

抗杜氏利什曼原虫保护性单克隆抗体研究*

胡孝素 林芳清 王玲 刘佩娜 阙兵 王雅静 王子龙

寄生虫学研究室

作者用³H-胸腺嘧啶核苷掺入法筛选出的 3 株单克隆抗体(McAb)对*L. d.*前鞭毛体具有抑制作用,并以2B12-A8及2H6-E3作用最强,在补体协同作用下,其抑制率稳定在94~99.3%的优异水平。而1B1-C2加补体的抑制率波动于68~95%。用McAb 1B1-C2对*L. d.*同株前鞭毛体分别进行³H-胸腺嘧啶核苷掺入法及巨噬细胞吞噬抑制试验,两法所得抑制率极为相近,分别为68~95%及61~87%。经免疫金技术超微定位证实,抑制作用最强的McAb 2H6-E3识别的抗原较广泛地存在于前鞭毛体膜外沿。此保护性McAb的发现,为黑热病免疫预防的研究提供了重要基础。

关键词 杜氏利什曼原虫 保护性单克隆抗体 ³H-胸腺嘧啶核苷

目前,黑热病的发病率有回升趋势,亟待研究预防该病的新对策。我国陇、蜀的黑热病流行区毗接相邻,其主要传染源均为病犬,犬的感染率高达8.5~25%^[1]。根据杜氏利什曼原虫四川人分离株与犬分离株k-DNA微环碱基序列不完全同源^[2],以及它们蛋白质组分分析中存在的差异(待发表资料),我们采用利什曼原虫犬分离株前鞭毛体制备膜抗原,免疫BALB/c鼠,与SP2/0融合获得杂交瘤株。又通过体外试验筛选,发现单克隆抗体(McAb)2H6-E3、2B12-A8对同种原虫前鞭毛体具有优异的抑制作用。现报道如下。

材料与方 法

一、材料

1. 利什曼原虫种、株 ①杜氏利什曼原虫犬分离株(*Leishmania donovani* canine isolate, 简称*L. d.*犬株)、中国预防医学中心寄生虫病研究所赠送,系自四川、甘肃交界地区病犬分

离获得,NNN培养基传代保种。②杜氏利什曼原虫新疆“812”株(*L. d.* Xinjiang“812”isolate),新疆维吾尔自治区地方病防治研究所赠送。812与801株均自新疆平原地区病人分离获得,金色仓鼠保种。本文中以812株代替801株使用。

2. McAb ①McAb 2H6-E3,抗*L. d.*犬株前鞭毛体膜抗原的McAb,属IgG2b亚类,腹水蛋白含量:纯化前为79.35mg/ml,饱和硫酸铵盐析法提取两次后为5.768mg/ml;②McAb 2B12-A8,抗*L. d.*犬株前鞭毛体膜抗原的McAb,属IgG1亚类,腹水蛋白含量:79.8mg/ml,饱和硫酸铵盐析法提取两次后为3.86mg/ml;③McAb 1B1-C2,抗*L. d.*新疆801株前鞭毛体全虫抗原的McAb,属IgM类,腹水蛋白含量:纯化前为43.4mg/ml,经饱和硫酸铵盐析法提取两次后为3.9mg/ml。

3. 正常豚鼠血清 从正常豚鼠心脏取血,分离血清,作为补体来源,置-70℃保存备用。

4. ³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR) 中国科学院上海原子核研究所提供,比放射性为 3.7×10^7 Bq/ml (1mCi/ml)。

5. 小鼠巨噬细胞 用RPMI 1640注入

* 国家自然科学基金资助项目

BALB/c鼠腹腔，冲洗的细胞悬液经1000r/min离心5分钟，再用同一培养基悬起细胞，滴于清洁盖玻片上，37℃孵育30分钟，洗去非贴壁细胞，即得单层巨噬细胞。

二、方法

1. ³H-TdR掺入试验 将199培养基中处于对数生长繁殖期的L.d.犬分离株前鞭毛体，调至6×10⁶/ml。将前鞭毛体悬液按每份标本1ml移入24孔细胞培养板(Linbro Flow Laboratories)或培养瓶内。实验组加入待试McAb 0.1ml和新鲜豚鼠血清0.01ml；对照组加同量SP2/0骨髓瘤细胞腹水替代McAb。同时另设单加McAb组和单加补体组。各组均一式3孔。全部标本置28℃培养48小时后。每孔加³H-TdR 3.7×10⁴μBq (1μCi)，继续培养16小时。再将各孔内容物分别用Whatman 3号滤纸(2cm直径的圆形纸片)收获，处理后用液体闪烁计数器测定cpm。取各组的3复孔cpm均值，按下式计算前鞭毛体的增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = \frac{\text{对照组cpm} - \text{实验组cpm}}{\text{对照组cpm}} \times 100\%$$

2. 巨噬细胞吞噬抑制试验 将前鞭毛体悬液用199培养基调整至5×10⁶/ml后，实验组在

3ml前鞭毛体悬液内加入McAb1B1-C2粗提腹水1mg/ml及豚鼠血清0.02ml/ml，对照组在同量前鞭毛体悬液内加同量SP2/0腹水替代McAb，室温30分钟。将两组悬液按0.5ml/片，分别滴于6张铺有单层巨噬细胞的盖玻片上，置5%CO₂、37℃孵育48、72小时，而后从中各取3张盖玻片，用199培养基洗去游离的原虫，片干后，瑞氏染色，油镜下观察。每片计数200个巨噬细胞，包括含有原虫的巨噬细胞数及其吞噬原虫的总数。按下式计算巨噬细胞吞噬率及吞噬抑制率。

$$\text{吞噬率}(\%) = \frac{\text{吞噬原虫的细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 100\%$$

$$\text{吞噬抑制率}(\%) = (1 - \frac{\text{实验组吞噬原虫数}}{\text{对照组吞噬原虫数}}) \times 100\%$$

结 果

一、³H-TdR掺入试验

1. 抗L.d.犬分离株McAb 2H6-E3、2B12-A8对同株原虫前鞭毛体的抑制作用 结果见表及图。从表可见，单加McAb组与对照组之间，差异有高度显著性；McAb加补体组与单加McAb组、单加补体组以及对照组之间也有高度显著性差异(P<0.01)，说明McAb

表. ³H-TdR掺入试验结果，示McAb对前鞭毛体的增殖抑制率

Table. The results of inhibiting growth of promastigotes in vitro by incorporation of ³H-TdR test

McAb	No. of experiment	Control group		Experiment groups				
		+SP2/0 0.1ml ⁽¹⁾	+ McAb 0.1ml ⁽²⁾	+ Complement (GPS 0.01ml) ⁽³⁾		+ McAb and complement ⁽⁴⁾ (The same as (2) and (3))		
				cpm average [*]	cpm average IR(%)	cpm average IR(%)	cpm average IR (%)	
2H6-E3	1	36557	20947	43	30958	16	1438	96
	2	18450	11156	40	8898	51	354	98
	3	52102	8112	84	31780	39	2884	94
2B12-A8	4	24043	1720	93	24175	<0	145	99.3
	5	42726	12648	70	44320	<0	476	98.8

* The average of triplicate samples (同批试验一式三份标本的均数，余同) IR = Inhibition rate(%)

GPS = Guinea-pig serum Rank sum test (秩和检验): (4) vs (1), (2), (3), P<0.01,

(2) vs (1), P<0.01

2H6-E3、2B12-A8单独作用于前鞭毛体时,已有明显的抑制作用;在补体的协同作用下,此抑制功能又得到了显著提高。经5批实验结果,McAb加补体的抑制率高达94~99.3%。

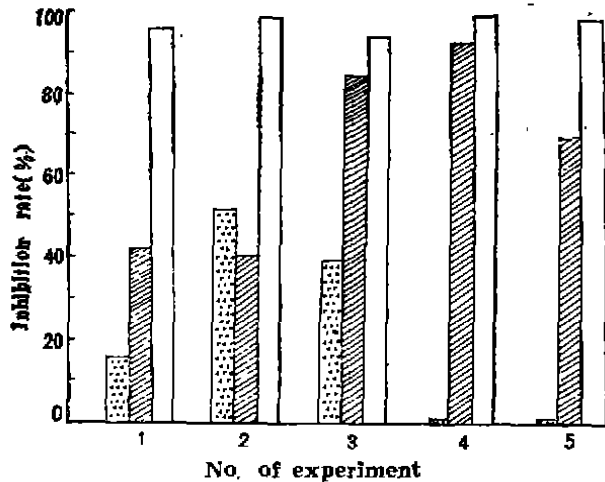


图 + Complement ▨ + McAb □ McAb + Complement

图. McAb对L. d. 犬分离株前鞭毛体的抑制率

Fig. The inhibition rate of McAb against promastigotes of L. d. canine isolate

Experiment 1, 2, 3: McAb 2H6-E3

Experiment 4, 5 McAb 2B12-A8

2. 抗L. d. 新疆801株 (人分离株) McAb 1B1-C2对同株原虫前鞭毛体的抑制作用 本实验用前鞭毛体量为 $7 \times 10^6/ml$, 每份标本量为1 ml, 实验组加入McAb 1mg/ml及新鲜豚鼠血清0.02ml/ml。对照组加入同量SP2/0腹水替代McAb, 两组放射活性cpm的均值经方差分析, 具有高度显著性差异 ($P < 0.01$)。重复5批实验, 抑制率为68~95%, 说明McAb 1B1-C2在补体协同作用下, 对同种抗原具有一定的抑制作用。

二、McAb 对前鞭毛体感染巨噬细胞的抑制试验

作者观察了McAb 1B1-C2对同株利什曼原虫前鞭毛体感染巨噬细胞的抑制作用。4批实验结果显示: McAb加补体组吞噬原虫的巨噬细胞数仅占细胞总数7.8~19% (吞噬率), 抑制率为61~87%, 吞噬原虫指数仅1.1~1.9/

细胞, 而对照组吞噬率为41.1~65.0%, 吞噬原虫指数为3.0~4.1/细胞。两组之间差异有高度显著性 (χ^2 检验, $P < 0.01$)。

讨 论

在筛选保护性McAb的研究中, 进行动物实验需要对该病原体敏感的、较大数量的优质动物供应, 方能得出可靠的实验结果。故学者们多用体外抑制试验作为初筛工具, 再将抑制作用明显者进行动物实验观察。如Dean^[3,4]用 3H -氨基酸掺入法和寄生虫计数法, 评价McAb对疟原虫的抑制效力, 发现用粗提腹水有8株McAb显示不同程度抑制寄生虫生长的作用, 而完全提纯腹水则仅有2株显示抑制作用。Perrin^[5,6]用 3H -次黄嘌呤掺入试验及原虫密度等指标, 筛选出对恶性疟原虫生长具有抑制作用的McAb, 并选择其中有明显抑制作用者, 分离出所识别的特异抗原, 用免疫松鼠猴, 结果显示这些猴在接受攻击感染后原虫率极低, 且80%猴自愈, 说明从体外筛选过渡到动物实验的途径是可取的。刘尔翔等^[7]用 3H -亮氨酸掺入试验表明, McAb M26-32能部分抑制 3H -亮氨酸的掺入, 且能延缓实验动物原虫血症的上升。以上结果提示了体外与体内试验方法结果的一致性。但在抗内脏利什曼原虫McAb研究方面, 尚未见类似报道。我们选用 3H -TdR掺入试验, 并与巨噬细胞吞噬抑制试验进行比较, 两者所得结果极为相近, 如McAb 1B1-C2对同株利什曼原虫前鞭毛体的抑制作用, 前者抑制率为68~95%, 后者为61~87%。两法之中, 我们认为 3H -TdR掺入试验简便易行, 数据可靠, 可少受主观因素的影响, 是值得推荐的体外筛选保护性McAb方法之一。

本研究所试3株McAb对同株原虫前鞭毛体的抑制作用, 以2B12-A8与2H6-E3作用最强, 抑制率稳定在94~99.3%的优异水平, 而

1B1-C2的抑制率则波动于68~95%之间。提示前者可作为优质的保护性McAb。在此基础上,我们借助于免疫金技术,选用McAb 2H6-E3对同一分离株前鞭毛体抗原进行超微定位研究,发现胶体金颗粒成簇地主要分布于虫体膜外沿,证明2H6-E3识别的抗原较广泛地存在于前鞭毛体膜上,这一发现为分离及应用该抗原提供了重要理论依据(待发表资料)。

参 考 文 献

1. 蓝林,等。四川南坪县黑热病流行情况的调查。中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1988, 6(2):150。
2. 吕洪刚,胡孝素。用分子杂交技术分析不同种株利什曼原虫k-DNA同源性。华西医科大学学报 1988, 19(3):217。
3. Deans JA, et al. Rat monoclonal antibodies which inhibit the in vitro multiplication of *P. knowlesi*. Clin Exp Immunol 1982, 49:297.
4. Deans JA, et al. Biosynthesis of a putative protective *P. knowlesi* merozoite antigen. Mol Biochem Parasit 1984, 11:189.
5. Perrin LH, et al. Inhibition of *P. falciparum* growth in human erythrocytes by monoclonal antibodies. Nature 1981, 289:301.
6. Perrin LH, et al. Immunization with a *P. falciparum* merozoite surface antigen induces a partial immunity in monkeys. J Clin Invest 1985, 75:1718.
7. 刘尔翔,等。三株抗恶性疟单克隆抗体(M26-32, F5-3F9, F5-4E9)的鉴定。生物工程学报 1986, 2(1):31。

(1988年10月6日收稿)

STUDIES ON PROTECTIVE MONOCLONAL ANTIBODIES TO LEISHMANIA DONOVANI*

Hu Xiaosu Lin Fangqing Wang Ling Liu Peina
Kan Bing Wang Yajing Wang Zilong
Department and Laboratory of Parasitology

Kala-azar is increasing in incidence in some endemic areas of China, such as provinces of Sichuan and Gansu. Monoclonal antibodies have been shown to interfere with the cutaneous leishmaniasis infection in the experimental animals. We have now raised McAb against membrane antigen of promastigotes of *L. donovani* canine isolate (the pathogen of visceral leishmaniasis). In this paper we report 3 McAb which inhibit the growth of promastigotes in vitro culture by incorporation of ³H-thymine deoxyriboside, such as McAb 2B12-A8, 2H6-E3, in the presence of complement, showing strong inhibiting

effects with a decrease in incorporation of ³H-TdR, 94-99.5% rate of inhibition, whereas the inhibition rate induced by McAb 1B1-C2 fluctuated in a range of 68-95%, which is identical with the results of macrophage infection inhibition test by the same McAb, 61-87%. The results of ultrastructural localization of *L. donovani* antigen by protective McAb 2H6-E3 with immunogold technique showed the gold particles, in clumps, widely distributed on the outer side of promastigotes membrane. According to the high density of localized gold particles, it is suggested that this antigen is abundant on the plasma membrane.

Key words *Leishmani donovani* Protective monoclonal antibodies ³H-thymine deoxyriboside

* The Project Supported by National Natural Science Foundation of China