DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.06.036
第24卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 6
2002年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2002

文章编号:1000-5404(2002)06-0713-03

论著

小鼠口服重组 LTB 和 Hp UreB 免疫活性的研究

曾韦锟,郭 刚,刘开云,解庆华,邹全明 (第三军医大学医学检验系临床微生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察重组大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位(rLTB)的粘膜佐剂活性以及重组 Hp 尿素酶 B 亚单位(rUreB)的免疫学活性,为制备安全有效的 Hp 疫苗奠定基础。方法 ELISA 检测 rLTB 的 GM1(神经节苷脂)结合活性,利用本室基因工程重组表达的 rLTB 和 rUreB 口服免疫 BALB/c 小鼠后,在第 4 和/或 5 周 ELISA 方法检测血清 IgG,以及唾液、粪便抽提物、肠粘液 sIgA 水平。采用^{3}H 掺入实验,检测小鼠脾脏淋巴细胞对特异性抗原的增殖反应。结果 ①rLTB 具有 GM1 结合活性。②与不加佐剂的对照比较,加 rLTB 的实验组,能够有效地诱发唾液及肠道 sIgA 的产生。③口服 Hp rUreB 抗原能够刺激小鼠产生特异性的 IgG 和 sIgA。④^{3}HTdR 掺入实验提示加佐剂组较不加佐剂组,脾脏淋巴细胞对特异性抗原的增殖反应更强。⑤不加佐剂组血清 IgG,免疫第 5 周较第 4 周高;加佐剂则是第 4 周比第 5 周高。结论 重组 LTB 具有良好的粘膜佐剂功能;Hp rUreB 具备良好的免疫原性;小鼠口服 rLTB 和 rUreB 后可以产生保护性 sIgA;rLTB 对 Th1/Th2 平衡的调节可能是血清 IgG 合成改变的原因。

关键词:UreB;LTB;HP;免疫应答;免疫佐剂
中图法分类号:R377;R392.11;R392.7 文献标识码:A

Study on immunological activities of adjuvant rLTB and rUreB of Hp after oral administration in mice

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

Abstract Objective To investigate the abilities of recombinant LTB as the mucosal adjuvant and recombinant UreB as immunogen in BALB/c mice after oral administration, which provide a good base for safe and effective vaccine of Hp. Methods The adhesive ability of rLTB to GM1 was determined through ELISA. The levels of IgG in serum and sIgA in saliva, fecal extract and intestine mucus respectively at the 4th and/or 5th week after immunization were detected, and the proliferative rate of the T cell in the spleen after stimulated by the antigen was studied through ^{3}H—TdR cooperation test. Results ①rLTB had the ability to adhere GM1. ② Higher levels of sIgA were observed in saliva and gastrointestinal tract in the group with rLTB than the group without rLTB. ③The specific IgG and sIgA were produced after oral immunization with rUreB. ④The proliferation of T cell in the spleen from the group with rLTB was stronger than the group without rLTB. ⑤ Serum level of IgG at the 5th week was higher than at 4th week in the group without rLTB, and the contrary result was found in the group with rLTB. Conclusion rLTB has effective ability as mucosal adjuvant, and rUreB processes good immunogenicity. Different levels of IgG in the 2 groupsmight be caused by the change of balance of Th1/Th2 regulated by rLTB.

Key words UreB; LTB; immunization; adjuvant

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是寄居在人胃上皮的螺杆状革兰阴性微需氧菌,可引起慢性胃炎、消化性溃疡,并与胃癌和粘膜相关淋巴组织瘤等疾病密切相关。世界卫生组织已经将其列为一类致癌因子[1]。据估计全世界约有 50%以上的人口感染过 Hp。采用疫苗形式有效预防 Hp 相关疾病的发生,具有重大意义。Hp 具有多种保护性抗原,其中尿素酶就是其中重要的一种。目前研究表明 LTB 可以作为有效的免疫佐剂,与抗原共同口服后,能引发机体产生有效的分泌型 IgA。本实验利用本室基因工程重组、纯化的 rLTB 和 rUreB 共同口服免疫 BALB/c 小鼠,观察诱发的免疫应答反应,为进一步疫苗研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物与免疫方法

雌性 BALB/c 小鼠 60 只,6~8 周龄、18~22 g,由第三军医大学实验动物中心提供。将小鼠随机分为 3 组,每组共 20 只。分别为 rUreB 免疫组、rLTB 加 rUreB 免疫组、PBS 对照组。

小鼠免疫前禁食、禁水 12 h,饲喂针经口灌服胃酸中和液 0.3 ml/只,待作用 30 min 后,灌服抗原。rUreB 组为 200 μg rUreB/每只,rLTB 和 rUreB 组为(200 μg rUreB+10 μg rLTB)/只,PBS 对照组灌服 PBS。每次间隔 1 周,共免疫 4 次。

1.2 试剂

rLTB 和 rUreB 为本室基因工程重组并纯化。胃酸中和液:7.5%$NaHCO_3$和 Hanks 液临用前 1∶4 混合。HRP 标记羊抗小鼠 IgA 购自深圳晶美公司。HRP 标记羊抗小鼠 IgG 购自深圳晶美公司。^{3}HTdR 购自中国原子能公司。硝酸毛果芸香碱购自第三军医大学西南医院药局,CTB(霍乱肠毒素 B 亚单位)购自 Sigma

基金项目:国家"九五"重点攻关课题(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:曾韦锟(1974-),男,贵州省贵阳市人,硕士,医师,主要从事病原微生物的检测及预防等方面的研究。电话:(023)68752315
收稿日期:2001-08-25;修回日期:2001-11-17

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

公司，GM1 购自 Sigma 公司。兔抗 CTB 本室自制。HRP 标记羊抗兔 IgG，购自博士德公司。

1.3 标本采集

1.3.1 血液标本的采集 于免疫后第 4 周断尾取血，第 5 周摘眼球采集血液，分离血清后－20 ℃冻存。

1.3.2 唾液标本的采集 于免疫后第 4 周和第 5 周，腹腔注射硝酸毛果芸香碱 40 μl 刺激唾液分泌后，收集唾液，离心后上清－20 ℃冻存。

1.3.3 粪便提取物和肠粘液的采集 于免疫后第 4 周和第 5 周，收集粪便 3 粒，约 100 mg 左右，加入 1 ml 20 mmol/L（含 0.05%NaN_3），剧烈震荡混匀，离心后上清－20 ℃冻存。

于免疫后第 5 周，颈椎脱臼处死小鼠，取靠近回盲段 15 cm 的肠段，平铺于滤纸上，纵向剪开，无菌 PBS（pH 7.4）反复冲洗肠腔表面用载玻片轻刮粘膜表面粘液于 1.5 ml 离心管内，加入 0.5 ml 20 mmol/L PBS 充分混匀，12 000 r/min 离心 10 min，上清－20 ℃冻存。

1.3.4 淋巴细胞的分离 常规方法分离脾脏淋巴细胞。

1.4 ELISA 检测

1.4.1 ELISA 法检测 rLTB 的 GM1 结合活性 4 μg/ml GM1 包被酶标板，常规方法检测。

1.4.2 ELISA 法检测血清特异性 IgG 和唾液、粪便提取物、小肠粘液特异性 IgA 4 μg/ml rUreB 抗原液包被酶标板，常规方法检测。

1.5 ^{3}H-TdR 掺入实验

取分离好的淋巴细胞，常规方法检测。其中抗原刺激量为 50 μg rUreB，每份标本加入 1 μCi ^{3}H-TdR，刺激培养 8 h。

1.6 统计学处理

SPSS 软件进行处理。

2 结果

2.1 ELISA 检测 rLTB 的 GM1 结合活性

检测显示 rLTB 具有同 CTB 相同的与 GM1 结合的生物学活性，见表 1。

表 1 CTB 和 rLTB 的 GM1-ELISA 结果（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Binding abilities of CTB and rLTB to GM1 determined with ELISA（$\bar{x}\pm s$）

Absortence/sample	CTB（7 μg/100 μl）	rLTB（7 μg/100 μl）	Control
OD495	1.861±0.054	1.756±0.068	0.103±0.031

2.2 血清 IgG 水平的变化

单纯 rUreB 口服免疫小鼠，小鼠血清 IgG 水平逐渐升高，rLTB 和 rUreB 共同免疫的小鼠，血清 IgG 水平在第 4 周 OG 值高于单纯 rUreB 口服免疫组，第 5 周出现减低，OD 值低于单纯 rUreB 口服免疫组，见图 1。即 rLTB 和 rUreB 免疫组血清 IgG 水平随时间推移出现了降低。rUreB 组 IgG 与 PBS 对照组比较 $P<0.05$，rLTB 和 rUreB 组 IgG 与 rUreB 组比较 $P<0.05$，见表 2。

2.3 唾液、粪便提取物、肠粘液中 sIgA 水平

无论是 rUreB 口服组还是 rLTB 加 rUreB 免疫组，唾液、粪便提取物及肠粘液中的 sIgA 均明显均高于 PBS 对照组，见表 2。随免疫时间的推移，不同免疫组的唾液、粪便提取物 sIgA 水平均呈现增高的趋势。同一时间段的标本加 LTB 的 sIgA 水平均明显高于不加 LTB 组，见图 2。

2.4 ^{3}H-TdR 掺入试验结果

rLTB、rUreB 共同免疫组和单纯 rUreB 免疫组，在特异性抗原的刺激下，细胞摄入 ^{3}H-TdR 明显增高，增高的趋势 rLTB、rUreB 共同免疫组高于单纯 rUreB 免疫组。rUreB 组与 PBS 对照组比较 $P<0.05$，rLTB 加 rUreB 组与 rUreB 组比较 $P<0.05$，见图 3。

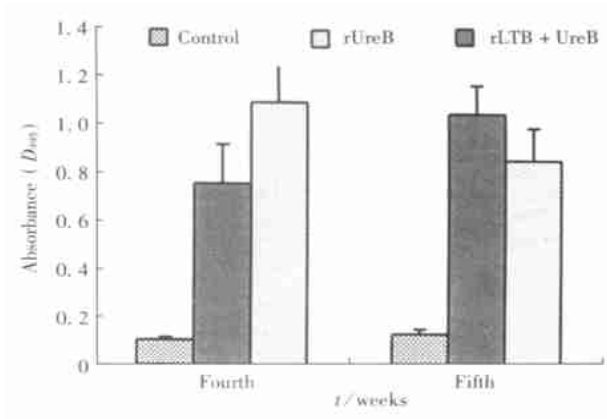
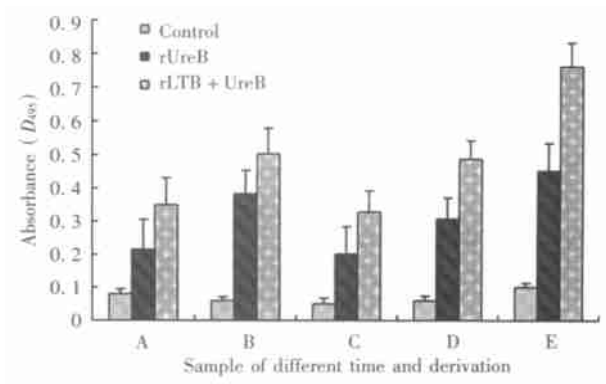


图 1 小鼠口服免疫后血清 IgG 水平的变化

Fig 1 Serum levels of IgG in mice after oral immunization



A: Fourth week（saliva）; B: Fifth week（saliva）; C: Fourth week（fecal extract）; D: Fifth week（fecal extract）; E: Fifth week（intestinal mucus）

图 2 小鼠口服免疫后 sIgA 的变化

Fig 2 Levels of sIgA in mice after oral immunization

表 2 不同组、不同来源标本 sIgA 水平（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Levels of sIgA from different samples in every group（$\bar{x}\pm s$）

Time/group derivation	Control			rUreB group			rLTB＋rUreB group		
	Saliva	Fecal extract	Intestinal mucus	Saliva	Fecal extract	Intestinal mucus	Saliva	Fecal extract	Intestinal mucus
4th week	0.080±0.015	0.050±0.018		0.215±0.09	0.201±0.082		0.350±0.081	0.328±0.064	
5th week	0.060±0.011	0.060±0.014	0.100±0.013	0.383±0.070 *	0.306±0.064 *	0.450±0.083 *	0.502±0.076△	0.486±0.054△	0.760±0.071△

*: $P<0.05$ *vs* control group; △: $P<0.05$ *vs* control group

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

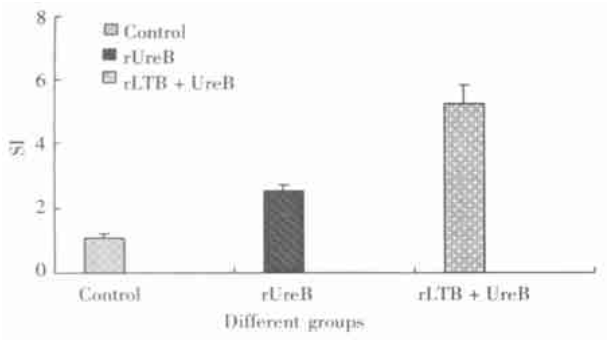


图 3　^{3}H-TdR 掺入实验

Fig 3　^{3}H-TdR cooperation in different groups

3　讨论

Hp 是寄居在人类及其他动物胃部的一种重要的致病菌, 与多种疾病密切相关。疫苗被认为是预防和根除 Hp 的有效方法。在 Hp 的多种保护性抗原中, 根据它们的生物学特性, UreB 被认为是最有前景的保护性抗原之一, 尿素酶不仅是 Hp 定植所必须的, 而且也是 Hp 的毒力因子[2]。在菌体蛋白中尿素酶占 6% ~ 10%[3]。而且它不但存在于菌体内部, 而且有大量的胞外分泌[4]。Hp 尿素酶由 A、B 两个亚单位组成, 其比例为 1∶1。这些都为 Ure 作为有效的免疫原提供了理论依据。粘膜分泌的 sIgA 对 Hp 具有免疫排除作用。单纯的口服给予保护性抗原, 产生的 sIgA 水平较低, T 淋巴细胞反应为 Th1 型为主, 容易造成粘膜组织的损伤[5]。较高的 IgG 结合 Hp 后, 可以产生多种生物学效应, 包括补体的活化, 炎症细胞的定向趋化、浸润等, 这些都可能是 Hp 感染后的病理损伤机制之一。保护性抗原辅以有效的粘膜佐剂如 CT 或 LT, 可以调整 T 细胞的反应模式, 使 Th 细胞亚类以 Th2 型为主, 更高地诱导粘膜 sIgA 的分泌[6]。但是 CT 或 LT 均有毒性, 它们的应用受到限制。通过基因重组的 LTB 既没有毒性, 又能够保留粘膜佐剂的功能, 因而具有广阔的应用价值。

GM1 结合能力在发挥粘膜佐剂功能中起着重要作用, 本实验采用的是本室基因工程合成、并纯化的 rLTB, 通过 GM1-ELISA 证明 rLTB 具有相同的 GM1 结合能力。rLTB 与 rUreB 共同免疫组能够较单独 rUreB 免疫组, 在粘膜相关部位诱导更高的 sIgA。说明我们重组的 LTB 具有较强的粘膜佐剂作用。rUreB 通过口服免疫 BALB/c 小鼠, 能够诱导较强的免疫应答, 证实重组的 UreB 具有良好的免疫原性, 通过基因工程技术可以大量表达 UreB, 为应用于免疫苗奠定了良好的基础。

实验中我们还观察到, 在免疫后的第 4、5 周, 单独 rUreB 免疫组, 血清 IgG 呈现出增高的趋势, 而 rUreB 和 rLTB 共同免疫且则出现了降低。究其原因可能是 LTB 作为粘膜佐剂, 能够调节 Th 细胞亚类的平衡, 引起以 Th2 细胞亚类为主的表现。Th2 类细胞因子是免疫球蛋白亚类转化的重要调节手段, 从而使分泌 IgG 的浆细胞减少, 分泌 IgA 的浆细胞增多。同时单独 UreB 免疫组 IgG 的持续增高, 与通常 Hp 感染时的变化一致, 可能同 Hp 感染引发的免疫损伤相关。当然这些实验结果还需要进一步重复。

参考文献:

[1] International agency for the research on cancer. World health organization schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans[J]. Vol 61 lyon EARC, 1994.

[2] Kunn B E, Cohen H, Blaser M J. Helicobacter pylori[J]. Clinl Microbiol Rev, 1997, 10(4): 720—741.

[3] Hu L T, Mobley H L T. Purification and U-teminal analysis of urease from Helicobacter pylori[J]. Infect Immun, 1990, 58(4): 992—998.

[4] Dunn B E, Vakil N B, Schneider B G, *et al*. Localization or Helicobacter pylori urease and heat shock protein in human gastric biopsies[J]. Infect Immun, 1997, 65(4): 1 181—1 188.

[5] Delios M M, Manghetti M, Decarli M, *et al*. T helper 1 effector cells specific for Helicobacter pylori in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease[J]. J Immun, 1997, 158(2): 962—967.

[6] Saldinger P F, Porta N, Launois P, *et al*. Immunization of BALB/c mice with Helicobacter pylori urease B induces a T helper 2 response absent in Helicobater pylori infection[J]. Gastroenterology, 1998, 115(4): 891—897.

（编辑　陈聪连）

（上接 712 页）

3　讨论

无牙颌并单侧上颌骨缺损, 修复的难点是上颌赝复体固位的问题。如果做成中空托牙, 不仅义齿取戴困难, 阻塞器部分亦难以充分伸展, 不能很好地利用腔洞倒凹固位[3]。要满足取戴方便, 又能充分利用腔洞倒凹固位的条件, 分段阻塞器赝复体就成了必然的选择[4]。

本研究所介绍的方法, 利用弹性塑料做成的塑料扣作为义齿与阻塞器的衔接件, 操作灵活, 连接可靠, 无侧向脱位之忧。由于采用分段阻塞器, 义齿取戴灵活, 而阻塞器取戴次数却可以减少, 减轻了病员的痛苦。尤其让病员满意的是, 无需随时随地戴用上颌义齿, 而只需戴阻塞器, 这样既减少了戴用口腔修复体的不适感, 又不妨碍语言交流, 可以清楚地发音, 喝茶亦无反流。而阻塞器在制作时, 采用了中空式设计, 有效地减轻了重量, 并特意将塑料扣安放在义齿基托上, 使阻塞器表面无突出物, 使其戴用更舒适。作者认为该方法为较成功的颌赝复体修复法。

关键词: 无牙颌伴上颌骨缺损; 分段阻塞器; 修复
中图法分类号: R783.6　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Postsurgical management with maxillary obturators after maxillectomy. Garg AK, Malo M, Dorado LS, Duarte F[J]. Gen Dent, 1998, 46(1): 75—78.

[2] The hollow box maxillary obturator. Blair FM, Hunter NR[J]. Br Dent J, 1998, 184(10): 484—487.

[3] Augmentation of obturator retention by extension into the nasal aperture: a clinical report. Pigno MA, Funk JJ[J]. J Prosthet Dent, 2001, 85(4): 349—351.

[4] Matsumura H, Kawasaki K. Magnetically connected removable sectional denture for a maxillary defect with severe undercut: a clinical report[J]. J Prosthet Dent, 2000, 84(1): 22—26.

（编辑　王　红）

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