DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.018
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
280 2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)03-0280-03

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

毛旭虎,邹全明,鲁东水,曾玮锟,郭 刚,王毅超,解庆华 (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 评价重组尿素酶B亚单位(rUreB)作为幽门螺杆菌(Hp)口服疫苗成份的效果、探讨Hp的免疫保护机制。方法 采用重组Hp保护性抗原UreB与粘膜免疫佐剂霍乱毒素B亚单位(CTB)共口服免疫BalB/c小鼠,ELISA分析血清、唾液和粪便、胃粘液中IgG、IgA抗体水平,体外培养脾淋巴细胞在Hp刺激下的增殖情况及IL-4、IFN-γ的变化。结果 BalB/c小鼠口服rUreB和CTB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。结论 rUreB可以作为Hp疫苗成分用于Hp感染的预防和治疗。

关键词:重组尿素酶B亚单位;免疫应答;幽门螺杆菌
中图法分类号:R345.6;R377;R392 文献标识码:A

Immune responses of *Helicobacter pylori* in BalB/c mice by oral immunization with subunit B of recombinant urease

MAO Xu-hu, ZOU Quan-ming, LU Dong-shui, ZENG Wei-kun, Guo Gang, WANG Yi-Chao, XIE Qing-hua (Department of Clinical Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the efficiency and immunoprotection mechanism of subunit B of recombinant urease as an oral vaccine against *Helicobacter pylori* in BalBlc mice. Methods Subunit B of recombinant urease was used to orogastrically immunize BalB/c mice combinated with Cholera toxin subnunit B. The specific antibodies for *Helicobacter pylori* IgG and IgA were determined in serum, saliva feces, and gastric juice with ELISA. Proliferation of spleen lymphocytes and the changes of IL-4, IFN-γ in the culture supernant of spleen lymphocytes stimulated by Helicobacter pylori were investigated with ^{3}H-TdR uptaking and ELISA. Results CTB and rUreB taken by BalB/c mice orally stimulated systematic and local immune response, humoral immune response, and cellular immune response. Conclusion The subunit B of recombinant urease can be used as a vaccine to prevent *Helicobacter pylori* infection.

Key words: subunit B of recombinant urease; immune response; *Helicobacter pylori*

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。本实验拟采用重组Hp保护抗原尿素酶B亚单位(Recombinant urease B subunit, rUreB)与粘膜免疫佐剂霍乱毒素B亚单位(Cholera toxin B subunit, CTB)共口服免疫BalB/c小鼠,观察其接种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,为评价rUreB作为Hp口服疫苗成份的效果,探讨Hp的免疫保护机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 免疫原

rUreB(工程菌10L体积发酵,包含体8 mol/L尿素溶解,AKTA-Explorer 100蛋白纯化系统纯化,SDS-PAGE、N-端氨基酸序列及肽图分析、ELISA、免疫印迹证实),免疫剂量为250 μg·只$^{-1}$·次$^{-1}$。

1.2 佐剂

CTB,使用剂量为5 μg·只$^{-1}$·次$^{-1}$。

1.3 动物及分组

BalB/c小鼠,健康雌性,6~8周龄,体重20~25 g,由第三军医大学实验动物中心提供(批号为重动字第310101014号)。将30只小鼠随机分为3组,每组10只。Ⅰ组为PBS对照组,Ⅱ组为rUreB免疫组,Ⅲ组为rUreB加CTB免疫组。

1.4 口服免疫方案

小鼠免疫前12 h禁食、禁水,免疫前30 min灌服0.25 ml胃酸中和液,然后分别Ⅰ组喂服0.25 ml 20 mmol/L PBS(pH 7.4),Ⅱ组喂服0.25 ml rUreB(1.0 mg/ml),Ⅲ组喂服0.25 ml rUreB(1.0 mg/ml)和10 μl CTB(0.5 mg/ml)。共免疫4次,每次间隔1周。末次免疫后10 d分别取血液、唾液、粪便、脾脏、胃粘膜组织标本。

1.5 血清、唾液、粪便提取物、胃粘液Hp及UreB特异的IgG、IgA水平检测

分别用rUreB、Hp超声上清按5 μg/ml包被酶标板,ELISA检测血清、唾液、粪便提取物、胃粘液IgG及IgA。

1.6 淋巴细胞培养上清IL-4、IFN-γ的测定

分离培养过夜的脾淋巴细胞转种于24孔细胞培养板中(1×10^{7}/孔),同时加入50 μg rUreB或50 μg Hp超声上清,对照孔则加入PBS,继续培养2 d后收获培养上清,测定其IL-4、IFN-γ的含量。采用上海森雄公司的双抗体夹心-ABC-ELISA试剂盒,按说明书进行。

基金项目:军队"九五"医药卫生科研基金(98D044);国家"九五"重点科技攻关项目(96-901-01-54)
作者简介:毛旭虎(1969-),男,湖北省天门市人,博士,副教授,主要从事基因工程疫苗和基因诊断方面的研究,发表论文13篇,联系电话:(023)68752315。
收稿日期:2001-06-18;修回日期:2001-10-08

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

1.7 ^{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(1×10^{6}/孔), 同时加入 50 μg rUreB 或 50 μg Hp 超声上清, 对照孔则加入 PBS, 另均加入 1μci ^{3}H-TdR, 继续培养 2 d 后采用多头收集器收集细胞, 0.9% NaCl 洗 3 遍后, 烘干, 加入闪烁液, 猝灭 2 h, 液闪记数仪计数 cpm 值。

1.8 统计学处理

数据结果以($\bar{x}\pm s$)表示, 进行方差分析。

2 结果

2.1 BalB/ c 小鼠口服免疫 rUreB 后血清、唾液、粪便特异的抗体水平

BalB/ c 小鼠最后一次口服免疫 10 d 后, 收集血液、唾液、粪便标本, ELISA 分别检测 Hp 及 rUreB 特异的血清 IgG、唾液和粪便 IgA 反应, 结果见表 1。

表 1　免疫后小鼠血清、唾液、粪便 **Hp** 及 **rUreB** 特异的抗体反应情况($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The specific antibodies to *H. pylori* or rUre B in sera, saliva and fecal($\bar{x}\pm s$)

	Sera IgG(1∶200)		Sativa IgA(1∶4)		Fecal IgA(1∶10)	
	Hp	rUreB	Hp	rUreB	Hp	rUreB
Control(Ⅰ)	0.268±0.086	0.187±0.073	0.172±0.054	0.116±0.023	0.320±0.112	0.219±0.054
rUreB(Ⅱ)	0.777±0.210△	0.654±0.192△	0.355±0.109*	0.305±0.088*	0.498±0.120*	0.371±0.104*
rUreB+CTB(Ⅲ)	1.020±0.357△	0.833±0.226△	0.579±0.175△	0.428±0.115△	0.878±0.286△	0.720±0.268△

*: $P<0.05$, △: $P<0.01$ *vs* Control

2.2 胃粘液特异的抗体反应

采用 ELISA 测定胃粘液中 Hp 及 rUreB 特异的 IgG 及 IgA 反应, 结果见表 2。

表 2　胃粘液特异的抗体反应情况($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The specific antibodies to *H. pylori* or rUreB in gastric juice($\bar{x}\pm s$)

	IgG		IgA	
	Hp	rUreB	Hp	rUreB
Control(Ⅰ)	0.226±0.089	0.168±0.062	0.213±0.077	0.192±0.059
rUreB(Ⅱ)	0.497±0.114△	0.446±0.073△	0.386±0.108*	0.315±0.088*
rUreB+CTB(Ⅲ)	0.605±0.187△	0.543±0.062△	0.626±0.155△	0.567±0.133△

*: $P<0.05$, △: $P<0.01$ *vs* Control

2.3 Hp 及 rUreB 刺激脾淋巴细胞特异的增殖反应

见图 1。

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

分离 BalB/ c 小鼠脾淋巴细胞; 培养 12h 后加入 Hp 超声上清或 rUreB 刺激, 继续培养 2 d 后收集细胞培养上清, 双抗体夹心 ELISA 法测定培养上清 IL-4 及 IFN-γ 的含量, 结果见图 2。

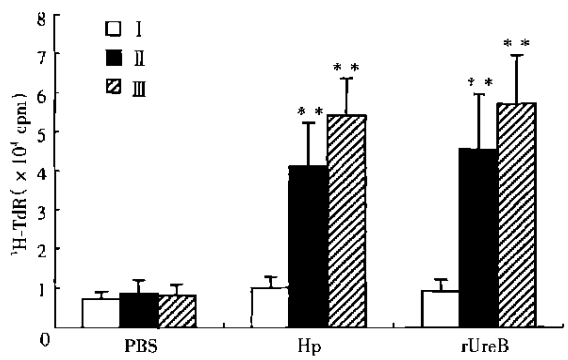
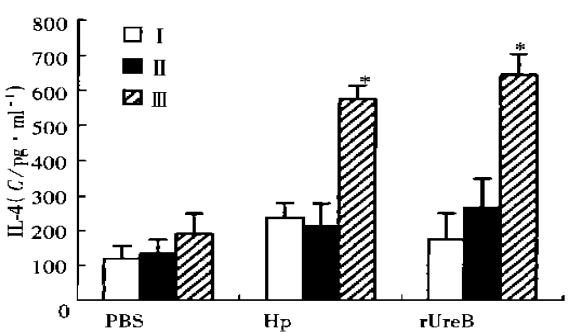


图 1　脾淋巴细胞的增殖反应

Fig 1　Proliferation of spleen lymphocytes stimulated with *H. pylori* or rUreB

**: $P<0.01$



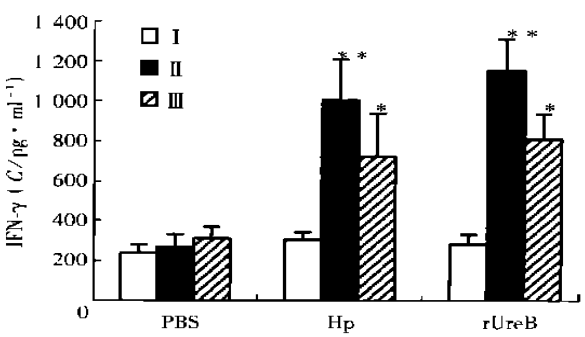


图 2　IL-4、IFN-γ 水平的变化

Fig 2　Changes of IL-4, IFN-γ in the cultured supernant of spleen lymphocytes stimulated with *H. pylori* or rUreB

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

3 讨论

大多数疫苗接种是通过复制病原菌感染所引起的免疫而达到保护作用。而众多资料表明: 人体由 Hp 感染引起的自然免疫不足以预防再感染[1]。动物实验也证明: 猫螺杆菌在小鼠感染所引发的免疫也是不充

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

分的，细菌在感染之后仍将大批生长，而且用抗生素根除了感染的动物仍可被同一株猫螺杆菌感染。所有这些提示 Hp 的疫苗接种所引起的有效保护性免疫反应与 Hp 感染所引起的自然免疫反应应该是不同的。了解其有效的免疫保护机制对发展 Hp 疫苗将起到指导作用。

BalB/c 小鼠口服 rUreB 后，与对照组相比，血清、唾液（粪便）及胃粘膜均产生了针对 Hp 抗原特异的 IgG 和 IgA 反应（$P<0.05$），其中加佐剂组在胃粘液、唾液（粪便）中 IgA 水平明显地较未加佐剂组要高（$P<0.01$）。特别是在胃粘膜组织，IgA 水平的显著增高可能参与了 Hp 的保护免疫作用。IgA 作为一种保护性抗体，目前较为满意的解释是所谓的“免疫排除”作用[2]。是否仅 IgA 在保护免疫中发挥作用呢？Weltzin 等[3]用尿素酶滴鼻免疫小鼠仅 2 次后就发现在缺乏佐剂的情况下，可产生血清 IgA，然而并不产生对抗螺杆菌的免疫保护；相反，使用了 LT 佐剂和尿素酶同时免疫的小鼠虽也只产生较低水平的 IgA，却可产生保护作用。Ferrero 等[4]比较了猫螺杆菌感染和粘膜疫苗免疫小鼠后胃粘膜的抗体分泌浆细胞类型，结果发现：感染小鼠有大量分泌 IgA 的浆细胞，而免疫小鼠则出现了高水平分泌 IgG 的浆细胞；被免疫小鼠可产生保护性免疫，而其分泌型 IgA 直到注射抗原 17 d 后才出现于胃粘膜。由此研究者得出相反的结论；在粘膜疫苗产生的保护性免疫中是 IgG 而非 IgA 的作用。我们在实验中也观察到有无 CTB，rUreB 均能诱导胃粘膜特异 IgG、sIgA 水平的增加，只是程度略有差异。出现接种效果的差异或相反结论的原因，可能与不同的动物模型、不同的接种途径、不同的佐剂等有关，也有研究者解释为是由于 IgA 抗体的性质如亲和力的不同。

体外培养的 rUreB 免疫鼠脾淋巴细胞，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（$P<0.01$）。同时，不加佐剂免疫组分泌 IFN-γ 水平增加（$P<0.01$），IL-4 水平未发现增加；而加佐剂免疫组除 IFN-γ 水平增加外（$P<0.1$），IL-4 水平也发现显著增加（$P<0.01$）。此结果与我室于长青等[5,6]以 Hp 超声上清免疫 BalB/c 小鼠后脾淋巴细胞 IL-4、IFN-γ mRNA水平的变化是一致。IFN-γ 为 Th1 型细胞因子，IL-4为Th2 型细胞因子。rUreB 免疫 BalB/c 小鼠后可激发机体的细胞免疫应答，联合粘膜佐剂能有效调节 Th1/Th2 反应平衡，而 Th1/Th2 反应的平衡可能在 Hp 的免疫保护机制中发挥重要作用[7,8]。

动物模型中观察到，Hp 抗原只有与粘膜佐剂（如 CT/LT 或其 B 亚单位）一起接种时才能诱导机体产生有效的抗螺杆菌免疫。没有佐剂时，经非肠道或虽可诱导 IgG 的产生，但 IgA 极少，更无保护作用[9]。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[10,11]。CT/LT 是常用的强力粘膜佐剂，但由于其毒性作用（相比 LT 毒性稍小），出于安全上的考虑，全毒素分子不可能为最终使用。其 B 亚单位不具毒性，同样具有粘膜佐剂作用，可以作为 Hp 疫苗的佐剂成分。不过有报道重组 CTB/LTB 无佐剂效应，可能与共免疫原的性质、免疫接种的途径等有关。

因此看来，Hp 疫苗的保护性免疫除包括特异的抗体（IgG、IgA）反应外，还存在非抗体依赖的细胞免疫等其它机制；采用 B 细胞缺陷的 μMT 基因敲除小鼠进行实验，发现无论是预防性或治疗性地用 Hp 抗原加 LT 佐剂免疫后都可获得抗螺杆菌的免疫保护效应[12,13]。

参考文献：

[1] 范工学，夏华向，主编. 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. 73－80.

[2] Goto T, Nishizono A, Fujioka T, *et al*. Local secretory immunoglobulin A and postimmunization gastritis correlate with protection against Helicobacter pylori infection after oral vaccination of mice[J]. Infect Immun, 1999, 67(5): 2 531－2 539.

[3] 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): 2 775－2 782.

[4] Ferero R L, Thiberge J M, Labigne A. Local immunoglobulin G antibodies in the stomach may contribute to immunity against Helicobacter infection in mice[J]. Gastroenterology, 1997, 113(1): 185－194.

[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] 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.

[8] 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): 1 022－1 029.

[9] 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): 3 594－3 597.

[10] 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.

[11] Matsuo K, Yoshidawa T, Asanuma H, *et al*. Induction of innate immunity by nasal influenza vaccine administered in combination with an adjuvant (cholera toxin)[J]. Vaccine, 2000, 18(24): 2 713－2 722.

[12] Blanchard T G, Czinn S J, Redline R W, *et al*. Antibody-independent protective mucosal immunity to gastric helicobacter infection in mice[J]. Cell Immunol, 1999, 191(1): 74－80.

[13] Suton P, Wilson J, Kosaka T, *et al*. Therapeutic immunization against Helicobacter pylori infection in the absence of antibodies[J]. Immunol Cell Biol, 2000, 78(1): 28－30.

（编辑 陈聪连）

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