DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.09.002
第26卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 9
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)09-0753-03

论著

BALB/c小鼠口服重组幽门螺杆菌热休克蛋白A疫苗的免疫应答

郭 鹰,邹全明,朱永红,吴 超,郭 刚,毛旭虎,袁小澎 (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 400038)

提 要:目的 评价重组热休克蛋白A(rHspA)作为幽门螺杆菌(Hp)口服疫苗成分的效果。方法 采用重组Hp保护性抗原HspA与粘膜免疫佐剂(霍乱毒素,CT;大肠不耐热肠毒素B亚单位,LTB)共口服免疫BALB/c小鼠,ELISA分析小鼠血清、胃肠粘液中IgG、IgA抗体水平,体外培养脾淋巴细胞在Hp刺激下的增殖情况以及IL4、IFN-γ的变化。结果 单纯口服rHspA组产生的抗体水平与对照组(PBS)相差不显著,而rHspA+佐剂组与对照组相差非常显著。rHspA+佐剂组小鼠脾淋巴细胞体外培养,在Hp抗原刺激作用下出现明显的增殖反应;不加佐剂免疫组分泌IFN-γ水平增加,IL-4水平未发现增加;而加佐剂免疫组除IFN-γ水平增加外,IL-4水平也发现显著增加。结论 BALB/c小鼠口服rHspA和CT以及LTB混合制剂能有效激发机体产生全身和局部特异性的体液免疫应答和细胞免疫应答。

关键词:幽门螺杆菌;热休克蛋白A;口服疫苗;免疫应答
中图法分类号:R341;R377;R392.7 文献标识码:A

Immune response of *Helicobacter pylori* in BALB/c mice by oral immunization with recombinant HspA

GUO Ying, ZOU Quan-ming, ZU Yong-hong, WU Chao, GUO Gang, MAO Xu-hu, YUAN Xiao-peng (Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the immune response efficiency of recombinant HspA (rHspA) as an oral vaccine in BALB/c mice. **Methods** BALB/c mice were vaccinated with rHspA combined with choleratoxin (CT) or heat-labile enterotoxin subunit B (LTB). The levels of specific IgG and IgA antibodies to *Helicobacter pylori* were determined in sera, fluids of stomach and intestine by ELISA. Proliferation of spleen lymphocytes cultured *in vitro* and the changes of IL-4, IFN-γ, stimulated by *Helicobacter pylori*, were investigated by ^{3}H-TdR incorporation and ELISA. **Results** No significant difference in level of anti-HspA antibodies between rHspA and control groups was found, but the level of antibodies in rHspA plus adjuvant group was significantly higher than that in the control group. Levels of IL-4 and IFN-γ in rHspA plus adjuvant group were higher than those in the control group. In rHspA group, however, only IFN-γ increased. **Conclusion** Oral administration of rHspA plus CT (or LTB) in BALB/c mice can stimulate local and systematic immune response, humoral immune response, and cellular immune response of the mice.

Key words: *Helicobacter pylori*; heat shock protein A; oral vaccine; immune response

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)疫苗预防和治疗Hp感染在于其激发机体有效的免疫保护反应。本实验采用重组Hp保护抗原热休克蛋白A(recombinanture heat shock protein A, rHspA)与粘膜免疫佐剂霍乱毒素(choleratoxin, CT)以及大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位(heat-labile enterotoxin subunit B)共口服免疫BALB/c小鼠,观察其免疫后机体全身的或局部的(重点是胃粘膜组织)体液和细胞免疫应答,评价rHspA作为Hp口服疫苗成分的效果。

基金项目:国家"九五"重点科技攻关计划项目(96-901-01-54),"863"生物与现代农业技术领域生物工程技术主题课题(2001AA215161)
Supported by the Key Sci & Tech Research Project of the National "Ninth Five-year Plan" of China (96-901-01-54) and the National "863" Key Research Project of China for Bioengineering Techniques in the Fields of Bioenginering and Modern Agriculture (2001AA215161)
作者简介:郭 鹰(1974—),男,江苏省金坛市人,硕士,助教,主要从事分子生物学方面的研究。电话:(023)68752313;E-mail:eaglegying@163.com
通信作者:邹全明,电话:(023)68752316
收稿日期:2003-09-05;修回日期:2003-11-10

1 材料与方法

1.1 免疫原

rHspA(本室制备,纯度为98.2%),免疫剂量为150μg/次。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 佐剂

CT 使用剂量为 1 μg/次, LTB 使用剂量为 10 μg/次。

1.3 动物及分组

BALB/c 小鼠, SPF 级, 雌性, 健康, 6~8 周龄, 体质量 18~22 g, 由四川大学实验动物中心提供(动物质量合格证号: 医动字第 24101110 号)。将 60 只小鼠随机分为 4 组, 每组 15 只。Ⅰ组为 PBS 对照组; Ⅱ组为 rHspA 免疫组; Ⅲ组为 rHspA+CT 免疫组; Ⅳ组为 rHspA+LTB 免疫组。

1.4 口服免疫方案

免疫前 24 h, 小鼠禁食、水, 灌喂胃酸中和液 0.20 ml/次, 20 min 后灌喂抗原。Ⅰ组 0.25 ml 20 mmol/LPBS (pH 7.4); Ⅱ组 0.20 ml rHspA (0.75 mg/ml); Ⅲ组 0.20 ml rHspA (0.75 mg/ml)+1 μl CT (1 μg/μl); Ⅳ组 0.20 ml rHspA (0.75 mg/ml)+10 μl LTB (1 μg/μl)。免疫 1 h 后供食、水。第 0、7、14、21 天各免疫 1 次, 共免疫 4 次。

1.5 标本的采集

末次免疫后 10 d, 断食、断水 24 h, 采集标本。

1.5.1 血清收集 摘除小鼠眼球取血, 1.5 ml 无菌 EP 管收集, 室温放置 1 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集血清。

1.5.2 胃液收集 脱脊椎处死小鼠, 75%乙醇消毒, 打开腹腔, 剪取胃。沿幽门-贲门线从中间纵切将胃一分为二, 除去胃内容物, 放入预加入 0.5 ml 1%蛋白酶抑制剂的无菌 1.5 ml EP 管中, 剪碎胃组织, 4 ℃, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清。

1.5.3 肠液收集 剪取小鼠的小肠, 除去肠内容物, 放入预加入 0.5 ml 1 蛋白酶抑制剂的无菌 1.5 ml EP 管中, 剪碎小肠组织, 4 ℃, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清。

1.5.4 脾细胞收集 处死小鼠后, 立即剪取脾脏, 置 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 中不锈钢网研磨、过滤脾细胞悬液, 离心, 弃掉上清, 加 3 ml 三蒸水, 溶红细胞 30 s, 立即加入 1.8%NaCl, 混匀。1 200 r/min 离心 10 min, 弃掉上清, PBS 洗 1~2 次。0.2%台盼蓝染色, 活细胞计数法计数活细胞比例> 5%。用 PBS 调整细胞数至所需浓度。

1.6 血清、胃液、肠液 HspA 特异性 IgG、IgA 水平检测

rHspA 5 μg/ml 0.1 ml/孔包被酶标板, ELISA 检测血清、胃液、肠液 IgG 及 IgA。

1.7 脾淋巴细胞培养上清 IL-4、IFN-γ 的测定

分离培养过夜的小鼠脾淋巴细胞转种于 24 孔细胞培养板中, 每孔细胞数为 1×10^7。同时加入 50 μg rHspA 或 Hp 超声上清, 对照孔加入 PBS, 继续培养 2 d 后收集各孔培养上清。采用双抗夹心-ABC-ELISA 试剂盒(上海森雄公司)检测各孔培养上清中 IL-4、IFN-γ 的含量。

1.8 ^{3}H-TdR 掺入试验

分离培养过夜的脾淋巴细胞转种于 24 孔细胞培养板中, 每孔细胞数为 1×10^6。同时加入 50 μg rHspA 或 Hp 超声上清, 对照孔加入 PBS, 各孔均加入 37 kBq ^{3}H-TdR。继续培养 2 d 后, 多头收集器收集各孔细胞, 0.9%NaCl 洗涤 3 次, 加入闪烁液, 猝灭 2 h, 液闪计数仪计数 cpm 值。

1.9 统计学处理

使用 SPSS 10.0 统计软件对实验数据进行方差分析。

2 结果

2.1 BALB/c 小鼠口服免疫 rHspA 后血清、胃液、肠液特异抗体水平

ELISA 分别检测 rHspA 特异的血清 IgG、IgA 以及胃肠液 IgA 反应, 发现单纯口服 rHspA 组免疫后所产生的抗体与对照组比较, 相差不显著($P>0.05$); 而 CT+rHspA 组、rLTB+rHspA 组产生的抗体水平比对照组高, 且相差非常显著($P<0.01$)(表 1)。

表 1 口服免疫后 BALB/c 小鼠血清、胃液及肠液抗 HspA 特异抗体反应情况(A_{492}, $\bar{x}\pm s$)

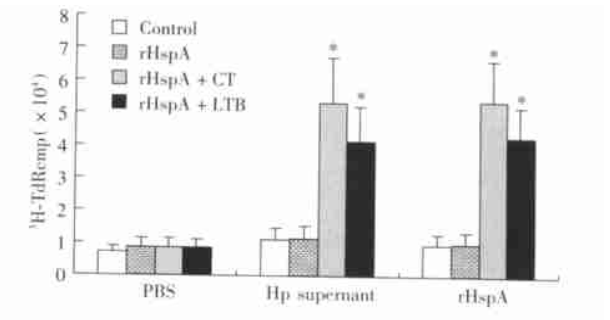
Tab 1 Anti-HspA Ig levels in sera and fluids of stomach and intestine of BALB/c mice after oral vaccination (A_{492}, $\bar{x}\pm s$)

Group	Sera(1∶200)		Gastric fluid	Intestinal fluid
	IgA	IgG	IgA (1∶4)	IgA (1∶5)
Ⅰ Control	0.101±0.048	0.105±0.053	0.111±0.061	0.115±0.045
Ⅱ rHspA	0.139±0.071	0.141±0.069	0.156±0.079	0.162±0.083
Ⅲ CT+rHspA	1.225±0.175 *	0.899±0.181 *	1.889±0.264 *	2.014±0.388 *
Ⅳ rLTB+rHspA	0.568±0.118 *	0.443±0.124 *	0.857±0.184 *	0.925±0.204 *

*: $P<0.01$, *vs* control

2.2 Hp 及 rHspA 刺激脾淋巴细胞特异的增殖反应

分离培养免疫后各组小鼠脾淋巴细胞, 分别利用 HP 超声上清和 rHspA 刺激后加入 ^{3}H-TdR, 继续培养 2 d 后, 收集细胞, 检测各组 ^{3}H-TdR 摄入量(cpm 值)。结果显示, 口服 CT+rHspA、rLTB+rHspA 组的脾淋巴细胞经 HP 超声上清和 rHspA 刺激后 cpm 均高于对照组, 且相差非常显著($P<0.01$); rHspA 组与对照组相差不显著(图 1)。



*: $P<0.01$, *vs* control

图 1 Hp 及 rHspA 刺激脾细胞的增殖反应

Fig 1 Proliferation of spleen lymphocytes stimulated with *Helicobacter pylori* or rHspA

2.3 Hp 及 rHspA 刺激小鼠脾淋巴细胞 IL-4、IFN-γ 的水平

各组小鼠脾淋巴细胞, HP 超声上清和 rHspA 刺激后, 培养上清经检测, 不加佐剂免疫组分泌 IFN-γ 水平增加, IL-4 水平未发现增加; 而加佐剂免疫组除 IFN-γ 水平增加外, IL-4 水平也发现显著增加(表 2)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　Hp 及 rHspA 刺激脾淋巴细胞 IL-4、IFN-γ 的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of IL-4 and IFN-γ in the cultured supernatant of spleen lymphocytes stimulated with *Helicobacter pylori* or rHspA ($\bar{x}\pm s$)

Group	IL-4(pg/ml)			IFN-γ(pg/ml)		
	PBS	Hp	rHspA	PBS	Hp	rHspA
Ⅰ Control	119±38	238±42	175±57	238±41	309±66	287±58
Ⅱ rHspA	133±42	212±66	186±59	234±36	1009±204 **	1151±213 **
Ⅲ rHspA+CT	192±76	575±84 *	312±50 *	303±47	715±162 *	817±126 *
Ⅳ rHspA+LTB	168±58	553±79 *	297±45 *	299±50	679±157 *	799±119 *

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control

3　讨论

幽门螺杆菌 HspA 属 GroES(Hsp10)同源物, 与其它细菌不同的是其 C 端有一镍离子结合区。HspA 参与尿素酶的组装和尿素酶活性的发挥, 是 Hp 重要的致病因子。有研究表明, HspA 具有免疫原性, 且位于 Hp 表面, 能够激发机体产生有效的保护性免疫应答, 是 Hp 亚单位疫苗的重要候选抗原之一[1]。

Hp 感染定植主要部位为胃粘膜, 其环境特殊, Hp 疫苗应以口服免疫途径有效地激发粘膜免疫应答, 才能发挥免疫保护作用[2], 这一过程需要粘膜免疫佐剂的参与。现已确认有效的粘膜免疫佐剂, 主要是大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)和霍乱肠毒素(CT)[3,4]。

BALB/c 小鼠口服 rHspA 未加佐剂组抗 HspA 的 IgG 和 IgA 水平与对照组相差不显著, 而加佐剂组血清、胃及肠粘液中抗体水平显著高于对照组。胃粘膜组织 IgA 水平的显著增高, 可能参与 Hp 的保护免疫作用。

rHspA 免疫鼠脾淋巴细胞体外培养, 在 Hp 抗原刺激作用下出现明显的增殖反应, ^{3}H-TdR 摄入量增加。同时, 不加佐剂免疫组分泌 IFN-γ 水平增加, IL-4 水平未发现增加; 而加佐剂免疫组除 IFN-γ 水平增加外, IL-4 水平也发现显著增加。此结果与以 Hp 超声上清、rUreB 免疫 BALB/c 小鼠后脾淋巴细胞 IL-4、IFN-γ、mRNA 水平的变化是一致[5~7]。IFN-γ 为 Th1 型细胞因子, IL-4 为 Th2 型细胞因子。rHspA 免疫 BALB/c 小鼠后可激发机体的细胞免疫应答, 联合粘膜佐剂调节 Th1/Th2 反应的平衡, 而 Th1/Th2 的平衡可能在 Hp 的免疫保护机制中发挥重要作用[8,9]。

动物实验中观察到, Hp 抗原只有与粘膜佐剂(如 CT/LT 或其 B 亚单位)一起接种时才具有显著的抗螺杆菌感染的能力。没有佐剂时, 经非肠道或口服接种虽可诱导血清 IgG 的产生, 但 IgA 极少, 更无保护作用[10,11]。CT/LT 或其 B 亚单位, 它们发挥粘膜免疫佐剂功能, 诱导共服抗原的保护性免疫作用机制目前尚不清楚。一般认为它们能有效增强局部粘膜的细胞及体液免疫应答, 调节 Th1/Th2 反应的平衡, 并能促进 IgG 型的转化和 sIgA 的分泌[12,13]。CT/LT 是常用的强效粘膜佐剂, 但由于其毒性作用(LT 毒性较 CT 小), 出于安全上的考虑, 全毒素分子不可能为人类最终使用。本实验中 LTB 组取得了与 CT 组相似的免疫效果, 说明 LTB 具有与 CT 同样的粘膜佐剂作用, LTB 亚单位不具毒性, 可以作为用于人体的 Hp 疫苗佐剂成分[14]。

从小鼠免疫应答的情况看来, LTB+rHspA 可以作为口服 HP 疫苗的候选方案。但其对 HP 感染的免疫保护效果, 有待下一步进行攻毒保护实验来验证。

参考文献:

[1] Ferrero R L, Thiberge J M, Kansau I, *et al*. The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protection immunity against mucosal infection in mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(14): 6499.

[2] Ferrero R L, Thiberge J M, Labigne A, *et al*. Local immunoglobulin G antibodies in the stomach may contribute to immunity against *Helicobacter* infection in mice[J]. Gastroenterology, 1997, 113(1): 185—194.

[3] Nedrud J G, Czinn S J, Blanchard T G. H. pylori Vaccines[A]. In: Lee A, Kolesnikow T, eds. *Helicobacter pylori*: A global pathogen. Baillière' Clinical Infectious Disease[M]. London: Baillière, 1998. 413—433.

[4] Blanchard T G, Czinn S J, Nedrud J G. Host response and vaccine development[A]. In: Westblom T U, Czinn S J, Nedrud J G, eds. Curr Top Microbiol Immunol[M]. Berlin: Springer Verlag, 1999. 181—213.

[5] 于长青, 鲁东水, 邹全明. BALB/c 小鼠口服幽门螺杆菌超声粉碎液后的免疫应答[J]. 上海免疫学杂志, 2001, 21(4): 240—242.

[6] 鲁东水, 于长青, 邹全明. 口服幽门螺杆菌苗免疫小鼠后胃粘膜的免疫应答[J]. 免疫学杂志, 2001, 17(2): 107—109.

[7] 毛旭虎, 邹全明, 鲁东水. BALB/c 小鼠口服重组幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位的免疫应答[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(2): 280—284.

[8] Chen W, Shu D, Chadwick V S. *Helicobacter pylori* infection in interleukin-4-deficient and transgenic mice[J]. Scand J Gastroenterol, 1999, 34(10): 987—992.

[9] Smythies L E, Waites K B, Lindsey J R, *et al*. *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice[J]. J Immunol, 2000, 165(2): 1022—1029.

[10] Weltzin R, Guy B, Thomas W D Jr, *et al*. Parenteral adjuvant activities of Escherichia coli heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric *Helicobacter pylori* infection[J]. Infect Immun, 2000, 68(5): 2775—2782.

[11] Lee A, Chen M. Successful immunization against gastric infection with Helicobacter species: use of a cholera toxin B-subunit-whole-cell vaccine [J]. Infect Immun, 1994, 62(8): 3594—3597.

[12] Mattsson A, Lonroth H, Quiding-Jarbrink M, *et al*. Induction of B cell responses in the stomach of *Helicobacter pylori*-infected subjects after oral cholera vaccination[J]. J Clin Invest, 1998, 102(1): 51—56.

[13] Katz J M, Lu X, Young S A, *et al*. Adjuvant activity of the heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli* for oral administration of inactivated influenza virus vaccine[J]. J Infect Dis, 1997, 175(2): 352—356.

[14] Nashar T O, Amin T, Marcello A, *et al*. Current progress in the development of the B subunits of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as carriers for the oral delivery of heterologous antigens and epitopes[J]. Vaccine, 1993, 11(2): 235—240.

(编辑　张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net