

# 日本血吸虫循环抗原成分的分析

王秀珍 黎世涛 张声海 周蕊  
王稚秋 周贤坤 胡忠勤

(四川省寄生虫病防治研究所)

血吸虫宿主体内存在着多种成分组成的抗原谱。既往研究较多的，在电泳中出现于阳极端的多糖抗原只是其中之一，它定位于血吸虫成虫肠上皮细胞，Deelder等证明感染小鼠尿液中的三种循环抗原均为虫源性，其中两种为不耐热和不溶于三氯醋酸的未知成分。目前许多学者用三氯醋酸提取的循环抗原免疫动物，仅能查出循环抗原中的一种，这可能是过去检查循环抗原方法敏感性不高所致。究竟宿主体内有几种循环抗原及其组分，各自的理化特性和免疫源性如何？作者在Nash(1974)，Houba(1976)，杨士静(1981)等对多糖抗原研究的基础上，对活虫、活卵进入宿主血循环的分泌代谢产物进行了分析，以期提供一种检测循环抗原的新的诊断试验。

## 材 料 与 方 法

### 一、循环抗原的制备

#### (一)成虫分泌代谢抗原

解剖经尾蚴感染42天的家兔，用无菌生理盐水冲虫，选择雌雄合抱完整的成虫由于新鲜台氏液中，按每瓶10对培养24小时。合并培养液，浓缩后离心除去沉淀。用蒸馏水透析除盐后，低温保存备用。

#### (二)活卵分泌代谢抗原

取经1500条尾蚴感染42天的家兔肝脏，分纯虫卵，用无菌蒸馏水按压积体积1% (V/V)比例，所含虫卵数为 $2471 \text{个} / \text{mm}^3$ ，于三角烧瓶内培养6小时，放4℃冰箱中过夜，离心沉淀，取上清液浓缩备用。

#### (三)三氯醋酸提取抗原

成虫浸出液或感染5000条尾蚴30天家兔血清，滴加等量15%的预冷三氯醋酸搅拌30分钟，用G<sub>3</sub>玻砂漏斗抽滤去沉淀，无蛋白滤液用流水透析除去三氯醋酸，用0.01M pH 7.4的PBS透析平衡。加4倍体积无水乙醇放4℃冰箱过夜，3000rpm离心15分钟去上清液，沉淀用无水乙醇洗涤两次，乙醚洗涤一次，真空干燥备用。

### 二、分析方法

(一) 蒽酮法测多糖，Lowry改良酚试剂法测蛋白，地衣酚试剂法定量核糖核酸。

## (二) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

用上述电泳法进行蛋白质、多糖、核酸组分的分离。用考马斯兰染蛋白质，Schiff氏法染多糖和糖蛋白，用苏丹黑染脂蛋白，用派洛宁染核糖核酸。

1. 区分含蛋白的多糖和多糖的方法：将经聚丙烯酰胺凝胶电泳后的凝胶条置于具塞试管中，分别用考马斯兰和Schiff氏法染色。Schiff氏法染色的区带与考马斯兰着色区带相对应者为糖蛋白，与考马斯兰染色对应不着色者为多糖。染色后鉴定电泳图谱。

2. 用凝胶等电聚焦和聚丙烯酰胺圆盘电泳确定循环抗原中蛋白质组分及其等电点范围。

3. 用琼脂免疫电泳，聚丙烯酰胺交叉免疫电泳确定各组分的抗原性。

4. 用聚丙烯酰胺凝胶电泳同时分离趋阳极和趋阴极抗原。方法如下：在长约12cm直径5mm的玻璃管上，先在一端聚合5cm长的7.5%的分离胶，在此分离胶上聚合100微升抗原的样品胶约1cm，再于另一端聚合7.5%分离胶5cm，按常规方法电泳。

## 结 果

定量培养的血吸虫代谢抗原分析结果表明：平均每对雌雄合抱的成虫24小时代谢具有抗原性物质30.55微克，其中多糖占代谢总量的7.8%，蛋白质占77%，核糖核酸占15.2%。分别将这三大类物质与高感染兔血清和抗成虫抗原血清作对流免疫电泳和双向扩散试验均产生沉淀线，而与抗血吸虫卵血清均不产生沉淀线。每1000个活卵培养6小时，代谢具有抗原性物质为0.72微克，其中多糖占46%、蛋白质占28%、核糖核酸占26%。见附表。虫卵代谢抗原与抗卵血清产生明显沉淀线，而与抗成虫抗原血清不发生沉淀线。

成虫代谢抗原经聚丙烯酰胺凝胶电泳后，用考马斯兰R250染色可显示16条区带，经凝胶等电聚焦电泳后用考马斯兰G250染色可显示在等电点5.53~6.9之间有11条区带。见图1。苏丹黑染色的脂蛋白在聚丙烯酰胺凝胶电泳后的胶条上只有一条区带。对照染色胶条，切下未染色的胶条上脂蛋白部分与抗循环抗原血清作琼脂扩散试验，可见一条明显沉淀线。

经同一电泳条件所得的凝胶条，分别用考马斯兰染色与Schiff氏染色对照，证明有两条区带为含蛋白的多糖成分。用派洛宁染色有一条区带。

三氯醋酸提取的循环抗原在趋阳极端有一条红色区带，阴极端有2条红色区带，对照考马斯兰染色胶条证明为多糖组分。

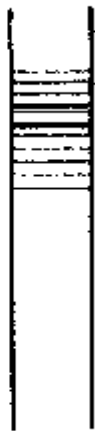
峰。成虫代谢抗原与抗循环抗原血清在聚丙烯酰胺凝胶交叉免疫电泳中可形成6个沉淀

血吸虫虫卵代谢抗原可分出6条多糖区带，16条蛋白质区带，1条核糖核酸区带。与高感染兔血清及抗卵血清均发生明显沉淀线。

附表

每对血吸虫24小时代谢循环抗原量

	样 品 编 号	24 小时代谢循 环抗原量 / 对 (ug)	主 要 组 分		
			蛋白质质量 / 对(酚 试法) (ug)	核酸量 / 对(地衣 酚法) (ug)	多糖量 / 对(蒽酮 法) (ug)
测 定 结 果	M—1	43.52	34.67	5.88	2.97
	M—2	38.78	30.50	5.14	3.14
	M—3	36.84	27.41	6.04	3.39
	M—4	44.07	34.23	5.88	3.96
	M—10	24.06	17.40	4.76	1.90
	M—11	29.26	21.40	5.52	2.34
	M—12	11.54	7.50	2.25	1.69
	M—13	30.10	22.60	4.64	2.86
	M—14	24.87	21.15	2.70	1.02
	M—15				
M—16	26.70	21.44	3.79	1.47	
M—17	26.27	19.47	4.78	2.02	
合 计		336.01	257.77	51.38	26.67
平 均		30.55	23.4	4.67	2.43
百分比 (%)		100.00	77.00	15.20	7.80



凝胶等电聚焦带型模式图



聚丙烯酰胺凝胶电泳带型模式图

图1 成虫代谢抗原经聚丙烯酰胺凝胶电泳和凝胶等电聚焦电泳后分离的区带带型。

## 讨 论

结果显示出血吸虫循环抗原系由宿主体内生活的虫体和虫卵所产生，这些物质组成了一个十分复杂的抗原谱，它包括了蛋白质、多糖和核糖核酸等几大类大分子物质，共可分为24个抗原组分，与抗循环抗原的血清可产生6个沉淀峰。既往研究较多的电泳出现于阳极端的多糖抗原只是其中之一。从定量分析结果来看，多糖抗原只占整个循环抗原的7.8%，因此用三氯醋酸提纯抗原来免疫动物，所获得的抗血清只能检测到血吸虫循环抗原的少部份，不利于提高检出率。

根据定量培养的每对成虫，每天经代谢可产生30.55微克的抗原，由此可推算出如一个寄生有20对血吸虫的宿主体内，每毫升血液中也仅有0.15微克的循环抗原，并不断地被机体免疫系统所清除，因此检测血吸虫循环抗原除了要应用高度敏感的方法，浓缩血清或尿液外，还必须获得高质量的抗体，这个抗体应该是抗全部的循环抗原成分，而不是和其中一种或二种成分具有亲和力。

虫卵的培养液也具有抗原成分，与感染兔血清及抗卵血清作对流免疫电泳均发生明显沉淀线，因此虫卵代谢产物也是日本血吸虫循环抗原的成分之一，检测虫卵的分泌代谢产物有助于了解体内有无生活型的虫子存在。

日本血吸虫在宿主体内产生的循环抗原并不积累也不随感染的继续而长期存在，而且迅速被宿主免疫系统清除。因此一旦体内血吸虫被药物杀死，循环抗原即迅速消失。所以检测循环抗原能更确切地反映疗效，从而更可靠地判断宿主体内有无活虫存在，提供准确的治疗依据及流行病学资料。Okabe(1958)首先从日本血吸虫病人尿中检出了循环抗原，这为寻找血吸虫免疫诊断方法指出了新的途径，他们的发现引起了许多学者的兴趣和重视。Berggren(1976)也从感染鼠的血清中检出循环抗原。二十多年来，国内外不少学者一直在研究循环抗原，但目前检测循环抗原的研究仍限于实验阶段，用于实际还有相当的距离。

本实验初步探明了血吸虫在宿主体内生活代谢产物中具有抗原性的成分。在循环抗原研究方面，取得了一些可供参考的结果。从理论上加深了对血吸虫循环抗原的认识，有利于制备高效特异的抗循环抗原的血清，有助于敏感的检测方法的建立，将缩短用检测循环抗原这一手段作为一种血吸虫病的确诊试验在实际应用中的距离。

## 参 考 文 献

- Deelder AM et al 1976 Schistosoma mansoni demonstration Of two circulatio antigens in infected hamsters. Exp. Parasitol. 40:189—197.
- Houba V et al 1976 Soluble antigens and antibodies in sera from baboons infected with Schistosoma mansoni. J. Immunol. 117:705—707.
- Nash TE 1974 Localization Of the circulating antigen with the gut Of Schistosoma mansoni. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23:1085—1087. (下转第7页)

$X^2$ 检验( $0.05 > P > 0.01$ ), 两种蚊有显著性差异。中华按蚊子孢子感染率为23.43%; 雷氏按蚊为23.61%。经 $X^2$ 检验( $P > 0.05$ ), 两者无显著性差异。由此表明, 中华按蚊和雷氏按蚊对间日疟原虫都是敏感的。因此, 我们认为无论是中华按蚊还是雷氏按蚊在流行病学上或防治对策上都应考虑其传疟作用。

此外, 最后一批以河南郑州中华按蚊在相同条件下进行感染实验, 其结果: 四川夹江地区中华按蚊胃卵囊感染率为70.83%, 而河南郑州中华按蚊则为60%, 似乎河南与四川地区的中华按蚊对间日疟原虫的敏感性无明显差异。

二、从各次的实验中, 中华按蚊和雷氏按蚊的感染率和感染度均各不相同, 出现这种现象, 我们认为主要不是按蚊的敏感性所致, 应考虑供血者体内疟原虫配子体的数量及其成熟程度和活力状况。在我们的实验观察中, 查见有的供血者配子体虽高(如82—3—1)供血者体内原虫配子体率在7/万以上, 曾发作三次, 但按蚊的感染率并不高。由此可见, 配子体形态成熟并不等于达到生理成熟。反之, 最末一次实验的结果, 其供血者体内的配子体率是最低的(配子体率在2/万以下, 发作二次), 但对中华按蚊和雷氏按蚊的感染率和感染度均高(表2), 显示出间日疟原虫对媒介按蚊的易感性强。Vanderberg(1980)亦曾报道过相似的结果。

三、在此次实验观察中, 供血者处于间歇期与发作期对按蚊的感染率是有所不同的。在间歇期的感染率普遍较高, 而在发作期则偏低, 尤以中华按蚊感染率较为明显。出现这种差异的原因, 有待研究。

## 参 考 文 献

- Hindle & Fcng LC 1929 Experiments with malaria and mosquitoes in Shandong, China. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 23:71.
- 姚永政 1955 实用医学昆虫学第一版, 125, 北京。
- 史冬元等 1982 郑州、信阳地区中华按蚊人工感染间日疟原虫实验。中华预防医学杂志 16(2) 85—86。
- 中国医学科学院寄生虫病研究所 1978 实用疟疾学 86—87, 人民卫生出版社。
- 许锦江、冯兰洲 1975 我国赫坎按蚊类群的研究。昆虫学报9(1) 77—98。
- Vanderberg JP & Gwadz RW 1980 The transmission by mosquitoes of Plasmodia in the laboratory. In: Malaria. Edited by Kreier JP, 2 213—214, Academic Press, New York.
- 
- (上接第13页)
- 杨士静等 1981 反向间接血凝检测日本血吸虫病循环抗原的研究。上海免疫学杂志 1 (3): 6—12.
- Seifter et al. 1950 The estimation of glycogen with the anthrone reagent. Arch Biochem. 25: 191—200.
- 李允鹤 1980血吸虫循环免疫复合物。国外医学寄生虫病分册(6) 245—248.