

# 诺氏疟原虫不同组分的抗原抵抗疟疾感染的实验研究

李英杰 马 杲 许日成 吴承声 李祥林  
(中国人民解放军第一军医大学疟疾免疫研究室, 广州)

我们用乳剂制造器崩解原虫, 以分级离心的方法提纯抗原, 并将不同组份的抗原分别进行动物实验, 结果表明, 此抗原可能属于原虫胞膜微粒体成分的 I 号抗原。在不加任何佐剂的情况下, 对诺氏疟原虫的攻击感染有较强的抵抗能力。

早在 1945 年 Freund 及其同事应用诺氏疟原虫 (*Plasmodium knowlesi*) 死虫体, 加完全佐剂给猴免疫, 可防止致命的感染<sup>[1]</sup>。但是, 此后很长的一段时间内对于疟疾自动免疫研究没有多大进展。直到六十年代初期, 有人报道恶性疟原虫 (*P. falciparum*) 产生抗氯喹作用后, 对于疟疾人工自动免疫的研究才成为抗疟措施中的重要课题。

关于应用较纯化的非水溶性的抗原物质与弗氏完全佐剂混合制成乳剂给猴体进行免疫实验, 已证明对动物有不同程度的保护作用<sup>[2-4]</sup>。

本文报道在不加任何佐剂的情况下, 利用不溶性抗原, 猴体对疟原虫的免疫作用。

## 材 料 和 方 法

### (一) 实验动物

全部实验动物均用在同一时间由广西南宁采购的恒河猴, 体重 4—8 市斤, 在实验室内, 在同一条件下, 经半年以上饲养后再做实验。除常规饮食外, 每天加喂少量香蕉和苹果等。实验时, 不加选择地将 15 只猴分编甲组、乙组和对照组, 每组 5 只。实验前, 定期进行血常规和血片检查, 判定没有疟原虫的自染感染。

### (二) 抗原制备

关于诺氏疟原虫抗原的分离制备技术见图 1。分离和制备好的 I 号和 II 号抗原可放 -30℃ 低

温冰箱保存。用前自冰箱取出融化, 如有絮状沉淀出现, 经混匀后再用。

所有抗原都不加任何佐剂。

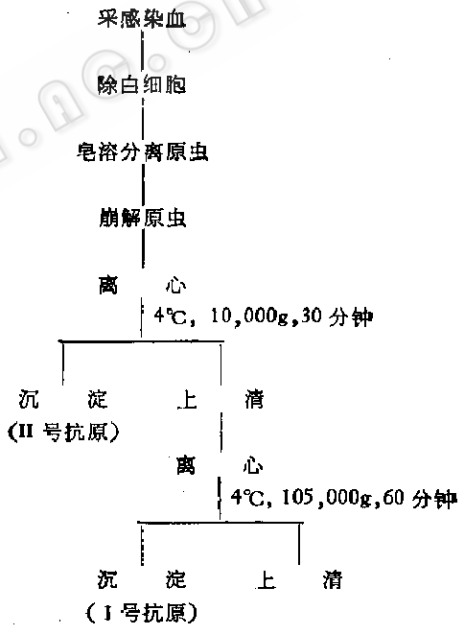


图 1 分离疟原虫抗原的程序

### (三) 免疫接种方法

甲组和乙组实验猴每只每次分别接种 I 号和 II 号抗原各 3.0 毫升, 间隔二周免疫接种一次, 共免疫三次。肌肉注射。

### (四) 攻击感染

在第三次免疫接种后的第 9 天, 用  $11 \times 10^3$  的诺氏疟原虫感染红细胞 (含环状体期寄生虫) 由静脉注射攻击感染。

本文于 1979 年 1 月 26 日收到。

在第一次攻击实验的基础上,将存活的 5 只免疫猴及 3 只新的对照猴,于第一次攻击后的第 6 个月进行第二次攻击实验。方法同第一次。攻击量为  $13 \times 10^3$  感染红细胞。

#### (五) 涂片

从攻击后的第四天起,每天上午涂制厚薄血膜,用姬氏染液染色镜检。根据感染的程度计数红细胞来统计原虫血症。当动物病危时,再做一次死亡前的原虫血症统计。

在全部实验过程中,每周每只猴抽一次血(2—3 毫升),分离血清,用荧光抗体技术检查抗

体。

## 实验结果

### 一、第一次攻击实验结果

#### (一) 不同组分抗原的保护作用

将所有实验动物用  $11 \times 10^3$  诺氏疟原虫感染红细胞,由静脉注射进行攻击,结果三组动物的差别明显,Ⅰ号抗原的保护作用是显著的(表 1)。

表 1 第一次攻击实验结果

动物编号	原虫血症出现日期 (月·日)	潜 隐 期 (天)	死前原虫血症 (%)	原虫血症持续天数	死亡日期 (月·日)
甲-1					
甲-2	12.5	4		*	
甲-3	12.6	5	9.12	7	12.12
甲-4					
甲-5					
乙-1	12.11	10	24.15	8	12.18
乙-2	12.7	6	89.14	6	12.12
乙-3	**				
乙-4	12.6	5	74.74	6	12.11
乙-5	12.6	5	29.08	6	12.11
丙-1	12.5	4	78.02	5	12.9
丙-2	12.5	4	73.99	7	12.11
丙-3	12.5	4	80.25	6	12.10
丙-4	12.5	4	82.17	6	12.10
丙-5	12.6	5	74.61	6	12.11

\* 甲-2 原虫血症持续约三个月,以后转阴。

\*\* 乙-3 仅于 12.11 在厚血膜中查见原虫,以后转阴。

接受Ⅰ号抗原免疫的 5 只猴,除甲-3 死亡外,其它 4 只猴全部存活。甲-1,甲-4 和甲-5 未发生原虫血症,呈现完全抵抗。甲-3 虽然死亡,但原虫血症也较低。用Ⅱ号抗原免疫的乙组动物,除乙-3 存活外,其它全部死亡。显示Ⅱ号抗原的保护作用是非常低的。攻击后,所有对照组动物在短时间内出现极高的原虫血症,并于 5—7 天内全部死亡。

#### (二) 用荧光抗体技术对三组动物疟疾抗体水平检查结果

从三组动物在免疫后,用荧光抗体技术对疟疾抗体水平检查结果来看,它们之间的差别是显著的。从图 2 可以看出,在免疫之前,甲-1,乙-1 和丙-1 的血清滴度十分接近,但从第二次免疫后,甲-1 和乙-1 的抗体水平逐步升高。到第一次免疫后第 40 天,两者的血清滴度都是 1:640。相反,丙-1 的血清滴度在免疫后与免疫前无差别。乙-1 略高于甲-1,而甲-1 的疟疾抗体到第一次免疫后的第 161 天又降到免疫前的水平。

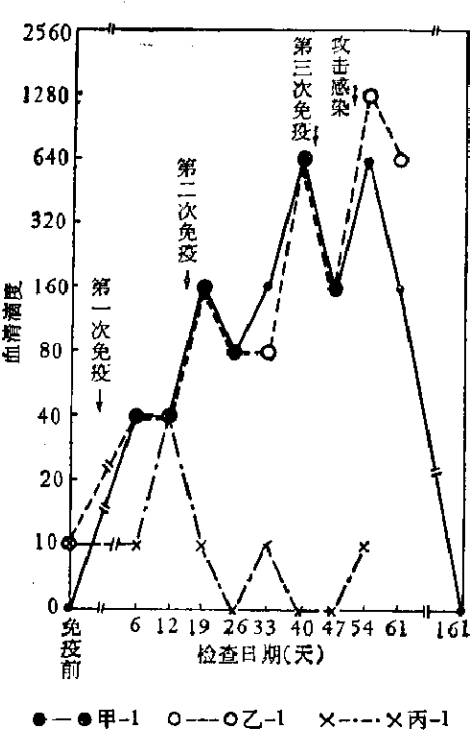


图2 用荧光抗体技术对甲-1、乙-1和丙-1疟疾抗体水平检查的结果

三组动物第一次免疫后第54天的荧光抗体的检查结果(图3),与图2的结果基本一致。甲组和乙组的血清滴度明显高于对照组,而乙组又略高于甲组。所有对照组动物的血清滴度都在1:40以下。

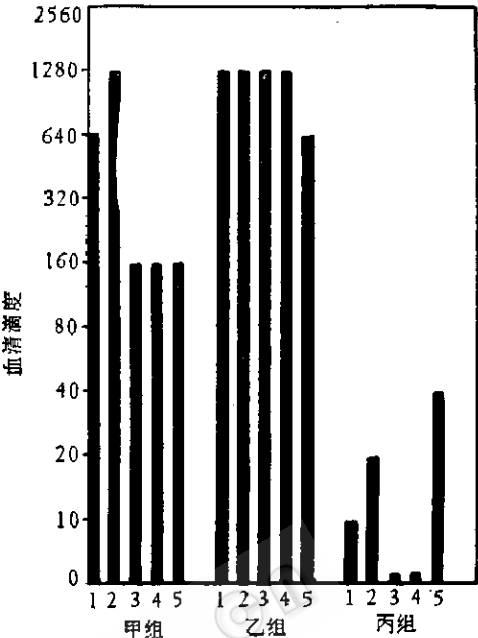


图3 在第一次免疫后54天用荧光抗体技术对三组动物疟疾抗体水平检查的结果

二、第二次攻击实验结果

在第一次攻击实验基础上,对存活的甲-1,甲-2,甲-4,甲-5和乙-3 5只猴,又于第一次攻击后的第6个月,连同另加的3只对照猴一起进行了第二次攻击实验。其结果除甲-2之外,其他7只猴全部死亡(表2)。在第二次攻击之前,甲-2的原虫血症

表2 第二次攻击实验结果

动物编号	原虫血症出现日期 (月·日)	潜 隐 期 (天)	死前原虫血症 (%)	原虫血症 持续天数	死亡日期 (月·日)
甲-1	5.13	4	45.20	7	5.19
甲-2					
甲-4	5.14	5	23.20	7	5.20
甲-5	5.14	5	48.90	6	5.19
乙-3	5.13	4	55.80	6	5.18
对-1	5.13	4	47.00	4	5.16
对-2	5.13	4	50.50	6	5.18
对-3	5.13	4	46.90	6	5.18

已消失,经过长期的带虫免疫后,当再次攻击时,甲-2未出现原虫血症。另外4只免

疫猴与对照组动物一样,在短期内出现极高的原虫血症且死亡,未表现保护反应。

## 讨 论

关于血液型疟原虫人工自动免疫的研究, 只有将免疫抗原与弗氏佐剂混合的乳剂给猴免疫, 才能使动物获得抵抗诺氏疟原虫感染的能力。然而, 在我们的实验中, 没有使用任何佐剂, 仅仅接种 I 号抗原的动物也取得较好的保护效果。佐剂的应用虽有刺激免疫系统提高免疫反应的能力, 但它的副作用也是严重的。所以, 我们的实验结果表明, 不加佐剂, 单独注射疫苗抗原成功地使猴获得免疫同源疟原虫攻击感染的能力, 这为研究人疟疫苗开辟了一个较好的实验途径。

虽然在 I 号抗原中可能混杂有少量红细胞膜, 但是, 这种抗原所产生的保护作用大概不会来源于抗原中污染的宿主细胞成

分。Targett 和 Fulton<sup>[5]</sup> 根据实验指出, 宿主细胞与弗氏佐剂混合做成的免疫材料对实验猴没有保护作用。D'Antonio 等人多次指出, 疟原虫疫苗抗原的起源与疟原虫崩解后的碎片有密切关连, 所以他们认为疫苗抗原大概是原虫胞膜的一部分。这与我们的 I 号抗原即“膜抗原”的认识是一致的。

## 参 考 文 献

- [1] Freund, J. et al.: *Science*, **102**: 202—204, 1945.
- [2] D'Antonio, L. E.: *Exper. Parasit.*, **31**: 75—81, 1972.
- [3] Corradetti, A. et al.: *Parassitologia*, **11**: 129—134, 151—159, 1969.
- [4] Schenkel, R. H. et al.: *Bull. WHO.*, **48**: 597—604, 1973.
- [5] Targett, G. A. T. and J. D. Fulton: *Exper. Parasit.*, **17**: 180—193, 1965.

# STUDIES ON THE VACCINATION OF RHESUS MONKEYS · AGAINST *PLASMODIUM KNOWLESI* MALARIA BY THE USE OF NON-SOLUBLE ANTIGEN FRACTIONS

Li Ying-jie Ma Gao Xu Ri-cheng Wu Cheng-sheng Li Xiang-lin

(Department of Malaria Immunology, the First PLA Medical College, Guangzhou)

This is a report of a successful immunization of monkeys against *plasmodium knowlesi* malaria by the use of insoluble antigen fraction without adjuvant.

1. The antigens are prepared according to a previous paper (Li et al., 1974). Parasites are harvested from infected monkeys' blood at peak parasitemia with mature schizont using a 1% saponin solution in 0.9% saline. The pooled parasites are suspended in 4 volumes of 5 mM MgCl<sub>2</sub> solution, and homogenized with an universal homogenizer at 18,000 rpm for

15 minutes. The resulting suspension was centrifuged to fractionate various antigen components. The pellet, sedimented with centrifugation at 10,000 g for 30 minutes, is designated as antigen fraction II. The supernatant was recentrifuged at 105,000g for 60 minutes, the resulting pellet is designated as antigen fraction I.

2. All antigen fractions are diluted with a volume of 0.9% saline and no adjuvants are added. The suspensions of these two fractions are used directly in vaccination.

3. Fifteen monkeys (*Macacca mulatta*), used in this experiment, were divided, group I, II and III (control) having five monkeys each. 2—3 ml of vaccine antigens was injected intramuscularly for 3 times to each animal of the two immunized groups, group I with fraction I and group II with fraction II. Ten days later, all experimental monkeys were challenged with intravenous inoculation of  $11 \times 10^8$  erythrocytes infected with homologous

parasites.

4. In group I, 4 of the 5 monkeys survived and 3 of the survived animals did not develop parasitemia, showing the greatest protection. The protection of antigen fraction II was poor, only one of the vaccinated 5 monkeys survived while the others developed high-grade parasitemia and finally died. All 5 control monkeys developed lethal infection.