

华支睾吸虫卵的形态变化、存活状况与胆囊结石形成的关系

乔铁, 罗小兵, 马瑞红, 郑培明, 罗振亮, 杨柳青

■背景资料

胆囊结石是一种常见的多因素疾病, 其发病机制仍不清楚。有报道认为华支睾吸虫感染与胆囊结石密切相关, 但具体机制有待研究。在胆囊结石中发现华支睾吸虫卵提示虫卵可能在结石形成过程中起到一定作用。

乔铁, 罗小兵, 马瑞红, 郑培明, 罗振亮, 杨柳青, 广州市番禺区胆囊疾病研究所 广东省广州市 511430

乔铁, 罗小兵, 马瑞红, 郑培明, 罗振亮, 杨柳青, 广州市南沙区第六人民医院 广东省广州市 511430

乔铁, 副主任医师, 主要从事胆道疾病和胆道微创外科的研究。

作者贡献分布: 本文由乔铁构思设计; 罗小兵完成写作; 马瑞红、郑培明、罗振亮及杨柳青完成实验与数据收集。

通讯作者: 乔铁, 副主任医师, 511430, 广东省广州市番禺区大石街岗东路88号, 广州市番禺区胆囊疾病研究所。fqj1958@163.com
电话: 020-84784457

收稿日期: 2013-08-23 修回日期: 2013-10-04

接受日期: 2013-10-15 在线出版日期: 2013-11-28

Relationship between morphological changes and survival status of *Clonorchis sinensis* eggs and gallstone formation

Tie Qiao, Xiao-Bing Luo, Rui-Hong Ma, Pei-Ming Zheng, Zhen-Liang Luo, Liu-Qing Yang

Tie Qiao, Xiao-Bing Luo, Rui-Hong Ma, Pei-Ming Zheng, Zhen-Liang Luo, Liu-Qing Yang, Institute of Gallbladder Diseases of Panyu District, Guangzhou 511430, Guangdong Province, China

Tie Qiao, Xiao-Bing Luo, Rui-Hong Ma, Pei-Ming Zheng, Zhen-Liang Luo, Liu-Qing Yang, the Sixth People's Hospital of Nansha District, Guangzhou 511470, Guangdong Province, China

Correspondence to: Tie Qiao, Associate Chief Physician, Institute of Gallbladder Diseases of Panyu District, 88 Gangdong Road, Dashi Street, Fanyu District, Guangzhou 511430, Guangdong Province, China. fqj1958@163.com

Received: 2013-08-23 Revised: 2013-10-04

Accepted: 2013-10-15 Published online: 2013-11-28

Abstract

AIM: To explore the relationship between *Clonorchis sinensis* (*C. sinensis*) infection and gallstone formation by observing the morphology and survival status of *C. sinensis* eggs in gallbladder bile, biliary sludge and gallstones from gallstone patients with *C. sinensis* infection.

METHODS: Twenty gallstone patients with *C. sinensis* infection were enrolled in this study. Their gallbladder bile, biliary sludge and gallbladder stones were collected to observe the

morphology of *C. sinensis* eggs using optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM). Von Kossa staining and X-ray energy dispersive spectroscopy were used to analyze the calcium content on the surface of eggs and the substance surrounding them. Trypan blue staining was used for evaluating the survival rate of eggs.

RESULTS: In gallbladder bile, 88.3% of *C. sinensis* eggs had typical morphology, while 56.7% of eggs in biliary sludge and 91.5% in stones were deformed (including changes in shape and size, egg cover loss, invisible internal miracidia and adhesion bilirubin on the surface or in their surroundings). Under SEM, egg shell showed an uneven texture shape, and its surface and surroundings were adhered with mucus-like substances in varying degrees. The calcium content of egg surface and surroundings gradually increased from the bile, biliary sludge to stones. The survival rates of eggs in bile, biliary sludge and stones were 86.6%, 42.1% and 11.5%, respectively.

CONCLUSION: In patients infected with *C. sinensis*, *C. sinensis* eggs can remain in the gallbladder by their uneven texture-like egg shell and mucus-like substance from the biliary tract. Eggs can be further deformed, degenerated, and even calcified to nucleation, resulting in the formation of biliary sludge and participating in gallstone formation.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Gallstones; Biliary sludge; Bile; *Clonorchis sinensis*; Morphology; Calcification

Qiao T, Luo XB, Ma RH, Zheng PM, Luo ZL, Yang LQ. Relationship between morphological changes and survival status of *Clonorchis sinensis* eggs and gallstone formation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(33): 3638-3646 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3638.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i33.3638>

■同行评议者

巩鹏, 教授, 大连医科大学附属第一医院普外二科; 李胜, 研究员, 山东省肿瘤防治研究院肝胆外科

摘要

目的: 观察胆囊结石合并华支睾吸虫感染患者的胆囊胆汁、胆泥及结石中的华支睾吸虫卵形态和存活状况, 探讨华支睾吸虫感染与胆囊结石的关系。

方法: 选取20例胆囊结石合并华支睾吸虫感染患者的胆囊胆汁、胆泥及结石标本, 行光学显微镜、扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察其中的华支睾吸虫卵形态; 进一步用Von Kossa染色和X射线能谱仪分析虫卵表面及其周围物质的钙盐含量、台盼蓝(Trypan blue)染色观察虫卵的存活情况。

结果: (1)胆汁中88.3%的虫卵具有典型形态, 而胆泥中56.7%的虫卵和结石中91.5%的虫卵出现变形(包括外形、大小改变, 卵盖丢失、卵内毛蚴看不清、表面或四周吸附胆红素); 电镜下, 卵壳为凹凸不平的纹理状结构, 表面和周围不同程度黏附有黏液样物质; (2)从胆汁、胆泥到结石, 虫卵表面及其周围物质的钙盐含量逐步增多; (3)胆汁、胆泥和结石中虫卵的存活率分别是86.6%、42.1%和11.5%。

结论: 人体感染华支睾吸虫后, 虫卵可通过卵壳的纹理状结构和胆道的黏液样物质储留于胆囊内并发生变形、变性、死亡以至钙化成核, 形成胆泥, 进而参与形成胆囊结石。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胆囊结石; 胆泥; 胆汁; 华支睾吸虫; 形态; 钙化

核心提示: 人体感染华支睾吸虫后, 华支睾吸虫卵可通过表面的纹理状结构和胆道的黏液样物质较长时间储留于胆囊内并发生变形、变性、死亡以至钙化成核, 进而参与形成胆囊结石。

乔铁, 罗小兵, 马瑞红, 郑培明, 罗振亮, 杨柳青. 华支睾吸虫卵的形态变化、存活状况与胆囊结石形成的关系. 世界华人消化杂志 2013; 21(33): 3638-3646 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3638.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i33.3638>

0 引言

华支睾吸虫病是由华支睾吸虫寄生在人体的肝胆管内所引起的以肝胆病变为主的一种人兽共患性寄生虫病, 人群主要通过生食或半生食含有华支睾吸虫囊蚴的淡水鱼虾感染此病^[1-3]。据报道, 全球约有3500万例感染该病, 而中国约有

1500万例, 广东省是主要流行区之一, 感染率达16.42%^[4-6]。

研究表明, 华支睾吸虫成虫可造成人体胆道的损伤和局部炎症、纤维化, 导致胆管炎、胆囊炎、胆管结石、甚至诱发胆管上皮癌、肝细胞癌^[7-9]。胆囊结石与华支睾吸虫感染的密切关系已有报道^[10,11], 但其致病机制尚不明确。本实验室前期研究发现, 在华支睾吸虫感染流行区, 部分胆囊结石患者的胆囊结石内存在虫卵^[12], 提示华支睾吸虫卵在胆囊结石形成过程中有一定作用。为了了解华支睾吸虫卵在胆囊结石形成过程中的作用, 我们对比观察了胆囊胆汁、胆囊胆泥和结石中的华支睾吸虫卵的形态、存活状况及其与周围物质的结构关系。

1 材料和方法

1.1 材料 20例胆囊结石患者来自于2011-05/2011-11间广州市南沙区第六人民医院普外科住院部, 年龄32-61岁, 男性14例, 女性6例, 均为广州市户籍。所有患者有食用或接触鱼/虾生史, 血清华支睾吸虫IgG抗体(EASE-MEDTREND, USA)均为阳性, 胆囊胆汁、胆泥和结石中均同时检见华支睾吸虫卵。

1.2 方法

1.2.1 标本的获取: 经过医院伦理委员会的审核并经患者知情同意, 在CHiAO硬质胆囊镜取石保胆术中, 切开胆囊壁底部后, 50 mL无菌注射器抽取所有胆囊胆汁, 装于无菌容器中送检。胆囊胆泥于术中使用时CHiAO胆道镜专用的泥沙样结石吸取箱获取, 结石标本为术中直接取得。个别胆囊胆汁中混有少量胆泥, 仍视为胆囊胆汁。所有标本获取后于2 h内送检, 并于送达后24 h内完成分析。

1.2.2 标本的处理及光学显微镜观察: (1)胆囊胆汁: 取送检的胆囊胆汁5 mL, 5000 r/min离心5 min, 倾去上层胆汁, 留取离心物约300 μ L, 充分振荡混匀备用; (2)胆囊胆泥: 称取送检的胆泥10 mg, 加适量双蒸水制成混悬液备用; (3)胆囊结石: 送检结石用蒸馏水冲洗表面3遍后, 直径>0.5 cm的结石取10 mg(不足10 mg者取全部), 泥沙样结石取数粒于研钵内, 加300 μ L蒸馏水研磨均匀备用。

每例标本涂玻片3张(每张约100 μ L), 面积接近每张玻片的1/2。然后光学显微镜(OLYMPUS BX51)观察其中虫卵的形态及其变化情况,

■ 研发前沿

华支睾吸虫成虫寄生在人体后, 可引起人体肝胆系统的一系列损伤, 其相应的致病机制多集中在成虫的致病作用方面, 而有关虫卵的致病作用和地位少有报道。

■相关报道

韩国学者Uddin等(2012)用体外培养的方式,发现华支睾吸虫虫卵在体外随着培养时间的延长,出现明显的形态变化和生存力丧失。乔铁等(2012)在胆囊结石中发现了大量华支睾吸虫卵,并指出胆色素结石形成与华支睾吸虫感染有关。

表 1 胆囊胆汁、胆泥和结石中的华支睾吸虫卵形态改变情况比较 ($n = 20$, mean \pm SD)

标本类型	形态改变情况(%)	P值
胆囊胆汁	11.7 \pm 8.5	<0.001
胆囊胆泥	56.7 \pm 14.6	
胆囊结石	91.5 \pm 5.8	

P值: 任意两组间比较均 $P < 0.001$ 。

每张涂片不少于100个高倍视野。

1.2.3 标本的染色: 3种标本的前期处理同1.2.2.

(1)钙盐(Von Kossa)染色: 参考文献[13], 取处理后备用的标本涂片, 每例2张(约200 μ L), 自然干燥后染色, 二甲苯透明、中性树胶封片, 显微镜观察; (2)台盼蓝(Trypan blue)染色: 取上一步处理后的剩余标本(100 μ L), 加入4%台盼蓝(Trypan blue)染液(Sigma公司)100 μ L, 混合均匀, 静置3-5 min, 再用无菌滴管轻轻吹打混匀, 吸取100 μ L滴加到洁净玻片, 加盖玻片, 显微镜检, 观察、记录华支睾吸虫卵内部毛蚴的着色情况。

1.2.4 标本的扫描电镜观察和X射线能谱仪分析: 取5 mL胆囊胆汁的离心沉淀物、适量的胆囊胆泥和胆囊结石, 37 $^{\circ}$ C干燥、导电胶固定、喷金, 扫描电镜(德国ZEISS, LIS10)观察其中虫卵形态和X射线能谱仪(英国OXFORD公司)分析钙元素含量, SEM所用的电子枪加速电压为20 kV。

统计学处理 采用统计学软件SPSS16.0分析数据。胆囊胆汁、胆泥和结石中的虫卵形态变化及存活情况用mean \pm SD表示, 3个组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 各组间的多重比较采用SNK(Student-Neuman-Keuls)法, 检验水平为 $\alpha = 0.05$ (双侧), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 3种标本中的华支睾吸虫卵形态及其与周围物质的关系 光学显微镜下, 胆囊胆汁中88.3%的虫卵易于辨认: 即芝麻形, 有壳, 卵内常可见内容物, 狭窄一端可见突出的卵盖, 宽而钝圆的一端(卵盖对侧)可见到点状小突起(图1)。相比之下, 胆泥和结石中则分别有56.7%和91.5%的虫卵不再具备上述典型形态或者说发生了形态改变而难于辨认, 这些形态改变表现为: 芝麻形外观变为椭圆形或条状、卵内容物看不清、卵盖丢失、卵壳表面和四周吸附黏液样物质和/或胆红素等(图1)。2种标本中形态改变的华支睾吸虫

表 2 胆囊胆汁、胆泥和结石中的华支睾吸虫卵存活率比较 ($n = 20$, mean \pm SD)

标本类型	存活率(%)	P值
胆囊胆汁	86.6 \pm 9.5	<0.001
胆囊胆泥	42.1 \pm 11.8	
胆囊结石	11.5 \pm 6.8	

P值: 任意两组间比较均 $P < 0.001$ 。

卵所占的百分比差别显著($P < 0.05$, 表1)。

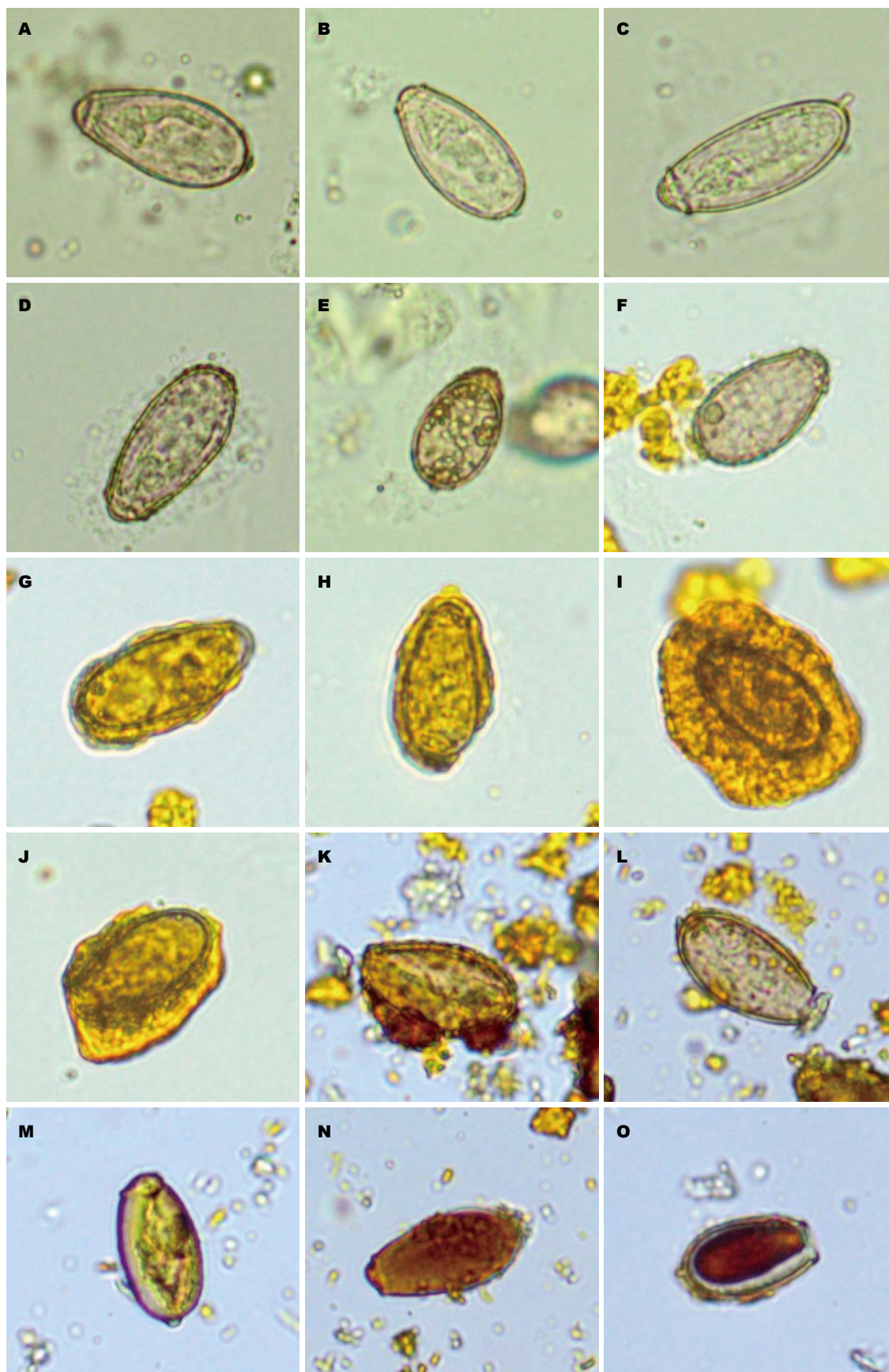
扫描电镜下, 胆汁中所有虫卵表面或卵壳为纹理状结构, 虫卵表面部分区域黏附有少量黏液样物质(图2), 而在胆泥中, 可见虫卵表面及四周大部分区域黏附黏液样物质甚至被黏液样物质完全包裹(图2)。在胆囊结石中, 还可见虫卵卵盖丢失、表面纹理状结构消失而变得光滑、周围黏附黏液样物质和碳酸钙结晶、甚至镶嵌于周围物质中(图2)。

2.2 华支睾吸虫卵表面和周围物质的钙盐染色 虫卵表面和周围物质的钙盐含量在一定程度上可反映虫卵在胆囊内储留时间的长短和钙化情况。钙盐(Von Kossa)染色结果显示: 从胆囊胆汁、胆泥到结石, 华支睾吸虫卵表面和周围物质的钙盐含量逐步递增(图3)。但在同一种标本上, 钙盐含量存在差异(图3); 进一步使用扫描电镜和X射线能谱分析仪, 分析3种标本中的虫卵表面和周围物质的钙元素分布情况, 与钙盐染色结果相符(图4)。

2.3 不同标本中华支睾吸虫卵存活率的比较 使用台盼蓝染色观察了胆囊胆汁、胆泥和结石中的华支睾吸虫卵存活率(表2)。结果显示: 在胆汁中, 86.6%的华支睾吸虫卵是存活或有活力的, 表现为台盼蓝染液不能透过卵壳(生物膜)而使卵内毛蚴着色; 而胆泥和结石中分别只有42.1%和11.5%的虫卵表现为存活(图5), 从胆汁、胆泥到结石, 华支睾吸虫卵的存活率明显减少($P < 0.05$)。

3 讨论

胆囊结石是世界范围的常见病、多发病^[14-16]。胆囊结石的发病是多种因素综合作用的结果。流行病学研究表明, 个体因素、饮食习惯、女性妊娠、家族遗传及消化系统疾病等均与胆囊结石的发病密切相关^[17-19]。近年来, 越来越多的证据表明, 胆道结石的发生可能与华支睾吸虫感染有关^[20-22]。有研究认为, 成虫



■创新盘点

本研究采用显微观察、组织化学染色以及X-射线能谱仪观察、分析了胆囊胆汁、胆泥和结石中的华支睾吸虫卵形态和存活率, 揭示了华支睾吸虫卵在胆囊结石形成中的作用和地位。

图 1 光学显微镜下, 胆囊胆汁、胆囊胆泥和胆囊结石中的正常及变形的华支睾吸虫卵(Mag × 400). A, B: 胆汁中的正常形态虫卵; C: 胆汁中的椭圆形虫卵; D: 胆汁中的表面吸附颗粒物质的虫卵; E: 胆汁中长度变短、表面及一端吸附胆红素和颗粒物的虫卵; F: 胆泥中形态较正常的虫卵, 但卵内毛蚴已看不清; G-I: 胆泥中的虫卵, 表面及四周黏附黏液和胆红素; J: 胆泥中虫卵, 卵盖丢失并黏附胆红素和黏液; K: 结石中的虫卵, 表面和周边吸附胆红素和黏液; L: 结石中卵盖即将分离的虫卵; M: 结石中固化的虫卵, 成半透明状; N: 结石中被胆红素和黏液完全包裹的虫卵; O: 结石中的虫卵, 卵盖丢失、卵内毛蚴吸附胆红素呈棕褐色。

■应用要点

本研究在一定程度上揭示了华支睾吸虫卵在胆囊结石发生中的地位和作用,为华支睾吸虫感染与胆囊结石的相关性提供了一个重要佐证,同时也可能为华支睾吸虫尤其是虫卵对宿主的作用、华支睾吸虫感染引起的肝胆疾病的致病机制研究以及胆囊结石病的预防治疗提供一种新的参考,具有重要的流行病学及临床意义。

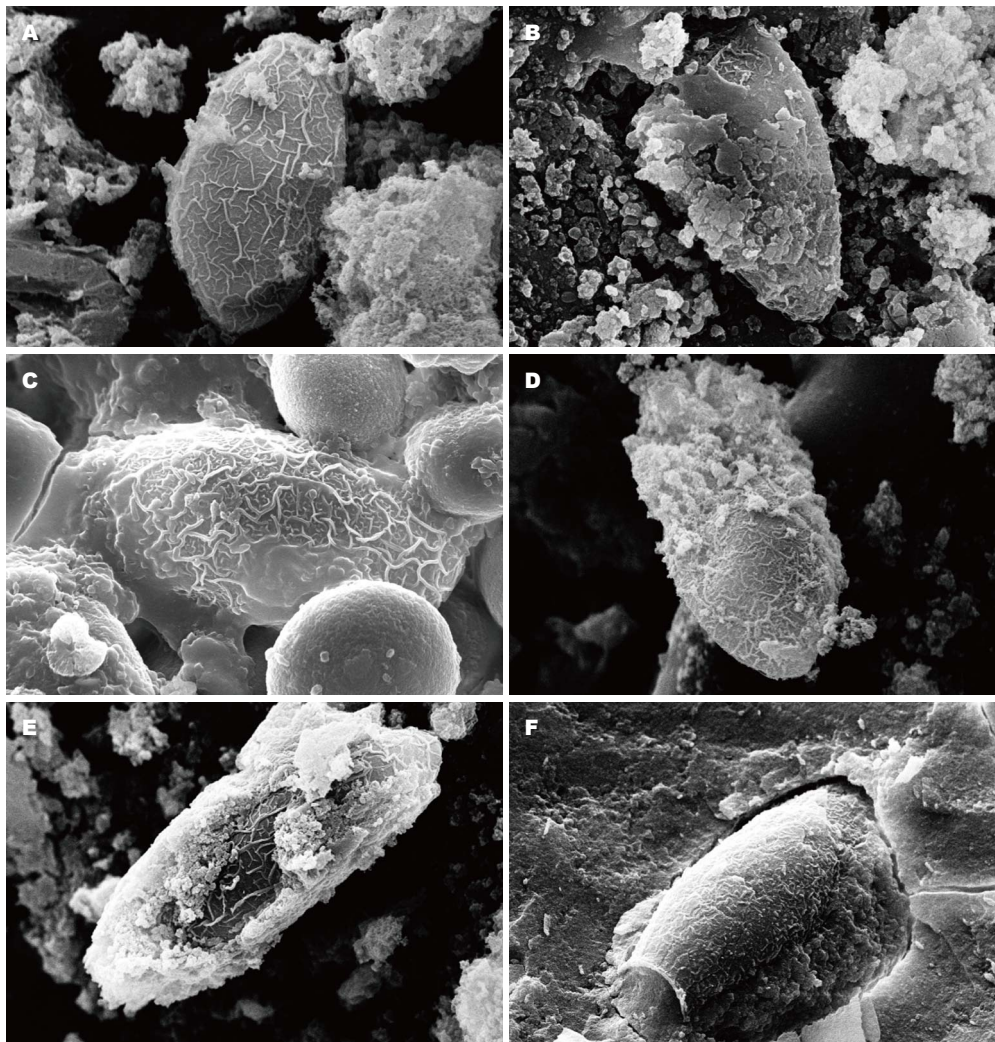


图2 电子扫描显微镜下,胆囊胆汁、胆泥和结石中的华支睾吸虫卵形态(Mag × 3000). A: 胆汁中的虫卵,表面呈凹凸不平的纹理状结构; B: 胆泥中的虫卵,表面被胆红素颗粒和黏液包裹; C: 结石中的虫卵,表面及四周黏附黏液和碳酸钙结晶; D: 胆汁中的虫卵,卵盖端黏附有黏液; E: 胆泥中的虫卵,未被黏液完全包裹,可见部分纹理状结构; F: 镶嵌于结石中的虫卵,卵盖丢失、表面纹理状结构消失而变得光滑。

在肝胆管内破坏胆管上皮和黏膜下血管,再加上虫体的分泌物、代谢产物和机械刺激等因素的作用,可引起胆道结石的发生^[23]。此外,华支睾吸虫感染引起胆道上皮分泌的糖蛋白增加,并附着于虫卵表面作为结石的核心,起支架和黏附剂作用,促进胆红素钙的沉积,最后导致色素类结石的形成^[23,24]。乔铁等更是在胆囊结石中发现了大量华支睾吸虫卵^[12]。尽管如此,华支睾吸虫卵在胆囊结石形成中所处的地位和作用仍不清楚,有待深入研究。

研究认为胆囊结石形成与胆汁的性状和成分改变^[25,26]以及胆泥的形成有关^[27-29],本实验在华支睾吸虫病流行区20例胆囊结石患者的胆囊胆汁、胆泥和胆囊结石中同时发现了华支睾吸

虫卵。与胆囊胆汁相比,胆泥和结石中的虫卵大多为变形和无活力或死亡的虫卵(表1, 2)。结果提示,在感染华支睾吸虫的胆囊结石患者体内,胆汁中的部分虫卵可较长时间停留在胆囊内,并与胆囊中胆泥甚至结石的形成有一定关联。

然而,胆囊结石的形成是一个复杂的演变过程。如果虫卵全程参与其中,其必然在胆囊内经历从液相到固相的形态变化,本实验结果证实了上述推测:即胆汁中的80%以上的虫卵多为形态典型且有活力,而胆泥和结石中则分别有50%和85%以上的虫卵出现变形和变性、死亡(表1, 2)。这提示人体感染华支睾吸虫后,部分华支睾吸虫虫卵可以长时间储留于胆囊内并发生形态改变、变性、死亡,直至成核,参与胆囊结石的形成。韩国学者Uddin等^[30]用体外培养的方

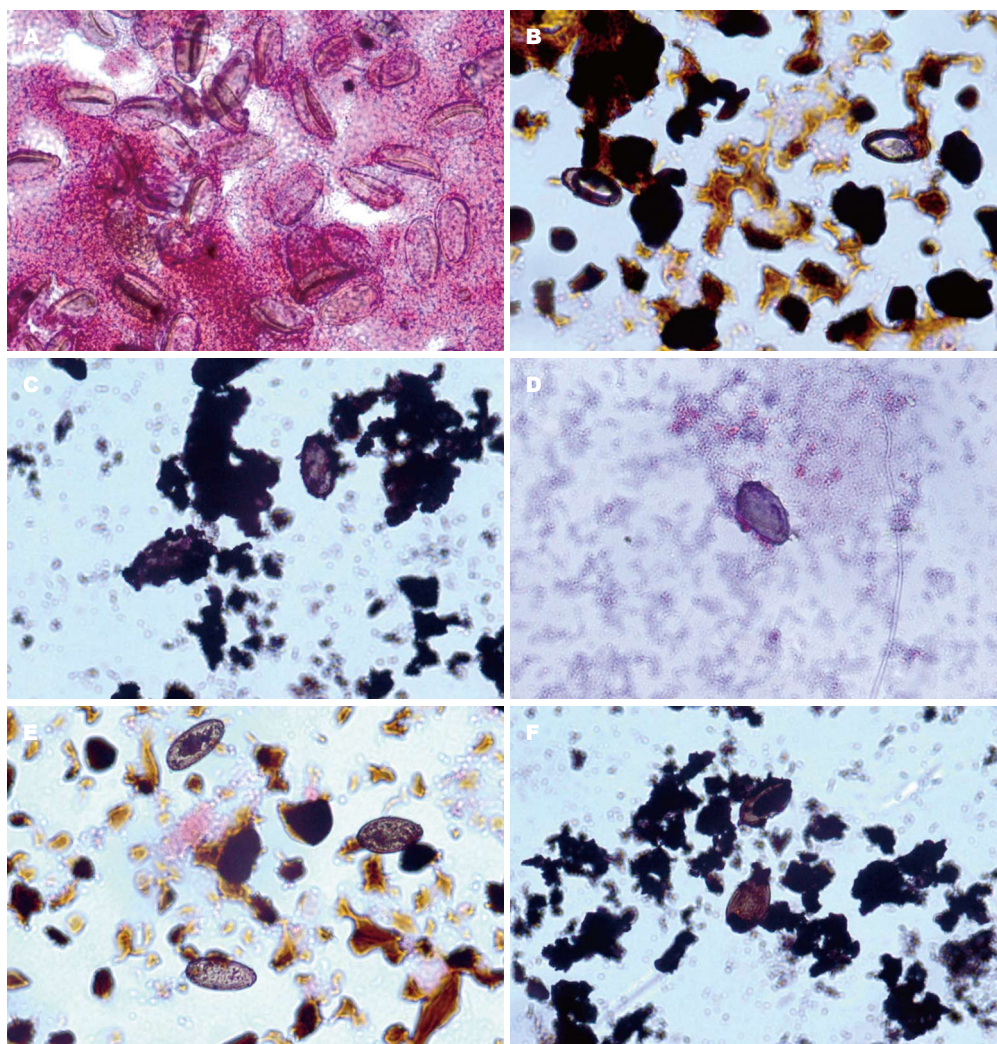


图3 胆囊胆汁、胆泥和结石中, 华支睾吸虫卵及周围物质的Von Kossa(钙盐)染色结果(Mag × 400), 黑色或黑褐色为染色阳性即黑色或黑褐色染色区域为含有钙盐区域, 提示此区域存在钙化。A: 胆汁中的虫卵和黏液染色为阴性; B, E: 胆泥中虫卵表面和周围大部分区域呈阳性, 棕黄色区域为胆红素和黏液混合物; C, F: 结石中虫卵表面和周围全部区域染色呈强阳性; D: 胆汁中个别虫卵表面染色成弱阳性。

同行评价

本研究采用显微观察、组织化学染色以及X-射线能谱仪观察、分析了胆囊胆汁、胆泥和结石中的华支睾吸虫卵形态和存活率, 对于解释华支睾吸虫卵是否参与胆囊结石形成的过程, 华支睾吸虫尤其是虫卵对宿主的作用、华支睾吸虫感染引起的肝胆疾病的致病机制研究, 具有重要的流行病学及临床意义。书写规范, 思路清晰。

式, 将华支睾吸虫卵置于不同培养液中, 观察了虫卵的形态、存活率与培养液和培养时间的关系。发现虫卵在体外随着培养时间的延长, 出现明显的形态变化和生存力丧失。该结果从一个侧面证实了本实验的结果和推论。

胆囊结石的形成可以被看做是一种异常的生物矿化(包括钙化)过程^[31,32], 因此, 虫卵表面和周围物质的钙盐含量可部分反映虫卵在胆囊内滞留的时间。本实验结果也与上述观点一致, 发现从胆汁、胆泥到结石, 虫卵表面和周围物质的钙盐含量逐级增多(图3, 4)。同时也表明, 研究病例胆囊结石的形成与虫卵的钙化有关。需要指出的是, 在同一胆汁、胆泥和结石中, 个别虫卵之间钙盐含量存在差异(图3, 4), 提示虫卵参与胆囊结石形成是渐进累积的过程, 只有部分

虫卵能储留于胆囊并最终参与结石的形成。此外, 虫卵储留于胆囊内的数量和时间可能还与成虫的排卵量和持续时间、胆囊的收缩功能、胆汁的化学成分、胆道中黏蛋白的含量及机体的感染程度和免疫情况等有关。这也可用来解释不是所有的华支睾吸虫感染患者都会发生胆囊结石。

以上结果引发了一个不容回避的问题, 华支睾吸虫卵是如何停留在胆囊内并参与结石的形成? 扫描电镜结果显示, 虫卵表面为特殊的网状结构(图2), 此结构可使虫卵容易吸附并停留于凹凸不平的胆囊黏膜皱襞内。同时, 机体感染华支睾吸虫后, 引起胆道黏蛋白分泌增多^[33], 黏蛋白不同程度黏附在虫卵表面和周围(图2), 使其不易排出胆囊; 附着于虫卵表面和周围的黏蛋

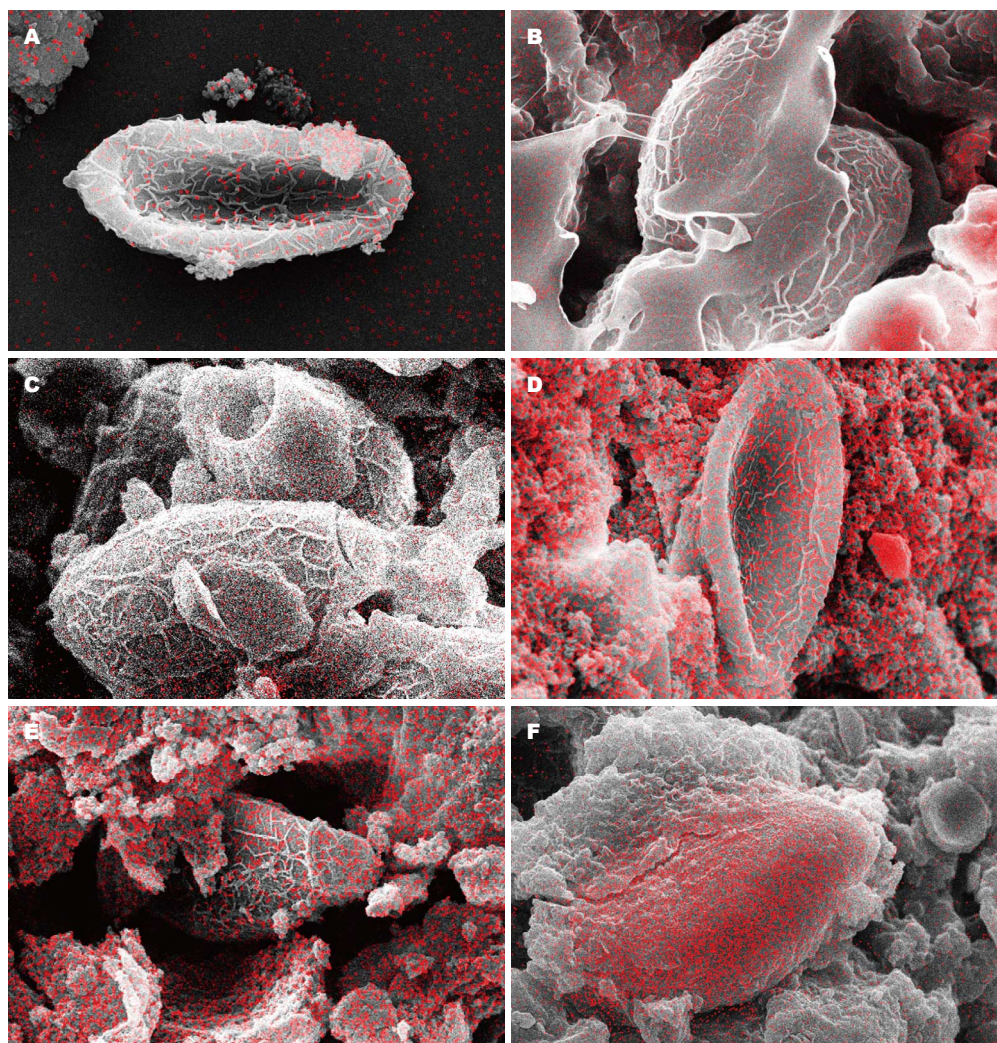


图4 扫描电镜和X-射线能谱仪联合分析胆囊胆汁、胆泥和结石中的华支睾吸虫卵及周围物质的钙元素分布情况,红点代表钙元素,红点越多越密集,代表钙含量越高(Mag $\times 3000$)。A, D: 同一例胆汁中的两个虫卵,表面钙含量差别较大; B, E: 同一例胆泥中,虫卵和周围物质的钙含量不同; C, F: 同一例结石中,被黏液样物质包裹的虫卵表面钙含量较高。

白还能促进碳酸钙、胆红素钙、磷酸钙等钙盐的沉积^[34-36],致使虫卵钙化、成核,导致结石形成。但是,上述结论还需要进一步证实。

需要指出的是,胆囊结石是一种多因素疾病,华支睾吸虫感染可能只是因素之一,因此其可能会改变胆囊结石的人群分布和结石类型^[10],但对发病率影响不是绝对的。对于二者的关系,应该从两个方面来看待。一方面,本研究结果已经证实华支睾吸虫感染尤其是华支睾吸虫卵在胆囊结石形成过程中有一定作用;另一面,这只表明二者有相关性,并不能说明二者存在因果关系或先后关系,二者既可独立发病又存在某种特定联系。我们的观点是:胆囊结石病是一种多因素的疾病,是许多因素如饮食、年龄、性别、遗传、身体内环境等综合作用的结果,其中任何一个因素包括华支睾吸虫感染,都可能

是危险因素而非决定因素。

总之,人体感染华支睾吸虫后,虫卵可通过表面的纹理状结构和胆道的黏液样物质储留于胆囊内并发生变形、变性、死亡以至钙化成核,形成胆泥,进而参与形成胆囊结石。本研究在一定程度上揭示了华支睾吸虫卵在华支睾吸虫感染相关的胆囊结石发生中的地位和作用,为华支睾吸虫感染与胆囊结石的相关性提供了一个重要佐证,同时也可能为华支睾吸虫尤其是虫卵对宿主的作用、华支睾吸虫感染引起的肝胆疾病的致病机制研究以及胆囊结石病的预防治疗提供一种新的参考,具有重要的流行病学及临床意义。

志谢: 感谢广州市南沙区第六人民医院普外科冯禹阳、王兴强、王小锋、王刚、黄毅敏医生

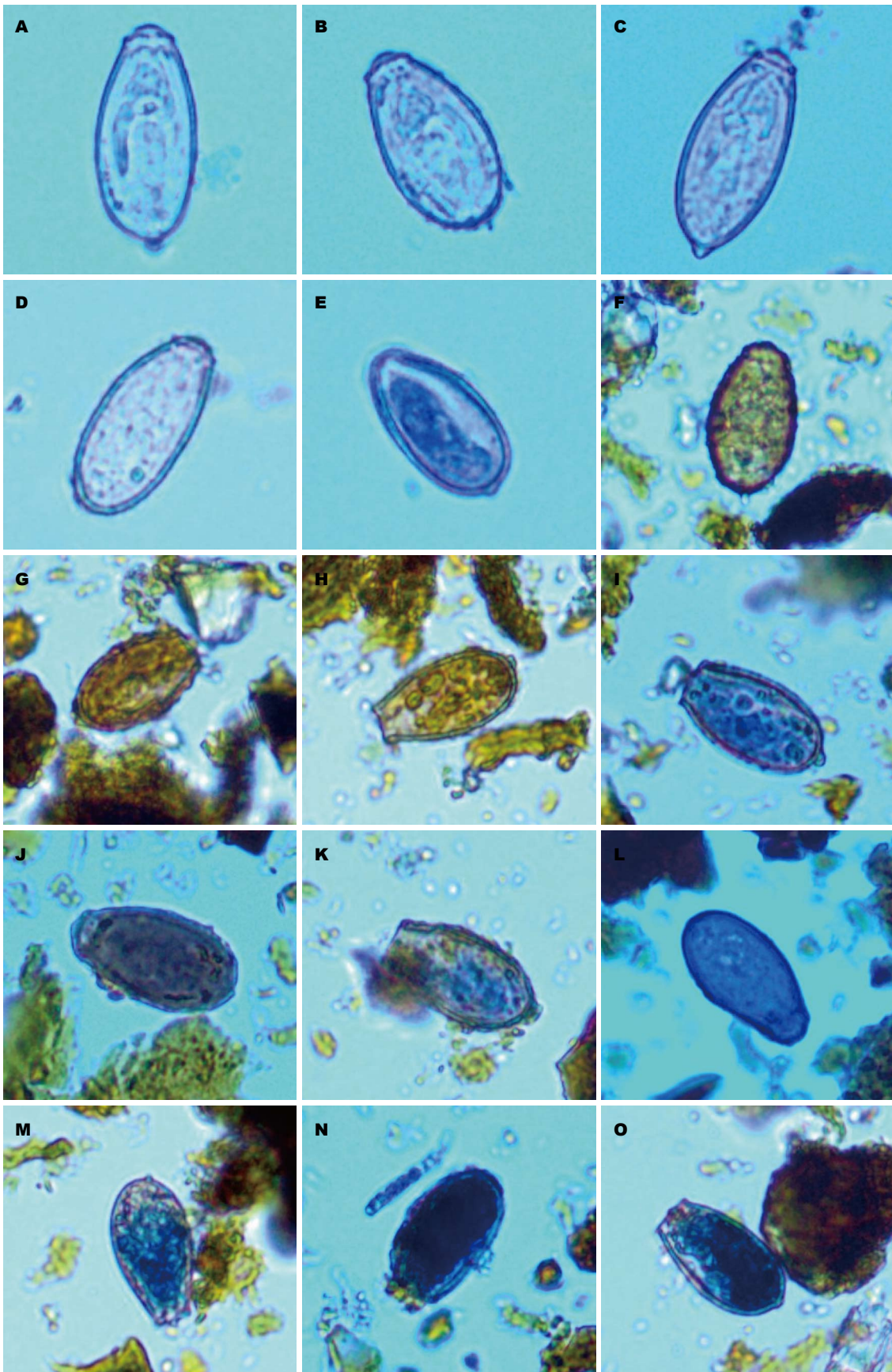


图 5 胆囊胆汁、胆泥和结石中, 华支睾吸虫卵的台盼蓝(Trypan blue)染色结果, 存活的虫卵表现为其内部的毛蚴不着蓝色, 而变性或死亡的虫卵则内部毛蚴着色(Mag $\times 400$)。A-D: 胆汁中存活的虫卵; E: 胆汁中变性或死亡的虫卵; F: 胆泥中钙化的虫卵; G, H: 胆泥中死亡的虫卵, 卵盖丢失, 毛蚴被胆红素染色; I, J: 胆泥中变性或死亡的虫卵; K-O: 结石中变性或死亡的虫卵, 内部毛蚴不同程度地蓝染。

提供研究用的胆囊胆汁、胆泥和结石标本, 特此志谢!

4 参考文献

- Chai JY, Darwin Murrell K, Lymbery AJ. Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *Int J Parasitol* 2005; 35: 1233-1254 [PMID: 16143336 DOI: 10.1016/j.ijpara.2005.07.013]
- 钱门宝, 周晓农, 方悦怡, 梁松, 陈颖丹. 加强中国华支睾吸虫病研究. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 2011; 29: 211-214
- Zhou P, Chen N, Zhang RL, Lin RQ, Zhu XQ. Food-borne parasitic zoonoses in China: perspective for control. *Trends Parasitol* 2008; 24: 190-196 [PMID: 18314393 DOI: 10.1016/j.pt.2008.01.001]
- Keiser J, Utzinger J. Food-borne trematodiasis. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 466-483 [PMID: 19597009 DOI: 10.1128/CMR.00012-09]
- Xue-Ming L, Ying-Dan C, Yi O, Hong-Man Z, Rui L, Weil M. Overview of human clonorchiasis sinensis in China. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2011; 42: 248-254 [PMID: 21710843]
- 全国人体重要寄生虫病现状调查办公室. 全国人体重要寄生虫病现状调查报告. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 2005; 23: 332-340
- Conlan JV, Sripa B, Attwood S, Newton PN. A review of parasitic zoonoses in a changing Southeast Asia. *Vet Parasitol* 2011; 182: 22-40 [PMID: 21846580 DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.07.013]
- 杨六成, 黄宝裕, 薛桂芳, 李晓林, 莫顶立. 华支睾吸虫感染与肝胆胰外科疾病的关系(附650例临床分析). *中华肝胆外科杂志* 2004; 10: 165-166
- 朱师晦, 罗章炎, 钟杏裳. 中华分支睾吸虫病与其它肝胆疾病的关系-2214例临床分析. *中华内科杂志* 1982; 21: 34
- Qiao T, Ma RH, Luo XB, Luo ZL, Zheng PM. Cholecystolithiasis is associated with *Clonorchis sinensis* infection. *PLoS One* 2012; 7: e42471 [PMID: 22905137 DOI: 10.1371/journal.pone.0042471]
- 乔铁, 马瑞红, 张阳德, 冯禹阳, 王兴强, 王小峰. 华支睾吸虫感染与胆囊结石研究报告. *中国现代医学杂志* 2009; 19: 2094-2098
- 乔铁, 马瑞红, 罗小兵, 罗振亮, 郑培明. 华支睾吸虫卵参与胆囊结石的形成. *中华肝胆外科杂志* 2012; 18: 671-675
- Bancroft J, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 2nd Ed. New York: Churchill Livingstone, 1982: 125, 139
- 谭宜将, 刘衍民. 胆囊结石发病原因研究现状与进展. *中国实用外科杂志* 2009; 29: 602-603
- 张新燕, 冯远德, 宋文渊. 胆囊结石病的治疗进展. *海南医学院学报* 2010; 16: 251-254
- 韩天权, 蒋兆彦, 张圣道. 胆固醇结石形成机制的基因研究现状与展望. *外科理论与实践* 2009; 14: 125-127
- Shaffer EA. Gallstone disease: Epidemiology of gallbladder stone disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 981-996 [PMID: 17127183 DOI: 10.1016/j.bpg.2006.05.004]
- Stinton LM, Myers RP, Shaffer EA. Epidemiology of gallstones. *Gastroenterol Clin North Am* 2010; 39: 157-169, vii [PMID: 20478480 DOI: 10.1016/j.gtc.2010.02.003]
- 于岚, 何小东, 武峤. 胆囊结石相关危险因素的探讨. *中华肝胆外科杂志* 2011; 17: 711-713
- Huang SC, Chen L, Eng HL, Chen WJ. Gallbladder adenocarcinoma with gallstone and calcified ova of *clonorchis sinensis*--a case report. *Changcheng Yixue Zazhi* 1994; 17: 94-99 [PMID: 8205506]
- 边红放, 张利永, 向军, 李玲芬, 许亚辉, 李勇, 王敏华. 华支睾吸虫感染并发胆结石一例. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 2001; 19: 353
- 谢琼琚, 徐仙赞, 苏水莲. 重症华支睾吸虫病合并胆结石1例. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 2009; 27: 106-106
- 李雍龙. *人体寄生虫学*. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 187
- 陈兴保, 吴观陵, 孙新. *现代寄生虫学*. 北京: 人民军医出版社, 2002: 571-589
- 蒋兆彦, 韩天权, 张圣道. 胆固醇结石病的发生机制. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1191-1195
- 李新平, 欧阳克清, 蔡绍哲. 胆汁分泌与排出的调节. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 1066-1070
- Shaffer EA. Gallbladder sludge: what is its clinical significance? *Curr Gastroenterol Rep* 2001; 3: 166-173 [PMID: 11276386 DOI: 10.1007/s11894-001-0015-6]
- Lee SP, Nicholls JF. Nature and composition of biliary sludge. *Gastroenterology* 1986; 90: 677-686 [PMID: 3943697]
- Pazzi P, Gamberini S, Buldrini P, Gullini S. Biliary sludge: the sluggish gallbladder. *Dig Liver Dis* 2003; 35 Suppl 3: S39-S45 [PMID: 12974509 DOI: 10.1016/S1590-8658(03)00093-8]
- Uddin MH, Bae YM, Choi MH, Hong ST. Production and deformation of *Clonorchis sinensis* eggs during in vitro maintenance. *PLoS One* 2012; 7: e52676 [PMID: 23285144 DOI: 10.1371/journal.pone.0052676]
- Demir T. Is there any relation of nanobacteria with periodontal diseases? *Med Hypotheses* 2008; 70: 36-39 [PMID: 17587506 DOI: 10.1016/j.mehy.2007.04.034]
- Nancollas GH. Crystallization in bile. *Hepatology* 1984; 4: 169S-172S [PMID: 6090296 DOI: 10.1002/hep.1840040832]
- 王乐旬, 徐劲. 华支睾吸虫致胆管癌的研究进展. *国际医学寄生虫病杂志* 2010; 37: 366-370
- Imano M, Satou T, Itoh T, Takeyama Y, Yasuda A, Peng YF, Shinkai M, Haji S, Yasuda C, Nakai T, Yasuda T, Imamoto H, Okuno K, Shiozaki H, Ohyanagi H. An immunohistochemical study of osteopontin in pigment gallstone formation. *Am Surg* 2010; 76: 91-95 [PMID: 20135947]
- Sayers C, Wyatt J, Soloway RD, Taylor DR, Stringer MD. Gallbladder mucin production and calcium carbonate gallstones in children. *Pediatr Surg Int* 2007; 23: 219-223 [PMID: 17225180 DOI: 10.1007/s00383-006-1867-5]
- Chen EY, Yang N, Quinton PM, Chin WC. A new role for bicarbonate in mucus formation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 299: L542-L549 [PMID: 20693315 DOI: 10.1152/ajplung.00180.2010]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

