

刚地弓形虫基因工程疫苗

徐安健 谷俊朝*

(首都医科大学附属北京友谊医院 北京热带医学研究所 北京 100050)

摘要 弓形虫疫苗是预防弓形虫感染的最有效手段之一。随着生物学研究技术的不断进步,弓形虫疫苗的研究也不断深入完善。介绍了近些年发展起来的基因工程疫苗的最新研究进展,以期在对现有研究成果总结的基础上,为今后的科研提供新的视角和方向。

关键词 弓形虫 基因工程疫苗

中图分类号 Q789

刚地弓形虫是一种呈全球分布的专性细胞内寄生的机会致病性原虫。免疫能力低下的人群在感染后可引起广泛的临床症状,严重者甚至会导致死亡。但由于弓形虫的生活史和致病机理比较复杂,到目前为止,尚未找到治疗弓形虫病的理想药物^[1],因此,使用安全有效的疫苗是预防弓形虫病的最佳策略^[2]。随着分子生物学技术的发展和基因工程技术的广泛应用,从分子和基因水平来认识弓形虫,深入了解弓形虫的保护性抗原以及宿主抗弓形虫感染的免疫机制,极大的推动了弓形虫疫苗的开发和研制。

1 弓形虫疫苗的发展

从20世纪60年代开始,弓形虫疫苗的研制经历了全虫死疫苗、减毒活疫苗、虫体特异组分疫苗、基因工程疫苗和核酸疫苗等发展阶段。全虫死疫苗虽然比较安全,但由于其抗感染能力弱,实用性较差;而减毒活疫苗虽有一定的使用价值,但存在恢复毒力和临床感染的风险;虫体特异组分疫苗由于其抗原为虫体裂解或排泄物和分泌抗原,到目前为止还没有得到免疫效果较好的免疫原^[3]。基因工程疫苗和核酸疫苗是近年来发展起来的弓形虫疫苗研制的新方向,它们与传统疫苗相比,在许多方面都有着极大的优势,如①用作疫苗表达的抗原接近天然构象,抗原性较强;②容易诱导机体产生针对抗原的较强的细胞和体液免疫;③易于其他疫苗联合使用,以增强免疫效果;④免疫力持久,免疫次数可适当减少;⑤制备较简单,成本较低,易于

大规模生产。因此,基因工程疫苗具有良好的开发和应用价值。本文将对近年来就弓形虫基因工程疫苗的研究现状及进展作一综述。

2 基因工程疫苗的研制和发展

基因工程疫苗是指用DNA重组技术将编码病原体的主要保护性抗原基因导入原核和真核细胞,使其在受体细胞中进行大量表达,经纯化表达产物后并辅以佐剂制成的疫苗。主要包括亚单位疫苗、复合多价疫苗和混合多价疫苗。

2.1 亚单位疫苗

亚单位疫苗是由从病原中分离的一个或几个具有免疫原性的抗原决定簇表位制成的蛋白质疫苗。弓形虫亚单位疫苗的候选抗原主要有速殖子膜表面抗原、致密颗粒抗原、棒状体蛋白和微线粒体蛋白等。

与其它原虫一样,弓形虫的表膜具有十分重要的作用,宿主免疫系统对弓形虫的识别主要在表膜蛋白。目前人们对弓形虫表膜蛋白研究较多的是P30、P22、P35及P23抗原。其中P30蛋白抗原又称主要表面抗原1(SAG1),是近年来研究较多,最有发展前景的候选疫苗之一。它只定位于弓形虫速殖子的表面,缓殖子和包囊表面则没有。研究发现,SAG1约占虫体总蛋白的3%~5%,但可抑制病人血清中抗体活性的50%以上,说明它具有高度的免疫原性,是诱导宿主免疫应答的主要靶抗原^[4,5]。随着基因工程技术的发展,研究者们纷纷寄希望与在体外表达SAG1,从而为疫苗制备提供原料。如司进等^[6]将体外扩增的SAG1全长基因克隆到原核表达载体中,并诱导表达,发现经亲和纯化的

rSAG1 具有较强的免疫反应性。Kim 等^[7]将 SAG1 基因在中国仓鼠卵细胞中进行表达,也获得了大量的 P30 蛋白。Liu 等^[8]运用重组的狂犬病病毒表达的 TgSAG1 蛋白制成的疫苗免疫 BALB/c 小鼠,发现小鼠对弓形虫 RH 株和狂犬病病毒都产生了较好的免疫性。其它几种膜表面抗原蛋白,如致密颗粒抗原、棒状体蛋白,虽然具有较强的免疫原性和免疫反应性,在弓形虫病诊断及免疫预防中也备受关注,但是由它们制成的单价疫苗还不能诱导机体产生足够的抗弓形虫保护性免疫^[9-11]。因此,对它们的生物学功能、免疫保护性及其作为疫苗候选因子的可能性还有待进一步的探索。

虽然在弓形虫基因工程疫苗的研究中,对单价分子疫苗的研究比较透彻。但是由于弓形虫生活史较复杂,抗原成分多,单一抗原成分构成的亚单位疫苗往往因为其含有的淋巴细胞结合位点少,受体 MHC 限制性比较大,难以刺激机体产生强而有效的免疫反应,很多的动物和人体实验也发现,单价亚单位疫苗的免疫效果并不太理想。因此,发展多种抗原结合、针对不同生活史发育阶段的多价疫苗是弓形虫疫苗研究的趋势和共识,这将有助于克服单一抗原成分作为候选疫苗的不足。

2.2 复合多价疫苗

复合多价疫苗是将不同抗原分子设计成联合抗原或将编码不同抗原分子的功能性表位氨基酸的基因片段连接起来,通过原核或真核表达系统表达出联合表位肽段制成的疫苗。这种人工改造的抗原制成的疫苗在接种后能刺激机体产生针对不同种株或(和)不同生活史时期的弓形虫均起作用的特异性免疫反应,使疫苗具有多用性和可靠的保护性^[12]。

杨婷婷等^[13]通过小鼠实验来比较 P30 单价抗原和 P30-ROP2 复合多价抗原疫苗在诱导小鼠抗体水平的差异显示,来自弓形虫不同生活阶段的符合抗原免疫效果要优于单价抗原。国外的 Igarashi M 等^[14]将 rROP2、rGRA5 和 rGRA7 蛋白制成复合多价重组疫苗,发现能较好的保护 BALB/c 小鼠脑中弓形虫包囊的形成。国内的张佃波等^[15]用 ROP2-P30 复合重组蛋白疫苗免疫的 BALB/c 小鼠,能诱导机体产生大量的 IgM、IgG 抗体和 IFN- γ 、IL-2 及 IL-4 细胞因子,从而发生高水平的体液和细胞免疫应答。

由于复合多价疫苗需要制备两种或两种以上的抗原,再联合进行免疫,因此操作相对繁琐,而且较难得到纯度高的融合蛋白,目前对复合多价疫苗的研究还

较薄弱。

2.3 混合多价疫苗

为了增强疫苗的免疫效果,将弓形虫表面抗原与细胞因子或佐剂联合制成的混合多价疫苗,是在复合多价疫苗的基础上发展起来的一个重要的研究方向。佐剂可以非特异性的增强抗原的免疫原性,但是具体选择何种佐剂还需仔细斟酌。1996 年,Debard 等^[16]以 SAG1 为抗原、霍乱毒素为佐剂经鼻内免疫 CBA/J 小鼠,结果产生了高水平的 IgG 抗体及特异的细胞免疫反应,而且这种获得性保护力至少可维持 5 个月。Martinez-Gomez 等^[17]用弓形虫骨架蛋白加干酪乳杆菌为佐剂制成的弓形虫疫苗能减少弓形虫感染小鼠脑中的卵囊数,使小鼠对弓形虫感染的免疫力提高。Hedhli 等^[18]用艾美球虫属的 Profilin 样蛋白为佐剂和弓形虫抗原组分联合免疫小鼠,也使小鼠的抗弓形虫免疫能力大为提高。有的混合多价疫苗虽有较好的免疫效果,但制作过程步骤较多,大量提取及纯化过程较复杂,且作用机制不甚明确,许多研究还只是停留在实验研究阶段。

3 弓形虫基因工程疫苗研制所面临的困难和挑战

如上所述,通过 DNA 重组技术在细胞中完成基因的克隆和表达,已成功获取和制备了大量疫苗所需抗原。但由于对弓形虫引起宿主免疫应答机制的研究相对匮乏,以及现阶段生物学技术的局限,使得弓形虫疫苗的研制还困难重重。目前,弓形虫疫苗的研制主要存在以下几个方面的困难:①对弓形虫入侵宿主和引起免疫应答机制的了解相对缺乏。现阶段虽然已经发现许多与弓形虫入侵宿主相关的蛋白和分子,也发现了许多与宿主抗弓形虫免疫的细胞因子,但是由于弓形虫的抗原特异性存在高度变异性,而且存在严重的株间变异等问题,对弓形虫引起的免疫应答以及其特有的入侵机制还需要更深入的研究。②目前大多数实验均采用鼠作为弓形虫模型来研究抗弓形虫免疫应答的机制,由此得出的机制与人体免疫的机制并非完全一致。③缺乏免疫保护性强的候选抗原,虽然到目前为止已经发现了许多与弓形虫致病相关的保护性抗原,但能产生强而持久保护性免疫力和足够高水平抗体的抗原仍十分有限。④原核细胞不能修饰蛋白质(如磷酸化、糖基化),常常导致表达产物免疫原性较低,而通过真核细胞表达的蛋白产量又较低。因此,对

抗原表达和纯化的技术还需要进一步的优化和提高。

4 展 望

对弓形虫疫苗的研究从全虫疫苗到基因工程疫苗和核酸疫苗,取得了令人鼓舞的成就,但是离实际应用于人类还有一段距离。目前所研制的弓形虫疫苗多是单价亚单位疫苗,其免疫效果并不理想,而后发展的复合多价疫苗和混合多价疫苗,虽克服了单个抗原分子诱导的免疫保护水平偏低的问题,但同时也存在生产过程复杂,技术难度大及成本高等缺点;近年来发展起来的核酸疫苗虽然也有其独特的优点,但是由于其免疫原性较低,在人体中诱导特异性免疫应答的水平不高等缺点,也极大的制约了弓形虫疫苗的研制和发展。今后在弓形虫基因工程疫苗的研究工作中,对弓形虫保护性抗原的研究将是重点中的重点。目前国内外就积极把近年来发展起来的新技术、新方法应用到弓形虫保护性抗原的研究中去,如双向电泳、质谱、蛋白芯片等,并取得了可喜的成果,发现了一批新的、免疫原性较高的抗原分子^[19],这对以后进一步的研究开辟了新的道路。因此,寻找更有效的保护性抗原,采取复合多价或混合多价疫苗的手段,选择有效的免疫途径和方法,建立合理的评估体系等,将是今后基因工程疫苗发展的潮流和趋势。相信随着生物信息学、分子生物学以及基因工程技术的日趋发展、成熟和完善,在不久的将来,弓形虫疫苗的研制必将取得突破性的成果。

参考文献

- [1] MH el Kouni. Adenosine metabolism in *Toxoplasma gondii*: potential targets for chemotherapy. *Curr Pharm Des*, 2007, 13 (6): 581 ~ 597
- [2] Jongert E, Roberts C W, Gargano N, et al. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009, 104(2): 252 ~ 266
- [3] Bout D T, Mevelec M N, Velge-Roussel F, et al. Prospects for a human *Toxoplasma* vaccine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2002, 2(3): 227 ~ 234
- [4] Kasper L H, Bradley M S, Pfefferkorn E R, et al. Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. *J Immunol*, 1984, 132: 443 ~ 449
- [5] Partanen J, Braekeleer D, Diet R, et al. Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. *J Clin Microbiol*, 1984, 20(1): 133 ~ 135
- [6] 司进, 汤俊明, 赵松, 等. 刚地弓形虫 RH 株主要表面抗原 1 的原核表达和纯化及免疫反应性检测. *中华检测医学杂志*, 2004, 27(2): 107 ~ 109
- Si J, Tang J M, Zhao S, et al. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2004, 27(2): 107 ~ 109
- [7] Kim K, Bulow R, Kampmeier J, et al. Conformationally appropriate expression of the *Toxoplasma gondii* SAG1 (P30) in CHO cells. *Infect Immun*, 1994, 62: 203 ~ 209
- [8] Liu Q, Gao S, Jiang L, Shang L, et al. A recombinant pseudorabies virus expressing TgSAG1 protects against challenge with the virulent *Toxoplasma gondii* RH strain and pseudorabies in BALB/c mice. *Microbes Infect*, 2008, 10(12,13): 1355 ~ 1362
- [9] Aline F, Bout D, Amigorena S, et al. *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. *Infect Immun*, 2004, 72(7): 4127 ~ 4137
- [10] Garcia J L, Navarro I T, Biazzone L, et al. Protective activity against oocyst shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by the intranasal route. *Vet Parasitol*, 2007, 145(3,4): 197 ~ 206
- [11] Leyva R, Herion P, Saacedra R. Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*, 2001, 87(1): 70 ~ 79
- [12] Tait E D, Hunter C A. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009, 104(2): 201 ~ 210
- [13] 杨婷婷, 何深一, 蒋华, 等. 弓形虫主要表面抗原 P30 单价及复合基因疫苗的构建. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2005, 23(1): 14 ~ 17
- Yang T T, He S Y, Jiang H, et al. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2005, 23(1): 14 ~ 17
- [14] Igarashi M, Kano F, Tamekuni K, et al. *Toxoplasma gondii*: evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cyst formation in BALB/c mice. *Exp Parasitol*, 2008, 118(3): 386 ~ 392
- [15] 张佃波, 周林涛, 王海防, 等. 刚地弓形虫 ROP-P30 复合重组蛋白疫苗对 BLAB/c 小鼠免疫保护性的研究. *中国病原生物学杂志*, 2008, 3(10): 763 ~ 767
- Zhang X B, Zhou L T, Wang H F, et al. *Journal of Parasitic Biology*, 2008, 3(10): 763 ~ 767
- [16] Debard N, Buzoni-Gatel D, Bout D. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. *Infect Immun*, 1996, 64(6): 2158 ~ 2166
- [17] Martinez-Gomez F, Garcia-Gonzalez L F, Mondragon-Flores R, et al. Protection against *Toxoplasma gondii* brain cyst formation in

mice immunized with *Toxoplasma gondii* cytoskeleton proteins and *Lactobacillus casei* as adjuvant. *Vet Parasitol*, 2009, 160 (3,4): 311 ~315

[18] Hedhli D, Dimier-Poisson I, Judge J W, et al. Protective immunity against *Toxoplasma* challenge in mice by coadministration of *T. gondii* antigens and *Eimeria* profilin-like protein as an adjuvant. *Vaccine*, 2009, 27(16): 2274 ~2281

[19] Morales-Sainz L, Escobar-Ramirez A, Cruz-Torres V, et al. The polypeptides COX2A and COX2B are essential components of the mitochondrial cytochrome oxidase of *Toxoplasma gondii*. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1777(2): 202 ~210

Genetic Engineering Vaccine of *Toxoplasma Gondii*

XU An-jian GU Jun-chao

(Beijing Tropical Disease Institute, Beijing Friendship Hospital, Beijing 100050, China)

Abstract The *Toxoplasma gondii* vaccine is the best way to prevent *Toxoplasma gondii* infection. The improvement of the biological techology promotes the study of *Toxoplasma gondii* vaccine. The newest study progresses of *Toxoplasma gondii* genetic engineering vaccine, which is summarized on the basis of the current study results, is respected to provide new aspects of the *Toxoplasma gondii* vaccine study for the researches.

Key words *Toxoplasma gondii* Genetic engineering vaccine

梅特勒-托利多基础型便携式溶氧仪全新上市

梅特勒 – 托利多 FiveGo™ 系列基础型便携式仪表系列新品 – 便携式溶解氧测定仪 FG4, 于 2009 年 10 月正式上市。全新便携式溶氧仪 FG4 秉承了梅特勒 – 托利多品牌仪表优雅的外观和便捷的操作设计, 不仅扩展了梅特勒 – 托利多 FiveGo™ 基础型便携式仪表产品系列, 而且引入了原电池法溶解氧测量技术, 原电池型溶解氧电极无需极化, 也无需添加电解液或更换电极膜等维护工作, 使测量更快速便捷, 可广泛应用于食品饮料、水产养殖、污水处理、环境监测等各行各业。

FiveGo™ 溶氧仪具有许多有用的特性, 确保做到精确和方便地测量:

- 易用-FiveGo™ 溶氧仪的操作直观: 读数 键为开始测量、校准键启动校准, 而设置 键可修改测量设置。您可以直接开始测量而不必研究操作说明书, 因此节省了时间。
- 低维护性 – 新的 LE611 和 LE612 溶氧电极测定溶解氧浓度时采用原电池方式取代了极谱法。这些电极不需要任何维护, 因此省去了补加电解液或更换膜等麻烦。
- 随时可用 – 原电池型溶氧电极无需极化时间。这意味着您不需要等待电极极化, 而是在您想要测量时即可立即开始测量。
- 精确测量 – 溶氧仪有许多有用的特性(比如大气压和盐度补偿), 确保了测量的精确性。此外, 该仪表拥有电极状态显示功能, 当电极性能变差时相应的图标即可显示。
- 立即开始 – 我们的仪表套装具有立即开始所必需的所有配件, 从而帮您节省时间。套装中附带有高性能的原电池型溶氧电极、温度探头以及电池, 可以让您立即开始测量样品。

如需了解更多有关便携式溶氧仪 FG4 的信息, 请登陆 <http://www.mt.com>