

文章编号:1000-7423(2010)-03-0185-05

【论著】

负载 GST 抗原的树突状细胞疫苗联合 CpG ODN 抗日本血吸虫感染的保护性研究

李小红¹, 曹建平¹, 汤林华^{1*}, 徐徐信¹, 刘述先¹, 王胜军², 成静²

【摘要】 目的 研究负载 GST 抗原的树突状细胞 (DC) 疫苗联合非甲基化胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸寡脱氧核苷酸 (CpG ODN) 免疫小鼠抗日本血吸虫感染的作用。方法 将 GST 抗原纯化后负载树突状细胞株 DC2.4, 免疫荧光染色法检测 GST 的负载情况, 并进行动物保护性实验。35 只 C57BL/6 小鼠随机均分 7 组 (每组 5 只), 分别作免疫注射: A 组为未处理的 DC, B 组为牛血清白蛋白 (BSA) 处理的 DC, C 组为 GST 负载的 DC, D 组为 GST+CpG ODN 共刺激的 DC, E 组为 CpG ODN 刺激的 DC, F 组为 GST 蛋白, G 组为空白对照组。A~E 各组 DC 经 0.25% 胰蛋白酶消化后用 PBS 调整密度至 $10^7/\text{ml}$, 每鼠皮下注射 0.1 ml, 每次间隔 2 周, 共免疫 3 次。F 组首次每鼠免疫 50 μg GST 蛋白加福氏完全佐剂, 第 2、3 次分别免疫 50 μg 、10 μg GST 蛋白加福氏不完全佐剂, 均为皮下注射。各组于末次免疫后 10 d 收集血清, ELISA 方法分析血清中的特异性抗体。各组小鼠于末次免疫后 2 周每鼠经腹部感染尾蚴 30 ± 1 条。6 周后剖杀小鼠, 计算减虫率。结果 DC 经 GST 负载后可在荧光显微镜下观察到抗 GST 的特异荧光, 表明抗原已被 DC 摄取。各组小鼠免疫后, F 组抗体水平最高, 为 $2.127 0\pm 0.411 5$, 另外 C 组 ($0.555 2\pm 0.078 9$) 和 D 组 ($0.715 0\pm 0.052 3$) 的抗体水平均高于 G 组 ($0.235 8\pm 0.088 9$), 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。免疫后攻击感染, D 组小鼠的减虫率最高为 53.3%, 其次为 F 组 (24.0%) 和 C 组 (21.3%), 但 D 组与两组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 CpG ODN 联合 GST 抗原负载的树突状细胞疫苗具有一定的抗日本血吸虫感染作用。

【关键词】 日本血吸虫; GST; 树突状细胞; CpG ODN

中图分类号: R532.21

文献标识码: A

Protective Efficacy Induced by Dendritic Cells Pulsed with GST in Combination with CpG Oligodeoxynucleotide against *Schistosoma japonicum* Infection

LI Xiao-hong¹, CAO Jian-ping¹, TANG Lin-hua^{1*}, XU Yu-xin¹,
LIU Shu-xian¹, WANG Sheng-jun², CHENG Jing²

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 200052, China)

【Abstract】 Objective To study the protective effects on the infection of *Schistosoma japonicum* in C57BL/6 mice induced by dendritic cells DCs pulsed with GST in combination with CpG oligodeoxynucleotide. **Methods** GST was purified and used to stimulate DC2.4 cell line. Antigen loading was analyzed by immunofluorescence method. Thirty-five C57BL/6 mice were divided into seven groups (5 mice per group). Mice in groups A, B, C, D and E were immunized subcutaneously with DCs, DCs treated with PSA, DCs pulsed with GST, DCs stimulated with GST+CpG ODN, DCs stimulated with CpG ODN, respectively. For the above five groups, each mouse received 100 μl cell suspension at the density of $10^7/\text{ml}$ subcutaneously for three times at 2-week intervals. Each mouse of group F was immunized subcutaneously with 50 μg GST formulated in complete Freund's adjuvant first, and 50 μg , 10 μg GST respectively in incomplete Freund's adjuvant for the last two doses. Group G received PBS and served as control. Serum samples were collected 10 days after the final immunization, and were analyzed for specific antibodies by ELISA. At two weeks after the final immunization, each mouse were challenged by 30 ± 1 cercariae of *S. japonicum*. Six weeks after infection the mice were sacrificed, and number

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025; 2 江苏大学基础与医学技术学院, 镇江 212000

* 通讯作者, E-mail: ipdtlh@sh163.net

of worms was counted. **Results** Light green fluorescence was observed in dendritic cells under the fluoroscope after pulsing with GST which indicated the protein loaded dendritic cells. The IgG level in groups C, D and F was $0.555 2 \pm 0.078 9$, $0.715 0 \pm 0.052 3$, and $2.127 0 \pm 0.411 5$, respectively, all higher than that of group G ($P < 0.05$). The worm reduction rate of group D was 53.3%, followed by group F (24.0%) and group C (21.3%). There was no significantly difference in the worm reduction rate between group D and groups F and C ($P > 0.05$). **Conclusion** Dendritic cells pulsed with GST in combination with CpG oligodeoxynucleotide induce significant immunoprotection against the infection of *Schistosoma japonicum*.

[Key words] *Schistosoma japonicum*; GST; Dendritic cell; CpG ODN

* Corresponding author, E-mail: ipdth@sh163.netcom

日本血吸虫病仍是严重的人兽共患寄生虫病。疫苗在控制血吸虫病中具有广阔的应用前景，一直是研究的热点。多年的研究探索表明，至少在啮齿类和灵长类的某些动物模型中，获得性免疫应答可杀灭血吸虫^[1,2]。但历经半个世纪的努力，血吸虫病疫苗仍未取得突破性得进展，其部分原因是血吸虫在长期与宿主的共进化过程中，建立了复杂的保护体系，抵御和防御宿主免疫系统的攻击^[3]。近年来日本血吸虫病疫苗研究中最大的进展是克隆了数以百计的候选抗原^[4]，但单一候选抗原分子诱导的保护力鲜有超过 40%的。而 WHO 曾公布的被认为是最有希望的 6 种曼氏血吸虫病的候选抗原已全部完成测试，亦无一能稳定诱导 40%以上的保护力。WHO 认为可能是抗原供应前后制剂稳定性差，以及抗原和佐剂质控不严所致。多年的研究提示抗原呈递作用的重要性，佐剂的选择和免疫接种方案优化需进一步探讨^[5]。

树突状细胞(dendritic cell, DC)是机体免疫系统岗哨工作的承担者，对自身或免疫抗原进行识别和加工^[6]，它们不仅能识别加工抗原，还能活化初始 T 细胞，并调节 T 细胞应答的性质，即诱导免疫耐受或是使免疫向 Th1/Th2 方向极化。DC 的这些重要生物功能使通过 DC 的干涉调节免疫应答成为可能。已知佐剂可通过激活 DC 而增强抗原的免疫应答，DC 本身也被称为是天然佐剂。经抗原体外刺激的 DC 免疫机体后可有效诱导 T 细胞依赖的免疫力，还可诱导小鼠产生较强的抗体应答。基于 DC 的治疗和免疫预防已在癌症和感染性疾病取得显著进展。在血吸虫候选抗原中，谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 抗原被认为是最有前途的候选抗原。鉴于此，本研究尝试用 GST 负载的树突状细胞联合非甲基化的胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸寡脱氧核苷酸(CpG ODN)免疫小鼠，观察其在 CpG ODN (CpG oligonucleotide, CpG 寡脱氧核苷酸)协同作用下抗日本血吸虫感染的作用。

材料与方 法

1 材 料

1.1 虫种、细胞株 小鼠树突状细胞株 DC2.4，由江苏大学基础与医学技术学院王胜军教授惠赠。日本血吸虫感染阳性钉螺购自江苏省寄生虫病防治研究所。室温 25℃，在湿草纸上放置过夜，次日上午按常规方法逸尾蚴，用于感染小鼠。

1.2 实验动物 6~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠，SPF 级，体重(20±2)g，购自中国科学院附属的上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.3 主要试剂 RPMI 1640 培养液购自美国 Gibco 公司，胎牛血清(FCS)购自杭州四季青股份有限公司，二甲基亚砷 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司，辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG(HRP-IgG)购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司，异硫氰酸荧光素 (FITC)标记抗 GST 单克隆抗体购自美国 BEthyl 公司。

2 方 法

2.1 GST 抗原的制备和纯化 参照文献[7]方法进行 GST 抗原的制备和纯化。

2.2 CpG ODN 序列的合成 1668 CpG-ODN (TC-CATGACGTTCCCTGATGCT)，所有碱基均硫代处理。由上海生物工程有限公司合成。

2.3 DC 疫苗的制备 DC2.4 按常规方法传代培养，待细胞长至覆盖 90%瓶底(25 cm² 细胞培养瓶)时，换新鲜培养基 5 ml，按照下列方法依次加入 GST 抗原或 CpG ODN。BSA-DC 组：加入牛血清白蛋白(BSA)至终浓度为 10 μg/ml，刺激 DC 18 h；GST-DC 组：加入 GST 蛋白至终浓度为 10 μg/ml，刺激 DC 18 h；GST+CpG ODN-DC 组：先加入 GST 蛋白至浓度为 10 μg/ml 刺激 9 h，然后加入 CpG ODN 至终浓度为 0.5 μmol/L 继续刺激 9 h；CpG ODN-DC 组：加入 CpG ODN 终浓度为 0.5 μmol/L，刺激 DC 18 h。免疫前各组均用 0.25%胰蛋白酶消化 DC，PBS 洗涤 3 次并重悬，调整密度为 1×10^7 /ml。

2.4 GST 抗原负载 DC2.4 细胞的检测 制作 GST 抗原负载的 DC2.4 细胞爬片，10%甲醛固定。室温用含 0.2% TritonX-100 的 PBS 溶液透化固定后的细胞

2 min, PBS 洗涤。加入 FITC 标记的抗 GST 单克隆抗体, 37 °C 孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次, 每次 3 min。碘化丙啶 (PI) 染色 5 min, PBS 洗涤。在作好标记的干净载玻片上滴一滴封固液, 用尖头镊子将爬片取出, 翻转使细胞面朝下, 置于载玻片的封固液上。在荧光显微镜下观察、拍照。

2.5 动物免疫和攻击感染 35 只 C57BL/6 小鼠随机分为 7 组(每组 5 只), A 组免疫未处理 DC, B 组免疫 BSA-DC, C 组免疫 GST-DC, D 组免疫 GST+CpG ODN-DC, E 组免疫 CpG ODN-DC, F 组免疫 GST 蛋白, G 组为空白对照组。A~E 组每鼠分别皮下免疫注射 0.1 ml 上述对应处理的 DC 细胞悬液, 每次间隔 2 周, 共免疫 3 次。F 组第 1 次每鼠免疫 50 μg GST 抗原加福氏完全佐剂, 第 2、3 次分别免疫 50 μg、10 μg GST 抗原加福氏不完全佐剂, 均为皮下注射。各组小鼠均于末次免疫后 10 d 尾静脉取血, 分离血清用于 ELISA 抗体检测。于末次免疫后 2 周, 各组小鼠均经皮肤感染 30±1 条日本血吸虫尾蚴。并于攻击感染后 6 周, 门静脉灌注冲洗检获成虫数, 计算减虫率 [减虫率=(对照组平均虫荷数-实验组平均虫荷数)/对照组平均虫荷数×100%]。

2.6 ELISA 检测抗体水平 用纯化的 GST 抗原包被酶标板 (1 μg/孔), 10% 小牛血清 37 °C 封闭 1 h。各组待检的免疫血清 (1:100) 每孔加 100 μl, 37 °C 湿盒孵育 2 h。PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。每孔加入羊抗鼠 HRP-IgG (1:4 000) 100 μl, 37 °C 孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次后, PBS 洗涤 1 次, 加入 100 μl 可溶性单组分四甲基联苯胺 (TMB), 显色 15 min, 最后加入 50 μl 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测定吸光度 (A₄₅₀ 值)。

3 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析。多组比较采用方差分析, 两组比较采用 *t* 检验。

结 果

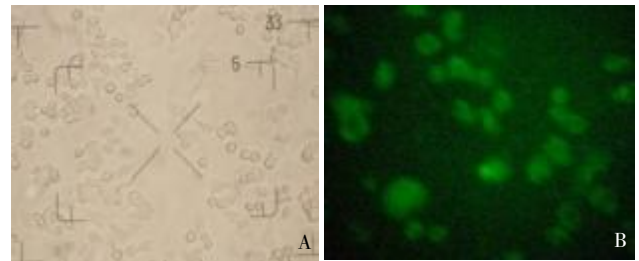
1 树突状细胞的形态观察及 GST 抗原负载检测

倒置显微镜下观察树突状细胞, 可见细胞贴壁, 呈圆形或梭形(图 1A)。GST 抗原负载树突状细胞后, 用 FITC 标记的抗 GST 荧光抗体检测, 在荧光显微镜下可见树突状细胞发出特异的绿色荧光(图 1B)。

2 ELISA 检测小鼠血清抗体水平

各组小鼠末次免疫后, F 组的血清抗体水平 (A₄₆₀ 值) 最高为 2.1270±0.4115, 其次为 D 组 (0.7150±0.0523) 和 C 组 (0.5552±0.0789)。F 组 (*P*<0.01)、D 组 (*P*<0.01)

和 C 组 (*P*<0.05) 与 G 组 (0.2358±0.0889) 比较差异均有统计学意义(图 2)。



A: 显微镜下 DC2.4 (×200); B: FITC 标记的抗 GST 单克隆抗体染色后的树突状细胞。

A: DC2.4 under microscope (×200); B: DC2.4 cells stained with FITC-labelled anti-GST monoclonal antibody.

图 1 树突状细胞 DC2.4

Fig.1 Dendritic cells

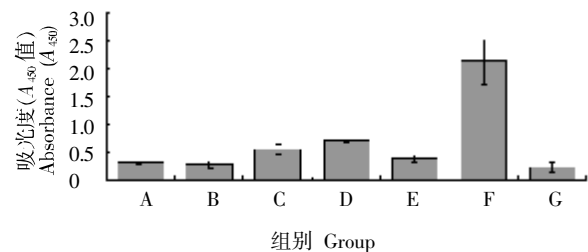


图 3 小鼠免疫血清中特异性 IgG 抗体水平

Fig 3 Level of specific IgG in immune sera of mice

3 免疫小鼠的减虫率

各组小鼠免疫后攻击感染, D 组(即 GST+CpG ODN-DC 组)减虫率最高, 为 53.3%, 其次为 F 组 (24.0%) 和 C 组 (21.3%), 但 D 组与 F 组和 C 组比较差异无统计学意义 (*P*>0.05)(表 1)。

表 1 各组小鼠检获成虫数

Table 1 Adult worms recovered in each group

组别 Group	成虫数 No. worms	减虫率 Worm reduction rate (%)
A 组(DC) Group A	13.6±4.3	9.3
B 组(BSA-DC) Group B	14.6±1.1	2.7
C 组(GST-DC) Group C	11.8±4.5	21.3
D 组(GST+CpG ODN-DC) Group D	7.0±3.0	53.3
E 组(CpG ODN-DC) Group E	17.0±5.9	-
F 组(GST) Group F	11.4±3.0	24.0
G 组(PBS 对照组) Group G(PBS control)	15.0±3.3	-

讨 论

树突状细胞疫苗目前广泛应用于抗肿瘤、移植免疫, 在抗寄生虫感染中也有报道^[8-11]。但在抗血吸虫

感染方面的研究还很少见。有报道血吸虫虫卵抗原 (SEA) 和 GST 负载的 DC 免疫 BABL/c 小鼠, 可分别诱导出 27.3% 和 34.5% 的减虫率^[12,13]。该研究小组接着用日本血吸虫 Sj26 和 Sj23 基因转染 DC 联合免疫 BABL/c 小鼠, 减虫率提高至 40.5%^[14]。本研究以 C57BL/6 小鼠为实验对象, 也观察到 GST-DC 免疫后, 诱导的保护力为 21.3%。这与上述报道的有差异, 可能是实验采用的细胞系不同, 或是实验小鼠品系不同所致。但以上研究均提示, 树突状细胞疫苗在抗血吸虫感染中具有较好的保护效果, 值得深入研究。

CpG ODN 是人工合成的含有非甲基化的胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸(CpG)的寡脱氧核苷酸(ODN), 可模拟细菌 DNA 刺激多种哺乳动物 (包括人) 的免疫细胞。它能直接激活 B 细胞和单核细胞(巨噬细胞和树突状细胞), 增强其功能和细胞因子的分泌, 增强抗原的加工呈递, 诱导 Th1 型免疫应答, 产生较强的体液免疫和细胞免疫。在包括感染性疾病在内的多种疾病治疗和免疫预防中^[15-17], 被证实是一种高效低毒的新型免疫治疗剂和佐剂。据报道, CpG ODN 具有诱导小鼠的 DC 成熟、刺激成熟 DC 产生细胞因子的作用^[18], 从而使未成熟的 DC 向专职抗原呈递细胞转化, 是 DC 成熟和激活的诱导剂, 能够增强 DC 疫苗的作用。CpG ODN 作为佐剂, 可有多种不同的序列选择, 本研究选用的是 CpG ODN 1668, 是已被实验证实具有佐剂作用的一种^[19-21]。采用 GST 抗原负载 DC, 联合 CpG ODN, 免疫小鼠, 攻击感染后观察到 53.3% 的保护力, 表明该疫苗具有较好的抗日本血吸虫感染的保护作用。ELISA 检测结果表明, 免疫后, GST-DC 组、GST+CpG ODN-DC 组抗体水平均显著上升, 表明该细胞疫苗诱导了体液免疫。但其抗体水平远低于 GST 抗原免疫组。由此可初步推测 GST 抗原疫苗与细胞疫苗诱导的免疫应答类型及机制是不同的。GST+CpG ODN-DC 组、GST-DC 组和未处理 DC 组之间保护力分别为 53.3%、21.3% 和 9.3%, 其中, GST+CpG ODN-DC 组与未处理 DC 组间减虫率差异有统计学意义, 但 GST+CpG ODN-DC 组与 GST-DC 组之间无差异有统计学意义, 可能与样本量过小有关, 即 CpG ODN 作为抗血吸虫 DC 疫苗的佐剂效应还需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Coulson PS. The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine [J]. Adv Parasitol, 1997, 39: 271-336.
 [2] Yole DS, Pemberton R, Reid GD, et al. Protective immunity to *Schistosoma mansoni* induced in the olive baboon *Papio Anubis*

by the irradiated cercaria vaccine[J]. Parasitology, 1996, 112(Pt): 37-46.
 [3] Wilson RA, Coulson PS. Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour[J]. Trend Parasitol, 2008, 25(9): 423-431.
 [4] Li XH, Cao JP, Liu SX. Progress in schistosomiasis japonica vaccine candidate antigen[J]. Chin J Zoonoses, 2005, 21(10): 901-905. (in Chinese)
 (李小红, 曹建平, 刘述先. 我国血吸虫病疫苗候选抗原研究新进展[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(10): 901-905.)
 [5] Liu SX, Cao JP. Present status and prospect of the research on vaccine against parasitic diseases[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(5): 362-368. (in Chinese)
 (刘述先, 曹建平. 寄生虫病疫苗研究的现状及展望[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(5): 362-368.)
 [6] Chen WF. Medical Immunology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001: 136-137. (in Chinese)
 (陈慰峰. 医学免疫学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 136-137.)
 [7] Liu SX, Song GC, Xu YX, et al. Immunization of mice with recombinant Sj26GST induces a pronounced antifecundity effect after experimental infection with Chinese *Schistosoma japonicum* [J]. Vaccine, 1995, 13(6): 603-607.
 [8] Ahuja SS, Reddick RL, Sato N, et al. Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection [J]. J Immunol, 1999, 163(7): 3890-3897.
 [9] Bourguin I, Moser M, Buzoni-Gatel D, et al. Murine dendritic cells pulsed *in vitro* with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity *in vivo*[J]. Infect Immun, 1998, 66(10): 4867-4874.
 [10] Dimier-Poisson I, Aline F, Mevelec MN, et al. Protective mucosal Th2 immune response against *Toxoplasma gondii* by murine mesenteric lymph node dendritic cells[J]. Infect Immun, 2003, 71(9): 5254-5265.
 [11] Bruna-Romero O, Schmiege J, Del Val M, et al. The dendritic cell-specific chemokine, dendritic cell-derived CC chemokine 1, enhances protective cell-mediated immunity to murine malaria[J]. J Immunol, 2003, 170(6): 3195-3203.
 [12] Shen DW, Luo JP, Li YL. Protective immunity effect of Sj26 gene transfer dendritic cells on *Schistosoma japonicum* infection [J]. Chin J Pub Hlth, 2005, 21(11): 1393-1394.(in Chinese)
 (沈定文, 罗金萍, 李雍龙. Sj26 基因转染 DC 抗血吸虫感染作用[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(11): 1393-1394.)
 [13] Luo JP, Chen XG, Shen DW, et al. Study on the protective immunity of dendritic cells against infection of *Schistosoma japonicum*[J]. J Xianning Coll (Med Sci), 2004, 18(2): 91-94.(in Chinese)
 (罗金萍, 陈喜圭, 沈定文, 等. 树突状细胞抗日本血吸虫感染保护性免疫力的研究[J]. 咸宁学院学报(医学版), 2004, 18(2): 91-94.)
 [14] Shen DW, Luo JP, Li YL. Study on immune effect of Sj26 and Sj23 gene transferred dendritic cells against *Schistosoma japonicum*[J]. Chin J Pub Hlth, 2008, 24(10): 1216-1217.(in Chinese)
 (沈定文, 罗金萍, 李雍龙. 基因转染树突状细胞联合免疫抗血吸虫感染作用[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(10): 1216-1217.)
 [15] Leonard JP, Link BK, Emmanouilides C, et al. Phase I trial of toll-Like receptor 9 agonist PF-23512676 with and following rituximab in patients with recurrent indolent and aggressive non hodgkin's lymphoma[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(20): 6168-6174.
 [16] Cooper CL, Davis HL, MorrisML, et al. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix2BHBV vaccine in healthy adults: a double 2 blind phase I/ II study[J]. J Clin Immunol, 2004, 24(6): 693-701.

- [17] McHutchison JG, Bacon BR, Gordon SC, *et al.* Phase 1B, randomized, double-blind, dose-escalation trial of CPG 10101 in patients with chronic hepatitis C virus[J]. *Hepatology*, 2007, 46(5): 1341-1349.
- [18] Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, *et al.* Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells[J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28(6): 2045-2054.
- [19] Lipford GB, Bauer M, Blank C, *et al.* CpG containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein

antigen: a new class of vaccine adjuvants[J]. *Eur J Immunol*, 1997, 27(9): 2340-2344.

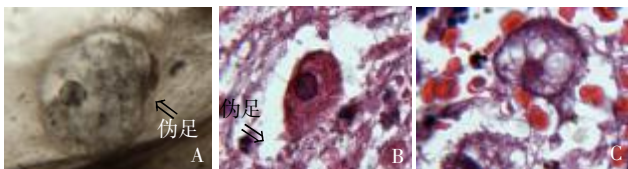
- [20] Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA [J]. *J Immunol*, 1996, 157(5): 1840-1845.
- [21] Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, *et al.* CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant that switch on T helper 1 (Th1) immunity [J]. *J Exp Med*, 1997, 186(10): 1623-1631.

(收稿日期: 2010-04-02 编辑: 盛慧锋)

(上接第 184 页)

较多的圆形或椭圆形(直径 20~25 μm)细胞,个别见胞质内有吞噬的淋巴细胞、细胞碎片或呈泡沫状,疑为阿米巴滋养体。病理学诊断为小脑急性脓肿和脑水肿,建议作病原学鉴定。

病原学检查:肉眼可见小脑病灶剖面呈棉絮状。镜下观察延髓和软化灶包膜的石蜡切片,见密度高、形态多样的溶组织内阿米巴滋养体,部分可见伪足(图 1A、B),有的细胞质呈空泡状(胞质充满大小不等的空泡)(图 1C)。部分虫体可见红细胞等吞噬物。经铁苏木素染色阿米巴虫体的形态特征尤显——深染的泡状核、核仁以及核周的染色质粒明显,且隐约可见核仁与核周染色质粒之间的核丝。部分切片的虫体密度较高(≥ 5 个/油镜)。询问家属,得知该患者一直在湛江居住,2年前曾在广西经商。



A: 阿米巴滋养体(铁苏木素染色); B: 阿米巴滋养体(苏木素-伊红染色); C: 滋养体空泡状细胞质(苏木素-伊红染色)。

图 1 脑组织中的溶组织内阿米巴滋养体($\times 1000$)

2 讨论

溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)主要流行于热带和亚热带地区。人体感染溶组织内阿米巴可以无症状,亦可侵袭肠黏膜下层发生溃疡,引起肠阿米巴病。1980 年世界卫生组织专门会议指出,溶组织内阿米巴无症状感染者(带虫者)占 90%以上^[1]。Lombardo 等^[2]报道近半数的阿米巴脑脓肿患者无肠道症状。本例阿米巴脑脓肿是在尸检意外发现的,但由于未送检肝肠标本,无法考证其肝肠是否受累。广东和广西两省(区)均属亚热带地区,溶组织内阿米巴病散在分布,常见肠阿米巴病和阿米巴肝脓肿病。本例可能在外伤前就已感染溶组织内阿米巴,外伤引起机体免疫力骤降,导致肠内阿米巴原虫增殖并迁移。尸检所见其小脑的“外层膜样结构”的“软化灶”和病理学诊断“小脑急性脓肿”均提示本例脑脓肿为初发。本例因发病不久即死亡并解剖,脓肿尚未形成结缔组织的包膜。有文献报道,阿米巴脑脓肿发病急,病程进展迅速,病灶一旦出现,多在 5~10 d 死亡,罕有超过 2 周者^[3,4]。

组织坏死是阿米巴病的主要病变——有明显的溶解性坏死和基质水肿。肉眼检查阿米巴脑脓肿外壁很薄,内壁模糊。脓肿影响部位可见水肿、充血。镜下可见溶解性坏死,脓肿壁内层常可见许多淋巴样细胞、变性的神经细胞和阿米巴滋养体;

阿米巴脑脓肿病变后期镜下可见炎症细胞浸润的、由坏死组织形成的中心体,而在病变发生初期,其围绕中心体的炎症细胞的边(内)缘是不规则^[3],本例脑组织切片观察结果及临床表现与文献一致。头痛或感觉中枢障碍是阿米巴脑脓肿早期最常见的体征^[3],脊髓、脊髓受损也会出现这种症候,本例复杂的病因给诊断与治疗增加了难度。

阿米巴脑脓肿患者病情多笃重,且病死率高。国内报道甚少,国外亦仅有零星报道。文献检索发现,迄今已报道的近 100 例的溶组织内阿米巴脑脓肿,多为死后尸检发现的^[4-6]。自 Lenshoek(1958)报告成功手术切除阿米巴脑脓肿后^[7],国内外相继有治疗溶组织内阿米巴脑脓肿的病例报告^[3,7,9]。

致谢 感谢广东医学院病理教研室孙宁教授的指导,中山大学中山医学院基础医学实验教学中心张瑞琳高级实验师协助鉴定,梁宇洪医师和唐龙冲医师提供病案资料及帮助,首都医科大学陈佩惠教授审阅文稿。

参 考 文 献

- [1] Xu BK. *Human Parasitology*[M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1989: 26. (in Chinese) (徐秉钺. 人体寄生虫学[M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社, 1989: 26.)
- [2] Lombardo L, Alonso P, Saenzarroyo L, *et al.* Cerebral amebiasis; Report of 17 cases[J]. *J Neurosurg*, 1964, 21: 704-709.
- [3] Sayhan Emil S, Altinel D, Bayol U, *et al.* Amebic cerebral abscess mimicking bacterial meningitis[J]. *Indian J Pediatr*, 2008, 75(10): 1078-1080.
- [4] Ye WF. *Amebiasis*[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1958: 21-60. (in Chinese) (叶维法. 阿米巴病 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1958: 21-60.)
- [5] Clark HC. The distribution and complications of amebic lesions found in 186 post-mortem examinations[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1925, 1: 157-171.
- [6] WHO. *Intestinal Protozoan and Helminth Infections*[M]. Translated by Huang YX, Xu GY, Lu ZL. Beijing: People's Medical Publishing House, 1984: 29-46. (in Chinese) (世界卫生组织. 肠道原虫及蠕虫感染[M]. 黄一心, 徐国余, 陆钟灵, 译. 北京:人民卫生出版社, 1984: 29-46.)
- [7] Lenshoek CH, Baumann C, Wielenga DK. Brain abscess due to *Entamoeba histolytica*: case report with successful excision[J]. *Arch Chir Neerl*, 1958, 10(1): 34-40.
- [8] Morishita A, Yamamoto H, Aihara H. A case of amebic brain abscess[J]. *No Shinkei Geka*, 2007, 35(9): 919-925. (in Japanese)
- [9] Liang L, Chen DL, Peng T. A case of amebic brain abscess of diaphragma cerebri [J]. *Acta Med Sin*, 2007, 20(2): 390-391. (in Chinese) (梁莉, 陈东亮, 彭涛. 透明膈阿米巴脑脓肿一例报告[J]. 华夏医学, 2007, 20(2): 390-391.)

(收稿日期: 2009-08-24 编辑: 杨频)