

疟疾疫苗研究的现状和展望

潘卫庆 (第二军医大学基础医学部病原生物学教研室)

[摘要] 疟原虫抗药性及疟蚊对杀虫剂抗性的产生和迅速扩散迫切需要研究新的疟疾防治方法,以控制该传染病的流行。根据自愿者试验、动物模型及现场研究结果,研制疫苗预防疟疾是可行的。当前,全球科学家正在研制3种类型的疟疾疫苗——抗红内期原虫疫苗、抗红前期原虫疫苗和传播阻断疫苗,其中一些候选疫苗已进入临床试验,并产生有意义的结果。由于疟原虫具有复杂的生活史、抗原变异和多种入侵途径,有效疫苗的研制将面临极大的困难,但是这种疫苗终究能够研制成功。

[关键词] 疟疾;疫苗;红内期;红前期;传播阻断

[中图分类号] R 392-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0001-04

Malaria vaccine: current status and perspective

PAN Wei-Qing (Department of Etiological Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] The emergency and rapid spread of drug resistant parasites and mosquitoes resistant to insecticides urgently demand new tools to control the disease. It is feasible to develop malaria vaccine based on animal and volunteers test. Scientists around the world are working on 3 types of malaria vaccine——pre-erythrocytic, blood-stage and transmission blocking. Some of the vaccine candidates are being tested in clinical trials and have been shown to be promising. It is very difficult to find a successful malaria vaccine due to its complex life cycle, antigen variations and multiple invasion pathways, but the vaccine will finally be developed.

[KEY WORDS] malaria; vaccine; pre-erythrocytic; blood-stage; transmission blocking

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 1-4]

疟疾是人类最古老的传染病之一。自 Laveran A 发现疟疾的病原体和 Ross R 发现疟疾的传播媒介以来,人们与这种疾病的斗争已进行了 1 个多世纪,但至今疟疾仍在全球肆虐。目前世界人口的约 40% 仍处在疟疾威胁之中,分布于 100 多个国家,每年有 3~5 亿人感染疟疾,其中约 270 万人死亡,大多为儿童和孕妇。特别难以使人理解的是,一百多年来全球防疟的努力不仅没有有效地控制这种传染病,反而有卷土重来之势。自 20 世纪 70 年代始,全球疟疾年死亡人数呈直线上升趋势。

疟疾是通过按蚊叮咬传播的寄生虫病,其病原体为疟原虫。疟原虫子孢子通过按蚊叮咬进入人体,经在肝脏发育繁殖,产生大量裂殖子释放入血,并侵入红细胞进行裂体增殖。疟原虫致病主要是由红内期原虫裂体增殖引起肝、脾、脑及肾脏等器官的损害。特别是对无疟疾免疫力的人群,感染疟疾后可因并发脑型疟疾而在几小时内发生死亡,也可因并发严重贫血或肾衰而死亡。若不及时治疗,20% 恶性疟疾患者会死亡。

在过去 1 个多世纪中,疟疾防治的常用方法包括清除蚊虫孳生地、用杀虫剂(如 DDT)灭蚊、防蚊叮咬(如使用药蚊帐)、药物预防和治疗。然而,由于

疟蚊对杀虫剂产生抗性及疟原虫对氯喹等抗疟药产生抗药性,这些疟防措施已面临着严重的挑战。全球疟疾形势的严重恶化,迫切需要采用高新技术研制新的疟疾防治方法以控制这种传染病的流行。目前在研的方法包括研制不同作用机制的新型抗疟药、研制定能抵抗疟原虫感染的转基因蚊虫以及疟疾疫苗等。研究者普遍认为,研制安全、价廉和有效的疟疾疫苗是人类控制乃至根除疟疾的重要途径。因此,世界各国对疟疾疫苗研究给予了前所未有的关注和支持:疟疾、爱滋病和结核疫苗已成为全球优先发展的三大疫苗;世界卫生组织、联合国计划开发署、世界银行及许多国家已将该三大疫苗研究作为今后一个阶段重点资助和优先发展的领域;欧盟、比尔·盖茨基金会等均设置了“疟疾疫苗专题”,并投入巨资用于发展三大疫苗。

1 疟疾疫苗的可行性

疟原虫与细菌不同,是一种生活史复杂的真核

[基金项目] 世界卫生组织专项基金(IDA 20198);国家杰出青年科学基金(30225041)。

[作者简介] 潘卫庆(1957-),男(汉族),博士,教授,博士生导师。
E-mail: malaria@guomai. sh. cn

生物。现已知道疟原虫有约 6 000 种蛋白质,且许多重要蛋白表达是期特异的。此外,疟原虫存在多种机制逃避宿主的免疫反应。对于这类病原体引起的疾病是否可以通过研制疫苗加以预防,一直是人们关注并有争议的问题。

研究者长期研究和实践获得了以下 3 方面的实验证据,表明研制疟疾疫苗是可行的:(1)自愿者经射线灭活的子孢子反复接种可获得完全保护性免疫,即用灭活子孢子免疫的个体能完全抵抗后来活子孢子的攻击感染,并且这种免疫力能持续相当长的时间^[1];(2)长期生活在疟疾流行区的人群能产生抵抗疟疾感染的免疫力。在高疟区,10 岁以上的人群很少发生重症疟疾,而因疟疾死亡的主要是 5 岁以下儿童。这表明反复感染疟原虫可诱导一定的疟疾免疫力,这种免疫力可减少疟疾的发病率和病死率;(3)用疟区成人的免疫球蛋白(IgG)进行被动免疫能有效治疗重症疟疾。从长期生活在西非的成年人体内提取 IgG 被动接种给感染恶性疟疾的泰国儿童,后者周围血中的原虫密度可降低 99%,这表明自然获得的疟疾抗体能对疟原虫产生有效的杀灭作用。

2 疟疾保护性免疫

由上述所知,人体经反复感染疟原虫后能产生一定水平的疟疾保护性免疫力。这种免疫力能将原虫密度控制在一个较低水平,并能阻止重症疟疾乃至疟疾死亡的发生。但这种免疫力维持时间较短,在离开疟区不到 1 年时间里免疫力开始下降。

疟原虫在人体内经历了多个生长期的繁殖。疟疾免疫的一个重要特点是期特异性,即各期原虫产生的免疫只对同期原虫有效,而对其他期原虫几乎无效。此外,由于各期原虫生长发育的环境与规律不同,其保护性免疫也存在差异。

2.1 针对红内期原虫的保护性免疫 特异性抗体对该期原虫发挥主要作用,其理由:(1)是由于红细胞表面缺乏组织相容性抗原复合物(MHC)分子,因此细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)对此期原虫无法发挥作用;(2)是尽管此期原虫大部分时间是寄生在红细胞内,但释放的裂殖子存在于血液中,能受到特异性抗体的作用。抗体对该期原虫的作用主要包括以下几方面:①阻断裂殖子与宿主细胞的结合;②阻断裂殖子的入侵过程;③使疟原虫形成串珠状聚合物,这些产物能被网状内皮系统清除;④介导抗体依赖的吞噬作用和抗体依赖的细胞介导的细胞毒(AD-CC)作用。此外保护性抗体还可能通过与巨噬细胞

结合,激活并释放细胞因子(如 TNF- α)和其他有害的物质(如一氧化氮等)杀灭胞内原虫。

2.2 针对红前期原虫的保护性免疫 尽管孢子子在血流中停留时间很短,但仍能诱导机体产生大量抗体。这种抗体能有效地抑制孢子子的入侵,从而实现预防疟疾的感染。当孢子子侵入肝细胞并在其内生长繁殖时,这种感染的肝细胞已成为疟疾保护性免疫力的靶点。由于肝细胞具有 MHC 分子,因此感染的肝细胞有可能诱导机体产生细胞免疫,并能受到 CTL 的攻击。针对感染肝细胞的免疫力包括:(1)CD8⁺ CTL:机体产生的特异性 CTL 能识别感染肝细胞表面的相应抗原 MHC I,并能杀灭感染的肝细胞;(2)CD4⁺ T 细胞:这种 T 细胞能释放 IFN γ 等细胞因子,这些细胞因子能作用肝细胞产生一氧化氮,后者能直接杀灭肝细胞内的原虫。

3 疟疾疫苗的分类及其研究进展

根据疟原虫在人体的生活史,疟疾疫苗可分为 3 种,即抗红前期原虫疫苗、抗红内期原虫疫苗和传播阻断疫苗。此外,根据疫苗的功能还可将疟疾疫苗分为杀虫疫苗和抗病疫苗。

3.1 抗红前期原虫疫苗 该期疫苗的靶点包括孢子子和感染的肝细胞。针对孢子子的疫苗,需要达到 100% 的保护效力,否则难以预防感染。这是因为疟原虫抗原有期特异性,孢子子疫苗只对孢子子有保护作用,而对其他各期原虫均无效。这样,只要有少数孢子子逃避疫苗的作用,它们即可通过肝内及红细胞内繁殖产生大量原虫,造成感染并使机体致病。

位于孢子子表面的环孢子蛋白(CSP)和血凝素相关匿名蛋白(TRAP)是针对该期原虫的 2 个重要的疫苗候选抗原。针对这 2 个抗原的抗体能抑制孢子子入侵。CSP 分子中央区域存在重复区,两侧区域称为区域 I 和区域 II,含有与肝细胞结合的功能域。大量针对 CSP 研究显示:重复区和 C 末端区域是该蛋白的保护性免疫功能域^[2~4]。但是,如何使机体产生针对这 2 个区域的免疫反应显得十分重要。以 CSP 为基础的 RTS.S 候选疫苗已取得了初步成功。RTS.S 是由 2 个成分组成,即 CSP 的 19 个 NANP 重复序列及其 C 末端序列与乙肝表面抗原(226 个氨基酸)融合而成。美国 GSK 生物公司(GSKBio)和美国陆军医学研究院(WRAIR)合作开展了该疫苗的临床前和临床试验。I / II 期临床试验结果显示该疫苗在人体中是安全的,并能产生强免疫反应。人工攻击感染结果显示该疫苗的保护效力达 50%。然而,这种保护性免疫持续时间很短,当 6

个月后再攻击感染时,绝大多数自愿者已失去原有的保护力。在此后开展的Ⅱ期临床试验自然感染保护效力测试中,总效力为34%,但前9周效力为71%,而后6周降为0^[5,6]。最近,GSKBio与比尔·盖茨-疟疾疫苗倡议会(MVI)合作在冈比亚进行6~11岁和1~5岁两个年龄组的临床试验。

瑞士洛桑大学科研人员采用人工合成长肽方法产生了102个CSP C末端的合成肽,经与铝佐剂和ISA720佐剂乳化后进行Ⅰ期临床试验。结果显示,该疫苗具有高免疫原性,产生了识别孢子的抗体和细胞免疫反应^[7]。

除CSP外,牛津大学科研人员构建了ME-TRAP候选疫苗。该抗原由一个多表位片段(ME)和TRAP融合而成。ME含有2个B细胞表位和14个来自6个红前期抗原的T细胞表位。该疫苗先用DNA质粒进行初次免疫,然后用病毒载体构建的抗原进行加强免疫,并开展了Ⅰ和Ⅱa期临床试验。结果显示:部分自愿者延迟出现原虫血症,并有部分自愿者获得保护^[8]。

美国海军医学研究中心等单位共同建立了DNA疫苗的技术平台,用单个或多个疟原虫红前期抗原基因进行人体自愿者免疫。结果显示:疫苗无安全性问题,尽管能产生一定水平的细胞免疫,但抗体水平极低。人工攻击试验显示无任何保护或延迟出现原虫血症的作用。

3.2 抗红内期原虫疫苗 在疟原虫生活史中,唯有红内期原虫能使人体致病乃至死亡。人们期望的红内期疫苗有2种:一种是完全有效的疫苗,这种疫苗能产生比天然感染更强的免疫保护力;另一种是有一定程度免疫保护力的疫苗,能使原虫血症控制在很低的水平,从而使免疫个体不至于发生重症疟疾,并使无免疫力的个体(如疟区儿童和非疟区人群)产生具有疟区成人的疟疾免疫力。

在红内期疟原虫中,由于裂殖子存在于细胞外,与宿主免疫系统直接接触,因此这一时期原虫已成为红内期疫苗的主要靶点。裂殖子入侵宿主细胞是个相当复杂的过程,并由受体和配体介导。推测有多个疟原虫蛋白质参与该入侵过程,这些蛋白包括位于裂殖子表面的蛋白质、培养上清中可溶性蛋白质以及位于棒状体或微线体中的蛋白质,其中研究较多的是裂殖子表面蛋白1(MSP1)和顶端膜抗原1(AMA-1)等。

美国WRAIR、MVI和GSKBio等机构联合研制了以MSP1 42 000 C末端片段(MSP1-42)为抗原的红内期疫苗。该抗原已在大肠杆菌中表达制备,经

与AS02A佐剂乳化后进行Ⅰ期安全性和免疫原性的临床试验。该疫苗显示无安全性问题,并产生强免疫反应。但在Ⅱ期攻击试验中无任何保护作用,并在与RTS.S联合免疫中也显示无任何保护效果^[9]。

WRAIR与GSKBio等机构合作在大肠杆菌系统中制备了AMA-1重组蛋白。该蛋白经与AS02A佐剂乳化后进行动物免疫实验。AMA-1免疫血清均能有效地抑制疟原虫体外生长,抑制作用依赖于AMA-1二硫键构象的形成。用夏氏疟原虫AMA-1免疫小鼠能对后来同种疟原虫的攻击感染提供部分甚至完全的免疫保护^[10]。用夏氏疟原虫AMA-1的抗体被动免疫小鼠也能抵抗同种原虫的攻击感染^[11]。此外在猴疟模型中也证实了AMA-1的保护作用^[12]。

本教研室与上海万兴生物制药公司及世界卫生组织合作研制了PfCP-2.9疫苗,它由AMA-1和MSP1-1抗原的功能域融合而成。该抗原在毕氏酵母中高水平表达,并在小鼠、家兔及恒河猴中显示出强免疫原性,更为重要的是免疫血清在15%浓度时能完全抑制疟原虫体外生长。目前,该疫苗正在进行安全性和免疫原性的临床试验。

3.3 传播阻断疫苗 这种疫苗通过阻断疟原虫在蚊体内的有性生殖及孢子增殖达到阻断疟疾传播的目的。显然阻断传播不能预防免疫个体感染疟疾,亦不能减轻疟疾症状,但能阻断按蚊将疟原虫从一个宿主传播至另一个宿主。当这种疫苗与疟疾保护性疫苗或抗疟药联合应用时,传播阻断疫苗可阻断那些逃避疫苗保护或对药物产生抗性而幸存下来原虫的传播。传播阻断疫苗的另一个用途是对旅游者进行免疫,以防止他们将疟原虫带回原地,造成疟疾在本地区的流行。

4 疟疾疫苗研制所面临的困难和挑战

如上所述,疟原虫生活史复杂、抗原具有期特异性并存在高度变异、疟原虫具有多种入侵途径和逃避宿主免疫攻击的机制,这使疟疾疫苗研制比一般细菌和病毒性传染病疫苗研制更为困难。

目前,疟疾疫苗研制主要存在以下几方面的困难:(1)缺乏保护作用强的候选抗原。尽管在过去20多年中已鉴定了约40个各期的疫苗候选抗原,但能产生强而持久保护性免疫力的抗原仍十分有限;(2)缺乏对疟疾保护性免疫机制的了解。目前大多数实验均采用鼠疟模型来研究抗疟免疫机制,但由此得出的机制与人体免疫机制并非完全一致,例如用射线灭活的孢子免疫人体产生的保护作用是通过

感染细胞产生一氧化氮杀灭疟原虫,而鼠疟疾模型是通过产生 CD8⁺ CTL 而发挥作用;(3)缺乏有效的动物模型。由于疟原虫抗原序列存在种间差异,因此无法用动物疟原虫模型来评价人体疟疾疫苗;尽管目前有恶性疟疾夜猴模型,但一方面夜猴并非恶性疟原虫的天然宿主,另一方面夜猴的来源非常困难,这使疫苗的体内保护效果评价难以实施;(4)疟原虫抗原变异及多途径入侵机制。疟原虫抗原不仅具有期特异性,而且存在严重的株间变异,这使疟疾疫苗研制显得更为复杂和困难;此外,疟原虫入侵宿主细胞存在替代途径,当疫苗阻断其中一条入侵途径后,部分原虫还可启动或选择另外的途径入侵宿主细胞,产生原虫血症;(5)缺乏持久的免疫力和难以产生足够高水平的抗体。体内外实验结果均显示,产生高水平的抗体滴度对有效抑制疟原虫是必需的,当抗体滴度较低或从最高值开始下降后,免疫血清完全失去抑制作用,这也是疟疾保护性免疫持续时间短的原因所在。

5 展望

疟疾疫苗研究已进行了近 30 年,尽管至今尚无有应用价值的疫苗产生,但研究者正全面展开 3 种疟疾疫苗的研究和开发,其中一些候选疫苗已进入临床试验,并产生了非常有希望的结果。

今后疫苗研制趋势包括以下几个方面:(1)新候选抗原的鉴定:疟原虫基因组计划已提供大约 6 000 个疟原虫蛋白基因的序列,这为鉴定更为有效的疫苗抗原提供了基础;(2)多期多价疫苗:构建由各期抗原组成多期多价疫苗,这种疫苗的优点是部分抗原变异而逃避某个抗原免疫力攻击的原虫将会受到其他抗原免疫力的进一步攻击,这样能有效地克服因抗原变异而出现免疫逃避现象;此外,各期抗原的免疫力可产生协同作用;(3)提高疫苗的免疫原性:疫苗的保护效力需要高水平的抗体滴度,因此如何提高现有抗原的免疫原性是疫苗研究的一个重要内容;提高疫苗的免疫原性应包括研制和使用新的强效佐剂、新的疫苗传递系统、制备融合抗原等。尽管研制安全有效疟疾疫苗尚需时日,但这种疫苗终究能够研制成功。

【参考文献】

[1] Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, et al. Protection of humans a-

gainst malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites [J]. *J Infect Dis*, 2002, 185 (8):1155-1164.

- [2] Wang R, Charoenvit Y, Corradin G, et al. Induction of protective polyclonal antibodies by immunization with a *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein multiple antigen peptide vaccine [J]. *J Immunol*, 1995, 154(6):2784-2793.
- [3] Roggero MA, Meraldi V, Lopez JA, et al. The synthetic, oxidized C-terminal fragment of the *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein elicits a high protective response [J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30(9):2679-2685.
- [4] Tewari R, Spaccapelo R, Bistoni F, et al. Function of region I and I adhesive motifs of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in sporozoite motility and infectivity [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(49):47613-47618.
- [5] Gordon DM, McGovern TW, Krzych U, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B antigen subunit vaccine [J]. *J Infect Dis*, 1995, 171(6):1576-1585.
- [6] Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria [J]. *N Engl J Med*, 1997, 336 (2):86-91.
- [7] Roggero MA, Weilenmann C, Bonelo A, et al. *Plasmodium falciparum* CS C-terminal fragment: preclinical evaluation and phase I clinical studies [J]. *Parassitologia*, 1999, 41 (1-3):421-424.
- [8] Moorthy VS, Pinder M, Reece WH, et al. Safety and immunogenicity of DNA/modified vaccinia virus ankara malaria vaccination in African adults [J]. *J Infect Dis*, 2003, 188(8):1239-1244.
- [9] Angov E, Aufiero BM, Turgeon AM, et al. Development and pre-clinical analysis of a *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1(42) malaria vaccine [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2003, 128(2):195-204.
- [10] Crewther PE, Matthew ML, Flegg RH, et al. Protective immune responses to apical membrane antigen1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes [J]. *Infect Immun*, 1996, 64(8):3310-3317.
- [11] Narum DL, Ogun SA, Thomas AW, et al. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii* YM blood-stage infection [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(5):2899-2906.
- [12] Collins WE, Pye D, Crewther PE, et al. Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile* [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1994, 51(6):711-719.

【收稿日期】 2003-12-10

【修回日期】 2003-12-28

【本文编辑】 尹 茶