

并殖吸虫病患者血清 IL-5、IL-4、IL-13 及胸腺基质淋巴细胞生成素水平检测

吴玛莉¹ 唐莉娜^{1*} 李安梅¹ 徐莉娜¹ 梁永生¹ 袁志波² 何光志³

【摘要】 目的 研究并殖吸虫感染者 Th2 免疫应答产生的细胞因子 IL-5、IL-4、IL-13、胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)的水平,筛选出可以用于临床诊断并殖吸虫病的潜在细胞因子标志物。**方法** 收集贵州省本地并殖吸虫病患者成年组(年龄>18 周岁)及未成年组患者(年龄≤18 周岁)的血清样本各 12 例,以健康人血清 4 例为对照,ELISA 检测血清中的 IL-5、IL-4、IL-13、TSLP 等 4 种细胞因子的浓度,各病例组及对照组间采用独立样本 *t* 检验分析,同时收集患者的流行病学信息。**结果** 成年组 IL-5、IL-4、IL-13、TSLP 分泌浓度分别为(19.50 ± 5.57) pg/ml、(0.95 ± 0.19) pg/ml、(475.30 ± 629.81) pg/ml、(16 676.67 ± 7 169.29) pg/ml;未成年组分别为(23.04 ± 3.37) pg/ml、(1.05 ± 0.19) pg/ml、(422.84 ± 539.48) pg/ml、(16 242.50 ± 6 230.81) pg/ml;对照组分别为(4.45 ± 0.84) pg/ml、(0.32 ± 0.12) pg/ml、(41.15 ± 11.72) pg/ml、(490.00 ± 123.36) pg/ml。IL-13、TSLP 在成年组、未成年组患者中升高,具有统计学意义($t = 1.27, P < 0.05$; $t = 3.11, P < 0.05$)。在有典型并殖吸虫病流行病学特征的未成年组中,IL-5 升高($t = 3.11, P < 0.01$),具有统计学意义;而在无典型症状的成年组中的变化无统计学意义($t = 1.52, P > 0.05$)。IL-4 在成年组、未成年组患者中均无统计学意义变化($t = 1.08, P > 0.05$; $t = 2.1, P > 0.05$)。**结论** 并殖吸虫病患者 Th2 免疫反应活化,IL-5、IL-13、TSLP 显著上调,可以作为潜在的诊断标志物进行下一步的研究筛选。

【关键词】 并殖吸虫病;细胞因子;诊断

Detection on serum levels of IL-5, IL-4, IL-13 and thymic stromal lymphopoietin in paragonimiasis patients WU Ma-li¹, TANG Li-na^{1*}, LI An-mei¹, XU Li-na¹, LIANG Yong-sheng¹, YUAN Zhi-bo², HE Guang-zhi³. ¹Guizhou Province Center of Disease Control and Prevention, Guiyang 550004, China ²the Research Center of Hangzhou Muliscience, Biotech, Hangzhou 310011, China ³the Chinese Medcial Institution of Guiyang, Guiyang 550002, China

* Corresponding author: TANG Li-na, Email: tanglina@163.com

Supported by the Governor Foundation of Excellent Science and Technological Education Talents of Guizhou Province(2010-91) and the Science and Technology Foundation of Guizhou Province ([2012]2210)

【Abstract】 Objective To investigate the cytokines including IL-5, IL-4, IL-13 and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) levels of Th2 immune response to *Paragonimus* infections, thus to find the potential biomarkers for clinical diagnosis on parasitic worms infections. **Methods** The sera of local paragonimiasis patients from adult (>18 years old) and juvenile (≤18 years old) group in Guizhou Province were collected, respectively. The concentration of IL-5, IL-4, IL-13 and TSLP was measured by ELISA and analyzed with independent sample *t* test among each patient group and control group. Simultaneously the epidemical data of patients were investigated. **Results** The concentration of IL-5, IL-4, IL-13 and TSLP in adult group was (9.50 ± 5.57) pg/ml, (0.95 ± 0.19) pg/ml, (475.30 ± 629.81) pg/ml and (16 676.67 ± 7 169.29) pg/ml, respectively while in juvenile group was (23.04 ± 3.37) pg/ml, (1.05 ± 0.19) pg/ml, (422.84 ± 539.48) pg/ml and (16 242.50 ± 6230.81) pg/ml, respectively. Meanwhile the concentration in control group was (4.45 ± 0.84) pg/ml, (0.32 ± 0.12) pg/ml, (41.15 ± 11.72) pg/ml, (490.00 ± 123.36) pg/ml, respectively. IL-13 and TSLP increased significantly in two patient groups ($t = 1.27, P < 0.05$; $t = 3.11, P < 0.05$). IL-5 increased significantly in juvenile with typical paragonimiasis epidemiology features ($t = 3.11,$

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2012.05.007

基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长基金项目(2010-91);贵州省科学技术基金([2012]2210)

作者单位:¹550004 贵阳,贵州省疾病预防控制中心;²310011 杭州,杭州联科生物研发中心;³550002 贵阳,贵阳中医学院

* 通信作者:唐莉娜,Email: tanglina@163.com

$P < 0.01$). On the contrary, IL-5 had no significant change in adults without typical symptoms ($t = 1.52$, $P > 0.05$). The variation of IL-4 in two patient groups had no statistical significance ($t = 1.08$, $P > 0.05$; $t = 2.1$, $P > 0.05$). **Conclusion** Th2 immune response was activated in paragonimiasis patients with significant up regulation of IL-5, IL-13, and TSLP. The cytokines are of worth to be further researched and screened as potential biomarkers.

【Key words】 Paragonimiasis; Cytokine; Diagnosis

并殖吸虫 (*Paragonimus*) 是一种人畜共患肠道蠕虫, 可感染猫、犬等野生哺乳动物, 广泛分布于亚洲、非洲及南美洲, 引起并殖吸虫病 (paragonimiasis), 又名肺吸虫病。2.93 亿人口受感染威胁, 儿童发病率最高, 患者年纪多在 10 ~ 14 周岁^[1]。据世界卫生组织 (WHO) 1995 年统计, 全世界有 2 000 万人感染。我国主要虫种为卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*) 和斯氏狸殖吸虫 (*Paragonimus skrjabini*), 而贵州省处于斯氏狸殖吸虫疫区。并殖吸虫是东亚地区常见食源性寄生虫, 最近的流行病学数据显示中国某些地区的发病率正在上升中^[2], 李安梅等^[3] 2007 年对贵州省 2 090 例寄生虫病住院病例进行回顾性调查分析, 结果显示并殖吸虫病例为 67 例 (占 3.21%), 仅次于蛔虫发病率。

并殖吸虫病常用临床检测方法主要有病原学检查、ELISA 检测患者血清或者胸腔积液抗体、粗抗原真皮内测试等^[4]。ELISA 是最常用的检测方式, 通常使用并殖吸虫粗抗原或部分提纯的抗原进行反应, 虽然有大量研究报道了不同的 ELISA 方法, 但是只有少量文献标准引起人们的注意, 各研究组常常使用自创的检测方法^[5]。同时, 全国临检领域对于该病的 ELISA 检测尚无统一行业标准, 因此检测结果只可作为临床诊断的参考, 不能凭此一项检测结果确诊, 必需借助于影像学、病理切片等其他更为准确的医学检验方法进行诊断; 此外, 不同种间吸虫的免疫交叉反应也是影响检测的重要因素^[6], 以上种种限制增加了检测结果的不确定性, 导致无法准确确诊并进行针对性治疗。解决上述问题应当着眼于开发更为特异、敏感的免疫分子诊断标志物。活化的 Th2 淋巴细胞亚群控制的细胞免疫反应是蠕虫感染的一个独有特征, 不同虫种具体调控情况不相同。感染后首先引发 Th2 细胞活化分泌各种细胞因子并激活相关效应细胞如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞等, 随后引发 B 淋巴细胞活化产生抗体 IgE、IgG1^[7-10]。从以上蠕虫免疫反应发生过程可以看出, Th2 细胞极化后最先分泌细胞因子, 且其分泌情况有种属差异性, 因此这些细胞因子较为敏感和特异, 故可以作为潜在的诊断标志物

进行筛选。

本研究选用 ELISA 研究贵州省本地感染并殖吸虫病例的细胞因子 IL-5、IL-4、IL-13、胸腺基质淋巴细胞生成素 (thymic stromal lymphopoietin, TSLP) 的水平, 筛查出具有潜在诊断价值的免疫分子, 为今后诊断试剂盒的开发提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 并殖吸虫病患者流行病学信息收集及血清准备

选取国内临检领域内推荐的行标珠海海泰生物公司生产的并殖吸虫 IgG 抗体试剂盒诊断阳性, 并结合流行病学调查信息筛选出的阳性患者 24 例, 其中未成年组 (≤ 18 岁) 12 例; 成年人组 (> 18 岁) 12 例, 以 4 例健康人血清作为阴性对照组。详细询问其流行病学史、记录临床症状和体征、影像学检查结果、感染时间、途径、地点信息。用普通生化管抽取感染患者 2 ml 全血, $1\ 476 \times g$ 离心 5 min 取上清于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.2 ELISA 检测

采用联科生物 IL-5、IL-4 试剂盒及华美生物 IL-13、TSLP 试剂盒进行检测, 检测步骤如下: 每孔加入 50 μl 样本稀释液, 再加入 50 μl 的标准品、样本或对照品。然后每孔加入 5 μl 检测抗体室温孵育 3 h。洗板后每孔加入 100 μl 辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素孵育 45 min。洗板后加入 100 μl 显色底物 TMB 孵育 10 ~ 30 min, 最后加入 100 μl 终止液终止反应, 检测 450 nm 的吸光度值 (A_{450})。根据标准品绘制标准曲线并计算直线回归方程 ($r > 99\%$)。以各样品所测 A_{450} 结合方程计算细胞因子浓度。

1.3 统计学分析

采用 SPSS17.0 独立样本 t 检验分别分析成年组和对照组间及未成年组和对照组的差异。首先, 对数据进行 Levene 方差齐性检验, 以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。随后, 进行均值方程的 t 检验, 根据第一

步所获 P 值选择相应 t 值及对应的 P 值, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为具有统计学意义, 结果以平均值 \pm 标准误表示。

2 结果

2.1 临床并殖吸虫病流行病学调查结果

如表 1 所示, 收集了 24 例患者的性别、年龄、主要症状、食蟹史等信息。从表中可以看出大约一半的患者均有胸水症状及食蟹史, 有 4 例患者有嗜酸性细胞病变症状, 未成年组大多具有包块症状, 这些主要症状和并殖吸虫病的临床表现一致。而流行病学史不详的病例不能排除无食蟹史, 因为很多未成年患者难以清晰准确表述自己是否有食用行为, 因而出现不详或无。而很多成年患者自身的饮

食习惯比较随意, 对食物是否生熟并不关注, 所以回答也以不详为主。在成年患者中甚至产生一些错误的饮食习惯, 例如以食用溪蟹来治疗风湿和肺结核等疾病, 因此即便是询问成年患者的流行病学信息时, 所获记录也难以确保绝对准确无误。

2.2 IL-5、IL-4、IL-13、TSLP 变化水平

并殖吸虫病成年组 IL-13、TSLP 独立样本 t 检验结果有统计学意义 ($t = 1.29, P < 0.05; t = 1.274, P < 0.05$), 未成年组 IL-5、IL-13、TSLP 独立样本检验结果有统计学意义 ($t = 3.11, P < 0.01; t = 1.27, P < 0.05; t = 3.11, P < 0.05$), 成年组未成年组的 IL-4 ($t = 1.08, P > 0.05; t = 2.1, P > 0.05$) 及成年组中的 IL-5 ($t = 1.52, P > 0.05$) 变化无统计学意义。

表 1 1 并殖吸虫病流行病学调查
Table 1 The epidemic investigation on paragonimiasis patients

组别 Group	例数 n	年龄 Age	男女比例 Male: female	主要症状 Typical symptoms	食蟹史 Crab-eating
成年组 Adult	12	19 ~ 71	7: 5	6 例为胸水, 3 例或咳血或嗜酸性细胞升高、脓肿, 1 例头部异物、1 例面部包块, 1 例肝右叶占位。	7 例不详, 3 例或因为饮食习惯或为治病生食溪蟹, 1 例可能食用过, 1 例自述 2007 年食用过。
未成年组 Juvenile	12	4 ~ 18	11: 1	10 例为胸水、腹水、腰腹部包块。1 例头痛, 嗜酸性细胞增高。1 例多器官功能障碍、浮肿。	4 例确定生食过溪蟹, 4 例自述无食蟹史, 4 例自述不详。

表 2 IL-5、IL-4、IL-13、胸腺基质淋巴细胞生成素分泌水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The statistical results of detection on levels of IL-5, IL-4, IL-13 and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	样本数 n	IL-5 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)	TSLP (pg/ml)
成年组 Adult	12	19.50 \pm 5.57 ^a	0.95 \pm 0.33 ^a	1 475.30 \pm 629.81 ^b	16 676.67 \pm 7 169.29 ^b
未成年组 Juvenile	12	23.04 \pm 3.37 ^c	1.05 \pm 0.19 ^a	1 422.84 \pm 539.48 ^b	16 242.50 \pm 6 230.81 ^b
对照组 Control	4	4.45 \pm 0.84	0.32 \pm 0.12	41.15 \pm 11.72	490.00 \pm 123.36

a: 与对照组比较 $P > 0.05$, b: 与对照组比较 $P < 0.05$, c: 与对照组比较 $P < 0.01$

a: $P > 0.05$ in comparison with control group, b: $P < 0.05$ in comparison with control group, c: $P < 0.01$ comparison with control group

3 讨论

近年来蠕虫细胞免疫学调节研究十分活跃, 研究表明这些反应涉及细胞因子和 IgE 的产生及效应细胞的扩展和活化。国际上已经普遍接受的理论是该类反应都是由辅助性 T 向 Th2 极化引起的^[8], 鼠类动物模型表明针对肠道蠕虫感染 Th2 免疫反应必不可少^[9], 它产生白介素 IL-4、IL-9、IL-10、IL-13、IL-5、IL-21 等^[9,11-12]。宿主感染蠕虫以后, 通常无症状, 大部分宿主能忍受其作为一个正常的病原

存在而无病变, 病理学变化更多地与增高的细胞免疫学变化有关^[9]。典型的如嗜酸性粒细胞在健康人中通常占 2% ~ 4%, 而在感染患者中会上升至 40%^[13]。嗜酸性粒细胞现在被假定为引发 Th2 反应的主要细胞之一, 分泌多种细胞因子和趋化因子, IL-5 即来源于它^[14]。IL-5 促进嗜酸性粒细胞上升, 介导其从骨髓中释放^[15-16], 趋化因子 CCL11、CCL5、IL-5 是其在肺部募集涉及的最主要分子^[17-18], 蠕虫感染诱导的嗜酸性粒细胞需要 IL-

5^[19]。IL-13 具有驱逐多回卷虫属 (*Heligmosomoides polygyrus bakeri*) 或者巴西钩虫 (*Nippostrongylus brasiliensis*) 的作用^[20]。IL-4、IL-13 来源于先天的或在宿主间质细胞上适应的 Th2 细胞, 它们的活化导致了宿主对成虫的驱逐^[11]。TSLP 对 Th2 的作用调节并不是必需的, 在不同虫种感染里所起的作用不同。在巴西钩虫和多回卷虫属感染者中即使没有 TSLP, 依然产生 Th2 应答^[21]; 但在鼠鞭虫 (*Trichuris muris*) 感染者中却需要 TSLP 介导 IL-12 的产生, 进而引导 Th2 应答发生^[22]。本研究根据并殖吸虫病儿童发病率最高的流行病学特点, 同时充分考虑到成年患者和未成年患者群体的免疫应答可能的差异, 针对性分组研究患者血清细胞因子, 目前所获结果证明它们的变化不完全一致。对 24 例本地感染贵州省并殖吸虫虫种的患者血清细胞因子研究表明, 斯氏狸殖吸虫的 Th2 反应涉及信号分子有其独特特点: IL-13、TSLP 显著上调, IL-5 只在喜欢食用半生不熟溪蟹、且其大部分都有典型的寄生虫包块症状的未成年患者中普遍升高, 这一点和周艳梅等^[23]观察到的 89 例患儿临床病例治疗前 IL-5 显著上升, 治疗 3 疗程后显著下降相同, 但认为 IL-5 水平可以作为判断并殖吸虫病患者发病及疗效判定的指标却值得商榷, 因为 IL-5 在一般不食用溪蟹、无典型斯氏狸殖吸虫包块的成年患者中变化不显著。应该修正为对具备典型斯氏狸殖吸虫感染流行病学的未成年患者而言, IL-5 具有较好的临床诊断应用价值, 是一个潜在的诊断标志物, 但对成年患者却不能以此为诊断依据。IL-4 变化不显著, 而 IL-13 变化显著, 或许和两者所起作用一致, 故其中之一上升就可能激活有关信号通路。对 Th2 反应起调控作用的 TSLP 在并殖吸虫感染中被检测到变化, 证实了 TSLP 的调控是必需的。综上所述, 研究结果充分说明不同虫种 Th2 反应具体情况虽有相同之处, 但细胞因子种类及变化相差较大, 应该进一步研究其他种类的细胞因子、不同感染时期的细胞因子变化及易引起交叉反应的吸虫虫种感染后细胞因子的变化。同时, 要最终确诊还需结合流行病学信息及多种检测手段, 不能单纯以一项指标为判断标准。总之, IL-13、TSLP 可作为潜在的诊断候选标志物进行进一步研究, 而 IL-5 则要限于未成年患者的研究。

参 考 文 献

- [1] WHO. Control of Food-borne trematode infections [R]. WHO Tech Rep Ser, 1995: 849.
- [2] Liu Q, Wei F, Liu W, et al. Paragonimiasis: an important food-borne zoonosis in China [J]. Trends Parasitol, 2008, 24 (7): 318-323.
- [3] 李安梅, 陈兆义, 唐莉娜, 等. 贵州省 2090 例寄生虫住院病例回顾性调查与分析 [J]. 热带病与寄生虫学, 2006, 5 (2): 88-89.
- [4] 郑晓燕, 阴赫宏, 谷俊朝. 并殖吸虫病诊治研究进展 [J]. 中国病原生物学志, 2009, 14 (3): 236-239.
- [5] Blair D, Agatsuma T, Wang W. World class parasites [M]. New York: Springer, 2007, 11 (1): 117-150.
- [6] 王光西. 肺吸虫抗原研究进展 [J]. 实用寄生虫病杂志, 2002, 10 (2): 80-84.
- [7] Hewitton JP, Grainger JR, Maizels RM. Helminth immunoregulation; The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity [J]. Mol Biol Parasitol, 2009, 167 (1): 1-11.
- [8] Maizels RM, Pearce EJ, Artis D, et al. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections [J]. J Exp Med, 2009, 206 (10): 2059-2066.
- [9] Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobarn N, et al. Helminth parasites-master of regulation [J]. Immunolo Rev, 2004, 201 (1): 89-116.
- [10] Harris N, William CG. B cell function in the immune response to helminthes [J], Trends Immunol, 2011, 32 (2): 80-88.
- [11] Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, et al. Interleukin-4 and interleukin - 13-mediated host protection against intestinal nematode parasites [J]. Immunol Rev, 2004, 201 (1): 139-155.
- [12] Frohlich A, Marsland BJ, Sonderegger I, et al. IL-21 receptor signaling is integral to the development of Th2 effector responses in vivo [J]. Blood, 2007, 109 (5): 2023-2031.
- [13] Reimert CM, Fitzsimmons CM, Joseph S, et al. Eosinophil activity in *Schistosoma mansoni* infections in vivo and in vitro in relation to plasma cytokine profile pre- and post-treatment with praziquantel [J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13 (5): 584-593.
- [14] Cadman ET, Lawrence RA. Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection [J]? Parasite Immunol, 2010, 32 (1): 1-19.
- [15] Tominaga A, Takaki S, Koyama N, et al. Transgenic mice expressing a B cell growth and differentiation factor gene (interleukin 5) develop eosinophilia and autoantibody production [J]. J Exp Med, 1991, 173 (2): 429-437.
- [16] Mould AW, Matthaei KI, Young IG, et al. Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice [J]. J Clin Invest, 1997, 99 (5): 1064-1071.
- [17] Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, et al. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness [J]. J Exp Med, 1998, 188 (1): 157-167.
- [18] Mould AW, Ramsay AJ, Matthaei KI, et al. The effect of IL-5 and eotaxin expression in the lung on eosinophil trafficking and degranulation and the induction of bronchial hyperreactivity [J]. J Immunol, 2000, 164 (4): 2142-2150.
- [19] Knott ML, Matthaei KI, Giacomini PR, et al. Impaired resistance in early secondary *Nippostrongylus brasiliensis* infections in mice with defective eosinophilopoiesis [J]. Intern J Parasitol, 2007, 37 (12): 1367-1378.
- [1] WHO. Control of Food-borne trematode infections [R]. WHO

- [20] Harris NL. Advances in helminth immunology: optimism for future vaccine design[J]. Trends Parasitol, 2011, 27 (7): 288-293.
- [21] Ramalingam TR, Pesce JT, Mentink-Kane MM, et al. Regulation of helminth-induced Th2 responses by thymic stromal lymphopoietin[J]. J Immunol, 2009, 182 (10): 6452-6459.
- [22] Taylor BC, Zaph C, Troy AE, et al. TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis[J]. J Exp Med, 2009, 206 (3): 655-667.
- [23] 周艳梅,王小菊,董继萍,等. 肺吸虫患儿血清 Eotaxin、IL-5 水平测定及其临床意义[J]. 实用医学杂志, 2004, 20(12): 1377-1378.

(收稿日期:2012-05-30)

(本文编辑:王吉鹏,陈勤)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对数字用法的规定

本刊执行 GB/T 15835 - 1995《出版物上数字用法的规定》。公历世纪、年代、年、月、日、时刻和计数、计量等均用阿拉伯数字。如:20 世纪 80 年代、1994 年 10 月 1 日。年份一般不用缩写,如:1990 年不能简作“九〇年”或“90 年”。从小数点起,向左和向右每三位数字一组,组间空 1/4 个汉字空,如:2 748 456, 3. 141 592 65。部队番号、文件编号、证件号码和其他序号用阿拉伯数字但每三位数间不留空。百分数的范围和偏差,前一个数字的百分符号不能省略,如 6% ~ 90% 不能写成 6 ~ 90%, (50.5 ± 0.6)% 不能写成 50.5 ± 0.6%, 带有尺寸单位的数值相乘,按下列方式书写:3 cm × 4 cm × 5 cm, 不能写成 3 × 4 × 5 cm³。统计表中同一指标下的数值,小数点后的有效位数要一致。

本刊编辑部