

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21720081152505

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

不同约氏疟原虫虫株对小鼠的致病性研究及重组人胸腺素 α 原在预防疟原虫感染中的作用

Study on Pathogenicity of Different Strains of *Plasmodium.yolii* in Mouse and Effect of Recombinant Human Prothymosin α on Prevention to *Plasmodium* Infection

高 吉 青

指导教师姓名: 刘 升 发 教 授

专 业 名 称: 动 物 学

论文提交日期: 2011 年 05 月

论文答辩时间: 2011 年 06 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: 杨文川教授

评 阅 人: _____

2011 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

| | |
|--|----|
| 中文摘要 | 1 |
| 英文摘要 | 3 |
| 第一章 前言 | 5 |
| 1 疟疾概述 | 5 |
| 2 宿主免疫应答机制及疟疾治疗方案与机制的研究 | 6 |
| 3 胸腺素 α 原概述 | 11 |
| 4 本课题的研究目的及意义 | 13 |
| 第二章 两株同源约氏疟原虫的研究 | 15 |
| 1 材料与方法 | 15 |
| 2 结果与分析 | 19 |
| 3 讨论 | 28 |
| 第三章 <i>P. yoelii</i> 全虫可溶性蛋白的研究 | 30 |
| 1 材料与方法 | 30 |
| 2 结果与分析 | 33 |
| 3 讨论 | 35 |
| 第四章 ProT α 作为约氏疟原虫蛋白疫苗免疫佐剂的研究 | 36 |
| 1 材料与方法 | 36 |
| 2 结果与分析 | 38 |
| 3 讨论 | 43 |
| 第五章 腹腔注射 ProT α 对提高小鼠抵抗疟原虫能力的初步研究 | 45 |
| 1 材料与方法 | 45 |
| 2 结果与分析 | 45 |
| 3 讨论 | 48 |

| | |
|----------------|----|
| 第六章 小结与展望..... | 50 |
| 参考文献..... | 51 |

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENTS

| | |
|---|----|
| ABSTRACT IN CHINESE..... | 1 |
| ABSTRACT IN ENGLISH..... | 3 |
| Chapter I Preface..... | 5 |
| 1 Summarize of malaria | 5 |
| 2 The research of host immune response mechanisms and treatment of malaria program and mechanisms..... | 6 |
| 3 Summarize of ProT α | 11 |
| 4 The purpose and significance of the study..... | 13 |
| Chapter II Study on two homologous <i>Plasmodium. yojii</i> | 15 |
| 1 Materials and methods..... | 15 |
| 2 Results and analysis..... | 19 |
| 3 Discussion | 28 |
| Chapter III Study on <i>Plasmodium. yojii</i> toatal soluble protein | 30 |
| 1 Materials and methods..... | 30 |
| 2 Results and analysis..... | 33 |
| 3 Discussion | 35 |
| Chapter IV Study on ProT α as <i>Plasmodium. yojii</i> protein vaccine adjuvant..... | 36 |
| 1 Materials and methods..... | 36 |
| 2 Results and analysis..... | 38 |
| 3 Discussion | 43 |
| Chapter V Study on intraperitoneal injection ProT α to improve mice against <i>Plasmodium</i> | 45 |
| 1 Materials and methods..... | 45 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 2 Results and analysis..... | 45 |
| 3 Discussion | 48 |
| Chapter VI Summary and outlook..... | 50 |
| REFERENCES | 51 |

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

疟疾是全球关注、高发的感染性疾病,对人类的生命安全造成了严重的威胁,阐明宿主抵抗疟原虫感染的保护性免疫应答的发生机制,研制行之有效的疟疾疫苗,寻找具有良好作用的抗疟药物和抗疟药物辅助剂是目前控制疟原虫感染和再感染急需解决的问题。胸腺素 α 原(prothymosin α , ProT α)具有广泛的生物学活性,参与对细胞周期的调节,促进细胞增殖,还可以提高免疫细胞活性和增强免疫细胞因子分泌,增强树突状细胞的活性,对于抗原的呈递具有重要作用,有望成为一种很好的候选免疫佐剂和抗疟辅助药物。

本实验研究了约氏疟原虫致死性虫株 *P. yoelii*-17XL、非致死性虫株 *P. yoelii*-17XNL 与重组人 ProT α 之间的关系。实验证明感染了 *P. yoelii*-17XL 的小鼠肝脏细胞中有大量 ProT α 高表达。通过内脏器官指数测定和病理学切片发现,感染了两株疟原虫的小鼠肝脏、脾脏、胸腺均受到了明显的损伤。采用感染 *P. yoelii*-17XNL 的小鼠血清通过皮下注射的方式注射到感染了 *P. yoelii*-17XL 的小鼠体内,可以使这些小鼠的疟原虫血症水平下降,并提高小鼠的存活率(提高了25%)。该结果提示经 *P. yoelii*-17XNL 感染的小鼠血清中含有效抵抗疟疾感染的特异性抗体存在。

采用超声破碎法提取了红内期 *P. yoelii*-17XNL 和 *P. yoelii*-17XL 的全虫可溶性蛋白作为抗原开展保护小鼠抵抗 *P. yoelii*-17XL 感染的研究。应用感染了疟原虫后存活下来的抗血清作为抗体,对两种抗原进行 Western-blotting 免疫印迹实验,结果显示在 19KD、23KD、33KD 和 48KD 等处有明显的杂交条带,这些蛋白与文献报道的裂殖子表面蛋白分子量接近。从另一方面证明这些抗原是具有诱导机体产生有效抗体的抗原成分。

应用 *P. yoelii*-17XNL 全虫可溶性蛋白作为抗原,ProT α 作为免疫佐剂进行保护性实验,经过抗原和佐剂免疫小鼠后,再感染 *P. yoelii*-17XL。结果表明免疫过的小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能增强;用 *P. yoelii*-17XNL 全虫可溶性蛋白作为抗原、用 ProT α 作为佐剂免疫的小鼠抵抗疟原虫感染的保护效果要比单独使用 *P. yoelii*-17XNL 全蛋白免疫效果好,提示了 ProT α 在作为疟疾疫苗佐剂方面的潜在作用。

通过单独腹腔注射 ProT α 的实验结果表明, 提前腹腔注射 ProT α 一段时间, 再感染 *P. yoelii*-17XL, 可以大大降低小鼠的疟原虫血症水平, 提高小鼠的存活率, 表明单独使用 ProT α 就能够有效达到抵抗疟原虫感染的效果。为今后作为辅助抗疟药物方面的研发有重要理论和应用价值。

关键词: *P. yoelii*-17XNL; *P. yoelii*-17XL; 免疫佐剂; ProT α ;

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Malaria is a high incidence and one of the most serious infectious diseases in the world which is harmful to people's health. There are three urgent problems in controlling infection and reinfection of *Plasmodium* in the present: to clarify protective immune response mechanism of host against malaria infection, to develop effective malaria vaccines and to find good anti-malarial drugs and antimalarial agents. Prothymosin α (ProT α) has a wide range of biological activity. It participates in the regulation of cell cycle and promotes cell proliferation. In addition, ProT α can improve the activity of immune cell and the secretion of immune cell cytokine, it can also enhance the activity of dendritic cells and plays an important role in antigen presentation. ProT α can be a good candidate as adjuvant of vaccines and assistant of antimalarial drugs based on the characteristic.

The relationship of *P. yoelii*-17XNL, *P. yoelii*-17XL and recombinant human ProT α has been carried out in this paper. The result shows that a large number of ProT α was highly expressed in liver cells of mice infected with *P. yoelii*-17XL. Based on internal organs index and observation of pathology biopsy, it is found that mice's liver, spleen and thymus have been severely damaged which infected with each of the two strains of malaria parasites. We made subcutaneous injection with serum from survived mice infected with *P. yoelii*-17XNL to the mice infected with *P. yoelii*-17XNL and found that the parasitemia level decreased and survival rate of mice increased (up to 25%). The results show that effective and specific antibodies against malaria exist in the anti-serum.

The whole soluble protein of *P. yoelii*-17XNL and *P. yoelii*-17XL at the erythrocytic stage were extracted by sonication. And these proteins as antigen were used to study of protection against *P. yoelii*-17XL. The Western-blotting electrophoresis using the whole soluble protein as antigen and anti-serum of mice infected *P. yoelii*-17XNL as antibody was carried out, the results showed that there were darker hybridized bands at 19KD,23KD,33KD, 48KD.etc. The molecular weight of these proteins is close to the merozoite surface protein as reported. It proved on the

other hand that these antigens have composition which can induce the effective antibody.

The protection experiment that mice were infected with *P. yoelii*-17XL after immuned with *P. yoelii*-17XNL whole soluble protein as antigen and ProT α as adjuvant. The results showed that mice's macrophage function were enhanced after immunization. It had better effect immuned with *P. yoelii*-17XNL whole protein as antigen and ProT α as adjuvant than with *P. yoelii*-17XNL whole protein only, which suggests ProT α could play a potential role as malaria vaccine adjuvant.

Comparison the results of pre-, post-infection with *P. yoelii*-17XL and controlled group ProT α , it showed that intraperitoneal injection with ProT α before infection with *P. yoelii*-17XL could significantly reduce the parasitemia level and increase survival rate of mice. It suggests that using ProT α only can effectively protect mice against malaria infection. Our research provided important bases for antimalarial drugs development.

Key words: *P. yoelii*-17XNL; *P. yoelii*-17XL; immune adjuvant; ProT α

第一章 前言

1 疟疾概述

疟疾是全球关注、高发的寄生虫病，是世界上危害最为严重的传染病之一，它的分布遍及世界 90 多个国家和地区，主要流行于亚洲、非洲及拉丁美洲的国家或地区，全球有 40% 的人口生活在疟疾流行区，约有 21 亿人受到疟疾威胁。据统计，全世界每年约有 5 亿人感染疟疾，上百万人因其死亡，其中大部分是儿童^[1]，平均每天有 2700 个小孩因疟疾死亡^[2]，世界卫生组织将消灭疟疾、艾滋病和结核作为传染性疾病的防治重点^[3]。我国自建国以来，疟疾防治取得了重大成果，发病人数由 20 世纪 70 年代初的 2400 多万减少到目前的数十万，严重流行区的范围已大幅度缩小，目前除云南、海南两省外，其他各省已基本消除了恶性疟疾。但是，由于疟疾流行因素复杂，具有传播快、易反复的特点，另外受流动人口和周边一些国家疫情的影响，2000 年以来我国疟疾疫情出现回升现象，部分地区出现暴发疫情^[4]。另外，许多省还受到输入性恶性疟的威胁。根据对全国部分地区的疫情调查结果推算，2004 年全国的实际发病数超过 74 万例，2005 年全国疟疾报告疫情显示全国疫情出现较大回升，21 个省(市、区) 1168 个县有疟疾病例报告^[5,6]。疟疾的防治工作仍然任重道远。

疟原虫是导致疟疾发作的病原体，所有疟原虫都需要人或动物和雌性按蚊两个宿主。疟原虫在人体内的发育分为红细胞内期和红细胞外期。红细胞外期中，由于蚊虫叮咬，成熟的子孢子进入血液，并随着血流侵入肝细胞，在肝细胞内发育成滋养体，通过裂体增殖，发育成成熟的裂殖体。成熟的裂殖体将细胞胀破，释放出裂殖子，裂殖子一部分被巨噬细胞吞噬，一部分入侵红细胞，进行红细胞内期的发育。在红内期中，疟原虫经过几代裂殖子、环状体、滋养体、裂殖体的循环，一部分发育成雌、雄配子体。配子体进入蚊胃后发育成配子，雌雄配子通过受精作用形成合子，然后继续发育为成熟子孢子。子孢子集中于按蚊的唾液腺，当感染的按蚊再次吸血时，子孢子进入人体，继续进行对人体的感染（图 1）。疟原虫感染人体后经过一段时间的潜伏期后便发作，典型的疟疾发作表现为周期

性的寒战、高热和出汗退热三个连续的过程，并伴有头痛、恶心、呕吐等症状。疟疾还会导致一系列的并发症。疟疾的反复发作会使脾功能亢进，吞噬正常红细胞，骨髓造血功能受到抑制，从而导致贫血；疟原虫随血液流动进入脑部，会引起脑型疟疾，造成儿童和无免疫力成人患者的死亡；由于大量的溶血现象和血红蛋白尿，患者会出现高热和出血性黄疸；疟原虫感染会损害肾脏，引起肾病；疟疾患者还会出现痢疾、寒冷、肺水肿等并发症，对生命健康造成严重威胁^[7]。

由于疟原虫复杂的生活史和抗原容易变异等特点，导致了免疫逃逸以及疟原虫再感染现象的普遍存在^[8]，这就需要针对疟原虫不同发育时期设计相应的治疗方案，但这也增加了控制疟疾传播的难度，使疟疾的防控形势十分严峻。目前，疟疾疫苗和抗疟新药的研制与开发是有效控制疟疾发生和发展的重要策略。

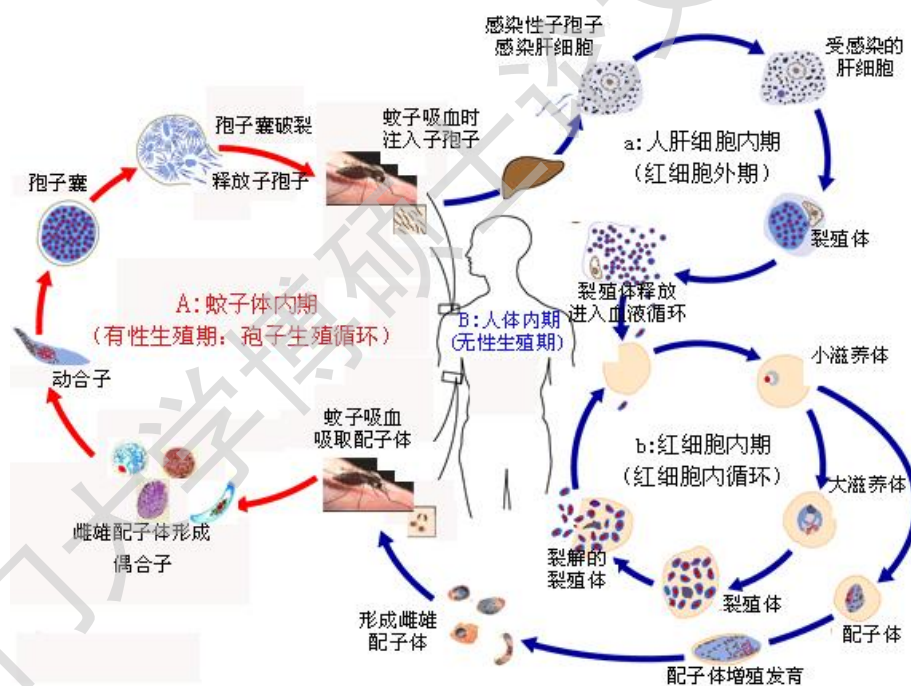


图1: 疟原虫生活史

Fig 1: Plasmodium life cycle

(图片来源: <http://jpkc.sysu.edu.cn/infection/photo.asp?Page=5>)

2 宿主免疫应答机制及疟疾治疗方案与机制的研究

2.1 宿主对疟原虫感染的免疫应答机制研究

在疟原虫感染宿主的不同时期,机体都会出现与之相应的免疫应答反应。阐明疟原虫感染过程中宿主的保护性免疫应答发生机制可以为疟疾防治提供必需的理论 and 实验依据^[9, 10]。在红外期感染、红内期致病以及疫苗研制等研究方面,鼠疟是一种重要的动物模型。在疟原虫感染过程中, T 淋巴细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、单核细胞以及 NK 细胞等接触疟原虫特异性抗原并被其活化以后,可以对疟原虫产生吞噬或杀伤作用,并且机体通过调控免疫细胞、细胞因子分泌以及神经内分泌系统间的相互作用确保了免疫反应的稳定性,对宿主有着重要的意义。

CD4⁺ T 细胞中有一类辅助性 T 细胞(helper T lymphocyte, Th), 根据 Th 分泌细胞因子种类的不同,可分为 Th1 和 Th2 两个亚型。在疟原虫感染过程中, Th1 和 Th2 受到抗原的刺激活化,进行分化和增殖,并分泌相应的细胞因子参与免疫调节。同时, Th1 和 Th2 细胞之间借助各自分泌细胞因子的质量来调节和维持免疫细胞间的动态平衡关系。鼠疟模型表明,不同遗传背景的小鼠可以对同种疟原虫产生抵抗和易感两种反应。感染早期 Th1 型细胞免疫应答的有效建立是抵抗小鼠消除红内期疟原虫的前提^[11]。Stevenson 通过对抵抗疟原虫型小鼠的研究发现,在原虫感染的急性期,首先出现 Th1 型为主的细胞免疫反应。Th1 型细胞被激活后,分化、增殖并分泌相应的细胞因子,例如 IFN- γ 。IFN- γ 能诱导激活和增强巨噬细胞的吞噬活性。活化的巨噬细胞会释放细胞因子以及产生活性氧自由基和一氧化氮(NO)起到杀死疟原虫的作用,从而抑制疟原虫的生长,降低疟原虫血症水平。感染一段时间以后, Th2 型细胞被激活,而 Th1 型细胞活性及其细胞因子水平下降。激活后的 Th2 型细胞迅速分化增殖并分泌相应的细胞因子来激活 B 细胞,刺激 B 细胞产生特异性抗体,最终消除疟原虫的感染^[12,13]。Th 型细胞免疫应答诱导和调控机制的阐明将为疟疾疫苗的研制提供新的靶点。

在抗病原生物感染过程中, IL-12 所介导的细胞免疫是必不可少的,它连接固有免疫和获得性免疫并启动 Th1 免疫应答,是促进早期免疫应答建立的重要细胞因子^[14,15]。IL-12 能够促进 NK 细胞和 T 细胞增殖,提高 NK 细胞的细胞毒活性,并且可以诱导 T 细胞分泌高水平的 Th1 型细胞因子 IFN- γ ^[16,17]。IL-12 基

因敲除的小鼠不仅脾细胞分泌 IFN- γ 的能力下降, 而且其巨噬细胞的吞噬能力也明显降低^[18], 从而导致疟原虫血症水平升高。

CD25⁺CD4⁺ 调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg 细胞)是体内天然存在的具有独立调节功能的 T 细胞亚群, 其免疫抑制效应的发挥可有效地维持机体的自身免疫耐受^[19,20]。研究发现, CD25⁺CD4⁺ T 细胞能够抑制 CD25⁺CD4⁺ T 细胞的增殖和细胞因子的分泌^[21,22]。体内阻断实验表明, 抗 CD25 单克隆抗体消除 CD25⁺CD4⁺ T 细胞可以使感染了致死型约氏疟原虫的小鼠存活下来^[23]。同时, 已有研究表明 CD25⁺CD4⁺ T 细胞的免疫抑制作用既可通过抑制性细胞因子 IL-10 和 TGF- γ 进行调控, 也可通过细胞之间的直接接触产生^[24]。IL-10 是一种具有多重免疫调节功能的抗炎性细胞因子, 它一方面对 Th1 反应有明显的抑制效应, 另一方面 IL-10 能够启动 Th2 反应, 可促进 B 细胞成熟和抗体的分泌, 是诱导 Th1 向 Th2 反应转换的关键性细胞因子^[25], 而以 Th2 反应为主的体液免疫应答是感染中后期宿主清除红内期原虫的主要承担者。感染疟原虫的小鼠通过感染早期建立的 Th1 反应抑制了急性期虫体血症快速升高, 然后通过 Th2 反应最终清除红内期原虫^[26,27]。

树突状细胞(Dendritic cells, DCs) 是体内功能最强的一类专职抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APCs)在扩大固有免疫应答、启动适应性免疫和形成Th免疫应答中发挥重要作用^[28]。在疟疾感染的急性期, DCs分泌的IL-10和TGF- β 明显抑制肝阶段T细胞介导的保护性免疫应答, 不能诱导产生有效的肝期保护性免疫。但在体内, DCs成熟以后受到感染红细胞的刺激可诱导Th1产生IFN- γ 、IL-12和TNF- α , 诱导Th2产生IL-4 和IL-10, 对疟原虫产生杀伤作用, 并在免疫应答发生30 天后, 诱导产生特异性抗体。这表明成熟的DCs对保护性免疫应答的产生有直接作用。国外的研究表明夏氏疟原虫裂殖子可以诱导小鼠DCs表达免疫分子CD40、CD86以及MHC II, 而成熟的裂殖子会诱导人的DCs表达CD86, 不诱导CD40的表达。从感染了约氏疟原虫的小鼠脾脏分离出来的APCs会提高CD80和MHC II的表达。脾脏DCs的CD40、CD80、CD86的表达量检测对研究宿主抵抗疟原虫感染的免疫机制具有重要的意义^[29-31]。

疟原虫在宿主细胞内生长繁殖的过程中会产生大量疟色素, 疟色素是由疟原虫侵入红细胞后, 将血红蛋白改变为一种黑褐色的颗粒, 沉积于成熟的疟原虫死

体内,当疟原虫死后,红细胞被破坏,色素散落到细胞间隙或被体内的网状内皮细胞所吞噬,常见于肝脏、脾脏等器官。疟色素可以对宿主巨噬细胞发挥作用和对树突细胞的成熟产生一定的影响,但至于是正面影响还是负面影响,不同的学者研究结果不同^[32-34]。

2.2 疟原虫疫苗研究现状

安全有效的疫苗是预防和控制传染病的有效途径。研究新型、安全、有效的疟疾疫苗成为遏制疟疾传播和消灭疟疾的迫切需要。

最早的疟疾疫苗是疟原虫死疫苗或用X射线减毒的子孢子活疫苗。用放射线照射减毒处理后的恶性疟子孢子接种志愿者,能产生有效且持久的保护性免疫^[35]。但是这种疫苗虽然曾获得一定的保护性,甚至可刺激机体产生细胞毒性T淋巴细胞,即诱导机体产生对疟原虫全面的保护性免疫应答。但该类疫苗接种时会引起免疫抑制,且减毒不充分也会导致临床感染,另外这种减毒子孢子疫苗的生产工艺和保存方法都存在局限性,使其应用受到很大限制^[36]。

红细胞内期的表面裂殖子蛋白(MSP)是一种很好的候选抗原,主要包括MSP1、MSP2、MSP3、MSP6、MSP8等。MSP1疟疾疫苗是最早研究也是研究得最多的疟疾疫苗之一。恶性疟原虫MSP1是一个前体蛋白,大小为195kD,它可以裂解为一个42kD的多肽,这个42kD的多肽再降解产生一个33kD的可溶性的蛋白和一个19kD的膜结合蛋白。19kD的膜结合蛋白构成类表皮生长因子区和含数个二硫化物桥,两者均具有完整的蛋白功能且能被抗体识别^[37]。该片段在裂殖子入侵红细胞时仍留于红细胞膜表面^[38],在裂殖体破裂和裂殖子入侵新的红细胞期间,虫体极易受血清免疫机制攻击。体外实验证明针对该19 kDa的多个单克隆抗体可以明显抑制裂殖子入侵红细胞^[39],而且只包含表皮生长因子样的区域蛋白所诱导产生的特异性抗体也可在体外抑制疟原虫生长^[40]。MSP2是另一个疟原虫表面蛋白,它的结构中含有葡萄糖肌醇(GPI),GPI是一种含有核心聚糖的糖脂毒素,可以锚定在恶性疟原虫表面^[41],介导巨噬细胞产生TNF- α 和IL-1,可以促进受感染的成熟红细胞表达恶性疟原虫红细胞膜蛋白1,粘附血管内皮细胞上的表皮蛋白CD36、血小板反应蛋白和细胞间粘附分子等^[42]。实验证实MSP2可以激

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库