有小钩的头节,认为是带虫类。

自从 Rudolphi 将棘球绦虫属(Echinococcus)从多头绦虫属(Polycephal)分离出来<sup>[3]</sup>,正式建立独立的一个属以来,人们对棘球绦虫属内虫种的分类就一直存在着争论,尤其是种与种以下阶元之间的分类关系。20 世纪 50 年代,Vogel 和 Rausch 等人将多房棘球绦虫(*E. multilocularis*)、分布于南美的少节棘球绦虫(*E. oligarthrus*)和福氏棘球绦虫(*E. vogeli*)各自立为独立种,而将散布于全世界的其他棘球绦虫种群统归为细粒棘球绦虫(*E. granulosus*)之后,争论渐趋平息,并获得学者们的公认<sup>[4~6]</sup>。

关于棘球绦虫的分类,长期以来一直以形态结构作为主要的分类指标,如果形态结构变异不能达到差异显著性,就不能确认为一个独立的种。后来发现在分类中被认为是同一个种的种下阶元其致病性、流行病学特征、发育历程等都存在着较大的区

别,加之形态学分类法的不统一性,使得人们重新考虑棘球绦虫的分类方法。随着生物技术的发展,形态结构和其它特征相结合逐渐成为分类学上解决近似种分类的一种方法。棘球绦虫不同种及亚种有不同的流行病学特征,其致病性也存在较大差异,其分类学研究必须在掌握多项指标的情况下重新鉴定新种和虫株,以揭示其生物学、遗传学和生理学特征,了解不同地域和不同宿主的变异特点。这不仅促进寄生虫分类学的进展,而且对我们认识棘球绦虫和棘球蚴病的流行病学及找出合理的预防措施有重要意义。目前,棘球绦虫的分子生物学分类方法,主要从染色体、蛋白质、核酸方面入手,运用核型分析、同工酶电泳、原位杂交、酶切片分析、序列测定等技术,揭示棘球绦虫种株之间的关系。

### 1 基因型分析与棘球绦虫的分类

染色体在物种分类上具有重要作用。对于同一物种来说,染色体数目是恒定不变的,但染色体数目和形态特征对鉴别物种之间的亲缘关系,特别是对近缘物种的分类常常具有重要意义<sup>[7]</sup>。染色体主要应用于种及种以上阶元的分类,而基因型在棘球绦虫分类中的研究主要是种以下的分类,涉及种之间的分类较少。根据基因型的差异,人们将细粒棘球绦虫分为 G1 到 G9 9 种不同地理株,其终寄主和中间寄主稍有相同<sup>[8~10]</sup>。另外,Furuya 等比较了多房棘球绦虫和细粒棘球绦虫染色体数目和形态的差

**作者简介:**马金友,男,1968 年,河南信阳人,讲师;博士;研究方向:寄生虫学。

异<sup>[11-13]</sup>。

## 2 分子标记与棘球绦虫的分类

分子标记在棘球绦虫种株鉴定方面的应用较为广泛。McManus 早在 1985 年即用 PCR-RFLP 技术对细粒棘球绦虫进行了研究<sup>[14]</sup>, Bowles 用此方法快速鉴别棘球属绦虫的种和株<sup>[15]</sup>, 任敏等运用基因组 DNA 的 RFLP 分类学鉴定方法, 比较了四川与宁夏两地区泡球蚴的酶切图谱的不同, 并说明与细粒棘球绦虫的带型存在属间同源性<sup>[16]</sup>。陈伟根据细粒棘球绦虫特异的 DNA 片段 pHD5 作为探针, 通过 Southern blot 杂交分析表明它不与多房棘球绦虫 DNA 杂交, 从而区分细粒棘球绦虫与多房棘球绦虫, 同时, 将各流行区细粒棘球绦虫虫株进行区别与鉴定<sup>[17]</sup>。李新兰等用 pSM 889 探针对来源于新疆、宁夏和四川的多房棘球绦虫原头节 DNA 进行了限制性酶切片长度多态性的分析, 三个不同地区来源的多房棘球绦虫 DNA 样本经 BamHI 酶切后与 pSM889 杂交产生的杂交图形基本一致, 经 EcoRI 酶切后与 pSM 889 杂交产生的图型显示出新疆和四川的多房棘球绦虫样本基本一致, 而宁夏样本与前二者略有不同<sup>[18]</sup>。李文妹等通过 RAPD 分析, 有三对引物扩增出细粒棘球绦虫与多房棘球绦虫存在显著差异<sup>[19]</sup>。Gasser 等通过单链构象多态性(SSCP)对细粒棘球绦虫不同的株和棘球绦虫属不同的种进行了比较, 发现细粒棘球绦虫不同的株之间差异较小, 不同的种之间差异较大<sup>[20]</sup>。

## 3 mtDNA 与棘球绦虫分类

mtDNA 基因常被应用于分类和系统发生研究, 线粒体 DNA 测序法也被用于检测棘球绦虫属的遗传变异。通过线粒体的不同亚单位核苷酸和氨基酸顺序的比较, 估计检测到的线粒体基因型的变化程度, 为有关基因组群之间关系提供了大量的信息。对于系统发育重建, 就是构建以分子数据为基础的分子进化树, 它可以精确地反应物种间和群体间在进化过程中发生的极微细的遗传变异(小至一个氨基酸或一个核苷酸的差异)。依据棘球绦虫 mtDNA 分子序列结构的比较分析, 系统树能反映棘球绦虫种和种以下阶元的自然演化系统分类体系。Bowles 通过对棘球绦虫属中 Co1 分析发现了 Co1 的 11 个不同的分序列, 而被检查的 366 个核苷酸位置中, 发现有 76 处核苷酸变异。在细粒棘球绦虫种内发现了相当有意义的 Co1 序列的变异, 49 个被测细粒棘球绦虫分离物可被划分为 7 个独立的组; 而在多房棘球绦虫分离物的 Co1 序列中仅发现了分为两组的微小变异。同时确认了细粒棘球绦虫虫株型的复杂性及棘球绦虫属虫株型的结论, 并发

现棘球绦虫属种间差异的程度并不明显大于细粒棘球绦虫遗传上确定的“亚种”的组间差异程度<sup>[21]</sup>。只要 DNA 靶区域选择的合适, 可与其他方法一样用于确定棘球绦虫属的种和株在分类学上的地位和相互关系。Nickisch-Rosenegk 等观察棘球绦虫 12S rDNA 序列中约有 440bp 的部分具有同源性, 由此构建一对棘球绦虫高度特异性的引物, 用这对引物扩增的片段来比较细粒棘球绦虫和多房棘球绦虫序列的差异, 并列出了它们的系统发生关系<sup>[22]</sup>。Kamenetzky 等比较了细粒棘球绦虫不同地理区域的虫种 mtDNA 中的 Co1 之间的序列差异, 发现同一株不同地理区域的虫种序列中的碱基变化较小<sup>[23]</sup>。此外, Le 和 Bowles 等运用 mtDNA 的其它基因比较了棘球绦虫同一种不同株和不同种的之间的序列差异和系统发生<sup>[24-26]</sup>。

## 5 rRNA 基因

真核生物的 rDNA 是一个多基因家族, 它包含许多能够编码 18S、5.8S 和 28S 重复序列单元, 其间有两个间隔序列(ITS1、ITS2)。为在基因水平上研究棘球绦虫种间和种内的变异, 人们用编码核糖体 RNA 的 DNA 序列和核糖体 RNA 间隔序列对棘球绦虫进行分析。即对编码核糖体 RNA 的 DNA 序列进行分析和利用核酸基因组 rDNA 的 ITS 区域做遗传标记, 同时结合限制性酶切将棘球绦虫分离物快速、简单的区分开来。从使用的内切酶对序列所作的 DNA 序列分析显示, 足以反映出棘球绦虫属内种和株的明显区别, 且不受因环境和宿主因素所导致的寄生虫表型变异的干扰<sup>[15]</sup>。van Herwerden 等扩增了棘球绦虫属 4 个种和细粒棘球绦虫 8 个地理株的 ITS1 序列, 通过比对发现: 棘球绦虫在发育中至少有两次 DNA 出现变化并存在较大的异质性。少节棘球绦虫(*E. oligarthrus*)和福氏棘球绦虫(*E. vogeli*)与多房棘球绦虫和细粒棘球绦虫 8 个地理株之间存在较大差异, 而多房棘球绦虫和细粒棘球绦虫 8 个地理株之间的差异则较小<sup>[27]</sup>。

## 6 结 语

由于棘球绦虫的终寄主和中间寄主较多, 有很多问题仍然缺乏完整、有说服力的证据, 其种株分析鉴定今后仍是一个较为复杂的课题。随着分子生物学技术的发展, 分子水平的分类对棘球绦虫种株鉴定提供了一种强有力的工具, 但棘球绦虫种株的确立, 需靠多种方法作综合分析, 方可确立一个新的棘球绦虫种株。另外, 通过分子生物学技术的运用, 重组抗原等的研究对棘球蚴病的诊断和疫苗发展也起了促进作用, 而且对我们认识棘球绦虫和棘球蚴病

的流行病学及找出合理的预防措施有重要意义。

## 参 考 文 献

- 1 蒋次鹏. 我国包虫病流行现状. 中国寄生虫病防治杂志, 1996, 9(4): 290 ~ 294
- 2 Gottstein B, Reichen J. Echinococcus hydatidosis Manson's Tropical Diseases. 20th ed. London: Saunders, 1996, 1496 - 1508.
- 3 Kumaratilake LM, Thompson RCA. A review of the taxonomy and speciation of the genus Echinococcus Rudolphi 1801. Z. Parasitenk., 1982, 58: 121 - 146.
- 4 Vogel H. Über den Echinococcus multilocularis Süddeutschlands. I. Das Bandwurmstadium Van Stammes menschlicher and tierischer Herkunft. Zeit. Tropenmed. Parasit., 1957, 8: 404 - 454.
- 5 Yamaguti S. Systema Helminthum Vol. II. The Cestodes of Vertebrates. Interscience Publishers, Inc. New York. 1959, 441 - 442.
- 6 Rausch R. Studies on the helminth fauna of Alaska. XX. The histogenesis of the alveolar larva of Echinococcus species. Journal of Infectious Disease, 1954, 94: 178 - 180.
- 7 张玉静. 分子遗传学. 北京: 科学出版社, 2000, 21 - 22
- 8 Romig T. Epidemiology of Echinococcosis. Langenbecks Arch. Surg., 2003, 388: 209 - 217.
- 9 Thompson RCA, Lymbery AJ, Constantine CC. Variation in Echinococcus: towards a taxonomic revision of the genus. Adv. Parasitol. 1995, 35: 145 - 176.
- 10 Scott JC, Stafaniak J, Pawlowski ZS, et al. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of Echinococcus granulosus. Parasitology, 1997, 114: 37 - 43.
- 11 Furuya K. An established cell line of larval Echinococcus multilocularis. Inter. J. Parasitol., 1991, 21: 233 - 240.
- 12 Smyth JD. The chromosome number of Echinococcus granulosus. J. Parasitology, 1962, 48: 544.
- 13 陆家海, 孔长青, 郭中敏, 等. 人源细粒棘球蚴染色体测定. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(5): 73 ~ 75
- 14 McManus DP, Knight M, Simpson AJ. Isolation and characterization of nucleic acids from the hydatid organisms, Echinococcus spp. Mol. Biochem. Parasitol., 1985, 16: 251 - 266.
- 15 Bowles J, McManus DP. Rapid discrimination of Echinococcus species and strains using a PCR - based RFLP method. Mol. Biochem. Parasitol. 1993, 57: 231 - 239.
- 16 任敏, 邱加闽, 黄启华. 四川与宁夏两地区泡球蚴基因组 DNA 酶切片段长度多态性的初步分析. 实用寄生虫病杂志, 1995, 3(1): 10 ~ 12
- 17 陈伟, 薛海筹, 裘丽姝, 等. 细粒棘球蚴 DNA 探针 pHD5 特异性的研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1996, 1: 62.
- 18 李新兰, 牛新玲, 依斯拉音. 我国不同地区多房棘球蚴原头节 DNA 杂交分析. 地方病通报, 1995, 10(2): 17 ~ 18
- 19 李文姝, 史大中. 细粒棘球蚴和多房棘球蚴的随机扩增多态性 DNA 分析. 地方病通报, 2001, 16(2): 4 ~ 6
- 20 Gasser RB, Zhu XQ, McManus DP. Display of sequence variation in PCR - amplified mitochondrial DNA regions of Echinococcus by single - strand conformation polymorphism. Acta Tropica, 1998, 71: 107 - 115.
- 21 Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus Echinococcus identified by mitochondrial DNA sequencing. Mol Biochem Parasitol, 1992, 54(2): 165 - 173.
- 22 von Nickisch - Rosenegk M, Silva - Gonzalez R, Lucius R. Modification of universal 12S rDNA primers for specific amplification of contaminated Taenia spp. (Cestoda) gDNA enabling phylogenetic studies. Parasitol Res, 1999, 85: 819 - 825.
- 23 Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, et al. Echinococcus granulosus: DNA Extraction from Germinal Layers Allows Strain Determination in Fertile and Nonfertile Hydatid Cysts. Experimental Parasitology, 2000, 95: 122 - 127.
- 24 Le TH, Pearson MS, Blair D, et al. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse - dog and sheep - dog strains of Echinococcus granulosus. Parasitology, 2002, 124: 97 - 112.
- 25 Bowles J, McManus DP. NADH dehydrogenase gene sequences compared for species and strains of the genus Echinococcus. Int. J. Parasitol., 1993, 23: 969 - 972.
- 26 Bowles J, Blair D, McManus DP. A molecular phylogeny of the genus Echinococcus. Parasitology, 1995, 110: 317 - 339.
- 27 van Herwerden L, Gasser RB Blair D. ITS - 1 ribosomal DNA sequence variants are maintained in different species and strains of Echinococcus. Inter. J. Parasitol., 2000, 30: 157 - 169.

## 2007 年《中国热带医学》征订启事

《中国热带医学》杂志(China Tropical Medicine)是经国家科学技术部批准,由中华人民共和国卫生部主管,中华预防医学会和海南省疾病预防控制中心主办的国家级中华预防医学会系列杂志。月刊,大 16 开,128 页,国际刊号:ISSN 1009 - 9727。国内刊号:CN 46 - 1064R。本刊现为中国学术期刊综合评价数据库统计期刊,中国生物医学文献数据库、万方数据库数字化期刊群、中国核心期刊(遴选)数据库、中国期刊全文数据库等国内数据库来源期刊,被 MEDLINE, CAB International, 美国化学文摘社期刊等国际文献检索系统文摘期刊收录。2006 年 4 月进入中国科技核心期刊。

本刊主要报道寄生虫病、病毒、细菌性疾病、地方病、皮肤与性传播疾病、环境与职业卫生、食品与营养、中毒、健康教育等热带病防治、研究成果、公共卫生和妇幼保健等经验,介绍国内外在热带病防治与研究中的新技术、新进展及发展趋势,并力求促进国内外的学术交流与合作。本刊主要设论著、疾病控制、临床诊治、监督监测、检验技术、传统医学、食品与营养、生殖与性健康、媒介防制、研究进展(综述)、公共卫生、科研与教学、理论探讨、国内外学术动态、科技信息(含译文)等栏目。

本刊每期定价 15 元(国内), \$10 美元(国外),全年 180 元(国内), \$120(国外)欢迎订阅。

订阅方式:1. 全国各地邮局:邮发代号:84 - 20

2. 《中国热带医学》编辑部,地址:海南省海口市海府路 44 号,邮政编码:570203

电 话:0898 - 65377298,传 真:0898 - 653221969(自动)

电子信箱:ctmfff@vip.163.com,ctmfff@163.com