

三株抗恶性疟单克隆抗体 (M26-32, F5-3F9, F5-4E9)的鉴定

刘尔翔 李文录 刘宝丰 樊汝恭 毛映红

(中国医学科学院基础医学研究所寄生虫学室; 世界卫生组织免疫学研究和培训中心, 北京)

用约氏疟原虫和恶性疟原虫免疫BALB/c小鼠, 取其脾细胞与SP2/0细胞融合, 获得11株抗恶性疟原虫红内期的单克隆抗体(McAb)。以多种疟原虫(恶性疟, 间日疟, 卵圆疟, 诺氏疟、食蟹猴疟和约氏疟)的感染血片为抗原, 进行间接免疫荧光测定(IFA), 发现有3株McAb(M26-32, F5-3F9, F5-4E9)与所试6种疟原虫均发生阳性荧光反应。其中M26-32除能与中国海南岛的2个恶性疟分离株结合外, 与东南亚、非洲、拉丁美洲的6个恶性疟分离株及卢旺达临床病人周围血中的环状体亦呈阳性反应。在与我国不同地区的间日疟反应时, 几株McAb的IFA结果不同, 提示不同间日疟原虫株的抗原成分有所差异。这些McAb与马媯疫锥虫和弓浆虫均无交叉免疫荧光反应。因此可能用于检测病人血中的微量疟原虫抗原, 为早期诊断疟疾提供有力的工具, 并可能用于鉴定不同地区的间日疟原虫。

恶性疟原虫体外生长抑制试验结果表明, McAb M26-32能部分抑制疟原虫对³H-亮氨酸的掺入, 并能延缓原虫血症的上升, 在疟疾保护性免疫中可能起一定作用。

关键词 疟原虫; 单克隆抗体; 疟原虫共同抗原。

用单克隆抗体(McAb)对疟原虫进行抗原分析, 有两种实际应用: 诊断抗原及寻找保护性抗原。由于疟原虫存在着不同的地区株, 如能制备一些McAb, 能与多种疟原虫及其不同地区株均起免疫反应, 它们的实用价值要比株特异的McAb大。我们在制备抗约氏鼠疟及抗恶性疟的McAb过程中, 发现有3株McAb对各种疟原虫有广泛的交叉。本文报告它们的鉴定结果。

材料和方法

(一) 细胞融合及高滴度McAb腹水的获得

参考文献[1]。

(二) 间接免疫荧光法(IFA)

参考文献[1]。

(三) 恶性疟原虫体外生长抑制试验

1. ³H-亮氨酸掺入法: 参考Perrin等人的方法^[2], 具体方法如下: 将体外培养的恶性疟原虫(FCCI/HN)感染率调至1%左右, 分装入96孔板内, 加入含10%McAb腹水的RPMI1640疟原虫培养基, 置37℃, 2.5%CO₂孵育箱中培养,

本文于1985年4月1日收到。

日内瓦WHO免疫中心的Dayal博士帮助进行McAb对不同地区恶性疟分离株的鉴定。首都医院检验科何学静、四川医学院寄生虫学教研室、河南省防疫站王恒礼、上海寄生虫病研究所诊断室、广州第一军医大学疟疾免疫室、贵州省防疫站为我们提供了不同种的疟原虫血片。马媯疫锥虫和弓浆虫涂片分别获自卫生部生物制品检定所生化药品室和301医院妇产科, 在此一并致谢。

每日换液。66h 后,小心吸去培养上清,每孔加入含 ^3H -亮氨酸的培养基 (30 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$)0.2ml, 孵育 6h。将培养细胞收集在玻璃纤维膜上,干燥后放入闪烁液内,测 cpm。每个标本重复做 5 个孔,并设不加 McAb 的空白对照和无关 McAb 对照。

2. 涂片计数法:恶性疟原虫培养方法同前,但不加同位素。分别在培养 24、48、72h 取血做涂片,经吉氏染色后,计数 2000 个红细胞,计算感染率,连续观察原虫血症变化情况。设空白及 SP2/0 腹水和无保护性的 McAb 作对照。

结 果

(一) IFA 结果

3 次融合共获得 11 株抗恶性疟的 McAb, 鉴定结果见表 1。

表 1 示在 11 株 McAb 中有 3 株 (M26-32, F5-3F9, F5-4E9) 与所试 6 种疟原虫均发生阳性荧光反应。关于这 3 株 McAb 的进一步鉴定见表 2—4。

3 株 McAb 都针对恶性疟原虫和约氏疟原虫的非阶段特异性抗原。其余 4 种疟原虫的抗原片中只有滋养体和裂殖体,因

表 1 McAb 与不同种疟原虫的交叉免疫荧光反应

Table 1 IFA results of McAbs using different spp. of *Plasmodium* as target

McAb	恶性疟 <i>P.f</i>	间日疟 <i>P.v</i>	卵圆疟 <i>P.o</i>	诺氏疟 <i>P.k</i>	食蟹猴疟 <i>P.c</i>	约氏疟 <i>P.y</i>
M26-9 ^a	+	-	ND ^c	+	-	+
M26-26 ^a	+	-	ND ^c	-	-	+
M26-29 ^a	+	-	ND ^c	-	-	+
M26-30 ^a	+	-	ND ^c	-	-	+
M26-32 ^a	+	+	+	+	+	+
F1-D2 ^b	+	-	ND ^c	-	-	-
F5-2D2 ^b	+	-	ND ^c	-	-	-
F5-3A1 ^b	+	-	ND ^c	-	-	-
F5-3F9 ^b	+	+	+	+	+	+
F5-3F12 ^b	+	-	ND ^c	-	-	-
F5-4E9 ^b	+	+	+	+	+	+
总计 Total	11	3	3	4	3	7

P.f = *P.falciparum* *P.v* = *P.vivax* *P.o* = *P.ovale* *P.k* = *P.knowlesi* *P.c* = *P.cynomolgi*
P.y = *P.yoelii*

a. 用约氏疟 (*P.y*) 免疫小鼠融合所得

McAb obtained from spleen cells immunized with *P.yoelii* only

b. 初次免疫用约氏疟, 两次加强免疫用恶性疟原虫

McAb obtained from spleen cells primed with *P.y* and then boosted twice with *P.f*

c. ND: 未做 not done

此, 尚不能确定与其它发育阶段的反应结果。与马媯疫锥虫和弓浆虫均无明显 IFA 反应。

表 3、4 说明这几株 McAb 与不同地区疟原虫的免疫荧光反应。M26-32 可与

世界不同地区的恶性疟原虫结合, 而 F5-3F9 可与我国几个不同地区的间日疟反应, 表明它们的相应抗原较广泛地存在于人疟原虫中。

表 2 McAb与疟原虫不同发育时期的IFA反应及与马媾疫锥虫和弓浆虫的交叉反应结果

Table 2 IFA results of McAbs reacting with different developmental stages of malaria parasites, *Trypanosoma* and *Toxoplasma*

疟原虫 <i>Plasmodium</i> spp.	M26-32	F5-3F9	F5-4E9
恶性疟 <i>P. falciparum</i> **	R, T, S, M.*	R, T, S, M.	R, T, S, M.
间日疟 <i>P. vivax</i>	T, S.	T, S.	T, S.
卵圆疟 <i>P. ovale</i>	T.	T.	T.
诺氏疟 <i>P. knowlesi</i>	T, S.	T, S.	T, S.
食蟹猴疟 <i>P. cynomolgi</i>	T, S.	T, S.	T, S.
约氏疟 <i>P. yoelii</i>	R, T, S, M.	R, T, S, M.	R, T, S, M.

* R: 环状体 Ring form; T: 滋养体 Trophozoite; S: 裂殖体 Schizont; M: 裂殖子 Merozoite.

** 恶性疟环状体的荧光反应均以一名卢旺达病人周围血涂片的IFA结果为准

Blood smears from a malaria patient from Rwanda were used to recognize ring form of *P. falciparum*

表 3 几株McAb与恶性疟不同分离株的交叉反应结果

Table 3 IFA results of 3 McAbs with different isolates of *P. f.*

McAb	中国 China		洪都拉斯 Honduras	扎伊尔 Zaire	冈比亚FCR-3 Gambia		泰国Tak-9 Thailand	
	FCC1	FCC3	M23	M25	A-2	D-3	M94	M96
M26-26	+	+	-	+	-	+	+	-
M26-29	+	+	-	+	-	+	+	+
M26-32	+++	+++	+	++	+	++	+++	+++

表 4 McAb与不同地区间日疟原虫的IFA反应

Table 4 IFA results of 3 McAbs with blood smears of *P. vivax* from different regions of China

McAb	<i>P. vivax</i>		
	四川 Sichuan	贵州 Guichow	河南 Henan
M26-32	+	-	-
F5-3F9	+	+	+
F5-4E9	+	-	-

(二) 恶性疟原虫体外生长抑制试验结果

1. ^2H -亮氨酸掺入试验: 恶性疟感染血在含有10% McAb 腹水的培养基中培养66h后, 加入 ^3H -亮氨酸孵育6h, 掺入情况见表5。

表5说明: (1) M26-32对恶性疟原虫生长时的亮氨酸掺入有抑制作用。当感染率较低时(实验1)与无关抗体M26-1比较, M26-32对疟原虫亮氨酸掺入的

抑制率为42.1%, t 检验表明二者有显著差异($p < 0.02$), 与空白对照比较, M26-32的抑制率为28.4%, t 检验有非常显著差异($p < 0.01$)。(2) M26-32的抑制作用与原虫感染率有关, 感染率较高时(实验2), 其抑制作用下降。腹水 McAb11、3F9、4E9加入恶性疟原虫培养后, 原虫摄取量均较空白为佳, 可能小鼠腹水中, 有增加疟原虫摄取 ^3H -亮氨酸的因素存在。图1示实验过程中空白对照组疟原虫

表 5 ^3H -亮氨酸掺入试验培养72小时结果Table 5 Results of ^3H -leucine incorporation assay (cultured for 72h)

McAb	实验 1 Exp.1. 0 小时感染率 0.7%		实验 2 Exp.2. 0 小时感染率 1.7%	
	$\bar{X} \pm \text{SD}(\text{cpm})$	抑制率(%) Inhibition rate	$\bar{X} \pm \text{SD}(\text{cpm})$	抑制率(%) Inhibition rate
空白Blank	954 ± 36.2		1150 ± 274.3	
M26-11*	1179 ± 269.9		1189 ± 225.9	
F5-3F9	1255 ± 105.5	-6.4	1600 ± 171.6	-34.6
F5-4E9	1131 ± 155.7	4.1	1460 ± 126.4	-22.8
M26-32	683 ± 62.8	42.1	924 ± 117.9	22.3

* M26-11 is McAb against *P.yoelii* only, not crossed with *P.falciparum*.

在正常培养条件下感染率的变化, 说明对照原虫生长正常。

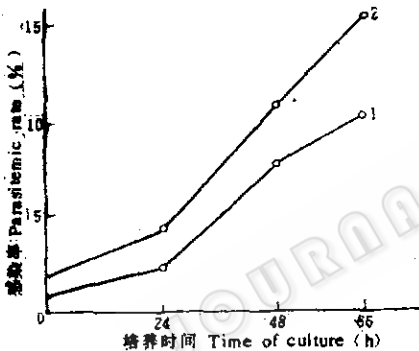


图 1 ^3H -亮氨酸掺入试验空白对照组的感染率变化 (涂片镜检法)

Fig. 1 The change of infection rate of *P.falciparum* culture in blank group (by smears with microscopic examination method).

1. 实验1. Exp.1; 2. 实验2. Exp.2

图 2 示加入 McAb M26-32 腹水 72h 后, 与对照组 F1-D2 (为无抑制作用的 McAb) 比较, 对恶性疟原虫生长的抑制率为 34%。24、48 及 72h 抑制率的方差分析结果表明 M26-32 对恶性疟原虫的生长有非常显著的抑制作用 ($p < 0.01$)。

讨 论

应用 McAb 技术寻找疟原虫种间

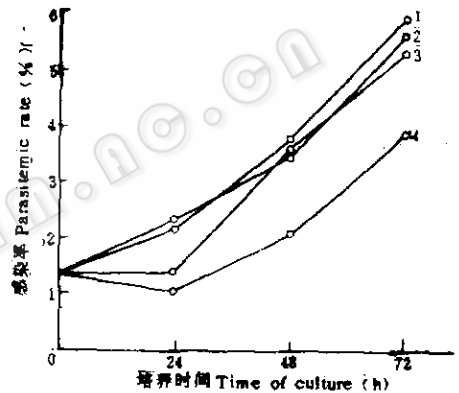


图 2 恶性疟原虫生长抑制试验涂片计数法试验结果

Fig. 2 Results of inhibition of McAbs on the growth of *P.f* in vitro (by smears with microscopic examination method).

1. sp2/0; 2. 空白对照blank; 3. McAb-F1-D2; 4. M26-32.

及分离株的共同抗原, 国内外已有报道^[1,3-5]。本文报告的 3 株 McAb 不但对不同种的疟原虫 (恶性疟原虫、约氏鼠疟原虫和两种猴疟原虫) 具有交叉反应, 而且对人类的恶性疟、间日疟及卵圆疟原虫均有交叉。由于没有得到三日疟原虫的血片, 尚不能确定这些 McAb 对三日疟原虫是否呈阳性反应。此外, M26-32 株 McAb 对我国海南岛的 2 个、中美的一个、泰国

的 2 个、非洲的 4 个恶性疟原虫分离株都有交叉反应。如此广泛的交叉反应, 过去文献中尚未见报道。这 3 株 McAb 对非疟原虫的血内寄生虫如锥虫和弓浆虫等不呈现明显阳性反应, 因此可能成为诊断疟原虫的有力工具。Mackey 等^[7] Avraham 等^[8] 使用人的免疫血清诊断血中是否有疟原虫, 效果与厚血片相近, 但假阳性较多。如改用 McAb, 可提高检测的敏感性及特异性, 是有希望的一种血清学诊断疟原虫的方法。

我国间日疟在流行病学及志愿者接种孢子子的实验中^[9,10], 证明可能存在两个不同的株, 即长潜伏期与短潜伏期株。本文报告的 3 株 McAb 均与四川采的间日疟原虫血片呈阳性 IFA 反应, 但只有 F5-3F9 株与河南郑州采的血片呈阳性反应。因此, 我国各地的间日疟原虫在抗原上有一定的差异。在获得较多的间日疟 McAb 后, 可能对我国间日疟原虫由抗原差异的角度加以分型。

在制备疟疾疫苗时, 要考虑到疫苗使用的广泛性。Dubois 等^[11] 取恶性疟分子量为 70—90 和 90—120kd 的两组抗原, 免

疫松鼠猴, 都取得了一定保护作用。Perrin 等^[12] 用人的免疫血清提取恶性疟原虫抗原, 免疫松鼠猴, 认为有效抗原的分子量为 140kd, 与前者报告的抗原分子量不同, 说明恶性疟原虫的保护性抗原可能不只一种。因此找到各疟原虫分离株都共有的抗原作为疫苗是可能的。本文报告的 M26-32 McAb, 由于与约氏鼠疟交叉, 当将 M26-32 腹水注入小鼠后, 再用强毒株约氏疟原虫攻击, 可以延长小鼠的寿命, 由对照组的 7.5 天延长到 9.3 天^[13]。将 M26-32 腹水加入恶性疟原虫体外培养, 可对恶性疟原虫的生长有 34—42.1% 的抑制(表 5, 图 2)。上述结果说明 M26-32 对两种不同的疟原虫, 体内及体外都有一定程度的抑制。即不同种的疟原虫所具有的共同抗原也可能是保护性的, 不一定只有株特异性抗原才有保护性。这就为制备广泛应用的疟疾疫苗提供了可能性。Fandeur 等^[14] 认为免疫血清对恶性疟的抑制作用, 体内法与体外法不完全一致。因此, M26-32 McAb 所提取的抗原是否就是保护性抗原, 尚有待动物(鼠猴或松鼠猴)实验证明。

参 考 文 献

- [1] 李文禄等: 寄生虫学与寄生虫病杂志, 2(2):83, 1984.
- [2] Perrin, L.H. et al.: *Nature*, 289:301—303, 1981.
- [3] Taylor, D.W. et al.: *Inf. Immunity*, 32(2):563, 1981.
- [4] Perrin, L.H. et al.: *Immunol. Rev.*, 61:245, 1982.
- [5] McBride, J.S. et al.: *Science*, 217:254, 1982.
- [6] Tait, A., *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2:205, 1981.
- [7] Mackey, L.J. et al.: *Bull WHO*, 60:69, 1982.
- [8] Avraham, H. et al.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32:11, 1983.
- [9] Jiang, JB (江静波) et al.: *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 76:845, 1982.
- [10] 王恒礼等: 寄生虫学与寄生虫病杂志, 1(4):2, 1983.
- [11] Dubois, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:229, 1984.
- [12] Perrin, L.H. et al.: *Clin. Exp. Immunol.*, 56:67, 1984.
- [13] 李文禄等: 中国医学科学院学报, 6(3):197, 1984.
- [14] Fandeur, T. et al.: *J. Immunol.*, 132(1):432, 1984.

CHARACTERIZATION OF 3 McAbs AGAINST *PLASMODIUM FALCIPARUM* (M26-32, F5-3F9 AND F5-4E9)

Liu Erxiang Li Wenlu Liu Baofeng Fan Rugong Mao Yinghong

(Department of Parasitology, Institute of Basic Medical Sciences, WHO Collaborating Center for Research and Training in Immunology, Beijing)

11 McAbs against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* were obtained from hybridoma cell lines and were characterized with indirect immunofluorescence assay (IFA) to detect the cross reactions between different *Plasmodium* spp.. Results showed that 3 McAbs (M26-32, F5-3F9 and F5-4E9) cross react with human (*P. f.*, *P. vivax* and *P. ovale*), simian (*P. knowlesi* and *P. cynomolgi*) and rodent (*P. yoelii*) malaria parasites. One of them, M26-32, reacts not only with 2 isolates of *P. f.* from China but also with 6 falciparum isolates from South-East Asia, Africa and Latin America as well as ring forms of *P. f.* in the peripheral blood smear of a patient from Rwanda. When the 3 McAbs were used to screen blood smears of *P. vivax* collected from different regions in China, the IFA results varied significantly, indicating that antigen diversity between *P. v.* strains may be present. When *Trypanosoma equiperdum* or *Toxoplasma* smears were used as target cells, no immunofluorescence was observed. Owing to the wide range cross reactivity among *Plasmodium* spp. and no cross reaction with other blood Protozoa, it is suggested that these McAbs may be a potential tool in malaria antigen diagnosis. They may be also useful in identifying strains of *P. vivax* according to their different immunological reactions to different strains.

McAb M26-32, added into *P. f.* culture in vitro, can inhibit the growth of the parasites, and hence the incorporation of ^3H -leusine into *P. f.* decreased. So this McAb may play a role in protective immunity.

Key words

Malaria parasites; monoclonal antibody; common antigen of malaria parasites