

日本血吸虫未成熟虫卵 26/28 kDa 抗原诱导抗雌虫生殖和抗卵胚发育免疫的研究

汪世平^{1*} 周汨波¹ 沈国励^{*} 陈焱¹ 李华¹ 赵慰先²

1 湖南医科大学 长沙 410078 2 南京医科大学 南京 210029 * 湖南大学博士后流动站

摘要 目的: 探讨日本血吸虫未成熟虫卵的 26/28 kDa 抗原(S IEA 26/28 kDa) 诱导小鼠产生抗雌虫生殖免疫的效果。方法: 采用纯化的 S IEA 26/28 kDa 抗原以及 S IEA -I 抗原, 分别免疫 BALB/c 小鼠, 于攻击感染后 46 d 进行粪卵、组织内虫卵定量。结果: 证明 S IEA 26/28 kDa 抗原能诱导小鼠产生抑制雌虫生殖的免疫力。与对照组比较, S IEA 26/28 kDa 抗原免疫鼠减虫虽不明显, 但肝组织内总卵数、成熟卵数和粪卵数(EPG) 分别减少 48.1%、83.6%、87.3%, 死亡卵数明显增加($P < 0.001$)。此外, 未纯化的 S IEA 和纯化的 S IEA 26/28 kDa 抗原免疫组均见雌虫子宫内虫卵数下降, 分别达 40.9%、54.8%, 而 SEA 和 S IEA -I 抗原免疫未见上述效应。结论: 提示抗雌虫生殖免疫和抗卵胚发育的效应, 主要与 S IEA 26/28 kDa 蛋白组分有关。

关键词 日本血吸虫 未成熟卵 26/28 kDa 抗原 免疫 抗卵胚 抗雌虫生殖

长期以来, 有关血吸虫疫苗的研究, 大多集中于抗感染免疫方面。迄今, 已鉴定出多种保护性抗原, 如 Sm 97、Gp 68、Gp 38、Gp 28、Sj 28、Sm 26、Sj 26、Sj 24-26、P 18 等抗原, 均来自于血吸虫成虫或童虫。这些抗原免疫小鼠或大鼠后可产生对攻击感染的部分抵抗力^[1]。然而, 有关抗病(抗卵)免疫的研究, 尤其是抗雌虫生殖产卵和抗卵胚发育免疫的研究一直是一个薄弱环节。Garcia 等(1987) 采用新鲜未成熟活卵反复致敏 BALB/c 小鼠, 诱导产生了抗卵胚发育的效应^[2]。作者等比较了不同发育阶段、不同方法制备的虫卵抗原的抗卵胚效果, 发现来自胚胎前期和胚胎早期的未成熟虫卵匀浆抗原(S IEA) 同样具有抗卵胚作用, 而且还兼有抗雌虫生殖免疫的效果^[3,4]。因此对 S IEA 的组分进行分析, 发现 S IEA 中 26/28 kDa 抗原是诱导保护性体液应答的主要成分^[5], 本文观察了 S IEA 26/28 kDa 抗原免疫诱导宿主产生抗生殖免疫的效果。

材料和方法

抗原制备

1 S IEA 和 SEA 的制备

用于抗雌虫生殖免疫的 S IEA 和 SEA 均按文献^[3]报道的方法制备。取健康新西兰家兔

以常规腹部铺片法感染 4 500—5 000 条日本血吸虫尾蚴, 于感染后 30—32 d 解剖, 从兔肝中分离纯净的未成熟虫卵, 置电动匀浆器中冰浴匀浆, 冷浸制备 S IEA。SEA 制备方法同上, 唯感染动物的日本血吸虫尾蚴数为 2 000 条, 感染后 48 d 取兔肝, 分离虫卵, 采用 260 目尼龙绢过筛和离心, 去除未成熟虫卵, 镜下计数要求含毛蚴的虫卵数大于 95% 以上。

2 S IEA 26/28 kDa 组分的分离纯化

按文献^[6,7]进行。

3 S IEA -I 分部纯化抗原的制备

按文献^[6,7]进行。收集 A cA 超凝胶柱层析后第 1 分部抗原, 合并 F1 蛋白峰各管, 测蛋白浓度后分装, 置 -20 备用。

动物免疫与攻击感染

BALB/c 小鼠(6—8 wk) 由本校实验动物中心提供, 随机分 3 组供免疫和对照用。A 组采用 S IEA -I 抗原进行免疫, B 组采用 S IEA 26/28 kDa 抗原免疫, C 组为无抗原的佐剂对照组, 每次每鼠皮下注射 50 μ g 抗原加福氏佐剂免疫, 每 2 wk 免疫 1 次, 连续 3—5 次。于末次免疫后血清效价达 1:12 800 以上时, 用新鲜逸出尾蚴 10 条行攻击感染。(阳性

* 本工作得到国家自然科学基金(39370633) 和卫生部血吸虫病重点研究项目(94-Y-05) 资助, 特此致谢。

钉螺购自湖南省寄生虫病防治研究所)。

考核方法与指标

免疫鼠和对照鼠均于感染后 46 d 进行解剖, 作虫荷测定、粪卵定量和肝、肠组织中虫卵定量计数, 考核方法均按文献^[3]进行。组织中各虫卵发育阶段的分类计数, 判断标准按严自助(1974)的描述进行^[8], 并将初产卵和空泡期卵合并为胚胎前期虫卵; 将单胚细胞期虫卵及成熟前胚胎期卵合并为胚胎发育期虫卵; 将含毛蚴的虫卵划为成熟期虫卵; 将颗粒性虫卵、萎缩性虫卵、黑卵等合并为死亡卵。将上述各组进行统计学处理, 采用两样本均数比较的 *t* 检验, 比较试验组与对照组的统计学差异, 并以 *P* 值表示。

雌子宫内虫卵计数

采用心脏灌注法, 从攻击感染小鼠门静脉收集成虫, 将成虫置于生理盐水中洗涤, 使

雌、雄虫分离, 然后将雌虫铺于载玻片上, 显微镜下计数整个子宫内虫卵数。

结 果

成虫发育率

采用 S IEA 26/28 kDa 和 S IEA -I 分部抗原免疫小鼠, 攻击感染后 46 d, 收集成虫计数, 结果 S IEA 26/28 kDa, S IEA -I 与对照组的成虫发育率分别为 34.3%, 32.9% 与 40.0%, 各组间无显著差异。

肝组织内各期虫卵的数量及分布

从表 1 可见, 采用 S IEA 26/28 kDa 抗原免疫后, 肝组织内虫卵数 (EPG) 显著下降 (48.1%), 成熟虫卵下降率更为明显 (83.6%), 死亡卵数较对照组显著增加 (*P* < 0.001), 而 S IEA -I 分部抗原免疫后未能诱导宿主产生上述效果 (表 1)。

表 1 免疫鼠攻击感染后肝组织内各期虫卵的分布状况

Table 1 Percentage distribution of immature and mature or dead eggs in the livers of immunized SIEA -I or SIEA 26/28 kDa antigen mice after challenge with *S. japonicum* cercariae

组别 Group	胚胎前期 Pre-embryo egg			胚胎发育期 Embryo egg			成熟卵 Mature egg			死亡卵 Dead egg			EPG/		
	X ± S	减卵率 Egg reduction rate (%)	<i>P</i>	X ± S	减卵率 Egg reduction rate (%)	<i>P</i>	X ± S	减卵率 Egg reduction rate (%)	<i>P</i>	X ± S	减卵率 Egg reduction rate (%)	<i>P</i>	X ± S	减卵率 Egg reduction rate (%)	<i>P</i>
S IEA -I	445.00 ± 98.34	23.7	> 0.05	4825.00 ± 2223.26	8.6	> 0.05	8736.67 ± 1540.98	- 3.6	> 0.05	918.33 ± 236.17	- 2.9	> 0.05	14925.00 ± 3793.69	1.7	> 0.05
S IEA 26 - 28 kDa	566.67 ± 137.21	2.9	> 0.05	2313.33 ± 341.21	56.2	< 0.001	1380.00 ± 601.60	83.6	< 0.001	3626.67 ± 801.76	- 306.7	< 0.001	7886.67 ± 939.25	48.1	< 0.001
对照组	583.33	-	-	5276.66	-	-	8436.67	-	-	891.67	-	-	15188.33	-	-
Control	± 185.05			± 1038.01			± 876.28			± 274.26			± 1505.09		

肝组织内各阶段虫卵的构成比

S IEA 26/28 kDa 抗原免疫组与 S IEA -I 分部抗原免疫组, 肝组织内各阶段虫卵的分布不同, S IEA 26/28 kDa 组成熟虫卵显著减少, 死亡卵比例明显增加。S IEA -I 组与对照组无明显差异。

肠内各阶段虫卵的数量与分布

S IEA 26/28 kDa 免疫组, 肠内虫卵数 (EPG/) 较对照组减低 77.4%, 成熟虫卵减少达 93.3%, 统计学上差异有极显著意义

(表 2)。S IEA -I 免疫组成熟虫卵数与对照组无差异。

粪卵减少率

S IEA -I 免疫组, S IEA 26/28 kDa 免疫组与对照组的粪卵数分别为 731.67 ± 441.42, 114.93 ± 41.93 与 903.57 ± 437.98。与对照组比较, S IEA 26/28 kDa 免疫组粪卵减少率达 87.3%, 统计学上有极显著意义, 而 S IEA -I 分部抗原免疫组, 差异无显著性 (*P* > 0.05)。

表 2 免疫鼠与对照鼠肠组织内各期虫卵的分布状况
Table 2 Percentage distribution of immature, mature and dead eggs in the intestines of the immunized or normal mice challenged with cercariae of *S. japonicum*

组别 Group	胚胎前期 Pre-embryo egg			胚胎发育期 Embryo egg			成熟卵 Mature egg			死亡卵 Dead egg			EPG/		
	$\bar{X} \pm S$	减卵率 Egg reduction rate (%)	P	$\bar{X} \pm S$	减卵率 Egg reduction rate (%)	P	$\bar{X} \pm S$	减卵率 Egg reduction rate (%)	P	$\bar{X} \pm S$	减卵率 Egg reduction rate (%)	P	$\bar{X} \pm S$	减卵率 Egg reduction rate (%)	P
SIEA-I	1416.67 ±540.69	2.7	> 0.05	13850.00 ±3133.12	14.6	> 0.05	2431.67 ±843.86	0.72	> 0.05	443.33 ±171.08	40.7	< 0.05	18141.67 ±3002.83	12.9	> 0.05
SIEA 26 /28kDa	531.67 ±279.74	63.5	< 0.001	3665.00 ±1504.00	77.4	< 0.001	161.67 ±76.27	93.30	< 0.001	348.33 ±171.40	48.6	< 0.05	4706.67 ±1712.13	77.4	< 0.001
对照组 Control	1455.71 ±268.19	-	-	16217.14 ±2286.57	-	-	2414.28 ±895.02	-	-	747.14 ±216.16	-	-	20834.28 ±2227.72	-	-

表 3 不同抗原免疫对雌虫子宫内虫卵数的影响

Table 3 Comparison of eggs burden in the uterus of female worms between the immunized mice and normal mice challenged with cercariae of *S. japonicum*

组别 Group	子宫内卵数(个) No. eggs in the uterus	$\bar{X} \pm SD$	减卵率(%) Egg reduction rate (%)	P
SIEA-I	1136	189.33 ± 57.86	13.8	> 0.05
SIEA 26/28 kDa	595	99.17 ± 35.31	54.8	< 0.01
SIEA	779	129.80 ± 42.34	40.9	< 0.01
SEA	1111	185.17 ± 67.90	15.7	> 0.05
对照组 Control	1318	219.67 ± 49.49	-	-

不同抗原免疫对雌虫子宫内虫卵数的影响

SIEA 及 SIEA 26/28 kDa 免疫组, 雌虫子宫内虫卵减少率分别为 40.9% 和 54.8%, 与对照组比较统计学上差异非常显著, 而 SIEA-I 分部抗原免疫组与 SEA 免疫组的雌虫子宫内虫卵数相近, 与对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 3)。

讨 论

当前, 寻找新的保护性候选抗原是血吸虫疫苗研究的一个热点。WHO/TDR 多次召开有关血吸虫疫苗的专题会议, 并支持发展抗产卵和抗卵胚发育疫苗的研究^[9]。本文首次证明了 SIEA 26/28 kDa 抗原具有明显的抗卵胚发育以及抗雌虫生殖的作用。SIEA 26/28 kDa 免疫使肝、肠组织内虫卵数分别较对照组减少了 48.1%、77.4%, 尤其是肝、肠组织内成熟虫卵数下降显著, 分别达

83.6% 和 93.3%, 更重要的是粪卵数减少率高达 87.3%。对肝、肠组织中各阶段虫卵构成比的分析, 也表明对照组小鼠肝组织内成熟虫卵比例显著高于肠组织, 或许与肠壁内虫卵成熟后排出体外有关。因而提示以肝卵谱的动态变化作考核指标似较以肠卵卵谱的动态变化作考核指标为优。

在抗虫作用方面, 无论是 SIEA-I 抗原还是纯化的 SIEA 26/28 kDa 抗原免疫, 均未产生明显的减少虫荷效应, 此与 Ritchie (1962) 报道成熟虫卵及其匀浆抗原免疫均未诱导宿主产生抗感染免疫力的结果相似^[10]。然而, 比较不同抗原免疫后雌虫子宫内虫卵数时发现, 未纯化的 SIEA 和纯化的 SIEA 26/28 kDa 蛋白免疫均可导致雌虫子宫内虫卵数下降, 分别比对照组降低了 40.9% 和 54.8%。有趣的是 SIEA 经部分纯化的第一分部抗原免疫不产生类似效果, 而与 SEA 免疫结果相近。从而证明, 抗雌虫生

殖作用似与 SIEA 26/28 kDa 蛋白组分有关, SIEA 26/28 kDa 免疫组织内卵荷的下降以及雌虫子宫内卵的明显减少进一步证明其免疫效应。

粪卵的下降,一方面与雌虫本身产卵量下降有关,另一方面也与组织内成熟卵的减少以及死亡卵数的增加密切相关。总之,上述结果表明, SIEA 26/28 kDa 可以作为一种抗日本血吸虫卵胚发育及抗雌虫生殖免疫的候选抗原分子,但其与目前已报道的来自成虫或童虫的谷胱甘肽-S-转移酶(GST)类抗原是否为同一类抗原^[11,12],尚有待今后深入探讨。

参 考 文 献

- 1 赵慰先主编 人体寄生虫学 第2版 北京:人民卫生出版社,1994 378
- 2 Garcia EG, Mitchell GF, Rivera PT, et al Evidence of antiembryonation immunity and egg destruction in mice sensitized with immature eggs of *Schistosoma japonicum*. *Asian Pacific J Allergy Immunol* 1987; 5: 137
- 3 汪世平,赵慰先,易新元,等 日本血吸虫未成熟卵可溶性抗原诱导抗卵免疫的初步研究 湖南医科大学学报

- 1995; 20: 193
- 4 汪世平,赵慰先,周汨波,等 日本血吸虫卵的体外培养与抗卵胚发育的研究 中华医学杂志 1996; 76: 218
- 5 汪世平,赵慰先,易新元,等 日本血吸虫未成熟卵可溶性抗原的初步分析 中国人畜共患病杂志 1995; 11: 35
- 6 汪世平,周汨波,李 华,等 日本血吸虫未成熟虫卵 26/28 kDa 抗原的分离与纯化 中国血吸虫病防治杂志 1996; 8: 270
- 7 汪世平,曾宪芳,易新元 日本血吸虫 31/32 kDa 抗原纯化及诊断应用研究(英文). *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 1995; 13: 25
- 8 严自助,裘丽姝,薛海筹 日本血吸虫卵在动物组织内的发育和演变 动物学报 1974; 20: 263
- 9 UNDP/World Bank/WHO/TDR. Meeting on strategies for the development of a schistosomiasis vaccine. TDR/SCH/VAC-DEV/1991; 3: 1-11
- 10 Ritchie LS, Carson S, Erickson DG. Attempts to induce resistance against *Schistosoma mansoni* by injecting cercarial, adult worm, and egg homogenates in sequence. *J Parasitol* 1962; 48: 233
- 11 Balkoul JM, Pierce RJ, Grzych JM, et al *In vitro* synthesis of a 28 kilodalton antigen present on the surface of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 1985; 17: 105
- 12 Liu SX, Ding LY, Song GC, et al The antigenicity of GST antigen extracted from Chinese strain of *Schistosoma japonicum*. *Southeast Asian J Trop Med Publ Hlth* 1993; 24: 61

1995年9月28日收稿 1996年5月29日修回

(编辑:任燕芬)

STUDIES ON ANTI-FEMALE FECUNDITY AND ANTI-EMBRYONATION IMMUNITY INDUCED IN MICE WITH 26/28 kDa ANTIGENS OF IMMATURE EGGS OF SCHISTOSOMA JAPONICUM

Wang Shiping^{1*} Zhou Mibo¹ Shen Guoli^{*} Chen Yan¹ Li Hua¹ Zhao Weixian²

¹ Hunan Medical University, Changsha 410078

² Nanjing Medical University, Nanjing 210029

* Hunan University, Postdoctoral Research Station, Changsha 410082

ABSTRACT

AM: To observe the effect of antiembryonation and anti-female fecundity immunity in mice induced by the 26/28 kDa antigens purified from soluble immature eggs antigen (SIEA) of *Schistosoma japonicum*. **METHODS:** BALB/c mice were immunized with SIEA 26/28 kDa or SIEA-I antigen to examine if these antigens can induce anti-disease immunity as determined by egg burden in liver, intestines and faeces on day 46 after challenge infection with cercariae of *S. japonicum*. **RESULTS:** A comparison of the egg burden in tissues and



faeces on day 46 after challenge infection showed that the number of mature eggs in the livers, intestines and faeces was significantly reduced in mice immunized with SIEA 26/28 kDa by 83.6%, 93.3% and 87.3%, respectively, whereas the number of dead eggs was much greater in the tissues of immunized mice than in that of control mice. In addition, the number of eggs in the uteri of female adults was obviously decreased in mice immunized with SIEA 26/28 kDa antigens or with the SIEA. However, these immune responses were not induced by the SEA or SIEA-I. **CONCLUSION:** The 26/28 kDa antigens were major components in SIEA responsible for both anti-fecundity and antiembryonation immunity.

Key words: *Schistosoma japonicum*, immature egg, 26/28 kDa antigen, immunization, antiembryonation, anti-fecundity

* Supported by the National Natural Science Foundation (39370633) and the Scientific Research Foundation for Schistosomiasis, Ministry of Public Health, China (94-Y-05)

水网地区采用人、牛同步化疗结合 易感地带灭螺防治血吸虫病的效果

张玉琪¹ 王文梁² 王正才¹ 杨维金¹

为探索湖沼垸内水网地区血吸虫病流行区的防治对策, 1987—1990年选定9个血吸虫病重流行村, 进行了人、牛同步扩大化疗结合易感地带灭螺的效果观察, 取得较好的效果。

防治方法

- 1 每年秋季对5岁以上人群凡粪检、皮试及询诊有明显症状体征者均用吡喹酮(系上海天平制药厂生产)50 mg/kg 治疗(送药上门, 看服到口), 1 d 2次分服, 并连续观察5-7 d 副反应。
- 2 由农牧兽医部门负责耕牛的查治工作, 于每年秋后用吡喹酮粉剂30 min/kg 1次性饲喂粪检阳性牛。
- 3 每年春、秋季系统抽样调查钉螺, 框距为5—10

m。并于每年秋季铲草皮抽槽土埋灭螺, 五氯酚钠10 g/m² 喷洒易感地带灭螺。

防治效果

1987-1990年人群、耕牛和螺情的变化见表1。由表1可见人群和耕牛的粪检阳性率均有明显下降, 两者下降率依次为76.7%和45.9%。急性感染者也逐年减少。有螺面积和易感地带面积均有所缩小, 表明上述措施的防治效果是明显的。为了巩固化疗的效果, 应做到现有患者与潜在病人的查治同步, 人畜的查治同步, 治病与灭螺同步。而在实施扩大化疗时, 单元性要强, 范围要大, 化疗方案应统一实施, 并需加强各部门及毗邻地区的协作。

表1 1987-1990年湖沼垸内水网地区防治血吸虫病概况

年份	治疗病例数	急性感染例数	阳性率 (%)		灭螺面积(万m ²)		易感地带面积(万m ²)
			人群	耕牛	土埋	五氯酚钠	
1987	7 804	20	33.0(2 896/8 769)	15.2(111/729)	59.2	118.4	126.6
1988	7 641	11	20.2(1 901/9 427)	10.9(75/687)	56.7	113.4	119.0
1989	6 516	4	12.7(1 249/9 877)	9.2(62/674)	58.5	117.0	113.2
1990	-	1	7.7(687/8 894)	8.2(54/655)	-	-	107.6

1995年10月20日收稿 1996年3月28日修回

- 1 湖北省潜江市张金镇血吸虫病地方病防治站 张金 433109
- 2 湖北省潜江市委血吸虫病地方病防治办公室 潜江 433100

(编辑: 李雅卿)