

炭疽疫苗及治疗药物筛选和评价模型研究进展*

董大勇 徐俊杰 陈 薇**

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘要 炭疽疫苗和治疗药物的研究是近年来国际上研究热点之一, 由于对它们的有效性研究不能在人体进行, 因此实验模型的选择就特别重要. 目前常用的细胞模型主要包括 CHO 细胞和 J774A.1 细胞. 动物模型种类较多, 包括小鼠、大鼠、豚鼠、兔和猴等都被作为炭疽的动物模型加以研究. 由于模型选择的差异, 实验结果常出现较大差异, 甚至得到相反的结果. 回顾了以往在细胞和动物模型上进行的炭疽实验, 分析选择炭疽研究模型的原则和依据. 同时, 为探讨不同模型之间产生实验结果差异的原因, 简要介绍了炭疽杆菌的致病机理, 以及炭疽疫苗和治疗药物的研究进展.

关键词 炭疽, 炭疽疫苗, 保护性抗原, 细胞模型, 动物模型

学科分类号 Q93

炭疽是由炭疽芽孢杆菌引起的人畜共患的急性烈性传染病, 对人类和畜牧业都曾造成严重危害, 至今对人类健康仍存在一定的威胁. 在美国, 1944 年至 1999 年自然发生的炭疽病例共 244 例^[1], 在我国, 据卫生部报道, 2003 年至 2005 年炭疽病例共 1 768 例, 死亡 25 例. 炭疽芽孢还是一种潜在的生物战剂和生物恐怖袭击的武器.

1 炭疽杆菌致病机理

炭疽可通过皮肤、吸入和食入三种途径发生感染. 不同的感染途径将导致不同的病理结果. 超过 90% 的自然感染炭疽是皮肤型炭疽, 致死性最强的炭疽是吸入性炭疽(肺炭疽). 炭疽芽孢杆菌的致病因子主要是细菌荚膜和炭疽毒素.

1.1 荚膜

控制荚膜合成与降解的基因位于炭疽杆菌质粒 pXO2 上. 炭疽芽孢在动物体内发芽后可以产生荚膜. 由于荚膜是单一线形 γ -D- 谷氨酸的多聚物, 故其免疫原性弱, 可帮助细菌逃避宿主的免疫防御, 阻止巨噬细胞吞噬^[2].

1.2 炭疽毒素

炭疽毒素包括保护性抗原(protective antigen, PA)、致死因子(lethal factor, LF)和水肿因子

(edema factor, EF) 三种蛋白质. 编码毒素的 3 个基因 *pag*、*cya* 和 *lef* 位于 pXO1 质粒上. 单一的蛋白质成分不能发挥作用, 水肿因子或致死因子必须与保护性抗原结合成水肿毒素(EF + PA, ET)或致死毒素(LF + PA, LT)才会产生毒素效应, ET 和 LT 两个毒素其结构模式符合蛋白毒素 AB 结构模式: PA 是结合亚单位 B, 与靶细胞受体结合; EF、LF 是效应亚单位 A^[3]. 目前的研究已经阐明了炭疽毒素进入细胞内的过程, 见图 1.

2 疫苗和药物

目前, 对炭疽芽孢杆菌的致病因子和致病机制的认识越来越清楚, 随着这种认识的不断加深, 也促进了炭疽疫苗和治疗药物的进一步发展. 图 2 简要展示了炭疽芽孢呼吸道感染机体的过程, 以及抗体(疫苗免疫诱发或治疗性抗体)抑制炭疽感染的作用环节.

*国家自然科学基金资助项目(30300016, 30571745).

** 通讯联系人. Tel: 010-66948565, Fax: 010-63815273

E-mail: cw789661@yahoo.com

收稿日期: 2005-12-27, 接受日期: 2006-02-09

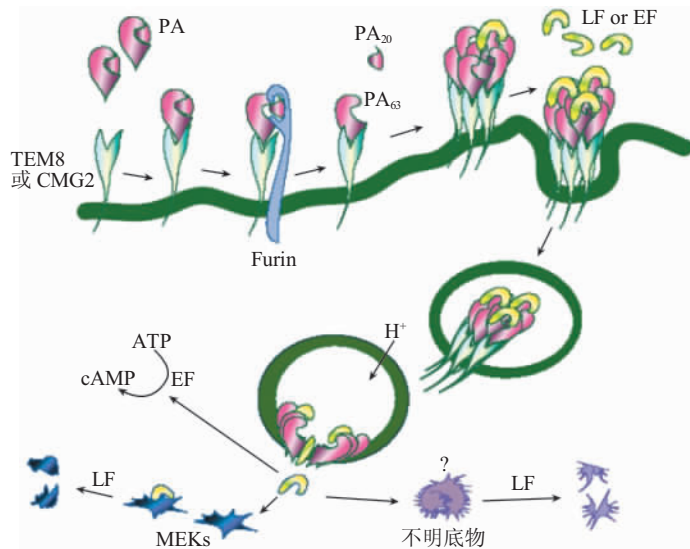


Fig. 1 The role of anthrax toxin in cell^[4]

图 1 炭疽毒素作用模式图^[4]

保护性抗原 (PA) 结合炭疽毒素受体 TEM8 或 CMG2 后, 被弗林蛋白酶水解成 PA₆₃ 和 PA₂₀, 水解的 PA₆₃ 形成七聚体, 七聚体再与 LF 或 EF 结合, 内吞进入胞浆, 内吞小泡受酸化作用, 将 LF 和 EF 转移至细胞质, EF 催化 ATP 转化为 cAMP, LF 水解膜上的 MEK 家族和其他靶蛋白。

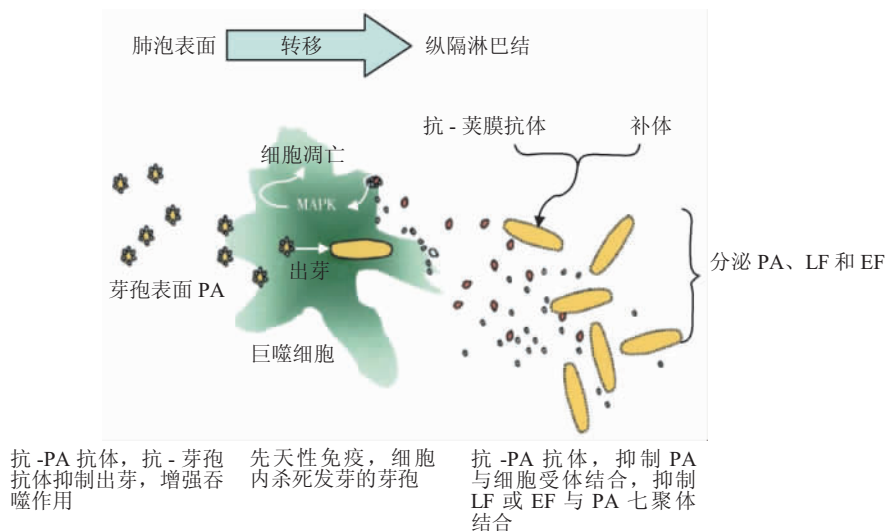


Fig. 2 The role of antibodies in preventing lethality in inhalational anthrax^[1]

图 2 抗体抑制肺炎炭疽的作用模式图^[1]

在感染初期, 因芽孢表面有 PA 的存在, 抗-PA 抗体和抗-Spore 抗体都能与芽孢结合, 增强肺泡巨噬细胞的吞噬作用, 抑制出芽或通过氧化杀死正在出芽的芽孢. 芽孢被巨噬细胞吞噬后, 或保留在原始感染部位, 或转移到纵隔淋巴结, 导致巨噬细胞裂解, 释放繁殖体, 伴随有一定量的 PA, LF 和 EF 的分泌表达. 蛋白酶水解 PA, 然后在敏感的单核细胞和巨噬细胞装配成七聚体, 结合 LF 或 EF 后, 内吞入细胞, 发挥毒素作用. 抗-PA 抗体能抑制 PA 装配或与细胞结合, 抗-LF/EF 抗体能阻断 LF/EF 发挥活性, 荚膜抗体能结合补体导致细菌繁殖体裂解或去除。

2.1 炭疽疫苗

经过药物评审批准使用的人用炭疽疫苗有俄罗斯的 STI 株和中国的 A16R 株减毒活疫苗, 美国的 V770-NP1-R 株和英国的 Sterne 株的培养液上清佐剂疫苗. PA 能诱导机体的保护性免疫, 是培养液上清佐剂疫苗 (如美国的 AVA) 的主要免疫活性成分, 也是当前各国研制第二代炭疽疫苗的首选抗原. 从 2003 年 7 月, 重组保护性抗原铝佐剂疫苗 (rPA/Alhydrogel 疫苗) 已经开始了临床实验 (美国国防部批准), 2004 年 9 月, 又开始了进一步的临床研究^[5].

新一代炭疽疫苗研究包括构建 PA 的突变体、致死因子和水肿因子酶活性结构域突变的突变体等, 研究了多种新型佐剂, 以及进行给药系统的选择, 包括口服、透皮和吸入途径, 还有 DNA、非复制性病毒颗粒和腺病毒等其他给药系统的研究. 最重要的是, 对有可能增强免疫反应的新抗原的鉴定工作还在继续, 在一些动物模型上进行的工作证明了芽孢抗原和荚膜抗原具有一定的保护性作用^[6~8].

2.2 治疗药物

炭疽芽孢杆菌对多种抗生素敏感, 如青霉素、环丙沙星、多西霉素等^[9]. 但炭疽毒素在炭疽的致病过程中发挥重要作用, 而抗生素不能对炭疽毒素起作用. 因此, 设计抑制毒素活性的治疗药物, 是治疗炭疽感染的关键.

炭疽毒素进入细胞的机制已经认识得比较清楚, 只要阻止 EF、LF 进入巨噬细胞, 或抑制其在细胞内的酶活性, 也就抑制了炭疽毒素的作用. 细胞实验和动物实验已经证明, PA 的中和性抗体可抑制 LT 和 ET 毒性, LF 的中和性抗体可抑制 LT 毒性, EF 的中和性抗体可抑制 ET 毒性. 外源的毒素受体 (CMG2 或 TEM8) 类似物可抑制 LT 和 ET 毒性, 且已证明 CMG2 的活性要远高于 TEM8. 此外还有 PA 的突变体, 它能与野生型 PA 形成七聚体, 但不能把 LF 和 EF 导入细胞内^[10]. Collier 和合作者^[11]发现一种合成的多价聚合体抑制剂, 能阻碍 PA 和 LF、EF 的相互作用. 还有, 喹唑啉复合物家族能抑制 EF 的 cAMP 酶活性, IL-1 β 、TNF α 和 IL-1 β 受体能保护小鼠对抗致死毒素的攻击.

3 疫苗和药物筛选的模型

3.1 细胞模型

动物模型成本较大, 费时费力, 在疫苗或药物

筛选和评价的初期, 用细胞模型先对疫苗或药物进行筛选既能节约成本, 又能提高效率. 炭疽毒素是炭疽致病的主要毒力因子, 如果能在敏感细胞上对 LT、ET 的毒力进行检测, 找到某种化合物、多肽或抗体能阻断毒素进入细胞或抑制其在细胞内的酶活性, 就能说明这种药物具有开发的潜力, 可以进行下一步的动物实验. 目前炭疽常用的细胞模型主要包括以下几种.

LT (PA+LF) 生物学活性测定和毒素中和实验细胞模型 (toxin neutralization assay, TNA). 1986 年, Friedlander^[12]报道了某些巨噬细胞对炭疽 LT 敏感的特性. LT 生物学活性测定方法是以 $10^5/\text{ml}$ 小鼠巨噬细胞 J774A.1 接种于 96 孔培养板, 加入不同浓度的 PA+LF, 3 h 后, 用 MTT 法通过检测存活细胞数, 计算细胞的 ED_{50} (半数存活率). TNA 方法是指在 96 孔细胞培养板上固定 PA、LF (细胞致死剂量) 浓度, 加入不同浓度的抗体或其他毒素抑制剂, 3 h 后, 用 MTT 法通过检测存活细胞数, 计算细胞存活率 ((加重组蛋白孔 A_{570} 值 / 未加蛋白孔 A_{570} 值) $\times 100\%$). 因为 TNA 可信赖、重复性好, 可方便地测定疫苗抗体中和致死毒素的能力, 所以它是动物免疫实验的一个重要监测指标, 也是免疫保护相关性的一个重要指标^[13,14].

ET (PA+EF) 生物学活性测定的细胞模型. ET 的活性测定是通过试剂盒检测细胞 cAMP 水平的变化. 中国仓鼠肾细胞 CHO, 以 $10^4/\text{ml}$ 接种于 96 孔培养板, 固定 PA 浓度、加入不同浓度的 EF, 2 h 后检测 cAMP 水平的变化. 固定 PA 和 EF 的浓度, 加入不同浓度的抗体或其他抑制剂, 检测 cAMP 水平的变化, 则可用于筛选 ET 的抑制药物^[15,16].

为了进一步研究抗体或药物对芽孢的作用, 近来人们已研究了芽孢感染细胞模型. 常用的细胞是小鼠的巨噬细胞 J774A.1 细胞, 以 $10^5/\text{孔}$ 被铺在 24 孔板, 每孔 $500\ \mu\text{l}$ 培养基, 生长 1~2 h, 用 $500\ \mu\text{l}/\text{孔}$ 基础培养基置换原培养基, 与炭疽芽孢共同作用 30 min 后, 换液去除未被吞噬的芽孢, 放回培养箱. 检测方法包括台盼蓝和中性红染色, 以及 LDH 活性测定^[17]. 该模型用台盼蓝染色, 显微镜观察, 进行定性检测较容易, 但用 LDH 定量检测操作较复杂, 而且实验涉及炭疽杆菌芽孢, 所以必须在 BSL-3 实验室中操作.

总之, 这些模型的建立, 方便了炭疽疫苗和治疗药物的筛选, 极大地提高了筛选的效率, 节省了实验的成本.

3.2 动物模型

人类自然感染的炭疽绝大多数为皮肤型炭疽, 而少见致死性最强的吸入性炭疽. 疫苗或药物的有效性实验, 不可能在人身上进行临床实验, 所以必须从大量的动物实验来进行推测. 为了试验药物和炭疽疫苗的有效性, 许多动物都被用来作为评价模型来研究, 主要包括小鼠、豚鼠、家兔和猴等. 但由于各种模型特点不同, 选择不同的模型, 结果往往不同, 有时甚至会得出相反的结论.

3.2.1 小鼠模型.

小鼠价格便宜, 操作方便, 可作为药物或疫苗筛选的初期动物模型, 但必须综合考虑以下 4 个因素: a. 小鼠的品系; b. 毒株的种类; c. 攻毒的方式(毒素或芽孢); d. 药物或疫苗诱发抗体作用的环节.

首先, 不同小鼠株对荚膜和毒素的敏感性不同. 对大多数小鼠株荚膜是个重要的毒力因子, 对毒素的敏感性, 不同株的小鼠有很大不同, 从有极强抗性的 CBA/J 株, 到非常敏感的 A/J 株. 已经确定这种敏感性的不同是由于 A/J 鼠缺乏功能性的 Hc 基因, 这个基因编码补体成分 C5, C5 衍生多肽对炎症中的巨噬细胞和中性粒细胞是重要的过敏毒素和化学引诱物. 缺乏这些成分导致巨噬细胞聚集感染部位延迟, 不能有效地抑制细菌的生长繁殖. 研究显示, A/J 小鼠在给予含有补体成分的正常血清和毒素中和抗体时, 能对抗炭疽强毒株的攻击.

其次, 用不同的炭疽毒株对疫苗或药物的评价效果不同. 在强毒株(pXO1+, pXO2+)中 Ames 株毒力较强, 曾被称为“疫苗抗性株”, Vollum 株则毒力相对较弱, 相同的免疫程序、剂量, 用这两株炭疽强毒株评价有时会出现完全不同的结果. STI 株(pXO1+, pXO2-)无荚膜质粒, 可以对有些药物或疫苗在毒素敏感的小鼠上进行筛选和评价.

最后, 要考虑药物或疫苗作用的环节以确定攻毒的方式. a. 如果筛选的是针对炭疽毒素的药物, 如毒素的受体, 或中和性单抗, 那么就要选用毒素敏感株小鼠, 用毒素攻击来筛选, 或用荚膜缺陷型的毒株来攻击筛选. 如果是针对芽孢或繁殖体的药物, 就不能用毒素来攻击, 而必须选用芽孢来攻毒. b. 筛选疫苗也要考虑疫苗产生抗体所作用的环节, 如果产生的是针对毒素的抗体, 用强毒株芽孢(如 Ames 株, pXO1+, pXO2+)对小鼠攻毒, 保护作用就不好. Helen 等报道以沙门氏菌为载体表达 PA 蛋白的疫苗, 免疫 A/J 小鼠, 用 STI 株攻毒,

取得了较好的免疫效果^[18]. 荚膜也是炭疽的毒力因子, 是炭疽杆菌繁殖体上的重要抗原, 近来已有关于把荚膜和 PA 相连接, 制成荚膜-PA 免疫的报道, 并在小鼠(Swiss Webster mice)模型上把它与 PA、荚膜、PA 聚合体、荚膜-BSA、荚膜+PA 等比较(Ames 株攻毒), 其中荚膜-PA 免疫保护效果最好^[19].

3.2.2 豚鼠模型.

豚鼠体形较小, 操作方便, 被广泛用作炭疽的动物模型来阐明毒素的作用及测试炭疽疫苗的免疫原性, 但在疫苗有效性实验中, 有些疫苗对不同的毒株保护率有很大差异.

美国的 AVA 疫苗, 在豚鼠模型上, 对不同的毒株具有不同的保护率. Fellows 等^[20]用 33 个不同的炭疽菌株攻击豚鼠(0, 4 周免疫, 第 10 周攻毒, 10 000 个芽孢/只), 每组 16 只, 雌雄各半, 其中有 7 组仅有 1 只或 2 只豚鼠存活. 而且综合所有的攻毒结果, 发现雌性豚鼠比雄性豚鼠有更好的耐受力, 雌性豚鼠存活 44%, 雄性豚鼠存活 23%. 该疫苗仅对加拿大的 BA0018 和南非的 BA1033 炭疽菌株提供 100% 的保护. 对 Ames 株(该株被称为“疫苗抗性株”)的保护率仅为 2/16. 然而, 当 PA 采用不同于铝佐剂的新型佐剂时, 它有可能获得全部的保护, 豚鼠在注射用 rPA/Ribi 疫苗对抗 Ames 株芽孢攻击能被完全保护, 但当用 rPA/Alhydrogel 疫苗或英国的人用疫苗免疫仅能提供很低的保护率. 与其他疫苗组比较, rPA/Ribi 组免疫学参数分析显示, 有更高的淋巴细胞增殖反应, 更高的 PA 中和抗体滴度和 IgG2 水平, 但在 PA 特异的 IgG1 水平上没有明显的不同, 而且攻毒存活与抗体滴度没有明显的相关性. 不同的佐剂结合蛋白抗原后激发不同的免疫反应, 它们也能经由不同的免疫机制诱导保护性免疫, 这些反应在不同动物之间不同. 当 PA 结合铝佐剂时, 豚鼠的免疫系统可能不完全识别 PA 的保护性位点, 所以它们很难被 AVA 或 rPA/Alhydrogel 疫苗免疫保护.

用不同的炭疽强毒株在豚鼠模型上分析 rPA 剂量与保护率的相关性会得出不同的结论. McBride 等^[21]报道, 在豚鼠模型上不能确定 rPA 剂量与保护率的相关性, rPA/Alhydrogel 疫苗(0, 2, 4 周免疫, 第 6 周攻毒), 免疫 rPA 剂量分别为 250, 2.5, 0.25, 0.025 μg /剂, Ames 株攻毒保护的比例为 5/7, 4/7, 2/8, 1/8. 而 Reuveny 等^[22]报道, 当用 Vollum 株进行皮下攻毒时, 得出免疫剂量、抗体

水平与豚鼠保护率的相关性. 免疫 rPA 剂量分别为 25、12.5、6.3、1.6、0.8 μg /剂, 2 周后攻毒, 保护比例为 10/10、6/6、4/6、2/6、0/6、1/6. 4 周后攻毒保护比例为 10/10、10/10、8/10、8/10、2/10、0/10. 从以往的报道知道, 当用 Vollum 株攻击时豚鼠可以被 AVA 较好地保护. David 等报道, 用兔的抗-PA 血清也可以为 Vollum 株攻击的豚鼠提供有效的被动保护^[23].

3.2.3 家兔模型.

家兔是对炭疽芽孢杆菌敏感的动物, 家兔对不同炭疽毒株的病理都非常相似, 大多数毒株呼吸道攻毒, 家兔是在 1~2 天死亡. 家兔吸入性炭疽病理学模型与人和非人灵长类都非常相似, 主要组织器官的病理损伤都是出血、水肿和坏死, 有些出现一定的白细胞浸润, 大多数病例最后都发展成菌血症. 兔脾、肺、肠道等器官的病理与人和猴基本一致, 只有在脑组织病理有些区别, 兔一般出现的是非炎性的中枢神经损伤, 猴和人一般出现炎性的中枢神经损伤. 兔的病程比猴和人要快, 兔攻毒的平均存活时间是 2.1 天, 猴的存活时间是 4.8 天, 人的存活时间是 4.7 天. 病理上的区别可能是因为人或猴的存活时间较长, 所以导致了他们出现中枢神经系统炎症, 以及肝和肺较显著的病理变化. 此外, 兔是炭疽疫苗在猴模型上有效性很好的预报者^[24]. 在我国, 用来效验皮上划痕人用炭疽活疫苗免疫力的动物模型也是家兔.

AVA 和 rPA/Alhydrogel 疫苗在兔模型上的保护性评价都取得了很好的效果. Fellows 等^[20]报道, 用 6 株来自不同国家的炭疽菌株, 对 AVA 免疫的兔进行气溶胶攻击, 保护率均在 90%以上. 用兔做模型研究了 AVA 和 rPA/Alhydrogel 疫苗免疫保护相关性指标也很成功. Pitt 等^[25]报道, AVA 按比例稀释(未稀释, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256), 0, 4 周免疫, 第 10 周用 Ames 株进行攻毒, 其中未稀释和 1:4 组的兔全部存活, 1:16、1:64 组的 10 只兔存活了 9 只. 1:256 组 10 只兔仅有一只存活. Little 等^[26]报道, 分别用不同剂量 rPA/Alhydrogel 疫苗, 单次或双免疫家兔, 单次免疫 rPA 剂量 100, 25, 5, 1, 0.2, 0.08 μg , 4 周后用 Ames 菌株 80 个半数致死量 (LD_{50}) 进行呼吸道攻击, 存活的比例分别为 28/30, 42/64, 16/37, 4/22, 1/10, 0/10, 两次免疫(0, 4 周免疫) rPA 剂量 10, 1, 0.2, 0.08 μg , 第 10 周用 Ames 菌株 80 个 LD_{50} 进行呼吸道攻击, 存活的比例分别为

12/12, 10/12, 10/12, 4/12, 0/8, 这两篇报道在兔模型上确定了 PA 免疫剂量与 anti-PA 抗体和 TNA 效价的关系, 也初步确定了免疫剂量、抗体水平与保护率的相关性.

在测试抗体作为芽孢感染治疗剂方面, Mohamed 等^[27]的研究证明, PA 高亲和性单抗 (ETI-204) 能预防或治疗炭疽芽孢气溶胶对兔的攻击. 炭疽感染前静脉注射 2.5 mg/只或 10 mg/只, 能显著保护家兔对抗 60~450 个 LD_{50} Ames 株的呼吸道攻击, 皮下注射用 20 mg 能完全保护家兔. 在攻毒之后 24 h, 36 h, 48 h, 静脉注射 10 mg/只, 保护的比率为 8/10, 5/10, 3/7.

疫苗或药物对炭疽有效性实验如果能用兔来代替猴, 将会大大降低实验的成本, 增加可行性, 将是一个较理想的动物模型.

3.2.4 猴模型.

炭疽疫苗或药物的有效性实验, 不能用于人体, 猴是最好的动物模型, 它有同人相似的 MHC I 类和 II 类以及 IgG 类型免疫反应, 和极相似的病理过程. 如果在猴模型上有很好的保护效果, 就可能推断在人身上有很好的保护效果, 因此它是药物或疫苗评价的关键模型.

实验证明, 对不同的炭疽毒株 (Namibia isolate, Turkey isolate, Vollum, Ames), AVA 和 rPA/Alhydrogel 疫苗在猴模型上都能提供很好的保护率^[20,28]. 此外, 当猴被注射两剂 AVA 疫苗 12~18 个月, 检测显示有较低的毒素中和抗体水平, 当 2 年之后, 不能检测到毒素中和抗体, 但在受到致死剂量呼吸道炭疽芽孢的攻击时仍能提供保护. 当 rPA 选用不同的佐剂时 (Alhydrogel, QS-21, MPL in SLT), 单剂量免疫, 6 周后用 Ames 株 93 个 LD_{50} 对猴进行呼吸道攻毒, 保护比例分别为 10/10, 10/10, 9/10, 证明了以 PA 为活性成分的疫苗能提供较好的保护效果. 统计所有的 AVA 疫苗和以 rPA 为基础的疫苗免疫恒河猴对抗呼吸道攻击实验结果显示, 不论采用何种佐剂, 免疫剂量, 攻毒菌株, 攻毒剂量, 攻毒时间, 疫苗均取得了很好的保护效果, 总体保护率达到 97%, 与豚鼠不同, 在对抗“疫苗抗性株” (Ames 株) 攻击时, 保护率也达到 95%. 总之, 这些研究表明, AVA 和 rPA 为基础的疫苗在猴模型上提供了广泛的、高水平的保护. 但对于在猴模型上免疫剂量与抗体或中和性抗体相关性的研究, 以及关于免疫保护的相关指标的研究还未见报道.

3.3 其他

在疫苗新抗原的筛选方面. 芽孢进入机体是炭疽感染的第一步, 研究表明, 芽孢表面具有能产生免疫保护性的蛋白质, Huang 和 Foster 等^[29]用蛋白质组学的方法对芽孢上具有免疫原性的蛋白质进行筛选. Francis 等^[30]用蛋白质组学对炭疽杆菌 Sterne 株繁殖体蛋白进行了分析, 用这种方法能分析到可能具有免疫原性的蛋白质, 但要证明蛋白质是否具有保护性还需要前面介绍的实验来筛选和验证.

在对治疗性抗体筛选方面, 可以采用先进的仪器如 Biacore 生物大分子热动力学相互作用分析仪, 来检测抗体与毒素亲和力的大小, 初步分析中和性抗体效价的强弱.

4 展 望

炭疽是一种人畜共患的烈性传染病. 炭疽芽孢是潜在的生物恐怖病原和生物战剂. 自“9·11”事件后, 对于炭疽治疗和预防在国际上备受关注. 因为炭疽实验不能直接应用于人体, 所以对于药物和疫苗筛选评价模型的选择特别重要. 已有的研究模型, 包括细胞模型, 动物模型, 为我们进行炭疽研究提供了宝贵的经验, 特别是在动物模型的选择上, 一定要结合研究的目标和模型的特点慎重地进行选择. 在药物和疫苗的筛选方面, 已开始用蛋白质组学、免疫组学、转录组学等方法进行探索, 已有关于炭疽芽孢上可能抗原分析和炭疽杆菌繁殖体蛋白质组的研究报道, 以及关于炭疽致死毒素与巨噬细胞相互作用的转录组的研究报道, 目的是进一步研究炭疽杆菌的致病机理, 寻找新的疫苗抗原和药物靶点, 但迄今为止, 对这些方法筛选到的蛋白仍缺乏进一步的研究验证, 这可能是以后炭疽研究的一个重要工作.

参 考 文 献

- Brey R N. Molecular basis for improved anthrax vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, **57** (9): 1266~1292
- Chabot D J, Scorpio A, Tobery S A, *et al.* Anthrax capsule vaccine protects against experimental infection. *Vaccine*, 2004, **23** (1): 43~47
- Ascenzi P, Visca P, Ippolito G, *et al.* Anthrax toxin: a tripartite lethal combination. *FEBS Lett*, 2002, **531** (3): 384~388
- Moayeri M, Leppla S H. The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 2004, **7** (1): 19~24
- National Institutes of Health. Anthrax Vaccine Clinical Trials. <http://www.clinicaltrials.gov/ct/gui/show/NCT00114621>. 2005-09-09
- Brossier F, Levy M, Mock M. Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy. *Infect Immun*, 2002, **70** (2): 661~664
- Schneerson R, Kubler-Kielb J, Liu T Y, *et al.* Poly(γ -D-glutamic acid)protein conjugates induce IgG antibodies in mice to the capsule of *Bacillus anthracis*: A potential addition to the anthrax vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (15): 8945~8950
- Rhie G E, Roehrl M H, Mourez M, *et al.* A dually active anthrax vaccine that confers protection against both bacilli and toxins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (10): 10925~10930
- Thomas V, Inglesby M D, Donald A, *et al.* Anthrax as a biological biological weapon. *JAMA*, 1999, **281** (18): 1735~1745
- Sellman B R, Mourez M, Collier R J. Dominant-negative mutants of a toxin subunit: an approach to therapy of anthrax. *Science*, 2001, **292** (5517): 695~697
- Hanna P C, Acosta D, Collier R J. On the role of macrophages in anthrax. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (21): 10198~10201
- Friedlander A M. Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid dependent process. *J Biol Chem*, 1986, **261** (16): 7123~7126
- 徐俊杰, 董大勇, 宋小红, 等. 重组炭疽保护性抗原的表达、纯化与生物活性分析. *生物工程学报*, 2004, **20** (5): 652~655
Xu J J, Dong D Y, Song X H, *et al.* *Chin J Biotechnology*, 2004, **20** (5): 652~655
- 郭 强, 徐俊杰, 董大勇, 等. 重组炭疽致死因子的表达及生物活性分析. *微生物学报*, 2004, **44** (6): 749~751
Guo Q, Xu J J, Dong D Y, *et al.* *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, **44** (6): 749~751
- Kumar P, Ahuja N, Bhatnagar R. Purification of anthrax edema factor from *Escherichia* and identification of residues required for binding to anthrax protective antigen. *Infect Immun*, 2001, **69** (10): 6532~6536
- 董大勇, 徐俊杰, 宋小红, 等. 重组炭疽水肿因子的表达与生物活性分析. *微生物学报*, 2005, **45** (3): 459~462
Dong D Y, Xu J J, Song X H, *et al.* *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, **45** (3): 459~462
- Gutting B W, Gaske K S, Schilling A S, *et al.* Differential susceptibility of macrophage cell lines to *Bacillus anthracis*-Vollum 1B. *Toxicology in Vitro*, 2005, **19** (2): 221~229
- Flick-Smith H C, Waters E L, Walker N J, *et al.* Mouse model characterisation for anthrax vaccine development: comparison of one inbred and one outbred mouse strain. *Microb Pathog*, 2005, **38** (1): 33~40
- Chabot D J, Scorpio A, Tobery S A, *et al.* Anthrax capsule vaccine protects against experimental infection. *Vaccine*, 2004, **23** (1): 43~47
- Fellows P F, Linscott M K, Ivins B E, *et al.* Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits, and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin. *Vaccine*, 2001, **19** (23~24): 3241~3247
- McBride B E, Mogg A, Telfer J L, *et al.* Protective efficacy of a recombinant protective antigen against *Bacillus anthracis* challenge and assessment of immunological markers. *Vaccine*, 1998, **16** (8): 894~899

- 810~817
- 22 Reuveny S, White M D, Adar Y Y, *et al.* Search for correlates of protective immunity conferred by anthrax vaccine. *Infect Immun*, 2001, **69** (5): 2888~2893
 - 23 Kobiler D, Gozes Y, Rosenberg H, *et al.* Efficiency of protection of guinea pigs against infection with *Bacillus anthracis* spores by passive immunization. *Infect Immun*, 2002, **70** (2): 544~560
 - 24 Food and Drug Administration. Anthrax vaccines: efficacy testing and surrogate markers of immunity. www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/nm000001.pdf. 2005-09-09
 - 25 Pitt M L, Little S F, Ivins B E, *et al.* *In vitro* correlate of immunity in a rabbit model of inhalational anthrax. *Vaccine*, 2001, **19** (32): 4768~4773
 - 26 Little S F, Ivins B E, Fellows P F, *et al.* Defining a serological correlate of protection in rabbits for a recombinant anthrax vaccine. *Vaccine*, 2004, **22** (3~4): 422~430
 - 27 Mohamed N, Clagett M, Li J, *et al.* A high-affinity monoclonal antibody to anthrax protective antigen passively protects rabbits before and after aerosolized *Bacillus anthracis* spore challenge. *Infect Immun*, 2005, **73** (2): 795~802
 - 28 Ivins B E, Pitt M L M, Fellows P F, *et al.* Comparative efficacy of experimental anthrax vaccine candidates against inhalational anthrax in rhesus macaques. *Vaccine*, 1998, **16** (11~12): 1141~1148
 - 29 Huang C M, Foster K W, DeSilva T S, *et al.* Identification of *Bacillus anthracis* proteins associated with germination and early outgrowth by proteomic profiling of anthrax spores. *Proteomics*, 2004, **4** (9): 2653~2661
 - 30 Francis A W, Ruggiero C E, Koppisch A T, *et al.* Proteomic analysis of *Bacillus anthracis* Sterne vegetative cells. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1748** (2): 191~200

Animal and Cell Models on Screening and Evaluating Vaccines and Drugs Against Anthrax*

DONG Da-Yong, XU Jun-Jie, CHEN Wei**

(Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing 100071, China)

Abstract Recently the research of vaccines and drugs against anthrax is one of hot spots. The efficacy of anthrax vaccines and drugs can't be experimented in human, therefore the testing model is very important. The cell models mainly include CHO and J774A.1. Now, various kinds of animals including mice, rats, rabbits, and nonhuman primates were experimented as animal models. Because the models are different, the results of experiments are significantly different, sometimes they are contrary. Many experiments of *Bacillus anthracis* in different cell and animal models are reviewed, and the principles of choosing animal models of anthrax are discussed. In order to analyze the different results of experiments in different models, the pathogenesis of *Bacillus anthracis* and the researching progress of anthrax vaccines and drugs are also simply introduced.

Key words anthrax, anthrax vaccine, protective antigen, cell model, animal model

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30300016, 30571745).

**Corresponding author. Tel: 86-10-66948565, Fax: 86-10-63815273, E-mail: cw789661@yahoo.com

Received: December 27, 2005 Accepted: February 9, 2006