

重组丝虫壳质酶及SXP-1抗原用作抗微丝蚴疫苗的研究*

王世海¹ 郑惠君¹ 陶增厚¹ Willy F. Piessens²

1 贵州省寄生虫病研究所 贵阳 550001

2 美国哈佛大学公共卫生学院 波士顿 02115

提要 目的: 测定重组马来丝虫壳质酶 (r-chitinase) 及其片段和 SXP-1 抗原免疫接种沙鼠后是否具有抗马来丝虫微丝蚴 (mf) 血症的保护性免疫作用。方法: 试验动物分别用壳质酶及其片段 (F_{7R2}, F_{8R2}) 和 SXP-1 免疫, 用酶联免疫吸附试验、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印渍试验测定抗体水平及特异性抗体蛋白分子。用寄生虫学方法检测 mf 及成虫。结果: 用重组马来丝虫壳质酶及其片段抗原免疫沙鼠, 再以马来丝虫感染期幼虫 (L₃) 攻击, 可诱导其免疫系统产生抗 mf 的部分保护性免疫, 但对成虫无作用。L₃ 攻击后的沙鼠处于 mf 显性前期或显性时期时, 用重组抗原免疫则抗 mf 血症的保护性作用差或无作用。用 SXP-1 抗原免疫沙鼠也能降低 mf 血症水平, 并可减少成虫负荷。结论: 重组丝虫壳质酶及其片段和 SXP-1 抗原具有抗马来丝虫 mf 血症的保护性免疫作用。

关键词 重组丝虫抗原 疫苗 保护性免疫

国外学者研究证明, 降低血循环中的微丝蚴 (mf) 水平, 干扰或影响丝虫幼虫发育过程中的某些分子可能是阻断丝虫病传播的有效方法。外周血循环中 mf 水平部分受宿主对 mf 期特异性抗原的免疫反应控制。这种效应机制是抗体依赖型细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)。ADCC 可由适宜的免疫血清转移或虫体提取物的主动免疫所诱导。ADCC 介导控制 mf 血症水平是间接作用^[1-3]。

本文测定重组丝虫壳质酶抗原, 用可被抗壳质酶单克隆抗体 (McAbMF1) 识别的具有壳质酶抗原表位的片段主动免疫沙鼠, 观察其是否具抗 mf 血症的保护性免疫作用, 并与另一种各期丝虫均具有的重组抗原 SXP-1 比较。

材料与方法

重组抗原

试验沙鼠分别以下列抗原免疫: 壳质酶, 壳质酶-c 端片段 F_{7R2} 或 F_{8R2}, SXP-1, maltose-binding protein (MBP)。每组 10 只沙鼠分别用 5 μg MBP 型, SXP-1 型和壳质酶接种免疫 4 次。以质粒 DNA PMal-c 为载体的丝虫抗原克隆与 MBP 结合, 以融合产物进行表达, maltose resin 亲和层析纯化。

免疫动物

用每组 10-25 只 6-8wk 龄的雄性沙鼠, 分别以 5 μg 重组抗原与福氏或明矾佐剂乳化, 经腹腔 (ip) 或后肢皮下 (sc) 接种免疫。

L₃攻击感染 从饲养的埃及伊蚊获得马来丝虫 L₃, 经 ip 或 sc 攻击感染沙鼠 (100 条/只)。

L₃攻击感染后 mf 潜伏期疫苗免疫作用的观察

目的是观察壳质酶在预先经 L₃ 攻击感染的沙鼠再免疫的保护性免疫作用。将沙鼠分为 2 组, 每组 10 只, 以每只沙鼠 100 条 L₃ 攻击感染, 10 d 后分别用壳质酶和 MBP 接种免疫, 每隔 10-12 d 加强免疫一次, 共 8 次。基础免疫, 间隔 10-12 d 加强免疫一次, 共 3 次。然后经 ip 进行 L₃ 攻击感染 (100 条/只)。

寄生虫学方法

L₃ 攻击后 3 个月, 从沙鼠眶后静脉丛取血与 20 mmol/L EDTA 混合, 以 60 μl 血计数 mf, 另制厚血膜 2 张计数 mf。以平均数作为 mf 水平。最后解剖动物检查成虫。

血清学方法

每组 6-9 只沙鼠于免疫前、后以壳质酶抗原分别与明矾、福氏佐剂混合, 经 ip 或 sc 免疫后收集与分离血清, 置 -20 备用。用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法测定血清中抗丝虫抗体水平, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及免疫印渍试验 (Western blotting) 测定特异性抗丝虫抗体的蛋白分子。试验血清以 5% 山羊血清 BSA-吐温 20-PBS 1:50 倍比稀释, 兔抗仓鼠 Ig 抗体结合物为第二抗体。

结 果

1 L₃攻击感染前接种免疫的保护性免疫作用

对试验沙鼠进行 ip 免疫, 结果用壳质酶和

* 联合国开发计划署/世界银行/世界卫生组织热带病研究培训特别规划署资助项目 (No. 940234)

SXP-1 重组抗原免疫的沙鼠血循环中 mf 出现的时间明显推迟, 且 mf 数及成虫数均减少 (表 1,

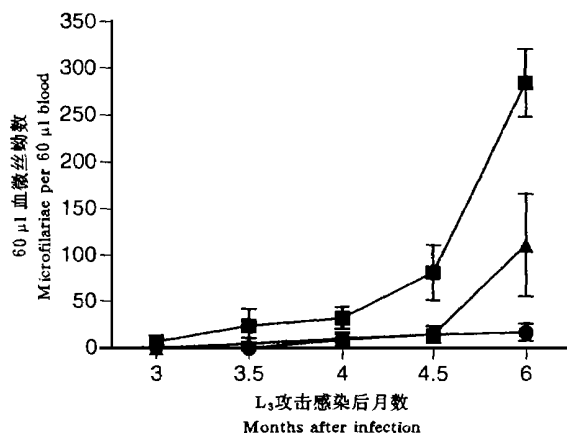
图 1)。

2 不同免疫途径的疫苗免疫效果

表 1 免疫沙鼠经 L₃攻击感染 6 个月后微丝蚴及成虫数
Table 1 Number of microfilariae and adult worms in immunized jirds 6 months after L₃ challenge

组别 Group	沙鼠数 No. jirds	微丝蚴数 (范围) No. mf (Range)	雌虫成虫数 GM* (范围) No. adult female worms GM (Range)	雄虫成虫数 GM* (范围) No. adult male worms GM (Range)
MBP	10	280 (220- 346)	7.3 (2- 21)	5.8 (1- 18)
SXP-1	10	9 (2- 32)	4.8 (2- 10)	3.6 (3- 5)
Chitinase	9	56 (0- 325)	2.4 (1- 19)	3.8 (0- 20)

* 几何均值 GM = geometric mean



MBP SXP-1 r-chitinase

图 1 重组丝虫壳质酶及 SXP-1 抗原抗 mf 血症的部分保护性作用
Fig.1 Partial protection of recombinant chitinase and SXP-1 against microfilaria

将沙鼠分成两组, 每组 20 只, 分别用壳质酶抗原和 MBP 通过 ip 或 sc 免疫, 然后经 ip 用 L₃ 攻击感染。于 L₃ 攻击感染后 6 个月解剖观察。结果, 壳质酶组检测的平均 mf 水平, ip 免疫组为 4, sc 免疫组为 3.4, 雌虫 ip 为 4.8, sc 为 3.1, 雄虫 ip 为 3.6, sc 为 3.2, MBP 对照组 ip 与 sc 平均 mf 水平分别为 57 和 53, 雌虫为 7.3 和 7.8, 雄虫为 5.8 和 6.9。证明两种途径免疫的沙鼠与对照组比较均能同等程度地降低 mf 血症水平 ($P < 0.01$), 表明不同的疫苗接种途径不会影响免疫效果。

3 免疫后再经 sc 感染的保护性免疫作用

壳质酶和 SXP-1 抗原均可诱导动物产生抗 mf 的保护性免疫作用, 且可持续到攻击感染后 120 d (图 2)。

4 L₃攻击感染后 mf 潜伏期疫苗免疫的作用

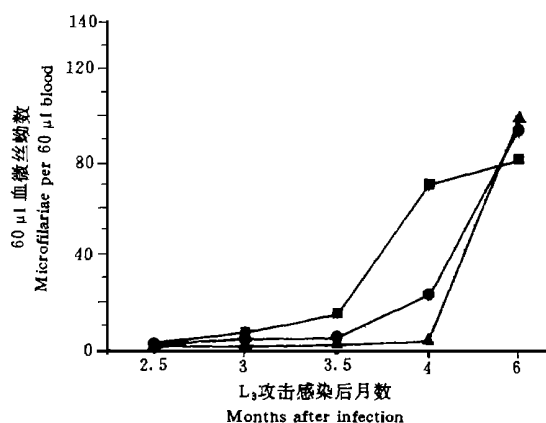


图 2 重组丝虫抗原经 ip 免疫后 sc 感染对沙鼠血循环中 mf 的免疫效果
Fig.2 Effect of r-chitinase and SXP-1 ip vaccination on microfilaria in jirds after sc infection

壳质酶组沙鼠外周血循环中查见 mf 的时间较 MBP 组推迟 2 wk 以上, 腹腔液中 mf 数明显低于 MBP 组 (壳质酶组的 mf 数为 0- 65 条, MBP 组为 20- 1 000 条) ($P < 0.01$)。我们曾对显性感染的沙鼠 (mf 阳性) 反复用壳质酶免疫, 但并不影响 mf 水平, 表明其无保护性免疫作用。

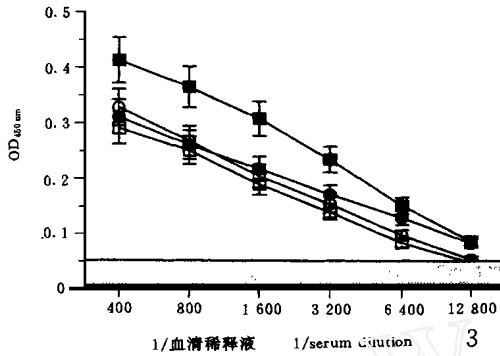
5 血清学观察

经重组丝虫壳质酶抗原免疫的沙鼠无论使用福氏佐剂或明矾佐剂经 ip 或 sc 途径免疫均可诱导沙鼠免疫系统产生抗 mf 抗体。对照组 MBP 则无此作用 (图 3)。

本实验用壳质酶抗原和 MBP 分别免疫的沙鼠血清, 对 mf 提取物反应的抗体滴度和抗原识别范围, 在用 L₃ 攻击感染后而增强。但用 MBP 免疫的血清仅在攻击感染后呈现 mf 血症时才出现抗 mf

提取物的抗体 (图 4)。从而证明, 重组抗原免疫沙鼠产生的抗 mf 血症的保护性免疫作用与血清对

mf 提取物, 壳质酶, F_{7R2}和 F_{8R2}片段抗原的抗体趋势及抗体效价无相关关系。



重组壳质酶 + 明矾 ip () sc () r-chitinase + alum ip () sc ()
重组壳质酶 + 福氏佐剂 ip () sc () r-chitinase + Freund's adjuvant ip () sc ()

图 3 重组丝虫壳质酶抗原免疫沙鼠诱导产生抗 mf 抗体水平测定 经 ELISA 与 mf 提取物反应的 OD 值几何均数 (±SEM)。图底部虚线阴影区域为 MBP 免疫的沙鼠血清以 1:400 稀释的均数加 2 个标准差的 OD 值。

图 4 重组丝虫壳质酶和 F_{7R2}、F_{8R2}片段抗原免疫沙鼠诱导产生抗 mf 抗原的抗体 Western blotting 结果。每 2 个小条为一个配对组, 左侧小条为用疫苗免疫前血清, 右侧小条为免疫后血清。第 1、9、10 组为 MBP (对照) 免疫组; 第 2- 8 组为壳质酶免疫组; 第 11、12 组分别为 F_{7R2}和 F_{8R2}片段组。重组丝虫抗原分别先与不同佐剂混合后再免疫沙鼠, 第 1- 5 组为明矾佐剂组; 第 6- 12 组为福氏佐剂组。第 2、4、6、8、11 组为用 L₃攻击后仍为非 mf 血症, 其它组均呈 mf 血症。70/75 对偶壳质酶特异的重组丝虫抗原仅可被用壳质酶、F_{7R2}和 F_{8R2}片段免疫的动物血清所识别。

Fig. 3 Immunization with recombinant chitinase elicits antibodies to microfilarial antigen Elicitation of antibodies to native microfilarial antigen by immunization with r-chitinase. Data are the means of optical density (OD) readings ± SEM. The shaded area represents the mean plus ± 2SD of OD values obtained with sera from jirds immunized with MBP tested at a 1:400 dilution. A crude microfilarial extract was used in the ELISA.

Fig. 4 Immunization with r-chitinase elicits antibodies to the microfilarial antigen Western blotting of microfilarial extracts were incubated with paired sera from jirds obtained before (left strip of each pair) and after intraperitoneal immunization (right strip) with MBP (jirds 1, 9, and 10), r-chitinase (jirds 2- 8), the F_{7R2} fragment (jird 11), or the F_{8R2} fragment of r-chitinase (jird 12). Antigen was emulsified in alum (jirds 1- 5) or Freund's adjuvant (jirds 6- 12). Jirds 2, 4, 6, 8, and 11 remained amicrofilaremic following challenge infection; all others became parasitemic. The characteristic 70/75 kDa r-chitinase doublet is the only antigen recognized by sera from jirds immunized with recombinant chitinase or its fragments.

讨 论

抗壳质酶的 M c A b 被动转移可降低沙鼠血循环中 mf 水平, 其抗原表位可由长期居住在流行区而无 mf 血症者的血清所识别^[4- 7]。

用壳质酶或含羧基末端分子的 F_{7R2}、F_{8R2}壳质酶片段的重组融合蛋白免疫沙鼠, 然后再用 L₃攻击感染, 与 MBP 组比较可获推迟和降低沙鼠血循环中 mf 血症水平的部分保护性免疫作用。壳质酶诱导的保护性免疫作用是 mf 期特异性抗原介导的免疫应答反应。试验证明重组丝虫壳质酶和 SXP-1 抗原可诱导动物至少产生部分的抗 mf 血症的保护性免疫作用, 而以同样质粒载体表达的重组 myosin 抗原免疫动物则未见保护性免疫作用。从而可确定壳质酶, SXP-1 的作用是由融合蛋白产物的丝虫成分产生, 而非 PM a1-c 载体纯化的重组产物的非特异性作用。

目前, 尚不能测定该抗原的精确性质及保护性免疫应答反应的准确表位。由于无鉴定沙鼠 Ig 的试

剂, 本研究使用与沙鼠 Ig 同系的啮齿类动物 Ig 测定沙鼠血清抗体。这样就限制了用 M c A b M F 1 竞争性 ELISA 方法检测沙鼠血清与 M c A b M F 1 表位的反应性。MBP 为重组丝虫抗原融合蛋白表达的粘合物, 因此本研究以 MBP 作为对照。我们曾尝试用蛋白水解酶除去 MBP 以生产较纯的重组抗原, 但生产的纯化重组抗原的量很少, 不能满足血清学研究。本研究表明, 壳质酶和 F_{7R2}或 F_{8R2}片段仅可诱导动物体内产生部分抗 mf 血症的保护性免疫作用, 提示壳质酶及其片段只是保护性免疫应答数个潜在表位之一。因此, 进一步深入研究是非常必要的^[4- 7]。

各期均具有的重组融合蛋白的抗原是一种潜在的表位, 其抗丝虫 mf 血症的机制可能是一种介导免疫的保护性作用, 这在我们用 SXP-1 试验所获得的降低循环 mf 血症水平的结果得到了证实。但 SXP-1 分子的性质和功能尚不很清楚, SXP-1 是丝虫的一种虫体抗原, 存在于多期虫体中, 并由虫体释放^[8- 10]。

有学者认为, 部分在丝虫病流行区出生的婴儿可能已在母体子宫内或母乳喂养时受丝虫抗原刺激, 并诱导婴儿体内产生特异性免疫耐受性。在丝虫病高度流行区这种免疫耐受性更为明显, 因此, 免疫效果差^[11-15]。我们用重组壳质酶等抗原免疫显性感染的沙鼠并不影响动物血循环中mf血症水平或效果差的结果证实了上述观点。因为mf血症阳性沙鼠的血清可与自然的壳质酶发生反应, 我们推测动物体内先期存在的抗丝虫抗体, 机制不明的“封闭”或“阻碍”了疫苗的保护性免疫作用。因此, 丝虫疫苗对显性感染无作用。

本研究结果证实, 抗mf疫苗的使用于mf血症显性前期可获得部分的保护性免疫作用, 在L₃攻击前进行疫苗免疫则效果更佳。

参 考 文 献

- 1 Fuhman JA, Urioste SS, Hamill B, et al Functional and saturation of *B rugia malayi* microfilariae. Am J Trop Med Hyg 1987; 36 70
- 2 Lawrence R, Denham DA. *B rugia pahangi* infections in immunocompromised rats demonstrate that separate mechanisms control adult worm and microfilarial numbers. Parasit Immunol 1992; 14 371
- 3 Weiss N, Tanner M. Studies on *D ipetalonema viteae* 3 Antibody-dependent cell-mediated destruction of microfilariae *in vivo*. Tropenmed Parasitol 1979; 30 73
- 4 Aggarwal A, Cuna W, Haque A, et al Resistance against *B rugia malayi* microfilariae induced by a monoclonal antibody which promotes killing by macrophages and recognizes surface antigen. Immunology 1985; 54 655
- 5 Canlas M, Wadde A, Lamontagen L, et al A monoclonal antibody to surface antigens on microfilariae of *B rugia malayi* reduces microfilaremia in infected jirds. Am J Trop Med Hyg 1984; 33 420
- 6 Dissanayake S, Xu M, Piessens WF. A cloned antigen for serological diagnosis of *W uchereria bancrofti* microfilaremia with daytime blood samples. Mol Biochem Parasitol 1992; 56 269
- 7 Dissanayake S, Xu M, Piessens WF. Myosin heavy chain is a dominant parasite antigen recognized by antibodies in sera from donors with filarial infections. Mol Biochem Parasitol 1992; 56 349
- 8 Ash LR, Riley JM. Development of subperiodic *B rugia malayi* in the jird, *M eriones unguiculatus*, with notes on infections in other rodent. J Parasitol 1970; 56 969
- 9 Fuhman JA, Piessens WF. A stage-specific calcium-binding-protein from microfilariae of *B rugia malayi* (Filariidae). Mol Biochem Parasitol 1989; 35 249
- 10 Dissanayake S, De Silva LV, Ismail MM. IgM antibody to filarial antigens in human cord blood: possibility of transplacental infection. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74 542
- 11 Weil GJ, Hussain R, Kumaraswami V. Prenatal allergic sensitization to helminth antigens in offspring of parasite-infected mothers. J Clin Invest 1983; 71 1124
- 12 Petralanda I, Yarzabal L, Piessens WF. Parasite antigens are present in breast milk of women infected with *Onchocerca volvulus*. Am J Trop Med Hyg 1988; 38 372
- 13 Steel C, Guinea A, McCarthy JS, et al Long term effect of prenatal exposure to maternal microfilaremia on immune responsiveness to filarial parasite antigens. Lancet 1994; 343 890
- 14 Piessens WF, Wadde AA, Kumawan L. Regulation of immune responses in lymphatic filariasis. Ciba Found Symp 1987; 127 164
- 15 King CL, Kumaraswami V, Poindexter RW, et al Immunologic tolerance in lymphatic filariasis. Diminished parasite specific T and B lymphocyte precursor frequency in the microfilaremic state. J Clin Invest 1992; 89 1403

1997年12月30日收稿 1998年9月21日修回
(编辑: 李雅卿)

STUDIES ON RECOMBINANT CHITINASE AND SXP-1 ANTIGENS AS ANTIMICROFILARIAL VACCINES*

WANG Shihai¹, ZHENG Huijun¹, TAO Zenghou¹, Willy F. Piessens²

¹ Guizhou Provincial Institute of Parasitic Diseases, Guiyang 550001

² Department of Tropical Public Health, Harvard School of Public Health, Boston MA 02115 USA

ABSTRACT

AM: To determine whether immunization with recombinant filarial chitinase or a fragment containing the epitope recognized by McAb MF1 and SXP-1 could protect jirds against microfilaremia resulting from infection with *B. malayi*. **METHODS:** Test jirds were immunized with the following recombinant parasite antigens: filarial chitinase, the c-terminal fragments F7R₂ or F8R₂ of r-chitinase, filarial SXP-1, myosin or maltose binding protein (MBP). Employing immunochemical technique (SDS-PAGE, Western Blotting) and serology (ELISA) measured antifilarial antibodies level. **RESULTS:** Immunization of jirds with recombinant chitinase induced partial protection against microfilaremia resulting from subsequent infection with *B. malayi*, but did not reduce adult worm burdens. Vaccination was much less effective when administered during the prepatent stage of infection and was ineffective when given to microfilaremic jirds. Immunization of jirds with SXP-1, an antigen present in multiple worm stages also reduced microfilaremia and, in some experiments, adult worm burdens. **CONCLUSION:** The recombinant chitinase, fragments