DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.020
第25卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 10
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

文章编号:1000-5404(2003)10-0887-03

论著

重组人幽门螺杆菌尿素酶B亚单位的免疫学性质研究

鲁东水,毛旭虎,邹全明,吴 超,张卫军 (第三军医大学医学检验系临床微生物学与免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 分析重组幽门螺杆菌尿素酶B亚单位的免疫学性质。方法 重组尿素酶B亚单位注射免疫BALB/c小鼠、家兔,双向琼脂扩散、ELISA、免疫印迹分析特异抗体的产生及性质。结果 重组尿素酶B亚单位能有效刺激机体的免疫应答,且产生的抗体能与天然幽门螺杆菌发生抗原抗体反应。结论 重组尿素酶B亚单位表现出天然幽门螺杆菌尿素酶B亚单位的免疫学性质,提示可作为幽门螺杆菌特异性抗体检测的包被抗原及幽门螺杆菌疫苗的有效成分。

关键词:幽门螺杆菌;尿素酶B亚单位;基因重组;免疫学性质
中图法分类号:R377;R392.2;R394.3 文献标识码:A

Immunological characters of recombinant urease B subunit of *Helicobacter pylori*

LU Dong-shui, MAO Xu-hu, ZOU Quan-ming, WU Chao, ZHANG Wei-jun (Department of Clinical Microbiology and Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To determine the immunological characters of recombinant urease B subunit (rUreB) of *H. pylori*. Methods BALB/c mice and rabbits were immunized with rUreB. The specific antibodies to UreB were analyzed by agarose diffusion, ELISA and Western-blot. Results The recombinant UreB could stimulate the immune response *in vivo*, and the specific antibodies could also react with UreB of *H. pylori*. Conclusion The recombinant UreB has the similar immunological characters with native UreB of *H. pylori*, suggesting that it could be used as the component of vaccine against *H. pylori* and as the coated antigen for the detection of the specific antibodies to UreB of *H. pylori*.

Key words: *H. pylori*; urease B subunit; recombinant; immunological character

已知人幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)与慢性胃炎、胃溃疡及胃癌等密切相关,诊断及使用预防制品控制其感染具有重要意义[1~3]。幽门螺杆菌尿素酶B亚单位(Urease B subunit, UreB)为Hp重要保护性抗原,本室采用基因工程技术已将其在大肠杆菌中获得了高效表达。本实验将对其主要免疫学性质进行分析,为应用研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 BALB/c小鼠1只,健康雌性,6~8周龄,体质量20~25 g,由本校实验动物中心提供;实验家兔,由本校实验动物中心提供。

1.1.2 菌株 Hp SS1株由第一军医大学南方医院消化病研究所提供,Hp ATCC11637、Hp ATCC11639株由中国预防科学院微生物与流行病学研究所提供,Hp 98037、Hp 98036、Hp 98016、Hp 98027为本室从临床胃炎、胃溃疡患者胃粘膜组织中分离鉴定保种。

1.1.3 主要试剂 ①不完全福氏佐剂(IFA):羊毛脂:液状石蜡=1:5。②完全福氏佐剂(CFA):每ml IFA中加1.0 mg卡介苗。③重组UreB(rUreB):蛋白质浓度为1.0 mg/ml。④其它均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 BALB/c小鼠的免疫 0.2 ml rUreB(200 μg)与等量CFA充分乳化后腹腔或皮下多点注射,以后每间隔2周以同样剂量抗原加等量IFA同法注射,加强免疫共2~3次,最后以无佐剂抗原0.1 ml(100 μg)静脉缓慢注射再加强免疫1次。2周眼眶后采血,ELISA测定抗体滴度。

1.2.2 家兔的免疫 1.0 ml rUreB(1 mg)与等体积CFA充分乳化后于家兔背部皮下、足垫多点注射,间隔1周后以同样剂量抗原加等体积IFA充分乳化后同法加强免疫,重复2~3次,最后以1.0 ml无佐剂rUreB再加强免疫1次。从第4周开始试血,双向免疫扩散效价达1:16以上时,从心脏采血,分离血清,Western-blot分析其免疫原性。

1.2.3 双向琼脂免疫扩散试验 按文献[4]进行。1.5%琼脂熔化,倾倒于玻片上,待凝固后,梅花型打孔,中间孔加入rUreB,周围加入不同稀释倍数的抗血清,在0.9% NaCl的湿盒中,37 ℃放置过夜,第2天观察沉淀线。

1.2.4 ELISA 分别以rUreB及不同Hp菌株超声上清按5 μg/ml的浓度包被酶标板,0.1 ml/孔,4 ℃过夜,2% BSA 37 ℃封闭2 h;PBS-Tween 20洗3次,分别加入1:100、500、1 000、2 000、4 000、8 000

作者简介:鲁东水(1963—),男,江西省余干县人,实验师,主要从事幽门螺杆菌疫苗方面的研究。电话:(023)68752315
通信作者:邹全明,电话:(023)68752316
收稿日期:2002-06-28;修回日期:2002-12-25

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

不同稀释比例的抗血清，37 ℃ 30 min，PBS-Tween 20洗3次，加入HRP标记的羊抗鼠IgG（1∶20 000工作浓度），37 ℃放置min，PBS-Tween20洗5次，加入OPD底物显色液，室温反应10 min，2 mol/L H_2SO_4终止反应，未免疫鼠血清作对照，测定各孔A_{492}。

1.2.5 Western-blot 不同Hp菌株及重组的工程菌pET-11c-ureB/BL21(DE3)、rUreB SDS-PAGE后，电转移至NC膜上，以免疫的兔血清作一抗，羊抗兔IgG作为二抗，DAB显色。

2 结果

2.1 rUreB免疫BALB/c小鼠后的血清抗体性质

rUreB免疫BALB/c小鼠血清不同的稀释度分别与不同Hp菌株及rUreB包被抗原进行ELISA，结果如表1。

结果表明：rUreB注射免疫BALB/c小鼠后，机体可产生高水平的rUreB特异的IgG抗体（效价最低在1∶2 000以上），此抗体能与不同Hp菌株产生免疫反应，证明rUreB具有良好的免疫原性及免疫反应性。

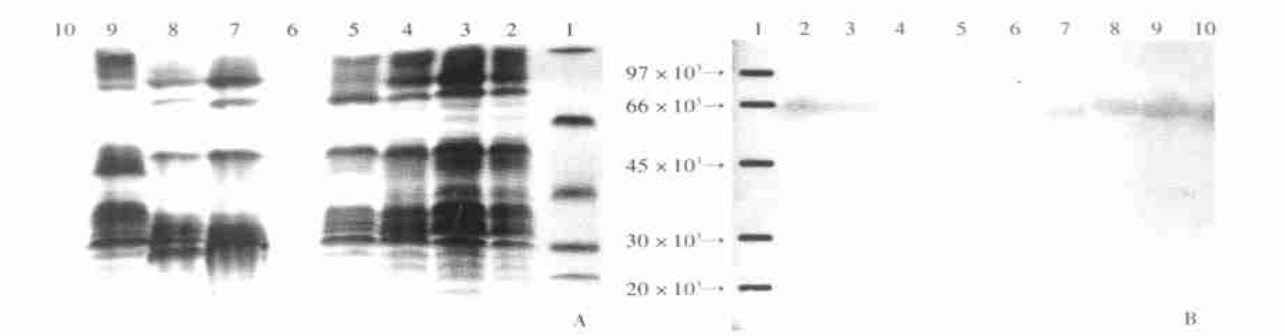
2.2 rUreB免疫家兔后的血清抗体性质

rUreB背部皮下及腹腔注射免疫家兔，双向琼脂糖免疫扩散抗血清效价达1∶32，以此抗血清对不同Hp菌株、重组的工程菌及rUreB进行免疫印迹，结果如图1。在MW约62×10^3蛋白质（rUreB位置）均出现了特异的免疫印迹带，而未免疫血清则未见到特异的免疫印迹带。结果表明：①rUreB注射免疫家兔可产生其特异的IgG抗体，从家兔的免疫实验中进一步证实了rUreB具有良好的免疫原性；②rUreB具有与天然Hp菌株中UreB相同的免疫学性质。

表1 BALB/c小鼠血清rUreB特异的抗体滴度检测

Tab 1 Changes of the antibody against rUreB in serum of BALB/C

Coated antigen	1∶100	1∶500	1∶1 000	1∶2 000	1∶4 000	1∶8 000	Negative serum control
HpSS1	＞4.0	2.227	1.042	0.480	0.255	0.191	0.173
HpATCC11637	＞4.0	2.548	1.152	0.522	0.239	0.203	0.166
HpATCC11639	＞4.0	2.568	1.371	0.606	0.263	0.187	0.156
Hp98037	＞4.0	2.397	1.430	0.601	0.236	0.210	0.179
Hp98036	＞4.0	1.835	1.014	0.547	0.211	0.175	0.180
Hp98027	＞4.0	1.943	1.015	0.574	0.242	0.192	0.186
Hp98016	＞4.0	2.356	1.163	0.549	0.249	0.196	0.168
rUreB	＞4.0	3.562	2.148	1.140	0.574	0.320	0.124



A: SDS-PAGE; B: Western blot; 1: Protein molecular weight marker; 2: HpSS1; 3: HpATCC11637; 4: HpATCC11639; 5: Hp98037; 6: Hp98036; 7: Hp98016; 8: Hp98027; 9: Recombint *E. coli* expressing UreB; 10: rUreB

图1 rUreB的免疫印迹分析

Fig 1 Western blot analysis of rUreB

3 讨论

已有证据表明：幽门螺杆菌的免疫接种具有保护性，幽门螺杆菌疫苗对预防和控制幽门螺杆菌感染具有十分重要的意义[1~3]。

尿素酶是幽门螺杆菌的外膜蛋白，约占菌体总蛋白的5%。尿素酶不仅是幽门螺杆菌的重要致病因子，在造成机体损伤方面具有重要作用；它还具有很强的抗原性，是幽门螺杆菌强有力的免疫原：幽门螺杆菌感染者与未感染者或感染前相比，血清尿素酶IgG、IgA抗体水平均明显增加[5]。近年来，许多学者正致力于将尿素酶作为疫苗的应用研究，以预防幽门螺杆菌感染的可能性。

尿素酶由A和B两种亚单位组成。其亚单位成分不具酶活性，可避免尿素酶本身对机体的直接毒性作用，又同样能有效诱导机体的免疫保护作用，特别是其B亚单位作用更为明显[6]。

本室采用PCR从我国临床分离的Hp菌株中克隆了ureB基因，并在大肠杆菌中获得了高效表达。SDS-PAGE及HPLC-MS测定rUreB的MW约62×10^3，N端15个氨基酸测序、氨基酸组成成分分析与理论预测值一致。推测rUreB可能具有与天然Hp中UreB相同的生物学性质[7]。

良好的免疫原性是疫苗抗原的基本要件。我们以rUreB注射免疫BALB/c小鼠和家兔，ELISA和Western-blot均证实其能刺激机体产生抗原特异的抗体，表现出良好的免疫原性。同时，产生的抗体能与不同的天然Hp菌UreB蛋白发生抗原抗体反应。结果表明此rUreB具有与天然Hp菌中UreB相同的免疫学性质，这就为rUreB作为Hp特异性抗体检测的研究奠定了免

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

疫学的基础。本室正进一步地观察其免疫动物的保护作用。

参考文献：

[1] Feldman R A, Eccersley A J, Hardie J M. Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio[J]. Br Med Bull, 1998, 54(1): 39—53.
[2] 范工学, 夏华向. 幽门螺杆菌感染——基础与临床[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997. 38—47.
[3] 胡伏莲, 周殿元, 贾博琦. 幽门螺杆菌感染的基础与临床[M]. 北京: 中国科学出版社, 1997. 173—238.
[4] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 73—77.
[5] Czinn S J, Nedrud J G. Oral immunization against *Helicobacter pylori*[J]. Infect Immun, 1991, 59(7): 2359—2363.
[6] Corthesy-Theulaz I, Porta N, Glauser M, *et al*. Oral immunization with *Helicobacter pylori* urease B subunit as a treatment against Helicobacter infection in mice[J]. Gastroenterology, 1995, 109(1): 115—121.
[7] 毛旭虎, 鲁东水, 郭 红, 等. 大肠杆菌表达人幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位跨膜区成分[J]. 免疫学杂志, 2001, 2(17): 94—96.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2003)10-0889-01

个案与短篇

前列腺增生并发膀胱大出血治疗分析

Analysis of the treatment of prostatic hyperplasia combined with bladder hematorrhea

张建华, 杨术明, 张玉红, 赵 涛 （重庆市涪陵中心医院泌尿外科, 涪陵 408000）

我院 1985—2001 年收治前列腺增生病人 787 例, 其中并发膀胱大出血患者 21 例, 现总结这 21 例患者的治疗经验并结合文献, 报告如下。

1 临床资料

一般资料：本组 21 例, 年龄 56～78 岁, 平均年 68.4 岁, 病程 1～5 年, 直肠指诊前列腺Ⅱ度～Ⅲ度增生。

诊断标准：全组病人就诊时均有膀胱区胀痛、头昏、恶心, 呈失血貌, 皮肤湿冷、四肢厥冷, 呈早期休克状。查体：脉搏细速 110～122 次/min, BP(8～12)/(6～7) kPa; 下腹膀胱区压痛, 叩诊浊音, 血红蛋白 64～98 g/L, B 超示膀胱内积大量血块。肛指诊前列腺Ⅱ度～Ⅲ度大小。

治疗方法和疗效：本组 21 例均在纠正失血性休克的同时, 急诊手术。第一阶段 A 组 9 例行耻骨上经膀胱前列腺摘除术, 术中清除血块 965～1 330 g, 可见覆盖于已突入膀胱内的前列腺组织表面粘膜有多处弥漫性静脉破裂出血。9 例病人术中输血 600～1 200 ml, 均安全度过危险。术后恢复尚好, 平均住院 28 d, 随访半年以上均排尿通畅。B 组 12 例行 TURP 术中引出血块 670～1 050 g。取膀胱截石位, 置入 storz 电切镜, 冲洗膀胱后, 观察前列腺增生情况及后尿道长度, 先用气化电极对前列腺出血处进行气化, 然后再行 5～7 点处电切, 长度取膀胱颈至精阜处, 电切深度达包膜层, 并将两侧叶坍塌的前列腺组织作大部分切除, 最后作前列腺尖部切除。术中输血 300～600 ml, 平均手术时间控制在 1 h 以内[2]。术后均恢复良好, 平均住院 11 d, 仍随访半年以上, 排尿通畅。

全组无死亡病例。A 组：1 例术后尿失禁, 经提肛训练 3 周恢复, 2 例术后前列腺窝感染, 经抗感染治疗 1 个月余后恢复。B 组未发生术中大出血及水中毒, 未发生膀胱或前列腺穿孔、尿失禁等并发症。

2 讨论

前列腺增生合并血尿是前列腺增生症常见症状之一, 前列腺增生后, 覆盖于前列腺粘膜的毛细血管充血, 小静脉曲张, 前列腺部尿道及膀胱颈粘膜下血管多受到体积增大的腺体的牵扯, 当膀胱用力收缩时即可能破裂出血。前列腺增生所导致的血尿大体可分为以下 3 种。① 自发性血尿：多系前列腺增生症, 膀胱颈及前列腺部炎症所致, 由于充血状态或排尿压迫所引起, 但必须注意有无膀胱肿瘤或并发膀胱结石的可能。② 医源性血尿：导尿或器械检查对每一个患者均可能引起血尿。前列腺增生患者尿潴留时常规导尿往往较为困难。临床上常用导丝或金属尿探导尿, 即使是在操作中加强注意也难以避免。医源性血尿系由于导尿过程中应用暴力损伤前列腺部尿道而引起血尿。这种情况下, 除引起剧烈的血尿外, 常可能导致严重的尿路感染。③ 空腔性血尿：多发生于高度扩张的膀胱被导尿突然排空之后。这种血尿的发生主要是膀胱突然排空后, 膀胱壁内长期被压迫的、曲张的, 变了性的血管因产生反应性充血而发生破裂, 引起出血。

关于前列腺增生并发大出血诊断并不困难。前列腺增生的患者, 突然出现严重的血尿, 或尿中混有大量血块, 或血尿后尿潴留, 或留置的导尿管、造瘘管被大量血块阻塞, 或插管导尿时仅能引流出少许血尿, 或根本无尿液引流出(因导尿管插入血凝块之中), 同时出现头昏、恶心、膀胱区胀痛、有强烈的尿意感、便意感、膀胱区压痛、叩诊浊音、并伴明显的急性失血或休克者, 结合实验室血红蛋白的检查明显低下, B 超示膀胱内积

（下转 894 页）

作者简介：张建华(1957—), 男, 重庆市人, 副主任医师, 主要从事泌尿外科方面的研究, 发表论文 6 篇。电话：(023)72234242

收稿日期：2002-11-18; 修回日期：2003-05-06

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