

重组霍乱毒素 B 亚基与恶性疟原虫多抗原表位融合蛋白 对恒河猴的免疫保护作用研究

李 平 钟 辉¹ 石成华¹ 李杰之¹ 张艳红¹

李楚芳¹ 时运林² 马清钧¹ 曹 诚^{1*}

¹(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100850)

²(军事医学科学院微生物与流行病学研究所,北京 100071)

摘 要 使用重组霍乱毒素 B 亚基(CTB)与恶性疟原虫抗原表位融合蛋白(AWTE)免疫恒河猴,研究其免疫应答并观察对食蟹疟原虫攻击的保护作用。结果表明,在 0、14、28 天分别通过鼻腔和肌肉注射免疫恒河猴,第 3 次免疫后 2 周,抗 CTB 抗体平均滴度可达 1:512(鼻腔免疫)和 1:1000(肌肉免疫),肌肉免疫后抗疟原虫抗体滴度也显著高于鼻腔免疫组。用 1.25×10^8 个食蟹疟孢子攻击,对照组 5 只恒河猴在攻击后 10~14d 全部感染,其中 1 只在攻击后 21d 死亡,另 4 只重度感染,感染持续 30d 以上。鼻腔免疫组的 5 只动物均在攻击 20d 后出现原虫,其中 3 只轻度感染,感染持续 4d 后即恢复,其余 2 只感染持续 36d 以上。肌肉注射组 3 只未受感染,其余 2 只在攻击后 19d 后轻度感染,感染 4d 后即完全恢复。以上结果表明,使用霍乱毒素 B 亚基为载体蛋白构建的重组疟疾疫苗具有良好的免疫原性,对食蟹疟攻击具有良好的交叉免疫保护作用。

关键词 疟疾,疫苗,霍乱毒素 B 亚基,恒河猴

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)04-0516-04

疟疾是最严重的寄生虫病之一,全世界每年有近 200 万人死于疟疾感染。研制有效的疟疾疫苗对于控制疟疾感染具有重要意义。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,以 SPF66 为代表的疫苗已应用于临床试验,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对研制有效的抗疟疫苗具有重要意义。霍乱毒素 B 亚单位(CTB)是良好的佐剂,通过表达 CTB 与病原体抗原表位的融合蛋白,可以在不使用其他佐剂时产生抗 CTB 和抗原表位抗体。为了构建有效的疫苗,本研究选用了恶性疟原虫红内期裂殖子 T、B 细胞表位及红外期孢子表面 T、B 细胞表位,在大肠杆菌中表达了霍乱毒素 B 亚基与上述多价抗原表位的融合蛋白。该融合蛋白免疫小鼠后可产生

高滴度的抗 CTB 抗体、抗疟原虫抗体及疟原虫抗原特异的 CTL 细胞。当使用约氏疟(*P. yoelli*)孢子攻击时,免疫组小鼠对攻击的保护率在 50% 左右^[2]。由于恶性疟除感染人体外,仅能感染哥伦比亚猴(*Aotus monkey*),其供应极其有限,给疫苗效果的初步评价带来很大困难。由于猴食蟹疟(*P. cynomolgi*)也被用作人间日疟(*P. vivax*)疫苗研究的模型^[3],且本研究使用的抗原中,表位 NKND 在不同疟原虫间有免疫交叉反应,食蟹疟原虫与恶性疟原虫裂殖子抗原同源性在 57% 左右,T 细胞抗原表位也非常保守,可能对食蟹疟原虫的攻击具有交叉免疫保护作用。因此选用恒河猴作模型,使用上述抗原免疫后使用食蟹疟攻击,以评价该重组融合蛋白免疫大动物后对疟原虫攻击的保护作用。此前使用该融合蛋白免疫 2 只恒河猴,产生了部分的免疫保护^[2],但是由于实验动物数量太少,难以评价疫苗的免疫效果,本研究进一步通过肌肉免疫和鼻腔免疫途径各免疫 5 只恒河猴,以评价疫苗的保护效

果。

1 材料与方法

1.1 重组抗原

重组质粒 pMC-AWTE 本实验室袁清安等构建^[4]，该质粒转化大肠杆菌 *E. coli* TK1046(本室保存) 后能表达 CTB 与疟原虫多抗原表位的融合蛋白，分别包括孢子抗原 B 细胞表位 NANP、孢子抗原 T 细胞表位 CST3(368-397 氨基酸，含有 Th 细胞表位和 CTL 表位) 以及裂殖子表面抗原的表位 (Spf55.1, Spf83.1 以及 Spf35.1)。该融合蛋白分泌性表达，通过亲和层析纯化后 - 20℃ 保存。

1.2 免疫方案

分别在 0、28、90d 通过鼻腔、肌肉两种途径接种经镜检证实没有疟原虫感染、体重 2 ~ 3.5kg 的恒河猴 (*Macaca Malatta*，军事医学科学院实验动物中心)。免疫剂量为鼻腔 0.1mg/只，肌肉 0.5mg/只。免疫后每 7 天采血检测抗体产生情况。

1.3 抗体测定

抗 CTB 抗体使用 ELISA 法测定。溶于碳酸盐缓冲液中 (pH9.6) 的 CTB (1μg/mL) 包被酶联板，4℃ 过夜。用 10% 的小牛血清于 37℃ 封闭 2h，每孔加入 100μL 适当稀释的待检血清，37℃ 孵育 1h，用 PBST 洗涤 4 次后，加入羊抗猴 IgG-HRP，37℃ 孵育 30min，同上洗涤后使用 OPD 底物显色，于 492nm 波长测定吸光值 (A_{492})。

抗疟原虫表位抗体采用免疫荧光法 (IFA) 测定，方法简述如下：体外培养的恶性疟原虫裂殖子，涂薄片，丙酮固定 10min，加入不同稀释度的待测抗体，室温于湿盒中孵育 30min。加入荧光标记的二抗 (羊抗猴 IgG-FITC)，避光湿盒中室温放置 30min，甘油封片后使用荧光显微镜镜检。根据荧光的强度来判定血清中抗体的滴度。

1.4 食蟹疟原虫的攻击实验

液氮冻存的食蟹疟原虫冷冻虫种 (军事医学科学院微生物流行病学研究所) 接种 2 只健康正常猴，接种后第 9 ~ 13 天时 (配子体密度一般较高) 让斯氏按蚊 (*A. Steohensi*) 叮咬，感染的蚊子饲养在 26℃ 的养蚊室。从感染良好的斯氏按蚊胸部提取食蟹猴疟原虫子孢子，用生理盐水配成 6.25×10^7 /mL。后腿静脉接种孢子悬液 2mL 进行攻击。攻击后第 7 天开始每天采耳血涂血片，Giemsa 染色后镜检，观察其出虫时间和原虫血症的消长情况。

2 结果与讨论

2.1 抗原的免疫原性

15 只恒河猴分为 3 组，每组 5 只。在 0、28、90d 分别使用 20mmol/L PBS 0.5mL (对照组) 或溶解于 PBS 的 CTB-AWTE 融合蛋白 0.5mg (肌肉免疫组) 通过大腿肌肉注射，鼻腔免疫组通过鼻腔滴注溶解于 PBS 的 CTB-AWTE 融合蛋白 0.1mg/只。免疫后每 7 天采血进行抗体检测。

2.1.1 抗疟原虫抗体 3 次免疫后 7、14d 的恒河猴血清，1:25、1:100、1:400、1:1600 稀释，用间接免疫荧光法测定抗疟原虫抗体。结果表明，鼻腔免疫组抗体滴度在 1:25 至 1:100，肌肉免疫后抗体滴度可达 1:400 ~ 1:1600 左右。

2.1.2 抗 CTB 抗体 第一次免疫后每 7 天抽血检测抗 CTB 抗体，结果表明经鼻腔免疫后 2 周可产生 1:200 左右的抗 CTB 抗体，加强免疫对抗体滴度的影响不大。肌注免疫组，第一次免疫后 2 周，抗体的几何平均滴度可达 1:1000，加强免疫后 1 ~ 2 周抗体滴度可达 1:2000 ~ 1:4000，第三次免疫后 1 周抗体滴度超过 1:10000，随后抗体滴度缓慢下降，但第三次免疫后 5 周抗体滴度仍达到 1:5000 左右 (图 1)。

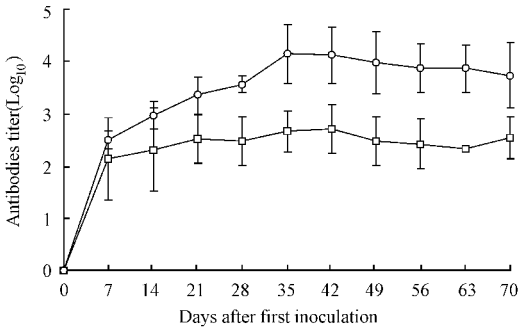


图 1 CTB-AWTE 融合蛋白通过鼻腔 (□) 和肌肉注射 (○) 免疫恒河猴后的抗 CTB 抗体反应曲线
Fig. 1 Anti-CTB antibodies responses in the rhesus monkeys inoculated with AWTE antigen i. n or i. m.

上述结果表明，CTB-AWTE 融合蛋白通过鼻腔和肌肉免疫恒河猴后均可产生抗疟原虫抗体和抗 CTB 抗体，通过肌肉免疫产生的抗体滴度远高于鼻腔免疫。

2.2 攻击后的保护作用

食蟹疟原虫可在多种不同的猴体内发育，它在血液中无性生活周期为 48h，其形态学及其它生物学特征与人类疟原虫相似，可产生与间日疟很相似的原虫血症，但其毒性较低，一般不引起动物死亡，因此可以观察到攻击后从寄生虫血症产生、发病直

至恢复的全过程。在第三次免疫 63d 后用 1.25×10^8 个食蟹疟子孢子攻击,攻击后每天涂血片检测虫血症出现情况,并计算感染红细胞占红细胞的百分数。结果表明,对照组 5 只动物中,全部在 10~14d 出现寄生虫血症,其中 1 只在攻击后 22d 死亡。攻击后 28d 虫血症达到高峰,红细胞感染率达 30% 左右,攻击 35d 后感染率下降,攻击后 50~55d 后虫血症消失,寄生虫血症持续 35~45d(图 2)。鼻腔免疫组 5 只动物均在攻击后 19d 出现虫血症,但其中 3 只仅出现低度(感染率 $< 5\%$)虫血症,而且仅持续 4d 后虫血症消失。另外 2 只出现严重的寄生虫血症,直至攻击后 49~50d 才完全恢复(图 3)。肌肉免疫组的 5 只动物攻击后,其中 3 只直至攻击后 60 天未出现虫血症,另外 2 只在攻击后 19d 出现轻(感染率 $< 5\%$)中($5\% < \text{感染率} < 10\%$)度寄生虫血症,虫血症仅持续 4d 即消失(图 4)。以上结果表明,融合抗原免疫恒河猴后特别是通过肌肉注射免疫后,可以产生有效的免疫保护。肌肉注射免疫组免疫后,多数动物(60%)得到完全的免疫保护,其他感染动物寄生虫血症出现时间延迟 5~8d,感染程度显著减轻,寄生虫血症持续时间(4d)显著缩短。说明该候选疫苗免疫恒河猴后,对食蟹疟的攻击具有显著的交叉免疫保护作用。

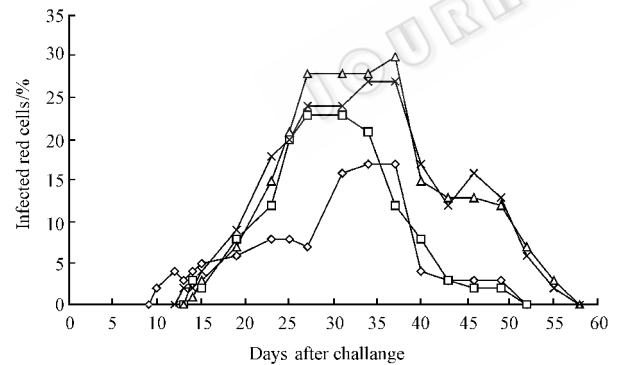


图 2 食蟹疟子孢子攻击对照组恒河猴后红细胞感染率(未包括 1 只死亡动物)

Fig.2 Percentage of infected red cells after the monkeys in control group were challenged by *P. cynomolgi*
□◇△× indicates percentage of infected red cells when the monkeys in control group were challenged by *P. cynomolgi* respectively

3 讨论

本研究使用霍乱毒素 B 亚单位与恶性疟原虫多抗原表位融合蛋白免疫恒河猴后,可产生高滴度的抗霍乱毒素 B 亚基及抗疟原虫抗体,说明融合蛋白具有良好的免疫原性。使用食蟹疟子孢子攻击

后,鼻腔免疫组有一定的免疫保护作用,而肌肉免疫

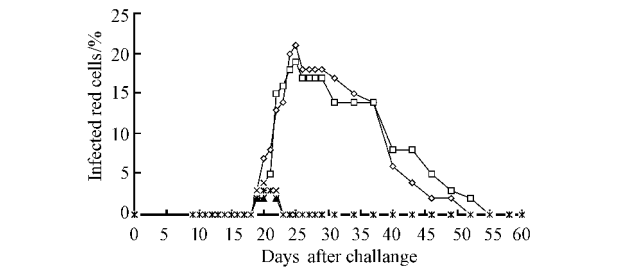


图 3 食蟹疟子孢子攻击鼻腔免疫组恒河猴后红细胞感染率

Fig.3 Percentage of red cells infected after the monkeys in i. n. group were challenged by *P. cynomolgi*
□◇△× show Percentage of infected red cells after the five monkeys in i. n. group were challenged by *P. cynomolgi*

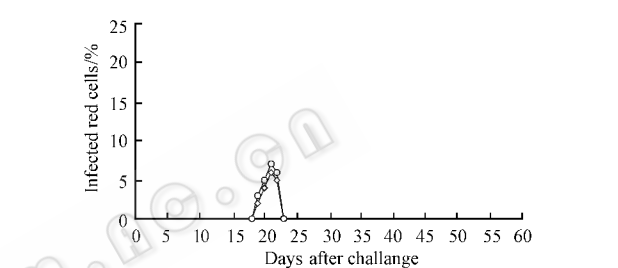


图 4 食蟹疟子孢子攻击肌肉免疫组恒河猴后寄生虫血症(未包括 3 只未感染动物)

Fig.4 Percentage of infected red cells after the monkeys in i. m. group were challenged by *P. cynomolgi*
□○ show Percentage of infected red cells when the two monkeys in i. m. group were challenged by *P. cynomolgi*

组则显示出较好的免疫保护作用。我们使用小鼠模型,使用 CTB-AWTE 免疫小鼠后用小鼠约氏疟子孢子攻击,也观察到明显的交叉免疫保护作用^[2]。本研究所应用的恶性疟原虫与食蟹疟原虫抗原表位相比,子孢子抗原 B 表位 NANP 对应序列为 NAGG, CST3 T 细胞抗原表位的同源性为 50%,相似性达 80%,而两种疟原虫裂殖子抗原的相似性为 57%,因此基于恶性疟原虫抗原设计的该候选疫苗,免疫恒河猴对食蟹疟的攻击产生了交叉免疫保护。特别是近年的研究表明,CST3 抗原表位与疟疾候选疫苗的保护性密切相关,本研究中较好的交叉免疫保护效果可能与融合抗原中的 T 细胞表位有关^[5,6]。此外,霍乱毒素 B 亚基是较强的免疫佐剂,不排除产生一定的非特异性免疫保护。总之,在没有合适的动物模型时,使用小鼠及恒河猴作为动物模型评价疫苗的效果具有可行性。

REFERENCES(参考文献)

- immune responses by immunization with linear multiepitope peptides based on conserved sequences from *Plasmodium falciparum* antigens. *Infect Immun*, 1998, **66**: 3232 – 3235
- [2] Cao X (曹诚), Li P (李平), Shi CH (石成华) *et al.* Induction of protective immunization with fusion protein of cholera toxin B subunit and multiples of *plasmodium falciparum*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16**: 333 – 335
- [3] Perera KL, Handunnetti SM, Holm I *et al.* Baculovirus merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant antigens are highly protective in a natural primate model for human *Plasmodium vivax* malaria. *Infect Immun*, 1998, **60**: 1500 – 1506
- [4] Yuan QA (袁清安), Cao X (曹诚), Shi CH (石成华) *et al.* Fusion and expression of multiple epitopes of malaria *plasmodium falciparum*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1996, **7**: 54 – 59
- [5] Reece WH, Pinder M, Gothard PK *et al.* A CD4(+) T-cell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural *Plasmodium falciparum* infection and disease. *Nature Medicine*, 2004, **10**: 406 – 410
- [6] Sun P, Schwenk R, White K *et al.* Protective immunity induced with malaria vaccine, RTS,S, is linked to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-specific CD4+ and CD8+ T cell subsets producing IFN-gamma. *J Immunol*, 2003, **171**: 6961 – 6967

Induction of Protective Immunity in Rhesus Monkey by Inoculation with Recombinant Fusion Protein of Cholera Toxin B Subunit-Multivalent Epitopes of *Plasmodium falciparum*

LI Ping¹ ZHONG Hui¹ SHI Cheng-Hua¹ LI Jie-Zhi¹ ZHANG Yan-Hong¹

LI Chu-Fang¹ SHI Yun-Lin² MA Qing-Jun¹ CAO Cheng^{1*}

¹(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100850, China)

²(Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

Abstract Rhesus monkeys (5 in each group) were inoculated with recombinant fusion protein of cholera toxin B subunit and multi-valent epitopes of *Plasmodium falciparum* intranasal or intramuscular (i. m.). Immune-responses and protective effect were evaluated. The antibody titer (Geometry mean) against CTB reached 1:512 (intranasal) and 1:10000 (i. m) 14 day after 3rd immunization, and antibodies against *P. falciparum* were also elucidated, the titers in i. m. group were also significantly higher than that in intranasal group. The monkeys were challenged with 1.25×10^8 sporozoites of *P. cynomolgi*, Patent infection was observed in all 5 monkeys in control group inoculated with PBS in 10 ~ 14 days after challenge. Patent infection was also observed in 5 animals inoculated via intranasal and 2 animals in intramuscular group 19th days after challenge, But the infection last only 4 days in 3 animals in intranasal group and 2 animals in intramuscular group. The results demonstrated that the vaccine candidate could induce protective immune-responses in rhesus monkey against the challenge of *P. cynomolgi*.

Key words malaria, vaccine, cholera toxin B subunit, rhesus monkey

Received: 01-02-2004

This work was supported by grant from National "863" High-Tech. Project (Grant No. 2001AA215021).

* Corresponding author. Tel 86-10-68155151, Fax: 86-10-68155151, E-mail: cao.c@ibp.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>