

文章编号: 1000-7423(2009)-01-0070-05

【综述】

减毒孢子诱导小鼠保护性免疫机制 及其对红前期疫苗研制的启示

徐文岳

【摘要】 受疟原虫孢子来源的限制和放射减毒程度控制的困难, 放射减毒孢子在实际应用中受到明显的限制, 但是可作为研究红前期保护性免疫机制和红前期亚单位疫苗设计的重要模型。本文就放射减毒孢子诱导宿主产生保护性免疫的分子机制和红前期亚单位疫苗的研究现状作一综述。

【关键词】 放射减毒孢子; 疟原虫; 疫苗; 保护性免疫

中图分类号: R382.31 文献标识码: A

Mechanism of Protective Immunity Induced by Irradiation-Attenuated Sporozoites and its Implication for Pre-Erythrocytic Malaria Vaccine Research

XU Wen-yue

(Department of Pathogenic Biology, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

【Abstract】 Irradiation-attenuated sporozoites are still the most effective pre-erythrocytic malaria vaccine. However, limitation of purified sporozoites and difficulty in attenuation controlling of sporozoites hamper its use in practice. Understanding the mechanism of protective immunity induced by irradiation-attenuated sporozoites will be helpful for the design of the efficient pre-erythrocytic malaria vaccine. This is a review on research progress in the mechanism of protective immunity induced by irradiation-attenuated sporozoites and current status of pre-erythrocytic malaria vaccine development.

【Key words】 Irradiation-attenuated sporozoite; Plasmodium; Vaccine; Protective immunity

Supported by the Natural Science Fund of Chongqing Municipality (No. 2008BA5010)

放射减毒孢子是目前最有效的红前期疟疾疫苗, 能诱导小鼠、猩猩和人产生长期有效的保护性免疫。放射减毒孢子诱导的保护性免疫具有种特异性, 但没有株特异性, 并不受遗传背景的限制。放射减毒孢子不但能诱导近交系和远交系小鼠, 而且能诱导不同主要组织相容性复合体(MHC) 人群产生较好的保护性免疫, 最长可持续 9 个月。虽然, 受孢子来源的限制和放射减毒程度控制的困难, 放射减毒孢子在实际应用中受到明显的限制, 但是可作为研究红前期保护性免疫机制和红前期亚单位疫苗设计的重要模型。

1 减毒孢子的生物学特性及其诱导的保护性效应机制

与野生孢子一样, 减毒孢子同样能侵入肝细胞。虽然侵入肝细胞内的减毒孢子能表达部分肝

期裂殖体相关成分, 但是不能进一步发育为肝期裂殖体和裂殖子。

早期的研究认为, 减毒孢子疫苗诱导的保护性免疫在一定程度上是由孢子蛋白(circumsporozoite protein, CSP) 重复区域特异的抗体通过中和孢子, 抑制其侵入肝细胞和发育为红前期疟原虫而介导的。然而, 随后的研究发现, 减毒孢子免疫 B 细胞耗竭(不能产生抗体) 的小鼠仍然能抵御孢子的攻击, 提示 T 细胞介导的免疫在减毒孢子疫苗诱导的保护性免疫中发挥重要作用。进一步研究证实红前期疟原虫特异的 CD8⁺ T 细胞尤其重要, 过继转移红前期特异的 CD8⁺ T 细胞能保护野生株小鼠抵御感染性孢子的攻击。另外, 在没有诱导抗体产生的情况下, 口服表达 CSP 沙门氏菌疫苗能通过诱导细胞免疫完全保护宿主抵御孢子的攻击感染^[1]。因此, 减毒孢子疫苗一方面通过中和孢子, 抑制其侵入肝细胞, 另一方面利用疟原虫特异的 CD8⁺ T 细胞^[2,3]清除寄生于肝细胞中的疟原虫。

基金项目: 重庆市自然科学基金重点项目 (No. 2008BA5010)

作者单位: 第三军医大学基础医学部病原生物学教研室, 重庆 400038

然而, 减毒孢子疫苗的效应机制在不同宿主体内不尽相同 (表 1): ① 对于 BALB/c (H-2^d) 小鼠而言, 减毒孢子疫苗诱导产生的保护性免疫的效应主要依赖于 CD8⁺ T 细胞以及自然杀伤细胞(NK), 而不是 CD4⁺ T 细胞分泌的白细胞介素-12 (IL-12) 和 γ 干扰素 (IFN- γ) [4]; ② 对于 C57BL/6(H-2^b) 小鼠而言, 减毒孢子疫苗的效应主要依赖于 CD8⁺ T 细胞, 但是同时需要 CD4⁺ T 细胞的参与; ③ 对于 B10.BR (H-2^K) 小鼠而言, 在 BALB/c 小鼠中发挥重要作用的 IL-12/NK 反馈环并不是其中的主要效应机制; ④ CD4⁺ T 细胞、NO 和 IL-12 是否参与减毒孢子疫苗诱导的保护性免疫取决于宿主本身。然而, 对于绝大多数宿主而言, CD8⁺ T 细胞和 IFN- γ 是主要效应分子, 但并不需要 CD8⁺ CTL 细胞, 因为减毒孢子同样能诱导穿孔素 (perforin), 颗粒酶 B (granzyme B), Fas 配体 (FasL) 缺失小鼠产生保护性免疫[5]。

表 1 减毒孢子诱导不同小鼠保护性免疫的效应机制

不同实验鼠	MHC类型			效应细胞和细胞因子			
	H-2	CD8 ⁺	CD4 ⁺	IFN- γ	IL-12	NOS	NK
BALB/c	d	需要	不需要	需要	需要	需要	部分需要
B10.BR	k	需要	不需要	需要	不需要	需要	不需要
A/J	A(k/d)	需要	不需要	需要	不需要	不需要	部分需要
C57BL/6	b	需要	需要	需要	需要	需要	需要
B6.129	b	需要	需要	需要	需要	需要	未检测
B10.D2	d	需要	需要	需要	不需要	部分需要	未检测
B10.Q	q	需要	不需要	不需要	不需要	未检测	未检测
CD-1	远交系	需要	不需要	需要	部分需要	部分需要	部分需要

进一步的研究证实, CSP 是减毒孢子诱导完全保护性免疫的主要抗原。根据 T 细胞发育的阴性和阳性选择原理, CSP 转基因小鼠不再拥有 CSP 特异的 T 细胞 (CD4⁺和 CD8⁺), 因此也就不能产生 CSP 特异的 IgG 抗体, 但是减毒孢子免疫后能诱导 CSP 转基因小鼠产生的 CSP 特异的 IgM 抗体 (不需要 T 细胞的辅助) 仍具有中和孢子的功能。耗竭非 CSP 特异的 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞后发现, 虽然 CD8⁺ T 细胞相对 CD4⁺ T 细胞的作用较强, 但是对减毒孢子诱导 CSP 转基因小鼠产生保护性免疫的影响不大, 说明非 CSP 特异的 CD8⁺ T 细胞在减毒孢子诱导的保护性免疫中的作用较弱; 减毒孢子两次免疫 B 细胞缺失的 CSP 转基因小鼠对肝脏疟原虫负荷降低率只有 B 细胞缺失小鼠的 1/10, 进一步说明非 CSP 特异的 CD8⁺ T 细胞在减毒孢子诱导的保护性免疫中的作用较弱, 而 CSP 特异的 CD8⁺ T 细胞在其中发挥了绝对的作用。因此, 减毒孢子疫苗诱导的保护性免疫主要依赖于抗 CSP 抗体 (中和孢子, 抑制其入侵肝细胞) 和 CSP 特异的 CD8⁺ T 细胞[6]。

另外, 减毒孢子诱导的长期保护性免疫与其诱导的肝内记忆性 CD8⁺ T 细胞密切相关, 而肝内 CD8⁺ 效应记忆性 T 细胞的存活依赖于肝细胞内减毒孢子表达的红前期相关抗原的持续刺激, 因为如果用伯氨喹杀灭疟原虫后, CD8⁺ 效应记忆性 T 细胞 (CD44^{high} CD45RB^{low} CD62L^{low} CD122^{low}) 的数量就明显减少[7]。

2 减毒孢子疫苗诱导宿主保护性免疫的机制

除了减毒孢子疫苗的效应机制外, 研究诱导宿主产生保护性免疫的具体机制对红前期疫苗的设计同样具有重要的指导意义。

2.1 保护性抗原 虽然, 侵入肝细胞内的减毒孢子能表达部分肝期裂殖体相关成分, 但是不能发育为肝期裂殖体和裂殖子。如果用伯氨喹杀灭侵入肝细胞内的减毒孢子, 减毒孢子诱导的保护性免疫即消失, 提示减毒孢子侵入肝细胞后表达的部分红前期相关成分可能是减毒孢子诱导保护性免疫的主要抗原。另外, 红前期抗原在促进记忆性 T 细胞存活和分化中同样发挥重要的作用。因此, 鉴定减毒孢子表达在肝细胞表面的红前期相关成分是探讨减毒孢子保护性抗原的主要方向。

有研究表明, 孢子表面的 CSP 可能是减毒孢子诱导保护性免疫的主要保护性抗原[6]。CSP 不但是孢子表面的主要蛋白, 而且能在红前期早期表达, 因此, 减毒孢子诱导产生的 CSP 特异的抗体和 CD8⁺ T 细胞分别能通过中和孢子抑制其入侵肝细胞以及清除表达 CSP 的感染肝细胞而抵御孢子的攻击感染。然而, 最近的研究发现, 在不产生抗伯氏疟原虫 CSP 特异的抗体和 CD8⁺ T 细胞的情况下, 带有 P.f CSP 的放射减毒伯氏疟原虫孢子同样能诱导小鼠产生长期保护性免疫[8]。另外, 减毒孢子 3 次免疫 CSP 转基因小鼠同样能诱导保护性免疫[6], 提示其他红前期抗原在其中亦发挥重要的作用。例如, 血小板凝血酶敏感蛋白相关未名蛋白 (thrombospondin-related anonymous protein, TRAP), 又名孢子表面蛋白 2 (sporozoite surface protein 2, SSP2), 免疫能诱导小鼠产生完全保护性免疫, 而减毒孢子免疫后也可以检测到针对 P.f SSP2 特异的抗体和 T 细胞反应[9], 提示 P.f SSP2 是红前期疫苗的重要候选抗原之一。虽然, 在孢子侵入肝细胞后, CSP 和 TRAP 在肝细胞膜上仍然有表达, 但是随着肝期裂殖体的发育, 表达量逐渐下降[9,10]。然而, 肝期抗原 1 (liver stage antigen-1, LSA-1) 在孢子侵入肝细胞后就开始表达, 并在整个肝期持续表达, 以絮状分布在裂殖子周围。通过对减

毒孢子免疫的志愿者的研究发现, 针对 LSA-1 的 T1、T3 和 T5 的 T 细胞反应在获保护的志愿者中的强度是未受保护者的 3~5 倍, 并与减毒孢子诱导的保护性免疫相关^[11]。疟疾流行区自然保护人群实验也发现, 轻型疟疾患者的 LSA-1 特异的 CD8⁺ T 细胞反应强于症状严重的疟疾患者^[12], 提示 LSA-1 特异的 CD8⁺ T 细胞能抑制红前期疟原虫的发育, 因此, LSA-1 可能是红前期疫苗的另一重要候选抗原。用患者保护性免疫血清从恶性疟原虫的 DNA 基因组文库中筛选出来的红前期特异抗原 LSA-3 免疫猩猩后, 也能诱导完全保护性免疫^[13], 提示 LSA-3 同样是疟原虫红前期的重要抗原, 其可以作为多价疟疾疫苗的重要组成部分。

2.2 抗原递呈和抗原特异性 T 细胞的活化 目前, 枯否氏(kupffer)细胞、树突状细胞(DC)和肝细胞被认为是可能的抗原递呈细胞, 参与了减毒孢子免疫后相关抗原的递呈, 从而活化 T 细胞。有关 kupffer 细胞是否参与抗原递呈还知之甚少, 然而, 在实验室条件下, 树突状细胞已证实是主要的抗原递呈细胞。减毒孢子免疫后, 可发现树突状细胞被募集到肝脏, 并吞噬凋亡的感染疟原虫的肝细胞, 提示凋亡的感染疟原虫肝细胞可能是减毒孢子诱导保护性免疫的主要抗原^[14]。那么表达 MHC I 的肝细胞在红前期疟原虫抗原的递呈中的作用如何? 最近的研究发现, 孢子侵入 8~24 h 期间, 体外培养原代肝细胞能将 CSP 递呈给 CD8⁺ T 细胞, 促进 IFN- γ 的分泌, 提示肝细胞能作为抗原递呈细胞参与红前期疟原虫的交叉递呈^[15]。然而, 作为抗原递呈细胞, 除了能递呈抗原外还应该表达共刺激分子, 才能最终活化 T 细胞。有研究报道, 丙型肝炎病毒(HCV)感染能诱导肝细胞浆内共刺激分子的表达^[16]。另外, 除了能表达主要组织相容性复合体 I (MHC I) 外, 肝细胞还能表达 MHC II^[17], 在感染疟原虫的小鼠的肝细胞膜上也已经检测到与 MHC I^[18,19] 和 MHC II^[20,21] 结合的疟原虫蛋白。上述证据均支持肝细胞可能参与红前期疟原虫抗原的交叉递呈和 T 细胞的活化。

2.3 疟原虫特异记忆性 T 细胞的分化 减毒孢子疫苗诱导的长期保护性免疫依赖于疟原虫特异性 T 细胞的分化和维持。肝内 CD8⁺ 效应记忆性 T 细胞的存活依赖于肝细胞内减毒孢子表达的红前期相关抗原的持续刺激, 因为如果用伯氨喹杀灭疟原虫后, 肝脏内 CD8⁺ 效应记忆性 T 细胞 (CD44^{high} CD45RB^{low} CD62L^{low} CD122^{low}) 的数量明显减少^[7], 而且过继转移实验也发现只有 CSP 特异的 CD44^{high} CD8⁺ T 细胞才能与疟原虫感染的肝细胞结合。

3 红前期疫苗的研究现状及其存在的问题

基于对减毒孢子疫苗主要效应分子和机制的认识, 人们已设计了多种红前期亚单位疫苗。然而, 除了 RTS,S 和 FP9-MVA ME-TRAP 疫苗外, 其他红前期疫苗的保护效率和持续时间均较低。虽然 RTS,S 和 FP9-MVA ME-TRAP 疫苗的保护效率和持续时间相对较好, 但是, 仍然不能达到 WHO 关于有效疟疾疫苗的标准 (50% 保护效率和 2 年的持续时间), 因此, 目前尚无有效的疟疾红前期亚单位疫苗问世。

3.1 目前的红前期亚单位疫苗 (表 2)

3.1.1 基于 CSP 的疟疾红前期亚单位疫苗 RTS,S 疫苗: RTS,S 是 CSP 重复序列(R)、C 末端(含 T 细胞表位)与乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原(S)在酵母表达的融合蛋白。由于 HBV 表面抗原能形成颗粒, 容易被抗原递呈细胞吞噬, 从而能提高疫苗的免疫原性。RTS,S 主要产生针对孢子表面的 CSP 的抗体和 T 细胞, 是目前最有效的红前期亚单位疫苗, 保护效率可达 41%, 肝脏的疟原虫负荷减少率可达 92%。研究发现, RTS,S 的保护性免疫与其能诱导 CSP 特异的抗体、CD4⁺、CD8⁺ T 细胞和 IFN- γ 相关, 其中持续表达的 IFN- γ 与 RTS,S 诱导的部分自愿者产生的长期保护性免疫相关^[22]。最近的研究还发现, 其还与针对 CSP “通用的 T 细胞表位 (universal T epitope)” 的 CD4⁺ T 细胞的活化密切相关^[23]。

ICC-1132 in Montanide ISA 720 疫苗^[24]: 此疫苗为 HBV 核心抗原、CSP B 细胞表位和 2 个 T 细胞表位形成的病毒样颗粒, 能诱导抗 NANP 抗体和适度的 T 细胞反应, 但是未能保护宿主抵抗恶性疟原虫孢子的攻击。

微毒粒疫苗 (virosome): 将恶性疟原虫 CSP 的 B 细胞表位插入到流感病毒, 利用流感病毒蛋白的强免疫原性诱导宿主产生高滴度的抗 CSP 抗体。

3.1.2 基于其他红前期抗原的疟疾亚单位疫苗 FP9-MVA ME-TRAP 疫苗: 鉴于疟原虫特异的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞在减毒孢子疫苗诱导的保护性免疫的重要作用, 因此诱导产生疟原虫特异的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞作为各种疟疾亚单位疫苗的设计标准。虽然, 采用脂蛋白、颗粒、DNA 和病毒等多种疫苗形式能诱导宿主产生疟原虫特异的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞, 但是, 激活-加强 (priming-boosting) 是诱导疟原虫特异 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的最有效策略。激活-加强策略指的是单次免疫诱导的免疫应答比较弱, 如果后续用同源或异源的载体反复刺激, 可以增强免疫应答。由于单独用 DNA 疫苗免疫诱导的细胞免疫应答通常比较弱, 随后人们发现, 如果首先用 DNA 疫苗激活, 然

后用表达相同抗原的重组修饰的 Ankara 痘病毒(modified vaccine virus Ankara, MVA) 加强, 可显著活化能分泌 IFN- γ 的特异性 CD8⁺ T 细胞。此策略是目前诱导疟原虫特异的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的最有效方式。FP9-MVA ME-TRAP 采用的是异源激活-加强策略, 先用表达 6 种红前期抗原表位(multi-epitope-TRAP polyepitope-protein) 的 FP9 鸡痘病毒激活, 然后用重组修饰的 Ankara 痘病毒加强, 结果可以获得 40% 完全保护, 并降低肝脏的原虫负荷达 92%。

3.2 存在的问题以及可能机制 虽然目前有多种旨在诱导特异 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞活化的肝期疫苗已进入临床试验, 但是, 除了 FP9-MVA/ME-TRAP 和 RTS,S 外, 现场试验发现, 大多数肝期疫苗根本没有保护作用, 最高的免疫保护率也仅约 10%。虽然 FP9-MVA/ME-TRAP 和 RTS,S 在局部地区的保护效率可以达到 40%, 但是对肝期疟原虫的减虫率有 92%, 而且保护作用的持续时间较短, 尚达不到至少持续 2 年 50% 免疫保护率的有效疟疾疫苗的标准。因此, 现有的红前期亚单位疫苗存在保护效率低, 持续时间短的问题。

对 FP9-MVA/ME-TRAP 诱导产生完全保护性免疫的志愿者的研究发现, 宿主的持续保护性免疫反应与采用培养酶联免疫斑点方法(cultured IFN- γ ELISPOT) 检测的中心记忆 T 细胞(central memory T cells) 的活性密切相关, 而与采用体外 ELISPOT 方法(*ex vivo* IFN- γ ELISPOT) 检测的效应记忆 T 细胞(effector memory T cells) 的活性没有相关性^[27], 提示能否诱导保护性免疫与亚单位疫苗能否活化中心记忆 T 细胞密切相关。

4 结语

放射减毒孢子能侵入肝细胞, 并表达部分红前

期抗原, 但是不能进一步发育为肝期裂殖体和裂殖子。研究证实, 减毒孢子诱导宿主产生长期有效的保护性免疫与其能诱导产生特异的抗体、CD8⁺、CD4⁺ T 细胞, 以及肝细胞寄生孢子表达的红前期抗原持续刺激和维持肝内记忆性 T 细胞的存活等因素密切相关。

研究证实, CSP 是减毒孢子的主要保护性抗原。然而, 目前的红前期亚单位疟疾疫苗大多是基于 CSP 的, 但是均未能诱导等同于减毒孢子疫苗的效果。虽然, 放射减毒孢子两次免疫 CSP 转基因小鼠产生的抗体和 T 细胞低于野生株小鼠, 但是, 3 次免疫同样能诱导 CSP 转基因小鼠产生保护性免疫。另外, 放射减毒的带有 P.f CSP 的伯氏疟原虫在不产生抗伯氏疟原虫 CSP 特异的抗体和 T 细胞的情况下, 同样能诱导长期保护性免疫; 其他红前期抗原 LSA1-3 和 SSP2 同样能诱导保护性抗体和 T 细胞反应。因此, 提示 CSP 可能不是唯一的保护性抗原, 而多价疫苗可能是疟疾红前期亚单位疫苗研制的努力方向之一。

虽然现有的红前期疫苗形式, 如 DNA、多肽和病毒重组疫苗, 均能诱导抗体和 T 细胞反应, 但是诱导的免疫强度以及刺激记忆性 T 细胞方面还存在不足, 可能也是导致现有红前期疫苗诱导产生的保护性免疫的效率和持续时间均未能达到 WHO 关于有效疫苗的标准的重要原因。因此, 疫苗递送系统以及免疫佐剂的研究同样是疟疾疫苗的另一重要方向。鉴于肝细胞寄生孢子表达的红前期抗原的持续刺激与维持肝内记忆性 T 细胞的存活密切相关, 因此, 如何模拟抗原的持续刺激是今后疟原虫红前期疫苗设计应该考虑的重要问题之一。

另外, 有关减毒孢子疫苗诱导产生疟原虫特异抗体和 CD8⁺ T 细胞的分子机制不是很清楚, 其机制

表 2 现有红前期亚单位疫苗的形式及其保护性研究

候选疫苗	简单描述	保护性
RTS,S in AS02A ^[25,26]	CSP 重复序列(R)、C 末端(含 T 细胞表位,T) 与 HBV 表面抗原(S)在酵母表达的融合蛋白, 主要针对孢子表面的 CSP 蛋白	41% 完全保护, 降低肝脏的原虫负荷达 97%
FP9-MVA ME-TRAP ^[27]	采用 priming-boosting 策略, 先用表达 multi-epitope (ME)-TRAP polyepitope-protein 的 FP9 virus priming, 然后用 modified vaccinia virus Ankara (MVA) boosting	40% 完全保护, 降低肝脏的原虫负荷达 92%
DNA-MVA ME-TRAP ^[28]	采用 priming-boosting 策略, 先用表达 multi-epitope (ME)-TRAP polyepitope-protein DNA 疫苗 priming, 然后用 modified vaccinia virus Ankara (MVA) boosting	无完全保护, 降低肝脏的原虫负荷达 80%
NYVAC encoding seven antigens ^[29]	NYVAC 病毒表达疟原虫生活史各个时期的抗原(总共 7 个)	3% 完全保护
Plasmid DNA encoding ME-TRAP ^[28]	表达 multi-epitope (ME)-TRAP polyepitope-protein DNA 疫苗	无任何保护
Plasmid DNA encoding five antigens	包括 CSP、TRAP、LSA-1、LSA-3 和 EXP-1 等 5 种红前期抗原	无任何保护
ICC-1132 in Montanide ISA 720 ^[34]	HBV 核心蛋白、CSP B 细胞表位和两个 T 细胞表位形成的病毒样颗粒	无任何保护
FMP1	以 AS02A 为佐剂的裂殖子表面抗原 MSP142	无任何保护
Combination B in Montanide ISA 720	包括 MSP1、MSP2 和 RESA 等 3 种红内期抗原	无任何保护

的探讨将对有效红前期疟疾疫苗的设计具有重要的指导意义。

参 考 文 献

- [1] Aggarwal AS, Kumar R, Jaffe D, *et al.* Oral *Salmonella*: malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8⁺ cytotoxic T cells[J]. *J Exp Med*, 1990, 172 (4): 1083-1090.
- [2] Rodrigues MM, Cordey AS, Arreaza G, *et al.* CD8⁺ cytolytic T cell clones derived against the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein protect against malaria[J]. *Int Immunol*, 1991, 3(6): 579-585.
- [3] Romero P, Maryanski JL, Corradin G, *et al.* Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria[J]. *Nature*, 1989, 341(6240): 323-326.
- [4] Doolan, D L, Hoffman SL. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8⁺ T cells in the *Plasmodium yoelii* model[J]. *J Immunol*, 1999, 163(2): 884-892.
- [5] Doolan DL, Hoffman SL. The complexity of protective immunity against liver-stage malaria[J]. *J Immunol*, 2000, 165(3): 1453-1462.
- [6] Kumar KA, Sano G, Boscardin S, *et al.* The circumsporozoite protein is an immunodominant protective antigen in irradiated sporozoites[J]. *Nature*, 2006, 444(7121): 937-940.
- [7] Berenzon D, Schwenk RJ, Letellier L, *et al.* Protracted protection to *Plasmodium berghei* malaria is linked to functionally and phenotypically heterogeneous liver memory CD8⁺ T cells[J]. *J Immunol*, 2003, 171(4): 2024-2034.
- [8] Gruner AC, Mauduit M, Tewari R, *et al.* Sterile protection against malaria is independent of immune responses to the circumsporozoite protein[J]. *PLoS ONE*, 2007, 2(12): 1371.
- [9] Rogers WO, Malik A, Mellouk S, *et al.* Characterization of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(19): 9176-9180.
- [10] Fidock DA, Gras-Masse H, Lepers JP, *et al.* *Plasmodium falciparum* liver stage antigen-1 is well conserved and contains potent B and T cell determinants[J]. *J Immunol*, 1994, 153(1): 190-204.
- [11] Krzych U, Lyon JA, Jareed T, *et al.* T lymphocytes from volunteers immunized with irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites recognize liver and blood stage malaria antigens[J]. *J Immunol*, 1995, 155(8): 4072-4077.
- [12] Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, *et al.* Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria[J]. *Nature*, 1991, 352(6336): 595-600.
- [13] Daubersies P, Thomas AW, Millet P, *et al.* Protection against *Plasmodium falciparum* malaria in chimpanzees by immunization with the conserved pre-erythrocytic liver-stage antigen 3[J]. *Nat Med*, 2000, 6(11): 1258-1263.
- [14] Rathore D, Sacci JB, Ide V, *et al.* Binding and invasion of liver cells by *Plasmodium falciparum* sporozoites essential involvement of the amino terminus of circumsporozoite protein[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(9): 7092-7098.
- [15] Bongfen SE, Torgler R, Romero JF, *et al.* *Plasmodium berghei*-infected primary hepatocytes process and present the circumsporozoite protein to specific CD8⁺ T cells *in vitro*[J]. *J Immunol*, 2007, 178(11): 7054-7063.
- [16] Mochizuki K, Hayashi N, Katayama K, *et al.* B7/BB-1 expression and hepatitis activity in liver tissues of patients with chronic hepatitis C[J]. *Hepatology*, 1997, 25(3): 713-718.
- [17] Franco A, Barnaba V, Natali P, *et al.* Expression of class I and class II major histocompatibility complex antigens on human hepatocytes[J]. *Hepatology*, 1988, 8(3): 449-454.
- [18] Weiss WR, Mellouk S, Houghten RA, *et al.* Cytotoxic T cells recognize a peptide from the circumsporozoite protein on malaria-infected hepatocytes[J]. *J Exp Med*, 1990, 171(3): 763-773.
- [19] Hoffman SL, Isenbarger D, Long GW, *et al.* Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes[J]. *Science*, 1989, 244(4908): 1078-1081.
- [20] Renia L, Marussig MS, Grillot D, *et al.* *In vitro* activity of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes from mice immunized with a synthetic malaria peptide[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(18): 7963-7967.
- [21] Renia L, Grillot D, Marussig M, *et al.* Effector functions of circumsporozoite peptide-primed CD4⁺ T cell clones against *Plasmodium yoelii* liver stages[J]. *J Immunol*, 1993, 150(4): 1471-1478.
- [22] 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 cells producing IFN-gamma[J]. *J Immunol*, 2003, 171(12): 6961-6967.
- [23] 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[J]. *Nat Med*, 2004, 10(4): 406-410.
- [24] Walther M, Dunachie S, Keating S, *et al.* Safety, immunogenicity and efficacy of a pre-erythrocytic malaria candidate vaccine, ICC-1132 formulated in Seppic ISA 720[J]. *Vaccine*, 2005, 23(7): 857-864.
- [25] Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, *et al.* A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group[J]. *N Engl J Med*, 1997, 336(2): 86-91.
- [26] Kester KE, McKinney DA, Tornieporth N, *et al.* Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental *Plasmodium falciparum* malaria[J]. *J Infect Dis*, 2001, 183(4): 640-647.
- [27] Webster DP, Dunachie S, Vuola JM, *et al.* Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(13): 4836-4841.
- [28] McConkey SJ, Reece WH, Moorthy VS, *et al.* Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans[J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 729-735.
- [29] Ockenhouse CF, Sun PF, Lanar DE, *et al.* Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria[J]. *J Infect Dis*, 1998, 177(6): 1664-1673.

(收稿日期: 2008-06-05 编辑: 盛慧锋)