

血吸虫体外培养的生殖生理学研究*

华先欣

(湖北医学院寄生虫学教研室血吸虫病研究室)

一、前言

血吸虫的生殖与对人体的致病有着密切关系;虫卵是主要的致病因素。然而,血吸虫的一些生殖生理现象如合抱的机制及产卵必需的营养要素至今仍未阐明。在宿主内对这些问题难

以进行准确、直观的研究。在体外培养过程中,既能清楚地观察血吸虫的整个生殖过程,又能人为地、准确地控制实验条件,从而有利于阐明血吸虫的合抱、生殖细胞发育的机制以及确定对这些过程的影响因素。

血吸虫生殖系统对环境条件改变极为敏

感,能否完全在体外重复血吸虫在哺乳类动物宿主中的生活史,关键在于其生殖系统能否在体外发育成熟和生殖生理功能的维持。如果在完全离体的条件下,血吸虫的生殖系统能充分发育成熟,持续产出活卵,虫卵孵出的毛蚴能感染中间宿主,那么,体外培养技术就能为血吸虫生物学、血吸虫病学、药物学和临床研究提供理想的实验模型。然而,迄今为止虽能将人工转变的童虫培养到产卵阶段,但产卵量小,持续产卵时间短,且产出的虫卵不能进一步发育。

要使体外培养的血吸虫童虫生殖系统充分发育成熟或成虫维持正常的生殖生理功能,在体外持续产出正常的虫卵,且得到与宿主体内相近的产卵量,卵发育成熟率和孵化率,必须从血吸虫的营养和培养的理化条件改进两方面入手。这些均为当今血吸虫体外培养的关键性问题。关于这些方面的资料多见于曼氏血吸虫,而日本血吸虫的资料极少;因此有必要对有关血吸虫生殖生理的研究作一复习,以供日本血吸虫这些方面研究借鉴。

二、血吸虫的一般生殖生理

人类三种主要血吸虫雌、雄虫的核型均为二倍体 ($2n = 16$)。雄虫两条性染色体为 ZZ,雌虫为 ZW,这与人类两性染色体的组合方式正好相反^[42]。虫卵受精时两性生殖细胞染色体的组合就决定了受精卵的性别^[43]。人类几种主要血吸虫雌虫必须与雄虫合抱相当长时间后,才能充分生长,性发育成熟^[13,30]。单性感染的雌虫生长及性器官发育均明显受到抑制;性器官发育成熟的雌虫与合抱雄虫分离后,其体长缩短,性器官退化^[12,16]。

不同种血吸虫雌、雄虫在宿主体内亦能发生合抱。曼氏血吸虫雌虫与杜氏小血吸虫雄虫合并感染时,雌雄合抱后雌虫性器官发育成熟,行孤雌生殖 (parthenogenesis) 产出活卵。但雌虫体长明显短于同种复性感染雌虫。因此,雄虫对雌虫生长提供的刺激与对性器官发育成熟所提供的刺激是不相同的。杜氏小血吸虫仅能刺激曼氏血吸虫雌虫性器官发育成熟,但不能

使其生长达正常状态,也不能使雌虫受精;雌虫的生长比性器官的发育更需要同种雄虫的刺激^[4,44]。由此可见,雄虫对雌虫正常生殖过程有两方面的作用:即通过合抱促进雌虫性器官发育成熟,继之使雌虫受精。若仅能促使雌虫性器官成熟而不能使之受精,雌虫则表现为孤雌生殖。至今,还未见日本血吸虫有孤雌生殖的报道。

关于雌雄合抱的机制以及合抱后雄虫对雌虫生长、生殖的刺激作用,有很多学说。Armstrong (1965)^[45]认为,雌雄虫开始是随机接触,继之通过触觉的相互识别而合抱。也有人认为,雄虫促进雌虫生殖系统的发育是通过传递营养物质^[46]、激素、精子或精子分泌物而实现的。但这些假说都有待于进一步验证。

三、血吸虫重要的生理活动——雌雄合抱

(一) 合抱机制的研究 在欧氏平衡盐溶液中,曼氏血吸虫同性、异性成虫之间均有相互趋化作用。用透析膜将雌、雄虫分开,两者仍能相互吸引^[47]。因此,推测虫体能释放出对同性、异性有趋化作用的物质,且这些物质能通过透析膜。

将性成熟合抱雌雄虫分开,培养 1—4 天内大部分能重新合抱。没有完整辜丸的雄虫亦能与雌虫合抱,甚至将成虫横切为两半,其片段在培养基中还能合抱。雄虫前 1/3 片段的合抱速度及程度均较后 2/3 低。因此,Michaels (1969)^[48]认为血吸虫后 2/3 体被中有决定合抱位置的线形感受器 (linear receptor)。扫描电镜 (SEM) 观察体外培养雄虫发现,抱雌沟表面有致密的体棘和各种不同的感觉结构^[7]。

Atkinson^[49]等 (1980) 利用体外培养、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和荧光技术发现,雄虫能合成一种分子量为 66 KD (kilo-dalton) 的多肽;与雌虫合抱后,这种多肽能传递给雌虫,而

* 本文承周述龙教授审校,谨致谢忱。

雄虫自身这种物质的含量却很少。作者认为,这种多肽是血吸虫持续合抱的生化基础。Popiel (1984)^[39] 仅检出分子量为 10 KD 的多肽从雄虫转移到雌虫。但他们均未能阐明这些物质的确切功能。单性感染雄虫在培养基中很活泼,更易与雌虫合抱,这可能是在无雌虫情况下刺激合抱的化学因子的积累所致^[40]。

综上所述,血吸虫的合抱机制既有体液方面的因素,又有神经方面的因素。首先,雌、雄成虫均能将对同性、异性有吸引作用的化学因子释放到周围,使虫体相互接触。雄虫由于其抱雌褶本能的合抱动作将雌虫抱住。然而,这种合抱开始是随机而不稳定的。随合抱时间延长,雌、雄虫之间发生了触觉的相互适应及多种化学物质(可能包括促进雌虫生殖系统发育的“信息素”)的传递。进而,雌虫的形态、功能发生一系列变化,性发育成熟并维持正常的生殖功能。

单性感染的雄虫虽能形成正常精子,但其体长明显短于复性感染的雄虫,可见雌虫也能为雄虫的生长提供刺激。不过,这方面的研究迄今还未见报道。

(二) 合抱对血吸虫生殖与代谢的影响
体外培养中单性感染雌虫与雄虫合抱后,其卵黄腺才能发育成熟,卵黄细胞分化并合成卵黄小滴。精子的存在并非卵黄细胞发育的先决条件。促使卵黄细胞发育的因子只能通过雄、雌虫紧密接触的体被传递^[16]。这种物质可为乙酰-丙酮所提取,可能是脂类物质^[41]。合抱能明显增进血吸虫产卵和卵的成熟率,雌雄虫分离则产卵减少^[29,37]。

合抱后雄虫能将 ¹⁴C-脯氨酸、葡萄糖等物质转移到雌虫体内。Cornford 等(1981)^[42] 认为,通过合抱,雄虫能为雌虫提供多种物质。这些物质可能是雌虫必需的营养成分,或能调节雌虫的代谢、生长及性器官的发育。合抱后血吸虫糖代谢加速,雌虫摄入的红细胞量增多,肠内容物排空时间缩短^[29]。虫体可获得更多的养料用于造卵。

四、血吸虫在体外培养中生殖系统的发育

(一) 生殖系统的发育 安罗岗一男^[43] (1978) 在人血清/NCTC 199 培养基中将血清转变的日本血吸虫童虫培养至 30 天时,即发生雌雄合抱,雄虫辜丸内出现精子。在人血清/EBSS 培养基中,早期埃及血吸虫童虫培养 22 天后,雄虫出现 4—5 个辜丸和贮精囊,雌虫有子宫形成,但未发生雌雄合抱^[44]。机械方法转变的曼氏血吸虫童虫培养 55 天后出现雌雄合抱^[28]。在 169 培养基中 10% 的曼氏血吸虫可产卵,但虫卵不能进一步发育^[6]。将这些培养的雌雄虫配对植入宿主肠系膜静脉中,则能产出活卵^[9]。可见培养的血吸虫一旦处于适宜的营养、理化条件下,能性发育成熟并维持正常的生殖机能。不同种类以及同种不同个体的血清对血吸虫发育的促进作用不一致^[46]。在 169 培养基中,机械转变的杜氏小血吸虫童虫培养 3—4 周就可产卵^[6]。因此,血吸虫体外产卵的迟早不仅与环境条件的适合与否有关,而且还受虫种的遗传控制。

(二) 体外培养血吸虫生殖系统的异常改变 将人体三种主要血吸虫培养于小牛血清/199 培养基内,用 ³H-胸腺嘧啶标记其生殖细胞。然后将虫体移入宿主体内。结果,6 天后雄虫的精原细胞均发育为成熟精子,有的精子进入贮精囊。同一天内可见雌虫受精。卵黄细胞极易摄取 ³H-胸腺嘧啶,发育、更新迅速。2 天内新形成的卵黄细胞就可排入卵黄管内。日本血吸虫移植 6 天后就可形成新的卵母细胞,而曼氏血吸虫和埃及血吸虫则需要 7 天。这与日本血吸虫产卵量比后二者大有关^[34]。

将标记的曼氏血吸虫继续培养于小牛血清/199 培养基中,5 天内辜丸内有精子发生,但无成熟精子形成。5 天后辜丸变性、坏死。5 天内卵黄细胞的形成与宿主体内相似。8 天内卵巢有卵细胞形成,但不能受精和形成虫卵。此后,则卵母细胞变性,卵巢蜕变^[29]。在体外培养中血吸虫生殖细胞的形成和变性的动态变化与

血吸虫在体外产卵的消长情况相符。曼氏血吸虫的产卵高峰常在培养的3—6天。日本血吸虫对于上述培养条件更不适应,卵巢、卵黄腺和睾丸的变性均早于曼氏血吸虫^[36]。

对环境因素改变最为敏感的是血吸虫的生殖系统。曼氏血吸虫成虫在人血清/EBSS培养基中,15—21天内体被、肌层、基底膜和神经、排泄系统的超微结构以及活动、合抱等均未发生异常改变,唯独生殖系统的超微结构和生理功能发生明显改变。培养4—6天后,卵巢细胞的线粒体集中分布于胞质的某一区域,核糖体从内质网表面脱落,游离于胞浆中。随培养时间延长,许多线粒体形态发生异常变化。10—15天内,卵巢前部和中间区出现大量含致密物的空泡;15—21天内,卵巢后部亦发生改变,许多卵细胞相互分离,单个细胞出现变性^[49]。

在卵巢超微结构开始发生改变的同时,卵黄细胞也发生了变化。成熟卵黄细胞的卵黄小滴解体;内质网/核糖体致密化,并含有许多多膜囊;线粒体肿胀。12—21天后,成熟卵黄细胞脂质含量明显增加。发育中的卵黄细胞内质网大为减少,但仍能见到卵黄小滴。在上述培养系统中培养21天时,卵膜、梅氏腺、子宫和卵黄管的超微结构仍然正常。因此,在此期间,生殖系统超微结构异常改变主要出现在功能旺盛的卵巢和卵黄腺^[43]。

用169培养基将机械转变的曼氏血吸虫童虫培养到产卵阶段,用透射电镜观察雌雄虫生殖系统的超微结构显示,睾丸内有许多成熟精子。雌虫卵黄腺的分叶数虽较宿主体内雌虫少,但每叶内均含有不同发育阶段的卵黄细胞。成熟卵黄细胞含有丰富的卵黄小滴及脂滴。卵膜、梅氏腺和子宫的结构正常。然而卵巢后部的卵母细胞变性,胞浆中出现许多空泡。胞质边缘有皮质颗粒。卵膜、子宫内含有无胚盘(embryo disc)、无卵壳的卵样结构。可见,在该培养系统中,血吸虫不能产出正常虫卵的主要原因是卵巢发育障碍,不能形成正常的卵母细胞^[22]。

由人工方法转变的童虫培养得到的成虫和

宿主体内取出的性成熟成虫二者生殖系统发生的超微结构改变不一致。后者的变性更为广泛。可能是所用的培养基不同,人血清-EBSS培养基对血吸虫生殖系统的支持作用不及169培养基;也有可能从宿主体内取出的成虫更难适应体外培养条件。

五、血吸虫的体外产卵

血吸虫在体外产卵屡见报道^[37,39,20,41]。Michaels^[41](1968)对曼氏血吸虫在体外培养中产卵的高峰时间、终止时间,卵的发育率和孵化率进行了系统的研究;此后,许多研究者试图采用改良的方法得到更高的产卵量,延长产卵时间,但结果均无显著改善。在宿主体内,曼氏血吸虫的产卵量约为每天每对300个虫卵,日本血吸虫每天每对则可达3,500个^[41]。

(一)产卵的动态变化 曼氏血吸虫成虫培养1—2天内开始产卵;3—6天达产卵高峰,10—14天产卵即告终止^[37,28,39]。但24天前还可见卵黄细胞和卵黄积聚物(vitelline conglomerate)产出。在双相(固相-液相)培养基中,曼氏血吸虫产卵高峰期间每天每对虫体可达180个。培养后期产出的大多为异常虫卵。机械方法转变的童虫能培养到产卵阶段,但产卵量极少。许世谔^[47](1974)报道,在马血清/台氏液中,日本血吸虫成虫至少可产卵18天,第一天产卵较少,3—7天为产卵高峰时间。最高产卵量每天每对虫体可达115.3个。

(二)影响体外产卵的因素 影响血吸虫体外产卵的因素是多方面的,既有营养因素,也有理化因素。此外,雄虫对雌虫产卵也有明显影响。

成虫生殖机能十分旺盛,尤其是日本血吸虫,产卵量相当大。血吸虫必须从环境中摄取大量培养物质,通过代谢将其转化为造卵物质。若营养供应受限,势必影响产卵,生殖器官的结构亦发生异常变化。

迄今还未能从血吸虫体内提取出结构、功能明确的具有调节其生长、生殖及代谢的“激素”。然而,某些哺乳类激素如胰岛素^[20]、甲状

腺素等^[44]能促进童虫的发育,增强其对机体免疫作用等不利因素的抵抗力。血吸虫体内还有代谢甾醇类激素的酶。五羟色胺(5-HT)能明显增进体外血吸虫的活动,促进虫体糖代谢。Schiller^[39](1975)认为血吸虫可能合成促进排卵的激素。可见,哺乳类宿主的某些激素可能作为血吸虫的“外源性激素”,而血吸虫自身亦可能合成某些“内源性激素”来控制、调节其代谢、生殖活动。

红细胞是血吸虫生长、生殖的重要营养成分。在培养基中加入红细胞,虫体活动增强,存活率升高。在宿主体内合抱雌成虫摄入的红细胞是雄虫的10倍,可达33万个/小时。虫体还能将血红蛋白中³H-L-亮氨酸同化到自身的蛋白质分子中^[39,40]。血红蛋白可能是制造卵黄物质的原料。此外,红细胞的消化还可使血吸虫获得嘌呤、嘧啶等碱基合成核酸。可见红细胞对血吸虫营养的重要性。然而,Newport(1982)^[32]、许世谔等^[2](1974)报道,在培养基中加入红细胞对血吸虫的产卵量无影响。这可能是在至今的培养系统中,红细胞还不能以宿主血管中的悬浮状态存在,致使血吸虫对红细胞的充分利用受到限制。

在不同成分的培养基中,血吸虫的产卵量有时有显著差别。曼氏血吸虫成虫在小牛血清/199中产卵量比在小牛血清/Eagle's培养基高。日本血吸虫日本株在RPMI/1640培养基中每对产卵量48小时内可达1826.7个,而在欧氏平衡盐水(EBSS)中仅为104.8个。在改良的血吸虫保存液(DSMH)中加入水解乳蛋白、水解酪蛋白或脉一腺3(proteose peptone 3)能明显增加产卵量^[33]。这说明在产卵过程中,血吸虫需从环境中摄取营养物质用于产出虫卵或/和形成新的虫卵。

培养瓶中加入过多的培养液产卵量减少^[38]。可能是培养液对虫体的压力过大。培养液的pH或温度不适,产卵量亦明显减少。在有氧、无氧条件下,曼氏血吸虫成虫对葡萄糖的利用和CO₂的生成量是相同的。在有氧条件下,曼氏血吸虫产卵高峰期每对产卵量可达180

个,而在无氧环境中则无卵产出。说明产卵过程是需氧的,氧可能被用于卵壳的醌化或某些促排卵激素的合成^[37]。

雄虫与雌虫合抱后能明显增进产卵。即使没有完整睾丸或精子的雄虫也有这种作用。杜氏小血吸虫在宿主体内无雄虫时能发育成熟并产出活卵;在体外培养中,雌虫与雄虫合抱之前就能产卵,但卵无活性^[6]。可见无活性卵的产出主要是培养系统理化环境的不适,而不是缺乏雄虫的刺激。

(三)体外产出虫卵的形态、营养及发育血吸虫的营养与产出虫卵的形态、发育有密切关系。红细胞吸附过的马血清(AHS)加红细胞、血清或NCTC 109等培养基中,产出的虫卵均无胚细胞,不能继续发育^[38,41]。Newsome(1962)用人血清/台氏液加少量血细胞培养日本血吸虫和曼氏血吸虫成虫,培养早期有正常虫卵产出。国内许世谔^[2](1974)、王凤临等^[4](1980)报道,在小牛血清/台氏液加红细胞的培养基中,日本血吸虫培养早期也能产出正常虫卵。

在培养最初24小时内、培养7—9天后成虫产出的虫卵大多数是异常的;虫体还可产出单独的卵细胞、卵黄细胞和卵黄积聚物。产卵是间歇性的,产出的虫卵常呈串珠状排列。异常虫卵缺乏完整的卵壳;SEM观察结果显示,卵的外部仅裹以卵黄细胞。虫卵内未见卵细胞;与侧刺相对的一侧卵壳极薄^[7]。卵壳形成是卵形成的重要过程之一,许多体外产出的虫卵缺乏卵壳或卵壳不完整。卵壳形成需要卵黄物质的参与。卵黄腺内含有丰富的酚酶。酚酶仅能将游离的酪氨酸氧化为醌,醌与卵壳蛋白交链形成坚韧的卵壳硬蛋白^[40,47]。卵壳异常可能与卵黄物质或游离酪氨酸的量不足有关,也可能是酚酶的活性受抑。

RPMI/1640和DSMH等培养基中血吸虫产出的虫卵可发育成熟^[23,26,32]。从产出到发育成熟卵的体积约增加一半。虫卵在体外发育过程中从培养基中摄取³H-胸腺嘧啶和尿嘧啶,用于自身DNA和RNA的合成。未成熟

卵的合成功能更为活跃^[46]。卵内毛蚴不但从环境中摄取葡萄糖,而且还能摄取甘氨酸、异亮氨酸和精氨酸等合成自身的蛋白质^[27]。吸收的氨基酸还可被转化,合成脂类或分解为 CO₂ 和水。由此可见,虫卵在发育过程中必须从环境中摄取多种营养物质。初产卵缺乏这些必需养料。曼氏血吸虫卵的三羧酸循环活跃,而糖酵解相对缓慢。TEM 观察发现,卵壳下区有丰富的线粒体。因此,虫卵的代谢途径与成虫明显不同,可以设想寻找一种能抑制虫卵发育、代谢的药物,以减轻虫卵引起的肝脏损害。

培养基的营养成分能影响虫卵的发育速度。在小牛血清/199 培养基中,曼氏血吸虫卵发育成熟时间为 6 天;在小牛血清/Eagle's 培养基中,则需要 8 天。在无血清的吸虫保存液中加入大豆卵磷脂、胆固醇和硬脂酸,或在 DSMH 中加入水解乳蛋白、水解酪蛋白,都能显著增加虫卵的发育成熟率。

体外培养第一天产出的日本血吸虫卵,在 RPMI/1640 培养基中培养两周后卵成熟率可达 40%。该培养基中有 14 种氨基酸、氯化胆碱和葡萄糖是虫卵发育成熟的必需物质。在这些物质中加入谷氨酰胺,则为培养日本血吸虫卵的最基本培养基^[20]。氨苯喋啶、嘌呤霉素对培养成虫的产卵和卵的胚胎发育都无影响但 这些物质能干扰哺乳类动物细胞 DNA 的合成。可见血吸虫卵发育过程中 DNA 合成的调节有其自身特点。放线菌素 D 能抑制培养成虫的产卵和卵的发育^[26]。

(四) 虫卵的孵化和毛蚴对中间宿主的感染 在人血清/台氏液加适量血细胞的培养液内,早期产出的虫卵能发育成熟,并在水中孵出表现正常的毛蚴。毛蚴能侵入螺体,但未发现在螺体内进一步发育。日本血吸虫卵在 RPMI/1640 培养基中、曼氏血吸虫卵在 DSMH 中都能发育成熟,孵出正常毛蚴;毛蚴侵入螺体后,能完成从母胞蚴到尾蚴的蛻过发育过程^[25,31]。

在小牛血清/199 培养基中培养 6 天内,有一半的曼氏血吸虫卵发生孵化。这种异常孵化孵出时间仅需 1/2—1 分钟。卵内毛蚴只能纵

向收缩,孵出后仅能旋转运动,纤毛板有脱落现象^[28,30]。日本血吸虫卵在培养基中也有异常孵化发生;小牛血清浓度超过 8% 则异常孵化率升高。异常孵化的原因可能有(1)虫卵与空气接触,(2)环境温度降低,(3)虫卵对渗透压的调节失常,(4)血清或血清的降解产物促使卵壳解体。异常孵出的毛蚴在培养基中可发生一系列向母胞蚴转变的形态变化;两天内纤毛板脱落,并有生长出征象。

六、结语与展望

虽然目前的体外培养系统已经成功地由人工转变的童虫培养到产卵阶段,但产卵量少,且卵不能进一步发育。体外培养条件与宿主体内毕竟大不一样^[19,30,32]。尽管改进培养基和培养的理化条件能促进产卵,但至今还未掌握血吸虫确切的营养需要和适宜的理化环境;连续流动培养装置也未取得满意结果^[21]。

不同营养物质可能在血吸虫不同生活阶段起着重要作用^[12]。在含红细胞膜(富含结构脂)的 169 培养基中,早期童虫的生长、发育比在含红细胞的 169 培养基迅速,但在这两种培养基中,虫体发育的最终结果却无明显差别^[10]。这说明红细胞膜更适合于早期童虫的生长和发育。

为了满足体外培养血吸虫各发育阶段的营养需要和提供适宜的理化环境,必须对血吸虫的营养、代谢、生殖和组织化学等方面有更广泛、更深入的了解。血吸虫在宿主体内的发育过程中,移行途径极为复杂,移行过程中不同部位的营养、理化条件也各不相同。可能正是这些复杂因素有规律的变更,才促使血吸虫迅速发育。要在完全离体条件下培养出能产出正常虫卵的血吸虫,就必须为血吸虫各发育阶段提供适宜的营养成分和理化条件。

随着血吸虫营养、代谢以及生理、生化等方面研究的深入,诸如借助分子生物学、放射标记和荧光技术等手段研究雌、雄虫之间的物质传递,寻找促进雌虫生长、发育和性成熟的“信息素”,可以相信,揭开血吸虫合抱与雌虫性发育成熟之间关系的奥密,阐明血吸虫适宜的营养

需要和理化条件,使其在体外完成整个正常生殖过程已为时不远了。

参 考 文 献

- [1] 王凤临等 1980 日本血吸虫成虫的体外培养观察 动物学报 26(4): 398
- [2] 许世博 1974 日本血吸虫在离体培养中的产卵和虫卵发育过程的研究 动物学报 20(3): 231
- [3] 何毅勋,杨惠中 1974 日本血吸虫卵形成的生理 动物学报 20(3): 243
- [4] Armstrong, J. C. 1965 Mating behavior and development of schistosomes in the mouse. *J. Parasitol.* 51(4): 605—616.
- [5] Atkinson, K. H. & B. G. Atkinson 1980 Biochemical basis for the continuous copulation of female *Schistosoma mansoni*. *Nature* 283: 478—479.
- [6] Basch, P. F. 1981 Cultivation of *Schistosoma mansoni* *in vitro*: I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. *J. Parasitol.* 67: 179—185.
- [7] Basch, P. F. & N. Basch 1982 Scanning electron microscopy of schistosomula, adults and eggs grown *in vitro*. *Parasitology* 85(2): 333—338.
- [8] Basch, P. F. & M. L. O'Toole 1982 Cultivation *in vitro* of *Schistosomatium Douthitti* (Trematoda: schistosomatidae). *Int. J. Parasitol.* 12(6): 541—545.
- [9] Basch, P. F. & W. D. Rhine 1983 *Schistosoma mansoni*: reproductive potential of male and female worms cultured *in vitro*. *J. Parasitol.* 69(3): 567—569.
- [10] Basch, P. F. 1984 Development and behavior of cultured *Schistosoma mansoni* fed on human erythrocyte ghosts. *Am. J. Med. Hyg.* 33(5): 911—917.
- [11] Basch, P. F. & N. Basch 1984 Intergenic reproductive stimulation and parthenogenesis in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 89(2): 369—376.
- [12] Bueding, E. & J. Fisher 1982 Metabolic requirements of schistosomes. *J. Parasitol.* 68(2): 208—212.
- [13] Clough, E. R. 1981 Morphology of reproductive organs and oogenesis in bisexual and unisexual transplants of mature *Schistosoma mansoni* females. *J. Parasitol.* 67(4): 535—539.
- [14] Cornford, E. M. 1974 *Schistosomatium douthitti*: effects of tyrosine. *Exp. Parasitol.* 36(2): 210—221.
- [15] Cornford, E. M. & M. E. Huot 1981 Glucose transfer from male to female schistosomes. *Science*. 213: 1267—71.
- [16] Erensus, D. A. & J. R. Shaw 1977 Egg production in *Schistosoma mansoni*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71(3): 289—292.
- [17] Eveland, L. K., B. Fried, & L. M. Cohen 1982 *Schistosoma mansoni*: adult worm chemoattraction, with or without barriers. *Exp. Parasitol.* 54(2): 271—276.
- [18] Eveland, L. K., A. Ludwikowska, & K. G. Madden 1979 *Schistosoma mansoni*: long-term culture of *in vitro* derived schistosomula. *Exp. Parasitol.* 48(3): 375—382.
- [19] Floyd, R. D. & P. M. Nollen 1977 Effects of stressful conditions on the development and movement of reproductive cells in *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 63(1): 87—90.
- [20] Francesca, L. S. & M. Smolarsky 1981 *Schistosoma mansoni*: Effects of insulin and a low-molecular-weight fraction of serum on schistosomula in chemically defined media. *Exp. Parasitol.* 52(3): 378—385.
- [21] Gowper, S. G. 1974 Some further observation on the use of a continuous flow apparatus for the maintenance of schistosomes and blood protozoa *in vitro*. *Am. Trop. Med. Parasitol.* 68(4): 415—425.
- [22] Iric, Y. P. F. Basch, & N. Basch 1983 Reproductive ultrastructure of adult *Schistosoma mansoni* grown *in vitro*. *J. Parasitol.* 69(3): 559—566.
- [23] Kawanaka, M. 1983 Deposition and maturation of *Schistosoma japonicum* eggs *in vitro*: comparison between a Japanese and Philippine strains. *Jpn. J. Parasitol.* 32(4): 305—315.
- [24] Kawanaka, M. S. Havashi, & H. Ohtomo 1983 A minimum essential medium for cultivation of *Schistosoma japonicum* eggs. *J. Parasitol.* 69: 857.
- [25] Lawrence, J. D. 1973 The ingestion of red blood cells by *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 59(1): 60—63.
- [26] Lee, H. G. & R. M. Michaels 1968 *In vitro* and *in vivo* effects of selected metabolic inhibitors and chemotherapeutic agents on adults and egg development of *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 22(2): 256—263.
- [27] Lewert, R. M., J. Prata, & M. A. Özcel 1970 Miracidial uptake of glucose in intact eggs of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 56: 1250.
- [28] Michaels, R. M. & A. Prata 1968 Evolution and characteristics of *Schistosoma mansoni* eggs laid *in vitro*. *J. Parasitol.* 54(5): 921—930.
- [29] Michaels, R. M. 1969 Mating of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 25(1—3): 58—71.
- [30] Moore, D. V., T. K. Yolles, & H. E. Meleney 1954 The relationship of male worms to the sexual development of female *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 42: 14—20.
- [31] Moore, D. V., & J. H. Sandground 1956 The relative egg producing capacity of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Ann. J. Trop. Med. Hyg.* 5(5): 831.
- [32] Newport, G. R. & T. H. Weller 1982 Deposition and maturation of eggs of *Schistosoma mansoni* *in vitro*: importance of fatty acids in serum-free media. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31(2): 349—357.
- [33] Newport, G. R. & T. H. Weller 1984 Miracidia infective for snails derived from eggs laid by adult *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Parasitology*, 84(3): 481—490.
- [34] Nollen, P. M., R. D. Floyd, R. G. Kolzow, & D. L. Deters 1976 The timing of reproductive cell development and movement in *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, and *Schistosoma haematobium*, using techniques of autoradiography and transplantation. *J. Parasitol.* 62(2): 227—231.
- [35] Popiel, I. & P. F. Basch 1984 Putative polypeptide

- transfer from male to female *Schistosoma mansoni*. *Molec. Biochem. Parasitol.* 11: 179—188.
- [36] Popiel, I., D. Cioli, & D. A. Erasmus 1984 The morphology and reproductive status of female *Schistosoma mansoni* following separation from male worms. *Int. J. Parasitol.* 14(2): 183—190.
- [37] Robinson, D. L. H. 1960 Egg-laying by *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 54: 112.
- [38] Ronald, G. K. & P. M. Nollen 1978 Effects of stressful conditions on the development and movement of reproductive cells in *Schistosoma japonicum*. *J. Parasitol.* 64(6): 994—997.
- [39] Schiller, E. L., E. Bueding, V. M. Turner, & J. Fisher 1975 Aerobic and anaerobic carbohydrate metabolism and egg production of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *J. Parasitol.* 61(3): 385—389.
- [40] Seed, J. L., C. D. Kilts, & J. L. Bennet 1980 *Schistosoma mansoni*: tyrosine a putative *in vivo* substrate of phenol oxidase. *Exp. Parasitol.* 50: 33—44.
- [41] Senft, A. W., & D. G. Senft 1962 A chemically defined medium for maintenance of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 48(4): 551—554.
- [42] Shaw, J. R. 1977 *Schistosoma mansoni*: pairing *in vitro* and development of females from single sex infections. *Exp Parasitology*, 41(1): 54—65.
- [43] Shaw, J. R. & D. A. Erasmus 1977 *Schistosoma mansoni*: differential cell death associated with *in vitro* culture and treatment with Astiban (Roche). *Parasitology* 75(1): 101—109.
- [44] Shaw, J. R., I. Marshall, & D. A. Erasmus 1977 *Schistosoma mansoni*: *in vitro* stimulation of vitelline cell development by extracts of male worms. *Exp Parasitol.* 42(1): 14—20.
- [45] Short, R. B. 1983 Presidential address sex and the single schistosomes. *J. Parasitol* 69(1): 4—23
- [46] Smith, M., J. A. Clegg, & G. Webbe 1976 Culture of *Schistosoma haematobium* *in vivo* and *in vitro*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 70(1): 101—107.
- [47] Smyth, J. D. & J. A. Clegg 1959 Egg-shell formation in trematodes and cestodes. *Exp. Parasitol.* 8(3) 286—323.
- [48] Stjernholm, R. L. 1974 *Schistosoma mansoni*: utilization of exogenous metabolites by eggs *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 36(2): 222—232.
- [49] Yasuraoka, K., Y. Irie, & H. Hata 1978 Conversion on schistosome cercariae to schistosomula in serum-supplemental media and subsequent culture *in vitro*. *Japn. J. Exp. Med.* 48(1): 3—60.
- [50] Zussman, R. A., P. M. Banman, & J. C. Petruska 1970 The role of ingested hemoglobin in the nutrition of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 56(1): 75—79.