文章编号:1000-7423(2014)-01-0042-04

【论著】

# 补体成分 Ficolin-A 抗小鼠感染伯氏疟原虫的研究

向田[1], 刘杲[1], 戴万案[1], 李宗清[1], 陈凡[2*]

【摘要】 **目的** 探讨免疫系统补体成分 Ficolin-A 抗伯氏疟原虫（*Plasmodium berghei*）感染的效果。 **方法** 克隆扩增伯氏疟原虫裂殖子表面蛋白 $MSP1_{19}$ 基因，构建 pGEX-KG-$MSP1_{19}$ 质粒。将 pGEX-KG-Ficolin-A 质粒和 pGEX-KG-$MSP1_{19}$ 质粒分别转染至大肠埃希菌（*E. coli*）BL21，1 mmol/L 异丙基硫代-β-*D*-半乳糖苷（IPTG）诱导表达，谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 柱纯化重组蛋白，十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳（SDS-PAGE）和蛋白质印迹（Western blotting）鉴定蛋白表达情况。40 只小鼠随机均分为 5 组，Ficolin-A 蛋白组和 $MSP1_{19}$ 蛋白组小鼠每次注射蛋白 20 μg，$MSP1_{19}$ 蛋白+Ficolin-A 蛋白组小鼠每次注射 2 种蛋白各 20 μg，PBS 对照组和 GST 对照组小鼠每次各注射 PBS 200 μl 和 GST 20 μg，各组小鼠每 2 周免疫 1 次，共免疫 4 次。末次免疫后 2 周，各组小鼠腹腔注射感染伯氏疟原虫的红细胞 300 μl，分别于注射感染后第 2、4、6、8 和 10 天每组各取 3 只小鼠，尾静脉采血涂片，吉氏染色后，显微镜下计数感染的红细胞，计算疟原虫密度。感染疟原虫后第 20 天统计各组小鼠的存活数量。 **结果** 测序结果表明，pGEX-KG-Ficolin-A 和 pGEX-KG-$MSP1_{19}$ 质粒构建成功。SDS-PAGE 和 Western blotting 结果表明，Ficolin-A 融合蛋白的相对分子质量（$M_r$）约为 69 000，$MSP1_{19}$ 融合蛋白约 $M_r$ 41 000，均与预测值相符。动物实验结果显示，感染后第 2、4、6、8 和 10 天，$MSP1_{19}$ 蛋白+Ficolin-A 蛋白组小鼠的疟原虫密度均略低于其他 4 组，至感染后第 10 天，疟原虫密度为（22.2±1.7）%，略低于 $MSP1_{19}$ 蛋白组［(33.4±2.7）%］、Ficolin-A 蛋白组［(36.2±3.1）%］、GST 对照组［(43.8±4.8）%］和 PBS 对照组［(45.3±3.6）%］，但差异均无统计学意义（$P>0.05$）。感染后第 20 天，PBS 对照组 8 只小鼠均死亡，Ficolin-A 蛋白组存活小鼠数量（3 只）与 GST 对照组（2 只）比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）；$MSP1_{19}$ 蛋白+Ficolin-A 蛋白组存活小鼠数量（6 只）显著高于 GST 对照组（$P<0.05$）。 **结论** 补体成分 Ficolin-A 对降低小鼠疟原虫密度效果不明显，联合 MSP119 使用可提高小鼠感染疟原虫后的生存机会。

【关键词】 **Ficolin-A；伯氏疟原虫；裂殖子表面蛋白 1 羧基端 $M_r$ 19 000 片段**

中图分类号：R382.319 文献标识码：A

# Study on Ficolin-A against Infection of *Plasmodium berghei* in Mouse Model

XIANG Tian[1], LIU Gao[1], DAI Wan-an[1], LI Zong-qing[1], CHEN Fan[2*]

(**1 *Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, EnShi* 445000, *China*; 2 *School of Life Science, Hubei University, Wuhan* 430062, *China***)

【**Abstract**】 **Objective** To evaluate the effect of Ficolin-A, a lectin complement against *Plasmodium berghei* in mice model. **Methods** The $M_r$ 19 000 fragment of merozoite surface protein-1 of *P. berghei* ($MSP1_{19}$) was cloned and then subcloned into the vector pGEX-KG. The recombinants of pGEX-KG-Ficolin-A and pGEX-KG-$MSP1_{19}$ were transformed into *Escherichia coli* BL21, and followed by expression of the protein induced by 1 mmol/L IPTG. The fusion protein was purified by affinity chromatography using Glutathione Sepharose 4B, and then identified by SDS-PAGE and Western-blotting. Five mouse model groups were treated with PBS, GST, Ficolin-A, $MSP1_{19}$, or Ficolin-A+$MSP1_{19}$, respectively. Each group had eight mice. Mice in Ficolin-A or $MSP1_{19}$ groups were injected with 20 μg Ficolin-A or $MSP1_{19}$ protein each time, respectively. Mice in Ficolin-A+$MSP1_{19}$ group were injected with 20 μg Ficolin-A and 20 μg $MSP1_{19}$ each time. Mice in control groups were injected with 200 μl PBS or 20 μg GST, respectively. All the mice received four immunizations at 2-week intervals. Two weeks after the last immunization, all the mice were inoculated with 300 μl *Plasmodium berghei*-infected red blood cells. On day 2, 4, 6, 8, and 10 post-infection, blood samples were collected from three mice of each group, and the Giemsa stained-blood films were microscopically examined. Density of malaria parasites was calculated. The survival rate was evaluated on day 20 post-infection. **Results** The recombinant vectors of pGEX-KG-Ficol-

**基金项目：** 恩施州科技攻关计划课题

**作者单位：** 1 湖北省恩施州中心医院，恩施 445000；2 湖北大学生命科学院，武汉 430062

* 通讯作者，E-mail: chenfan1688cn@aliyun.com

in-A and pGEX-KG-MSP$1_{19}$ were constructed. Purified fusion proteins, Ficolin-A-GST and MSP$1_{19}$-GST, were obtained. Western blotting analysis indicated that the relative molecular mass of fusion proteins Ficolin-A-GST and MSP$1_{19}$-GST was about $M_r$ 69 000 and $M_r$ 41 000. Animal experiments showed that on day 10 after infection, the parasite density in Ficolin-A+MSP$1_{19}$ group [(22.2±1.7)%] was slightly lower than that of the groups MSP$1_{19}$ [(33.4±2.7)%], Ficolin-A [(36.2±3.1)%], GST [(43.8±4.8)%] and PBS [(45.3±3.6) %], but the difference was not statistically significant ($P$>0.05). No mouse survived in PBS group on day 20 after infection. There was no significant difference in number of survival mice between Ficolin-A group (3 mice) and GST group (2 mice). Six mice survived in Ficolin-A+MSP$1_{19}$ group, which was significantly more than that of GST group ($P$<0.05). **Conclusion** Ficolin-A cannot significantly suppress parasite density. However, Ficolin-A+MSP$1_{19}$ can increase the survival rate of *Plasmodium berghei*-infected mice.

**【Key words】** Ficolin-A; *Plasmodium berghei*; MSP$1_{19}$

Supported by the Key Science and Technology Project of Enshi Prefecture

* Corresponding author, E-mail: chenfan1688cn@aliyun.com

疟疾是由疟原虫感染引起的严重的寄生虫病之一，至今每年导致约100万人死亡[1]。研制安全、价廉和有效的疟疾疫苗是控制乃至消除疟疾的重要途径，天然免疫系统不仅是病原体的第一道防线，而且可激发宿主的获得性免疫[2]。Ficolin是凝集素补体途径的重要起始物质，是甘露聚糖结合凝集素（mannan-binding lectin, MBL）家族中新发现的成员之一，在机体天然免疫中有积极的意义[3,4]。研究人员在小鼠体内发现了2种Ficolin，即Ficolin-A和Ficolin-B，其中，Ficolin-B含量甚微，而Ficolin-A在宿主血浆中的浓度和结构均与MBL相近[5,6]。裂殖子表面蛋白1（MSP1）是一种重要抗疟疾疫苗候选抗原，其C末端$M_r$ 19 000片段（MSP$1_{19}$）与裂殖子侵袭红细胞密切相关[7]。Ficolin的功能与MBL有相似之处，由于Ficolin在血清中含量较低，目前对于其功能研究的报道较少。本研究旨在利用小鼠感染伯氏疟原虫模型，联合MSP$1_{19}$免疫，探讨Ficolin-A在抗疟原虫感染中的作用。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

1.1.1　小鼠和疟原虫　40只5～6周龄雌性BALB/c小鼠购自湖北省疾病预防控制中心，伯氏疟原虫（*Plasmodium berghei*）NK65由海南省热带病重点实验室惠赠。

1.1.2　菌株和质粒　大肠埃希菌（*E. coli*）DH5α、BL21株、质粒pGEX-KG和pGEX-KG-Ficolin-A以及GST抗血清均由本实验室保存。

1.1.3　主要试剂　*Taq* DNA聚合酶、$T_4$ DNA连接酶以及各种限制性内切酶均购自日本TaKaRa公司，胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒购自上海维特捷生物科技有限公司，辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG（HRP-IgG）和二氨基联苯胺（DAB）试剂盒购自天根生化科技（北京）有限公司，谷胱甘肽琼脂糖凝胶4B（Glutathione Sepharose 4B）为美国GE公司产品，其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2　方法

1.2.1　MSP$1_{19}$基因的克隆和pGEX-KG-MSP$1_{19}$质粒的构建　提取疟原虫基因组，根据基因库提供的基因序列（5023-5319, GenBank登录号AF187232），设计引物P1：CGGGATCCATGCTTAATATGGAT，P2：CGGAATTCTTATGCATTAGGGGT（下划线为*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ酶切位点）。MSP$1_{19}$基因序列和pGEX-KG质粒经双酶切后连接，转化至DH5α，挑选克隆，提取质粒并测序。

1.2.2　Ficolin-A和MSP$1_{19}$融合蛋白的表达　将pGEX-KG-Ficoli-A及pGEX-KG-MSP$1_{19}$转化至*E. coli* BL21，空载体pGEX-KG为对照。取菌落于LB（含50 μg/ml Amp）培养基中37 ℃ 160 r/min培养过夜。取3 ml菌液加入200 ml LB（含50 μg/ml Amp）培养基中37 ℃ 160 r/min摇3 h，至菌液吸光度（$A_{600}$值）约0.6时，加入1 mmol/L异丙基硫代-β-*D*-半乳糖苷（IPTG）继续培养4 h，进行超声破碎。将破碎后的菌液加入Glutathione Sepharose 4B柱，根据说明书所示步骤纯化，用缓冲液50 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）洗脱后，十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析。

1.2.3　Western blotting分析鉴定融合蛋白GST-Ficolin-A和GST-MSP$1_{19}$融合蛋白　经SDS-PAGE凝胶电泳后，将蛋白质转移至PVDF膜上，80 V 4 ℃过夜，5%脱脂奶粉37 ℃封闭1 h后，加入一抗兔抗GST血清（1∶200），37 ℃孵育1.5 h后，加入二抗山羊抗兔HRP-IgG（1∶2 000），37 ℃孵育1 h，1×Tris-HCl缓冲液洗涤2次，每次5 min，DAB显色鉴定。

1.2.4　小鼠感染模型和原虫密度检测　将40只BALB/c小鼠随机分成Ficolin-A蛋白组、MSP$1_{19}$蛋白组、MSP$1_{19}$蛋白+Ficolin-A蛋白组、GST对照组和PBS对照

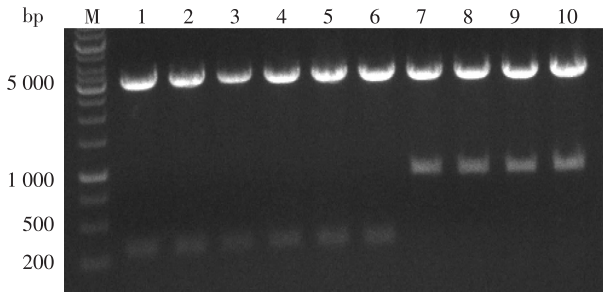
组等5组，每组8只小鼠。采用尾静脉直接注射免疫，Ficolin-A 蛋白组和 $MSP1_{19}$ 蛋白组小鼠每次注射蛋白 20 μg，$MSP1_{19}$ 蛋白+Ficolin-A 蛋白组小鼠每次注射 2 种蛋白各 20 μg，PBS 对照组和 GST 对照组小鼠每次分别注射 PBS 200 μl 和 GST 20 μg，各组小鼠每 2 周免疫 1 次，共免疫 4 次。末次免疫后2周，各组小鼠腹腔注射感染疟原虫的红细胞300 μl。感染后第2、4、6、8和10天，每组各取3只小鼠，尾静脉采血，涂片后吉氏染色，显微镜下计数感染红细胞，并计算原虫密度。原虫密度=I/(I+U) ×100%，其中I为1个视野中感染的红细胞数，U为同一视野中未感染的红细胞，每张涂片观察50个视野。

1.2.5　小鼠存活情况观察　连续观察各组小鼠存活情况，于感染疟原虫后第20天，统计存活小鼠数量。

1.3　统计学分析　数据用 ($\bar{x}\pm s$) 表示，采用SPSS 13.0软件进行统计分析，检验水平为α=0.05。

## 2　结　果

2.1　重组质粒的构建和鉴定　pGEX-KG-$MSP1_{19}$质粒经酶切鉴定，获得大小约300 bp的条带，与预期大小相符。质粒pGEX-KG-Ficoli-A经酶切后获得大小约 1 000 bp的片段，与预期结果一致。将酶切鉴定正确的质粒测序，结果证实重组质粒pGEX-KG-$MSP1_{19}$和pGEX-KG-Ficolin-A构建成功（图1）。

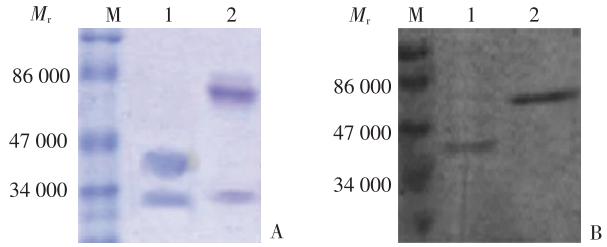



M：DNA标志物；1～6：质粒pGEX-KG-$MSP1_{19}$双酶切电泳结果；7～10：质粒pGEX-KG-Ficolin-A双酶切电泳结果。
M: DNA marker; 1–6: pGEX-KG-$MSP1_{19}$ digested by *Bam*H Ⅰ and *Eco*R Ⅰ; 7–10: pGEX-KG-Ficolin-A digested by *Bam*H Ⅰ and *Eco*R Ⅰ.

**图1　重组质粒pGEX-KG-$MSP1_{19}$和pGEX-KG-Ficolin-A的鉴定**
**Fig. 1　Identification of the combinant vectors pGEX-KG-$MSP1_{19}$ and pGEX-KG-Ficolin-A**

2.2　融合蛋白的表达和鉴定　SDS-PAGE和Western blotting结果显示，在相对分子质量（$M_r$）为69 000处和41 000各有一目的条带，与Ficolin-A-GST 和$MSP1_{19}$-GST 融合蛋白的预测大小一致(图2)。

2.3　原虫密度分析　感染后各组小鼠尾静脉采血检测红细胞感染程度，结果发现，感染后第 2、4、6、8 和 10 天，$MSP1_{19}$ 蛋白+Ficolin-A 蛋白组小鼠的疟原虫密度均略低于其他 4 组，至感染后第10天，$MSP1_{19}$蛋白+Ficolin-A蛋白组小鼠的疟原虫密度为（22.2±1.7）%，略低于$MSP1_{19}$蛋白组［(33.4±2.7) %］、Ficolin-A蛋白组［(36.2±3.1) %］、GST对照组［(43.8±4.8) %］和PBS对照组［(45.3±3.6) %］，但差异均无统计学意义（$P$>0.05）（图3）。




A：SDS-PAGE分析；B：Western blotting鉴定。
M：蛋白标志物；1：纯化的MSP119-GST融合蛋白；2：纯化的Ficolin-A-GST融合蛋白。
A：SDS-PAGE analysis；B：Western blotting analysis。
M: Protein marker; 1: Purified MSP119-GST protein; 2: Purified Ficolin-A-GST protein.

**图2　融合蛋白Ficolin-A-GST (A) 和$MSP1_{19}$-GST的表达和鉴定 (B)**
**Fig. 2　Identification of fusion protein Ficolin-A-GST and $MSP1_{19}$-GST by SDS-PAGE (A) and Western blotting (B)**

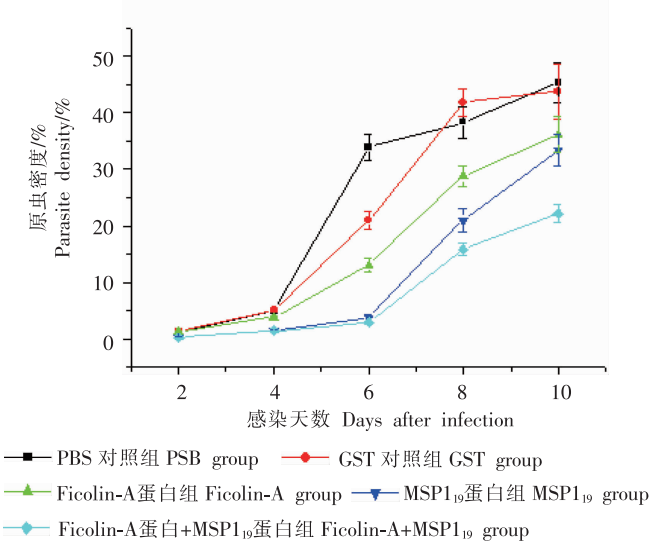



**图3　小鼠感染后血液中原虫密度检测**
**Fig. 3　Detection of parasite density in infected mice**

2.4　小鼠存活情况　小鼠感染伯氏疟原虫20 d后，PBS对照组8只小鼠均死亡，GST对照组、Ficolin-A蛋白组、$MSP1_{19}$蛋白组和Ficolin-A蛋白+$MSP1_{19}$蛋白组存活小鼠数量分别为2、3、4和6只。Ficolin-A蛋白组存活小鼠数量与GST对照组相比，差异无统计学意义（$P$>0.05）；Ficolin-A蛋白+$MSP1_{19}$蛋白组存活小鼠数量显著高于GST对照组（$P$<0.05）（图4）。

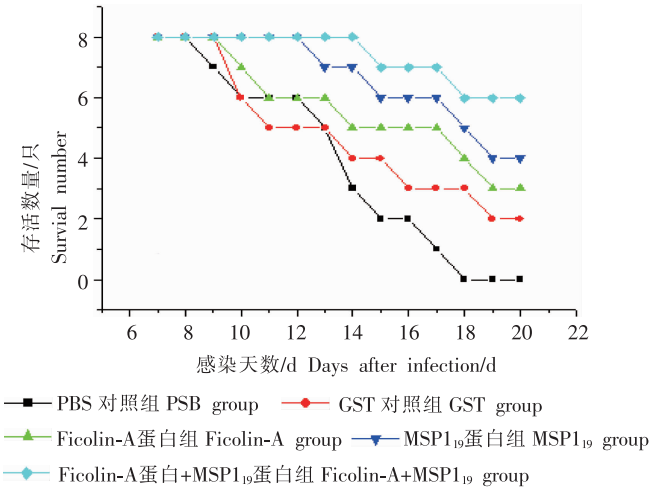



**图4　感染伯氏疟原虫小鼠存活情况**

**Fig. 4　Survival of *Plasmodium berghei*-infected mice**

## 3　讨　论

尽管在中国疟疾疫情得到了有效控制，但部分地区疫情仍较严重[8]。机体的天然免疫系统在抗病原微生物感染的早期发挥着十分重要的作用。Ficolin-A是新近发现的参与天然免疫途径的补体凝集素，不仅能与MBL相关丝氨酸蛋白酶（MASPs）结合而激活补体凝集素途径[9]，还能作为调理素与吞噬细胞表面受体结合而介导调节吞噬作用[10]。研究表明，Ficolin-A可显著抑制实验小鼠金黄色葡萄球菌的感染[11]。目前有关Ficolin-A在疟疾感染中的作用研究还较少。

疟原虫MSP1$_{19}$是一种表达于裂殖子表面的蛋白，可能参与裂殖子的入侵。在裂殖子入侵红细胞的过程中，该蛋白经过了一系列的蛋白水解，最终裂解为$M_r$ 19 000的羧基端片段，并被携带进入红细胞内[12]。动物研究表明，免疫重组的MSP1$_{19}$对抵抗疟原虫感染具有一定的效果[12,13]，但这种免疫效果需要联合福氏佐剂才起效。因此，提高候选疫苗的免疫原型，以获得对人类安全有效的疫苗是目前研究的热点[14,15]。MSP1$_{19}$是目前公认的较好的抗疟疾疫苗的候选免疫原，以MSP1$_{19}$为参照，可较好地反应Ficolin-A在抗疟原虫感染中的作用。本研究结果表明，Ficolin-A单独使用时对疟原虫有一定的抑制作用，但效果不显著，但Ficolin-A可增强MSP1$_{19}$的免疫效果，显著延长小鼠的生存时间。推测Ficolin-A在小鼠体内的半衰期有限，导致其降低原虫密度的效果不明显。因此，增加Ficolin-A在小鼠体内的表达量，可能会有较好的抗疟效果。

Ficolin-A的抗感染机制可能是由于Ficolin分子为可溶性模式识别受体，因此可能针对疟原虫上的某些基序分子进行识别，进一步刺激和活化机体的免疫系统，增强疫苗的免疫效果。由于Ficolin-A是小鼠自身补体成分，因此在小鼠模型中，Ficolin-A可以作为佐剂增强抗疟疾疫苗的效果。相应地，由于在人疟疾疫苗的研制中不能使用佐剂，因此可考虑利用相应的补体成分作为佐剂，以增强免疫效果。因此，进一步研究阐明Ficolin的抗疟疾作用机制，或利于探讨Ficolin作一种新型疟疾疫苗佐剂的应用前景。

## 参　考　文　献


[1] Cibulskis RE, Aregawi M, Williams R, *et al*. Worldwide incidence of malaria in 2009: estimates, time trends, and a critique of methods [J]. PLoS Med, 2011, 8(12): e1001142.

[2] Matsushita M, Fujita T. The role of ficolins in innate immunity[J]. Immunobiology, 2002, 205(4-5): 490-497.

[3] Fujita T, Matsushita M, Endo Y. The lectin-complement pathway and its role in innate immunity and evolution [J]. Immunol Rev, 2004, 198(1): 185-202.

[4] Matsushita M, Endo Y, Taira S, *et al*. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin[J]. J Biol Chem, 1996, 271(5): 2448-2454.

[5] Fujimori Y, Harumiya S, Fukumoto Y, *et al*. Molecular cloning and characterization of mouse ficolin-A[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 244(3): 796-800.

[6] Ohashi T, Erickson HP. Oligomeric structure and tissue distribution of ficolins from mouse, pig and human [J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 360(2): 223-232.

[7] Hirunpetcharat C, Tian JH, Kaslow DC, *et al*. Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1) of *Plasmodium yoelii* expressed *in Saccharomyces cerevisiae*: correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effector CD4$^+$T cells [J]. J Immunol, 1997, 159(7): 3400-3411.

[8] 夏志贵，杨曼妮，周水森. 2011年全国疟疾疫情分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30 (6): 419-422.

[9] Matsushita M, Endo Y, Fujita T. Cutting edge: Complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease[J]. J Immunol, 2000, 164(5): 2281-2284.

[10] Cseh S, Vera L, Matsushita M, *et al*. Characterization of the interaction between ficolin-A/P35 and mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2[J]. J Immunol, 2002, 169(10): 5735-5743.

[11] Endo Y, Nakazawa N, Iwaki D, *et al*. Interactions of ficolin and mannose-binding lectin with fibrinogen/fibrin augment the lectin complement pathway[J]. J Innate Immun, 2009, 2(1): 33-42.

[12] Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, *et al*. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion inhibiting antibodies[J]. J Exp Med, 1990, 172(1): 379-382.

[13] Tian JH, Miller LH, Kaslow DC, *et al*. Genetic regulation of protective immune response in congenic strains of mice vaccinated with a subunit malaria vaccine[J]. J Immunol, 1996, 157(3): 1176-1183.

[14] 钱峰，徐沪济. 疟疾偶联疫苗[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30(5): 393-395.

[15] 钱峰. 用多肽-蛋白偶联方法制备抗恶性疟原虫抗体[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30(6): 442-445.


（**收稿日期**：2013-07-15　　编辑：张争艳）