

疟疾免疫记忆最新研究进展

马雅文 冯辉* 曹雅明

【摘要】 抗原特异性的免疫记忆是获得性免疫的重要特征。初次感染后免疫系统对特异性抗原建立免疫记忆,再次遇到同种抗原后能够产生更快速和高强度的免疫应答。构建疫苗的理想目标是诱导长效免疫记忆的产生。目前,疟疾的预防和治疗策略不断受阻于耐药疟原虫虫株出现等问题。免疫记忆难以长期有效维持是疟疾感染的主要特征。然而,诱导、维持和活化免疫记忆细胞的分子机制尚未充分阐明。该文对疟疾免疫记忆研究进展作一综述,以期为疟疾疫苗的研制开发提供新的理论依据。

【关键词】 疟疾;再感染;免疫记忆

Recent progress in malaria immune memory MA Ya-wen, FENG Hui*, CAO Ya-ming. Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China

* Corresponding author: FENG Hui, Email: fhshy@yahoo.com.cn

Supported by National Natural Science Foundation of China (30800961)

【Abstract】 The hallmark of adaptive immunity is antigen-specific immunological memory. Immunological memory is a phenomenon that has been exposed to a pathogen and survived the infection the experience is 'remembered' by the immune system. Upon re-exposure to the same pathogen an individual's immune response is more rapid and stronger so that the individual may experience no clinical systems of the infection. Indeed, all vaccines are predicated on the phenomenon of immunological memory. Malaria control has been continuously hampered by the re-emerging parasite resistance to newly introduced drugs. An important feature of malaria infection was difficult to effectively maintain long-term immune memory. However, the molecular mechanisms of induction, maintain and activation of memory cells remain unclear. Herein, this review highlighted the key aspects of malaria immune memory so as to provide theoretical basis for the development of effective malaria vaccines.

【Key words】 Malaria; Re-infection; Immune memory

免疫记忆是疟疾疫苗设计和应用的基础。疟疾免疫记忆的建立缓慢、不完整且短寿,产生和维持抗疟免疫记忆的机制尚不明确。流行区个体保护性免疫难以维持和迅速减弱的原因尚有争议。抗疟保护性免疫应答的短暂维持是否与记忆 CD4⁺ T 细胞或记忆 B 细胞或浆细胞寿命缺陷相关尚待深入研究。目前,疟疾免疫记忆研究成果主要来自血清流行病学研究和鼠疟模型。本文对疟疾免疫记忆特征、记忆 B 细胞、浆细胞和记忆 T 细胞的表型、产生维持机制等最新研究进展作一综述。

1 疟疾免疫概述

1.1 流行区疟疾免疫记忆特点

疟疾感染获得性免疫建立的时间缓慢且不持

久,当成人离开疟疾流行区或在疟疾再感染前特异性抗体迅速减少^[1-2],提示持续暴露于疟原虫抗原不仅是效应细胞和记忆细胞产生所必需的,而且是维持免疫记忆细胞持续存在所必需的。

居住在疟疾高密度流行区的个体在多次感染后能够获得对重症疟疾比较完整的免疫保护,而居住在低密度流行区的个体则不能^[3],表明保护性免疫记忆的建立有赖于抗原的持续刺激。对马里流行区 185 名 2~25 岁个体检测发现,体内恶性疟特异性记忆 B 细胞和长效抗体的建立依赖于长期接触恶性疟原虫,且以循序渐进的方式逐步累积获得^[4]。在马达加斯,疟疾已经被完全控制了很长时间,再次出现传播时,30 年前感染过疟原虫的个体比年轻初次感染者抵抗力强,表明抗疟免疫一旦建立可能长期存在。年轻个体抗疟免疫维持时间极为短暂^[5],且即使在初次感染时建立了良好的抗疟免疫,但在再次感染时抗疟免疫尚不能增强^[6],提示年轻个体在建立功能性的免疫记忆中可能存在

缺陷。但是,初次感染导致疟疾免疫发生缺失或受损的机制尚不明确。

非洲儿童近 20% 死于疟疾。每个非洲儿童每年平均因疟疾发热 1.6 ~ 5.4 次,每 30 秒就有一个儿童死于疟疾感染。尽管自出生后持续受到恶性疟的威胁,但 5 岁以下流行区儿童无法有效建立抗疟保护性免疫应答,对重症疟疾易感。目前认为,恶性疟原虫感染破坏了 B 细胞免疫记忆的建立、维持和活化。有疟疾临床症状的肯尼亚儿童体内产生短寿的抗恶性疟原虫裂殖子抗原特异性抗体,特异性 IgG1 抗体半衰期为 9.8 d,比正常 IgG1 半衰期(21 ~ 23 d)明显缩短^[6]。进一步研究发现,年龄较大的健康儿童和无症状疟疾感染携带者体内抗体滴度下降较慢,提示抗原持续存在和宿主免疫力成熟对维持血清抗体寿命至关重要^[2]。

1.2 疟疾初次感染影响脾脏结构

鼠疟模型显示,疟疾急性感染导致脾脏微结构出现改变,这可能影响免疫应答的发展和调节。夏氏疟原虫 AS 株 (*Plasmodium chabaudi chabaudi* AS, *P. c chabaudi* AS) 感染 C57BL/6 小鼠,原虫血症达峰后 2 ~ 3 d,脾脏微结构出现明显改变。正常结构中围绕滤泡的边缘区消失,CD169⁺ 边缘区巨噬细胞和 ER-TR9⁺ 巨噬细胞消失。骨髓区黏附分子 MAcCAM-1 表达增加。当原虫血症消退后,脾脏结构在感染后 60 d 恢复正常^[7]。脾脏结构的改变不依赖于 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 2、TLR4 或 TLR9,与 MyD88 分子作用微弱。尽管在感染小鼠体内形成了生发中心,但未形成明显的明区和暗区。疟原虫感染前 2 周用鸡 γ 球蛋白免疫小鼠,不影响其产生 IgG 抗体的数量和亲和力。但是,与夏氏疟原虫 AS 株同时免疫小鼠后,导致抗体亲和力明显减少。这提示脾脏结构尤其是生发中心的改变,可能影响疟原虫或其他病原体感染的抗体反应质量^[8]。

淋巴器官(脾、淋巴结和派尔集合淋巴结)内的 T/B 细胞应答与疟疾免疫和病理的相关性研究显示,伯氏疟原虫 ANKA 株 (*Plasmodium berghei* ANKA, *P. b* ANKA) 感染 CBA 小鼠后第 3 天,二级淋巴器官中大量 T 细胞激活,感染后第 6 ~ 8 天,大量 B 细胞被激活,同时生发中心的中心母细胞大量活化、增殖和凋亡,但几乎无分化的中央细胞。脾脏边缘区消失,且紊乱的生发中心和骨髓之间的界限变得模糊。T 细胞区观察到大量的浆母细胞产生。

伯氏疟原虫 ANKA 株感染导致生发中心结构改变,提示 B 细胞应答缺陷,进而影响 B 细胞免疫记忆的形成^[9]。

2 记忆 B 细胞和浆细胞

抗体已被确认在自然获得抗疟免疫中起关键作用。但是,疟原虫特异性抗体不能长期维持的原因尚不明确。B 细胞应答发生在淋巴器官,长寿浆细胞主要定居于骨髓。对流行区个体 B 细胞和抗体应答的研究仅局限于外周血单个核细胞检测。因此,鼠疟模式为深入研究记忆 B 细胞和浆细胞的形成和维持提供了必要的前提。

2.1 鼠疟模型

功能记忆 B 细胞和长期存活的浆细胞可以在夏氏疟原虫 AS 株感染后诱导产生。利用裂殖子表面蛋白羧基端相对分子量(M_r)为 19 000 的(merozoite surface protein 1-19, MSP1-19)蛋白初次免疫小鼠,诱导产生了 MSP1-19 特异性记忆 B 细胞和长寿浆细胞,并能够在骨髓和脾脏持续存在 8 个月之久。CD138⁺ 长寿浆细胞不依赖于疟原虫慢性感染的存在,抗疟药物治疗不影响其数量。再次感染时,功能性记忆 B 细胞可分泌产生 IgG2c、IgG2b 和 IgG1 型 MSP1-19 特异性抗体^[10]。

利用鼠疟模型,对记忆 B 细胞的表型进行分析。夏氏疟原虫 AS 株初次感染诱导 C57BL/6 小鼠产生脾脏 CD19(+) 记忆 B 细胞,存活至初次感染后第 60 天。记忆 B 细胞表型是 CD19(+) IgD(-) CD38(+) IgM(+) 或 CD19(+) IgD(-) CD38(+) IgG1(+) 和 CD19(+) IgD(-) CD38(+) IgG2a(+)。IgM(+) 记忆 B 细胞在再感染中不扩增,IgM(-) 记忆 B 细胞在生发中心和边缘区快速活化增殖,分泌高水平特异性抗体。再次感染时,骨髓内出现大量终末 B220(-) 浆细胞,其成熟表型为: Ig(hi) CD138(hi) CD9(+) B220(-),提示初次感染疟原虫后诱导有效记忆 B 细胞产生,在疟疾再感染中快速分化和长寿浆细胞联合发挥抗感染效果^[11]。

对流行区个体只能通过外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 检测和分析 B 细胞和浆细胞应答,而外周血液单核细胞是否反映脾脏和骨髓内的疟原虫特异性反应尚待进一步确认。近期研究显示,夏氏疟原虫 AS 株初次感染 C57BL/6 小鼠后,外周血能够检测到低水平记忆 B

细胞和浆细胞。记忆 B 细胞在外周血中存在时间长,在初次感染后 90 d 仍可检测,表型为 IgD(-) IgM(-) CD19(+) B 细胞和 MSP1 特异性记忆 B 细胞。浆细胞在外周血中存在时间短,在初次感染后 10~25 d 或再次感染后 10 d 内可检测到。外周血单核细胞中的浆细胞并非来源于骨髓的长寿浆细胞,而是由浆母细胞分化而来的,可表达 CD19、B220 和主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) II 类分子。由此提示,外周血液单核细胞可以成为疟疾特异性记忆 B 细胞和浆细胞的有效来源,可依据记忆 B 细胞和浆细胞外周血存在时间差异为收集疟疾流行区个人外周血采样时间提供理论依据^[12]。

2.2 流行区个体

疟原虫感染人体可以诱导产生短寿^[2,13]和长寿^[14-15]抗疟原虫特异性抗体应答。Dorfman 等^[16]利用肯尼亚感染人群外周血在体外用 MSP1 抗原刺激进行酶联免疫斑点检测(enzyme-linked immunospot assay, ELISPOTS),发现疟疾特异性细胞数量少,提示疟原虫特异性记忆 B 细胞减少。相反,Drakeley 等^[17]从坦桑尼亚感染人群发现,一旦获得 MSP1-19 特异性抗体和其他抗无性期抗原的特异性抗体,即可维持多年。

在肯尼亚 2~6 岁恶性疟感染急性期儿童外周血中,CD38(+) IgD(-) 记忆 B 细胞和过渡期 CD10(+) CD19(+) B 细胞数量增加,而初始 B 细胞亚群降低,提示恶性疟感染扰乱了 B 细胞亚群比例^[18]。非典型 B 细胞在疟疾流行区个体内大量扩增^[19],与恶性疟传播密度相关^[20]。

近期对居住在泰国北部低度疟疾流行区过去 6 年中患过恶性疟或间日疟临床个体的研究发现,很大比例暴露在低密度疟原虫感染个体的外周血中可检测到疟原虫抗原特异性抗体和抗原特异性记忆 B 细胞。血浆中未检测到抗原特异性抗体的个体,外周血也有稳定含量的抗原特异性记忆 B 细胞,提示循环记忆 B 细胞可能不依赖于长寿浆细胞而长期存活。由此表明,疟疾低频率感染能够诱导记忆 B 细胞应答和特异性抗体长期存在^[21]。

恶性疟顶端膜抗原 1(apical membrane antigen 1, AMA1)或裂殖子表面蛋白羧基端 M_r 42 000 片段(merozoite surface protein 1-42, MSP1-42)和明矾佐剂,单独或联合 TLR9 拮抗剂 CpG 进行免疫。志愿者外周血获得了抗原特异性记忆 B 细胞,外周血来

源的记忆 B 细胞 CD19(+) CD27(+) CD38(-)与初始 B 细胞 CD19(+) CD27(-) CD38(-)。联合 CpG 疫苗接种的个体,特异性记忆 B 细胞出现时间更早,数量更多,维持时间更长。疫苗特异性记忆 B 细胞与抗体水平呈正相关^[22]。

3 记忆 T 细胞

CD4⁺ T 细胞在疟疾初次感染的细胞免疫应答中发挥核心作用。CD4⁺ T 细胞可以辅助 B 细胞产生清除寄生虫所必需的抗体。它们也能增强吞噬细胞的吞噬杀伤能力,同时参与调控免疫病理损伤。疟疾免疫中 CD4⁺ T 细胞是维持 B 细胞分化、抗体类别转换和免疫记忆维持的关键。然而,记忆 CD4⁺ T 细胞如何产生,并参与和维持记忆 B 细胞的相关机制尚不明确。

3.1 鼠疟模型

研究者对夏氏疟原虫 AS 株感染 C57BL/6 小鼠 200 d 内 T 和 B 细胞功能进行研究后发现,抗疟完整保护性免疫的缺失不是由急性期疟原虫负荷决定的,也不是由特异性 IgG2a 和 IgG1 的血清水平决定的,而是特异性记忆 T 细胞反应能力逐渐降低的结果。药物治疗与未治疗组显示了相似的结果。此外,进一步通过过继转移试验证实,感染夏氏疟原虫 AS 株过程中 CD4⁺ T 细胞对抗疟长期完整性的保护发挥主要作用^[23]。

利用转基因小鼠获得抗疟红内期蛋白 MSP1 特异性 T 细胞受体的 CD4⁺ T 细胞,有助于深入研究记忆性 T 细胞的形成机制。夏氏疟原虫 AS 株慢性感染促进 CD4(+) CD44(hi) IL-7R α (+) 记忆 CD4⁺ T 细胞的产生,且与急性感染的 CD4(+) CD62L(lo) IL-7R α (-) 效应 T 细胞明显区分。根据细胞表型差异,将 CD4⁺ T 细胞分成 3 个亚群:中枢记忆细胞、早期效应记忆细胞和晚期效应记忆细胞。早期 CD4(+) CD62L(lo) IL-7R α (-) 效应记忆细胞在慢性感染中占主导地位。由此证明一条线性的记忆细胞分化途径:中枢记忆细胞-早期效应记忆细胞-后期效应记忆细胞。通过过继转移实验证实,慢性感染小鼠 CD44^{hi} 记忆细胞比未发生慢性感染的药物治疗小鼠的记忆细胞能更有效地推迟原虫血症并减弱免疫病理形成。慢性感染小鼠体内含有更高比例的产生 IFN- γ 和 TNF- α 的效应细胞,可增强抗疟保护效应。以上发现有助于理解疟疾慢性感染人体效应记忆细胞在重复感染中的再次活化效应^[24]。

3.2 流行区个体

Lee 等^[25]发现疟疾流行区个体体内记忆 T 细胞数量减少, T 细胞招募受抑制, T 细胞增殖和 IFN- γ 产生受抑制。I 期临床实验检测 MSP1-42 蛋白亚单位疫苗效果, 从 3 次免疫后 2 周的志愿者体内收集 PBMC, ELISPOTS 体外检测出 PBMC 培养上清 Th1 型细胞因子 IFN- γ 和 IL-2 与更高水平 Th2 型细胞因子 IL-5 和 IL-13, 证实 MSP1-42 蛋白亚单位疫苗可诱导特异性 CD4⁺ T 细胞免疫应答。46% 志愿者外周血细胞在体外长期培养后产生 CD4(+) CD45RO(+) CD40L(+) 特异性记忆 T 细胞^[26]。

泰国北部疟疾低密度流行区个体 CD4⁺ T 细胞能够对疟疾红内期裂殖体表面抗原产生免疫应答。受试者在研究前的 6 年中曾经患过恶性疟或间日疟, 分离受试者 CD45RO⁺ 效应记忆 T 细胞, 体外用疟原虫红内期裂殖体表面抗原刺激 24 h 后可分泌产生 IFN- γ , 6 d 后的培养上清可检测到 IL-10。此反应在携带长期抗体和疟疾抗原特异性记忆 B 细胞的受试者中反应更明显。产生 IFN- γ 的效应记忆 T 细胞数量在 12 个月后显著减少, 半衰期约为 3.3 年(95% CI 1.9 ~ 10.3)。截然不同的是, 产生 IL-10 的效应记忆 T 细胞在最近一次疟疾感染后持续维持多年, 至少 6 年内未显著减少^[27]。

4 结语

疟疾感染引起免疫抑制与记忆 B 细胞、长寿浆细胞和记忆 T 细胞的建立维持缺失有关。充分理解参与调控、维持和诱导记忆 B 细胞、记忆 T 细胞形成的因素和疟疾免疫记忆特性可为保护性免疫、免疫病理和有效疟疾疫苗的构建奠定坚实的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, et al. Immunity to malaria: more questions than answers[J]. Nat Immunol, 2008, 9(7): 725-732.
- [2] Akpogheneta OJ, Duah NO, Tetteh KK, et al. Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific [J]. Infect Immun, 2008, 76(4): 1748-1755.
- [3] Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, et al. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections[J]. Nat Med, 1999, 5(3): 340-343.
- [4] Weiss GE, Traore B, Kayentao K, et al. The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections [J]. PLoS Pathog, 2010, 6(5): e1000912.
- [5] Achtman AH, Bull PC, Stephens R, et al. Longevity of the immune response and memory to blood-stage malaria infection [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2005, 297: 71-102.
- [6] Kinyanjui SM, Conway DJ, Lanar DE, et al. IgG antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life[J]. Malar J, 2007, 6: 82.
- [7] Achtman AH, Khan M, MacLennan IC, et al. *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice induces strong B cell responses and striking but temporary changes in splenic cell distribution [J]. J Immunol, 2003, 171(1): 317-324.
- [8] Cadman ET, Abdallah AY, Voisine C, et al. Alterations of splenic architecture in malaria are induced independently of Toll-like receptors 2, 4, and 9 or MyD88 and may affect antibody affinity [J]. Infect Immun, 2008, 76(9): 3924-3931.
- [9] Carvalho LJ, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT, et al. Germinal center architecture disturbance during *Plasmodium berghei* ANKA infection in CBA mice [J]. Malar J, 2007, 6: 59.
- [10] Ndungu FM, Cadman ET, Coulcher J, et al. Functional memory B cells and long-lived plasma cells are generated after a single *Plasmodium chabaudi* infection in mice [J]. PLoS Pathog, 2009, 5(12): e1000690.
- [11] Stephens R, Ndungu FM, Langhorne J. Germinal centre and marginal zone B cells expand quickly in a second *Plasmodium chabaudi* malaria infection producing mature plasma cells [J]. Parasite Immunol, 2009, 31(1): 20-31.
- [12] Nduati EW, Ng DH, Ndungu FM, et al. Distinct kinetics of memory B-cell and plasma-cell responses in peripheral blood following a blood-stage *Plasmodium chabaudi* infection in mice [J]. PLoS One, 2010, 5(11): e15007.
- [13] Cavanagh DR, Elhassan IM, Roper C, et al. A longitudinal study of type-specific antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in an area of unstable malaria in Sudan [J]. J Immunol, 1998, 161(1): 347-359.
- [14] Drakeley CJ, Carneiro I, Reyburn H, et al. Altitude-dependent and -independent variations in *Plasmodium falciparum* prevalence in northeastern Tanzania [J]. J Infect Dis, 2005, 191(10): 1589-1598.
- [15] Taylor RR, Egan A, McGuinness D, et al. Selective recognition of malaria antigens by human serum antibodies is not genetically determined but demonstrates some features of clonal imprinting [J]. Int Immunol, 1996, 8(6): 905-915.
- [16] Dorfman JR, Bejon P, Ndungu FM, et al. B cell memory to 3 *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in a malaria-endemic area [J]. J Infect Dis, 2005, 191(10): 1623-1630.
- [17] Drakeley CJ, Corran PH, Coleman PG, et al. Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(14): 5108-5113.
- [18] Asito AS, Moormann AM, Kiprotich C, et al. Alterations on peripheral B cell subsets following an acute uncomplicated clinical malaria infection in children [J]. Malar J, 2008, 7: 238.
- [19] Weiss GE, Crompton PD, Li S, et al. Atypical memory B cells

- are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area [J]. J Immunol, 2009, 183(3): 2176-2182.
- [20] Weiss GE, Clark EH, Li S, et al. A positive correlation between atypical memory B cells and *Plasmodium falciparum* transmission intensity in cross-sectional studies in Peru and Mali [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e15983.
- [21] Wipasa J, Suphavitai C, Okell LC, et al. Long-lived antibody and B cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* [J]. PLoS Pathog, 2010, 6(2): e1000770.
- [22] Crompton PD, Mircetic M, Weiss G, et al. The TLR9 ligand CpG promotes the acquisition of *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in malaria-naive individuals [J]. J Immunol, 2009, 182(5): 3318-3326.
- [23] Freitas do Rosario AP, Muxel SM, Rodriguez-Malaga SM, et al. Gradual decline in malaria-specific memory T cell responses leads to failure to maintain long-term protective immunity to *Plasmodium chabaudi* AS despite persistence of B cell memory and circulating antibody [J]. J Immunol, 2008, 181(12): 8344-8355.
- [24] Stephens R, Langhorne J. Effector memory Th1 CD4 T cells are maintained in a mouse model of chronic malaria [J]. PLoS Pathog, 2010, 6(11): e1001208.
- [25] Lee EA, Flanagan KL, Minigo G, et al. Dimorphic *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 epitopes turn off memory T cells and interfere with T cell priming [J]. Eur J Immunol, 2006, 36(5): 1168-1178.
- [26] Huaman MC, Martin LB, Malkin E, et al. Ex vivo cytokine and memory T cell responses to the 42-kDa fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in vaccinated volunteers [J]. J Immunol, 2008, 180(3): 1451-1461.
- [27] Wipasa J, Okell L, Sakkhachornphop S, et al. Short-lived IFN-gamma effector responses, but long-lived IL-10 memory responses, to malaria in an area of low malaria endemicity [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(2): e1001281.

(收稿日期:2011-05-06)

(本文编辑:陈勤)