

## 肝泡型包虫病患者体液免疫变化的研究\*

马 婕<sup>1,2</sup>, 冀林华<sup>1</sup>, 刘文静<sup>1</sup>, 崔 森<sup>1△</sup>, 樊海宁<sup>1▲</sup>

(1. 青海大学附属医院, 西宁 810001; 2. 青海大学医学院高原医学研究中心, 西宁 810001)

**[摘要]** **目的** 通过研究肝泡型包虫病(HAE)患者外周血 B 淋巴细胞部分表面抗原的表达及所分泌的抗体水平变化,探讨肝包虫病患者体液免疫的变化情况。**方法** 用 10  $\mu$ L CD19-FITC、10  $\mu$ L CD20-PE 标记 100  $\mu$ L 外周血中 B 淋巴细胞,经避光反应、裂红、洗涤等步骤后用流式细胞仪测定 CD19、CD20 的表达,并用蛋白分析仪检测 IgG、IgM、IgA 的表达水平。**结果** HAE 患者外周血 CD19<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup> B 淋巴细胞比率均低于正常对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。HAE 组 IgG、IgA 水平均明显高于对照组,IgM 水平低于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 泡球蚴在体内寄生过程中,宿主的免疫反应处于抑制状态,使得泡球蚴能在宿主内长期寄生并发育,同时能刺激机体产生强弱不等的免疫应答反应。

**[关键词]** 棘球蚴病,肝;B 淋巴细胞;体液免疫**[中图分类号]** R383.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)35-4479-03

## Study on humoral immune changes in patients with hepatic alveolar echinococcosis\*

MA Jie<sup>1,2</sup>, JI Linhua<sup>1</sup>, LIU Wenjing<sup>1</sup>, CUI Sen<sup>1△</sup>, FAN Haining<sup>1▲</sup>

(1. Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining, Qinghai 810001, China; 2. Research Center for High Altitude Medicine, Qinghai University, Xining, Qinghai 810001, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the change of humoral immune in the patients with hepatic alveolar echinococcosis (HAE) by studying the expression of partial surface antigens and excreted antibody level change of B lymphocyte in peripheral blood. **Methods** The B cells in 100  $\mu$ L peripheral blood were labeled by 10  $\mu$ L CD19-FITC and 10  $\mu$ L CD20-PE, and then the expressions of CD19 and CD20 were detected by flow cytometry after lightless reaction, lyticing red blood cell and washing. The expression levels of IgG, IgM and IgA were detected by the protein analyzer. **Results** The ratio of CD19<sup>+</sup> and CD20<sup>+</sup> cells in peripheral blood of HAE patients was lower than that of the normal control group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). The levels of IgG and IgA in the HAE group were significantly higher than those in the control group, the level of IgM was lower than that in the control group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** During the in vivo parasitic process of alveolar echinococcosis, the host's immune response is in inhibitory status, which enables alveolar echinococcosis to parasitize and develop in the host for a long time, meanwhile stimulates the body to produce varying intensity degrees of immune response.

**[Key words]** echinococcosis, hepatic; B lymphocytes; humoral immunity

包虫病是常见的人畜共患病,是由棘球绦虫幼虫-棘球蚴寄生而致的,又称棘球蚴病。引起人感染的主要是细粒棘球蚴和多房棘球蚴,又分别称为囊型(cystic echinococcosis, CE)和泡型包虫病(alveolar echinococcosis, AE)<sup>[1-2]</sup>。人体在感染棘球蚴过程中宿主-寄生虫之间的相互作用关系十分复杂<sup>[3]</sup>。目前对棘球蚴与宿主的免疫反应有许多研究结果,但大多集中在细胞免疫方面,而对体液免疫的研究还比较少。寄生虫在宿主体内生长离不开体液免疫的调节, B 细胞作为机体体液免疫的重要细胞,通过提呈抗

原、产生抗体以及分泌细胞因子实现其价值<sup>[4-5]</sup>。本文通过研究肝泡型包虫病(HAE)患者外周血 B 淋巴细胞部分表面抗原的表达及所分泌的抗体水平变化,探讨 HAE 患者体液免疫的变化情况。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 30 例 2015 年 12 月至 2016 年 12 月在青海大学附属医院影像中心初步诊断但未治疗的 HAE 患者(HAE 组),男 17 例,女 13 例,平均年龄 41.5 岁(18~69 岁),回顾手术后确诊为 HAE 患者。排除标准<sup>[6]</sup>:(1)感染性疾病(细菌、病毒等);(2)

\* 基金项目:国家人力资源与社会保障部 2017 年高层次留学回国人才资助项目(2017-200);青海省科技厅项目(2014-ZJ-719);青海大学附属医院中青年科研基金项目(ASFR-2015-YB)。作者简介:马婕(1980—),主治医师,硕士,主要从事慢性高原病方面的研究。△ 通信作者, E-mail:13897284366@139.com; ▲ 共同通信作者, E-mail:fanhaining@medmail.com.cn。

恶性肿瘤；(3)风湿免疫性疾病患者；(4)合并囊型包虫病及其他寄生虫疾病患者；(5)应用非甾体类抗炎药、激素类药物、精神病治疗药物等。同时选取 30 例本院体检的健康人为正常对照组，其中男 16 例，女 14 例，平均年龄 42.5 岁(19~65 岁)，行血常规、肝肾功能、心电图及 B 超等检查示均正常。本研究经青海大学附属医院伦理委员会批准，抽血及化验均征得受试者同意并签署知情同意书。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 仪器与试剂

流式抗体 CD19-FITC、CD20-PE 均购自美国 BD 公司， $10\times$ 红细胞裂解液购自中国联科生物公司，IgG、IgM、IgA 均购自美国 Thermo Fisher 公司，流式细胞购自艾森生物公司，蛋白分析仪购自德国西门子公司，纯水制备系统购自美国 Millipore 公司，电子天平购自美国 Bio-Rad 公司，涡旋混合仪购自美国 Scientific Industries 公司。标记笔、采血管、试管、各种规格的移液器及枪头等。

### 1.2.2 主要溶液配制方法

(1) $1\times$ 红细胞裂解液：用纯水 900 mL 溶解 100 mL  $10\times$ 红细胞裂解液， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。(2)PBS 溶液：将 PBS 粉末缓冲体系充分溶于超纯水，配制成  $1\times$ PBS 缓冲液， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2.3 流式细胞仪检测 B 淋巴细胞抗原表达

取  $100\text{ }\mu\text{L}$  EDTA 抗凝全血加入流式细胞分析专用试

管，加入  $10\text{ }\mu\text{L}$  CD19-FITC、 $10\text{ }\mu\text{L}$  CD20-PE 后混匀，室温避光反应 15 min，再加入 1 mL 红细胞裂解液，室温避光反应 10 min 后，离心弃上清液，加入 2 mL  $1\times$  PBS 洗涤 1 次后以  $300\text{ }\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞，用艾森生物 ACEA NovoCyte<sup>TM</sup> 流式细胞仪进行 FCM 测定，在 FSC/SSC 图上设门去除碎片及死细胞，然后测定 CD19<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup> B 淋巴细胞的百分率，用 NovoExpress 软件获取、分析数据。

### 1.2.4 检测 IgG、IgM、IgA

抽取外周血 2~3 mL 于含纤维蛋白酶促凝剂的管中(橘黄色管盖)，应用西门子 BN II 全自动特定蛋白分析仪检测 IgG、IgM、IgA 的表达水平。

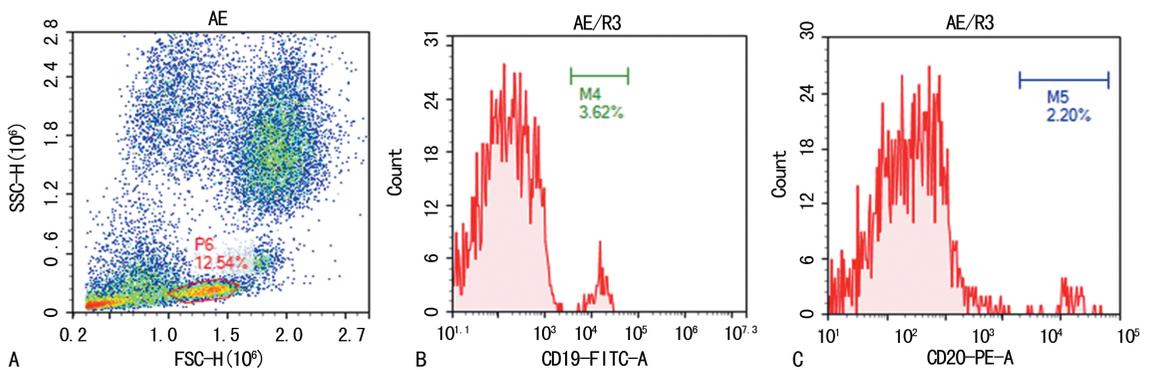
### 1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析处理，计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示，两组间比较采用 *t* 检验，以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

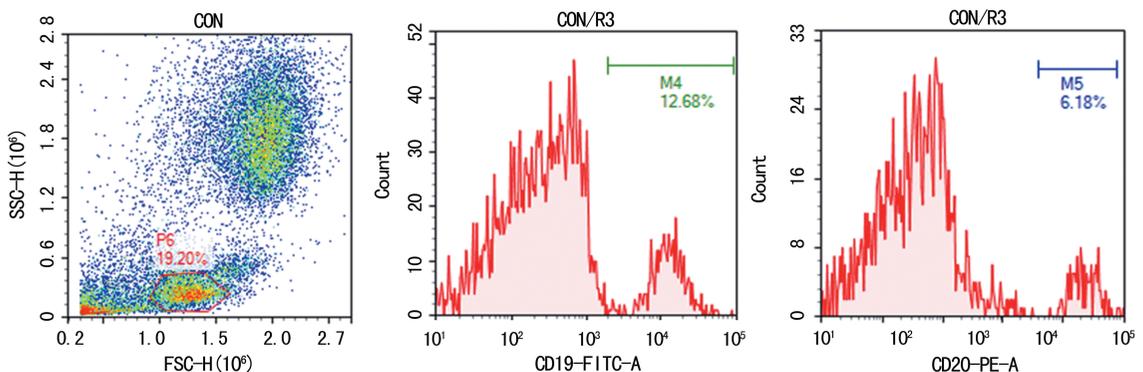
### 2.1 两组外周血 B 淋巴细胞的比率

HAE 组患者外周血 CD19<sup>+</sup> B 淋巴细胞比率为  $(2.18\pm 0.82)\%$ ，正常对照组为  $(9.26\pm 3.40)\%$ ，二者比较 HAE 组显著低于正常对照组，差异有统计学意义( $P<0.01$ )。CD20<sup>+</sup> B 淋巴细胞比率为  $(2.88\pm 1.05)\%$ ，正常对照组为  $(4.54\pm 1.26)\%$ ，二者比较 HAE 组显著低于正常对照组，差异有统计学意义( $P<0.01$ )，见图 1、2。



A: 设门于淋巴细胞; B: HAE 患者外周血 CD19<sup>+</sup> B 淋巴细胞比率; C: HAE 患者外周血 CD20<sup>+</sup> 细胞 B 淋巴比率

图 1 流式细胞术分析 HAE 组患者外周血 B 淋巴细胞比率



A: 设门于淋巴细胞; B: 正常对照组外周血 CD19<sup>+</sup> B 淋巴细胞比率; C: 正常对照组外周血 CD20<sup>+</sup> B 淋巴细胞比率

图 2 流式细胞术分析正常对照组外周血 B 淋巴细胞比率

## 2.2 HAE 组与正常对照组免疫球蛋白水平比较

HAE 组 IgG 为  $(23.99 \pm 7.08)$  g/L, IgA 为  $(3.23 \pm 1.68)$  g/L, 正常对照组 IgG 为  $(11.13 \pm 2.30)$  g/L, IgA 为  $(2.14 \pm 1.02)$  g/L, 二组相比 HAE 组 IgG、IgA 水平均明显高于正常对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而 HAE 组 IgM 为  $(1.26 \pm 0.36)$  g/L, 正常对照组为  $(1.78 \pm 0.80)$  g/L, 二者相比 HAE 组 IgM 水平低于正常对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 HAE 组与正常对照组免疫球蛋白水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ , g/L)

组别	HAE 组	正常对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
IgG	$23.99 \pm 7.08$	$11.13 \pm 2.30$	7.72	0.000
IgA	$3.23 \pm 1.68$	$2.14 \pm 1.02$	2.46	0.018
IgM	$1.26 \pm 0.36$	$1.78 \pm 0.80$	-2.27	0.029

## 3 讨 论

包虫病被认为是一种世界性公共卫生问题, 在我国以新疆、内蒙古、青海等畜牧业发达地区多发, 严重影响当地的经济及居民健康<sup>[7]</sup>。包虫病在人类的传播过程中, 人作为中间宿主, 误食了被狗或狐狸等宿主的粪便排出的寄生虫卵污染的蔬菜或水源, 虫卵在人体小肠内孵化并钻入肠壁, 随血流到达肝、肺、脑等脏器并寄生, 其中以在肝脏内寄生最为多见, 称为 HEA, 在青海地区 HEA 较其他地区多见<sup>[8]</sup>。

在人体被泡球蚴感染后寄生虫长期在宿主体内寄生, 能刺激宿主免疫系统发生特殊的变化, 棘球蚴长期寄生于宿主体内, 为了抵抗宿主免疫系统的杀伤, 包虫能引起宿主免疫系统发生一系列免疫反应, 宿主和包虫的免疫系统都做出了相应调整才能达到动态平衡的“共生”状态。在泡球蚴感染的早期, 为了避免自身遭受伤害, 宿主通过体内免疫细胞的增殖及分化使淋巴细胞转化功能增强, 有排除异己、控制泡球蚴早期生长和转移的作用; 而随着病程的进展, 淋巴细胞转化功能有所下降, 宿主的免疫反应受抑制, 泡球蚴在体内长期寄生并发育<sup>[9]</sup>。

既往的研究中, 细胞因子如白细胞介素 (IL)-2、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) 等在肝包虫病免疫中的作用得到阐明, 这些细胞因子对肝包虫病的发病机制及对疾病的严重程度、疗效及预后有重要意义<sup>[10]</sup>。目前还没有发现关于人体感染包虫后抗体反应的结论性信息, 包虫感染能引起人体外周血循环中 IgG、IgM、IgA 和 IgE 的变化, 有学者指出肝包虫病患者免疫球蛋白水平变化结合超声影像学表现, 对后续诊断及治疗工作有一定的帮助<sup>[11]</sup>。

本试验对 HAE 患者的体液免疫进行了研究, 比较了 HEA 患者外周血成熟 B 细胞变化及血清 IgG、IgA、IgM 等抗体的水平与健康人的区别。以

CD19<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup> 标记外周血成熟 B 细胞, 用流式细胞仪测定外周血中 CD19<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup> 表达量, 结果表明 HAE 患者 CD19<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup> 阳性率明显低于正常对照组, 说明泡球蚴在体内寄生过程中, 淋巴细胞比例下降, 宿主的免疫反应处于抑制状态, 使得泡球蚴能在宿主体内长期寄生并发育。

寄生虫侵入宿主体后首先表现 IgM 上升, IgM 是一种大分子抗体, 相对分子质量最大, 故称之为巨球蛋白, IgM 能清除血流中的原虫颗粒, 为一种凝集性抗体, 是直接、间接凝集实验的诊断要素。张永红等<sup>[12]</sup> 在小鼠腹腔接种棘球蚴原头节后, 在未发育形成囊泡前 30 d 能测到低效价的 IgM 血清抗体, 90 d 后随着囊泡不断长大, IgM 开始降低。本研究中 HAE 患者血清 IgM 抗体较正常对照组降低, 考虑包虫在宿主体内长期寄生, 宿主的免疫抑制, 导致 IgM 下降。

继 IgM 后, IgG 水平明显升高, IgG 是一种保护性抗体, 在免疫过程中占主导地位, 可与相应抗原发生特异性结合, 中和虫体毒素, 对虫体起杀伤作用。寄生于不同组织器官的包虫诱导宿主产生抗体的类型也不同, 表现为肝包虫的主要是 IgG 抗体, 肺包虫主要是 IgM 抗体<sup>[13]</sup>。IgG 包括 4 种不同类型, 分别为 IgG1~4, 既往研究表明随着疾病进展, IgG1 和 IgG3 水平逐渐降低, 而 IgG2 和 IgG4 在整个疾病过程中均保持着类似的高度<sup>[14]</sup>。IgA 存在两种形式——血清型 IgA 和分泌性 IgA, 血清型 IgA 具有抗虫体毒素的作用; 分泌性 IgA 在保护机体胃肠道、呼吸道等黏膜免疫器官受虫体入侵时起到关键作用。GUO 等<sup>[15]</sup> 研究发现 IL-6 能促进 IgA 的分泌, 而近年来研究资料表明, 肝包虫病患者血清 IL-6 水平较健康人明显升高, 可能是倒导致 IgA 水平增高的原因之一。

在本研究中 HAE 患者血清 IgM 抗体较正常对照组降低, 而 IgG 和 IgA 则较正常对照组明显升高, 考虑包虫在宿主体内长期寄生的过程中刺激机体产生强弱不等的免疫应答反应, 随着包虫囊增大和包虫寄生数量的增多, 抗体阳性率也随之变化<sup>[16]</sup>。在人体感染包虫后发生的免疫反应与疾病的性质和特点相关, 这个特性提供了一个重要的优势, 使得免疫系统针对特定群体的传染病病原体能够调整其防御策略。

目前, 尽管 HAE 进展的分子机制尚不明确, 但有大量基础研究结果显示体液免疫及细胞免疫参与其进展。HAE 的免疫相当复杂, 只有清楚地了解了其免疫机制, 才能更有效地寻找抑制包虫感染的办法, 从而控制其传播。

## 参考文献

- [1] 温浩, 徐明谦. 实用包虫病学[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [2] MORO P, SCHANTZ P M. Echinococcosis: a review[J]. Int J Infect Dis, 2009, 13(2): 125-133. (下转第 4486 页)

获取直观的软骨图像,对膝关节外伤合并软骨损伤的诊断有着重要意义;(3)MERGE 序列诊断的整体准确度、特异度与关节镜诊断的一致性均不如 PDWI 序列、Fiesta-c、FS-3D-SPGR 序列。总之优化序列及参数,并结合流行病学特征,有助于提高诊断水平。本研究仅选取了 MERGE、Fiesta-c 序列、FS-3D-SPGR 序列进行观察,随着 MRI 技术发展、新序列的出现,关于软骨损伤的序列优化还有待不断研究总结。

## 参考文献

- [1] 席智杰,梁倩倩,米琨,等.丹红注射液联合关节镜下自体骨软骨移植治疗股骨滑车骨软骨损伤[J].中华中医药学刊,2016,35(7):1591-1594.
  - [2] 金亚平,徐刚,金建华,等.关节镜治疗膝关节盘状半月板损伤的疗效及术后疼痛的危险因素分析[J].中华全科医学,2015,13(11):1796-1798.
  - [3] 张振勇,王海波,段宏伟.磁共振对膝关节软骨损伤的诊断价值[J].中国 CT 和 MRI 杂志,2015,13(7):106-109.
  - [4] 桂向洪,陈晔.膝骨关节炎患者滑膜组织中  $\beta$ -catenin 及 MMP-3 表达水平研究[J].国际检验医学杂志,2017,38(20):2931-2940.
  - [5] 陈琦,廖文波.滑膜间充质干细胞修复膝关节软骨损伤的应用与进展[J].中国组织工程研究,2015,19(36):5886-5891.
  - [6] 王庆,黄华扬,张涛,等.基质诱导自体软骨细胞移植修复膝关节软骨损伤的早期疗效[J].中华骨科杂志,2016,36(1):28-34.
  - [7] 程智涛,夏春明,何振华,等.326 例膝关节骨软骨骨折病例流行病学分析[J].创伤外科杂志,2015,17(4):364-364.
  - [8] 朱渊,徐向阳,刘津浩,等.踝关节镜下微骨折手术治疗距骨骨软骨损伤[J].第三军医大学学报,2015,37(3):211-214.
  - [9] 丁明,徐虎,王迎春,等.前交叉韧带断裂并发膝关节软骨损伤的影响因素[J].中华创伤杂志,2015,31(6):512-516.
  - [10] 潘晓华,陈志斌,洪劲松.膝关节软骨下骨骨挫伤的研究进展[J].中华创伤骨科杂志,2016,18(2):179-184.
  - [11] 贾焕英.膝关节软骨损伤磁共振扫描序列临床应用价值的研究[J].中国药物与临床,2017,17(6):826-827.
  - [12] 刘广红,张兵,张辉.磁共振成像技术在膝关节软骨损伤术前评判中的临床应用价值[J].中华创伤骨科杂志,2015,17(8):699-703.
  - [13] ECKSTEIN F, GUERMAZI A, GOLD G, et al. Imaging of cartilage and bone: promises and pitfalls in clinical trials of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2014, 22(10):1516-1532.
  - [14] COOK J L, COOK C R, STANNARD J P, et al. MRI versus ultrasonography to assess meniscal abnormalities in acute knees[J]. J Knee Surg, 2014, 27(4):319-324.
  - [15] 周小卫,谢国强,左毅,等.磁共振 3D-FIESTA 序列在脑积水中的诊断价值[J].中华神经外科疾病研究杂志,2016,15(1):46-49.
- (收稿日期:2018-06-18 修回日期:2018-09-02)
- 
- (上接第 4481 页)
- [3] VUITTON D A. Echinococcosis and allergy[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2004, 26(2):93-104.
  - [4] RIGANO R, PROFUMO E, BRUSCHI F, et al. Modulation of human immune response by Echinococcus granulosus antigen B and its possible role in evading host defenses[J]. Infect Immun, 2001, 69(1):288-296.
  - [5] ESMAELIZAD M, AHMADIAN G, AGHAIYPOUR K, et al. Induction of protective T-helper1 immune responses against Echinococcus granulosus in mice by a multi-T-cell epitope antigen based on five proteins[J]. Mem I Oswaldo Cruz, 2013, 108(4):408-413.
  - [6] WS257-2006, 包虫病诊断标准[S].北京:中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,2006.
  - [7] XU L Q. The damage of major parasitic disease in the western region in our country and reflection to the prevention and control work[J]. Chin J Parasitic Dis Control, 2002, 15(1):1-3.
  - [8] 温浩. 包虫病学[M].北京:人民卫生出版社,2015.
  - [9] GRIMM E D, PORTUGAL R V, dE OLIVEIRA NETO M, et al. Structural analysis of an echinococcus granulosus actin fragmenting protein by SAXS studies an molecular modeling[J]. Biophys, 2006, 90(9):3216-3223.
  - [10] 高亮亮,张示杰.肝包虫病相关因子的研究进展[J].中国人兽共患病学报,2013,29(1):78-81.
  - [11] SIRACUSANO A, DELUNARDO F, TEGGI A, et al. Cystic echinococcosis: aspects of immune response, immunopathogenesis and immune evasion from the human host[J]. Endocrine, 2012, 12(12):16-23.
  - [12] 张永红,薛海.棘球蚴病患者的特异性免疫球蛋白水平[J].中国寄生虫病防治杂志,1990,3(2):139-140.
  - [13] 朱兵,徐明谦.棘球蚴病患者 IgG 抗体阴性反应血清再检测的研究[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2002,12(6):16-19.
  - [14] HUANG X, GRÜNER B, LECHNER C J, et al. Distinctive cytokine, chemokine, and antibody responses in Echinococcus multilocularis-infected patients with cured, stable, or progressive disease[J]. Med Microbiol Immunol, 2014, 203(3):185.
  - [15] GUO H, KUANG P, LUO Q, et al. Effects of sodium fluoride on blood cellular and humoral immunity in mice[J]. Oncotarget, 2017, 8(49):85504-85515.
  - [16] 朱兵,徐明谦.宿主对棘球蚴感染的免疫反应[J].新疆医学,2005,12(1):104-108.
- (收稿日期:2018-06-22 修回日期:2018-09-16)