

文章编号: 1000-7423(2009)-02-0102-05

【论著】

## 杜氏利什曼原虫前鞭毛体和无鞭毛体的比较蛋白质组学分析

敬保迁\*, 邓世山, 张仁刚, 张洁

**【摘要】** 目的 应用蛋白质组学技术分析杜氏利什曼原虫前鞭毛体和无鞭毛体蛋白质表达状况。方法 分别提取和纯化杜氏利什曼原虫四川 SC6 株前鞭毛体与纯培养无鞭毛体的总蛋白, 分别经 pH3~10 的预制胶条进行双向电泳分离, 凝胶用考马斯亮蓝染色, 凝胶图像以 PDQuest 1.0 软件分析, 并对主要差异表达蛋白点用电喷雾质谱法进行鉴定。结果 等量的前鞭毛体与纯培养的无鞭毛体总蛋白经双向电泳分离后均可获近 700 个蛋白点, 其中超过 90% 的蛋白点的分布和相对强度基本一致。与前鞭毛体比较, 6 个蛋白点在无鞭毛体蛋白中明显高表达, 3 个蛋白点低表达。6 个明显高表达的蛋白点中有 5 个为已知功能蛋白, 分别为 Reiske 铁硫蛋白前体、 $\alpha$  微管蛋白、过氧化物酶 1、二氢硫辛酰胺乙酰转移酶前体和甘露糖-1-磷酸瓜氨酸转移酶; 3 个低表达的蛋白点中有 2 个为已知功能蛋白, 分别为热休克蛋白 70 和  $\beta$  微管蛋白。这些差异调节表达蛋白与碳水化合物/能量代谢, 应激反应, 细胞膜和细胞骨架形成相关。结论 前鞭毛体与无鞭毛体蛋白质的表达存在差异。

**【关键词】** 杜氏利什曼原虫; 前鞭毛体; 无鞭毛体; 比较蛋白质组学

中图分类号: R382.22 文献标识码: A

## Comparative Proteomic Analysis of the Promastigotes and Amastigotes of *Leishmania donovani*

JING Bao-qian\*, DENG Shi-shan, ZHANG Ren-gang, ZHANG Jie

(Institute of Immunology and Molecular Biology, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

**【Abstract】** **Objective** To explore the protein profile and identify developmentally regulated proteins of the promastigotes and axenic amastigotes with comparative proteomics technique. **Methods** The total proteins of promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania donovani* SC6 strain were separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE) in a broad pH range (3–10), and the gel was stained with Coomassie blue. The images were analyzed by PDQuest 1.0 software, and the major developmentally regulated proteins were identified by electrospray mass spectrometry. **Results** Approximately 700 protein spots were revealed in equivalent proteins of the promastigotes and axenic amastigotes separated by 2-DE, among which more than 90% protein spots showed equivalent quantity and distribution, with 6 proteins up-regulated and 3 proteins down-regulated in axenic amastigotes compared with promastigotes. Five of the 6 up-regulated proteins were with known function, respectively ascribed as Reiske iron-sulfur protein precursor,  $\alpha$ -tubulin, peroxidoxin 1, dihydrolipoamide acetyltransferase precursor, and mannose-1-phosphate guanyltransferase. Two of the 3 down-regulated proteins were identified as heat shock protein 70 and  $\beta$ -tubulin. The functions of the developmentally regulated proteins were related to the carbohydrate/energy metabolism, stress response, or formation of cell membrane/cytoskeleton. **Conclusion** The findings demonstrate the differences in protein expression profiles between promastigotes and amastigotes.

**【Key words】** *Leishmania donovani*; Promastigote; Amastigote; Comparative proteomics

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30571635)

\* Corresponding author, E-mail: bjjing@yahoo.com.cn

杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*) 能够引起人内脏利什曼病, 全世界每年新发病例约 50 万。

由于利什曼原虫感染致病的分子机制和保护性免疫机制至今仍不十分清楚, 很难研制出安全有效的抗利什曼病的新药与疫苗。研究表明, 利什曼原虫不同发育阶段表达的分化调节类功能蛋白在原虫的致病和保护性免疫中起着非常重要的作用<sup>[1]</sup>, 但这些功

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30571635)

作者单位: 川北医学院免疫学与分子生物学研究所, 南充 637000

\* 通讯作者, E-mail: bjjing@yahoo.com.cn

能蛋白的 mRNA 转录水平与蛋白表达水平并不平行<sup>[2]</sup>, 从转录水平认识利什曼原虫蛋白质的表达水平非常局限。

蛋白质组学技术可从利什曼原虫整体层次上, 更精确和贴切地反映原虫蛋白质的表达状况。本研究采用比较蛋白质组学技术分析杜氏利什曼原虫 SC6 株前鞭毛体与无鞭毛体的蛋白质表达情况, 并对差异表达蛋白点进行鉴定, 为进一步研究其致病和免疫保护的分子机制奠定基础。

## 材料与方 法

### 1 虫株来源与培养

杜氏利什曼原虫四川 SC6 株(MHOM/CN/86/SC6)系中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所汪俊云研究员惠赠。将保存于 NNN 培养基 (Novy-MacNeal-Nicolle medium) 中的杜氏利什曼原虫 SC6 株接种于 M199 复合培养液 (pH 7.0, 含 10% 新生牛血清、100 U/ml 青霉素 G 和 100 μg/ml 链霉素), 26 °C 轻微震荡扩增培养, 制备对数生长期的前鞭毛体。取部分对数生长期的前鞭毛体接种于 RPMI 1640 复合培养液 (pH 5.5, 含 10% 新生牛血清), 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 诱导培养 3 d, 转化成无鞭毛体<sup>[3]</sup>。

### 2 主要试剂与仪器

尿素、硫脲、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸 (CHAPS)、二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、十二烷基硫酸钠 (SDS) 及蛋白质定量试剂盒等购自美国 Bio-Rad 公司, 蛋白酶抑制剂混合物、核酸酶混合物、非线性固相 pH 梯度干胶条 (IPG strip pH 3~10, NL, 18 cm)、两性电解质 PharmaLyte3-10、固相 pH 梯度 (IPG) 缓冲液、去拖尾剂 DeStreak 和蛋白纯化试剂盒 (clean up kit) 均购自美国 GE Amersham 公司, 蛋白质标志物购自立陶宛 MBI Fermentas 公司, 牛血清白蛋白 (BSA) 购自美国 Amersco 公司。C<sub>18</sub> ZipTip 微量层析柱购自美国 Millipore 公司, Zorbax 300SB-C<sub>18</sub> trap 柱购自美国 Agilent Technologies 公司, C<sub>18</sub> 逆向层析柱 (15 cm×150 μm) 购自加拿大 CTI 公司。酶标仪 (R550) 为美国 BioRad 公司产品, 等电聚焦仪 (Ettan IPGphor II 型)、扫描仪 (Image scanner) 和垂直电泳系统 (Ettan DALT II) 均为美国 GE Amersham 公司产品, 高效液相色谱仪 (Agilent 1100 HPLC) 为美国 Agilent Technologies 公司产品, 液质联用质谱仪 (LCQ DECA XP Plus) 为美国 Thermo Finnigan 公司产品。

### 3 总蛋白的制备

将上述含虫体的培养液分别离心 3 000×g 10 min, 各收集 2×10<sup>8</sup> 个前鞭毛体与无鞭毛体, 用预冷的 0.01 mol/L PBS 缓冲液洗涤 3 次后, 加入 10 ml 裂解液 (含 7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、40 mmol/L Tris、40 mmol/L DTT、2% PharmaLyte3-10、50 μl 蛋白酶抑制剂混合物、50 μl 核酸酶混合物、100 μl IPG 缓冲液和 0.001% 溴酚蓝), 室温快速振荡 3~4 h 后, 4 °C 16 000×g 离心 40 min, 收集上清, 以 BSA 标准品为参照, 用蛋白质定量试剂盒 (参照使用说明) 测定各样品蛋白质浓度, 再用蛋白纯化试剂盒 (参照使用说明) 对前鞭毛体蛋白和无鞭毛体蛋白进一步纯化, 以 4 ml 上样缓冲液 (含 7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、40 mmol/L Tris、10 μl 蛋白酶抑制剂混合物、40 mmol/L DTT、2% PharmaLyte3-10、10 μl 核酸酶混合物、20 μl IPG 缓冲液、1 μl DeStreak 和 0.001% 溴酚蓝) 溶解沉淀后, 用蛋白质定量试剂盒测定各样品蛋白质浓度, 分装并冻存于 -80 °C。

### 4 双向凝胶电泳

纯化后的前鞭毛体和无鞭毛体蛋白质, 分别设 3 个独立的双向电泳。分别取样品蛋白 1.5 mg 加入等电点仪聚焦盘内, 将室温平衡好的 IPG 干胶条胶面朝下置于聚焦盘中蛋白样品溶液上, 胶条上覆盖 3 ml 矿物油后进行等电聚焦, 设置等电聚焦仪参数, S1 为 30 V 12 h, S2 为 200 V 1 h, S3 为 500 V 2 h, S4 为 8 000 V 3 h, S5 为 8 000 V 8~12 h; S6 为 500 V 5 h。聚焦总电压时间积为 60 000 Vh。聚焦完毕后, 胶条用现配的 10 ml 胶条平衡缓冲液 I (含 6 mol/L 尿素、2% SDS、50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8、30% 甘油、100 mg DTT 和 0.001% 溴酚蓝) 平衡 15 min, 再用现配的胶条平衡缓冲液 II (含 6 mol/L 尿素、2% SDS、50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8、30% 甘油、400 mg 碘乙酰胺和 0.001% 溴酚蓝) 平衡 15 min, 平衡后的胶条转移至预先制备的 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶上沿, 正极侧加入蛋白质标志物, 用 0.5% 低熔点琼脂糖封胶, 冷却后, 进行第二相电泳, 设置电泳仪参数, S1 为 2 w/胶 30 min, S2 为 17 w/胶, 直至溴酚蓝离胶最底端 1 mm 处停止电泳。

### 5 凝胶分析

双向电泳后的凝胶经考马斯亮蓝 R-250 染色液 (含 0.1% 考马斯亮蓝 R-250、40% 甲醇和 10% 乙酸) 染色 1.5 h, 脱色液 (40% 甲醇和 10% 乙酸) 反复脱色至背景清亮, 蛋白点明显后, 用扫描仪扫描凝胶图

像,以 PDQuest 1.0 计算机软件对图像进行编辑、强度校正、点检测、背景消减、匹配和点的体积强度百分比(%)检测。分析双向电泳的重复性后,比较前鞭毛体与无鞭毛体双向凝胶图像中蛋白质点的分布和强度,确定前鞭毛体与无鞭毛体间的稳定差异表达蛋白点。

## 6 液相色谱-电喷雾串联质谱分析与数据库检索

在恒定差异表达的蛋白点中,挑取在前鞭毛体中表达量高于其他蛋白点平均值而在无鞭毛体不表达的蛋白点,以及在无鞭毛体中表达量高于其他蛋白点平均值而在前鞭毛体不表达的蛋白点作进一步鉴定。液相色谱-电喷雾串联质谱(liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, LC-ESI-MS/MS)分析由上海生命科学院蛋白质组研究分析中心完成。将含有相应蛋白的胶塞以 1%胰蛋白酶水解 20 h,抽提酶解后的多肽片段,冻干后,加入 10  $\mu$ l 0.1%甲酸溶液溶解,取 5  $\mu$ l 样品上样用 C<sub>18</sub> ZipTip 柱脱盐后,再以 Zorbax 300SB-C<sub>18</sub> trap 柱和 C<sub>18</sub> 逆向层析柱进行串联液相色谱。将 0.1%甲酸水溶液作为 A 液,0.1%甲酸乙腈水溶液(乙腈为 80%)作为 B 液,色谱柱以 A 液平衡后,样品由自动进样器上样,流速为 15  $\mu$ l/min: 0~15min, 95% A 液; 15~45 min, B 液线性梯度从 5%上升到 60%; 45~50 min, B 液线性梯度从 60%上升到 100%; 50~55 min, B 液维持在 100%; 55~60 min, B 液线性梯度从 100%下降到 5%,所收集到的样品进行质谱分析。质谱分析以微喷雾方式进样,喷雾电压为 3.2 kV,毛细吸管温度为 170  $^{\circ}$ C, MS 扫描范围为 400~2 000 u (原子质量单位),正离子方式进行检测。多肽和多肽碎片的质量

电荷比按照下列方法采集:每次全扫描后采集 3 个最强的碎片图谱。得到的原始数据用 BIOWORKS 软件搜索 NCBI Leishmania 蛋白库,肽段序列结果过滤参数为当电荷(Charge)为+1,交叉相关系数(Xcorr) $\geq$ 1.9;当 Charge 为+2, Xcorr $\geq$ 2.2;当 Charge 为+3, Xcorr $\geq$ 3.75;其中  $\Delta$ 交叉相关系数(DelCN) $\geq$ 0.1。

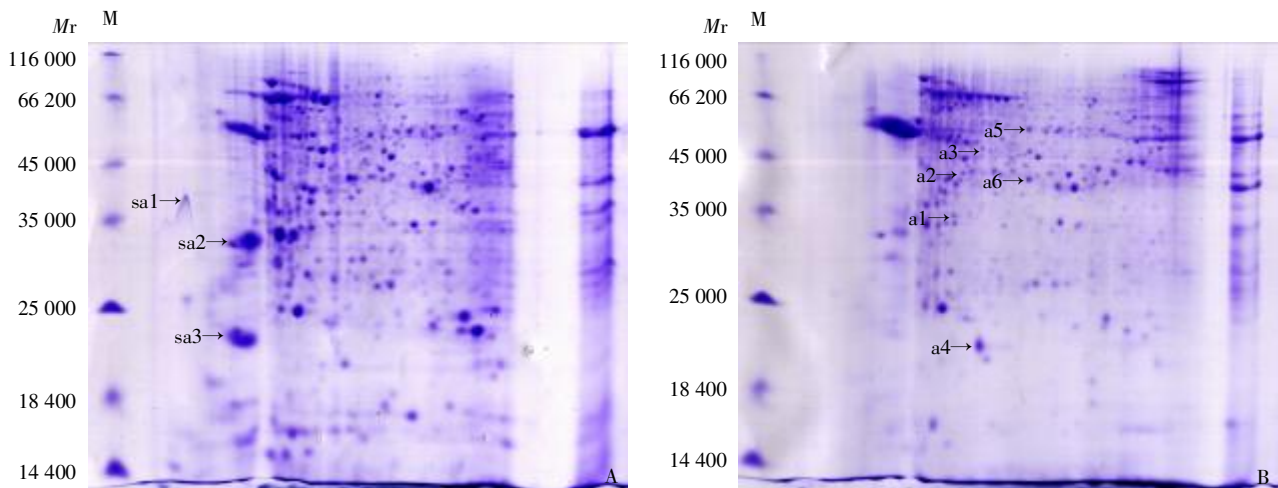
## 结 果

### 1 双向凝胶电泳

等量的前鞭毛体与无鞭毛体蛋白质分别经 3 次独立的双向电泳后,均可检测出约 700 个蛋白点(图 1A、B),超过 90%的蛋白点的分布和相对强度基本一致,蛋白点的重合性好。比较前鞭毛体与无鞭毛体双向电泳凝胶图像上的蛋白点,部分蛋白点在前鞭毛体和无鞭毛体中呈恒定差异表达,选取其中 3 个前鞭毛体明显高表达的蛋白点(sa1~sa3),6 个无鞭毛体明显高表达的蛋白点(a1~a6)进行鉴定。在前鞭毛体图谱中的一些相对分子质量较低的蛋白,而在无鞭毛体的图谱中未见相应的蛋白点,未对其进行质谱鉴定。

### 2 质谱鉴定

9 个差异表达蛋白点中,前鞭毛体特异高表达的 3 个蛋白点:sa1 为热激蛋白 70(登录号为 AY423868),sa2 未鉴定出,sa3 为  $\beta$  微管蛋白(登录号为 X93566);无鞭毛体特异高表达的 6 个蛋白点:a1 为 Reiske 铁硫蛋白前体(登录号为 AAZ14377.1),a2 为假定蛋白(登录号为 CAJ07026.1),a3 为  $\alpha$  微管蛋白(登录号为 CAJ02503.1),a4 为利什曼原虫超氧化物酶 1(登录号为 AAG40074.1),a5 为二氢硫辛酰胺乙酰转移酶前体



A: 前鞭毛体, B: 无鞭毛体; M: 蛋白质标志物; sa1~sa3: 前鞭毛体特异高表达蛋白, a1~a6: 无鞭毛体特异高表达蛋白。  
A: Promastigotes, B: Amastigotes; M: Protein marker; sa1~sa3: Unique proteins expressed in promastigotes, a1~a6: Unique proteins expressed in amastigotes.

图 1 杜氏利什曼原虫前鞭毛体和无鞭毛体蛋白质双向电泳图

Fig.1 Images of total proteins of promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* after two-dimensional electrophoresis

(登录号为 CAJ09224.1), a6 为甘露糖-1-磷酸瓜氨酸转移酶(登录号为 CAJ03868.1)。这些差异表达蛋白主要参与原虫下列生物学功能: ① 能量代谢与糖脂合成 (Reiske 铁硫蛋白前体、二氢硫辛酰胺乙酰转移酶前体和甘露糖-1-磷酸瓜氨酸转移酶), ② 应激反应 (热激蛋白 70 和过氧化物酶 1), ③ 细胞膜/细胞骨架形成 ( $\alpha$  微管蛋白和  $\beta$  微管蛋白)。

## 讨 论

对数生长期的杜氏利什曼原虫前鞭毛体不能感染人致病, Debrabant 等<sup>[3]</sup>将杜氏利什曼原虫前鞭毛体体外转化生成的无鞭毛体, 具有组织来源的无鞭毛体形态特征, 可体外感染人巨噬细胞, 也具有感染金黄地鼠能力。作者通过改变体外培养时的温度、pH 和 CO<sub>2</sub> 浓度等条件, 将杜氏利什曼原虫 SC6 株前鞭毛体转化为无鞭毛体, 与前鞭毛体比较, 无鞭毛体形态典型, 毒力基因表达谱发生改变, 对 BALB/c 小鼠和金黄地鼠感染致病能力增强 (尚未发表)。说明无鞭毛体发育相关分子的功能或免疫性质与致病或保护性免疫密切相关。本研究在前鞭毛体与无鞭毛体差异表达的蛋白中, 对 6 个在无鞭毛体明显高表达和 3 个明显低表达的蛋白进行鉴定, 与 Bente 等<sup>[4]</sup>对杜氏利什曼原虫发育所致的蛋白质组学变化的结果比较, 发现其中 3 个蛋白 (Reiske 铁硫蛋白前体、 $\alpha$  微管蛋白和  $\beta$  微管蛋白) 的表达状况一致, 都在无鞭毛体高表达, 而热休克蛋白 70 的表达则相反。

Reiske 铁硫蛋白是线粒体膜上泛素-细胞色素 c 还原酶复合物的一个组分, 参与氧化还原反应与电子传递; 二氢硫辛酰胺乙酰转移酶是丙酮酸脱氢酶复合物的 E2 亚基, 属能量产生与转换的相关酶类。由于利什曼原虫无鞭毛体寄生在巨噬细胞内, 原虫的生存和增殖均需大量能量。Glaser 等<sup>[5]</sup>证实无鞭毛体的葡萄糖、脯氨酸和核苷酸代谢的最适 pH 值为 4.5~5.0, 而 Reiske 铁硫蛋白和二氢硫辛酰胺乙酰转移酶前体蛋白均在无鞭毛体上调表达, 说明这些酶可能是无鞭毛体在 pH 值较低的环境中进行能量代谢的关键酶类。

巨噬细胞内大量氧自由基对无鞭毛体有很强的杀灭作用, 无鞭毛体通过产生超氧化物酶等对氧自由基进行清除, 从而保证原虫在巨噬细胞内的存活。Zarley 等<sup>[6]</sup>发现经热休克处理的杜氏利什曼原虫不仅感染力增强, 而且能抵抗自由氧的杀伤。Barr 等<sup>[7]</sup>从转录水平证实利什曼原虫无鞭毛体过氧化物酶 1 上调表达。本研究从蛋白质表达水平证实过氧化物酶 1 在无鞭毛体内上调表达, 说明该分子增强了杜氏利什曼原虫无鞭毛体的抗氧自由基能力, 与原虫的毒力相关。

利什曼原虫甘露糖代谢直接参与了利什曼原虫黏附和入侵相关分子脂磷酸聚糖 (lipophosphoglycan, LPG) 和蛋白磷酸聚糖 (proteophosphoglycan, PPG) 等的合成。Garami 等<sup>[8]</sup>敲除利什曼原虫甘露糖代谢途径中甘露糖-1-焦磷酸酶基因, 则原虫对巨噬细胞的感染力丧失。本研究发现杜氏利什曼原虫四川 SC6 株无鞭毛体内甘露糖代谢途径中的甘露糖-1-磷酸瓜氨酸转移酶蛋白质表达水平增高, 进一步证实该分子对内脏利什曼病具有重要的研究价值。

杜氏利什曼原虫感染中, 机体的免疫应答参与了致病, 并可在疾病痊愈后形成较强的免疫保护。Sayda 等<sup>[9]</sup>发现利什曼原虫 Reiske 铁硫蛋白前体是刺激机体产生免疫应答的重要抗原之一; 而二氢硫辛酰胺乙酰转移酶前体的免疫原性极强, 与许多自身免疫性疾病的发生有关<sup>[10]</sup>。本研究发现这两个蛋白在杜氏利什曼原虫四川 SC6 株无鞭毛体内较之在前鞭毛体内蛋白表达水平升高, 说明它们可能是该虫株刺激机体产生免疫保护或免疫致病的重要抗原。

利什曼原虫前鞭毛体在体外转化成无鞭毛体的过程中, Sacks 等<sup>[11]</sup>通过电子显微镜观察到无鞭毛体被膜下微管蛋白发生重排, 微管不能到达细胞顶点。本研究观察到  $\alpha$  微管蛋白、 $\beta$  微管蛋白的表达发生了明显变化, 可从分子水平解释上述现象的发生。

无鞭毛体是利什曼原虫引起人体疾病的关键生活史时期, 本研究发现的杜氏利什曼原虫四川 SC6 株无鞭毛体时期上调表达的蛋白质多为影响无鞭毛体生命代谢的功能蛋白质, 研制药剂干扰其功能, 可能有利于内脏利什曼病的治疗, 将这些蛋白分子用作候选抗原, 研究其免疫保护性, 有助于研发针对内脏利什曼病的有效疫苗。

## 参 考 文 献

- [1] Chang KP, Reedb SG, McGwire BS, et al. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity[J]. *Acta Trop*, 2003, 85(3): 375-390.
- [2] Beverley SM, Akopyants NS, Goyard S, et al. Putting the *Leishmania* genome to work; functional genomics by transposon trapping and expression profile[J]. *Phil Trans R Soc Lond B*, 2002, 357(1417): 47-53.
- [3] Debrabant A, Joshi MB, Pimenta PFP, et al. Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics [J]. *Int J Parasitol*, 2004, 34(2): 205-217.
- [4] Bente M, Harder S, Wiesgigl M, et al. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*[J]. *Proteomics*, 2003, 3(9): 1811-1829.
- [5] Glaser TA, Baatz JE, Kreishman GP, et al. pH homeostasis in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(20): 7602-7606.
- [6] Zarley JH, Britigan BE, Wilson ME. Hydrogen-peroxide mediated toxicity for *Leishmania donovani chagasi* promastigotes; role of hydroxyl radical and protection by heat shock[J]. *J Clin Invest*,



1991, 88(5): 1511-1521.

[7] Barr SD, Gedamu L. Cloning and characterization of three differentially expressed peroxidoxin genes from *Leishmania chagasi*. Evidence for an enzymatic detoxification of hydroxyl radicals [J]. J Biol Chem, 2001, 276(36): 34279-34287.

[8] Garami A, Ilg T. Disruption of mannose activation in *Leishmania mexicana*: GDP-mannose pyrophosphorylase is required for virulence, but not for viability[J]. EMBO J, 2001, 20(14): 3657-3666.

[9] Sayda KE, Ikram G, Jean MS, et al. Proteomic approach for characterization of immunodominant membrane-associated 30-to

36-kilodalton fraction antigens of *Leishmania infantum* promastigotes, reacting with sera from Mediterranean visceral leishmaniasis patients[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(2): 310-320.

[10] Cha S, Leung PS, Gershwin ME, et al. Combinatorial autoantibodies to dihydrolipoamide acetyltransferase, the major autoantigen of primary biliary cirrhosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(6): 2527-2531.

[11] Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes[J]. Exp Parasitol, 1989, 69(1): 100-103.

(收稿日期: 2008-11-06 编辑: 瞿麟平)

文章编号: 1000-7423(2009)-02-0106-01

## 【病例报告】

# 重症华支睾吸虫病合并胆结石 1 例

谢琼珺, 徐仙赞, 苏水莲\*

中图分类号: R532.23 文献标识码: D

患者, 女性, 59 岁, 农民, 江西省于都县仙下乡三贯村人。2008 年 2 月右上腹持续性疼痛 2 d, 在仙下乡卫生院诊断为“胃炎”。经抗炎治疗, 疼痛缓解, 但仍反复发作。2008 年 7 月 26 日早餐后突发右上腹剧烈疼痛, 畏寒发热、恶心, 但无呕吐, 之后 2 d 症状加剧, 于 2008 年 7 月 28 日入于都县人民医院住院治疗。查体: 体温 38.5℃, 神志清; 皮肤、巩膜无黄染; 心律 103 次/min, 律齐; 两肺呼吸音清晰, 腹软, 肝区有叩痛, 神经系统检查未见异常。血常规: 红细胞  $3.39 \times 10^{12}/L$ , 血红蛋白 95 g/L, 白细胞  $9.0 \times 10^9/L$ , 其中淋巴细胞  $0.7 \times 10^9/L$ , 中性粒细胞  $7.5 \times 10^9/L$ , 嗜酸粒细胞  $0.7 \times 10^9/L$ , 血小板  $200 \times 10^9/L$ 。尿常规正常。肝功能: 总胆红素 111  $\mu\text{mol}/L$ , 直接胆红素 64  $\mu\text{mol}/L$ , 间接胆红素 47  $\mu\text{mol}/L$ , 谷丙转氨酶 899 U/L, 碱性磷酸酶 189 U/L,  $\gamma$ -谷氨酰基转移酶 289 U/L, 其他均正常。血 Ca 浓度升高至 2.58 mmol/L。B 超检查: 胆囊及肝外胆管结石。CT 检查: 胆囊颈及门静脉缘多发结节状钙质密度灶, 初步诊断为胆结石。采取胆囊切除术、胆总管切开取石术及 T 管引流术治疗。胆囊及胆管内引流物病理诊断: ① 胆囊结石合并慢性炎症。② 胆管内引流物镜下见灶状空泡样物质, 送至赣南医学院病原研究室检查, 在患者的 T 管引流液中见大量华支睾吸虫卵 (图 1); 病理切片经伊红-苏木素 (HE) 染色, 见胆管内有大量华支睾吸虫卵。后经吡喹酮治疗 (总量 37.5 g, 5 d 疗程), 同时进行保肝、抗感染治疗, 20 d 后复检 T 管引流物和粪便, 均未发现华支睾吸虫卵。

### 讨论

华支睾吸虫, 成虫寄生于人体的肝胆管内, 引起以肝胆病变为主要的人畜共患寄生虫病——华支睾吸虫病。该病在我国流行范围广、感染率高, 是我国当前最严重的食源性寄生虫病之一<sup>[1]</sup>。华支睾吸虫病的危害性主要是患者的肝脏受损。病变

主要发生于肝脏的次级胆管。华支睾吸虫成虫和虫卵寄生于胆道, 虫体破坏了胆道上皮的正常结构, 有利于细菌在胆道内潜隐存在, 导致胆汁中细菌性  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶活性增高, 从而使胆汁中可溶性葡萄糖醛酸胆红素转变为难溶性的胆红素钙<sup>[2]</sup>; 另一方面, 胆道上皮分泌的糖蛋白增加, 并附着于虫卵表面作为结石的核心, 起支架和黏附剂作用, 促进胆红素钙的沉积, 最后导致色素类结石 (多发性胆石) 的形成。因此华支睾吸虫感染常并发胆管感染和胆石症, 在胆石的核心可找到华支睾吸虫卵<sup>[2]</sup>。患者居住地为华支睾吸虫病流行区, 曾食生黑鲩鱼片 2 次 (150 g/次)。根据以上资料分析, 病因诊断不明的原因为:

① 临床医生对华支睾吸虫病认识不足, 不了解该病的特点, 仅诊断了并发症, 未寻找发病原因; ② 询问病史不仔细; ③ 检查项目不全面。建议临床医生详细询问肝胆病患者病史; 对有食生鱼虾史的患者, 进行常规粪检华支睾吸虫卵, 以预防临床上华支睾吸虫病的漏诊误诊。

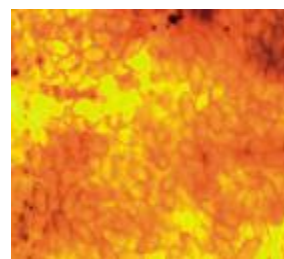


图 1 T 管引流液中的华支睾吸虫卵 (×400)

### 参 考 文 献

[1] Xu LQ, Xue CL. The Guide to Diagnosis and Treatment of Important Parasitic Diseases [M]. Beijing: Science and Technology Publishing House, 2002: 55-62. (in Chinese) (许隆祺, 薛纯良. 重要寄生虫病诊治指南 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2002: 55-62.)

[2] Li YL. Human Parasitology [M]. 6th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004: 187. (in Chinese) (李雍龙. 人体寄生虫学 [M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 187.)

(收稿日期: 2008-10-07 编辑: 高石)

作者单位: 赣南医学院显微实验室, 赣州 341000

\* 通讯作者, E-mail: ssushui@gmail.com