

15-17

用免疫学方法分析格林-巴利综合征 与空肠弯曲菌感染关系

R745.43

李春岩 张建中[△] 刘瑞春 陈晶晶 田文强 蒋秀高

摘要 对不同类型格林-巴利综合征病人血清中所含抗格林-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、北京对照用人源性空肠弯曲菌及其脂多糖抗体进行分析,结果显示, AMAN 病人血清中含有高滴度抗 AMAN 病人感染株空肠弯曲菌 LPS 的抗体,同时含有较弱的抗当地分离株空肠弯曲菌 LPS 的抗体,但不含有抗对照组空肠弯曲菌 LPS 的抗体, AIDP 病人血清中不含有抗空肠弯曲菌 LPS 的抗体,仅含有较弱的抗空肠弯曲菌蛋白抗原的抗体,表明抗空肠弯曲菌 LPS 抗体的产生与 AMAN 的发生密切相关;若某些 AIDP 的发生与空肠弯曲菌感染相关,则其发生也与抗空肠弯曲菌 LPS 抗体的产生无明显关系。AIDP 与 AMAN 病人在发病机理上存在明显不同,对临床 GBS 病人血清中抗空肠弯曲菌 LPS 抗体的检测,可能对 AMAN 与 AIDP 的鉴别诊断具有重要意义。

关键词 格林-巴利综合征 空肠弯曲菌 急性运动性轴索型神经病 脂多糖

G-B综合征

诊断,鉴别诊断

Immunological study on the relationship of the subtypes of
Guillain-Barre syndrome and Campylobacter jejuni infection

Li Chunyan, Zhang Jianzhong, Liu Ruichun, et al.

Department of Neurology The 2nd Hospital of Hebei Medical University 050000

Abstract The anti-C. jejuni LPS antibodies differences between the Guillain-Barre syndrome (GBS) subtypes, acute motor axonal neuropathy (AMAN) and AIDP, were studied by SDS-PAGE and Western blot analysis. The result showed that the AMAN patients have obvious anti-LPS of C. jejuni, which was isolated from AMAN patient's stool, but AIDP patients have no C. jejuni LPS antibodies. To identify and distinguish between AMAN and AIDP, it may be important to detect anti-C. jejuni LPS antibodies in GBS patients.

Key words Guillain-Barre syndrome Campylobacter jejuni AMAN LPS

格林-巴利综合征 (Guillain-Barre Syndrome, GBS) 是一种临床常见的软瘫性疾病,患者肢体瘫痪,生活不能自理,呼吸肌麻痹,严重者可致死,长期以来被认为是一种原因不明的疾病,近年来国内外研究表明,某些格林-巴利综合征的发生与空肠弯曲菌的感染,特别是与其脂多糖 (LPS) 的反应密切相关。神经电生理和神经病理学研究表明 GBS 在临床上常见有急性炎性脱髓性多发性神经病 (AIDP) 和另一种急性运动性轴索型神经病 (acute motor axone neuropathy, AMAN)^[1]。空肠弯曲菌感染与此两类型间的关系如何,尚

未见从免疫学角度进行研究的报道,本文仅对不同类型 GBS 病人血清中存在的抗空肠弯曲菌抗体 (特别是抗 LPS 抗体) 的差别进行分析。

材料与方 法

一、空肠弯曲菌菌株分离及电泳样品准备: 芦磊株空肠弯曲菌 (LLCj) 分离自急性运动性轴索型格林-巴利综合征病人 (芦磊), 经 Penner 分型为 Penner19 型; 鸡眼株空肠弯曲菌 (JYCj), 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), 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,

作者单位: (050000) 河北医科大学第二医院神经内科 (李春岩、刘瑞春、田文强), 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)

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 2x 样品缓冲液, 混匀后放入 100℃ 水浴中煮沸 5 分钟后备用。

二、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 0.15m M CaCl₂ ~ 0.5m M 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 2x 样品缓冲液, 混匀后放入 100℃ 水浴中煮沸 5 分钟后备用。

三、格林-巴利综合征及对照非格林-巴利综合征病人血清采集, 对四名患者分别采静脉血分离血清后放 -80℃ 保存备用。经临床及电生理学检查, 患者芦磊、张兵符合急性运动轴索型格林-巴利综合征; 张占亮符合急性炎症脱髓鞘型格林-巴利综合征, 而陈秀金为同期脑囊虫病住院病人。

四、聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 (SDS-PAGE)^[2], 聚丙烯酰胺凝胶电泳采用 5% 浓缩胶, 11% 分离胶, 每样品加样量约 30 微升 (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, 氨银染色。染色后用 EAGLE EYE I 读胶仪照相记录。

五、免疫印迹分析 (western blots)^[2], 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液, 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, 室温震荡 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, 室温震荡 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 奈酚底物液中, 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

一、芦磊 (AMAN) 病人血清与芦磊空肠弯曲菌及其 LPS 间有较强的免疫反应条带出现, 但与 P16 空肠弯曲菌以及 C1、Y22, 鸡眼株空肠弯曲菌的 LPS 间无明显免疫反应条带出现。

二、张兵 (AMAN) 病人血清与芦磊空肠弯曲菌间有较强的免疫反应条带出现, 并与其 LPS 及鸡眼株 LPS 间有强免疫反应条带出现, 与其它两株空肠弯曲菌的 LPS 也无免疫反应条带出现。

三、陈秀金 (脑囊虫病病人) 血清与芦磊空肠弯曲菌间有较强的免疫反应条带出现, 但与其 LPS 无免疫反应条带出现。

四、张占亮 (AIDP 病人) 血清与芦磊空肠弯曲菌间有一条较弱的免疫反应条带, 与其它三株空肠弯曲菌, 实验用四株空肠弯曲菌的 LPS 及神经成分间无免疫反应条带出现。

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, 国内外不同地点格林-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。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, 均可成功诱发猴、鸡、兔等动物疾病模型^[5,6], 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。

在本试验中,发现一 AMAN 病人血清中含有特异性很高的针对自身所感染空肠弯曲菌 LPS 的抗体,而对其它空肠弯曲菌(包括当地分离株)LPS 无明显反应;而另一 AMAN 血清中同样含有抗 AMAN 来源株空肠弯曲菌 LPS 的抗体,同时含有较弱的抗当地分离株空肠弯曲菌 LPS 的抗体,但不含有抗对照组空肠弯曲菌 LPS 的抗体,表明 AMAN 病人血清中出现的抗空肠弯曲菌 LPS 的抗体虽表现出一定的特异性,但也从另一方面说明在 GBS 高发区(河北省)中不同空肠弯曲菌 LPS 间存在明显的抗原交叉性。对另外两例 AIDP 病人和脑囊虫病人血清的分析表明,其中均不含有抗空肠弯曲菌 LPS 的抗体,仅含有较弱的抗空肠弯曲菌蛋白抗原的抗体,某些 AIDP 的发生可能与空肠弯曲菌感染无关,其血清中抗空肠弯曲菌抗体可能为人群自然感染空肠弯曲菌的背景所造成;若某些 AIDP 的发生与空肠弯曲菌感染相关,则其发生也与抗空肠弯曲菌 LPS 抗体的产生无明显关系。AIDP 与 AMAN 病人在发病

机理上存在明显不同,对临床 GBS 病人血清中抗空肠弯曲菌 LPS 抗体的检测,可能对 GBS 两个类型的鉴别诊断具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 李春岩,高长玉,薛平,等.急性运动性轴索型格林-巴利综合征.中华神经精神科杂志,1993;26:282.
- 2 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.
- 3 李春岩,陈晶晶,张建中,等.急性运动性轴索型神经病.121 份血清抗空肠弯曲菌抗体分析.河北医药,1993;15:134.
- 4 G. O. Aspinall, S. Fujimoto and A. G. McDonald, et al. Lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni* Associated with Guillain-Barre Syndrome Patients Mimic Human Gangliosides in Structure. *Infect & Immunity*, 1994; 62: 2122.
- 5 李春岩,薛平,刘瑞春,等.空肠弯曲菌致鸡格林-巴利综合征动物模型的初步研究.脑与神经疾病杂志,1994;2:68.
- 6 CYLi, P Xue, WQ Tian, et al. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in the chicken: an animal model of axonal Guillain-Barre syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 1996; 61: 279.

(1997-10-25 收稿)

扼颈致闭锁综合征 1 例报告

刘传贵 张振兴 魏本来 曹培成

患者,男 40 岁,农民。因被人用双手扼颈 2 分钟后出现一过性昏迷、失语、四肢瘫于 1995 年 7 月 27 日入院。

查体:患者神志清,双眼右侧凝视,可通过睁闭眼睑及眼球垂直运动来表达思维,对言语理解无障碍,其余眼球运动消失。双瞳孔等大等圆,光反应存在,双侧面舌完全瘫,吞咽反射消失,四肢软瘫,腱反射消失,双下肢病理征阳性,皮肤感觉存在。颅脑 CT 未发现异常。

治疗:入院后应用脱水抗感染药物,补液,激素,胞二磷胆碱应用,气管切开,营养支持疗法等,病人病情逐渐好转,伤后 45 天拔除气管套管,70 天出院。

出院时病人可张口,四肢肌力 III°,双下肢病理征消失。

讨论:闭锁综合征由桥脑基部病变引起,病因多数为桥脑腹侧的梗塞或出血,亦可由于外伤、脱髓鞘疾病,肿瘤,炎症等引起。本例可能因扼颈致颈椎扭曲,颈椎基动脉供血不足,和/或颈动脉系统缺血致椎基动脉系统盗血所引起。治疗方面,应及时气管切开,维持水电解质平稳,加强营养支持疗法,防治并发症,应用神经细胞活化剂等,以促进病人恢复,本病人治疗上注意以上几点,取得了较好疗效。

(1997-01-22 收稿)

作者单位:(256400) 山东淄博桓台县人民医院外二科(刘传贵),潍坊市人民医院神经外科(张振兴、魏本来、曹培成)