论著

文章编号:1000-5404(2010)07-0654-04

免疫组化技术对斯氏狸殖吸虫成虫免疫诊断相关抗原的初步研究

牛靖萱[1],张锡林[2],王利芳[1],陈文碧[1],何 谐[2],陈 琳[2] (646000 四川 泸州,泸州医学院病原生物学教研室[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部病原生物学教研室[2])

[摘要] **目的** 初步分析斯氏狸殖吸虫成虫表膜和肠相关抗原,探讨肺吸虫病的免疫诊断的特异性诊断抗原。**方法** 斯氏狸殖吸虫成虫制备成15 μm的冰冻切片,肺吸虫患者血清识别斯氏狸殖吸虫成虫特异性抗原,采用免疫金标记和免疫酶标记检测技术对抗原进行定位,激光共聚焦显微镜技术进行半定量分析以及免疫透射电镜对其细微结构的观察。分实验组和对照组。**结果** 肺吸虫患者血清识别的斯氏狸殖吸虫成虫抗原定位于虫体的表膜和肠腔,表膜抗原半定量分析平均灰度值为80.65,肠腔抗原半定量分析平均灰度值为71.26,电镜下可见胶体金附着于肠腔和表膜的双层结构。**结论** 肺吸虫患者血清识别的斯氏狸殖吸虫成虫抗原都为表膜相关抗原和肠相关抗原,因此与肺吸虫病免疫诊断相关的诊断抗原为虫体表膜和肠上皮产生的相关蛋白。

[关键词] 斯氏狸殖吸虫;表膜;肠腔;免疫组化

[中图法分类号] R383.2; R329.11; R446.62 **[文献标志码]** A

Immunodiagnosis-associated antigens of *Pagumogonimus skrjabini* adult worm with immunohistochemical technique

Niu Jingxuan[1], Zhang Xilin[2], Wang Lifang[1], Chen Wenbi[1], He Xie[2], Chen Lin[2] ([1]Department of Pathogenic Biology, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan Province, 646000; [2]Department of Pathogenic Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] Objective To investigate tegument antigens and intestine-associated antigens of *Pagumogonimus skrjabini* (*P. skrjabini*) adult worm and provide the immunodiagnostic antigen for clinical diagnosis. Methods The adults of *P. skrjabini* were sectioned at a thickness of 15 μm. Serum specific antigens from patients with *P. skrjabini* infection was used for immunological study. The immunodiagnosis-associated antigens were identified by using immunogold techniques, immune electron microscopy, enzyme-labeled immunoassay and laser scanning confocal microscopy. Results Both immunogold techniques and enzyme-labeled immunoassay showed that specific antigens were concentrated in the tegument and enteric cavity. Confocal laser scanning microscopy showed that semi-quantitative analysis of tegument antigen of average gray value was 80.65, and that of intestine antigen was 71.25. At the ultrastructural level, the immunogold labeling showed deposit of gold particles on the surface membrane of tegument and enteric cavity. Conclusion Identification of adult specifical antigens of *P. skrjabini* by using paragonimiasis sera are tegument- and intestine-associated antigens, therefore, immunodiagnostics of paragonimiasis are the adult components of the surface membrane and intestine.

[Key words] *Pagumogonimus skrjabini*; tegument; enteric cavity; immunohistochemistry

Supported by the Foundation of Scientific Research of Department of Education of Sichuan Province (2005A067) and the Japan Health Science Foundation Phase Ⅱ (JPH20070512). Corresponding author: Zhang Xilin, Tel: 86-23-68752245, E-mail: jsczxl@tmmu.edu.cn

肺吸虫病在中国广泛分布、是危害严重的食源性寄生虫病[1]。在肺吸虫的虫种中,斯氏狸殖吸虫因人体不是该虫的正常宿主,感染后导致“幼虫移行症”,引起多处组织、器官的损害,严重危害身体健康[2]。由于该病的临床表现复杂多样,常被误诊、误治[3]。斯氏狸殖吸虫的成虫抗原作为临床常用的免疫诊断性抗原,在临床诊断和鉴别诊断中起重要作用,因此该抗原的特异性和灵敏性是免疫诊断的关键。本实验以免疫组织化学为理论依据对抗原进行的分析,采用免疫

[基金项目] 四川省教育厅科研基金(2005A067);日本第二期健康科学基金(JPH20070512)

[通信作者] 张锡林,电话:(023)68752245,E-mail:jsczxl@tmmu.edu.cn

金标技术、免疫酶标技术、激光共聚焦显微镜技术和免疫透射电镜对抗原的定位、半定量和细微结构的观察和分析，对斯氏狸殖吸虫成虫免疫诊断相关抗原分析，为临床研究特异性的免疫诊断抗原提供依据。

1 材料与方法

1.1 成虫虫体切片的制备

采集四川省兴文县斯氏肺吸虫病流行区的溪蟹，从中分离出斯氏狸殖吸虫的囊蚴。经腹腔注射感染雄性家犬（200个囊蚴/条）1条。感染90 d后动物处死，检获成虫。取2条成虫浸泡于4%的多聚甲醛4℃过夜，次日分别在蔗糖浓度为10%、15%、25%中4℃梯度脱水。冰冻切片机将虫体切成15 μm的薄片，将其贴附于玻片上，冷丙酮固定标本，5%的脱脂奶粉封闭抗原4 ℃过夜，0.01 mol/L PBS洗涤4次，5 min/次，玻片储存于-20 ℃备用。

1.2 斯氏狸殖吸虫患者血清和正常血清

5份斯氏狸殖吸虫病患者血清作为实验组，采自本院附属医院住院和门诊患者。均有生吃或半生吃溪蟹史和游走性皮下包块体征。经活体组织病理切片检查证实为寄生虫性包块，斯氏狸殖吸虫成虫抗原皮试和ELISA血清抗体检测均阳性。5份正常血清作为对照组，采自体健、无肺吸虫病史并且ELISA血清抗体检测均阴性的志愿者。

1.3 主要试剂和仪器

Microm Hm525冰冻切片机（德国美康公司）、MF5荧光倒置显微镜（日本OLYMPUS公司）、Leica TCS SPE激光共聚焦显微镜（德国徕卡公司）、LIBRA 120透射电镜（德国ZEISS公司）、碘化丙啶（美国Sigma公司）、羊抗人IgG荧光素（北京中杉公司）、辣根过氧化物酶标羊抗人IgG（上海史瑞可生物科技有限公司）、胶体金羊抗人IgG由实验室自制。

1.4 方法

1.4.1 免疫金标技术检测　取出成虫冰冻切片在室温下复温10 min，分别滴加肺吸虫患者的混合血清（1∶50）和正常人混合血清（1∶50）4 ℃过夜，0.01 mol/L PBS洗涤4次，5 min/次；滴加胶体金羊抗人IgG溶液37 ℃孵育2 h，0.01 mol/L PBS洗涤4次，5 min/次，光镜下观察结果。

1.4.2 免疫酶标技术检测　取出成虫冰冻切片在室温下复温10 min，分别滴加肺吸虫患者的混合血清（1∶50）和正常人混合血清（1∶50）4 ℃过夜，0.01 mol/L PBS洗涤4次，5 min/次；滴加辣根过氧化物酶标羊抗人IgG（1∶500）37 ℃孵育2 h，0.01 mol/L PBS洗涤4次，5 min/次，光镜下观察结果。

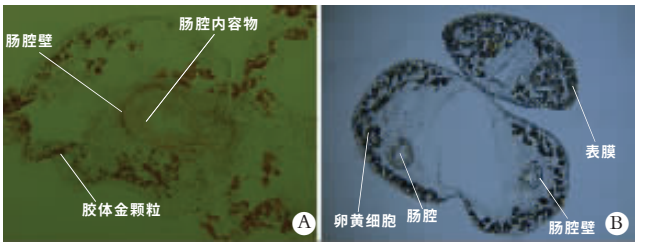
1.4.3 免疫荧光技术检测　取出成虫冰冻切片在室温下复温10 min，分别滴加肺吸虫患者的混合血清（1∶50）和正常人混合血清（1∶50）4 ℃过夜，0.01 mol/L PBS洗涤4次，5 min/次；滴加羊抗人IgG荧光素（1∶10）37 ℃孵育2 h，0.01 mol/L PBS洗涤4次，5 min/次；滴加PI（5 μg/ml）室温避光15 min，0.01 mol/L PBS洗涤4次，5 min/次；滴加80%的甘油封片盖上盖玻片，共聚焦显微镜观察结果。

1.4.4 免疫电镜技术检测　经多聚甲醛固定的虫体在其中段取1 mm的厚度作为样品，按照免疫金标技术的顺序进行样品的制备（包括正常人血清的阴性对照），分肠腔和表膜两个样本。送往电镜室进行免疫电镜样品制备，透射电镜观察结果。

2 结果

2.1 免疫金标检测结果

光镜下观察到红色金颗粒附着在成虫的表膜和肠腔。表膜的表层及下层都可见红色的金颗粒附着，肠腔壁及肠腔内容物均有细致的红色颗粒附着。红色颗粒的附着说明肺吸虫患者血清识别的斯氏狸殖吸虫成虫抗原的所在位置（图1A）。正常血清为阴性对照，未见红色胶体金颗粒附着在肠腔和表膜及其他位置（图1B）。

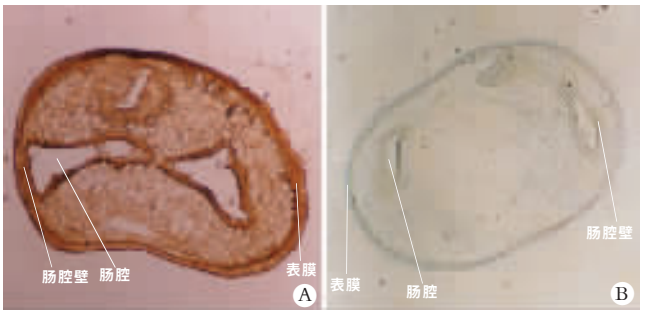


A：实验组（×400）；B：对照组（×100）

图1 两组免疫金标实验光镜观察结果

2.2 免疫酶标检测结果

光镜下观察到成虫的表膜和肠腔壁经免疫酶标后呈深棕色，可清楚地观察到表膜和肠腔壁的双层结构（图2A），这些棕色的显色说明肺吸虫患者血清识别的斯氏狸殖吸虫成虫抗原的所在位置。正常血清作为阴性对照，结果显示肠腔和表膜没有显色（图2B）。

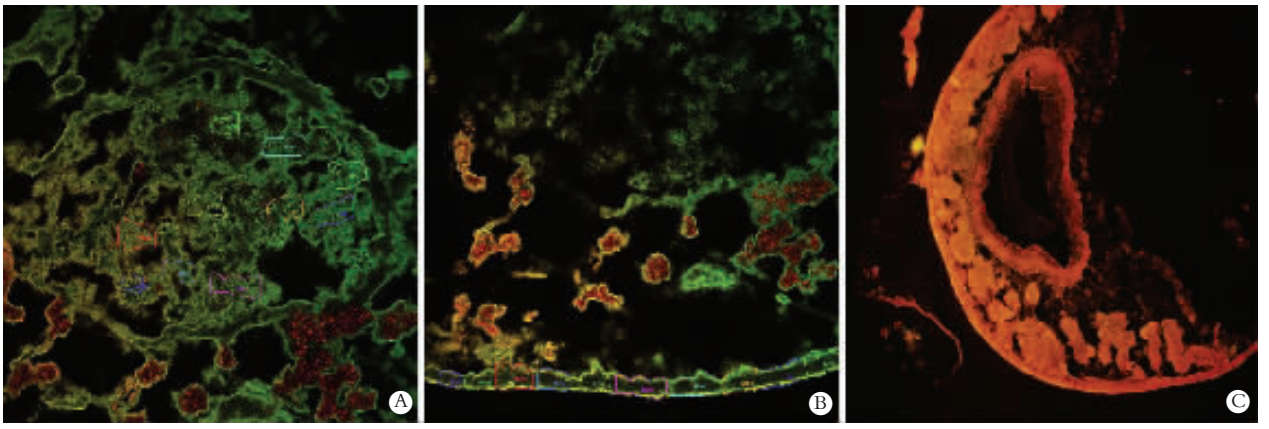


A：实验组；B：对照组

图2 两组免疫酶标实验光镜观察结果（×100）

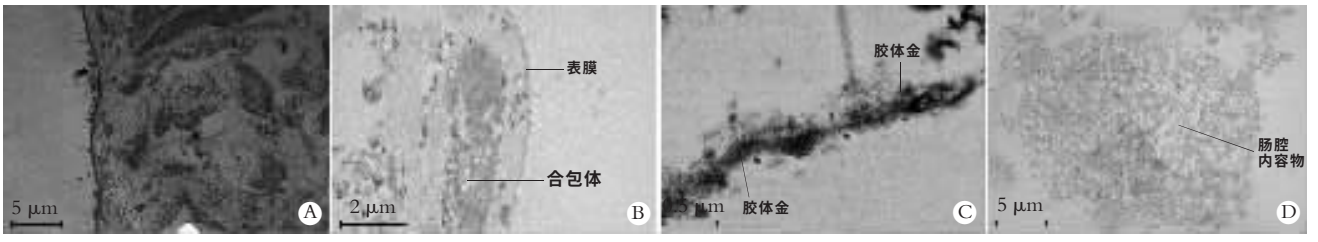
2.3 免疫荧光检测结果

使用共聚焦系统观察斯氏狸殖吸虫成虫抗原的分布。成虫虫体抗原与患者血清特异性结合形成的免疫复合物再与羊抗人IgG荧光素结合在激光束的作用下发出绿色荧光，细胞核与PI的结合在激光束下发出的红色荧光（图3A、B），图中可以清楚地观察到成虫抗原分布在表膜的双层结构和肠腔壁及肠腔内容物。正常血清对照标本只观察到红色荧光标记的细胞核，肠腔和表膜均无绿色荧光标记（图3C）。同时运用激光共聚焦显微镜中的图像处理软件LAS-TCS SPS，分别对是肠腔和表膜抗原进行半定量分析，图像处理软件选定具有代表的10个



A:实验组肠腔;B:实验组表膜;C:对照组

图3 免疫荧光共聚焦显微镜观察两组成虫抗原分布 (×400)



A:实验组表膜;B:实验组肠腔;C:对照组表膜;D:对照组肠腔

图4 两组免疫电镜观察结果

区域(图3A、B),并对区域的面积和相对应的荧光灰度值进行计算,荧光灰度值表示抗原量的相对值,10个区域的荧光灰度值的平均值则是对该抗原的半定量分析,经软件分析得到表膜抗原半定量分析平均灰度值为80.65,肠腔抗原半定量分析平均灰度值为71.26,代表成虫表膜和肠腔产生的抗原量。

2.4 免疫电镜检测结果

电镜下可见斯氏狸殖吸虫成虫超微结构,直径约为20 nm的胶体金在电镜下呈致密黑色颗粒,均匀地附着在虫体的表膜和肠腔壁的双层结构(图4A、B),图中箭头所指为胶体金颗粒。胶体金的附着标示肺吸虫患者血清识别的斯氏狸殖吸虫成虫抗原的所在位置。正常血清作为阴性对照组则无黑色的致密物附着于表膜及肠腔,只见其正常组织结构(图4C、D)。

3 讨论

免疫组织化学技术是运用抗原与抗体之间结合具有高度的特异性,以此对组织切片或细胞标本中的某些化学成分进行原位的定性、定位或定量研究的一门技术[4]。抗体与抗原结合后形成的免疫复合物是无色的,因此,须借助组织化学方法将抗原抗体反应部位显示出来,进而分析结果。本实验使用胶体金、辣根过氧化物酶标及荧光素,与抗原抗体的复合物相结合,在显微镜下观察结果,从而对肺吸虫患者血清特异性识别的斯氏狸殖吸成虫抗原的成分进行定性、定位及定量的分析与研究。

本实验采用斯氏狸殖吸虫患者血清作为识别成虫抗原的第一抗体,与临床诊断应用相结合,提高特异性抗原在临床的实用性。免疫金标实验是对抗原位置的定位,胶体金作为标记物与抗原抗体的复合物相结合,清晰、具体的显示抗原的具体位置,红色的颗粒显示出肠腔和表膜是抗原的主要定位。免疫酶标实验和免疫电镜实验进一步说明了抗原所在位置,结果清楚显示出表膜和肠腔的双层结构。斯氏狸殖吸虫成虫的表膜主要由蛋白质、脂类和糖类构成,结果表明表膜抗原具有较强的抗原性,在入侵机体时与外界环境密切接触,起重要的免疫作用。肠腔作为寄生虫的消化系统最重要的器官为虫体的发育成熟提供营养物质,在宿主体内,肠上皮产生的相关蛋白在参与物质代谢、养分吸收和免疫调节作用中可发挥重要作用。

表膜和肠腔是多种蛋白酶产生的部位,亮氨酸氨肽酶经免疫组化技术定位在卫氏并殖吸虫的肠上皮,并具有在宿主体内分解代谢血红蛋白的作用[5]。血红蛋白酶同样定位在肠上皮,扮演着分解血红蛋白及提供营养的角色[6]。卫氏并殖吸虫的PwCP2是一种分子克隆的半胱氨酸蛋白酶,免疫组化技术将其定位在肠上皮,可作为有效地诊断抗原[7]。一些蛋白酶不仅存在于肠腔或是表膜,还分布在虫体的其他部位,副肌球蛋白通过免疫组化定位在成虫虫体的肠腔、表膜、肌层、口吸盘、咽等其他部位,生物学和免疫学特性的研究显示可作为今后疫苗和化疗药物发展的新方向[8]。免疫组化技术可分析某种蛋白在虫体不同的发育阶段中的表达,说明该蛋白在虫体发育中的作用。

卫氏并殖吸虫相对分子质量为 28×10^3 的克鲁兹蛋白酶也为半胱氨酸蛋白酶家族的一种。免疫组化结果显示 Pw28CCP 只定位在成虫的肠上皮,说明 Pw28CCP 只表达在成虫阶段,在成虫阶段发挥作用[9]。卫氏并殖吸虫的分泌排泄物最主要成分的相对分子质量为 27×10^3 和 28×10^3,在研究卫氏并殖吸虫的后尾蚴半胱氨酸蛋白酶的来源时,通过免疫组化定位在后尾蚴的排泄囊内[10]。另外,一些蛋白酶是由其他器官分泌的,卫氏并殖吸虫的磷脂氢过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶 pwGPx1 和 pwGPx2 通过定位在卵黄腺和子宫卵[11],pwGPxs 可能积极地参与了卫氏并殖吸虫氧化危害的解毒作用。本实验结果显示肺吸虫患者血清识别的成虫抗原在表膜和肠腔,表明作为临床应用的免疫诊断抗原主要成分是表膜抗原和肠相关抗原,但是也不排除其他部位的抗原可以应用于临床免疫诊断,并且斯氏狸殖吸虫成虫虫体内含有多种的蛋白酶,在虫体的发育、寄生、移行、致病及免疫逃避起重要作用,这些酶的具体作用和作用机制需在今后的实验中进一步的研究论证,为临床实际应用提供理论依据。

此外,本实验采用激光共聚焦显微镜对抗原进行抗原的半定量分析,根据荧光灰度值通过图像处理软件 LAS-TCS SPS 计算出选定区间的抗原量,对抗原量有较为客观的评估。可采用此技术对虫体不同发育阶段时期蛋白的表达,分别进行定位和定量的分析,研究蛋白在发育的不同时期表达情况以此来研究该蛋白在虫体的发育过程中的状况。并可运用激光共聚焦的三维成像技术,对虫体的肠腔、卵黄腺等组织结构进行三维的成像,对抗原的分布做具体客观的研究。另外,本实验采用的是患者混合血清对成虫抗原的定位,血清和虫体抗原的成分都不是单一的,对抗原的定位分析只是初步的研究,今后可运用重组抗原技术对表膜和肠腔重要抗原做进一步的研究,为临床提供高特异性的免疫诊断抗原。

参考文献:

[1] Nakamura-Uchiyama F, Onah D N, Nawa Y. Clinical features of paragonimiasis cases recently found in Japan: parasite-specific immunoglobulin M and G antibody classes[J]. Clin Infect Dis, 2001, 32(12): e151 - e153.

[2] 沈一平. 实用肺吸虫病学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 157 - 161.

[3] 干小仙, 王越, 施晓华. 31例食源性肺吸虫病诊治分析[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2006, 33(6): 368 - 370.

[4] 邱曙东, 宋天保. 组织化学与免疫组织化学[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 171 - 172.

[5] Song S M, Park J H, Kim J, *et al*. Identification and characterization of Paragonimus westermani leucine aminopeptidase[J]. Parasitol Int, 2008, 57(3): 334 - 341.

[6] Choi J H, Lee J H, Yu H S, *et al*. Molecular and biochemical characterization of hemoglobinase, a cysteine proteinase, in Paragonimus westermani[J]. Korean J Parasitol, 2006, 44(3): 187 - 196.

[7] Yang S H, Park J O, Lee J H, *et al*. Cloning and characterization of a new cysteine proteinase secreted by Paragonimus westermani adult worms[J]. Am J Trop Med Hyg, 2004, 71(1): 87 - 92.

[8] Zhao Q P, Moon S U, Na B K, *et al*. Paragonimus westermani: biochemical and immunological characterizations of paramyosin[J]. Exp Parasitol, 2007, 115(1): 9 - 18.

[9] Yun D H, Chung J Y, Chung Y B, *et al*. Structural and immunological characteristics of a 28-kilodalton cruzipain-like cysteine protease of Paragonimus westermani expressed in the definitive host stage[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(6): 932 - 939.

[10] Yang H J, Chung Y B, Kang S Y, *et al*. Excretory bladder: the source of cysteine proteases in Paragonimus westerman imetacercariae[J]. Korean J Parasitol, 2002, 40(2): 89 - 92.

[11] Kim S H, Cai G B, Bae Y A, *et al*. Two novel phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase genes of Paragonimus westermani induced by oxidative stress[J]. Parasitology, 2009, 136(5): 553 - 565.

(**收稿**:2009-10-13;**修回**:2009-12-04)

(编辑 汪勤俭)

作者修改稿件注意事项

作者收到编辑退修意见(E-mail)后,请按修改意见认真修改,如编辑提示有附件,请登陆本刊稿件处理系统,点击操作栏放大镜图标查看。稿件修改处最好用红色标注,方便编辑和审稿专家查看。修改完成后,请登录稿件处理系统,点击操作栏红色箭头,按操作步骤上传修改稿及答辩意见。注意:在稿件修改说明栏按意见逐条说明修改情况(必填),但不能简单地以"已按要求修改"等字样作为修改说明。如对修改意见有异议,可说明理由,如文字太多,可以"修改说明附件"形式上传。上传修改稿时注意:不要误传为修改说明附件或稿件附件。如有彩图请提供单张 JPG、TIF 格式的图片(要求像素 300 万以上,不要在图上附加 A、B 等信息,也不要将几张图合并);如有线条图请提供 Excel 原始数据图,一起压缩后以"稿件附件"形式上传。确认上传成功后点击下一步,最后点完成。如有问题,可直接与编辑联系,联系方式请点击本刊主页"联系我们"查看。

本刊编辑部