

研究工作

日本血吸虫病患者血清对血吸虫卵和成虫抗原的免疫反应

许阿莲 周晓音

Donald A. Harn

(浙江医科大学寄生虫学教研室, 杭州市 310031)

(美国哈佛大学公共卫生学院热带公共卫生系)

提 要

用免疫印渍术分析了 33 例确诊为日本血吸虫病患者血清对日本血吸虫虫卵抗原(SEA)和成虫抗原(SWAP)的免疫反应,发现患者血清对虫卵和成虫抗原的敏感性分别为 100%和 97%,而正常人血清则无反应。大多数病例(28/33)血清和 SEA 抗原反应后,印渍谱上于 180,54 和 32kD 处显现较宽区带;对 SWAP 而言,多数病例(26/32)则在 190 及 64kD 处显现区带;而急性患者(21/24)还可在 34kD 处检出一条较宽区带。这些结果提示了免疫印渍术在日本血吸虫病临床诊断上的价值。

关键词 免疫应答,日本血吸虫病,免疫印渍术,酶联免疫吸附

疾病病理学研究与临床诊断中,正在采用简便而又灵敏的免疫印渍术(Immunoblotting,又名 western blotting)来替代传统的方法。Miller 等人曾指出^[2]:免疫印渍术是检测中枢神经系统囊虫病的好方法,它比原有的间接血凝试验和补体结合试验都要灵敏。

早在 1982 年, Tsang 等人就开始采用免疫印渍术研究日本血吸虫虫卵抗原不同组分的特异性^[3]。以后 Slemenda 等人报道用免疫印渍术检测肺血吸虫病患者血清,并证明此法具有很高的敏感性(96%)和特异性(99%)^[4]。Rogers 等人也报道了用免疫印渍术分析菲律宾的日本血吸虫病患者血清,鉴定出该血吸虫整个膜蛋白的抗原谱^[5]。在中国,这方面的研究也已开始,例如,1988 年石佑恩等人用免疫印渍术分析了血吸虫成虫抗原的免疫沉淀带^[6];裘丽姝等人也用此技术试验了日本血吸虫病患者血清对成虫抗原的免疫应答^[7]。本文报道用免疫印渍术分析 33 例各期日本血吸虫病患者血清对日本血吸虫成虫和虫卵抗原的免疫应答。

1 材料与方 法

1.1 血清 33 例患者血清均来自江西省余干县确诊的日本血吸虫病患者。其中急性(急血)24 例;慢性早期(早期)7 例;慢性晚期(晚期)2 例。另外 12 名正常人混合血清 1 份和正常人血清 1 份系由美国哈佛大学 Dr. Harn 实验室提供。

1.2 抗原 日本血吸虫虫卵系浙江医科大学寄生虫室收集,经 -20℃低温保存。日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*, S.j)的成虫、曼氏血吸虫(*S. mansoni*, S.m)和埃及血吸虫(*S. haematobium*, S.h)的成虫和虫卵均由 Dr. Harn 实验室提供。以上三种血吸虫的可溶性虫卵抗原(soluble egg antigen, SEA)和可溶性成虫抗原制剂(soluble worm antigen preparation, SWAP)则按 Harn 法^[9]制得,并在 -70℃下保存备用。

1.3 酶联免疫吸附试验(ELISA) 上述 33 例各期日本血吸虫病患者的血清分别和

S.j, S.m 以及 S.h 的 SEA 和 SWAP 进行 ELISA, 所用抗原浓度是: SEA 为 $7\mu\text{g/ml}$; SWAP 为 $10\mu\text{g/ml}$. 病人血清稀释度为 1:800. 第二抗体采用过氧化物酶联的羊抗人 IgG (Cappel 产品), 工作浓度为 1:1000, 底物是 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB; Kirkegard & Perry Laboratories 产品). 酶反应是用酶标读数仪 (MICROPLATE READER) 读取 490nm 波长处的消光值 (OD) 来表示.

1.4 免疫印渍术 基本上按 Tsang 等人的方法^[8]. S.j 的 SEA 或 SWAP 经 10% SDS-PAGE 电泳后, 在 25mmol/L Tris, 192mmol/L 甘氨酸, 20% 甲醇, pH 为 8.3 的缓冲液中把凝胶区带电印渍于硝酸纤维素纸 (Schleicher & Schuell 产品), 电压 30V, 4℃ 下印渍一夜. 次晨, 电压升至 60V 后再电印渍 1—1.5h. 取出印渍纸, 放入内含 1% (W/V) 干奶粉, 0.3% (V/V) Tween-20, 10mmol/L Hepe, pH7.9 的 PBS 中猝灭 2 次, 每次 30min. 把印渍纸转入内含 0.05% (V/V) Tween-20 的 PBS 中洗 3 次, 每次 20min. 其后印渍纸和病人血清 (1:800) 于 37℃ 共育 45min. 再如上述洗涤 3 次. 把印渍纸移入过氧化物酶联羊抗人 IgG, 共育 45min 后如上法洗. 最后印渍纸用 4-氯-1-萘酚显色, 并在适当时间用双蒸水终止反应. 每次试验均用已知阳性的鼠血清、阴性鼠血清、正常人血清, 以及蛋白质分子量标准系列 (系 Bio-Rad 产品) 作对照.

2 实验结果

2.1 患者血清与血吸虫虫卵和成虫抗原的 ELISA

33 例日本血吸虫病患者血清分别与日本血吸虫、曼氏血吸虫和埃及血吸虫的 SEA 和 SWAP 进行 ELISA 试验, 结果见表 1. 由表 1 可见, 患者血清在与各血吸虫 SEA 的反应中, OD 值按 S.j, S.m 和 S.h 依次下降. 经统计学处理结果看, S.j 的 SEA 和 S.h 的 SEA 有着十分显著的差别 ($P < 0.001$). 在患者血清与各血吸虫 SWAP 的反应中, S.j 的 SWAP 的

表 1 33 例日本血吸虫患者血清对血吸虫抗原的 ELISA 的结果

Table 1 The OD value of ELISA tested with Schistosome Ag in 33 cases

Ag	Mean $\pm$ SD	P	No. of positive	(%)
S.j	0.944 $\pm$ 0.248		32	96.97
SEA S.m	0.898 $\pm$ 0.257	$> 0.05^{1)}$	32	96.97
S.h	0.569 $\pm$ 0.154	$< 0.001^{1)}$	31	93.94
S.j	0.686 $\pm$ 0.287		29	87.88
SWAP S.m	0.338 $\pm$ 0.378	$< 0.001^{2)}$	19	57.58
S.h	0.149 $\pm$ 0.280	$< 0.001^{2)}$	11	33.33

1) compare with S.j SEA

2) compare with S.j SWAP

OD 值明显高于 S.m 和 S.h 的, 且三者差别非常显著 ($P < 0.001$; 见图 1).

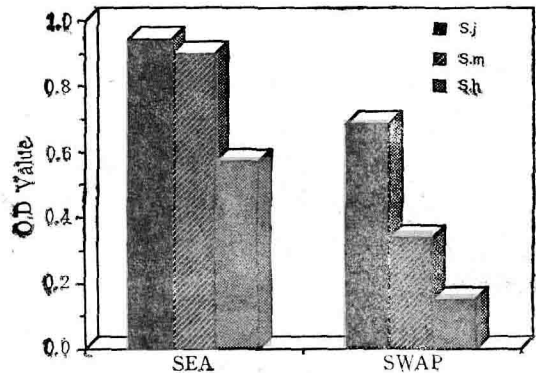


图 1 33 例日本血吸虫病患者血清对血吸虫抗原的 ELISA 平均 OD 值

Fig.1 The average OD value of ELISA tested with Schistosome Ag in 33 cases

对 33 例日本血吸虫病患者血清进行 ELISA 后所统计的阳性率 (OD > 0.3 者) 表明, SEA 均在 90% 以上; SWAP 的阳性率则差别甚大, 后者 S.j 为 87.88%, 而 S.m 和 S.h 仅分别为 57.88% 和 33.33% (表 1).

2.2 患者血清与血吸虫虫卵和成虫抗原的免疫印渍分析

33 例日本血吸虫病患者血清用免疫印渍木检测时, 它们在和 S.j 虫卵抗原的反应中全都能显现免疫结合区带, 敏感度达 100%; 在和其成虫抗原的反应中, 有 32 例阳性, 敏感度为 97%. 表 2 出示了这些反应所得免疫结合各区

表 2 33 例日本血吸虫病患者血清对日本血吸虫抗原的免疫印渍术分析
Table 2. The sera of 33 cases of S.j analysed by Western Blot with S.j. Ag

抗原 Ag	分子量 MW	急 血 Acute S.j.			早 期 Early stage			晚 期 Advanced stage		
		No	Mean	(%)	No	Mean	(%)	No	Mean	(%)
S.j-SEA	<50kD	55	2.29	32.93	10	1.43	27.03	5	2.5	31.25
	50-150kD	53	2.21	31.74	10	1.43	27.03	9	4.5	56.25
	>150kD	59	2.46	35.33	17	2.43	45.94	2	1	12.50
	Total	167	6.69	100.0	37	5.29	100.0	16	8	100.0
S.j-SWAP	<50kD	48	2.00	23.30	10	1.43	22.73	0	0	0
	50-150kD	66	2.75	32.04	14	2.00	31.82	3	1.5	50.00
	>150kD	92	3.83	44.66	20	2.86	45.45	3	1.5	50.00
	Total	206	8.58	100.0	44	6.29	100.0	6	3.0	100.0

带的分析结果。由表 2 可见, 24 例急血患者血清和 S.j 的 SEA 和 SWAP 反应所显区带数目分别平均为 6.96 和 8.58; 7 例早期患者分别为 5.29 和 6.29。若按所显区带分子量差异, 把各区归入: <50kD 为小分子量; 50—150kD 为中等分子量; >150kD 为大分子量进行统计时, 24 例急血患者血清和 S.j 成虫抗原反应所显区带以 >150kD 者为多(图 2)。7 例早期患者血清与 S.j 的 SEA 和 SWAP 反应的区带数也均

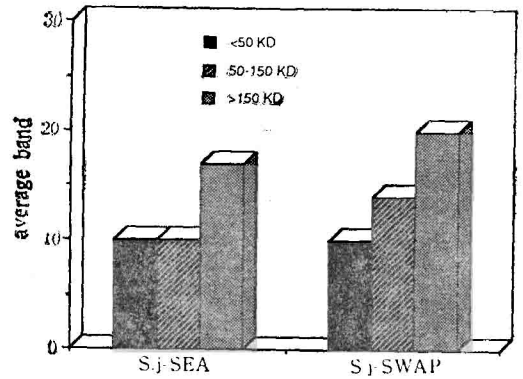


图 3 7 例早期日本血吸虫病患者血清对日本血吸虫抗原免疫印渍分析

Fig.3 The sera of 7 cases of S.j analysed by Western Blot with S.j. Ag

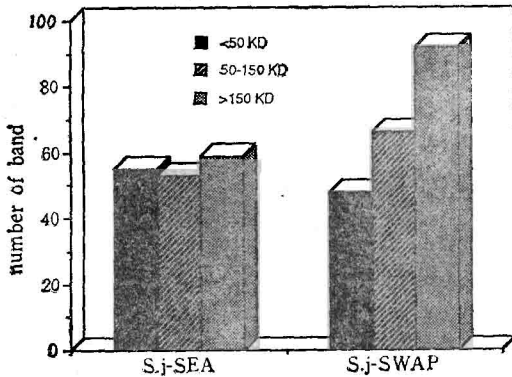


图 2 24 例急性日本血吸虫病患者血清对日本血吸虫抗原免疫印渍分析

Fig.2 The sera of 24 acute cases of S.j. analysed by Western Blot with S.j. Ag

以 >150kD 者为多(图 3)。至于晚期患者, 因仅 2 例而难以作比较分析。

2.3 免疫结合区带的特异性分析

图 4 出示了部分患者所得免疫印渍谱。和

对照——免疫鼠、正常鼠和人的血清(图 4 9—11 列)所得免疫印渍谱相比较, 几乎所有患者都能在 32~222kD 的范围内显现免疫结合区带。多数病例(28 例)可在分子量为 180, 54 和 32kD 处显现特有的较宽区带。对和 S.j 的 SWAP 反应而言, 有 32 例能在 36—220kD 范围内显现大量的区带, 其中有 26 例能在 190 和 64kD 处显现两条特有的较宽区带(图 4b), 在 24 例急血患者中有 21 例还能在 34kD 处(图 4b 之 1~5 列)显现一条特有的较宽区带。相反, 对正常人混合血清和单人血清所进行的 8 次免疫印渍试验中, 均无上述区带显现(图 4a 和 b 之 11 列)。

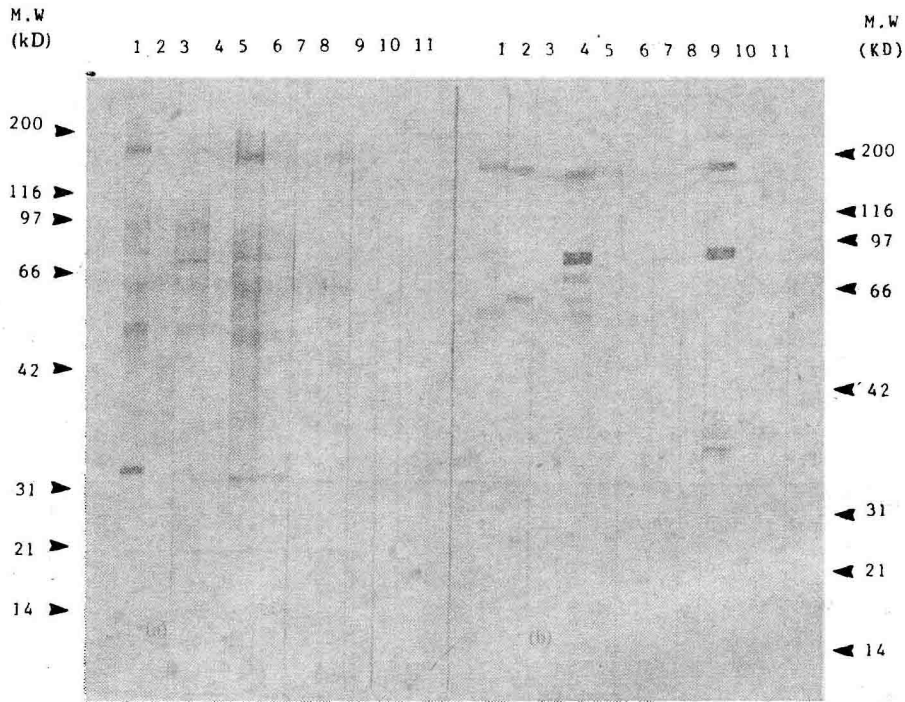


图 4 部分患者血清、免疫鼠、正常鼠及正常人血清与日本血吸虫卵成虫抗原的结合区带
Fig.4 Sera of *S. japonica* patients and *S. j.*-immunized mice were tested in Blot with *S.j* SEA and SWAP

a. 与虫卵抗原的结合条带 (tested with *S.j* SEA) b. 与成虫抗原的结合条带 (tested with *S.j* SWAP)
1—5 急性病例 (acute *S.j* cases) 6—7 早期病例 (*S.j* early stage cases) 8 晚期病例 (*S.j* advanced stage case) 9 免疫鼠血清 (immunized mice sera) 10 正常鼠血清 (normal mice sera) 11 正常人血清 (normal human sera)

表 3 33 例不同感染度日本血吸虫病患者血清对日本血吸虫抗原免疫印渍术分析
Table 3. The sera of 33 cases of *S.j.* analysed by Western Blot with *S.j.* Ag

Degree of infection	虫卵抗原 <i>S.j</i> -SEA				成虫抗原 <i>S.j</i> -SWAP			
	急性 Acute <i>S.j.</i>	早期 Early stage	晚期 Advanced stage	平均条带数 Average band	急性 Acute <i>S.j.</i>	早期 Early stage	晚期 Advanced stage	平均条带数 Average band
+	12(89)	3(14)	0(0)	6.87	12(111)	3(12)	0(0)	8.2
++	4(30)	1(4)	0(0)	6.80	4(33)	1(4)	0(0)	7.4
+++	5(27)	2(11)	2(16)	6.00	5(27)	2(12)	2(3)	4.67
++++	3(18)	1(7)	0(0)	6.25	3(34)	1(16)	0(0)	12.5

括号内数字表示区带数, 括号前数字表示病例数 The number in the bracket denotes the number of bands, the number before the bracket denotes the number of cases

2.4 免疫结合区带数和感染度的关系

33 例日本血吸虫病患者的感染程度是根据粪孵毛蚴数来区分的。即毛蚴数 1—5 者为 +; 6—10 为 ++; 11—15 为 +++; >16 为 ++++。患者感染度和其血清经免疫印渍术

分析所得区带数之间的关系如表 3 所示。可见就 *S.j* 的 SEA 而言, 不同感染度患者血清所显免疫结合区带大致相似。但就 *S.j* 的 SWAP 而言, 正如图 5 所示, 感染度为 ++++ 者, 其免疫结合区带数明显增加。

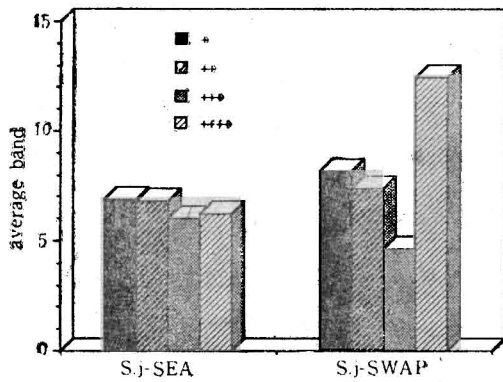


图 5 33 例不同感染度日本血吸虫病患者血清对日本血吸虫抗原免疫印渍术分析

Fig.5 The sera of 33 cases of S.j analysed by Western Blot with S.j Ag

3 讨 论

酶联免疫吸附试验 (ELISA) 是现代检测许多疾病的一种较好方法, 为了和免疫印渍术相比较, 本研究也用 ELISA 检测了血吸虫病患者血清。从结果看 (表 1), 对 S.j 的 SEA 和 SWAP 的阳性率分别为 96.97% 和 87.88%, 这说明 ELISA 法用于检测日本血吸虫病确是有效的。当用此法来比较 S.j, S.m 和 S.h 三种血吸虫时 (图 1), 我们发现三种对 SEA 的反应都很敏感, 均在 90% 以上, 相反三者对 SWAP 的敏感度不及 SEA, 且彼此相差很大 (表 1)。这一结果说明, 当用 ELISA 法检测这些血吸虫病时, 还是采用 SEA 为好。

近几年, 建议用免疫印渍术替代传统方法检测各种血吸虫病的报道越来越多^[1-7]。这些研究或用 SEA^[3] 或用 SWAP^[6], 本文则同时对二者进行了比较研究。结果表明, 二者的敏感度都要高于 ELISA 法, 即 SEA 为 100%, SWAP 为 97% (表 2)。此值与 Slemenda 等人报道的结果相似^[4]。

ELISA 虽在检测日本血吸虫病时也具较高敏感度, 但它还不能像免疫印渍术那样分辨出患者所属急、慢性和早、晚期。正如图 4 所示印渍谱表明, 24 例急血患者对 S.j 的 SEA 和对 S.j 的 SWAP, 分别能显现 3—19 和 1—19 条结合区带, 而 7 例早期患者则只能分别出现 2—8 和

1—16 条。这一结果表明, 各试验组均能显现众多的区带, 这反映出 S.j 的 SEA 和 SWAP 所具有的复杂性和患者血清抗体的多价性。这一结果又表明, 不论是 S.j 的 SWAP 还是 SEA, 凡是急血患者所显区带数均比早期患者所显现的要多 (请同时比较图 2 和图 3), 说明急性患者免疫反应强烈, 符合急性患者的临床表现。

从图 4 所示免疫印渍谱上还能看到各种反应的特有区带。例如对 S.j 的 SEA 反应, 多数病例可在分子量约为 180、54 和 32kD 处显现三条较宽区带; 对 S.j 的 SWAP 反应, 是在 190 和 64kD 处显现两条区带; 急性患者则在 34kD 处还可找到一条较宽区带。从这一结果看, 作者虽然还不能明确地得出 180—190kD 之间的区带就是 SEA 和 SWAP 的共同抗原带, 而 34kD 则是急性患者所具有的特异性抗原带这类肯定的结论, 但各试验组印渍谱之间存在差异是不容忽视的。因为这些差异除了可能在临床诊断中具有一定意义外, 也可能反映了血清抗体与宿主保护性免疫力之间的关系。例如 Mitchell 等人^[10]也曾报道, 近亲繁殖的 129/J 小鼠感染日本血吸虫后会产生一种针对 26kD 成虫抗原的抗体。Grzych 等人报道^[11], 识别 S.m 表膜 38kD 的单抗 1PLS1 对大鼠、小鼠、猴和人体血吸虫感染均具保护能力。Smith 等人也提出^[12], 识别 S.m 童虫和成虫表膜 155 kD 的抗体, 具有抗攻击感染的保护力。综上所述, 本文观察到的各试验组间区带之差异, 值得进一步研究, 有关工作正在进行中。

衷心感谢周学章教授提供本研究所患者血清。

参 考 文 献

- 1 范培昌编著. 生物大分子印渍技术与应用. 上海科技文献出版社, 1989
- 2 Miller B *et al.* *Neurology*, 1984; 34: 695
- 3 Tsang V C W *et al.* *J Parasitol*, 1982; 68: 1034
- 4 Slemenda S B *et al.* *Am J Trop Med Hyg*, 1988; 39(5): 469
- 5 Rogers M V *et al.* *Molecu Biochem parasit*, 1988; 29:77
- 6 石佑恩等中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1988; 6(4): 245
- 7 裘丽姝等. 上海免疫学杂志, 1988; 8(2): 118

- 8 Tsang V C W *et al. Methods in Enzymology*, 1983; 92: 377
 9 Harn DA *et al. J Exp Med*, 1984; 159: 1371
 10 Mitchell G F *et al. Parasit Immuno*, 1985; 7:165
 11 Grzych J M *et al. J Immunology*, 1982; 129: 2739
 12 Smith M A, Clegg J A. *Science*, 1985; 227: 535

IMMUNOREACTIVITY OF PATIENT SERA TO SCHISTOSOME JAPONICUM EGG AND ADULT ANTIGENS

XU Alian Zhou Xiaoyin

(Department of Parasitology, Zhejiang Medical University)

Donald A. Harn

(Department of Tropical Public Health, Harvard School of Public Health, USA)

ABSTRACT

A sensitive and specific immunoblot assay was used to analyze 33 cases of immune reactions between sera of Schistosomiasis Japonica patients and schistosome Japonicum egg (SEA) and adult (SWAP) antigens. The assays consists of SDS-PAGE and Western blot. The sensitivity of SEA reaction is 100%, while that of SWAP is 97%, with negative reactivity in the control sera. In most cases (28/33), SEA reactive to patient sera show three wide bands at 180,54 and 32kD while in the case of SWAP it shows two wide bands at 190 and 64kD in 26 cases(26/32). In most patients (21/24) with acute schistosomiasis Japonica, an additional wide band is seen at 34kD. These results suggest clinical value of Western Blot in the diagnosis of schistosomiasis Japonica.

Key words immunoreactivity, schistosomiasis japonica, Western blot, ELISA

(上接第 54 页)

HCMV-DNA 阳性率分别为 83.3% 和 60.3%。从 DNA 水平进一步说明了 HCMV 感染人群的普遍性和严重性,以及 HCMV-DNA 确实潜伏于血液白细胞中。此外尚发现 HCMV-DNA 检出率与血沉值高低之间无任何相关性。

PCR 高度的特异性和敏感性避免了临床标

本的误诊和漏诊。但因 HCMV 感染广泛,且发生潜伏感染,因而 PCR 的高阳性率与临床症状不尽一致。对 HCMV 来讲,PCR 具有诊断价值是一方面;另一方面 PCR 更适用于探讨 HCMV 感染机理、先天性感染的判断与预测、流行病学调查以及血源的筛选。