

幽门螺杆菌重组蛋白脂质体疫苗免疫 保护作用的动物实验研究*

黄文^{1)**} 李兆申¹⁾ 白杨²⁾ 王继德²⁾ 张亚历²⁾ 周殿元²⁾

¹⁾第二军医大学长海医院消化科, 上海 200433; ²⁾南方医科大学南方医院消化科, 广州 510515)

摘要 探讨幽门螺杆菌重组蛋白脂质体疫苗的免疫预防作用及可能的免疫机制. 用逆向蒸发法制备以卵磷脂和胆固醇为膜组分包裹的重组蛋白和 / 无免疫佐剂的口服疫苗, 并用透射电镜测定其粒径. BALB/c 小鼠分为 6 组, 分别通过灌胃方法给予 PBS、空白脂质体、UreB 重组蛋白+CT、脂质体包裹 UreB 重组蛋白、脂质体包裹 UreB 重组蛋白和 CT、脂质体包裹(UreB + Kat + CT), 每周 1 次共 4 次, 末次攻击 2 周再用活幽门螺杆菌(*Hp*)攻击 3 次, 5 周后处死小鼠, 行胃组织快速尿素酶试验、*Hp* 的定植半定量、炎症程度及其炎症活动度的评分. RT-PCR 检测小鼠脾淋巴细胞中 γ -干扰素 (INF- γ) 和白细胞介素 -4 (IL-4) 表达. 脂质体疫苗电镜下负染, 显示粒径为 $(0.7 \pm 0.2) \mu\text{m}$. PBS 组、空白脂质体组、UreB 重组蛋白+CT 组、脂质体包裹 UreB 重组蛋白组、脂质体包裹 UreB 重组蛋白和 CT 组、脂质体包裹 (UreB + Kat + CT) 组的免疫保护率分别为 0(0/11)、0(0/11)、58.3%(7/12)、54.5%(6/11)、63.6%(7/11)、75.0%(9/12), UreB 重组蛋白+CT 组免疫保护率与脂质体包裹 UreB 重组蛋白组比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 脂质体包裹 UreB 重组蛋白+CT 组免疫保护率与脂质体包裹 (UreB + Kat + CT) 组比较有显著性差异 ($P < 0.05$). 各疫苗组 *Hp* 定植评分均明显低于 PBS 和脂质体对照组 ($P < 0.01$), 且 UreB + Kat 双价疫苗组较三个单价疫苗组比较也有显著性差异 ($P < 0.05$). 疫苗组不仅能降低 *Hp* 的定植, 而且能减轻 *Hp* 造成的小鼠胃黏膜的局部慢性炎症反应 ($P < 0.05$), 但各疫苗组间比较未见显著性差异 ($P > 0.05$). *Hp* 攻击后, 与对照组比较, 各疫苗组脾淋巴细胞 INF- γ mRNA 水平较低 ($P < 0.05$), 而 IL-4 mRNA 水平则较高 ($P < 0.05$), 各疫苗组间比较未见显著性差异 ($P > 0.05$). 研究表明, 在小鼠 *Hp* 感染模型中脂质体能部分代替霍乱毒素的免疫佐剂作用, 在 *Hp* 攻击后, 未经免疫小鼠体内诱导以 Th1 为主应答, 免疫小鼠体内则诱导以 Th2 为主的免疫应答.

关键词 幽门螺杆菌, 尿素酶 B 亚单位, 过氧化氢酶, 疫苗, 脂质体, 免疫应答

学科分类号 Q

自 1982 年澳大利亚学者 Warren 和 Marshall 首先从人胃黏膜中培养出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *Hp*) 以来的 20 余年, 随着对 *Hp* 的不断深入研究, 已将其确定为慢性活动性胃炎和消化性溃疡的重要致病菌, 并与胃腺癌和胃粘膜相关性淋巴瘤组织(MALT)淋巴瘤关系密切. 世界卫生组织癌症研究委员会早在 1994 年就将 *Hp* 列为 I 类致癌原, 两位发现者则于 2005 年荣获了诺贝尔医学奖. 目前, 治疗 *Hp* 感染主要是抗生素、有机铋及抑酸剂联合治疗, 但耐药菌株迅速增多, 使治疗越来越困难, 同时还存在副作用较多、患者依从性差、经济负担大等弊端. 作为感染性疾病的病因, 最经济、最有效的防治方案是疫苗研制, 但是近年来 *Hp* 疫苗研制中多配伍免疫佐剂霍乱毒素(CT)或霍乱毒素 B 亚单位(CTB), 这就限制了其在人体中的应用.

脂质体 (liposome) 是类脂双分子薄膜在一定条件下形成的类似细胞膜结构的超微球体, 制备使用的主要材料——磷脂及辅料均是生物可降解的物质. 由于脂质体药物可改变体内药物动力学特性, 与细胞亲和力强, 缓释长效, 安全无毒, 具有免疫佐剂作用和促吸收效果^[1,2], 我们拟利用脂质体包裹重组 *Hp* 纯化的蛋白质, 制成口服疫苗免疫小鼠, 以探讨其对 *Hp* 感染的免疫预防作用、评价脂质体代替 CT 的可行性、并探讨其对 *Hp* 感染的免疫预防机制.

*国家自然科学基金资助项目(30270078).

** 通讯联系人. Tel: 021-25074838, E-mail: huangsh666@263.net

收稿日期: 2006-04-21, 接受日期: 2006-06-30

1 材料和方法

1.1 材料

幽门螺杆菌国际标准菌株 NCTC11637 和小鼠胃内驯化分离株 M1 为第二军医大学长海医院消化科保存. 无特定病原体(SPF)BALB/c 小鼠 72 只, 7 周龄, 雄性, 体重 17~19 g, 购自南方医科大学动物中心并在中心无菌室饲养. 重组幽门螺杆菌热休克蛋白 60 (Hsp60) 和过氧化氢 (*Kat*) 为我们前期完成的工作^[34], 卵磷脂和黏膜佐剂 CT 购自 Sigma 公司, 胆固醇为 Aldrich 公司产品, 尿素酶试剂为福建三强生化公司产品, 空肠弯曲菌琼脂培养基购自上海腹泻病控制中心. Thermoscript™ RT-PCR system 试剂盒为 Invitrogen life technologies 公司产品.

1.2 仪器

Büchi R-14 型旋转蒸发器和 Büchi B-980 型水

浴器(Büchi 公司), SHZ, Philips tecnal-10 型透射电子显微镜(飞利浦公司), Y-200 型透射电镜铜网为北京创业铜网制作社产品.

1.3 脂质体的制备和技术指标检测

采用逆向蒸发法制备脂质体, 胆固醇 50 mg 和卵磷脂 200 mg 溶于 10 ml 乙醚中, 减压旋转蒸发, 挥发乙醚, 加入 PBS 10 ml 溶解的适量重组蛋白和(或)免疫佐剂, 超声波清洁剂超声乳化 10 min, 形成稳定的 W/O 乳液. 脂质体的电镜观察及粒径测定, 将制备的脂质体用 1%磷钨酸负染后, 滴于有支持膜的铜网上, 干燥后用透射电镜观察并拍摄照片, 取清晰视野中 20 个脂质颗粒, 电镜下测定其粒径(直径), 取其平均值.

1.4 免疫方案

动物分组: 根据免疫组分不同共分 6 组, 每组 12 只(表 1).

Table 1 BALB/c mice were divided and immunized

Group	Component was orally immunized respectively
PBS	PBS (0.5 ml)
Liposome	Liposome alone (0.5 ml)
Vaccine-A	rHsp60 10 µg + CT10 µg
Vaccine-B	Liposome-encapsulated (rHsp60 10 µg)
Vaccine-C	Liposome-encapsulated (rHsp60 10 µg + CT10 µg)
Vaccine-D	Liposome-encapsulated (rHsp60 10 µg + rKat 10 µg + CT 10 µg)

免疫方案: 免疫及接种 *Hp* 前, 小鼠禁食、水 12 h 以上, 接种前 30 min 先经口喂饲 150 µl 0.01 mol/L NaHCO₃ 溶液以中和胃酸. 实验组及对照组分别按上述分组接种抗原和(或)佐剂, 在第 0、7、14、21 天各免疫一次, 免疫 1 h 后恢复食、水, 距末次免疫 2 周后(第 35 天)各组均用 10⁸ CFU/ 次的 *Hp* 菌(国际标准株 NCTC11637: 小鼠胃内驯化分离株 M1 为 1:1)攻击, 隔日 1 次, 共 3 次, 距末次攻击 4 周后处死小鼠.

1.5 疫苗预防保护作用的评价

细菌定植的评价, 眼眶放血处死小鼠后立即剖腹取胃, 沿大弯侧剪开, 以无菌生理盐水冲洗胃内容物, 沿纵轴取胃组织两部分, 一份涂片后置 96 孔板行快速尿素酶试验, 另一份置 10%福尔马林固定供组织学检查. 涂片 Gram 染色: 无菌镊夹取胃组织, 黏膜面向下均匀涂布于洁净玻片上, 直径 1~1.5 cm, 自然干燥, 火焰固定, Gram 染色, 油镜下观察, *Hp* 染成红色. 此法用于 *Hp* 是否定植的

初筛方法. 尿素酶试验: 将尿素酶试剂加入含鼠胃组织的 96 孔板各孔中, 每孔定量至 100 µl, 密闭下室温静置 0.5 h, 当有 *Hp* 感染时试剂由黄色变为红色. 组织学检查: 10%福尔马林常规固定后梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 连续垂直切片(5 µm), 脱蜡复水后, 2% Giemsa 液染色 30 min, 水洗, 100%乙醇脱水, 二甲苯透明, 风干后封片. 光镜下见组织和细菌均呈紫红色. 观察 10 个视野胃小凹 *Hp* 的定植情况, 按下法进行半定量评分: 0 分, 无 *Hp* 定植; 1 分, 部分胃小凹有 1~2 条 *Hp*; 2 分, 多数胃小凹有 3~10 条 *Hp*; 3 分, 多数胃小凹有超过 10 条 *Hp*. 疫苗保护率判定标准: 尿素酶试验和组织学检查均未见 *Hp* 为受保护, 两者一项阳性则定为未受保护.

胃黏膜组织病理学检查, 同上固定、脱水、包埋、切片, HE 染色, 高倍镜下观察 10 个视野固有层淋巴细胞及中性粒细胞的浸润情况, 判断炎症程度及其活动度. 慢性炎症评分: 0 分, 固有层偶

见淋巴细胞浸润; 1 分, 固有层散在淋巴细胞浸润; 2 分, 固有层有中等量淋巴细胞浸润; 3 分, 固有层大量淋巴细胞浸润, 个别在胃粘膜下有淋巴滤泡形成. 炎症活动度评分: 0 分, 固有层偶见中性粒细胞浸润; 1 分, 固有层散在中性粒细胞浸润; 2 分, 固有层有中等量中性粒细胞浸润; 3 分, 固有层有大量中性粒细胞浸润.

1.6 疫苗预防保护机制的探讨

对不同免疫小鼠组受攻击后脾 T 淋巴细胞 IFN- γ 和 IL-4 的表达进行 RT-PCR 检测. 其中 IFN- γ 反映 Th1 细胞水平, 而 IL-4 则反映 Th2 细胞水平. 脾淋巴细胞的分离, 将小鼠眼眶放血处死, 无菌取脾, 用剪刀剔除结缔组织和脂肪并剪碎脾脏, 将碎脾组织置于平皿内的不锈钢丝网 (100 目, 孔径 0.15 mm) 上, 一手持网, 另一手用注射器的针芯轻轻挤压脾组织, 使单个细胞经网入平皿内的 Hank's 液中, 吸取 Hank's 液冲洗网, 将细胞悬液再依次通过 150 目 (孔径 0.1 mm) 和 600 目 (孔径 0.02 mm) 的不锈钢丝网以便形成单个细胞悬液. 离心 (2 000 g, 5 min) 后, 低渗处理去除红细胞, 再次离心洗涤, 重悬细胞, 作细胞计数, 用 Hank's 液调整细胞数至 $10^6/\text{ml}$, $0\sim 4^\circ\text{C}$ 保存待测. 细胞总 RNA 的提取、RNA 的逆转录、PCR 反应按《精编分子生物学实验指南》进行.

PCR 引物, 细胞因子引物设计按《精编分子生物学实验指南》和 GenBank 序列, 分别设计 3 对引物的序列, 并由上海生工生物工程技术服务有限公司合成.

β -actin (569 bp): 引物 1, 5' ATG GAT GAC GAT ATG GCT 3'; 引物 2, 5' ATG AGG TAG TCTGTC AGG T 3'. IFN- γ (233 bp): 引物 1, 5' GGC TGT TTC TGG CTG TTA CTG C 3'; 引物 2, 5' CGC TTA TGT TGT TGC TGA TGG 3'; IL-4 (227 bp): 引物 1, 5' GGC ACA GAG CTA TTG ATG GG 3'; 引物 2, 5' CTC TGT GGT GTT CTT CGT TGC 3'.

1.7 统计学分析

各组间率的比较用 SPSS10.0 软件进行 Fisher 精确检验, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 各组之间利用 SPSS10.0 软件进行 One Way Anova 检验, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 结 果

2.1 脂质体的技术指标检测

制备的脂质体肉眼观呈乳白色悬液, 静置

45 min 不分层, 脂质体负染后透射电镜结果如图 1, 脂质体呈球形, 大小较均匀, 电镜下测定其粒径 (直径) 约为 $(0.7 \pm 0.2) \mu\text{m}$.

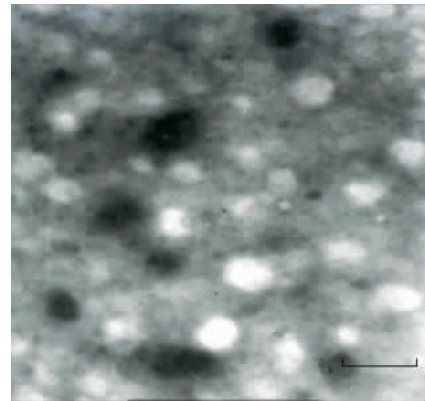


Fig. 1 Photography of negative stain electron microscopy of liposomes-encapsulated vaccine
 $\times 6\,000$.

2.2 免疫/攻击后小鼠胃内 *Hp* 定植情况和病理学评价

试验中不同组别中有 4 只小鼠死亡, 未补充, 末次攻击后 4 周, 根据各组小鼠胃黏膜组织的尿素酶检查和组织学 *Hp* 检查, 判定免疫保护结果, 见图 2 和图 3, 可见 PBS 和脂质体 2 个对照组小鼠全

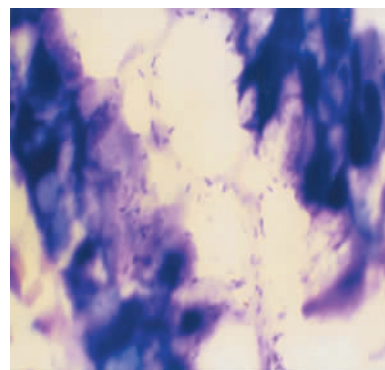


Fig. 2 *Hp* colonizing in gastric tissues of mice
Giemsa staining.

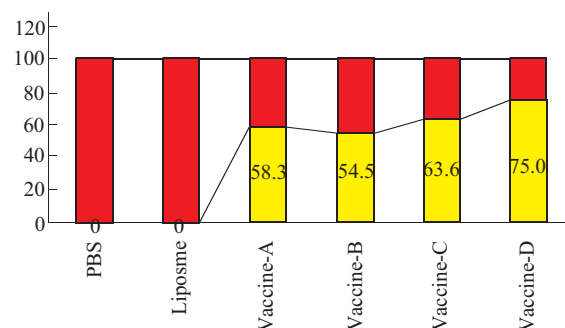


Fig. 3 Immune protection rates determined by urease test and histologic staining
■: Protective rate; ■: Influence rate.

部为 *Hp* 所感染，提示 *Hp* 小鼠定植模型建立成功。4 个免疫疫苗组均有不同程度的保护率，各疫苗组保护率与 2 个对照组比较均有显著性差异 ($P < 0.001$)，疫苗 A 组 (rHsp60 + CT) 与疫苗 B 组 (脂质体 + rHsp60) 相比无显著性差异 ($P > 0.05$)，提示脂质体可以部分代替黏膜免疫佐剂作用。而疫苗 D 组 (脂质体 + rHsp60 + rKat + CT) 较前疫苗 C 组 (脂质体 + rHsp60 + CT) 免疫保护率提高显著 ($P < 0.05$)，提示双价疫苗的保护率较单价疫苗强。

2.3 免疫/攻击后小鼠胃内 *Hp* 定植和炎症评价

组织切片 Giemsa 染色可清楚显示 *Hp*，菌体呈 S 形或弯曲杆状，多位于胃小凹上部及胃腺腔内，见图 4、5，不同对照组和疫苗组在攻击后 5 周，*Hp* 定植量不同。根据前述评分标准进行半定量，结果见表 2，经 One Way Anova 分析，4 个疫苗组 *Hp* 定植评分均明显低于 PBS 和脂质体对照组 ($P < 0.01$)，且疫苗组 D 较 3 个单价疫苗组比较也有显著性差异 ($P < 0.05$)。进一步对 HE 染色的病理切片高倍镜下观察固有层淋巴细胞及中性粒细胞的浸润情况，以判断炎症程度及其活动度。对慢性炎症评分和炎症活动度评分进行半定量化结果显示，疫苗组不仅能降低 *Hp* 的定植，而且能减轻 *Hp* 造成的小鼠胃黏膜的局部慢性炎症反应 ($P < 0.05$)，但各疫苗组间比较未见显著性差异 ($P > 0.05$)。

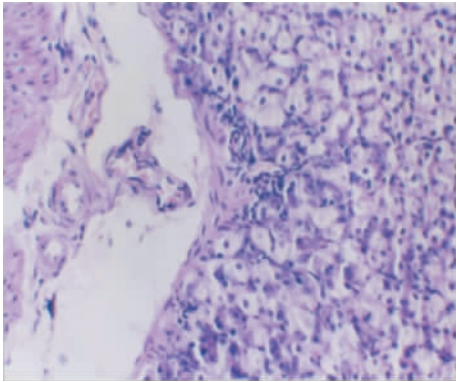


Fig. 4 Gastric pathology of a mouse in PBS group post-challenged, note moderate lymphocytes infiltration
HE staining, ×100.

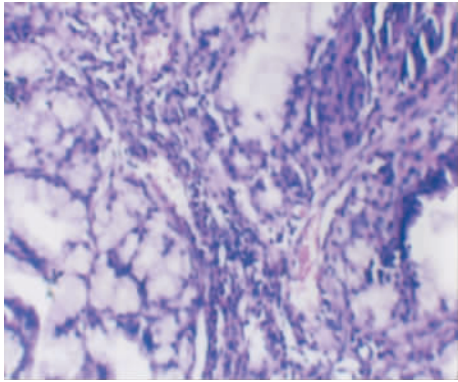


Fig. 5 Gastric pathology of a mouse in group rHpaA+CT post-challenged for 8 weeks, note sporadic lymphocytes infiltration
HE staining, ×100.

Table 2 The grades of *Hp* colonizing, inflammation severity and activity from gastric mucosa in mice post-challenged with *Hp*

Group	<i>n</i>	<i>Hp</i> colonizing	Inflammation severity	Inflammation activity
PBS	11	(2.5 ± 0.3)	(1.6 ± 0.4)	(1.0 ± 0.2)
Liposome	11	(2.4 ± 0.2)	(1.7 ± 0.3)	(1.1 ± 0.2)
Vaccine-A	12	(1.5 ± 0.3) ¹⁾²⁾	(0.8 ± 0.3) ¹⁾	(0.4 ± 0.2) ¹⁾
Vaccine-B	11	(1.5 ± 0.4) ¹⁾²⁾	(0.9 ± 0.4) ¹⁾	(0.5 ± 0.3) ¹⁾
Vaccine-C	11	(1.3 ± 0.1) ¹⁾²⁾	(0.7 ± 0.2) ¹⁾	(0.4 ± 0.2) ¹⁾
Vaccine-D	12	(1.0 ± 0.2) ¹⁾	(0.6 ± 0.2) ¹⁾	(0.4 ± 0.2) ¹⁾

¹⁾ $P < 0.05$ vs PBS and Liposome; ²⁾ $P < 0.05$ vs Vaccine-D.

2.4 攻击后小鼠脾淋巴细胞 IFN- γ 和 IL-4 mRNA 表达的比较

实验中有 4 组中各有 1 只小鼠死亡，未补充，自 PBS 和脂质体对照组中各随机选取 5 只 *Hp* 感染的小鼠，各疫苗组获得免疫保护者中分别选取 5 只，每只小鼠标本分别重复做 2 次。结果显示，受

Hp 攻击后，对照组和疫苗组小鼠脾淋巴细胞均有不同程度的 IFN- γ 和 IL-4 的表达。PBS 和脂质体组出现以 Th1 细胞 (IFN- γ) 为主的增生，IFN- γ 水平较疫苗组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。而 4 个疫苗组则出现以 Th2 细胞 (IL-4) 为主的增生，IL-4 水平较对照组有显著性差异 ($P < 0.05$)，见图 6，7，表 3。

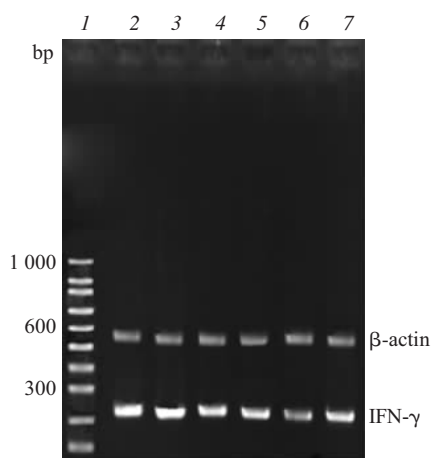


Fig. 6 The levels of IFN- γ mRNA of the spleen T lymphocyte in mice post-challenged by *Hp*

1: Molecular mass marker; 2: PBS group; 3: Liposome group; 4~6: Vaccine A~D.

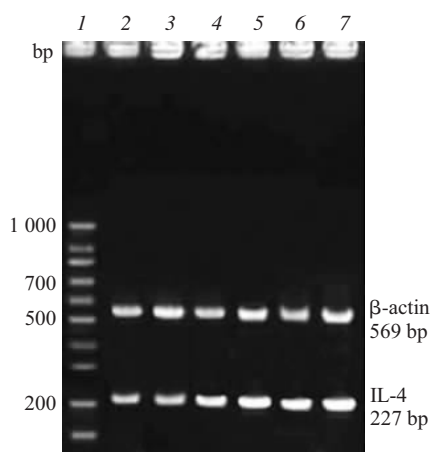


Fig. 7 The levels of IL-4 mRNA of the spleen T lymphocyte in mice post-challenged by *Hp*

1: Molecular mass marker; 2: PBS group; 3: Liposome group; 4~6: Vaccine A~D.

Table 3 Semi-quantization of IFN- γ and IL-4 by RT-PCR of the spleen T lymphocyte in mice post-challenged with *Hp*

Group	n	IFN- γ	IL-4
PBS	5	(1.63 $\pm$ 0.05)	(0.73 $\pm$ 0.03)
Liposome	5	(1.60 $\pm$ 0.06)	(0.68 $\pm$ 0.03)
Vaccine-A	5	(1.32 $\pm$ 0.06) ^b	(1.22 $\pm$ 0.03) ^b
Vaccine-B	5	(1.28 $\pm$ 0.04) ^b	(1.26 $\pm$ 0.05) ^b
Vaccine-C	5	(1.26 $\pm$ 0.04) ^b	(1.27 $\pm$ 0.04) ^b
Vaccine-D	5	(1.27 $\pm$ 0.03) ^b	(1.32 $\pm$ 0.03) ^b

^b $P < 0.05$ vs PBS and Liposome group.

3 讨 论

脂质体是一种定向药物载体, 属于靶向给药系统的一种新剂型. 它可以将药物粉末或溶液包埋在

直径为纳米级的微粒中, 这种微粒具有类细胞结构, 进入人体内主要被网状内皮系统吞噬而激活机体的自身免疫功能, 并改变被包封药物的体内分布, 使药物主要在肝、脾、肺和骨髓等组织器官中积蓄, 从而提高药物的治疗指数, 减少药物的治疗剂量和降低药物的毒性^[1]. 脂质体作为疫苗佐剂可同时增强机体的体液免疫和细胞免疫, 研究表明, 适当比例脂质体与抗原复合物能与机体细胞表膜和细胞内膜直接融合或通过内吞作用进入细胞. 脂质扩散入靶细胞膜的过程, 破坏了膜与抗原间的相互作用, 而使抗原成分进入细胞浆. 带正电的脂质-抗原已被成功用在活体动脉内、静脉内及气管内转染细胞上. 适量的脂质体参与机体免疫的体液反应效果, 不仅能提高特异抗体的滴度、提前特异抗体出现的时间, 还能大大降低免疫原的使用量^[5]. 脂质体有效增强疫苗促免疫保护功能强度的关键是适量, 可能的作用机制是适量的脂质体能包裹抗原形成适当大小且表面带正电荷的颗粒, 这种颗粒不仅可以对抗机体中可能存在拮抗抗原的酶, 更有利于抗原进入机体内诱导免疫应答^[6].

本试验根据逆向蒸发法对蛋白类药物包封率高的特点而选用该法制备脂质体疫苗, 该方法简便、重复性较好, 制备的脂质体疫苗粒径约为 (0.7 $\pm$ 0.2) μm , 适合小鼠肠道黏膜吸收, 并易被网状内皮系统摄取. 研究表明, 脂质体的粒径影响其分布, 小于 200 nm 在循环中停留时间延长, 大于 6 μm 容易被肺部的巨噬细胞所吞噬, 介于两者之间则主要分布于肝脾和肠道淋巴系统. 本实验中制备的脂质体平均粒径为 0.7 μm 左右, 符合靶向要求.

根据攻击后各组小鼠胃黏膜组织的尿素酶检查和组织学 *Hp* 检查, 4 个免疫疫苗组均有不同程度的感染率和保护率, 各疫苗组保护率与 PBS 和单纯脂质体对照组比较均有显著性差异 ($P < 0.001$), 疫苗 A 组 (rUreB + CT) 与疫苗 B 组 (脂质体+CT) 相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 提示脂质体可以部分代替黏膜免疫佐剂作用. 而疫苗 D 组 (脂质体 + rUreB+rKat+CT) 较前疫苗 C 组 (脂质体 + rUreB + CT) 免疫保护率提高显著 ($P < 0.05$), 提示双价疫苗的保护率较单价疫苗强. CT 由 A、B、亚单位组成, A 单位具有酶活性, 能引起液体从小肠进入肠腔, 导致腹泻. B 单位只是与小肠细胞的 GM1 神经节苷脂结合, 介导 A 单位进入细胞、刺激免疫反应, 有助于抗原的吸收. CT 本身具有一定的对消化道传播疾病非特异性免疫保护作用, 将其作为免疫

佐剂应用也较早, 但它有致腹泻和致热等副作用, 这就限制了它在人体中的应用. 我们尝试用无毒副作用的脂质体代替 CT 的免疫佐剂作用, 结果取得了令人满意的效果, 假以时日, 通过对脂质体组成的优化、制备工艺的改进等措施, 将脂质体应用于 *Hp* 疫苗的制备工作中, 可能会产生重大的意义. 本实验中我们也发现由 rUreB+rKat 组成的双价疫苗较 rUreB 单价疫苗的免疫保护率有显著性差异, 这与国内多家研究报道相似^[7,8], 提示在 *Hp* 疫苗研制中, 应尽力发现免疫作用强大的候选抗原, 进行优选配伍, 同时也可望通过基因重组技术建立基因融合的二价或多价 *Hp* 疫苗.

自然感染 *Hp* 后的免疫反应并不能清除细菌, 反而由于持续感染导致胃黏膜免疫病理损害, 而大量实验表明, 免疫接种可预防甚至治疗 *Hp* 感染, 这说明在有效的疫苗接种后可诱导机体产生保护性免疫反应, 这种保护性免疫反应能够打破 *Hp* 与机体之间已建立的一种免疫耐受平衡, 对有关疫苗的保护性免疫机理的研究对于免疫防治 *Hp* 感染具有重大的意义.

Hp 作为一种黏膜感染, 由分泌性 IgA(sIgA)介导的免疫反应一度被认为是一种重要的保护性反应. 在 *Hp* 疫苗研究中发现免疫后的个体在受到细菌攻击时, 胃黏膜内可见较对照组明显增高的特异性 IgA⁺B 细胞浸润, 并伴 sIgA 增加. 口服抗尿素酶 IgA 单抗可保护小鼠不受猫胃螺杆菌感染^[9]. 但随着基因改造动物在疫苗研制和免疫机理研究中的应用, 这一观点受到了质疑. Ermak 等^[10]利用基因剔除小鼠作的免疫预防研究发现, B 细胞缺乏的小鼠予尿素酶加 LT 免疫后, 虽然胃黏膜内无 IgA⁺B 细胞存在, 但对 *Hp* 攻击仍具有保护作用, 而且免疫鼠胃黏膜内出现较多 CD4⁺T 细胞, 据此认为免疫保护不需抗体介导, 而是由受 MHC II 类抗原限制的 CD4⁺T 细胞介导的细胞免疫发生作用. Stutlin 等^[11]用 B 细胞缺乏小鼠作 *Hp* 感染的免疫治疗实验发现, 细菌的根除也并不依赖抗体的产生. 在人体方面, Bogstedt 等^[12]观察发现, IgA 缺乏症患者的 *Hp* 感染率与相同年龄的正常人相比并无明显增高, 也证明分泌性 IgA 在抗 *Hp* 感染免疫中并不是必要的.

近年来, 辅助性 T 淋巴细胞反应在免疫防治中的作用引起人们的重视, T 细胞根据其表面分化抗原(CD)的表达可分为 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞. 已有的报道表明, 在 *Hp* 感染的保护性免疫中起关键作

用的是 CD4⁺T 辅助细胞. 在感染性疾病中, CD4⁺T 辅助细胞(Th)起着非常重要的免疫调节作用. 根据其细胞因子产生情况及功能, CD4⁺T 辅助细胞可以分为 Th0、Th1 和 Th2 亚群. Th1 亚群分泌 IL-2、IFN- γ 、IL-12 等细胞因子, 并辅助 B 细胞产生 IgG2a 这类具有调理及补体结合功能的抗体; Th2 亚群则分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 及 IL-13 等细胞因子, 辅助 B 细胞产生 IgG1 这类中和抗体或 IgE、IgA 抗体. Th0 亚群同时具有 Th1 和 Th2 亚群的特点, 在适当条件下, 分别向 Th1 或 Th2 亚群转化. Th1 和 Th2 细胞之间通过各自分泌的细胞因子制约对方的功能, 例如 IFN- γ 可下调 Th2 反应, 而 IL-10 则可下调 Th1 反应. Th1 反应的效应主要是通过活化巨噬细胞和杀伤性 T 细胞而消灭病原体, 尤其是细胞内病原体感染, 如病毒、分枝杆菌等, 在抗感染的同时也会造成炎症性组织损伤(迟发性超敏反应, DTH); 而 Th2 反应则包括活化肥大细胞引起速发性超敏反应; 通过中和抗体和活化的嗜酸性粒细胞对某些细胞外细菌和肠道寄生虫发挥免疫作用; 对 Th1 反应导致的炎症和组织损伤起抑制作用. 不同 Th 反应对于感染的最后转归是很重要的, 不适当的免疫反应结果不但不能清除病原体反而会导致感染的持续及炎症损伤^[13]. *Hp* 的自然感染均导致 Th1 型免疫应答, 表现为胃黏膜组织内特异性 CD4⁺T 细胞增加, T 细胞产生 IL-2、IFN- γ 、IL12 等细胞因子增加. Th1 细胞通过其分泌的细胞因子, 尤其是 IFN- γ 导致胃黏膜炎症损伤甚至溃疡. 实验证明对感染 *Hp* 的小鼠加用 IL-12 治疗可加重胃部炎症, 反之予抗 IFN- γ 单抗治疗则可使炎症减轻. 缺乏 IFN- γ 基因的小鼠感染 *Hp* 后不产生炎症反应^[14].

Hp 自然感染状态下的 Th1 型免疫应答对 *Hp* 无清除作用, 容易使人推测疫苗接种后的保护性免疫来自 Th2 反应, 已证实疫苗接种后再以 *Hp* 攻击, 机体在 Th1 反应的同时出现了 Th2 反应, Mohammadi 等^[15]将 *Hp* 特异性 Th1 和 Th2 细胞分别被动免疫小鼠后再以 *H. felis* 攻击, 结果接受 Th2 细胞免疫的小鼠胃细菌定植密度较接受 Th1 细胞免疫者明显降低. 与之相反, Bercik 等^[16]用联合免疫缺陷(SCID)小鼠所做的另一个被动免疫实验, 却证明将感染或未感染 *Hp* 的 C₅₇BL/6 小鼠脾淋巴细胞输入 *Hp* 感染的 SCID 小鼠后, 在其胃黏膜导致了较供体鼠更严重的胃炎和迟发超敏反应, 同时伴有胃 *Hp* 的减少, 这说明保护性免疫来自于 Th1

反应, 而且这种 Th1 型反应在抗感染同时也造成炎症性组织损伤。

本实验中我们对 *Hp* 攻击后各组小鼠的脾淋巴细胞 Th1(IFN- γ)和 Th2(IL-4)的 mRNA 进行检测, 对照组和疫苗组小鼠均有不同程度的 IFN- γ 和 IL-4 的表达. PBS 和脂质体组作为模拟反映 *Hp* 自然感染的宿主, 出现以 Th1 细胞(IFN- γ)为主的增生, IFN- γ 水平较疫苗组比较有显著性差异($P < 0.05$). 而 4 个疫苗组作为模拟反映免疫保护的宿主则出现以 Th2 细胞(IL-4)为主的增生, IL-4 水平较对照组有显著性差异($P < 0.05$). 提示在 *Hp* 自然感染的免疫反应中以 Th1 细胞为优势, 这种免疫反应只能造成强烈的黏膜炎症, 且不能清除细菌, 更无免疫记忆功能, 而在免疫小鼠可出现以 Th2 细胞为优势的增生, 在其受 *Hp* 攻击时, 可产生多种免疫因子和免疫抗体参与的保护性反应, 不但能清除细菌, 而且有一定时间内的免疫记忆功能, 这一点在我们以往对胃黏膜 *Hp* 感染时 Fas/Fas Ligand 介导的 T 细胞致胃上皮细胞损伤研究已有了一定的认识, Th1 和 Th2 细胞对 Fas 介导的细胞凋亡敏感性不同, *Hp* 上调 FasL 表达, 具有保护作用的 Th2 细胞易发生凋亡, 而对 FasL 敏感性差的 Th1 得以保留并继续参与免疫致病作用^[3]. 本研究对 Th 细胞检测的结果与前述的报道及国内一些观点不同, 陈洁等^[4]观察, 以减毒鼠伤寒沙门菌为载体构建的重组 *Hp* 疫苗诱导小鼠产生免疫保护作用的机制, 认主要以诱导 Th1 反应为主的免疫应答, 并推测自然感染和免疫接种诱导的 Th1 反应在本质上无区别, 有区别的可能只是这种反应在自然感染和免疫接种这两种不同情况下, 其强度和持续时间不一样, 因而所产生的后果也不一样, 而免疫佐剂或载体也许就对 Th1 免疫反应起重要的“定向”作用. 目前还有于长青等^[7]分析 *Hp* 全菌抗原口服免疫应答反应的结论, 认为全菌抗原和黏膜佐剂可诱导 *Hp* 特异性黏膜免疫应答, 局部 sIgA 可能在抗 *Hp* 感染中起重要作用, 肠黏膜免疫主要诱导部位派伊尔小结(PP)早期表现为 Th1 型优势应答, 晚期则转为 Th2 型优势应答. 这一点在我们实验结论中也可作为一种解释, 但我们在设计中缺乏动态观测指标, 有待于在将来工作中补充。

参 考 文 献

- 李 强, 金 一, 崔福德. 膜融合脂质体作为疫苗载体的研究进展. 中国药物杂志, 2003, **38** (10): 734~737
- Li Q, Jin Y, Cui F D. Chin Pharm J, 2003, **38** (10): 734~737
- Fabani M M, Gargini R, Taira M C, *et al.* Study of *in vitro* stability of liposomes and *in vivo* antibody response to antigen associated with liposomes containing GM1 after oral and subcutaneous immunization. J Liposome Res, 2002, **12** (1~2): 13~27
- 白 杨, 张亚历, 王继德, 等. 幽门螺杆菌过氧化氢酶基因的克隆、高效表达及活性评价. 中华消化杂志, 2002, **22** (4): 203~205
Bai Y, Zhang Y L, Wang J D, *et al.* Chin Dig, 2002, **22** (4): 203~205
- 施 理, 王继德, 陈 烨, 等. 幽门螺杆菌基因重组尿素酶亚单位免疫疫苗预防作用的实验研究. 中华医学杂志, 2000, **80** (11): 811~815
Shi L, Wang J D, Chen Y, *et al.* Natl Med China, 2000, **80** (11): 811~815
- Ninomiya A, Ogasawara K, Kajino K, *et al.* Intranasal administration of a synthetic peptide vaccine encapsulated in liposome together with an anti-CD40 antibody induces protective immunity against influenza A virus in mice. Vaccine, 2002, **20** (25~26): 3123~3129
- 陈晓光, 杨培梁, 龚 娅, 等. 适当比例的 DNA: 脂质体混合物能显著增强 DNA 疫苗的免疫效果. 中国人兽共患病杂志, 2002, **18** (1): 12~16
Chen X G, Yang P L, Gong Y, *et al.* Chin J of Zoonoses, 2002, **18** (1): 12~16
- 李明峰, 刘新梅, 凌 贞, 等. 幽门螺杆菌 HspA-CtxB 口服疫苗的研制及免疫原性研究. 中国微生物学和免疫学杂志, 2002, **22** (4): 398~402
Li M F, Liu X M, Ling Z, *et al.* Chin J of Microbiol and Immunol, 2002, **22** (4): 398~402
- 孙 波, 杨 骅, 李兆申, 等. 幽门螺杆菌 UreB2NAP2HpaA 三价 DNA 疫苗的构建及免疫原性初步研究. 第二军医大学学报, 2005, **26** (6): 636~638
Sun B, Yang H, Li Z S, *et al.* Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, **26** (6): 636~638
- Lee C K, Weltzin R, Thomas W D, *et al.* Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease induces secretory IgA antibodies and protects mice from challenge with *Helicobacter felis*. J Infect Dis, 1995, **172** (2): 161~172
- Ermak T H, Giannasca P J, Nichols R, *et al.* Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II restricted responses. J Exp Med, 1998, **188** (10): 2277~2288
- Stuttin P, Wilson J, Kosaka T, *et al.* Therapeutic immunization against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies. Immunol Cell Biol, 2000, **78** (1): 28~30
- Bogstedt A K, Nava S, Wadstron T, *et al.* *Helicobacter pylori* infection in IgA deficiency: lack of role of the secretory immune system. Clin Exp Immunol, 1996, **105** (2): 202~204
- 王继德, 陈 烨, 赵进军, 等. 幽门螺杆菌感染时 Fas/FasL 介导的 T 细胞致胃上皮细胞损伤. 中华消化杂志, 2001, **21** (3): 148~151
Wang J D, Chen Y, Zhao J J, *et al.* Chi Dig, 2001, **21** (3): 148~151
- 陈 洁, 陈明湖, 朱森林, 等. 重组幽门螺杆菌疫苗免疫保护机制的研究. 中华消化杂志, 2002, **22** (2): 80~83
Chen J, Chen M H, Zhu S L, *et al.* Chi Dig, 2002, **22** (2): 80~83
- Mohammadi M, Nedrud J, Redlin R, *et al.* Murine CD4⁺ T-cell response to *Helicobacter infection*: Th1 cells enhance gastritis and

- Th2 cells reduce bacterial load. *Gastroenterology*, 1997, **113**(10): 1848~1857
- 16 Bercik P, De Giorgio R, Blennerhassett P, *et al.* Immune-mediated neural dysfunction in a murine model of chronic *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2002, **123** (4): 1205~1215

- 17 于长青, 邹全明, 王缚鲲, 等. 幽门螺杆菌全菌口服免疫 BLAB/C 小鼠的免疫应答机理研究. *免疫学杂志*, 2001, **17** (4): 281~28
- Yu C Q, Zhou Q M, Wang F K, *et al.* *Immunological Journal*, 2001, **17** (4): 281~28

Experimental Study of Immune Protective Efficacy of The Liposomes-encapsulated Recombinant *H. pylori* Vaccine*

HUANG Wen^{1)**}, LI Zhao-Shen¹⁾, BAI Yang²⁾, WANG Ji-De²⁾, ZHANG Ya-Li²⁾, ZHOU Dian-Yuan²⁾

¹⁾Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military University, Shanghai 200433, China;

²⁾Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Nanfang Medicine University, Guangzhou 510515, China)

Abstract In order to investigate the immune protective efficacy and immune protective mechanism of the liposome-encapsulated *Helicobacter pylori* (*Hp*) recombinant protein vaccines, the oral liposome-encapsulated vaccines with/without CT were used. Phosphatidyl choline (PC) and cholesterol (Chol) were prepared using reverse evaporation method whose size distribution of folate liposomes was measured by electronic microscopy. BALB/c mice were divided into six groups and immunized by BPS alone, liposome alone, rUreB plus CT, liposome-encapsulated rUreB, liposome-encapsulated rUreB plus CT and liposome-encapsulated (rUreB and rKat) plus CT orally respectively once a week for four weeks. All mice were challenged by alive *Hp* three times in two weeks after the last immunization and sacrificed in five weeks after the last challenge. *Hp* was determined by the fast urease test. The bacterial colonizing density semi-quantitation, the inflammation severity grades and activity grades of the gastric histopathology were observed. IFN- γ and IL-4 mRNA expression of spleen T lymphocyte cell in different groups were studied with RT-PCR. The liposome-encapsulated vaccines were obtained successfully. The mean size of folate liposome was $(0.7 \pm 0.2) \mu\text{m}$. Protective rates of BPS alone, liposome alone, rUreB plus CT, liposome-encapsulated rUreB, liposome-encapsulated rUreB plus CT and liposome-encapsulated (rUreB and rKat) plus CT were 0(0/11), 0(0/11), 58.3%(7/12), 54.5%(6/11), 63.6%(7/11) and 75.0%(9/12) respectively. Protective rate of rUreB plus CT was equal that of the liposome-encapsulated rUreB group ($P > 0.05$). Protective rate of liposome-encapsulated (rUreB and rKat) plus CT was significantly higher than that of liposome-encapsulated rUreB plus CT ($P < 0.05$). The mice gastrically inoculated with the latter four immune antigens had been significantly less infected by *Hp* and had mild inflammation of gastric tissue ($P < 0.05$). There was not significant difference among any vaccine group ($P > 0.05$). After *Hp* attacked, the level of IFN- γ mRNA expression of every vaccine group was significantly lower than that of the PBS and liposome group ($P < 0.05$) while the level of IL-4 mRNA expression of every vaccine group was significant higher than that of the PBS and liposome group ($P < 0.05$). There was not significant difference among any vaccine group ($P > 0.05$). The liposome-encapsulated vaccines can significantly decrease *Hp* colonizing density and reduce inflammation degree in mouse model. The double-candidate vaccines have more stronger immune protective function against *Hp* than that of single-candidate vaccines. After *Hp* attack, the mice which infected without vaccine induce a predominant Th1 immune inflammatory response while the mice which have accepted vaccine can induce a predominant Th2 protective immune response.

Key words *Helicobacter pylori*(*HP*), urease-B subunit (UreB), catalase (Kat), vaccine, liposome, immune response

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30270078).

**Corresponding author. Tel: 86-21-25074838-808, E-mail: huangsh666@263.net

Received: April 21, 2006 Accepted: June 30, 2006