

## 红内期间日疟原虫浓集纯化及免疫反应性研究

胡守锋<sup>1</sup>, 陶志勇<sup>2</sup>, 夏 惠<sup>1</sup>, 高 琪<sup>3</sup>, 胡开明<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的: 建立白细胞滤器(Plasmodipur)联合 Percoll 密度梯度离心浓集纯化红内期间日疟原虫(*P. v*)的方法。分析和比较皂素与冻融两种处理方法制备的 *P. v* 抗原与 *P. v* 感染者混合血清免疫反应性的差别。方法: *P. v* 感染者血样, 用 Plasmodipur 滤器分离去除白细胞, 经 60% Percoll 浓集其中的感染红细胞(iRBC)。采用皂素法和冻融法从 iRBC 中释放疟原虫, 经超声粉碎, 所获 *P. v* 可溶性抗原和同样处理的正常红细胞(nRBC)成分经 SDS-PAGE 电泳分析其组分差别, 并应用 *P. v* 感染者、正常对照混合血清与相应的抗原进行免疫印迹分析, 确定具有免疫原性的抗原组分。结果: 115 例 *P. v* 感染者血样, 用 Plasmodipur 滤器分离去除白细胞, 每 10 个油镜视野中 WBC 残留  $\leq 5$  个 99 例(86.1%), 经 60% Percoll 浓集的 35 例样本中, 共有 30 例(85.7%)能提高 iRBC 比例至 60% 以上。SDS-PAGE 电泳分析, 皂素处理与冻融处理的 *P. v* 抗原分别显示出 6 条和 2 条 *P. v* 特异性蛋白条带。免疫印迹分析表明, *P. v* 感染者混合血清能特异性地识别 22、24、5、29、35、36 kDa 皂素处理的 *P. v* 抗原, 26、49、59、63、115、120 kDa 冻融处理的 *P. v* 抗原。结论: 血样中疟原虫皂素与冻融两种处理方法制备的 *P. v* 抗原与 *P. v* 感染者混合血清免疫反应性存在明显差异, 其中皂素处理的 22 kDa 抗原组分具有较强的免疫原性, 其作为 *P. v* 特异性诊断抗原的价值有待进一步研究。

**[关键词]** 间日, 疟原虫; 红内期抗原; 免疫反应性; 浓集纯化

[中国图书资料分类法分类号] R 382.31 [文献标识码] A

### Study on purification and immunoreactivity of erythrocytic stage *Plasmodium vivax*

HU Shou-feng<sup>1</sup>, TAO Zhi-yong<sup>2</sup>, XIA Hui<sup>1</sup>, GAO Qi<sup>3</sup>, HU Kai-ming<sup>1</sup>

(1. Department of Microbiology and Parasitology, Bengbu Medical College, Infection and Immunity at Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030; 2. Department of Microbiology and Parasitology, Suzhou University, Suzhou Jiangsu 215006; 3. Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi Jiangsu, 210064, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method of concentration and purification of erythrocytic stage *Plasmodium vivax* (*P. v*) by using combined WBC filtration and Percoll density centrifugation, and compare and analyze the immunoreactivity difference between infected RBC (iRBC) and normal RBC (nRBC) antigens prepared by saponin lysis and freeze-thawing by using pooled sera from *P. v* patients and normal controls. **Methods:** Leukocytes were removed by Plasmodipur filter from *P. v* patients' blood, iRBC was concentrated by 60% Percoll density gradient. Parasites were released by two methods: saponin lysis or freeze-thawing from iRBC. After sonication, *P. v* and nRBC soluble antigens which were prepared by the same method were compared by SDS-PAGE. Specific *P. v* antigen bands were defined by immunoblotting, pooled sera from *P. v* patients and normal controls were used as primary antibody to recognize *P. v* and nRBC antigen strip. **Results:** Ninety-nine of 115 (86.1%) *P. v* infected blood samples filtrated by Plasmodipur filter to remove leukocytes and retained RBC reached an acceptable level ( $\leq 5/10$  oil immersion field). Thirty-five WBC free samples were concentrated by 60% Percoll, and the iRBC percentage of 30 cases were raised over 60%. By SDS-PAGE analysis, there were 6 and 2 specific bands found in saponin lysis and freeze-thawing treatment *P. v* soluble antigens respectively. Immunoblotting analysis were showed that pooled *P. v* patients' sera can specifically recognized 22, 24, 5, 29, 35, 36 kDa bands from saponin lysis treatment and 26, 49, 59, 63, 115, 120 kDa bands from freeze-thawing treatment *P. v* soluble antigens. Combined using of Plasmodipur filter and 60% Percoll demonstrated of high efficiency in removing WBC and concentrating iRBC from *P. v* infected blood. **Conclusions:** There was a significant immunoreactivity difference between *P. v* soluble antigens prepared by saponin lysis and freeze-thawing treatment through using pooled *P. v* patients' sera. Twenty-two kDa *P. v* antigen prepared by saponin lysis treatment showed high immunoreactivity, it needs further study to evaluate its diagnostic usage.

**[Key words]** *Plasmodium vivax*; erythrocytic stage antigen; immunoreactivity; concentration and purification

[收稿日期] 2009-04-06

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2006kj34413)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 病原生物学教研室, 安徽省感染与免疫重点实验室, 安徽 蚌埠 233030; 2. 苏州大学医学院 病原生物学教研室, 江苏 苏州 215006; 3. 江苏省血吸虫病防治研究所, 江苏 无锡 210004

[作者简介] 胡守锋(1962-), 男, 实验师。

[通讯作者] 夏 惠, 研究生导师, 教授。

疟疾是严重危害人类健康的寄生虫病, 世界范围内流行, 我国也深受疟疾的危害, 发病以间日疟为主。建国以来, 我国疟防工作取得了巨大成就, 但近几年来, 局部地区疟疾疫情有所回升, 尤其是皖北地区, 间日疟流行情况严重<sup>[1]</sup>。因此, 加强对间日疟的研究, 是新形势下疟疾防治工作的迫切需要。疟原虫入侵人体后经历红细胞外期和红细胞内期的裂

体增殖发育,致病的同时诱导人体产生抗疟原虫感染的特异性免疫力,疟疾发作时机体内已存在高滴度特异抗体 IgG、IgA、IgM<sup>[2]</sup>。疟原虫抗原诱导机体产生的免疫力,既有虫种、株特异性,也有期特异性。深入了解疟原虫抗原及其免疫反应性,寻找敏感、特异的诊断抗原,对开发免疫诊断试剂具有重要意义。本研究通过联合使用 Plasmodipur 滤器和 60% Percoll 密度梯度离心,分离和浓集感染者血样中的间日疟原虫感染红细胞(iRBC),采用皂素和冻融两种处理方法制备间日疟原虫(*Plasmodium vivax*, *P. v*)可溶性抗原,应用 SDS-PAGE 分析 *P. v* 抗原与正常红细胞(nRBC)的差别,免疫印迹法分析 *P. v* 抗原免疫反应性的特征,为寻找有效的红内期 *P. v* 特异性抗原提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 样本 *P. v* 感染血样由蚌埠市周边区、县医院检验科采集送检,由本室保存;nRBC 由蚌埠市中心血库提供;正常对照血清来自我校新入学非疫区健康体检学生。

1.2 Plasmodipur 滤器 EURO Diagnostica 产品,由泰国 Mohidol 大学 Udomsangpetch 教授惠赠。

1.3 主要试剂和设备 HRP 标记羊抗人 IgG(H + L)(北京中杉金桥生物有限公司产品);皂素(Sigma 公司产品);DAB(博士德公司产品);PageRuler™ 蛋白分子量标准品、(Fermentas 公司产品)。TGL-16G 台式高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);核酸蛋白分析仪,Mini PROTEAN 3 Cell 电泳槽(美国 BIO-RAD);DYY-7B 电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.4 *P. v* 可溶性抗原制备 (1) *P. v* iRBC 分离浓集。*P. v* 感染者静脉血经肝素抗凝后离心,血浆置 -20℃ 冰箱保存备用,压积 RBC 用 RPMI 1640 配制成约 25% 的 RBC 悬液,通过 Plasmodipur 滤器,取 RBC 滤液涂厚片,吉姆萨染色,镜检。WBC 过滤效果好(≤5 个/10 个油镜视野)的血样调整压积为 20%,加在等体积 60% Percoll 液面上,2 500 r/min 离心 20 min,小心吸取交界层 iRBC,PBS 洗涤 2 次,放置 -80℃ 冰箱备用<sup>[3]</sup>。(2)皂素处理。取前述感染血样,加 10 倍体积的 0.1% 皂素生理盐水,轻轻混匀,室温放置 1 min,4℃ 10 000 ×g 离心 15 min,弃上清,用 5 倍体积的 PBS 混匀,4℃ 10 000 ×g 离心 15 min,弃上清,按此方法重复洗涤 3~4 次,直到上清液无色透明为止。以上操作均在冰面上进行,所获得的棕黑色沉淀即为纯化的 *P. v* 颗粒抗原<sup>[4]</sup>。(3)冻融处理。感染血样经 -80℃ 冷冻

30 min,40℃ 水浴解冻,反复冻融 3 次,洗涤步骤同前。(4) *P. v* 可溶性抗原的制备。取经不同处理方法纯化的 *P. v* 颗粒抗原,冰浴条件下超声处理,设置电压 450 V,共超声粉碎 15 次,每次 20 s,间隔 90 s,离心,上清即为 *P. v* 可溶性抗原,经核酸蛋白分析仪测蛋白质含量,置 -80℃ 冰箱备用<sup>[5]</sup>。(5) nRBC 可溶性抗原的制备。nRBC 经 Plasmodipur 滤器滤除白细胞,皂素和冻融处理同 *P. v* 可溶性抗原。(6) SDS-PAGE 电泳。参照 Laemmli 方法,分离胶浓度为 12%,积层胶浓度为 5%<sup>[6]</sup>。样品蛋白上样量为每泳道 48 μg,同时加 PageRuler™ 蛋白分子量标准品,蛋白分子量计算按文献<sup>[7]</sup>。(7)免疫印迹。SDS-PAGE 同(6),转印条件为稳流 350 mA,电泳 1.5 h。取下 NC 膜,用丽春红 S 染色 10 min,适度洗膜,将各泳道切成 4 条,标记后,用 pH 7.5 的 5% 脱脂奶粉-TBS 封闭,将膜条按 *P. v* 皂素处理、*P. v* 冻融处理、nRBC 皂素处理、nRBC 冻融处理分组,一抗按 1:40 *P. v* 感染者混合血清、1:40 正常对照混合血清分组,分别进行反应,二抗为 1:1 000 稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG,DAB 显色,用扫描仪扫描后保存结果<sup>[8]</sup>。

## 2 结果

2.1 Plasmodipur 滤过 WBC 结果 115 例 *P. v* 感染血样经 Plasmodipur 过滤,厚涂片法检查,每 10 个油镜视野中 WBC 残留 <1 个 47 例(40.8%),1~5 个 52 例(45.2%),>5 个 16 例(14.0%)。

2.2 60% Percoll 浓集 iRBC 结果 35 例过滤后 WBC 残留 ≤5 个/10 个油镜视野的感染血样本,经 60% Percoll 浓集 iRBC 后原虫密度 <60% 5 例(14.3%),≥60% ~ <90% 17 例(48.6%),≥90% 例 13 例(37.1%)。

2.3 *P. v* SDS-PAGE 电泳分析 (1)皂素处理组:皂素处理的 *P. v* 抗原,经 SDS-PAGE 分析显示 12 条主带,同样处理的 nRBC 显示 16 条主带。比较显示,皂素处理 *P. v* 抗原特异性主带有 29、36、39、63 和 72 kDa(见图 1)。(2)冻融处理组:冻融处理的 *P. v* 抗原,经 SDS-PAGE 分析,显示 10 条主带,同样处理的 nRBC 显示 14 条主带。比较显示,冻融处理 *P. v* 抗原特异性主带有 29 和 65 kDa(见图 2)。

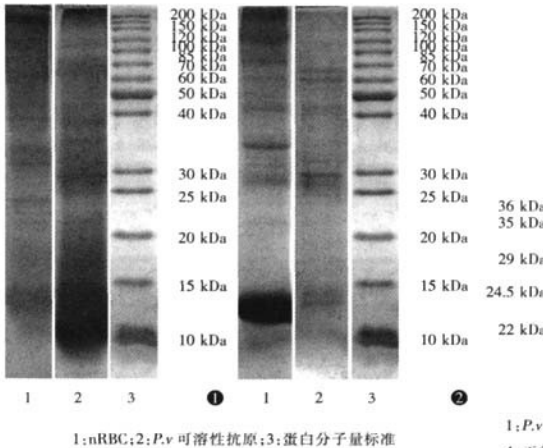
2.4 *P. v* 免疫印迹分析 (1)皂素处理组免疫印迹结果显示,*P. v* 感染者混合血清能特异性识别 22、24.5、29、35 和 36 kDa *P. v* 抗原(见表 1 和图 3)。(2)冻融处理组免疫印迹结果显示,*P. v* 感染者混合血清能特异性识别 26、49、59、63、115 和 120 kDa *P. v* 抗原(见表 2 和图 4)。

表 1 皂素处理的 *P. v.*、nRBC 抗原免疫印迹结果

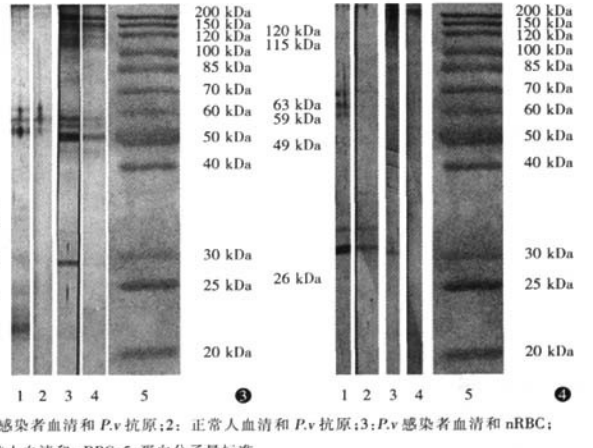
| 检测血清             | 皂素处理抗原       | 阳性带数 | 阳性条带分子量 (kDa)                                |
|------------------|--------------|------|--|
| <i>P. v.</i> 感染者 | <i>P. v.</i> | 9    | 22, 24.5, 29, 35, 36, 53, 59, 62, 280        |
| 正常对照             | <i>P. v.</i> | 3    | 53, 59, 62                                   |
| <i>P. v.</i> 感染者 | nRBC         | 10   | 28, 50, 55, 59, 105, 115, 125, 160, 200, 280 |
| 正常对照             | nRBC         | 7    | 50, 55, 59, 125, 160, 200, 280               |

表 2 冻融处理组免疫印迹结果

| 检测血清             | 冻融处理抗原       | 阳性带数 | 阳性条带分子量 (kDa)                             |
|------------------|--------------|------|---|
| <i>P. v.</i> 感染者 | <i>P. v.</i> | 10   | 26, 31, 33, 49, 59, 63, 70, 115, 120, 280 |
| 正常对照             | <i>P. v.</i> | 4    | 31, 33, 70, 280                           |
| <i>P. v.</i> 感染者 | nRBC         | 5    | 31, 125, 140, 220, 240                    |
| 正常对照             | nRBC         | 3    | 31, 220, 240                              |



1: nRBC; 2: *P. v.* 可溶性抗原; 3: 蛋白分子量标准



1: *P. v.* 感染者血清和 *P. v.* 抗原; 2: 正常人血清和 *P. v.* 抗原; 3: *P. v.* 感染者血清和 nRBC; 4: 正常人血清和 nRBC; 5: 蛋白分子量标准

图 1 皂素处理的 *P. v.* 抗原与 nRBC SDS-PAGE 结果 图 2 冻融处理的 *P. v.* 抗原与 nRBC SDS-PAGE 结果  
图 3 皂素处理组免疫印迹结果 图 4 冻融处理组免疫印迹结果

3 讨论

在红内期 *P. v.* 抗原研究中, 抗原的分离和纯化一直是难以突破的瓶颈。Plasmodipur 滤器可以有效地除去感染血中的 WBC, 且该法对 iRBC 的回收率高, 克服了纤维素柱法滤过 WBC 效果差又容易截留成熟阶段 iRBC 的不足<sup>[9]</sup>, 较好地解决了感染血样浓集 *P. v.* 过程中 WBC 的残留问题。Plasmodipur 滤器和 60% Percoll 联合应用, 能快速、有效地分离和浓集间 *P. v.* iRBC, 确保获得足量、高纯度、有活性的红内期 *P. v.*, 为抗原制备提供更为优质的实验材料。

从 RBC 内释放疟原虫的方法很多, 由于疟原虫寄生于 iRBC 的纳虫空泡内, 被两层生物膜及 RBC 骨架所包裹, 各法均不能将虫体彻底地释放出来, 或多或少残留有 RBC 成分<sup>[10]</sup>。皂素和冻融处理法是从 iRBC 中释放疟原虫最常用的两种方法。皂素是一种非离子型的表面活性剂, 能使 iRBC 膜的渗透性增加, 胞内血红蛋白等内容物可以自由通过, 而纳虫空泡膜相对保持完整, 形成被 RBC 膜残留物、细胞骨架和纳虫空泡膜包裹的疟原虫虫体<sup>[11]</sup>。

*P. v.* 抗原和 nRBC 经 SDS-PAGE 比较分析显示, 皂素处理和冻融处理后的 *P. v.* 抗原组分既有共同部分, 也有不同的部分。免疫印迹分析进一步显示, 两

种方法所制备出来的 *P. v.* 抗原, 其组分存在较大差异。其可能为: 皂素处理 iRBC 时, 皂素的表面活性作用除洗脱大量的 RBC 整膜蛋白外, 同样会洗脱掉疟原虫表达在 RBC 表面的蛋白, 造成部分 *P. v.* 抗原组分缺失。冻融法处理 iRBC, 能使 RBC 溶血, 内容物外渗, 这种方法制备 *P. v.* 抗原, 完整地保留了疟原虫来源的膜蛋白及 RBC 自身膜成分。文献报道<sup>[12]</sup>, 用冻融的方法处理伯氏疟原虫, 历经一次冻融循环, 大约有 35% ~ 40% 的虫体蛋白溶出。可见冻融处理会损伤胞内寄生的疟原虫虫体, 致使其内容物在洗涤过程中被洗脱, 亦造成部分疟原虫抗原组分损失。

皂素处理组 SDS-PAGE 和感染者血清免疫印迹检出的 *P. v.* 特异性条带差别提示, 部分对人具有免疫原性的 *P. v.* 抗原组分含量较低, 不能被考马斯亮蓝染料很好地染色, 而 SDS-PAGE 电泳分析显示的具有特异性的 *P. v.* 组分, 虽然含量相对较高, 但不能诱导机体产生相应的 IgG 类抗体。免疫印迹试验显示 22 kDa 具有 *P. v.* 特异性, 而 PAGE 分析中, *P. v.* 抗原和 nRBC 均出现 22 kDa 带, 分析认为 22 kDa 蛋白组分不纯, 既有 *P. v.* 成分, 又有 nRBC 成分, 其中的 *P. v.* 特异性抗原组分含量虽然未知, 但具有较强的免疫原性, 能诱导机体产生较强的免疫应答, 在免疫印迹试验中呈强阳性反应, 能否作为诊断抗原, 有待进一步研究。

[文章编号] 1000-2200(2009)08-0656-03

· 基础医学 ·

## PTEN、Rb 基因蛋白在乳腺癌中的表达及其意义

刘德纯, 赵云霞, 承泽农

**[摘要]** **目的:**探讨张力蛋白同源物磷酸酯酶(PTEN)、视网膜母细胞瘤(Rb)基因蛋白异常表达在乳腺癌发生、发展中的作用及其意义。**方法:**应用免疫组织化学 S-P 法检测 PTEN、Rb 基因蛋白在 150 例乳腺癌标本及 30 例乳腺良性增生性病变中的表达,并分析其异常表达与乳腺癌若干临床病理参数的关系。**结果:**PTEN、Rb 基因蛋白在乳腺癌组与乳腺良性病变组异常表达差异均有统计学意义( $P < 0.005$ )。PTEN 基因蛋白的失表达与乳腺癌淋巴结转移、雌激素受体(ER)失表达有一定关系( $P < 0.05$ )。Rb 基因蛋白的失表达与各临床病理参数均无关,只是在乳腺癌Ⅲ级中失表达率较高。ER 的表达与 Rb 蛋白的表达具有相关性( $P < 0.05$ )。**结论:**PTEN、Rb 基因蛋白在乳腺良性病变中有很高的表达率,在乳腺癌中表达率下降,表明其肿瘤抑制功能丧失,促进细胞的肿瘤性转化。PTEN 蛋白的表达与淋巴结转移、ER 失表达相关,对乳腺癌的预后判断有参考价值。

**[关键词]** 乳腺肿瘤;免疫组织化学;张力蛋白同源物磷酸酯酶;视网膜细胞瘤

**[中国图书资料分类法分类号]** R 737.9 **[文献标识码]** A

### Significance of expressions of PTEN and Rb gene proteins in breast cancer

LIU De-chun, ZHAO Yun-xia, CHENG Ze-nong

(Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the role and significance of abnormal expressions of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) and retinoblastoma (Rb) gene in the development of breast cancer. **Methods:** Immunohistochemical technique (S-P method) was used for detection of PTEN and Rb gene proteins in 150 cases of breast cancer and 30 cases of mammary benign proliferative lesions. The results were analyzed and compared with some clinicopathological parameters. **Results:** The protein expression levels of PTEN and Rb in breast cancer were significantly lower than those in benign proliferative lesions ( $P < 0.005$ ). Loss of expression of PTEN protein was obviously related to lymph nodes metastasis and the loss of expression of estrogen receptor ( $P < 0.05$ ). Loss of expression of Rb protein was not related to the clinicopathological parameters except the loss rate of expression was higher in grade III. The positive association was found between the expressions of PTEN and Rb proteins ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** Expression rates of anti-oncogenes PTEN and Rb proteins are higher in benign proliferative lesions and decrease in breast cancer. The loss of inhibiting function of anti-oncogenes PTEN and Rb results in neoplastic transformation. Expression of PTEN relates to lymph nodes metastasis and the loss of expression of estrogen receptor, which shows a certain reference value to judge the prognosis of breast cancer.

**[Key words]** breast neoplasmas; immunohistochemistry; PTEN; Rb

[收稿日期] 2008-12-12

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金资助项目(2004kj277)

[作者单位] 蚌埠医学院 病理学教研室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 刘德纯(1946-),男,教授。

抑癌基因是正常细胞内能抑制细胞生长的基因,其功能的丧失意味着对细胞过度增殖失去控制,并可促进细胞的肿瘤性转化。近年发现一些抑癌基因与乳腺癌的发生、发展有关,如10号染色体缺失

### 【参 考 文 献】

- [1] 中华人民共和国卫生部. 2006~2015年全国重点寄生虫病防治规划[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2006, 13(11): 1-3.
- [2] Cohen S, McGregor IA, Carrington S.  $\gamma$ -globulin and acquired immunity to human malaria[J]. Nature, 1961, 192: 733-737.
- [3] Trang DT, Huy NT, Kariu T, et al. One-step concentration of malarial parasite-infected red blood cells and removal of contaminating white blood cells[J]. Malar J, 2004, 3: 7.
- [4] Zuckerman A, Spira D, Hamburger J. A procedure for the harvesting of mammalian plasmodia[J]. Bull World Health Organ, 1967, 37(3): 431-436.
- [5] 肖建华, 杨秋林主编. 分子寄生虫学实验指南[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2004: 12.
- [6] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [7] 郭尧君. 蛋白质电泳技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 128-131.
- [8] 萨姆布鲁克 J 著. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 金冬雁译. 北京: 科学出版社, 1992: 894-898.
- [9] Janse CJ, Camargo A, Del Portillo HA, et al. Removal of leucocytes from Plasmodium vivax-infected blood[J]. Ann Trop Med Parasitol, 1994, 88(2): 213-216.
- [10] Wernsdorfer WH. 疟疾学(上)[M]//王 钊编译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1992: 175-188.
- [11] Kirk K. Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte[J]. Physiol Rev, 2001, 81(2): 495-537.
- [12] Grothaus GD, Kreier JP. Isolation of a soluble component of Plasmodium berghei which induces immunity in rats[J]. Infect Immun, 1980, 28(1): 245-253.