DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.030
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

文章编号:1000-5404(2002)08-0941-03

论著

幽门螺杆菌超声处理菌液口服免疫BALB/c小鼠的实验研究

于长青,邹全明,王缚鲲,张卫军,曾 浩 (第三军医大学医学检验系临床微生物及免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 从细胞和分子水平探讨小鼠口服免疫幽门螺杆菌超声处理菌液后的粘膜免疫应答。方法 Hp菌超声上清和粘膜佐剂大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)口服免疫小鼠,ELISPOT分析胃粘膜、派伊尔结(Payer's patch PP)抗原特异性抗体分泌细胞(ASC)、RT-PCR分析肠粘膜免疫主要诱导部位PP T细胞因子mRNA表达水平。结果 ①结合佐剂口服免疫可诱导胃粘膜、PP大量抗原特异性抗体分泌细胞(ASC),尤以sIgA-ASC型居多。②单纯抗原免疫小鼠PP T细胞,早期高表达IL-4,晚期高表达IFN-γ。③抗原+LT免疫小鼠PP T细胞,早期高表达IFN-γ,晚期高表达IL-4。结论 单纯抗原口服免疫诱导的抗体分泌细胞数量尤其是sIgA型明显低于联合应用佐剂组,PP体外抗原刺激后先表现为Th_2型优势应答,后转为Th_1型优势应答,而结合LT免疫,PP则先表现为Th_1型优势应答,后转为Th_2型优势应答。

关键词:幽门螺杆菌;口服免疫;抗体分泌细胞;Th_1/Th_2细胞
中图法分类号:R377;R392.12 文献标识码:A

Immune responses of BALB/c mice immunized by oral administration of *Helicobacter pylori* sonicates

YU Chang-qing, ZOU Quang-ming, WANG Fu-kun, ZHANG Wei-jun, ZENG Hao (Department of Clinical Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the mucosal immune responses of mice induced by oral administration of *Helicobacter pyloni* (Hp) sonicates. Methods After BALB/c mice were orally immunized with Hp sonicates and *E. coli* heat-labile enterotoxin (LT) as mucosal adjuvant the antibody secreting cells (ASC) in their gastric mucosa and Payer's patch (PP) were assayed by enzyme-link immunospots (ELISPOT), and the expressions of T cell cytokines mRNA in PP were detected with RT-PCR. Results (1) Oral immunization induced significant Hp-specific antibody-secreting cells in gastric mucosa and PP. (2) Hp antigen caused early higher expression of IL-4, and late higher expression of IFN-γ in T cells of PP in mice immunized with antigen alone. (3) Conversely, the mice treated with Hp sonicates+LT showed early higher expression of IFN-γ, and late higher expression of IL-4 in T cells of PP. Conclusion Immunization with Hp sonicates+LT can induce Hp-specific mucosal immune responses and early preponderant activation of Th_1 cells and late preponderant activation of Th_2 cells in inductive sites, such as PP, of the intestinal mucosal immune system.

Key words: Helicobacter pylori; oral immunization; antibody-secreting cells; Th_1/Th_2 cells

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是慢性胃炎、消化性溃疡的主要病原菌,并且与胃粘膜相关淋巴组织淋巴瘤和胃癌发生发展密切相关。目前的三联药物治疗,因耐药菌株的不断增多及费用的昂贵,在应用中存在局限性。治疗性疫苗替代药物预防、治疗Hp感染,已成为近年来的研究热点[1]。本实验将采用Hp超声处理菌液结合粘膜佐剂大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)口服免疫BALB/c小鼠,从细胞和分子水平分析小鼠口服免疫后,PP与胃粘膜的抗体分泌细胞及PP T细胞亚群细胞因子变化,探讨肠粘膜免疫应答机制,为研制Hp口服疫苗提供实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性SPF级BALB/c小鼠,6~8周龄,体重18~25 g,由本校实验动物中心提供。

1.2 菌株

Hp971023、Hp980706、Hp98016分离自十二指肠溃疡患者,由本室鉴定保存。

1.3 试剂

大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)、明胶、四甲基联苯胺(TMB)、Percoll分离液(Sigma公司),RPMI1640细胞培养液、细胞培养板(Gibco),辣根过氧化物酶标记IgG、IgA(深圳晶美),Tripure RNA抽提试剂盒、RT-PCR试剂盒(Promega)。

1.4 抗原制备

Hp选择血平板(本室自制)微需氧培养48~72 h,0.15 mol/L PBS(pH 7.4)洗3次,5 000 r/min×10 min 4 ℃,混合收集3株Hp菌,加0.15 mol/L PBS(pH 7.4)、EDTA 0.65 mg/ml、苯甲基磺酰氟1 mmol/L,200 W×30 s超声7次,12 000 r/min×20 min 4 ℃离心收集上清,Folin-酚法测定蛋白浓度。

1.5 小鼠免疫方案

30只随机分为3组,每组10只,分别为Hp超声上清抗原组(1 mg)Hp超声上清抗原(1 mg)+LT(10 μg)组、PBS对照组。小鼠免疫前禁食、水12 h,0.25 ml胃酸中和液(Hank's+7.5% $NaHCO_3$)中和胃酸,30 min后免疫(共4次),间隔7 d。

基金项目:国家"九五"重点攻关项目(96-901-01-54);全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(98D004)
作者简介:于长青(1971-),男,河南省南阳市人,硕士,讲师,主要从事细胞与分子免疫学方面的研究,现在附属大坪医院野战外科研究所高血压内分泌科,电话:(023)68757443
收稿日期:2001-07-13;修回日期:2002-01-14

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

1.6 胃粘膜、PP 抗体分泌细胞(ASC)检测

ASC 检测参考文献[2,3]进行:①末次免疫 5 d 后分离胃粘膜、派伊尔小结细胞,70% Percoll 分层液和尼龙棉柱分离 B 淋巴细胞,2%台盼蓝染色,活细胞计数≥95%方可用于 ASC 检测。②酶联免疫斑点(Enzyme-link immunospots ELISPOT)法检测胃粘膜、PP IgG、IgA-ASC:Hp 超声上清 Ag(50 μg/ml)溶于 0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液中,每孔加入 0.2 ml,4 ℃过夜包被,弃包被液,PBS-Tween20 洗 3 次,每孔 100 μl 2% BSA,37 ℃封闭 1 h,RPMI1 640 培养液洗 1 次,各孔加入 0.1 ml 1×10^5/ml 的细胞悬液,每种细胞设 4 个复孔,同时设以下对照:以包被液为无抗原对照;以细胞培养液为无细胞对照;以 PBS-Tween20 为无二抗对照。二氧化碳孵箱培养 10% CO_2 4 h 后,PBS-Tween20 洗 3 次,加入 100 μl 辣根过氧化物酶标记抗鼠抗体 sIgA(1∶1 500)、IgG(1∶2 000),37 ℃,孵育 4 h,PBS-Tween 20 洗 3 次,加入明胶-TMB-H_2O_2 混合物(明胶= 7.5%,TMB= 1 mg/ml,H_2O_2= 0.03%)100 μl,冰水浴使迅速凝固,10~30 min 后,倒置显微镜下观察,蓝色斑点为阳性细胞。计数 200 个细胞中阳性细胞,ASC 相对数量= 阳性细胞数/200× 10^4。

1.7 RT-PCR 分析 IFN-γ、IL-4 mRNA 表达水平

各免疫组小鼠 PP T 细胞的分离及抗原特异性诱导增殖实验参照文献[4]进行。简言之,机械研磨免疫小鼠肠粘膜派伊尔小结,70% Percoll 分层液和尼龙棉柱分离 T 淋巴细胞,2%台盼蓝染色证实活细胞计数≥95%、α-醋酸萘酯染色细胞纯度≥97%。分离的 T 细胞(1× 10^6/ml)加入 20 ml 细胞培养瓶,同时加 Hp 抗原刺激(终浓度 100 μg/ml),分别提取抗原刺激 0、1、3、6 d 时 T 细胞总 RNA,RT-PCR 法分析抗原刺激 0、1、3、6 d T 细胞 IFN-γ、IL-4、β-actin(内参)mRNA 表达水平。各引物序列如表 1。Tripure 一步法提取 T 细胞总 RNA,加入 Oligod(T)15、AMV 反转录酶(Promega)反转录,TaqDNA 多聚酶进行 PCR,扩增参数为 94 ℃ 1 min、58 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min 32 cycles,72 ℃ 5 min,2%琼脂糖凝胶电泳,UVP 紫外凝胶分析仪扫描分析扩增产物的 V 值。

表 1 RT-PCR 扩增产物的引物序列

Tab 1 Oligonucleotide sequences of 5′ and 3′ primers for RT-PCR

mRNA species	5′ primers	3′ primers	Size of PCR pruducts(bp)
β-actin′	5′-TGG AAT CCC TG G CATCCATGAAAC-3′	5′-TAA AAC GCA GCT CA GTAACAGTCCG-3′	349 bp
IFN-γ	5′-GGC TGT TTC T GG CTG TTA CTG C-3′	5′-CGC TTA TGT TG T TGC TGA TGG-3′	233 bp
IL-4	5′-GGC ACA GAG C TA TTG ATG GG-3′	5′-CTC TGT GGT GTT CTT CGT TGC-3′	227 bp

1.8 统计学处理

数据处理采用 t 检验。

2 结果

2.1 胃粘膜、PP 抗原特异性 sIgA-ASC、IgG-ASC 变化

小鼠口服免疫后,胃粘膜、PP 均诱导抗原特异性抗体分泌细胞,Ag+LT 免疫组 ASC 数量明显多于单纯 Ag 免疫组和对照组($P<0.05$),并且诱导的 ASC 类型以 sIgA-ASC 为主,诱导部位以 PP 为主。PBS 免疫组胃粘膜、PP 中 ASC 数量稀少,阳性细胞可能为肠道正常菌群与 Hp 共有的交叉抗原诱导的 ASC。具体结果见表 2、图 1。

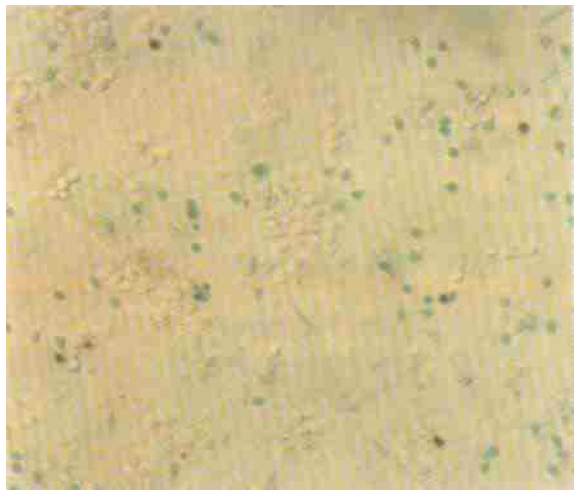


图 1 PP IgA-ASC 阳性细胞 (Elispot× 250)

Fig 1 Positive IgA-ASC in PP (Elispot× 250)

表 2 Hp 超声上清抗原口服免疫小鼠 4 次后胃肠抗原特异性抗体分泌细胞的变化(n= 10,$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of antigen specific antibody secreting cell in gastric mucosa and PP after oral immunization with Hp sonicates for 4 times(n= 10,$\bar{x}\pm s$)

Group	PP	(1× 10³)	G	(1×10³)
	sIgA	IgG	sIgA	IgG
PBS	0.082±0.036	0.074±0.046	0.069±0.024	0.063±0.033
Ag	0.457±0.262 *	0.433±0.182 *	0.126±0.066	0.148±0.050
Ag+LT	2.542±1.410 **	1.758±1.262 **	0.438±1.000 **	0.412±0.258 *

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

2.2 PP T 细胞细胞因子 mRNA 动态表达

以β-actin 的表达水平作为对照,体外抗原刺激不同时期 β-actin、IFN-γ、IL-4mRNA 表达水平如表 3、4。以抗原刺激 0 d 时,RT-PCR 产物扫描光密度值 V_0 为 100%,抗原刺激不同时期 IFN-γ 和 IL-4mRNA 表达水平以 $Rx= Vx/V_0$ 表示。结果表明,抗原+LT 免疫组 PP T 细胞体外抗原刺激后,1 d 时可见 IFN-γ-mRNA 表达水平增高,3 d 时达高峰,增高 22.95 倍,6 d 时,IFN-γ 表达则降至较低水平,为 3.24 倍。IL-4 则随刺激时间延长,表达水平逐渐增高,在 6 d 时表达量增至 32.47 倍。而单纯抗原免疫组,IFN-γ-mRNA 表达水平随刺激时间增加表达逐渐增强,IL-4 则随刺激时间延长,表达水平逐渐减弱。PBS 对照组,PP T 细胞抗原刺激前后,β-actin、IFN-γ and IL-4 mRNA 表达水平均无明显变化。

表 3 Ag+LT 免疫组小鼠 PP T 细胞 IFN-γ 和 IL-4 mRNA 表达水平

Tab 3 Expression of IFN-γ and IL-4 mRNA in PP T cells of mice stimulated by Hp sonicates in Ag+LT immunization group

Time	β-actin	IFN-γ	IL-4
D0	100	100	100
D1	104	483	346
D3	124	2295	877
D6	117	324	3247

$Rx= Vx/V_0$, $Vx= f(OD)x$, $V_0= f(OD)_0= 100\%$

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

表 4　Ag 免疫组小鼠 PP T 细胞 IFN-γ 和 IL-4 mRNA 表达水平

Tab 4　Expression of IFN-γ and IL-4 mRNA in PP T cells of mice stimulated by Hp sonicates in Ag immunization group

Time(d)	β-actin	IFN-γ	IL-4
0	100	100	100
1	112	214	688
3	108	453	478
6	116	1688	134

$Rx = Vx / V_0$, $Vx = f(OD)x$, $V_0 = f(OD)_0 = 100\%$

3　讨论

口服蛋白抗原在肠道由 M 细胞摄取, 首先活化 PP 结等肠粘膜相关淋巴组织的 T、B 细胞, 在 IFN-γ、TGF-β、IL-4、IL-5 的刺激下, B 细胞增殖并转化成细胞表面含 IgA、IgG、IgE 等抗原特异性 B 淋巴母细胞, 一部分直接分布肠粘膜固有层, 大部分经肠系膜、血循环返回胃肠道粘膜, 在 IL-2、IL-6 刺激下转化为抗体分泌细胞, 分泌特异抗体, 发挥局部体液免疫反应。本实验 ELISPOT 分析结果表明, 超声上清结合佐剂 LT 口服免疫小鼠后, 胃粘膜、PP 均出现大量特异 IgG-ASC、IgA-ASC, ASC 数量明显多于单纯抗原免疫组和对照组($P < 0.05$), ASC 类型以 IgA-ASC 占优势, 部位以 PP 为主。说明肠粘膜免疫的主要诱导、效应部位为 PP, 并且以 sIgA 型抗体分泌细胞居多, 揭示口服免疫尤其是联合佐剂免疫, 可有效诱导粘膜免疫应答, 产生大量的 sIgA-ASC, 分泌高水平 sIgA, 发挥肠道粘膜局部体液免疫应答作用。

T 细胞根据分泌的细胞因子不同, 可划分为 Th_0、Th_1、Th_2 等功能细胞亚群, Th_1 型细胞主要分泌 IL-2、IFN-γ, 参与细胞介导的免疫应答; Th_2 型细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13, 参与抗体介导的免疫应答; Th_0 亚群则同时具有 Th_1、Th_2 型特点, 在适当条件下分别向 Th_1 或 Th_2 型转化[5,6]。为分析 PP T 细胞亚群在口服免疫应答中的作用和变化特点, 我们分别选择 INF-γ 和 IL-4 分别代表 Th_1 和 Th_2 型应答标志性细胞因子, RT-PCR 分析小鼠口服免疫后 PP IFN-γ、IL-4 mRNA 表达水平。发现结合 LT 免疫组小鼠, PP T 细胞体外抗原刺激后, 先表现为 Th_1 型优势应答, 后逆转为 Th_2 型优势应答; 单纯抗原免疫组, PP T 细胞则先表现为 Th_2 型优势应答, 后转为 Th_1 型优势应答; PBS 对照免疫组, IFN-γ、IL-4 mRNA 表达水平则无明显变化, 表明口服免疫同时诱导了 Th_1 型、Th_2 型免疫应答。抗原免疫组, 早期表现的 Th_2 型应答, 可能与免疫后小鼠产生的肠粘膜体液免疫应答相关, 晚期的 Th_1 型应答可能存在两方面意义。①Th_1 型细胞分泌 IL-2、协同 IL-5 诱导 IgA 合成, 分泌的 IFN-γ 促进 IgG_{2a} 产生, 辅助 Th_2 型细胞增强肠粘膜体液免疫应答。②Th_1 型细胞产生的 IFN-γ 可诱发细胞免疫, 引起机体免疫损伤。LT 作为一种粘膜免疫佐剂, 当其与靶抗原同时口服免疫时, 可明显增强机体对靶抗原的免疫应答, 并选择性诱导抗原特异性 Th_2 型应答, 产生抗靶抗原特异的 IgG(包括 IgG_1、IgG_{2a}、IgG_{2b} 亚型)、IgM、sIgA 抗体, 尤其是 IgG1 和 sIgA, 减少病原体在胃肠粘膜表面的生存, 发挥局部体液免疫应答作用[7]。因此未来 Hp 疫苗研制, 选择理想的免疫原及粘膜佐剂, 尤其是选择性诱导 Th_2 型应答的佐剂, 方能有效提高疫苗效力, 发挥抗 Hp 感染作用。

参考文献:

[1] Blanchard T G, Czinn S J, Nedrud J G, *et al*. Host response and vaccine development to Helicobacter pylori infection[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1999, 24(1): 181－194.

[2] Hideki A, Yuji I, Chikara A, *et al*. Characterization of mouse nasal lymphocytes isolated by enzymatic extraction with collagenase[J]. J Immunol Methods, 1995, 187(1): 41－51.

[3] 赖燕来, 高杰英. 用 BA-ELISA 斑点法检测痢疾杆窥免疫小鼠中的特异抗体分泌细胞(ASC)[J]. 中国免疫学杂志, 1995, 11(2): 280－282

[4] 张亚东, 高杰英, 彭　红, 等. Th_1 和 Th_2 细胞在痢疾疫苗诱导小鼠产生粘膜免疫应答中的调节作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1999, 19(8): 512－515.

[5] Seifarth C, Deusch K, Reich K, *et al*. Local cellular immune response in Helicobacter pylori associated type B gastritis-selective increase of $CD4^+$ but not gamma delta T-cells in the immune response to H. pylori antigens[J]. Z Gastroenterol, 1996, 34(4): 215－224.

[6] 王静波, 杨秋霞, 孟德润. 辅助性细胞亚群的分化调节[J]. 国外医学免疫学分册, 1999, 22(2): 206－210.

[7] Marchetti M, Rossi M, Giannelli V. *et al*. Protection against Helicobacter pylori infection in mice by intragastric vaccination with Helicobacter pylori antigens is achieved using a non-toxic mutant of *E. coli* heat labile enterotoxin (LT) as adjuvant[J]. Vaccine, 1998, 16(1): 33－37.

(编辑　郭建秀)

(上接 940 页)

下出血创面直接滴入去甲肾上腺素及凝血酶控制了出血。气管内用创面修复药表皮细胞生长因子—金因肽, 以促进粘膜溃疡的愈合。② 应重视烧伤后肝损害的诊断与治疗, 本例伤后 60d 始出现严重肝损害表现, 其感染来源以输血的可能性较大。此病毒性肝损害和少许残余创面的存在可能是引发本例烧伤恢复期 3 次脓毒血症的诱因, 经积极保肝及抗感染治疗后痊愈。③创面基本愈合后连续 3 次脓毒血症的提示, 创面基本愈合不等于痊愈, 此时病人体质弱, 抵抗力低, 有时局部病灶也会诱发全身感染。

关键词: 重度烧伤; 吸入性损伤; 气胸
中图法分类号: R561.4; R644　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 郑庆亦, 陈锦河, 蔡少甫, 等. 大面积烧伤早期救治的临床研究[J]. 解放军医学杂志, 2001, 26(2): 152－153.

[2] 葛绳德. 我国烧伤休克的回顾与展望[J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(5): 261－264.

[3] 郭振荣, 盛志勇, 高维谊, 等. 休克期切痂有助于控制或减轻感染并发症[J]. 中华外科杂志, 1995, 33(7): 406－408.

(编辑　张　宁)

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