

卫氏并殖吸虫二、三倍体型的定种研究

柳建发¹, 廖 奇¹, 蒋雯雯¹, 张劭楠², 胡奇丰¹

(1. 宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波市疾病预防控制中心, 浙江 宁波 315010)

摘要: 卫氏并殖吸虫是人体并殖吸虫病的主要病原体, 是浙江省高发的寄生虫病之一。迄今发现卫氏并殖吸虫可分为二倍体和三倍体 2 种类型, 关于它的定种研究, 学术界一直存在争议。笔者试从该吸虫形态变化、蛋白质异同、同工酶谱改变、染色体差异和寄主适应性变异等几个方面, 比较 2 种类型之间的区别, 为两型肺吸虫定种的地位确定提供理论依据。

关键词: 卫氏并殖吸虫; 二倍体型; 三倍体型

中图分类号: R383.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2013) 03-0123-04

并殖吸虫病是一种重要的人兽共患病, 流行于亚洲、非洲和美洲 25 个国家。在全球报告的 50 个种群中, 卫氏并殖吸虫发现早, 分布广泛, 而且其是人体最主要的致病虫种, 故普遍地引以关注。从其发现起至今, 已百余年, 但是有关虫种的定位问题尚不一致。其中, 20 世纪 70 年代, 日本学者对并殖吸虫检测时, 发现卫氏并殖吸虫存在二、三倍体($2n=22$, $3n=33$) 2 种类型, 经著名寄生虫学家 Miyazaki (宫崎一郎) 收集全球标本检测比较, 发现这两型虽然在囊蚴、虫体和虫卵形态上极为相似, 但在大小上差别明显, 加上二倍体型虫体具精子, 三倍体型无; 二倍体型行交配生殖, 而三倍体型为孤雌生殖; 对人体致病性也存在三倍体型明显强于二倍体型; 在数量上二倍体型广泛分布, 而三倍体型仅发现于日本、韩国、中国的台湾、东北、安徽、浙江和福建。因此, Miyazaki 将二倍体型定名为卫氏并殖吸虫(*P. westermani*), 将三倍体型定为肺生并殖吸虫(*P. pulmonalis*)^[1]。

研究并殖吸虫的种间和种内遗传差异, 通常是通过 ITS2 和部分 COI 的 DNA 序列分析。这是利用不同基因的进化速率不同, 分析不同阶元的种系发生。COI 基因属线粒体基因组, 而 ITS2 基因属于核基因组。由于前者的进化速率较核基因组快, 并且是以母系遗传为主, 基本不受基因重组的影

响, 适用于种内遗传差异的研究; 而 ITS2 基因相对保守, 适用于并殖吸虫种间差异的研究^[1-2]。笔者谨对卫氏并殖吸虫二、三倍体型的定种研究展开综述。

1 形态变化

卫氏并殖吸虫二、三倍体型在形态上有着明显差别。观察两型精子发生过程的超微结构发现, 二倍体型精子发生过程正常, 各发育阶段细胞的活性均较强, 而三倍体型却不能产生正常的精子, 不能进行有性生殖, 这种差异最终引起细胞分化异常, 这为两型肺吸虫的定种提供了形态差异的证据^[3]。

两型成虫之间除受精囊内有无精子是其主要特征外, 在大小及其他形态结构上并无明显区别。笔者提出以患者咳痰中的虫卵类型来鉴别卫氏并殖吸虫的类型^[4]。另据报道^[5], 卫氏并殖吸虫还存在一种嵌合体型, 成虫生殖细胞的染色体数为 22/33, 虫卵大小介于二、三倍体型之间, 并发现在动物体内 3 种类型自然混合寄生。不同倍体的卫氏并殖吸虫可能增加致病性, 也可能与中间宿主和终宿主有关^[6]。

2 蛋白质异同

蛋白质是表达遗传信息的一种方式, 分析卫

氏并殖吸虫两型的蛋白质成分能够辅助证明二者之间的亲缘关系。童虫与成虫比较,带型分布和着色浓度基本一致,但带数不同^[7]。进一步测定两型的氨基酸含量可知,两型成虫体内均含有 17 种相同的氨基酸,但氨基酸含量差别较大^[8]。童虫中二倍体型检出 15 种氨基酸,三倍体型检出 16 种氨基酸。囊蚴中二倍体型检出 11 种氨基酸,三倍体型检出 15 种氨基酸。在童虫和囊蚴间,三倍体型比二倍体型的氨基酸种类多而且含量高^[9]。可见组成成虫虫体的结构蛋白大多在童虫阶段已经合成。

同工酶是由单细胞阶段的一个前体酶谱产生的。同工酶分析结果可表现虫种特征性酶谱,对并殖吸虫虫种鉴定具有重要意义。研究两型卫氏并殖吸虫间 EST、MDH、LDH 3 种酶系统的同工酶谱发现,EST 同工酶谱的相似系数最大,且主带较近似,而 MDH、LDH 同工酶谱的差异较为明显,主要表现在 LDH 同工酶的带数、主带的位置及双带出现的位置不同和 MDH 主带的数目、Rf 值、染色强度和弱带的数目不同^[10]。进一步对二、三倍体型的 9 种同工酶分析结果表明,两者酶蛋白分子存在明显的同源性。G-6-PDH、DIA、PO、TO 和 ACP 5 种同工酶在两型的所有受检个体中均表现一致的电泳谱,PGM 和 MDH 呈现多态性,分别可见 3 种表现型。HK 和 ME 在二倍体型中出现个别酶变异体^[11]。另一种是两型肺吸虫在发育期整个基因座位区无酶带表现,显示其同工酶的遗传方式不同^[12]。不同地区的二倍体型卫氏并殖吸虫的 EST、MDH、LDH、ALP 4 种同工酶,总体上呈多态现象,酶谱显示出一定的差异^[13]。通过酶电泳分析认为三倍体来源于 2 个不同亚种或亲缘关系相近的 2 个种杂交^[14]。

3 抗原变异

两型卫氏并殖吸虫在宿主体内寄生状况及致病性存在明显差异,这被归因于两者对人的寄生适应性不同。使用免疫荧光技术和分子生物学技术检测,发现两型并殖吸虫的抗原有明显的差异性。正常小鼠血清处理的童虫切片都没看到特异荧光反应。三倍体型童虫,不论为何种免疫状态所得,都存在比二倍体型童虫更强的宿主抗原^[15]。Westernblot 实验结果表明,二倍体型和三倍体型

虫株的主要抗原 22.5 kD 蛋白区带以及 27、28、29 kD 3 条蛋白区带均能分别与狗抗二倍体和三倍体虫株感染血清发生反应,两型虫株的 22.5 kD 蛋白区带同样能与大鼠和兔抗二倍体和三倍体虫株血清发生反应。但两型虫株的 27、28、29 kD 蛋白区带却不被大鼠和兔抗两型虫株血清所识别。此外,二倍体虫株的 48.5 kD 蛋白区带只与兔抗二倍体虫株血清发生强反应。未观察到两型虫株与狗、大鼠和兔的正常血清的反应带^[16]。两型童虫抗原与同源感染鼠血清反应后,均出现 23.5、23 kD 的二联带,二倍体型童虫又多出一条 24.5 kD 特异带^[17]。两型虫株抗原均能诱导宿主产生基本相似的免疫应答。

4 染色体差异

二、三倍体型卫氏并殖吸虫染色体 C 带多态性的同源染色体的多种组合, C 带的种属特性分析有助于认识两型亲缘关系^[18]。有学者认为三倍体型是二倍体型所产生的同源三倍体^[19],但是赵吉滨等^[20]对卫氏并殖吸虫两型的染色体 C 带带型进行了分析,结果表明两型间存在差别。三倍体型卫氏并殖吸虫有 2 套染色体,其中一套在 C 带带型上与二倍体型相一致,另一套染色体则具有不同的带型,此差别突出表现在 2、3、5、6 和 7 号染色体上。用 5 种限制性内切酶消化后,经凝胶电泳,比较其酶解图型,又用 ³²P 标记两型吸虫的基因组 DNA 作探针,分别对经 7 种酶消化的两型 DNA 片段,进行 Southern 印渍交叉杂交试验。显示两型 Bam HI、Hind III 及 Eco RI 的酶切结果基本相同,但 Pst I、Dde I、Hae III 及 Hpa II 的结果却显示两类型的 DNA 重复顺序有明显差别^[21]。用双酶切消化两型成虫 DNA,经过分子杂交技术强化,用三倍体 DNA 为探针,使限制性酶切片长度差异(RFLDs)更显著,显示两型间具有意义的差别^[22]。有报道^[23],在日本的并殖吸虫二、三倍体中,Pst I、Rsa I 和 Hae III 也具有不同的酶切片段。上述实验结果从基因水平显示了两型卫氏并殖吸虫型间的差别,说明两型间存在一定程度的基因变异。因此有学者认为,二倍体型为卫氏并殖吸虫,三倍体型则为前者在进化过程中,通过染色体突变形成的独立种^[24-25]。

5 寄主适应性变异

无论两型并殖吸虫的种类分型如何,其宿主选择性和致病性表现较大的差异^[26]。有人发现不同品系的卫氏并殖吸虫以及不同产地的二倍体型在大鼠体内的发育时存在差异。二倍体型绝大部分可以童虫形式长期滞留于肌肉中,少数可见于体腔,后者比前者发育好些,但大多数仍为不成熟童虫。可见大鼠不仅可做该虫的转续宿主,也可起保虫宿主作用^[27]。在猴类中,恒河猴为两型卫氏并殖吸虫的非适宜宿主,虽虫体在恒河猴体内未能发育至性成熟产卵,但可在宿主内长期存活。而短尾猴可为三倍体型的实验转续宿主^[28]。通过调查和比较不同地区人体肺吸虫病的病原生物发现,两型虫体对终末宿主适应有差别,两型并殖吸虫自体内排卵方式有随痰排出或经粪便排出,临床表现以肺部症状为主,也可见于其他部位异性寄生,至于两型的临床表现差异还有待于进一步的研究^[29]。

6 展望

由于吸虫的差别明显以及 Miyazaki 的权威性,二、三倍体定种似成定论。但是仅仅经过 20 年,澳大利亚学者布莱尔(Blair)等以分子生物学方法检测来自台湾、韩国和日本的卫氏并殖吸虫标本,检测虫体线粒体细胞色素 C 氧化酶单位 I (COI: mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I)基因和核糖体 DNA (rDNA),用于考察物种的变异与进化,提出定种的不明确性^[30]。核糖体 DNA 第二间隔区(ITS2: nuclear ribosomal DNA second internal transcribed spacer)序列具株的特异性,可作病原体株鉴定、诊断靶基因和系统、进化树的绘制。

基因组 DNA 的限制性内切酶图谱分析,可以利用虫体 DNA 碱基序列不同,通过电泳显示 DNA 条带图谱,在此基础上,经 Southern 印渍与 DNA 探针杂交,形成限制性片断(RFLP)图谱,反映出酶切位点间 DNA 长度的突变,因而可测定种系发生关系。

自发现卫氏并殖吸虫存在二倍体型与三倍体型以来,国内外寄生虫学家、免疫学家和分子生物学家对卫氏并殖吸虫进行了广泛的研究。肺吸虫是人体肺吸虫病的病原体,确认其分型的准确依

据至今仍未发现。所以解决卫氏并殖吸虫的定种问题还有待于多学科的联合攻关。

参考文献:

- [1] Miyazaki I. Two types of the lung fluke which has been called *Paragonimus westermani*[J]. Jap Med J, 1978, 54(4):251-263.
- [2] Park G M, Yong T S, Im K I. Phylogenetic relationship of ribosomal ITS2 and mitochondrial CO I among diploid and triploid *Paragonimus westermani* isolates[J]. Parasitology, 2003, 41(01):47-55.
- [3] 赵吉滨, 黄瞬毅. 卫氏并殖吸虫二倍体型与三倍体型精子发生过程的超微结构研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1989, 7(3):10-12.
- [4] 李得垣, 周景生, 刘铁聪. 辽宁省凤城县卫氏并殖吸虫两种类型的发现及其差异[J]. 中国医科大学学报, 1990, 19(2):88-91.
- [5] 袁建华, 李得垣. 卫氏并殖吸虫嵌合体的发现与卫氏并殖吸虫三种类型在哺乳动物体内的自然混合寄生[J]. 中国人兽共患病杂志, 1987, 3(2):2-4.
- [6] Dreyfuss G, Rondelaud D. Biodiversity of flukes[J]. Parasite, 2008, 15(3):282-285.
- [7] 陈蓉, 李得垣. 卫氏并殖吸虫二倍体型和三倍体型虫体蛋白的等电点聚焦电泳分析[J]. 中国医科大学学报, 1989, 18(S1):15-17.
- [8] 赵吉滨, 黄瞬毅, 富德. 二倍体型与三倍体型卫氏并殖吸虫成虫氨基酸含量测定[J]. 哈尔滨医科大学学报, 1986(3):10-12.
- [9] 孙秀琴, 黄瞬毅. 两型卫氏并殖吸虫囊蚴、童虫氨基酸含量的比较分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1992, 10(1):45-47.
- [10] 吴信忠, 李树华. 我国斯氏并殖吸虫和两型卫氏并殖吸虫三种同工酶的板状电泳比较[J]. 重庆医科大学学报, 1990, 15(2):106-109.
- [11] 陈红根, 李得垣. 二倍体型与三倍体型卫氏并殖吸虫同工酶等电点聚焦电泳研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1991, 4(4):269-272.
- [12] 吴信忠, 李树华, 苗素英. 二倍体型与三倍体型卫氏并殖吸虫同工酶谱的发育变异及其分类学意义[J]. 动物学报, 1997, 43(3):263-270.
- [13] 胡文庆, 毛玮, 刘登宇. 不同地域二倍体型卫氏并殖吸虫同工酶及蛋白质的比较[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2005, 18(3):192-194.
- [14] Agatsuma T, Habe S. Electrophoretic studies on enzymes of diploid and triploid *Paragonimus westermani*[J]. Parasitology, 1985, 91(3):489-497.

- [15] 王恩荣, 马爱新, 王继春, 等. 二倍体型与三倍体型卫氏并殖吸虫虫体抗原与宿主抗原的观察[J]. 中国医科大学学报, 1990, 6(5):21-23.
- [16] 郑韧坚, 王恩荣, George Cain. 两型卫氏并殖吸虫蛋白质及其抗原性的比较研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 1991, 7(3):17-18.
- [17] 马爱新, 王恩荣, 王继春, 等. 卫氏并殖吸虫二倍与三倍体型抗原组份及定位的比较分析[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1993, 6(2):114-117.
- [18] 谭奇伟, 李得垣. 卫氏并殖吸虫二倍体型与三倍体型染色体 C 显带的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1990, 8(1):35-37.
- [19] Terasaki K, Shibahara T, Noda Y, et al. The oocyte of triploid fluke receiving intrusion of sperm from a diploid fluke-evidence for the origin of tetraploids in *Paragonimus westermani*[J]. J Parasitol, 1996, 82(6): 947-950.
- [20] 赵吉滨, 黄舜毅, 赵素云. 卫氏并殖吸虫二倍体型与三倍体型染色体 C 带带型的比较研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1989, 7(2):103-104.
- [21] 王恩荣, 郑韧坚, Cain G D. 二倍体型及三倍体型卫氏并殖吸虫的 DNA 重复顺序的比较研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1991, 9(1):46-49.
- [22] 张克新, 王恩荣, 王继春. 两类型卫氏并殖吸虫 DNA 重复顺序的进一步比较观察[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1994, 7(3):186-189.
- [23] Agatsuma T, Yang L, Kim D, et al. Mitochondrial DNA differentiation of Japanese diploid and triploid *Paragonimus westermani*[J]. J Helminthol, 1994, 68(1): 7-11.
- [24] 袁建华. 东北地区卫氏并殖吸虫及其亚种、变种的染色体核型分析与它们在分类学中地位的探讨[J]. 中国医科大学学报, 1984, 13(6):14-19.
- [25] Hirai H, Sakaguchi Y, Habe S, et al. C-banding analysis of six species of lung flukes, *Paragonimus spp.* (Trematoda: Platyhelminthes), from Japan and Korea[J]. Z Parasitenkd, 1985, 71(5):617-629.
- [26] 张传生, 张雁冰, 李英晶. 不同宿主体内两种类型卫氏并殖吸虫虫卵形态观察及测量[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(1):40-42.
- [27] 胡文庆, 刘登宇. 卫氏并殖吸虫(二倍体型)在大鼠体内发育的观察[J]. 广西医科大学学报, 2002, 19(1):54-56.
- [28] 袁建华, 王勇军, 曾小军. 两种类型卫氏并殖吸虫对猴的寄生适应性的比较研究[J]. 动物学报, 1990, 36(1): 100-102.
- [29] 何毅勋, 黄德生, 胡亚青. 皖南两种卫氏并殖吸虫品系特征的比较[J]. 中国医学科学院学报, 1981, 3(2):89-94.
- [30] Blair D, Agatsuma T, Watanobe T, et al. Geographical genetic structure within the human lung fluke, *Paragonimus westermani*, detected from DNA sequences [J]. Parasitology, 1997, 115(4):411-417.

Advances in Comparative Study of Diploid and Triploid of *Paragonimus Westermani*

LIU Jian-fa¹, LIAO Qi¹, JIANG Wen-wen¹, ZHANG Jie-nan², HU Qi-feng¹

(1.Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.The Center of Prevention and Control of Ningbo City, Ningbo 315010, China)

Abstract: *Paragonimus westermani* is a main pathogen of human paragonimiasis. we discovered that they were divided to diploid and triploid types. This review has compared the differences between two types from several aspects such as morphology, protein, isozyme, chromosomes and host selection, etc. It provides theoretical evidence for confirming the position of two types.

Key words: *Paragonimus westermani*; diploid; triploid

(责任编辑 史小丽)