

重组霍乱毒素 B 亚基与疟原虫多表位融合蛋白 的免疫保护作用研究

曹 诚 李 平 石成华 钟 辉 李杰之¹ 时运林* 马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100850)

摘 要 对以霍乱毒素 B 亚基为载体蛋白的重组疟疾多价抗原在小鼠及恒河猴中的免疫原性及对相应疟原虫感染的免疫保护作用进行了研究。结果表明,该抗原免疫小鼠后,对约氏疟孢子攻击的保护率在 50% 左右,恒河猴免疫后用 1×10^8 食蟹疟裂殖子攻击,对照组 2 只动物在攻击后 4d 感染,感染持续 30d 以上,免疫组 2 只动物中,两只动物在感染 6~7d 后完全恢复,且 1 只推迟 3d 感染,说明该抗原具有免疫保护作用。

关键词 疟疾疫苗,霍乱毒素 B 亚基

中图分类号 Q342 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0333-04

疟疾是严重的寄生虫病,全世界每年大约有 300 万人死于疟疾,在我国的海南、云南地区,疟疾流行仍较严重。由于抗药性的产生,给药物治疗带来困难,因此,研制有效的疟疾疫苗一直受到极大的重视。

由于疟原虫的生活史极为复杂,其抗原性弱且有很强的抗原变异性,因此疟疾疫苗研究遇到了极大的困难。近年来,随着分子生物学等现代技术的发展,对疟原虫抗原及免疫保护作用的研究日益深入,出现了以 Spf66 为代表的疫苗应用于临床试验,但其免疫效果不肯定^[1]。由于疟原虫自然感染后未见明显的保护,因此我们认为要研制有效的疟疾疫苗必须寻求有效的免疫增强途径,提高机体对抗原的免疫应答水平。我们通过遗传工程途径,在大肠杆菌中表达了霍乱毒素 B 亚基与疟原虫多价抗原的融合蛋白^[2],研究表明该抗原具有良好的免疫原性,其中的 CTB 部分具有良好的佐剂活性,不加其它佐剂免疫小鼠后产生高滴度的抗 CTB 抗体、抗疟原虫抗体及疟原虫特异性 CTL 细胞^[3]。

由于恶性疟除人体外,仅能感染哥伦比亚的夜猴(*Aotus monkey*),其来源极其有限,给疫苗效果的初步评价带来很大困难。近年的研究表明,恶性疟孢子抗原(CSP)免疫小鼠后,对约氏疟(*Plasmod-*

ium yoelii)孢子的攻击有交叉免疫保护作用^[4];猴食蟹疟(*P. cynomolgi*)也被用作人间日疟(*P. vivax*)疫苗研究的模型^[5],由于本研究应用的抗原(AWTE)含有孢子抗原(CSP)及在恶性疟及间日疟间有免疫交叉保护作用的表位 NKND^[5],因此小鼠及恒河猴有可能用作评价该候选疫苗的动物模型。

1 材料与方法

1.1 重组抗原

重组质粒 pMC-AWTE 本室袁清安等构建,该质粒转化大肠杆菌 *E. coli* TK104(本室保存)后能表达 CTB 与疟原虫多抗原表位的融合蛋白。该融合蛋白分泌性表达,通过亲和层析纯化后 -20℃ 保存。

1.2 实验动物及攻击用虫株

C57BL/6J(18~20g/只)小鼠及恒河猴(3kg 左右)均购自军事医学科学院实验动物中心,所用恒河猴使用前均经镜检证实没有疟原虫感染。小鼠约氏疟原虫(*P. yoelii*)由首都医科大学保存,食蟹猴疟原虫(*P. cynomolgi*)由军事医学科学院时运林教授提供。

1.3 约氏疟孢子的制备

感染约氏疟的按蚊(雌蚊)剪去腹部后,加入生

收稿日期:1999-02-01,修回日期:1999-11-10。

基金项目:国家高技术研究与发展计划资助项目(863-102-10-9)。

* 军事医学科学院微生物流行病学研究所。

理盐水研磨匀浆,显微计数,用无菌生理盐水将孢子浓度调整为 $1.25 \times 10^5/\text{mL}$,备用。

1.4 食蟹猴疟原虫裂殖子制备

通过蚊媒叮咬使恒河猴感染,在攻击前制作薄片,经姬母萨染色后计算感染红细胞的比例,同时取血进行红细胞计数,以计算攻击用裂殖子剂量。

1.5 免疫原性分析

疟原虫特异性 CTL 细胞测定参见文献[6], CTB 抗体测定参见文献[7]。

抗疟原虫表位抗体测定方法如下:将 AWTE 抗原中的疟原虫抗原基因切下克隆至大肠杆菌表达载体 pBV220,在大肠杆菌中表达重组抗原,经制备电泳纯化后包被酶联板,用于测定抗疟原虫表位抗体,后续测定步骤与 CTB 抗体的测定相同。

1.6 攻击试验

小鼠第3次免疫后1周,通过腹腔注射约氏疟孢子攻击,从第3天开始每天涂片镜检感染结果。恒河猴在攻击前14d进行1次加强免疫,通过静脉注射感染了食蟹猴疟原虫的红细胞,攻击剂量为 1×10^8 。

2 结果与讨论

2.1 AWTE 抗原免疫恒河猴后产生细胞和体液免疫效应

重组抗原 $100\mu\text{g}$,通过大腿肌肉注射免疫恒河猴,在14、28d各加强免疫1次,取静脉血测定抗体产生情况,结果表明,免疫动物能产生高滴度的抗 CTB 抗体,抗疟原虫表位抗体滴度也可达 1:6400 (图1)。

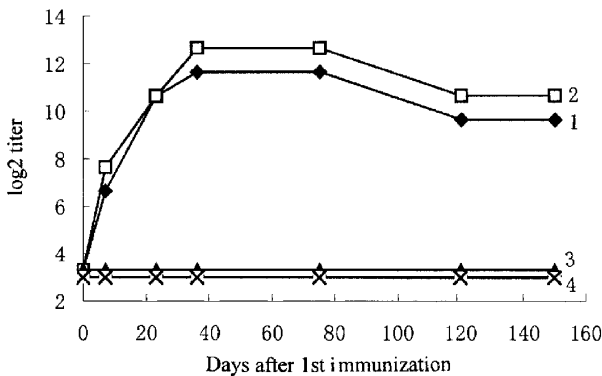


图1 AWTE 抗原免疫恒河猴后产生抗疟原虫表位抗体
Fig.1 Anti-p. f epitope antibody after AWTE immunization to rhesus monkeys
Immunization group 1. 1[#] monkey; 2. 2[#] monkey;
Control group 3. 3[#] monkey; 4. 4[#] monkey

在第三次免疫2周后取血,分离外周血单核细胞(PBMC)进行CTL活性分析,结果表明重组抗原免疫恒河猴后,能刺激机体产生特异性杀伤T细胞。

由于在免疫时并未加其它佐剂,说明霍乱毒素B亚基具有良好的佐剂活性。AWTE 抗原有可能在小鼠及恒河猴中诱发较好的免疫保护。

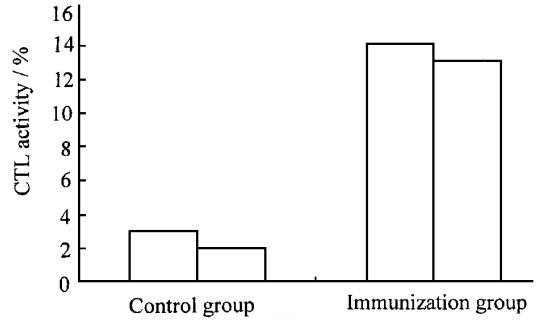


图2 AWTE 抗原免疫恒河猴后能产生特异性 CTL 细胞
Fig.2 CTL activity after AWTE immunization to rhesus monkeys

2.2 C57BL/6J 小鼠免疫后的保护作用

60只小鼠分为3组,每组20只,分别用 $10\mu\text{g}$ 重组霍乱毒素B亚基(Control), $10\mu\text{g}$ 重组 AWTE 融合抗原(AWTE10)及 $50\mu\text{g}$ 融合抗原(AWTE50)分别于0、7、28d免疫3次,第3次免疫后进行攻击试验。攻击试验时,20只小鼠分为两小组,每组10只,分别通过腹腔注射 1.25×10^4 及 2.5×10^4 个约氏疟孢子,取尾血涂片检验感染情况,20d内不出现显性感染的动物即认为得到了保护,结果如图3。

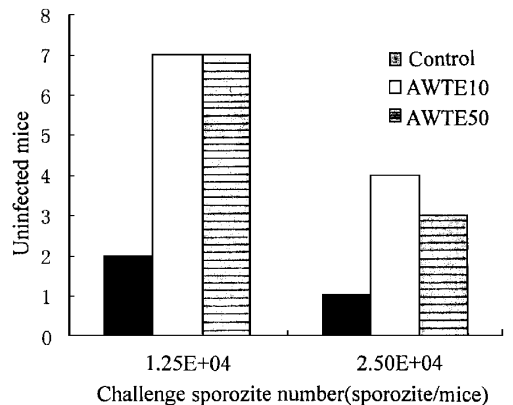


图3 AWTE 抗原免疫小鼠后的免疫保护情况
Fig.3 Protective efficacy after AWTE immunization to mice

图3的结果表明,无论是 $10\mu\text{g}$ 还是 $50\mu\text{g}$ 组,小鼠在免疫后均对约氏疟的攻击产生显著的保护作用。

用。在 12 500 孢子攻击时,免疫组 10 只小鼠均有 7 只没有出现显性感染,而对照组仅 2 只(保护率为 50%);为了证实该结果的可靠性,本保护性研究重复了 2 次,均获得类似结果,说明 AWTE 抗原免疫小鼠后的确具有免疫保护作用。

3 恒河猴免疫后的保护作用

由于猴疟(*P. cynomolgi*)与人间日疟(*P. vivax*)具有生物学、遗传学的近似性,在疟疾疫苗的研究中也常以 *P. cynomolgi* 作为间日疟的模型,获得了好的研究结果。因此用恒河猴作为动物模型,重组 AWTE 抗原免疫后用食蟹疟攻击,其结果可能更接近于人体的情况。

恒河猴用 100 μ g 重组抗原分别于 0, 14, 28d 免疫 3 次,在攻击前 7d 距第 1 次免疫 143d 用同样剂量再加强免疫 1 次,然后用 10⁸ 感染食蟹疟的红细胞通过静脉注射攻击,攻击时间应该在最后一次免疫后 60d 左右,这时的免疫后应处于较高水平,但由于食蟹疟原虫的饲养出现问题,所以我们的攻击时间要推迟一些,攻击结果见图 4。

由图 4 可见,对照猴在攻击后第 5 天均出现显性感染,且虫血症迅速达到高峰,感染至少持续 30d 以上。免疫组中,有一只感染时间推迟了 3d,两只猴在攻击后 11, 15d 完全恢复,显性感染仅持续 5~7d。从寄生虫血症数量看,除免疫组中一只短暂达到 8% 且仅持续 2d 外,其虫血症也明显低于对照组。

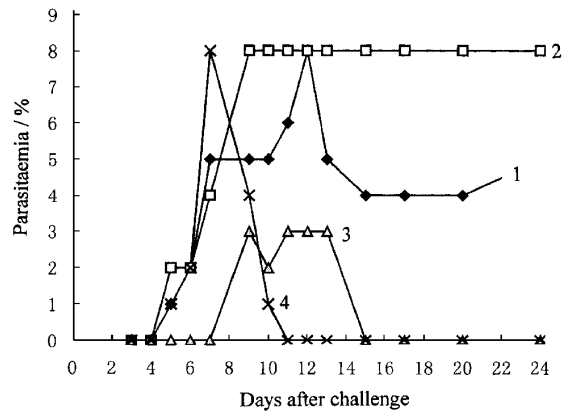


图 4 AWTE 免疫恒河猴后,恒河猴对食蟹疟裂殖子攻击的保护作用

Fig. 4 Protective efficacy after AWTE immunization to rhesus monkeys

1. Control 1; 2. Control 2; 3. Vaccinated 1[#]; 4. Vaccinated 2[#]

本研究中,攻击用的裂殖子数量较通常的(静脉)攻击剂量(10⁶)高得多,因此如果降低攻击剂量,可望产生更好的免疫保护效果。

以 HBcAg 为载体蛋白通过基因融合途径构建的疟疾疫苗在人体试验中取得了良好的保护效果^[8]。本研究以小鼠和恒河猴为模型,证实了霍乱毒素 B 亚基与恶性疟多价抗原表位的融合蛋白的免疫保护作用,与文献中报道的 CTB 的免疫增强作用相一致^[9]。这些结果表明,应用合适的佐剂和载体蛋白以增强抗原的免疫原性对于研究有效的疟疾疫苗是非常重要的。

参 考 文 献

- [1] Nosten F, Luxemburger C, Kyle D E et al. *Lancet*, 1996, **14**: 701~707
- [2] 袁清安,曹 诚,石成华等. *生物工程学报*, 1996, **7**: 54~59
- [3] 李 平,曹 诚,石成华等. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, **20**(2): 149~151
- [4] Bharadwaj A, Sharma P, Joshi S et al. *Infect Immun*, 1998, **66**: 3232
- [5] Perera K L, Handunnetti S M, Holm I, Longacre S et al. *Infect Immun*, 1998, **60**: 1500~1506
- [6] Cheng Q, Jones G, Liu E X et al. *Mol Biochem Parasitol*, 1991, **49**: 73~82
- [7] Lagging L M, Meyer K, Hoft D et al. *J Virol*, 1995, **69**: 5859~5863
- [8] Shi C H, Cao C, Zhang J S et al. *Vaccine*, 1995, **13**: 933~937
- [9] Stoute J A, Saloui M, Happner D G. *N Engl J Med*, 1997, **336**: 86~91

Induction of Protective Immune Response in Mice and Rhesus Monkeys by Immunization with Fusion Protein of Cholera Toxin B Subunit and Multiples of *Plasmodium falciparum*

CAO Cheng LI Ping SHI Cheng-Hua ZHONG Hui LI Jie-Zhi SHI Yun-Lin MA Qing-Jun
(Beijing Institute of Biotechnology ,Academy of Military Medical Sciences ,Beijing 100850)

Abstract Recombinant fusion protein of cholera toxin B subunit (CTB) and poly-valent protective epitopes of plasmodium falciparum was given to *i. m* to C57BL/6j mice and rhesus monkeys three times. In rhesus monkeys high level of antibodies for CTB (1 :6400) and malaria epitopes (1 :3200) antibodies were elicited as well as the specific CTL activity for *P. plasmodium*. After the mice were challenged with sporozoites of *P. yoelli*, about 50% of them were protected from the patent infection. A blood-stage challenge with 10^8 of *P. cynomolgi* parasite were given to rhesus monkeys, which showed that two animals in control group were patent infection for at least 30 days in contrast the two animals immunized were recovered respectively at the day of 11 and 15 after challenges. The results suggested that cholera toxin acts as an effective adjuvant in the development of malaria vaccine.

Key words Malaria vaccine, cholera toxin