

热带无爪螨体内特异性变应原定位

吴桂华¹, 刘志刚^{2,*}, 孙新¹, 杨峰巍²

(1. 蚌埠医学院病原生物学教研室, 安徽蚌埠 233030; 2. 深圳大学医学院过敏反应与免疫学研究所, 广东深圳 518060)

摘要:【目的】探讨热带无爪螨 *Blomia tropicalis* 特异性变应原在体内的定位。【方法】制作热带无爪螨石蜡切片, HE 染色后光镜观察其内部形态结构。选用对尘螨过敏患者的阳性血清特异性 IgE 抗体作探针, 免疫组织化学染色分析其特异性抗原存在位置。【结果与结论】免疫组织化学染色可见热带无爪螨中肠、盲囊、结肠的肠壁和内容物及生殖腺等均有阳性反应。其中肠壁组织和肠腔内容物呈强阳性反应, 提示肠为特异性抗原的主要存在部位。

关键词: 热带无爪螨; 变应原; 抗原定位; 免疫组织化学; HE 染色

中图分类号: Q964 文献标识码: A 文章编号: 2454-6296(2009)01-106-04

Localization of the specific allergens in the body of *Blomia tropicalis* (Acari: Echymiopodidae) by immunohistochemistry

WU Gui-Hua¹, LIU Zhi-Gang^{2,*}, SUN Xin¹, YANG Feng-Wei² (1. Department of Microbiology and Parasitology, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233030, China; 2. Institute of Allergy and Immunology, Medical College of Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

Abstract: 【Aims】 To localize the specific allergens in the body of *Blomia tropicalis* by immunohistochemistry. 【Methods】 Paraffin sections of *B. tropicalis* mites stained by hematoxylin-eosin (HE) were observed by optical microscope. Serum specific IgE antibodies from patients who were sensitive to the house dust mite served as probe, and the specific allergens in the body of *B. tropicalis* were localized. 【Results and Conclusion】 Immunohistochemistry staining revealed that the specific allergens were located in the gut wall, gut contents and the reproductive system, but strongly bound to the midgut wall and contents.

Key words: *Blomia tropicalis*; allergens; antigen localization; immunohistochemistry; hematoxylin-eosin stain

尘螨(house dust mites)广泛存在于人类生活和工作环境中,其分泌物、代谢物、蜕皮液、尸体等是强烈的变应原,可引起过敏性哮喘、鼻炎、皮炎和荨麻疹等多种变态反应性疾病(Voorhorst *et al.*, 1967)。热带无爪螨 *Blomia tropicalis* (van Bronswijk *et al.*, 1973) 隶属于蜱螨亚纲(Acari)真螨目(Acariformes)粉螨亚目(Actinedida)食甜螨科(Glycyphagidae)无爪螨属 *Blomia*, 是除了粉尘螨 *Dermatophagoides farinae* (Hughes, 1961), 屋尘螨 *D. pteronyssinus* (Trouessart, 1897) 和埋宇内尘螨 *Euroglyphus maynei* (Cooreman, 1950) 之外, 另一种重要的室内致敏螨类, 是热带和亚热带地区的优势螨种。近年来从热带无爪螨中已分离出 28 种变应原, 这些变

应原可引起螨性哮喘、过敏性鼻炎等多种变态反应性疾病(Chew, 1999)。在巴西圣保罗和委内瑞拉加拉卡斯经皮肤针刺试验结果发现热带无爪螨抗原阳性率分别为 93.7% 和 77.8%, 相对应的屋尘螨阳性率分别为 91% 和 75.5% (Fernández-Caldas and Lockey, 2004), 均高于屋尘螨和粉尘螨, 亚热带地区的新加坡、台湾和香港等地的调查也显示热带无爪螨是这一地区的优势螨种(Tsai *et al.*, 1998; Chew, 1999)。此外, 热带无爪螨的变应原与屋尘螨、粉尘螨、腐食酪螨、棉兰皱皮螨均有明显的交叉反应(Puerta *et al.*, 1996; Yi *et al.*, 2002; Kuo *et al.*, 2003)。热带无爪螨的重要性已逐步被认识, 然而与目前变应原分离纯化和分子克隆方面取得的进展

基金项目: 国家“863”计划项目(2002AA214011, 2006AA02A231); 国家自然科学基金项目(30471505, 30271226); 粤港关键领域重点突破项目(20054982207); 广东省科技计划重大项目(2003C104019); 深圳市科技计划项目(200218, 200630)

作者简介: 吴桂华, 女, 1978 年 8 月生, 硕士研究生, 主要从事分子寄生虫免疫研究, E-mail: wu.guihua@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 0755-26538722; E-mail: lzg@szu.edu.cn

收稿日期 Received: 2008-04-30; 接受日期 Accepted: 2008-12-12

相比,形态学的观察自 van Bronswijk 等(1973)首次对热带无爪螨新种进行简要描述后,有关内部结构和特异性抗原的定位仅少见报道(Bi *et al.*, 2005),为进一步了解热带无爪螨的致病机理,加强对过敏性疾病的防治,本文通过免疫组化实验对热带无爪螨变应原的在体内的分布部位进行研究。

1 材料与方法

1.1 标本来源

热带无爪螨采自深圳地区家庭床尘,用连续变倍体视镜挑取并分离后,在培养箱进行纯化培养(日本 ESPEC 公司, LHL-113),培养条件为温度 $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $75\% \pm 1\%$ 。

1.2 血清及试剂

阳性血清取自海口市人民医院,选用哮喘、过敏性鼻炎或荨麻疹患者,血清学试验、皮肤点刺试验结果尘螨特异性 IgE 阳性、反应达 3 级或 3 级以上人血清(I 抗)10 份, -80°C 保存,阴性血清取自健康体检者(经变应原自动检测仪检测尘螨反应为 0 级),生物素标记的羊抗人 IgE 抗体(II 抗)及 SABC 链酶亲和素(武汉博士得生物工程公司),苏木素-伊红(hatmatoxylin-eosin, HE)染色试剂为国产常用试剂。

1.3 切片制备

取热带无爪螨雌雄各 20 只, Bouin 液固定 24 h 后,先经 1.5% 琼脂预包埋后再行石蜡包埋,作厚度为 $5 \mu\text{m}$ 的石蜡切片,将蜡条展于用 poly-L-lysine 处理过的载玻片上(粘片后 58°C 烤片 3 h),常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,分别作 HE 染色及免疫组织化学分析。

1.4 热带无爪螨特异性抗原定位

用于免疫组织化学分析的切片先经 3% 过氧化氢孵育 60 min,灭活内源性酶,然后经 PBS 清洗,微波煮沸修复抗原,冷却,再加入正常羊血清封闭液室温下作用 20 min,甩去多余液体,不洗。加入 PBS 稀释(1:8)的尘螨过敏患者阳性血清, 37°C 下作用 60 min,再加入生物素标记的羊抗人 IgE 抗体(效价 1:500)室温下作用 60 min, SABC 复合物(PBS 1:100 稀释)室温下作用 60 min,经二氨基联苯胺(DAB)显色,二甲苯透明、封片。阴性对照用健康人血清。图像采集在显微镜下(Olympus Bx-51),由 Olympus DP70 数码相机拍摄(日本 Olympus 公司)完成。

2 结果

2.1 热带无爪螨形态学观察

热带无爪螨外部形态呈圆球状,躯体长约 $250 \sim 450 \mu\text{m}$,表皮无色、粗糙、有很多微小突起,有背毛 5 对,顶内毛在顶外毛之后,腭内毛、腭外毛和肩内毛着生在同一水平线上(图版 I:1)。

2.2 热带无爪螨内部结构

HE 染色切片纵、横切面可见消化道和生殖道占据体腔大部分空间,消化道可见脑、前中肠、中肠、2 个较大的盲囊、结肠等,肠腔内可见明显的粪便颗粒。生殖腺位于体腔末端,雌螨可见卵巢等结构,雄螨可见较大的附腺、睾丸等结构(图版 I:2)。

2.3 热带无爪螨特异性抗原定位

分别观察免疫组化染色的热带无爪螨横、纵切片,分别观察特异性抗原存在部位,健康人血清对照,无任何区域着色(图版 I:3)。IgE 阳性患者血清孵育的切片可见其唾液腺、前中肠、中肠、盲囊和结肠的肠壁、内容物、体壁以及雌、雄螨的生殖腺都呈阳性反应,其中唾液腺、中肠、盲囊、结肠的肠壁、及肠腔内粪便颗粒的阳性反应较其他部位强烈,着色较深(图版 I:4,5)。

3 讨论

有关热带无爪螨抗原定位的研究国内外仅见少量报道,相对来说粉尘螨屋尘螨的抗原定位研究较为透彻(Tovey and Baldo, 1990; Fu *et al.*, 2004; Liu, 2005; Li *et al.*, 2007),显示其主要变应原与消化道有关,体壁和头部也存在变应原。本研究基于石蜡包埋切片和常规 HE 染色技术,用尘螨过敏病人的血清 IgE 为探针做免疫组化染色,对热带无爪螨特异性抗原进行定位研究,发现热带无爪螨的唾液腺、中肠、盲囊(盲囊较大)、结肠的肠壁及其内容物(即粪便颗粒)为强阳性反应(图版 I:4,5),提示变应原可能是由这些部位合成和分泌,然后渗入到粪便颗粒中,使其变应原含量高。此结论和 Bi 等(2005)论述的热带无爪螨主要变应原 Blo t 5 主要存在于肠壁和肠腔内容物基本相似。体壁及生殖腺亦呈阳性反应但没有肠道反应强,提示抗原分布较少或作用不强。Thomas 和 Chua(1995)曾报道 Der P2 主要来源于雄螨附腺,本研究发现热带无爪螨雄

螨附腺阳性程度不强(图版 I :5),这可能是由于不同的螨种,其特异性变应原的存在部位也会有差别,后续研究可进一步用单抗证实。热带无爪螨的肌肉组织、血腔呈阴性反应,故这些部位无变应原存在。正常人血清作阴性对照,无任何区域着色,肠腔亦无反应(图版 I :3)。本研究证实热带无爪螨变应原在体内的分布规律与屋尘螨粉尘螨基本一致。应该强调的是,热带无爪螨变应原成分复杂,故用尘螨过敏的阳性血清抗原定位热带无爪螨特异性抗原必然存在多部位阳性,因此针对热带无爪螨某一特定变应原的定位研究,如 Blo t 5, Blo t 11, Blo t 12, Blo t 13 等,还有待于进一步深入。

参 考 文 献 (References)

- Bi XZ, Gao YF, Chew FT, 2005. Blo t 5 the major allergen from dust mite *Blomia tropicalis*, is secreted from the mite stomach and gut epithelial and is associated with gut and faecal contents. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 115: s91.
- Chew FT, Zhang L, Ho TM, Lee BW, 1999. House dust mite fauna of tropical Singapore. *Clin. Exp. Allergy*, 29: 201–206.
- Fernández-Caldas E, Lockey RF, 2004. *Blomia tropicalis*, a mite whose time has come. *Allergy*, 59: 1 161–1 164.
- Fu RL, Liu ZG, Xing M, Li L, Zou ZH, 2004. Antigenic localization of specific allergen in the body of *Dermatophagoides pteronyssinus* by immunohistochemistry. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 22(4): 243–245. [付仁龙, 刘志刚, 邢苗, 李莉, 邹泽红, 2004. 屋尘螨特异性变应原的定位研究. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 22(4): 243–245]
- Kuo IC, Cheong N, Trakultivakorn M, Lee BW, Chua KY, 2003. An extensive study of human IgE cross-reactivity of Blo t 5 and Der P5. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 11: 603–609.
- Li M, Bao Y, Liu ZG, 2007. Study on the localization of a major allergen Der f 2 by fluorescence immunohistochemical method. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 25(1): 49–52. [李盟, 包莹, 刘志刚, 2007. 粉尘螨 2 型变应原抗原定位的研究. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 25(1): 49–52]
- Liu ZG, Li M, Bao Y, Fu RL, Su DM, 2005. Antigenic localization of Der P1 in the body of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* by immunohistochemistry. *Acta Entomologica Sinica*, 48(6): 833–836. [刘志刚, 李盟, 包莹, 付仁龙, 苏东明, 2005. 屋尘螨 I 类变应原 Der p1 的体内定位. *昆虫学报*, 48(6): 833–836]
- Puerta L, Caraballo L, Fernández-Caldas E, Avjioglu A, Marsh DG, Lockey RF, Dao ML, 1996. Nucleotide sequence analysis of a complementary DNA coding for a *Blomia tropicalis* allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 98(5): 932–937.
- Tsai JJ, Wu HH, Shen HD, Shen HD, Hsu HL, Wang SO, 1998. Sensitization to *Blomia tropicalis* among asthmatic patients in Taiwan. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 115: 144–149.
- Thomas WR, Chua KY, 1995. The major mite allergen Der p-2 a secretion of the male mite reproductive tract? *Clin. Exp. Allergy*, 25: 667–669.
- Tovey ER, Baldo BA, 1990. Localization of antigens and allergens in thin sections of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *J. Med. Entomol.*, 27: 368–376.
- van Bronswijk JE, Cock AW, Oshima S, 1973. The genus *Blomia* Oudemans (Acari: Glycyphagidae). I. Description of *Blomia tropicalis* sp. n. from house dust in tropical and subtropical regions. *Acarologia*, 15: 477–489.
- Voorhorst R, Spijksma F, Varekam PN, Leupen M, Lyklema A, 1967. The house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergens it produces: Identity with the house dust allergen. *J. Allergy*, 39: 325–328.
- Yi FC, Cheong N, Shek PC, Wang DY, Lee BW, 2002. Identification of shared and unique immunoglobulin E epitopes of the highly conserved tropomyosins in *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin. Exp. Allergy*, 32(8): 1 203–1 210.

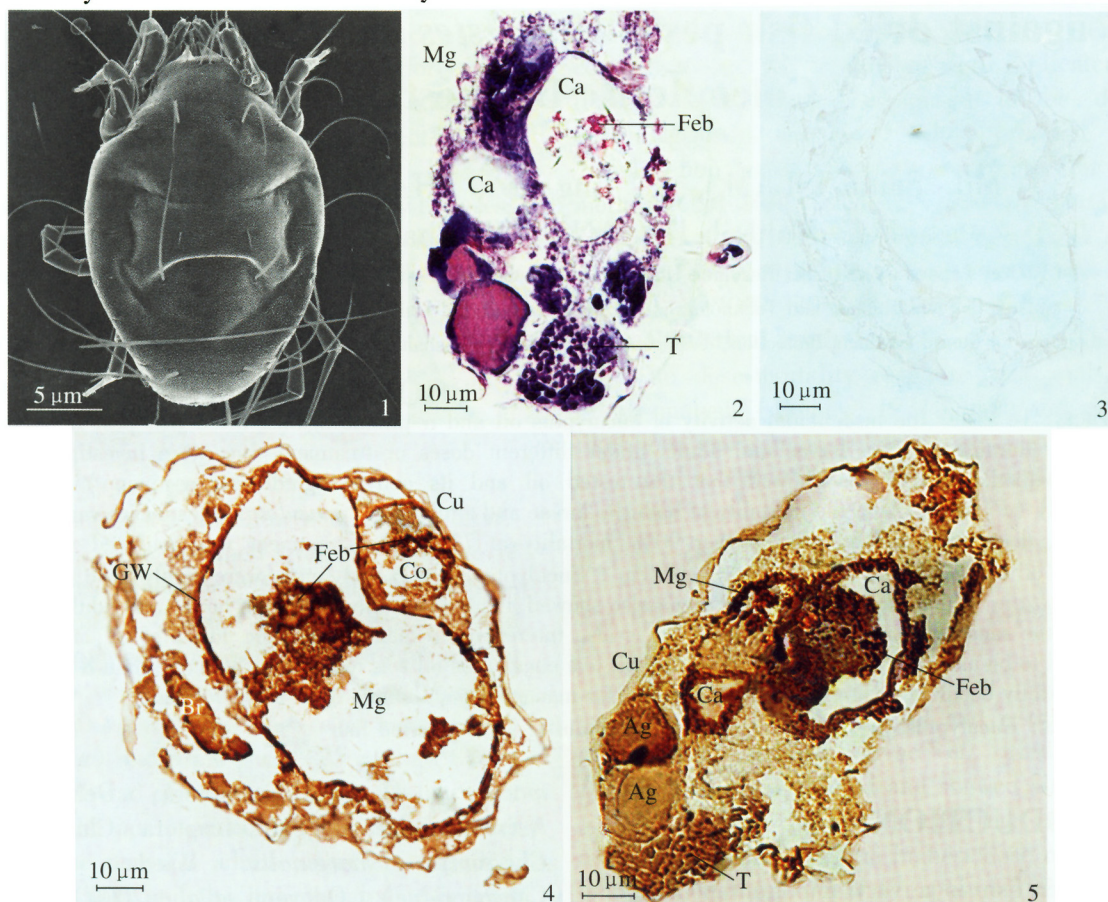
(责任编辑:袁德成)

吴桂华等:热带无爪螨特异性变应原定位

图版 I

WU Gui-Hua *et al.*: Localization of the specific allergens in the body of *Blomia tropicalis* by immunohistochemistry

Plate I



1. 热带无爪螨形态学观察(扫描电镜)(背面)Morphologic observation of a live *Blomia tropicalis* by scanning electron microscope (dorsal); 2. HE 石蜡切片横切面示热带无爪螨内部结构 Internal structure of *Blomia tropicalis* (paraffin section stained with HE) (♂); 3. 免疫组化染色热带无爪螨横切面阴性对照 Cross section of the mite body of the negative control; 4. 横切面示免疫组化热带无爪螨特异性抗原存在部位 Cross section shows the specific allergen location of *Blomia tropicalis* by immunohistochemistry; 5. 矢状切面示免疫组化热带无爪螨特异性抗原存在部位 Sagittal section shows the specific allergen location of *Blomia tropicalis* by immunohistochemistry (♂). Ag: 附属腺 Accessory gland; Br: 脑 Brain; Ca: 盲囊 Caecum; Co: 结肠 Colon; Cu: 体壁 Cuticle; Feb: 粪便颗粒(肠内容物)Fecal ball (caecum content); GW: 肠壁 Gut wall; L: 腿 Leg; Mg: 中肠 Midgut; T: 睾丸 Testis.