论著

文章编号:1000-5404(2005)13-1320-03

沙鼠感染幽门螺杆菌后胃粘膜 INF-γ、IL-4 及 IL-12p40 表达水平的分析

刘开云,郭 刚,解庆华,邹全明 (第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,重庆市生物制药工程研究中心,重庆 400038)

提 要: 目的 通过比较幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染蒙古沙鼠前后胃粘膜 INF-γ、IL-4 及 IL-12p40 mRNA 水平的变化,确定 Hp 感染在蒙古沙鼠胃粘膜诱发的免疫应答方式。**方法** 采用临床分离的 Hp 强毒株对蒙古沙鼠进行感染,4 周后剖杀。取胃粘膜组织作半定量 RT-PCR 检测 INF-γ、IL-4 及 IL-12p40 mRNA。**结果** 与对照组相比,沙鼠感染 Hp 后,胃粘膜 INF-γmRNA 水平显著增加($P<0.05$),IL-4 mRNA 水平显著降低($P<0.05$),IL-12p40 mRNA 水平变化不显著($P>0.05$)。**结论** Hp 感染沙鼠诱导 Th1 型免疫应答,同时抑制 Th2 免疫应答,而对单核巨噬细胞的活化作用不明显。

关键词: 幽门螺杆菌;免疫应答;RT-PCR;蒙古沙鼠
中图法分类号: R322.44; R377; R392.13 **文献标识码**: A

INF-γ, IL-4 and IL-12p40 expressions in gastric mucosa of *Helicobacter pylori* infected Mongolian gerbil

LIU Kai-yun, GUO Gang, XIE Qing-hua, ZOU Quan-ming (Department of Clinical Microbiology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To analyze the mRNA expressions of INF-γ, IL-4 and IL-12p40 in the gastric mucosa of Mongolian gerbil infected of *H. pylori* and to investigate the immune response mechanisms. **Methods** Twenty female Mongolian gerbils of 8 weeks, weighing (50 ± 5) g, were orally administered with *H. pylor*. Another 20 gerbils were used as control. Four weeks later, all animals were sacrificed and the gastric mucosa was dissected and the mRNA expressions of INF-γ, IL-4 and IL-12p40 were detected by semi-quantitive RT-PCR. **Results** The mRNA expression of INF-γ increased ($P<0.05$) but IL-4 decreased significantly ($P<0.05$), and IL-12p40 was of no change, as compared with the control group. **Conclusion** *H. pylori* infection can induce Th1 and depress Th2 response in the gastric mucosa of Mongolian gerbil and has little effect on mononuclear macrophage activation.

Key words: *Helicobacter pylori*; immune response; reverse transcription PCR; Mongolian gerbil

由于幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)独特的生物学特性以及局限的动物宿主,国内外虽有报道建立了小鼠及大鼠感染模型[1,2],但稳定性较差。1996 年 Hirayama 等[3]首次报道了 Hp 感染沙鼠致胃炎、胃溃疡的动物实验。我们也用人源性 Hp 分离株成功感染了沙鼠,并证明该动物模型能再现人胃部的炎症及溃疡等病理学变化。通过比较分析沙鼠 Hp 感染前后胃粘膜 INF-γ、IL-4 及 IL-12p40 mRNA 水平的变化,确定 Hp 感染在蒙古沙鼠胃粘膜诱发的免疫应答方式,为沙鼠 Hp 感染后胃粘膜的免疫损伤机制研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 菌株

由本室自临床慢性胃炎患者体内分离、鉴定并保存(编号 CCM9903),cagA 阳性。

1.2 实验动物

雌性蒙古沙鼠 40 只,8 周龄,体质量(50 ± 5)g,由浙江省实验动物中心提供(浙医实动单项准第 2001001 号)。

1.3 Hp 感染沙鼠

蒙古沙鼠 20 只,按本室建立的 Hp 感染沙鼠模型制作方法[4]进行。另外 20 只沙鼠做正常对照。

基金项目:国家重点科技攻关计划课题资助项目(96-901-01-54)
Supported by the Foundation for the Key Sci & Tech Research Project of China (96-901-01-54)
作者简介:刘开云(1974-),男,重庆市人,硕士,助教,主要从事幽门螺杆菌及其疫苗方面的研究。电话:(023)68753590
通讯作者:邹全明,电话:(023)68752316,E-mail: qmzou@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-03-02;**修回日期**:2005-06-01

1.4　感染率检测

Hp 感染后 4 周脱臼处死试验沙鼠，取出鼠胃，其中一半胃粘膜组织作培养，按本室建立的方法[4]进行。选取 Hp 培养阳性的沙鼠胃粘膜组织 RT-PCR 结果进行统计分析。

1.5　半定量 RT-PCR 检测沙鼠胃粘膜 IL-4、INF-γ、IL-12p40 表达的差异

1.5.1　总 RNA 提取　　取剩余的一半胃粘膜组织匀浆后用 Tripure Isolation Reagent 试剂盒抽提总 RNA，同时取对照组 20 只沙鼠按相同方法做对照，紫外测定 $D(260)/D(280)$ 比值在 1.8～2.0。

1.5.2　PCR 引物的设计与合成　　在 GenBank 中查出沙鼠的 β-actin、INF-γ、IL-4 及 IL-12p40 mRNA 序列，primer primier 5.0 软件设计 PCR 引物，合成 β-actin：正义：5′-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3′，反义：5′-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3′，合成目的片段 587 bp；INF-γ：正义：5′-GCTCTGCCTCCTGGCGATTTCTG-3′，反义：5′-CTTCCTTAGGGTGACTCTGGGTG-3′，合成目的片段 418 bp；IL-4：正义：5′-CACGGAGATGTTTGTGCCAGATGTC-3′，反义：5′-CTCTTAGGCGTCCCAGGAAGTCATT-3′，合成目的片段 257 bp；IL-12p40：正义：5′-AAAGGGGATGAAAAGGATGGTAAGC-3′，反义：5′-CGGTGTGATGATGTCTCTGATGAAG-3′，合成目的片段 174 bp。由成都博瑞克生物技术有限公司合成。

1.5.3　RT-PCR　　采取一步法 RT-PCR，即逆转录和 PCR 在同一试管中一次反应完成，详细步骤参照 Promega 公司 Access RT-PCR System 一步法 RT-PCR 试剂盒说明书进行，扩增产物 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

电泳结果采用 UVP 凝胶成像系统拍照，UVP 凝胶分析系统软件分析电泳条带的光密度值。

1.6　统计学方法

应用 SPSS 10.0 软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　沙鼠 Hp 感染率

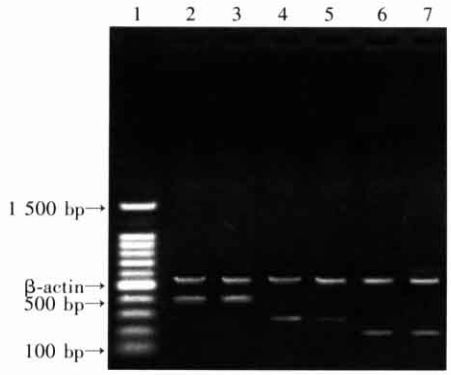
20 只实验沙鼠中有 17 只 Hp 培养阳性，阳性率为 85%。

2.2　SQ RT-PCR 循环数的确定

为了确定 RT-PCR 的扩增平台期，我们用提取的总 RNA 进行 20、22、24、26、28、30、32 个循环的扩增，在 20～28 个循环时扩增产物尚有差异；而在 28 个循环后差异消失。可判断在 24～28 循环时反应尚未达到平台期且产物量最佳，故在下面的半定量 RT-PCR 扩增中选用 26 个循环数。

2.3　半定量 RT-PCR 检测沙鼠胃粘膜 INF-γ、IL-4、IL-12p40 mRNA 表达的差异

以正常沙鼠为对照，Hp 感染沙鼠胃粘膜 RT-PCR 测定 INF-γ、IL-4、IL-12p40 mRNA 水平结果见图 1。表 1 为电泳图像经 UVP 凝胶扫描仪软件半定量分析的结果，为各检测产物光密度值与各自对应的 β-actin 光密度值的比值统计结果。从表 1 中结果可以看出 Hp 感染后 2 周，Hp 感染沙鼠胃粘膜 INF-γ mRNA 水平显著增加（$P<0.05$），IL-4 mRNA 水平显著降低（$P<0.05$），IL-12p40 mRNA 水平变化不显著（$P>0.05$）。



1：Marker；2：Control β-actin and INF-γ；3：Infection β-actin and INF-γ；4：Control β-actin and IL-4；5：Infection β-actin and IL-4；6：Control β-actin and IL-12p40；7：Infection β-actin and IL-12p40

图 1　沙鼠胃粘膜 INF-γ、IL-4、IL-12p40 mRNA RT-PCR 扩增电泳结果

Fig 1　Electrophoresis of INF-γ, IL-4, and IL-12p40 mRNA in gastric mucosa of Mongolian gerbils

表 1　Hp 感染沙鼠 INF-γ、IL-4 和 IL-12p40 mRNA 表达[$(\bar{x}\pm s)$%]

Tab 1　INF-γ, IL-4 and IL-12p40 mRNA expression in gastric mucosa of Hp infected gerbils [$(\bar{x}\pm s)$%]

Group	n	Rx of INF-γ	Rx of IL-4	Rx of IL-12p40
Control	20	90.3±0.022	84.2±0.020	87.9±0.021
Infection	17	99.4±0.024*	78.1±0.019*	86.0±0.022

*：$P<0.05$，*vs* control

3　讨论

由于目前对 Hp 的抗感染治疗尚存在易复发、费用高及耐药菌株日益多见等诸多问题，因此，研制有效的 Hp 疫苗一直是医学界的研究热点。目前认为 Hp 感染后胃粘膜的 $CD4^+$ 辅助性 T 淋巴细胞（Th）免疫应答机制是 Hp 致病及疫苗研制的关键[3]。基于 Hp 感染后胃粘膜免疫应答机制的重要性，我们在已建立的 Hp 蒙古沙鼠感染模型基础上[4]，选取代表 Th1 亚群功能的 INF-γ、代表 Th2 亚群功能的 IL-4 以及代表单核巨噬细胞功能的 IL-12p40，采用半定量 RT-PCR 检测感染后沙鼠胃粘膜这些细胞因子 mRNA 水平的变化，对 Hp 感染后胃粘膜免疫应答机制进行分析，从而为 Hp 疫苗研制提供实验依据。

Hp 感染可诱导体液及细胞免疫应答，目前尚无标准的抗沙鼠的各种抗体，限制了对沙鼠体液免疫应答的研究。实时定量 PCR 可准确反映核酸水平的细微变化，但需要制备已知模板绘制标准曲线。本研究选

用看家基因 β-actin 作为内参照，从 RNA 样品抽提直至光密度扫描，靶基因与内参照均在同一体系中，消除了实验误差。RT-PCR 反应的灵敏性是众所周知的，每 1 个扩增循环的产物作为下一个循环的模板使产物呈指数增长，但实际上经过一定数量的循环后，扩增的效率随循环数的增加而逐渐降低，出现所谓的平台效应[6]。这时的扩增对确定目标序列的多少是没有意义的[7]。因此，确定平台期和循环数是检测不同样品是否有表达差异的关键。在实验中，24～28 为最佳循环数，可确保不同样品的表达差异能顺利检出。

Hp 感染后，机体免疫系统产生相应的免疫应答，包括多种细胞因子的合成和分泌，以及各种抗体的产生，Th1/Th2 平衡的改变等，从而引起免疫或组织损伤[8]。Th1 型细胞活化分泌 INF-γ，Th2 型细胞活化分泌 IL-4，本研究选取这两种细胞因子作为代表，分析沙鼠 Hp 感染后胃粘膜的免疫应答类型。单核巨噬细胞具有免疫防御、抗原呈递、免疫调节等功能，参与抗 Hp 免疫应答，是免疫清除 Hp 感染的又一关键因素。IL-12 是已知最强的单核细胞活化因子，故本研究选取 IL-12 水平观察单核细胞对 Hp 感染的应答。

本研究表明，Hp 感染后沙鼠胃粘膜 INF-γ mRNA 水平显著增加（$P<0.05$），IL-4 mRNA 水平显著降低（$P<0.05$）。说明 Hp 感染后在沙鼠胃粘膜诱导 Th1 型免疫应答，Th1 型免疫应答产生的 INF-γ 可下调 Th2 应答，导致 IL-4 水平降低；同时 INF-γ 增加可导致炎症损伤甚至溃疡，与人体 Hp 感染一致[9]。而 Th1 型免疫应答主要针对胞内感染，Th2 型免疫应答主要针对胞外感染，这可能正是 Hp 感染诱导的免疫应答不能有效清除 Hp 本身的重要原因[9]。IL-12p40 mRNA 水平变化不显著（$P>0.05$），说明 Hp 感染不能很好的激发单核巨噬细胞的免疫防御和抗原呈递，使 Hp 能够逃避单核巨噬细胞的杀伤，与 Garhart 等[10]发现，缺乏 IL-12p40 的小鼠免疫后攻毒不被保护的报道一致。本研究的观察结果与人体研究报道一致[1,9,11]，说明沙鼠感染 Hp 后胃粘膜免疫应答与人体相似，Hp 沙鼠感染模型是良好的 Hp 疫苗研究模型。

当然，Hp 感染后激活机体的免疫系统，还伴有粘膜上皮细胞合成 IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、趋化因子、粒细胞-单核细胞集落刺激因子、肿瘤坏死因子等细胞因子的改变[11,12]，应对这些细胞因子作进一步的研究，才能更好的了解 Hp 感染在沙鼠体内诱导的免疫应答。Hp 感染诱导沙鼠的体液免疫应答也是的另一个重要方面，还有待研究。如果使用实时 PCR，将会进一步提高检测的灵敏度与准确度。

参考文献：

[1] 曾志荣，胡品津，陈旻湖，等. 幽门螺杆菌长期感染鼠腺胃模型的研究[J]. 中华医学杂志，1998，78(7)：494－497.

[2] Lee A，O'Rourke J，De Ungria M C，*et al*. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection：introducing the Sydney strain[J]. Gastroenterology，1997，112(4)：1386－1397.

[3] Hirayama F，Takagi S，Kusuhara M，*et al*. Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori* [J]. J Gastroenterol，1996，31(5)：755－757.

[4] 郭 刚，刘开云，解庆华，等. 幽门螺杆菌沙鼠感染模型的定量分析研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(3)：286－288.

[5] Bergman M P，Engering A，Smits H H，*et al*. *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN[J]. J Exp Med，2004，200(8)：979－990.

[6] Choquer M，Boccara M，Vidal Cros A. A semi-quantitative RT-PCR method to readily compare expression levels within Botrytis cinerea multigenic families *in vitro* and in planta[J]. Curr Genet，2003，43(4)：303－309.

[7] Yamamura M，Uyemura K，Deans R J，*et al*. Defining protective responses to pathogens：cytokine profiles in leprosy lesions[J]. Science，1991，254(5029)：277－279.

[8] Baggiolini M，Walz A，Kunkel S L. Neutrophil-activating peptide-1/ interleukin 8，a novel cytokine that activates neutrophils[J]. J Clin Invest，1989，84(4)：1045－1049.

[9] D'Elios M M，Appelmelk B J，Amedei A，*et al*. Gastric autoimmunity：the role of *Helicobacter pylori* and molecular mimicry[J]. Trends Mol Med，2004，10(7)：316－323.

[10] Garhart C A，Heinzel F P，Czinn S J，*et al*. Vaccine-induced reduction of *Helicobacter pylori* colonization in mice is interleukin-12 dependent but gamma interferon and inducible nitric oxide synthase independent[J]. Infect Immun，2003，71(2)：910－921.

[11] Watanabe N，Shimada T，Ohtsuka Y，*et al*. Proinflammatory cytokines and *Helicobacter pylori* stimulate CC-chemokine expression in gastric epithelial cells[J]. J Physiol Pharmacol，1997，48(3)：405－413.

[12] Bliss C M Jr，Golenbock D T，Keates S，*et al*. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8，epithelial neutrophil-activating peptide 78，and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes[J]. Infect Immun，1998，66(11)：5357－5363.

（编辑 汪勤俭）