

doi: 10. 3969/ j. issn. 1000-484X. 2011. 06. 017

·临床免疫学·

胸腺素 α 原作为约氏疟原虫疫苗免疫佐剂的初步研究^①高吉青 刘升发 韩伟 张亭 吴汉洲 王世媛^② 杨彩霞 洪凌仙 章军 周克夫
(厦门大学生命科学学院 细胞生物学和肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

中国图书分类号 R392-33 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2011)06-0552-04

[摘要] 目的: 研究胸腺素 α 原(Prothymosin α , ProT α)作为约氏疟原虫疫苗免疫佐剂的作用。方法: 提取 *P. yoelii*-17XNL 全蛋白作为抗原, 用胸腺素 α 原作为免疫佐剂, 免疫小鼠。具体方案为: 昆明小鼠分为4组, 每组6只, A组免疫 *P. yoelii*-17XNL全蛋白+ProT α ; B组免疫 *P. yoelii*-17XNL全蛋白; C组只注射ProT α ; D组为空白对照, 以相同体积的生理盐水代替。免疫结束后感染致死的 *P. yoelii*-17XL, 1×10^7 个虫/只小鼠。结果: 感染后的前10天A组小鼠疟原虫血症平均值要低于其他三组, 且最终有3只小鼠存活下来, 存活率50%, C组有一只小鼠存活, B、D组小鼠全部死亡。结论: 用 *P. yoelii*-17XNL全蛋白做抗原, 用ProT α 作为佐剂, 比单独用 *P. yoelii*-17XNL全蛋白对小鼠有更好的免疫保护作用, 提示了ProT α 可以成为一种有潜力的蛋白疫苗。

[关键词] 约氏疟原虫; 疫苗; 胸腺素 α 原; 免疫佐剂Study on the prothymosin α as vaccine adjuvant of *P. yoelii*

GAO Ji-Qing, LIU Sheng-Fa, HAN Wei, ZHANG Ting, WU Han-Zhou, WANG Shi-Yuan, YANG Cai-Xia, HONG Ling-Xian, ZHANG Jun, ZHOU Ke-Fu. Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the function of prothymosin α (ProT α) as vaccine adjuvant of *P. yoelii*. **Methods:** The mice were immunized with the total protein extracted from *P. yoelii*-17XNL as antigen, together with prothymosin α as adjuvant. Programs: Kunming mice were divided into A, B, C and D group. A group was immunized with *P. yoelii*-17XNL total protein and ProT α ; B group was immunized with *P. yoelii*-17XNL; C group was only injected with ProT α ; D group was the control, only injected with physiological saline. And then, the mice of each group was infected with *P. yoelii*-17XL, the dosage was 1×10^7 mice. **Results:** The parasitemia of A group mice was lower than the other three groups in the first 10 days after infection, and eventually there were three mice survived in A group, the survival rate was 50%, one mouse survived in C group, all of mice in B group and D group died. **Conclusion:** Mice immunized with *P. yoelii*-17XNL total protein as antigen together with ProT α as adjuvants, had better immune protection than those immunized with *P. yoelii*-17XNL protein only. The present results suggest that the ProT α can act as a potential adjuvant in protein vaccine.

[Key words] *Plasmodium yoelii*; Vaccine; Prothymosin α ; Immunity adjuvant

疟疾目前仍是人类难以攻克的难题。目前药物治疗是治疗疟疾的主要方法, 但由于疟原虫 (*Plasmodium*) 耐药性问题严重, 使得药物治疗愈发困难。疟疾疫苗的研究成为一个重要课题。约氏疟原虫

株 *P. yoelii*-17XNL 与 *P. yoelii*-17XL 同源, 小鼠感染 *P. yoelii*-17XNL 可以存活下来, 而感染 *P. yoelii*-17XL 后却死亡, 研究发现, 二者最大的不同是红细胞结合配体 (Erythrocyte binding-ligand, EBL) 蛋白位置的不同^[1]。目前疟原虫候选疫苗最主要是裂殖子表面蛋白。

疫苗要发挥更好的效果需要佐剂的辅助。ProT α 作为一种核蛋白, 它既参与对细胞周期的调节, 促进细胞增殖, 也可以调节免疫应答, 促进 IL-2、IFN- γ 及 TNF- α 等细胞因子的产生, 是一种很好的候选免疫佐剂^[2-3]。目前 ProT α 作为基因疫苗佐剂研究的较多, 研究结果表明将抗原蛋白基因和 ProT α 基

① 本文由厦门市科技项目 (3502220083004) 及国家“973”项目 (2007CB513103) 资助

② 厦门伯赛基因转录技术有限公司, 厦门 361005

作者简介: 高吉青 (1986年—), 女, 在读硕士, E-mail: gjq329@163.com;

通讯作者及指导教师: 周克夫 (1966年—), 男, 博士, 副教授, 主要从事免疫学、基因工程方面研究, E-mail: zhoukefu88@gmail.com.

因在动物体内共同表达或通过口服 DNA 疫苗,可以保护实验动物抵抗致死性感染^[6,7]。因此,我们用 *P. yoelii*-17XNL 全蛋白作为抗原, ProT α 作为佐剂,研究它们对小鼠感染 *P. yoelii*-17XL 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料 实验虫株 *P. yoelii*-17XNL 与 *P. yoelii*-17XL 由本实验室 -80°C 保存。实验动物为昆明小鼠, 6~8 周龄, 雌性, SPF 级, 购自厦门大学医学院实验动物中心。重组人前胸腺 α 原由本实验室和厦门伯赛基因转录技术有限公司共同制备。

1.2 方法

1.2.1 感染两株疟原虫 小鼠随机分为 N、Q 两组, 每组 6 只, N 组感染 *P. yoelii*-17XNL, Q 组感染 *P. yoelii*-17XL, 腹腔感染 1×10^7 个虫/只小鼠。每天制备薄血膜涂片, 计数疟原虫血症水平, 观察记录小鼠的存活情况。等感染 *P. yoelii*-17XNL 的小鼠体内疟原虫消失后再感染 *P. yoelii*-17XL, 观察疟原虫虫株 *P. yoelii*-17XL 的生长情况。

1.2.2 *P. yoelii*-17XNL 全蛋白的制备 用 *P. yoelii*-17XNL 感染小鼠, 感染率较高且疟原虫处于裂殖体期时, 取血液, 获得疟原虫, 加蛋白裂解液, 超声破碎 5 分钟, 离心后取上清低温保存备用。

1.2.3 小鼠免疫方案 小鼠分四组, 每组 6 只: A 组免疫 *P. yoelii*-17XNL 全蛋白 ($100 \mu\text{g}/\text{只}$) + ProT α ($5 \mu\text{g}/\text{只}$); B 组免疫 *P. yoelii*-17XNL 全蛋白 ($100 \mu\text{g}/\text{只}$); C 组只注射 ProT α ($5 \mu\text{g}/\text{只}$); D 组为空白对照(注射相同体积的生理盐水)。

共免疫四次, 第一次与第二次间隔两周, 以后每次间隔一周, 免疫采用背部皮下注射。免疫结束一周后, 腹腔感染 1×10^7 *P. yoelii* 17XL/只小鼠, 每天制备薄血膜涂片, 计数疟原虫血症, 观察记录小鼠的存活情况。

2 结果

2.1 小鼠感染 *P. yoelii*-17XNL 与 *P. yoelii*-17XL 后, 感染率与感染时间及存活比较(图 1) 小鼠感染 *P. yoelii*-17XNL 与 *P. yoelii*-17XL 后, 一般第 3 天可以检出疟原虫。N 组小鼠疟原虫血症低于 60%, 20 天左右虫消失, 小鼠死亡 1 只, 其他存活下来。Q 组感染率最高可达 99%, 7~8 天小鼠全部死亡。

N 组存活下来的小鼠, 疟原虫消失后, 再感染致死的 *P. yoelii*-17XL, 没有检出疟原虫。

2.2 免疫过的各组小鼠感染疟原虫 (*P. yoelii*-17XL) 后存活情况和疟原虫血症比较

2.2.1 各组小鼠感染疟原虫后存活情况比较(图 2)

通过图 2 我们看出, A 组小鼠有 3 只存活下来, 存活率为 50%, C 组有一只小鼠存活, B、D 组小鼠全部死亡, 说明在 ProT α 的辅助作用下, *P. yoelii*-17XNL 全蛋白抗原才对小鼠有明显的免疫保护作用。

2.2.2 各组小鼠疟原虫血症水平及显著性差异比较(图 3)

通过图 3 我们看出第三天各组小鼠已经开始检出疟原虫, 且前十天随着时间的延长各组小鼠疟原虫血症水平逐渐升高, 最高可达 90%。第五天时 B 组小鼠疟原虫血症平均值要低于其他三组; 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。第 6~8 天, A 组小鼠疟原虫血症平均值要低于其他三组; B 组单独免疫 *P. yoelii*-17XNL 全蛋白的小鼠, 疟原虫血症平均值低于空白对照组 D 组。比较第 5、6、7 天各组小鼠疟原虫血症水平发现: 第 5 天时, 各组小鼠疟原虫血症水平没有明显差异 ($P > 0.05$); 第 6 天时, A 组低于 D 组, 有显著性差异 ($P < 0.05$), A 组与 B、C 组无显著性差异 ($P > 0.05$); 第 7 天时 A 组低于 B、D 组, 有显著性差异 ($P < 0.05$), A 组与 C 组没有显著性差异 ($P > 0.05$)。这说明在 ProT α 的辅助作用下, *P. yoelii*-17XNL 全蛋白的免疫保护作用要强于只单独注射 *P. yoelii*-17XNL 全蛋白。

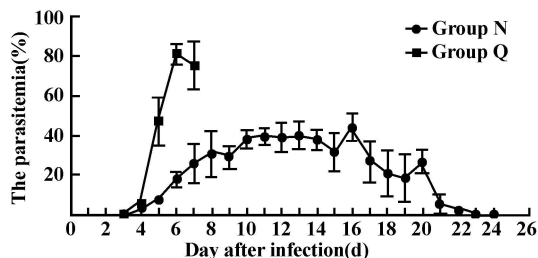


图 1 两组小鼠疟原虫血症水平

Fig. 1 The Parasitemia of mouse between two groups

Note: Group N. Infected with *P. yoelii*-17XNL; Group Q. Infected with *P. yoelii*-17XL.

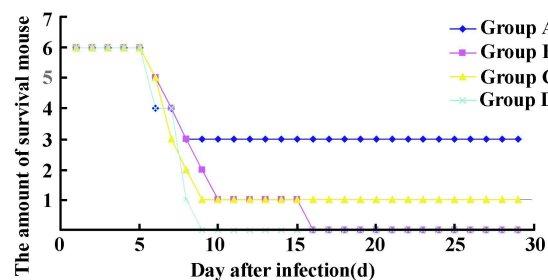


图 2 各组小鼠存活情况

Fig. 2 The amount of survival mouse in each group

Note: Group A. Injected with *P. yoelii*-17XNL total protein and ProT α ; Group B. Injected with *P. yoelii*-17XNL total protein; Group C. Injected with ProT α ; Group D. Injected with physiological saline as control.

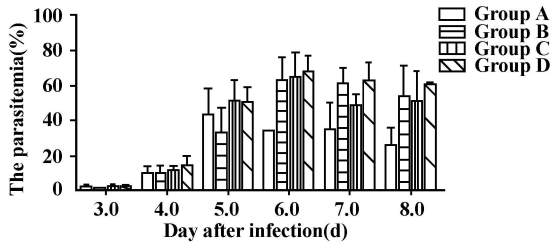


图 3 第 3~8 天疟原虫血症水平

Fig. 3 The parasitemia level of mouse in each group in day 3-8

Note: Group A. Injected with *P. yoelii*-17XNL total protein and ProTα; Group B. Injected with *P. yoelii*-17XNL total protein; Group C. Injected with ProTα; Group D. Injected with physiological saline as control.

3 讨论

免疫反应分为先天性免疫和获得性免疫, 获得性免疫分为体液免疫和细胞免疫。在疟原虫感染过程中, 由于疟原虫在血液中存在不同时期的克隆, 暴露了多种靶蛋白, 可以刺激产生体液免疫反应和细胞免疫反应^[8,9]。在疟原虫感染和免疫研究方面, 越来越多的证据表明树突细胞 (Dendritic cells, DC) 在疟疾免疫中起着关键性作用, 有研究发现在约氏疟原虫 (*P. yoelii*) 感染中, DC 可以激活孢子特异性 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞, 从而启动抗肝期疟原虫感染的免疫反应, CD8⁺ T 细胞参与抵抗孢子再次感染, 决定再感染时的原虫血症水平^[10-12]。在约氏疟原虫红内期感染的急性期, DC 能呈递疟原虫抗原, 上调主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex II, MHC II), CD80 和 CD86 分子的表达和促进 CD4⁺ T 细胞产生 IFN-γ^[13]。也有研究表明 TOLL 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 及其信号途径也参与疟原虫感染的免疫应答中^[14]。我们推测, 感染了非致死的 *P. yoelii*-17XNL 疟原虫的小鼠, 感染过程中可以刺激机体产生体液免疫应答和细胞免疫应答, 由于 *P. yoelii*-17XNL 的繁殖率较 *P. yoelii*-17XL 要低, 使得机体可以抵抗 *P. yoelii*-17XNL 的感染, 最终存活下来。存活下来的小鼠通过获得性免疫在体内留下的记忆细胞, 当同源 *P. yoelii*-17XL 再次感染小鼠时, 机体调动体液免疫和细胞免疫清除了疟原虫的感染。

约氏疟原虫红内期抗原能诱导宿主产生抗约氏疟原虫再感染的免疫力, 诱导机体产生具有保护作用的 IFN-γ、IL-2、IL-4 等细胞因子, 也可以刺激细胞免疫应答^[15]。ProTα 通过调节细胞周期和免疫应答, 既可以促进细胞增殖, 也可以促进 IFN-γ、IL-2、IL-4 等细胞因子的产生, 从而增强抗原的免疫保护作用。ProTα 作为胸腺肽的一种组分, 已被用于临床

治疗肿瘤和免疫低下。也有人研究将其用于蛋白疫苗的佐剂, 并取得较好的效果^[16]。我们的实验结果表明, 用非致死的 *P. yoelii*-17XNL 全蛋白免疫小鼠, 用 ProTα 作为免疫佐剂, 可以在一定程度上抵抗致死的 *P. yoelii*-17XL, 不但可以提高小鼠的存活率, 还降低了疟原虫血症水平, 对小鼠有一定的免疫保护作用, 比单独用蛋白抗原免疫小鼠效果要好。近年来美国纽约的 Mosoian 等^[17-19] 研究小组通过体外试验证明 ProTα 能够有效抑制 HIV-1 在宿主免疫细胞内复制, 并揭示了其作用机理, 他们认为, ProTα 是通过 TLR-4 的信号通路作用, 促进 TNF-α 的产生, 从而达到抑制 HIV-1 的复制, 同时发现, 无论是天然获得的 ProTα 还是重组人 ProTα 都有相同的效果, 但胸腺素 α1 却无效果。本研究结果对于 ProTα 是否同样经过这个通路, 达到抑制疟疾繁殖的效果还需要进一步研究。

4 参考文献

- Otsuki H, Kaneko O, Thongkukiattkul A *et al*. Single amino acid substitution in *Plasmodium yoelii* erythrocyte ligand determines its localization and controls parasite virulence[J]. PNAS, 2009; 106(17): 7167-7172.
- Wu C L, Shiau A L, Lin C S. Prothymosin alpha promotes cell proliferation in NIH3T3 cells[J]. Life Sciences, 1997; 61(21): 2091-2101.
- Pineiro A, Begona B M, Pilar A M *et al*. Identification of receptors for prothymosin alpha on human lymphocytes[J]. Biol Chem, 2001; 382(10): 1473-1482.
- 邱磊, 郭葆玉, 苗红 *et al*. 重组人胸腺素 α 原体外对 IFN-γ, IFN-α 及 TNF-α 的影响[J]. 药学报, 2002; 37(5): 326-328.
- Skopeliti M, Voutsas IF, Klimentzou P *et al*. The immunologically active site of prothymosin α is located at the carboxy-terminus of the polypeptide. Evaluation of its in vitro effects in cancer patients[J]. Cancer Immunol Immunother; 2006; 55(10): 1247-1257.
- Jin Y W, Cao C, Li P *et al*. Boosting immune response to hepatitis B DNA vaccine by coadministration of prothymosin α-expressing plasmid[J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2005; 12(12): 1364-1369.
- Shiau A L, Chen Y L, Huang Y S *et al*. Prothymosin α enhances protective immune responses induced by oral DNA vaccination against pseudorabies delivered by *Salmonella choleraesuis* [J]. Vaccine, 2001; 19(28-29): 3947-3956.
- Kyes S, Horrocks P, Newbold C. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria[J]. Annu Rev Microbiol, 2001; 55: 673-707.
- Rich S M, Ayala F J. Population structure and recent evolution of *Plasmodium falciparum* [J]. PNAS, 2000; 97(13): 6994-7001.
- Bruna-Romero O, Rodriguez A. Dendritic cells can initiate protective immune responses against malaria[J]. Infect Immun, 2001; 69: 5173-5176.
- Belhoue E, Costa F, Frankenberg T *et al*. Protective T cell immunity against malaria liver stage after vaccination with live sporozoites under chloroquine treatment[J]. Immunol, 2004; 172(4): 2487-2495.
- Lucas B, Engel A, Camus D *et al*. Plasmodium yoelii in mice; antigen reactivity of CD4⁺- and CD8⁺-bearing T cells[J]. Cell Immunol, 1993;

- 150 (1): 59-71.
- 13 Luyendyk J, Olivas O R, Ginger L A *et al.* Antigen-presenting cell function during *Plasmodium yoelii* infection [J]. *Infect Immun*, 2002; 70(6): 2941-2949.
- 14 Coban C, Ishii K, Horii T *et al.* Manipulation of host innate immune responses by the malaria parasite [J]. *Trends Microbiol*, 2007; 15(6): 271-278.
- 15 王春莉, 刘智广, 薛采芳 *et al.* 约氏疟原虫保护性抗原快速蛋白液相色谱法纯化及鉴定 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1996; 14 (3): 201-204.
- 16 靳彦文, 陈 婷, 李 平 *et al.* 胸腺素 α 原作为乙型肝炎表面抗原佐剂的研究 [J]. *生物技术通讯*, 2008; 19(4): 497-499.
- 17 Mosoian A, Teixeira A, Bums C S *et al.* Prothymosin- α inhibits HIV-1

- via Toll-like receptor 4-mediated type I interferon induction [J]. *PNAS*, 2010; 107(22): 10178-10183.
- 18 Mosoian A, Teixeira A, High A A *et al.* Novel function of prothymosin alpha as a potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in primary macrophages [J]. *J Virology*, 2006; 80 (18): 9200-9206.
- 19 Mosoian A, Teixeira A, Bums C S *et al.* Influence of prothymosin- α on HIV-1 target cells [J]. *Annals New York Academy of Sciences*, 2007; 1112: 269-285.

[收稿 2010-12-28 修回 2011-02-21]
(编辑 张晓舟)

(上接第 551 页)

隆抗体。对所得单抗进行鉴定, 制备得到了 14 株抗孕酮单克隆抗体, 抗体的亲和常数为 $1.9 \times 10^8 \sim 6.5 \times 10^8$ mol/L; 与甾体类激素的交叉反应率均较小。

选择 11F8(3)H5 这株抗体建立酶联免疫分析方法, 其测量范围为: 0.3 ~ 100 ng/ml, 灵敏度为: 0.12 ng/ml, 批内变异与批间变异分别为: 7.5% ~ 11.4% 与 8.2% ~ 12.1%, 回收率为: 93.8% ~ 124.7%, 稀释实验测定值与稀释度呈线性相关, 相关系数 r 为: 0.995 7。与酶促化学发光分析方法测定血清样品的孕酮浓度值进行比对, 相关性方程为: $y = 0.7894x + 0.7600$, $r = 0.9126$ 。抗孕酮的单克隆抗体的初步应用, 为检测孕酮酶联免疫分析试剂盒的开发奠定基础。

4 参考文献

- 1 张天娇, 陈文祥, 徐锐锋 *et al.* 血清孕酮测定方法的回顾和进展 [J]. *质谱学报*, 2006; 27(Suppl.): 136-137.
- 2 Euan H D Cameron, Jacqueline J Scarisbrick. Radioimmunoassay of plasma progesterone [J]. *Clin Chem*, 1973; 19(12): 1403-1408.
- 3 朱云林, 阮克和. 孕酮酶联免疫测定法 [J]. *福建医学院学报*, 1991; 25(1): 541-545.

- 4 A P Richardson, J B Kim, G J Barnard *et al.* Chemiluminescence immunoassay of plasma progesterone, with progesterone-acridinium ester used as the labeled antigen [J]. *Clin Chem*, 1985; 31(10): 1664-1668.
- 5 许志凯. 实用单克隆抗体技术 [M]. 陕西: 陕西科学技术出版社, 1992: 2-6.
- 6 贾娟娟, 刘一兵, 许文革 *et al.* 抗人心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的制备及初步鉴定 [J]. *现代免疫学杂志*, 2010; 30(6): 467-470.
- 7 李振甲, 王仁芝. 主编. 激素的放射免疫分析 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1985: 38-43.
- 8 Euan H D Cameron, Jacqueline J Scarisbrick. Radioimmunoassay of plasma progesterone [J]. *Clin Chem*, 1973; 19(12): 1403-1408.
- 9 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法 [J]. *免疫学杂志*, 1983; 33(2): 97-100.
- 10 霍海琴, 赵国瑞, 金伯泉. 酶标记孕酮酶联免疫分析 [J]. *临床检验杂志*, 1999; 17(6): 359-360.
- 11 Shrivastav T G, Basu A, Kariya K P. Substitution of carbonate buffer by water for IgG immobilization in enzyme linked immunosorbent assay [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2003; 24(2): 191-203.
- 12 Anupam Bsau, Tulsidas G Shrivastav, Saumen Kumar Maitra. A direct antigen heterologous enzyme immunoassay for measuring progesterone in serum without using displacer [J]. *Steroids*, 2006; 71: 222-230.

[收稿 2010-11-30 修回 2011-02-17]
(编辑 倪 鹏)

· 启事 ·

《中国免疫学杂志》关于彩图处理的有关说明

《中国免疫学杂志》的来稿均一经采用, 来稿所附图片根据具体需要, 酌情制作彩图, 彩图制作费包含在该稿件的版面费中, 一并开具发票, 望周知!

《中国免疫学杂志》编辑部