

# 卫氏并殖吸虫二、三倍体型的比较研究

柳建发<sup>1</sup>, 张勤楠<sup>2</sup>, 蒋雯雯<sup>1</sup>

**摘要:** 卫氏并殖吸虫是人体并殖吸虫病的主要病原体, 迄今发现其可分为二倍体和三倍体两种类型。本文从形态、蛋白、同工酶、染色体等几个方面, 比较两种类型之间的差异, 为两型分类地位的确定提供理论依据。

**关键词:** 卫氏并殖吸虫; 二倍体型; 三倍体型

中图分类号: R382<sup>+</sup>3

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2013)02-0191-04

## Advance in comparative study on diploid and triploid of *Paragonimus westermani*

LIU Jian-fa<sup>1</sup>, ZHANG Jie-nan<sup>2</sup>, JIANG Wen-wen<sup>1</sup>

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

2. Ningbo Center for Disease Control and Prevention, Ningbo 315010, China)

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

**KEY WORDS:** *Paragonimus westermani*; diploid; triploid

Supported by the Natural Science Foundation of Ningbo City (No. 2010A610036)

Corresponding author: Liu Jian-fa, Email: liujianfa@nbu.edu.cn

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, 而且其是人体的最主要的致病虫种, 故普遍引以关注。从其发现起至今, 已经百余年, 但有关虫种问题尚不一致。其中, 上个世纪 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( $2n=22, 3n=33$ )两种类型, 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, 只是在大小上差别明显, 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*)<sup>[1]</sup>。

研究并殖吸虫的种间和种内遗传差异, 通常是指通过 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<sup>[2]</sup>。本文谨对卫氏并殖吸虫二、三倍体型的比较研究展开综述。

### 1 形态差异

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, 最后可形成大量形态与功能正常的精子。而三倍体型却不能产生正常的精子, 其原因是精子

宁波市自然科学基金(No. 2010A610036)资助

作者单位: 1. 宁波大学医学院, 浙江 315211,

Email: liujianfa@nbu.edu.cn;

2. 宁波市疾病预防控制中心, 浙江 315010

发生退化畸形,即细胞间桥过早断裂,细胞分裂异常,产生合胞体,次级精母细胞的第二次成熟分裂没有发生,细胞器稀少且发育不良,导致细胞活性降低,最后引起细胞分化异常<sup>[3]</sup>。

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。成虫的大小不能作为两型鉴别的依据。两型间囊蚴的区别主要体现在其形体大小上,大型者为三倍体型,小型者为二倍体型。两型间虫卵的差别最为显著。三倍体型虫卵外形为长椭圆型,前端宽而末端窄,最大宽度约位于虫卵前1/3处,二倍体型虫卵为卵圆形,两端钝圆,或上窄下宽,最大宽度约位于虫卵的中部。两型虫卵的卵小盖亦有显著不同,其宽度与高度经显著性检验差别有统计学意义( $P<0.01$ )。三倍体型的卵小盖宽而高,二倍体型的卵小盖较窄而低平。因此作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<sup>[4]</sup>。另据报道,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,并发现在动物体内三种类型自然混合寄生<sup>[5]</sup>。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<sup>[6]</sup>。

## 2 蛋白差异

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。应用等电点聚丙烯酰胺凝胶电泳方法分析两型成虫、童虫的普通蛋白和糖蛋白成分,发现两型之间的带型分布、等电点和着色浓度基本相同。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<sup>[7]</sup>。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<sup>[8]</sup>。童虫中二倍体型检出15种,三倍体型检出16种氨基酸。囊蚴中二倍体型检出11种,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。可见组成成虫虫体的结构蛋白大多在童虫阶段已经合成,氨基酸的不同导致两型之间蛋白质有所差异。但是差异并不明显,两型之间蛋白质存在高度同源性,SDS-PAGE结果表明,两型虫株的结构蛋白质均具有基本相同的分子量。

## 3 同工酶差异

同工酶是由单细胞阶段的一个前体酶谱产生的,它的一系列复杂变化随着个体的发育而发生。

同工酶分析结果可表现种特征性酶谱,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三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<sup>[9]</sup>。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ACP5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。比较分析两型吸虫在不同发育期之间及相应各发育期之间同工酶谱发现ALD、HK、G6PD均存在变异。变异表现为两种方式,一种是在同一个基因座位区的同工酶的酶带数目、迁移位置及活性发生变异;另一种是两型吸虫在有的发育期整个基因座位区无酶带显示。这反映了两型吸虫在发育进程中编码同工酶的基因遗传背景的差异。不同地区的二倍体型卫氏并殖吸虫的EST、MDH、LDH、ALP4种同工酶,总体上呈多态现象,酶谱显示出一定的差异<sup>[10]</sup>。通过酶电泳分析可认为三倍体来源于两个不同亚种或亲缘关系相近的两个种杂交。

## 4 抗原差异

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。影响寄生虫对宿主寄生适应性的因素很复杂,但首先被考虑到的是寄生虫的免疫逃避现象,它主要涉及虫体抗原的变异和宿主的应答状态。使用间接免疫荧光抗体法,对鼠体内两种类型卫氏并殖吸虫虫体抗原与宿主抗原做了检测。结果显示两类型童虫与感染同源卫氏并殖吸虫小鼠血清反应后,虫体抗原存在于体表皮层、肠管上皮细胞上。两类型童虫与兔抗鼠红细胞抗体血清反应后,主要在表皮层看到宿主抗原,荧光强度比虫体抗原所示为弱。不论宿主是否处于免疫状态,所获两型童虫都能结合免疫抗体,显示出很强的虫体抗原。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<sup>[11]</sup>。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识别。此外,二倍体虫株的 48.5 kD 蛋白区带只与免抗二倍体虫株血清发生强反应。未观察到两型虫株与狗、大鼠和免的正常血清的反应带<sup>[12]</sup>。在两型成虫抗原与同源感染猫血清反应中,有 7 条分子量在 100.5~23 kD 间的相同带,而三倍体型成虫抗原又多出 2 条(103、25 kD)特异带。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。总而言之,两型卫氏并殖吸虫的主要抗原组分基本相同,但也存在个别特异的抗原成分。两型虫株抗原均能诱导宿主产生基本相似的免疫应答。

## 5 DNA 差异

不少学者认为,异染色质具有种的特异性,C 带的种属特性也有助于从一个侧面认识物种和追溯亲缘关系。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。有学者认为三倍体型是二倍体型所产生的同源三倍体<sup>[13]</sup>,但是赵吉滨等对卫氏并殖吸虫两个型的染色体 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两套染色体,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。由于这些染色体中结构异染色质分布的位置不同,表现为着色区段的位置、大小及深浅不一致。把两型卫氏并殖吸虫成虫成组地及单个地提取与纯化其基因组 DNA,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<sup>32</sup>P 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、*Hin* 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<sup>[21]</sup>。进一步对不同地区两型基因组 DNA 重复顺序的比较分析发现,二倍体型成虫 DNA 的 *Pst* I 消化物皆有 6.6 kD 片段,但未见个体差异。用双酶切消化两型成虫 DNA,经分子杂交技术强化,用三倍体 DNA 为探针,使限制性酶切片段长度差异(RFLDs)更显著,显示两型间具有意义的差别<sup>[13]</sup>。有报道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,三倍体型为前者在进化过程中,通过染色体突变形成的独立种。

## 6 寄生适宜性差异

据报道,卫氏并殖吸虫二、三倍体型病人痰中的虫卵小于犬体内虫卵,即是同一类型卫氏并殖吸虫,不同宿主虫卵的形态特征与大小不尽相同,由此得出无论二倍体型还是三倍体型因宿主的种类不同其寄生适宜性和致病性呈现很大的差异<sup>[14]</sup>。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发育时存在差异的。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<sup>[27]</sup>。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达性成熟产卵,但可在宿主体内长期存活。而短尾猴可为三倍体型的实验转续宿主<sup>[15]</sup>。调查和比较了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,导致患者在临床和 X 线胸片特征以及痰中有无虫卵排出等方面表现不同。三倍体型对人体寄主适应,能发育成熟,故痰中有卵排出,临床表现以肺部症状为主。二倍体型对人体寄主不适应,未能发育成熟而停留在童虫阶段,故痰中无卵,临床表现很象内脏性蠕虫幼虫移行症的症状及变态反应。

## 7 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<sup>[15]</sup>。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,可作为病原体株的鉴定、诊断的靶基因和系统、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两种类型以来,国内外学者已就两型的虫体形态、蛋白和酶、染色体,以及它们对不同种类动物宿主的寄生适宜性和致病性进行了广泛研究和比较,试图为两型分类地位的确定和解释该病的发病机理提供依据,但至今未有统一的定论。所以解决卫氏并殖吸虫悬而未决的定种问题,仍是紧迫的需要。

## 参考文献:

- [1] Miyazaki I. Tow types of the lung fluke which has been called *Paragonimus westermani* [J]. Jpn Med J, 1978, 54(4): 251-263.
- [2] Park GM, Yong TS, Im KI. Phylogenetic relationship of ribosomal ITS2 and mitochondrial CO I among diploid and triploid *Paragonimus westermani* isolates [J]. Parasitology, 2003, 41(01): 47-55.
- [3] Zhao JB, Huang SY. Ultrastructural study on sperm developmental processing of diploid and triploid of *Paragonimus westermani* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1989, 7(3): 10-12. (in Chinese)
- 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] Dreyfuss G, Rondelaud D. Biodiversity of flukes [J]. Parasite, 2008, 15(3): 282-285.
- [5] Zhao JB, Huang SY, Fu D. Testing of amino acids contents of adults of diploid and triploid of *Paragonimus westermani* [J]. J Harbin Med Univ, 1986, 10(3): 10-12. (in Chinese)
- 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, 10(3): 10-12.
- [6] Agatsuma T, Habe S. Electrophoretic studies on enzymes of diploid and triploid *Paragonimus westermani* [J]. Parasitology, 1985, 91(3): 489-497.
- [7] Zheng RJ, Wang ER, Cain G. Comparative study on proteins and antigenicity of diploid and triploid of *Paragonimus westermani* [J]. Chin J Zoonoses, 1991, 7(3): 17-18. (in Chinese)
- 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.
- [8] Ma AX, Wang ER, Wang JC, et al. Comparative study on antigens and locations of diploid and triploid of *Paragonimus westermani* [J]. Chin J Prev Ctrl Parasit Dis, 1993, 6(2): 114-117. (in Chinese)
- 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.
- [9] Tan QW, Li DH. Study on C bands of chromatin of diploid and triploid of *Paragonimus westermani* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1990, 8(1): 35-37. (in Chinese)
- 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.
- [10] 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.
- [11] Wang ER, Zheng RJ, Cain GD. Comparative study on repeated sequences of DNA of diploid and triploid of *Paragonimus westermani* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1991, 9(1): 46-49. (in Chinese)
- 王恩荣, 郑韧坚, Cain GD. 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.
- [12] Zhang KX, Wang ER, Wang JC. Further comparative study on repeated sequences of DNA of two types of *Paragonimus westermani* [J]. Chin J Prev Ctrl Parasit Dis, 1994, 7(3): 186-189. (in Chinese)
- 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.

收稿日期:2011-07-11;修回日期:2012-04-18