

格林-巴利综合征相关空肠弯曲菌脂多糖抗原初步分析

张建中 李春岩 陈晶晶 刘瑞春 蒋秀高 田文强

摘要 用格林-巴利综合征相关性空肠弯曲菌复制动物模型成功后的动物免疫血清对河北省格林-巴利综合征病人分离株空肠弯曲菌、动物来源株空肠弯曲菌及北京对照用菌株空肠弯曲菌及其脂多糖抗原性进行分析。结果显示,发生了典型的格林-巴利综合征样疾病的动物已产生了明显的抗格林-巴利综合征相关性空肠弯曲菌的免疫反应,其抗脂多糖抗体与当地其它来源株空肠弯曲菌有部分交叉反应,与北京分离株空肠弯曲菌无明显交叉反应。说明格林-巴利综合征相关性空肠弯曲菌脂多糖具有其独特的抗原性。支持某些特殊血清型的空肠弯曲菌参与格林-巴利综合征的致病过程。

关键词 多神经根神经炎 弯曲杆菌 空肠 脂多糖类 G-B综合征 抗原

studies on the LPS antigens of the Guillain-Barre syndrome associated *Campylobacter jejuni* Zhang Jianzhong*, Li Chunyan, Chen Jingjing, et al. * Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

Abstract Lipopolysaccharides (LPS) antigens differences between the Guillain-Barre syndrome associated *C. jejuni* and Non-Guillain-Barre syndrome associated *C. jejuni* were studied by using the SDS-PAGE and Western blots analysis. The results indicated that the anti-LPS antibodies reacted partially with the local *C. jejuni* strains, but get no reaction with the strains isolated from Beijing district. The LPS of Guillain-Barre syndrome associated *C. jejuni* has specifically antigenicity, and the corresponding serum type of *C. jejuni* might be the real pathogen of Guillain-Barre syndrome.

Subject words Polyradiculon-euritis *Campylobacter jejuni* Lipopolysaccharides

格林-巴利综合征 (Guillain-Barre syndrome, 简称 GBS) 是一种临床常见的瘫痪性疾病, 患者肢体瘫痪, 生活不能自理, 严重者可致死, 长期以来被认为是一种原因不明的疾病。近来国内外研究表明, 某些格林-巴利综合征的发生与空肠弯曲菌的感染密切相关^[1]。我们在国内外首先应用格林-巴利综合征相关性空肠弯曲菌及其纯化脂多糖成份复制格林-巴利综合征动物模型成功^[2], 证实了空肠弯曲菌感染 (尤其是其脂多糖成份) 是格林-巴利综合征重要的致病因素; 空肠弯曲菌是一种人畜感染率很高的细菌, 流行病学及动物实验资料均提示可

能只有某些特殊菌型的空肠弯曲菌参与 GBS 的致病过程。本文报告格林-巴利综合征相关性空肠弯曲菌与其它空肠弯曲菌间脂多糖抗原性差异分析结果。

材料和方法

1. 空肠弯曲菌菌株分离及电泳样品准备: 芦磊株空肠弯曲菌 (LL Cj) 分离自临床格林-巴利综合征病人 (芦磊), 经 Penner 分型为 Penner 19 型。鸡眼株空肠弯曲菌 (JY Cj): 自鸡眼部感染灶处分离 (分离地为河北)。P16 株空肠弯曲菌 (P16): 自猪粪便中分离的空肠弯曲菌 (分离地为北京), Cj26: 为空肠弯曲菌国际标准菌株; 朝 1 株空肠弯曲菌 (C1)、延 22 株空肠弯曲菌 (Y22): 分别分离自北京朝阳区及延庆县腹泻儿童病人, 以上菌株均经系统鉴定为空肠弯曲菌。

将各株菌分别接种于含 6% 羊血的布氏平板中, 置

作者单位: 102206 北京, 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 (张建中, 陈晶晶, 蒋秀高); 河北医科大学第二附属医院 (李春岩, 刘瑞春, 田文强)

混合气体环境(5% O₂, 10% CO₂ 和 85% N₂)中, 37℃ 培养 72 小时后, 收菌并稀释成约 3mg 干菌/ml 浓度, 加等量 2× 样品缓冲液, 混匀后放入 100℃ 水浴中煮沸 5 分钟后备用。

2. 空肠弯曲菌脂多糖(LPS)提取及电泳样品准备: 将各株菌分别接种于含 6% 羊血的布氏平板中, 置混合气体环境(5% O₂, 10% CO₂ 和 85% N₂)中, 37℃ 培养 72 小时后, 将菌苔洗入 0.15mmol/L CaCl₂-0.5mmol/L MgCl₂ 溶液中, 用酚水法提取 LPS, 将提取物冷冻真空干燥后, 用蒸馏水稀释成约 3mg/ml 浓度, 加等量 2× 样品缓冲液, 混匀后放入 100℃ 水浴中煮沸 5 分钟后备用。

3. 人神经材料采集: 人神经材料采自格林-巴利综合征病人及非格林-巴利综合征对照病人新鲜尸检材料, 取材后放-80℃ 低温保存, 用前经充分研磨乳化, 加等量 2× 样品缓冲液, 混匀后放入 100℃ 水浴中煮沸 5 分钟后备用。

4. 动物免疫血清采集: 应用 LL Cj 喂养猴、鸡、兔等实验动物, 动物出现典型 GBS 表现后, 静脉抽取发病猴(2 号猴)血, 分离血清后-80℃ 低温保存备用。

5. 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(SDS-PAGE)^[3]: 采用 5% 浓缩胶, 11% 分离胶, 每样品加样量约 30μl (加样顺序见实验结果部分照片中标注); 恒压 60 伏, 12 小时条件。电泳完毕后采用考马斯亮蓝 R-250、银染色。染色后 EAGLE EYE I 读胶仪照相记录。

6. 免疫印迹分析(Western blots)^[4]: 将各电泳样品, 经 SDS-PAGE 后, 采用 80mA, 恒流 4 小时将抗原转移至硝酸纤维膜(NC 膜上), 将转膜后的 NC 膜放入 5% 的脱脂奶粉中封闭过夜; 用 TBS-T 洗涤 NC 膜三次, 每次 10 分钟; 将 NC 膜放入 1:50 稀释的待测血清中, 室温振荡 2 小时, 用 TBS-T 洗涤 NC 膜三次, 每次 10 分钟; 将 NC 膜放入适当稀释的辣根过氧化物酶标记的第二抗体(用 SPA 代替)中, 室温振荡 1 小时, 用 TBS-T 洗涤 NC 膜三次, 每次 10 分钟; 将 NC 膜放入新配制的 4-氯-1-萘酚底物液中, 显色满意后, 将 NC 膜放入蒸馏水中终止反应, 用 EAGLE EYE I 读胶仪照相记录。

结 果

1. SDS-PAGE 分析结果显示, 提取的 LL Cj, C1, Y22 及 JY Cj 株空肠弯曲菌 LPS/LOS 在考马斯亮蓝染色中无着色反应(见图 1); 提取的 LL Cj, C1, Y22 及 JY Cj 株空肠弯曲菌

LPS/LOS 在银染色中显示均含有脂多糖和脂寡糖成份存在, 4 株菌的 LPS 分子量均在 17.5×10^3 以下, 其中 C1, Y22 及 JY Cj 株空肠弯曲菌 LPS 分子量基本相同, 但较 LL Cj 者分子量稍大(见图 2)。

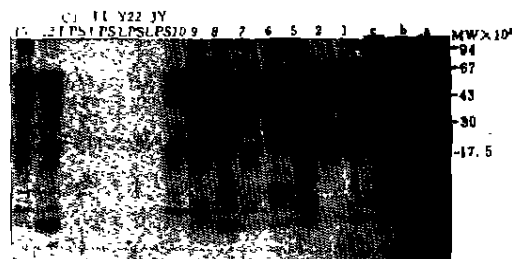


图 1 空肠弯曲菌脂多糖聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(考马斯亮蓝染色)

Fig 1. SDS-PAGE analysis of LPS extracted from *C. jejuni* (Coomassie brilliant blue R-250 stain)

a: Cj 26; b: P16; c: LL Cj;

1~10, 12, 13; Peripheral nerves of human and monkeys

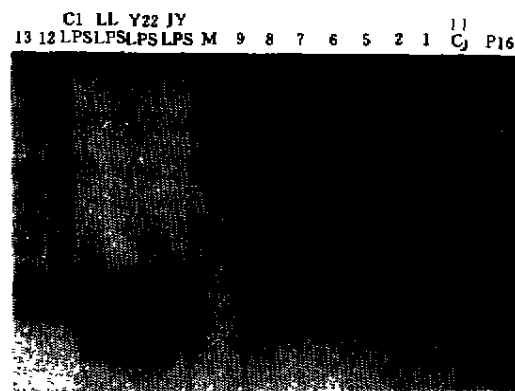


图 2 空肠弯曲菌脂多糖聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(银染色)

Fig 2. SDS-PAGE analysis of LPS extracted from *C. jejuni* (silver stain)

1~10, 12, 13; Peripheral nerves of human and monkeys

M: Protein MW standard (94000, 67000, 43000, 30000, 17500)

2. Western blot 分析结果显示, 发病猴血清对 Cj26 和 P16 两株空肠弯曲菌, 均有明显的抗体反应条带出现, 未见与 LPS 对应区免疫反应出现; 与 LL Cj 间有明显免疫反应条带出现, 同时含有很强的与其 LPS 相对应的免疫反应条带(条带位置与图 2 中显示的 LPS 位置相一

致)。发病猴血清与 LL LPS 和 JY LPS 间可见与图 2 中显示的 LPS 位置(分子量稍低于 17.5×10^3 区域)相对应的免疫反应条带,其中对 LL LPS 的反应明显强于对 JY LPS 的反应;未见与 Y22 LPS 和 C1 LPS 相对应的免疫条带出现(见图 3)。

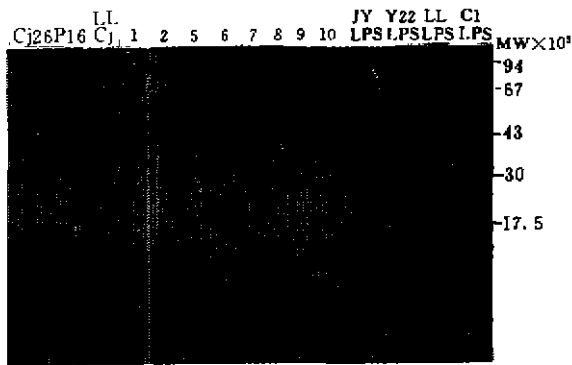


图 3 LPS 免疫印迹分析

Fig 3. Analysis of LPS by Western-blot

1~10, 12, 13: Peripheral nerves of human and monkeys

讨 论

格林-巴利综合征多年来一直病因不明,近年来国内外研究表明,其发病与空肠弯曲菌感染密切相关,格林-巴利病人血清中空弯抗体阳性率和滴度均明显高于对照人群^[4],国内外不同地点自格林-巴利病人分离的空肠弯曲菌均主要集中在 Penner 19 型等个别空肠弯曲菌血清型上^[5]。进一步的动物模型研究发现,应用格林-巴利综合征病人来源空肠弯曲菌感染或用其脂多糖成份免疫动物,均可成功诱发鸡^[2]、猴、兔(待发表资料)等动物疾病模型,其脂多糖成份为格林-巴利综合征的主要致病因子,而非格林-巴利综合征病人来源空肠弯曲菌感染或用其脂多糖成份免疫动物,则不能诱发疾病模型;应用发病动物或病人血清也可在外周神经局部引起相应病变(待发表资料),说明抗空肠弯曲菌脂多糖的体液免疫在格林-巴利综合

征发生过程中起主要作用,而研究格林-巴利综合征病人来源空肠弯曲菌与非格林-巴利综合征病人来源空肠弯曲菌脂多糖成份间的抗原性差异,已成为研究其致病机理的关键。

在本试验中,发病猴在采用 LL Cj 攻击后发生了典型的格林-巴利综合征样疾病,实验结果显示,动物已产生了明显的抗 LL Cj 的免疫反应,其抗体与北京分离株空肠弯曲菌 LPS 间无免疫反应出现,与 JY Cj 间可见 LPS 相对应的免疫反应条带出现,但位置较 LL Cj 稍高,反应性也较弱,说明 LL Cj 株空肠弯曲菌 LPS 具有其独特的抗原性,支持某些特殊血清型的空肠弯曲菌参与格林-巴利综合征的致病过程,这种与格林-巴利综合征发病相关的抗原决定簇是否仅出现在 Penner 19 型空肠弯曲菌,是否出现在所有 Penner 19 型空肠弯曲菌株还有待进一步研究,而对其 LPS 的结构和独特抗原性部位的确定,将对格林-巴利综合征病原学诊断方法和相关流行病学调查方法的建立起到促进作用。

参 考 文 献

- 1 Kuroki S, Haruta T and Yoshiooka M, et al. Guillain-Barre syndrome associated with campylobacter infection, *Pediatr Infect Dis J*, 1991, 10: 149.
- 2 李春岩, 薛平, 刘瑞春, 等. 空肠弯曲菌致格林-巴利综合征动物模型的初步研究. *脑与神经疾病杂志*, 1994, 2(2): 68.
- 3 金灵, 苏新. Biotin-avidin 免疫转移技术. *生物化学与生物物理学进展*, 1989, 16: 148.
- 4 李春岩, 陈晶晶, 张建中, 等. 急性运动性轴索性神经病—421 份血清抗空肠弯曲菌抗体分析. *河北医药*, 1993, 15(2): 134.
- 5 Aspinall GO, Fujimoto S and McDonald AG, et al. Lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barre syndrome patients mimic human gangliosides in structure. *Infect & Immun*, 1994, 62(5): 2122.

(收稿: 1996-07-10 修回: 1996-10-07)