

表达幽门螺杆菌粘附素保守区的减毒鼠伤寒沙门菌免疫治疗作用的研究*

白 杨¹⁾ 陈 烨¹⁾ 王继德¹⁾ 唱韶红²⁾ 张兆山²⁾ 周殿元¹⁾ 张亚历¹⁾**

(¹⁾ 第一军医大学南方医院全军消化病研究所, 广州 510515;

²⁾ 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 探讨表达幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *Hp*) 粘附素保守区 (AB) 的减毒鼠伤寒沙门菌 X4072 (pYA248-AB) 的免疫治疗效果, 以及可能的免疫治疗机制, 以确定 X4072 (pYA248-AB) 在 *Hp* 疫苗研制中的应用价值. 建立 *Hp* 感染小鼠模型, 在该模型中评价 X4072 (pYA248-AB) 治疗 *Hp* 感染的效果, 运用细菌培养法观察 *Hp* 根除率及定植量的改变, 流式细胞术分析免疫后小鼠脾细胞亚型, IL-2 和 IL-4 细胞依赖株的细胞测活法检测细胞因子, ELISA 法检测小鼠血清及肠液中抗 AB 抗体产生情况. 结果表明, 免疫治疗后疫苗治疗组根除率为 53.3%, 显著高于 X4072 (pYA248) 和 PBS 对照组 ($P < 0.01$). 未根除 *Hp* 的小鼠, 疫苗治疗组 *Hp* 的定植密度明显低于其他两组 ($P < 0.01$). 应用流式细胞仪分析免疫小鼠脾 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞的比值时, 发现疫苗治疗组和鼠伤寒菌对照组的比值均显著高于 PBS 对照组 ($P < 0.05$), 而疫苗治疗组的比值又显著高于鼠伤寒菌对照组 ($P < 0.05$). 进一步对细胞因子进行分析发现, 与 PBS 对照组相比免疫治疗组和鼠伤寒菌对照组 IL-2 和 IL-4 明显升高 ($P < 0.05$). 同时, 免疫治疗组与鼠伤寒菌对照组相比, IL-4 增高明显 ($P < 0.05$). 针对 AB 的抗体测定结果发现, 仅在免疫治疗组的小鼠肠液中检测到了 IgA 抗体. 免疫治疗组 IgG 抗体滴度较其他两组明显升高, 第二次加强免疫后 2 周即上升至 1:10 000. 动物实验表明, X4072 (pYA248-AB) 能根除或显著降低 *Hp* 在小鼠胃内的定植, 其可能的免疫治疗机制包括提高 CD4⁺/CD8⁺ 比值, 诱导 Th1 和 Th2 反应以及产生针对 AB 的特异性抗体.

关键词 幽门螺杆菌, 粘附素保守区, 减毒鼠伤寒沙门菌, 治疗性疫苗

学科分类号 Q78, R739

在以前的工作中, 我们构建了幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *Hp*) 粘附素保守区 AB 的高效原核表达体系^[1,2], 表达产物经过纯化后在体外探讨了它的安全性、免疫原性和生物活性^[3], 并进一步将保守区基因克隆入减毒鼠伤寒沙门菌平衡-致死系统, 构建了 AB 的减毒鼠伤寒沙门菌疫苗 X4072 (pYA248-AB)^[4]. 本文目的是通过建立感染 *Hp* 的小鼠模型观察 X4072 (pYA248-AB) 的免疫治疗作用并探讨其免疫治疗机制, 为治疗性 *Hp* 疫苗的研制奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料

幽门螺杆菌 ss1 株为本所保存, CTLL-2 和 CTLL-2/IL-4R 细胞由北京大学医学部提供, *S. typhimurium* X4072 (pYA248-AB) 由本所制备. 无特定病原体 (specific-pathogen free, SPF) C57BL/6 小鼠 60 只, 4 周龄, 雄性, 重 12 ~ 13 g, 饲养条件符合 2 级动物要求. 重组粘附素保守区

rAB、快速尿素酶试剂由本所制备, 羊抗小鼠 HRP-IgG、HRP-IgA 购自 Sigma 公司, FITC 标记的小鼠 CD4 (L3T4) 和 PE 标记的小鼠 CD8 (LY-2) 单克隆抗体购自 PharMingen 公司, 刀豆素 A (ConA) 购自 Sigma 公司, MTT 溶液由军事医学科学院制备, CTLL-2 和 CTLL-2/IL-4R 细胞培养基础为 RMPI 1640 培养基 (美国 GIBCO 公司); 其余试剂为国产分析纯.

1.2 主要仪器

流式细胞仪 (COULTER Elite. ESP, 美国), Σ 960 型全自动酶标仪 (Metertech INC, 美国), CO₂ 培养箱 (TABA1, 日本), 倒置显微镜 (重庆光学仪器厂), 超净工作台 (苏州净化设备厂),

* 国家高技术“863”计划资助项目 (102-07-03-06), 国家自然科学基金资助项目 (30270078) 和军队“十五”医药卫生科研课题资助项目 (OIMA-132).

** 通讯联系人.

Tel: 020-85141531, E-mail: baiyang1030@hotmail.com

收稿日期: 2003-05-19, 接受日期: 2003-06-28

普通光学显微镜 (Olympus, 日本), 恒温水浴箱 (上海实验仪器厂), LD25-2 型台式水平离心机 (北京医用离心机厂), 高速低温离心机 (Beckman 公司, 美国), 24 孔培养板 (DELTA, 丹麦)。

1.3 *Hp* 的培养与鉴定

Hp 的固体培养: 取冷冻保存的 *Hp* 菌种一环于固体培养基上连续划线接种, 2 h 内置厌氧培养箱, 37℃ 微需氧环境 (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) 中培养 72 h, 湿度保持 95% 以上。 *Hp* 的菌落呈圆形, 凸起、光滑、灰白色、半透明, 直径 0.2 ~ 0.8 mm 左右。 液体培养: 取固体培养基上生长的 *Hp* 菌落至布氏肉汤中, 抽滤瓶抽气换气 2 次以满足微需氧条件, 恒温振荡 120 r/min, 培养 48 ~ 72 h。 *Hp* 的鉴定包括菌落形态、涂片观察 (包括革兰氏染色观察细菌形态、暗视野观察细菌活力)、尿素酶实验 (将自制尿素酶试剂加入含鼠胃组织的 96 孔板各孔中, 37℃ 作用 5 min, 当有 *Hp* 感染时试剂由黄色变为红色)。 灌胃用 *Hp* 的要求: 革兰氏染色阴性, 形态呈 S 形、螺旋形、杆状, 暗视野下有活力, 不含杂菌, *Hp* 菌浓度约为 10⁹ CFU/ml。

1.4 *S. typhimurium* X4072 (pYA248-AB) 的培养
详见参考文献 [4]。

1.5 *Hp* 感染小鼠模型的建立

采用参考文献 [5] 方法驯化 *Hp ss1* 株, 分离可在小鼠胃内稳定定植的 *Hp ss1* 株, 固体培养 2 ~ 3 天, 菌落经鉴定后用布氏肉汤洗下, 调整细菌浓度至 10⁹ CFU/ml, 每只小鼠灌胃 0.5 ml (约 10⁹ CFU/ml)。 所有动物灌胃前禁食 12 h, 禁水 4 h。 灌胃后禁食 2 h。 连续 5 次, 1 周完成。 采用胃管法以确保 *Hp* 灌入胃内。 末次灌胃后 4 周随机处死 5 只小鼠, 剖腹取胃, 沿纵轴将胃切为 3 部分, 一份行快速尿素酶试验, 一份置 10% 福尔马林固定供组织学检查, 一份细菌培养, 检查是否感染 *Hp*。

1.6 动物分组

将已鉴定感染 *Hp* 的小鼠随机分成 3 组, 每组 15 只。 PBS 组: 即阴性对照组, 经口喂饲 PBS, 每只鼠每次 200 μ l; 4072 (pYA248) 组: 即鼠伤寒菌对照组, 经口喂饲浓度为 10⁹ CFU/ml 的 4072 (pYA248), 每只鼠每次 200 μ l; 4072 (pYA248-AB) 组: 即疫苗治疗组, 经口喂饲浓度为 10⁹ CFU/ml 的 4072 (pYA248-AB), 每只鼠每次 200 μ l。

1.7 免疫治疗方案

免疫治疗前小鼠禁食 12 h, 禁水 4 h。 每只小鼠先用 3% 的碳酸氢钠 100 μ l 灌胃以中和胃酸, 10 min 后分别按上述分组灌胃, 30 min 后再给小鼠提供水和食物。 隔周免疫, 加强免疫 2 次, 剂量同前。 末次免疫后 4 周, 禁食一天, 摘眼球放血处死动物, 用 75% 的酒精浸泡小鼠体表 5 min 以上。 在超净工作台内迅速取出胃、肠、肝和脾脏, 留取标本进行下一步实验。

1.8 免疫治疗后幽门螺杆菌根除的鉴定

采用半定量细菌培养法^[6]。

1.9 脾细胞制备及培养上清的收集

在 4℃ 的 PBS 缓冲液中, 漂洗干净脾后, 用滤纸吸干水渍, 置于 400 目筛网上, 用注射器针芯轻轻研磨, 并用 4℃ 的 PBS 冲洗。 过滤得单细胞悬液, 计数, 留取少许细胞作亚型分析, 其余细胞重悬于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 用台盼蓝染料排斥计数法计数活的脾细胞数目。 将细胞移入 24 孔细胞培养板中, 调整细胞数为 1 $\times$ 10⁷/孔。 培养 48 h, 3 000 g 离心 10 min, 收集上清。

1.10 脾细胞亚型分析

分别取未固定的脾细胞约 1 $\times$ 10⁵ 个于离心管中, 离心, 去上清, 留约 40 μ l 液体, 加入 10% 小牛血清 PBS 稀释的 FITC 标记的抗小鼠 CD4⁺ 单抗, 和 PE 标记的抗小鼠 CD8⁺ 单抗 40 μ l, 使抗体的最终稀释度约为 1:80, 每 10⁵ 个细胞中抗体量约为 0.2 μ g。 4℃ 冰箱中孵育 30 min, 4℃ PBS 洗两次, 每次 5 ml, 离心, 去上清, 1% 的多聚甲醛固定 (0.5 ml)。 流式细胞仪测试分析, 测定小鼠脾脏淋巴细胞 CD4⁺/CD8⁺ 的比值。

1.11 IL-2 和 IL-4 细胞依赖株细胞因子测定

参见文献 [7]。 收集对数生长期的 CTLL-2 和 CTLL-2/IL-4R 细胞, 用培养基洗 3 遍。 在 96 孔板上倍比稀释脾细胞培养上清, 加入细胞 3 $\times$ 10⁴/孔, 设 3 个重复孔。 空白为不含细胞的完全培养基, 阴性对照为不含脾细胞培养上清的空白培养基及细胞。 37℃, 5% CO₂ 培养 40 ~ 44 h, 加入 MTT 溶液 20 μ l/孔, 5 h 后加入终止液, 放置过夜后, 测 A₅₇₀ 值。

1.12 分泌性特异 IgA 抗体的测定

收集并制备免疫及对照小鼠的肠液样本, 以 ELISA 法测定肠液抗 AB 的 IgA 抗体。 以正常小鼠肠液为阴性对照。

1.13 血清抗 ABIgG 抗体的测定

以 ELISA 法检测血清抗体滴度，以免疫前小鼠血清为阴性对照，实验期间小鼠尾静脉取血，最后摘眼球取血，待血液凝固后离心，吸取血清于有盖的塑料小试管中，-20℃ 保存备用（用于抗体水平的测定）。

1.14 统计学分析

计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，各组之间进行 student *t* 检验，*P* < 0.05 为有显著性差异。

2 结 果

2.1 *Hp* 感染小鼠模型的鉴定

经尿素酶实验、组织病理学检查（图 1）及细菌培养证实全部感染 *Hp*，图 2 为正常对照。细菌培养发现 *Hp* 的定植密度为 $10^5 \sim 10^6$ 个每克胃组织。

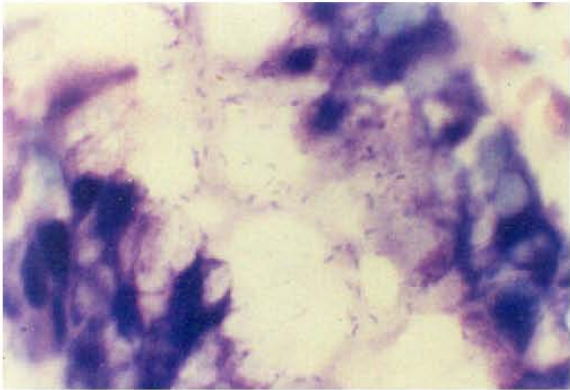


Fig. 1 Gastric mucosa of a mouse infected with *Hp*

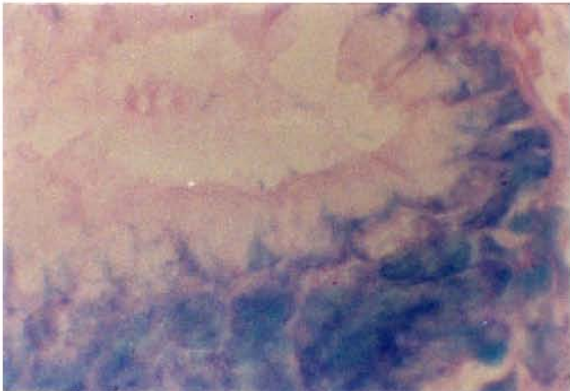


Fig. 2 Gastric mucosa of a health mouse

2.2 免疫治疗后小鼠胃内 *Hp* 根除情况评价

胃组织培养 *Hp* 为阴性者定为根除，免疫治疗

后小鼠胃内 *Hp* 根除情况见表 1。统计分析显示疫苗治疗组根除率显著高于其他两组（*P* < 0.01）。未根除 *Hp* 的小鼠，我们进行了 *Hp* 定植密度的分析，结果发现疫苗治疗组 *Hp* 的定植密度明显低于其他两组（图 3），其差异有显著性（*P* < 0.01）。

Table 1 The eradication rate of *Hp* after immunization treatment in infected C57BL/6

Vaccine	Animal numbers	<i>Hp</i> negative numbers	Eradication rate of <i>Hp</i>
PBS	13	0	0
4072 (pYA248)	13	0	0
4072 (pYA248-AB)	15	8	53.3 *

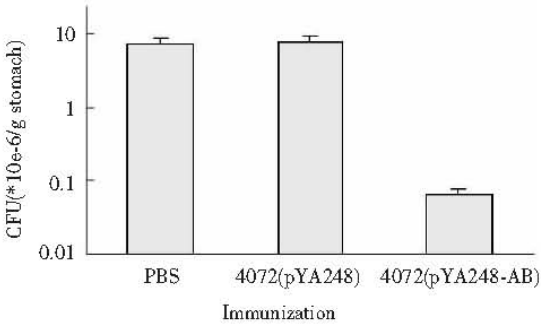


Fig. 3 The *Hp* colonization of immunization treatment was assessed by colony count assay

2.3 免疫小鼠脾细胞 CD4⁺/CD8⁺ 比值的变化

应用流式细胞仪分析 FITC-CD4 及 PE-CD8 双染的免疫小鼠脾细胞时，可计算出 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞的比值，结果见图 4 和表 2。从表 2 可以看出疫苗治疗组和鼠伤寒菌对照组的比值均显著高于阴性对照组（*P* < 0.05），而疫苗治疗组的比值又显著高于鼠伤寒菌对照组（*P* < 0.05）。

Table 2 The ratio of spleen CD4⁺/CD8⁺ T lymphocytic cell of the immuned mice

Group (<i>n</i>)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ($\bar{x} \pm s$)
PBS (13)	2.090 ± 0.143
X4072 (pYA248) (13)	2.608 ± 0.156
X4072 (pYA248-AB) (15)	3.770 ± 0.309

* One-Way ANOVA showed *P* < 0.05 between each two groups.

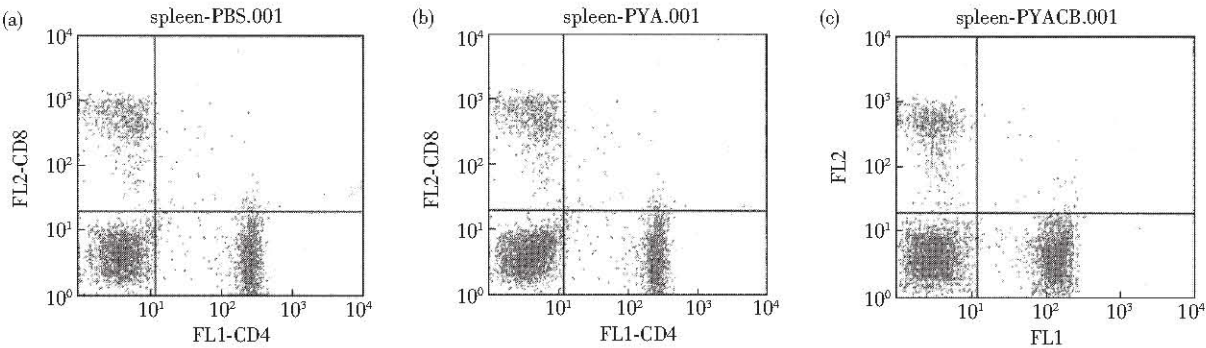


Fig. 4 The ratio of spleen CD4⁺/CD8⁺ T lymphocytes of the immunized mice
(a) PBS group; (b) X4072 (pYA248) group; (c) X4072 (pYA248-AB) group.

2.4 细胞因子 IL-2 和 IL-4 的检测结果

小鼠脾细胞培养上清中 IL-2 和 IL-4 的检测结果 显示, 免疫治疗组和鼠伤寒菌对照组与阴性对照组相比, IL-2 明显升高 ($P < 0.05$), 而免疫治疗组与鼠伤寒菌对照组相比则无明显差异 ($P > 0.05$). 免疫治疗组 IL-4 增高明显, 与鼠伤寒菌对照组和阴性对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 鼠伤寒菌对照组与阴性对照组相比, IL-4 增高明显 ($P < 0.05$) (图 5).

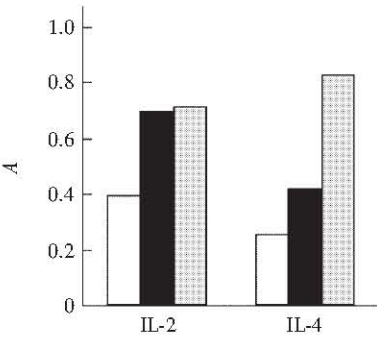


Fig.5 Detected results of IL-2 and IL-4 in the cultured supernatant of mice spleen cells
□: PBS; ■: 4072(pYA248); ▨: 4072(pYA248-AB)

2.5 分泌性特异 IgA 抗体的测定结果

凡样本 A 值/阴性对照 A 值超过 1.5 的, 均判为阳性. 由于制备过程中难以定量, 故不能表示滴度. 仅在免疫治疗组的小鼠肠液中检测到了抗体, 结果见表 3.

2.6 血清抗 AB 抗体的测定结果

各组小鼠血清中抗 AB IgG 抗体水平如图 6 所示. 初次免疫 1 周后, 免疫治疗组可测到血清抗体

滴度为 1:1 000, 而其他两组的滴度为 1:400. 第一次加强免疫后 1 周血清抗体滴度为 1:3 000, 而其他两组的滴度仍为 1:400; 第二次加强免疫后 2 周和 4 周血清抗体滴度上升至 1:1 0000, 而其他两组的滴度还略有降低 (1:300).

Table 3 Mice intestinal fluid were tested for AB-specific IgA by ELISA

Samples	A ₄₉₂	Positive (+) or negative (-)
Void control group	0	
Intestinal fluid of health mice	0.028 ± 0.011	-
Intestinal fluid of PBS mice group	0.025 ± 0.014	-
Intestinal fluid of X4072 (pYA248) mice group	0.032 ± 0.019	-
Intestinal fluid of X4072 (pYA248-AB) mice group	0.526 ± 0.043	+

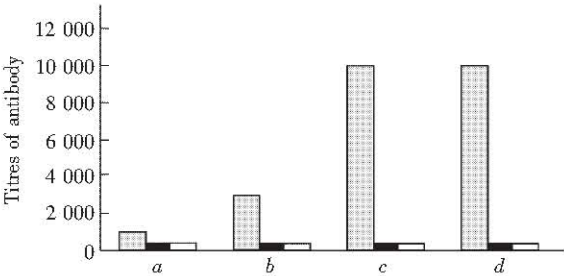


Fig.6 Titre of antibodies raised against AB by oral immunization with live X4072(pYA248-AB)

Antiserum samples were taken as follow: a. 1 week after priming administration; b. 1 week after first booster; c. 2 weeks after second booster; d. 4 weeks after second booster. ▨: 4072(pYA248-AB); ■: 4072(pYA248); □: PBS.

3 讨 论

国外学者发现 *Hp* 疫苗不单纯具有预防作用, 同时还有治疗 *Hp* 感染作用. 1994 年 Doidge 等利用 *Hp* 粗制抗原加佐剂霍乱毒素 (CT) 治疗已感染了 *H. felis* (*Hf*) 的小鼠, 2 个月后发现 90% 的动物清除了感染的细菌. 同年, Michetti 的研究小组也发现应用基因重组技术产生的尿素酶 (rUre) 与羟磷灰石结合, 加上免疫佐剂 CT 治疗已感染动物, 结果 48% 的动物清除了感染, 而对照组则无变化, 显示了免疫治疗 *Hp* 感染引起相关疾病的可行性. 他们的研究开创了免疫治疗幽门螺杆菌感染的先河. 此后, 国外学者又报道免疫治疗不但完全根除小鼠胃内的 *Hf*, 并治愈胃炎, 而且使小鼠获得持久抵抗 *Hf* 感染的免疫力. 1998 年 Dubois 等^[8]用重组尿素酶加上佐剂大肠杆菌不耐热毒素 (LT) 口服免疫已感染 *Hp* 的恒河猴, 大多数动物胃内 *Hp* 得到根除且胃炎明显好转. 1999 年又有学者报道利用重组尿素酶加上灭毒的沙门氏菌作为佐剂治疗小鼠 *Hp* 相关性疾病, 动物感染的 *Hp* 被根除^[9]. 目前国外已进行重组尿素酶 *Hp* 疫苗的 II 期临床治疗试验, 有一定的疗效, 但佐剂 LT 有引起受试胃炎患者腹泻的不良反应. 上述现有资料显示免疫治疗已成为治疗 *Hp* 感染最有效、最有前景的方法之一. 同时也提示: 单一尿素酶抗原免疫不能达到最佳的治疗效果, 为了确保免疫治疗效果必须寻找其他有效抗原成分来配制更有效的疫苗; 其次, 由于 CT 和 LT 的毒性及副作用, 必须寻找对人类无毒的免疫佐剂.

我们构建的表达 AB 减毒鼠伤寒沙门菌疫苗既是对寻找其他有效抗原的探索, 又是对无毒的免疫佐剂的尝试. 动物实验表明, 表达 AB 的减毒鼠伤寒沙门菌疫苗的 *Hp* 根除率为 53.3%, 即使未根除的小鼠, 其 *Hp* 定植密度也有明显的降低 ($P < 0.01$), 初步证实, 表达 AB 的减毒鼠伤寒沙门菌疫苗可用于 *Hp* 治疗性疫苗的研制.

在 *Hp* 根除率与定植密度的研究中, 本研究采用了细菌培养结果作为唯一的评价标准, 而不是常用的尿素酶实验和组织病理学检查结果. 因为在建立 *Hp* 感染小鼠模型的预实验中, 我们发现接种 *Hp* 1 周后的部分小鼠, 细菌培养呈阳性, 而尿素酶实验和组织病理学检测结果呈阴性. 是否细菌培养的敏感性高于尿素酶实验和组织病理学检测呢? 带着这一疑问, 我们查阅了有关文献, 发现国外学者

Sutton^[6]设计的相关实验证实了细菌培养的敏感性高于尿素酶实验和组织病理学检测. 因此, 我们选用细菌培养作为评价 *Hp* 定植的唯一标准.

T 细胞按 CD 分子的不同可分为 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 两大亚群. $CD4^+$ 细胞又称辅助性 T 细胞 (Th 细胞), 根据所分泌的细胞因子的不同, 可分为 Th1 和 Th2 细胞. Th1 细胞偏向于分泌 IL-2 和 IFN γ , 可促进细胞介导的免疫应答; Th2 细胞偏向于分泌 IL-4、IL-6、IL-10, 可增强抗体介导的免疫应答. $CD8^+$ 细胞又称细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL), 其主要作用是特异性直接杀伤靶细胞. Ermak 等^[10]和 Pappo 等^[11]都发现缺乏 $CD4^+$ T 细胞的小鼠在使用 *Hp* 粘膜疫苗后都不能产生对 *Hp* 的保护效应, 而 $CD8^+$ T 细胞在此机制中并不重要, 说明 $CD4^+$ T 细胞在 *Hp* 的免疫防治中处于关键地位. 我们用流式细胞仪测定了免疫治疗后小鼠脾 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的比值, 结果疫苗治疗组的比值高于鼠伤寒菌对照组与阴性对照组, 其差异具有显著性, 表明我们构建的表达 AB 的减毒鼠伤寒沙门菌疫苗是通过提高 $CD4^+/CD8^+$ 比值达到免疫治疗作用的, 进一步证实了 Ermak 等和 Pappo 等的结论. 另外, 鼠伤寒菌对照组的比值又显著高于阴性对照组 ($P < 0.05$), 提示 $CD4^+/CD8^+$ 比值的提高与应用减毒鼠伤寒杆菌活菌作为疫苗载体有关, 表明减毒鼠伤寒杆菌活菌疫苗载体可能诱导有助于免疫防治的应答反应. 在成熟的 T 细胞表面, $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 分子是互相排斥存在的, 两者的比值是相对稳定的, 在正常小鼠 $CD4^+/CD8^+ = 1.5 \sim 2.0$, 而本研究阴性对照组的比值为 2.090, 略高于正常小鼠, 提示在 *Hp* 感染中, $CD4^+$ T 细胞的比例也升高, 同时也表明, $CD4^+$ T 细胞即 Th 细胞中存在着复杂的感染与免疫调节机制.

那么, 这种复杂的调节机制究竟是什么呢?

Hp 是一种细胞外致病菌, 但早期的一些研究发现, 无论在动物或人体内, 其感染均导致 Th1 型免疫应答, 表现为粘膜组织内特异性 $CD4^+$ 细胞以及 IFN γ 等 Th1 型细胞因子分泌增加^[12,13]. 也就是说, 无论是在自然感染螺杆菌的人或感染螺杆菌的动物模型中, 均可产生大量但无效的 Th1 免疫应答, 不但不能清除细菌, 反而导致胃粘膜免疫病理损害. Mohammadi 等^[14]对小鼠的研究发现, 激发 Th2 型应答不仅能减少细菌载量, 而且能减轻胃粘膜炎症, 提示疫苗接种所诱导的免疫应答若转向 Th2 型, 通过增加 IgG1、IL-4 等 II 型细胞因子的产

生可抑制 *Hp* 在胃粘膜的定植, 起到免疫防治作用. 后来的研究进一步证明了这一点: 在给感染 *Hf* 的小鼠分别输注螺杆菌特异的 Th1 和 Th2 细胞株后, 只有在输注 Th2 细胞株的小鼠胃内发现 *Hf* 的定植水平明显减低. 而且, Saldinger 等^[15] 采用 rUreB 和 CT 口服免疫已感染 *Hf* 的 BALB/c 小鼠, 发现感染小鼠在第 4 次免疫后 3 周被治愈, 免疫还导致其脾脏 CD4⁺T 细胞的增殖反应, 并伴有渐进性的 IFN γ 降低和 IL-4 升高, 同时, 接受免疫治疗的小鼠均出现特异的血清抗 rUreB IgG1 升高. 也就是说, 用 rUreB 对 BALB/c 小鼠行治疗性免疫可诱导渐进性的 Th2 免疫反应, 从而达到清除病原体的目的. 事实上, 在螺杆菌小鼠模型中, 用 CT 作为佐剂的免疫机制就是为了诱导 Th2 型极化, 分泌 IL-4, 从而增强免疫防治效应. 上述大量实验证实, *Hp* 疫苗的防治作用是与 Th1 细胞的进行性减少和 Th2 反应的逐步增强密切相关的, 认为 *Hp* 疫苗的主要目标就是调节机体免疫反应从 Th1 型向 Th2 型转变.

然而, 近来的一些研究发现, 诱导 Th1 和 Th2 反应比单纯诱导 Th2 反应更能防治小鼠 *Hp* 感染. Jiang 等^[16] 给感染 *Hf* 的小鼠注射腺病毒 (基因疫苗), 在 Th1 细胞因子 IFN γ 或 IL-12 基因敲除的小鼠体内螺杆菌的定植率不受影响, 而无基因敲除的小鼠螺杆菌的定植率却明显下降, 这说明 Th1 型免疫应答在 *Hp* 疫苗的免疫防治机制中也发挥一定的作用, 而且 Th1 型细胞可能较 Th2 型细胞在免疫防治中更为重要. Nedued 等分别采用两种佐剂和螺杆菌抗原共同免疫小鼠, 即诱导 Th2 型免疫应答的铝剂和诱导 Th1 型免疫应答的完全弗氏佐剂, 结果表明两种疫苗方案均可在小鼠体内诱发保护性免疫应答, 这说明 Th1 和 Th2 型免疫应答都可发挥免疫防治效应^[17]; Guy 等^[18] 认为只有 Th1 和 Th2 两种反应之间的恰当平衡, 才能达到既避免组织损伤, 又获得抗 *Hp* 感染的完全防治作用.

我们的实验结果显示, 疫苗治疗组小鼠的脾细胞培养上清中 IL-2 和 IL-4 均较 PBS 组有明显升高 ($P < 0.05$), 故可推测减毒鼠伤寒杆菌 4072 (pYA248-AB) 能够诱导 Th1 和 Th2 型免疫应答, 并有可能通过 Th1 和 Th2 两种免疫应答之间的恰当平衡达到免疫治疗作用. 需要指出的是鼠伤寒杆菌对照组小鼠的脾细胞培养上清中 IL-2 和 IL-4 也较 PBS 组明显升高 ($P < 0.05$), 特别是 IL-2 的升高与免疫治疗组无显著性差异, 提示减毒鼠伤寒杆菌

作为一种侵袭性细菌能够诱导 1 型和 2 型辅助 T 细胞应答和随后的细胞因子表达, 作为活菌载体有助于 *Hp* 疫苗的免疫应答. 另外, 4072 (pYA248-AB) 组 IL-4 的升高较 4072 (pYA248) 明显 ($P < 0.05$), 故可间接推测 AB 能够诱导 Th2 型免疫应答. 我们检测的细胞因子比较局限, 不能完全反应细胞应答状况, 4072 (pYA248-AB) 的细胞免疫治疗机制还有待进一步研究.

在粘膜感染中, 局部粘膜免疫反应是一种重要的防治机制, 而粘膜分泌性 IgA 是其防治作用中的重要效应分子. 许多研究已证实针对 *Hp* 的特异性 IgA 有防治螺杆菌感染的作用^[19]. 如给小鼠服用抗螺杆菌 IgA 型单克隆抗体可保护小鼠免受 *Hf* 感染. Ikewaki 等^[20] 用 *Hp* 全菌超声上清和霍乱毒素口服免疫长期感染 *Hp* 的小鼠后, 发现可产生特异性的唾液和粪便 IgA, 而且清除了 *Hp* 的感染. 研究者们认为, 治疗性口服疫苗可通过有效的粘膜 IgA 反应来清除长期的 *Hp* 感染. 另外, 近来的研究发现针对 *Hp* 的特异性 IgG 抗体也有防治 *Hp* 感染的作用. 特别是 Ferrero 等^[21] 通过比较 *Hf* 感染和粘膜疫苗免疫小鼠后胃粘膜的浆细胞类型, 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; 被免疫的小鼠可产生保护性免疫, 而其分泌型 IgA 的浆细胞直到注射抗原 17 天后才出现于胃粘膜. 由此研究者得到一个结论, 特异性 IgG 在 *Hp* 疫苗的粘膜免疫中有重要作用. 与上述结论不同的是, 许多研究发现, 不论免疫组还是感染组, IgG 和 IgA 均保持较高水平, 甚至感染组高于免疫组. 那么, 对于 *Hp* 免疫防治中 IgG 和 IgA 的作用应如何判断呢? 一些研究指出抗体的性质也许比数量更重要^[22], 即这些抗体可以攻击细菌的重要功能部分, 例如攻击对螺杆菌活动非常重要的鞭毛. 本研究中, 我们选用纯化的 AB 作为包被抗原对 IgG 和 IgA 抗体进行了检测. 由于技术所限, 我们对小鼠肠液中的 IgA 仅进行了定性检测, 结果发现只有疫苗治疗组的小鼠产生了针对 AB 的特异性抗体. 另外, 我们对免疫治疗后 4 个时点的小鼠血清 IgG 进行了检测, 发现初次免疫后 1 周, 针对 AB 的特异性 IgG 即有所上升, 末次免疫后 2 周, 抗体滴度上升至 1:10 000, 末次免疫 4 周后仍维持在这一较高水平, 而其他两组抗体水平未有明显变化. 由此, 我们初步推测, 针对 AB, 这一具有重要功能的 porin 样外膜蛋白的 IgG 和 IgA 抗体在 *Hp* 免疫治疗中起着重要作用.

参 考 文 献

- 1 白 杨, 张亚历, 王继德, 等. 幽门螺杆菌 4 种黏附素基因保守区的克隆、序列及其生物信息学分析. 第一军医大学学报, 2002, **22** (10): 869 ~ 871
Bai Y, Zhang Y L, Wang J D, *et al.* J First Mil Med Univ, 2002, **22** (10): 869 ~ 871
- 2 白 杨, 但汉雷, 王继德, 等. 幽门螺杆菌 AlpA 基因中四种黏附素基因保守区的克隆、表达、纯化及鉴定. 生物化学与生物物理进展, 2002, **29** (6): 922 ~ 926
Bai Y, Dan H L, Wang J D, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2002, **29** (6): 922 ~ 926
- 3 白 杨, 张亚历, 陈 烨, 等. 幽门螺杆菌粘附素保守区蛋白的免疫原性、安全性和粘附作用的体外评价. 生物化学与生物物理进展, 2003, **30** (3): 422 ~ 426
Bai Y, Zhany Y L, Chen Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, **30** (3): 422 ~ 426
- 4 白 杨, 王继德, 张兆山, 等. 表达幽门螺杆菌黏附素保守区的减毒鼠伤寒沙门氏菌株的构建. 生物工程学报, 2003, **19** (3): 77 ~ 82
Bai Y, Wang J D, Zhang Z S, *et al.* Chin J Biotech, 2003, **19** (3): 77 ~ 82
- 5 Marchetti M, Arico B, Burrone D, *et al.* Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. Science, 1995, **267** (5204): 1655 ~ 1658
- 6 Sutton P, Wilson J, Lee A. Further development of the *Helicobacter pylori* mouse vaccination model. Vaccine, 2000, **18** (24): 2677 ~ 2685
- 7 唱韶红, 熊凌霄. 对 IL-4 两种测活方法的比较及 MTT 法最适合条件确定. 免疫学杂志, 2000, **16** (4): 300 ~ 303
Chang S H, Xiong L S. Immunity Journal, 2000, **16** (4): 300 ~ 303
- 8 Dubois A, Lee C K, Fiala N, *et al.* Immunization against natural *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates. Infect Immun, 1998, **66** (9): 4340 ~ 4346
- 9 Gomez-Duarte O G, Bumann D, Meyer T F. The attenuated *Salmonella* vaccine approach for the control of *Helicobacter pylori*-related diseases. Vaccine, 1999, **17** (13 ~ 14): 1667 ~ 1673
- 10 Ernak 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** (12): 2277 ~ 2288
- 11 Pappo J, Torrey D, Castriotta L, *et al.* *Helicobacter pylori* infection in immunized mice lacking major histocompatibility complex class I and class II function. Infect Immun, 1999, **67** (1): 337 ~ 341
- 12 D'Elios M M, Manghetti M, de Carli M, *et al.* T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. J Immunol, 1997, **158** (2): 962 ~ 967
- 13 Bamford K B, Fan X, Crowe S E, *et al.* Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. Gastroenterology, 1998, **114** (3): 482 ~ 492
- 14 Mohammadi M, Nedrud J, Redline R, *et al.* Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. Gastroenterology, 1997, **113** (6): 1848 ~ 1857
- 15 Saldinger P F, Porta N, Launois P, *et al.* Immunization of BALB/c mice with *Helicobacter urease* B induces a T helper 2 response absent in *Helicobacter* infection. Gastroenterology, 1998, **115** (4): 891 ~ 897
- 16 Jiang B, Jordana M, Xing Z, *et al.* Replication-defective adenovirus infection reduces *Helicobacter felis* colonization in the mouse in a gamma interferon- and interleukin-12-dependent manner. Infect Immun, 1999, **67** (9): 4539 ~ 4544
- 17 Gottwein J M, Blanchard T G, Targoni O S, *et al.* Protective anti-*Helicobacter* immunity is induced with aluminum hydroxide or complete Freund's adjuvant by systemic immunization. J Infect Dis, 2001, **184** (3): 308 ~ 314
- 18 Guy B, Hessler C, Fourage S, *et al.* Systemic immunization with urease protects mice against *Helicobacter pylori* infection. Vaccine, 1998, **16** (8): 850 ~ 856
- 19 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. Infect Immun, 1999, **67** (5): 2531 ~ 2539
- 20 Ikewaki J, Nishizono A, Goto T, *et al.* Therapeutic oral vaccination induces mucosal immune response sufficient to eliminate long-term *Helicobacter pylori* infection. Microbiol Immunol, 2000, **44** (1): 29 ~ 39
- 21 Ferrero R L, Thiberge J M, Labigne A. Local immunoglobulin G antibodies in the stomach may contribute to immunity against *Helicobacter* infection in mice. Gastroenterology, 1997, **113** (1): 185 ~ 194
- 22 Blanchard T G, Nedrud J G, Reardon E S, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of the local and systemic antibody response in mice and humans with *Helicobacter* immunity and infection. J Infect Dis, 1999, **179** (3): 725 ~ 728

Study on Immunization Treatment of The Attenuated *Salmonella typhimurium* Strain Expressing Conservative Region of *Helicobacter pylori* Adhesin *

BAI Yang¹⁾, CHEN Ye¹⁾, WANG Ji-De¹⁾, CHANG Shao-Hong²⁾,
ZHANG Zhao-Shan²⁾, ZHOU Dian-Yuan¹⁾, ZHANG Ya-Li¹⁾ **

(¹⁾ PLA Institute for Digestive Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China;

(²⁾ Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract In order to investigate the treatment efficacy and the potential mechanism of the attenuated *Salmonella typhimurium* strain expressing conservative region (AB) of *Helicobacter pylori* (Hp) adhesion X4072 (pYA248-AB) in mouse model infected with Hp, the feasibility of X4072 (pYA248-AB) in Hp vaccination was determined. Hp infected mouse model was established and applied in oral vaccination. The density of bacterial colonization was

determined by the semi-quantitative bacterial culture assay. The T cell subsets of spleenocytes were assayed by flow cytometry (FCM) after immunization. IL-2 and IL-4 were detected through MTT. Mice sera and intestinal fluid were separately tested for AB-specific IgG and IgA by ELISA. The results showed that after immune treatment, the eradicate rate of vaccine treatment group was 53.3%, which was significantly higher than that of other two control groups (X4072 (pYA248-AB) vs X4072 (pYA248) and PBS, $P < 0.01$). The *Hp* colonized density of vaccination group with *Hp* infection was significantly lower than that of other two groups (X4072 (pYA248-AB) vs X4072 (pYA248) and PBS, $P < 0.01$). Comparing the ratio of spleen $CD4^+/CD8^+$ T lymphocytic cells of the immunized mice by flow cytometer, it was found that the ratio of vaccine treatment group and mice typhoid fever germ control group were significantly higher than that of negative control group (X4072 (pYA248-AB) and X4072 (pYA248) vs PBS, $P < 0.05$) respectively. In addition, the ratio of vaccine treatment was significantly higher than that of mice typhoid fever germ control group (X4072 (pYA248-AB) vs X4072 (pYA248), $P < 0.05$). The further analysis of cytokine it was found that IL-2 and IL-4 of vaccine treatment group and mice typhoid fever germ control group were significantly higher than those of negative control group (X4072 (pYA248-AB) and X4072 (pYA248) and PBS, $P < 0.05$) respectively, meanwhile, the IL-4 of vaccine treatment group was significantly higher than that of mice typhoid fever germ control group (X4072 (pYA248) vs PBS, $P < 0.05$). Humoral immunity analysis showed that IgA was only detected in the immune treatment group, and the IgG antibody titer of immune treatment group increased significantly than that of the other two group, and the titer reached 1:10 000 two weeks after the second intensive immunization. By the animal experiments it is suggested that X4072 (pYA248-AB) can eradicate or significantly reduce the *Hp* colonization on the mice stomach. The potential immune therapeutic mechanism included the increase of $CD4^+/CD8^+$ ratio, induction of Th1 and Th2 response, and production of the specific antibodies.

Key words *Helicobacter pylori*, conservative region of adhesin, the attenuated *Salmonella typhimurium* strain, therapeutic vaccination

* This work was supported by grants from The State 863 High Technology R & D Project of China (102-07-03-06), The National Natural Sciences Foundation of China (30270078) and Military 'ten-five' Commanding Project (OIMA-132).

** Corresponding author. Tel: 86-20-85141531, E-mail: baiyang1030@hotmail.com

Received: May 19, 2003 Accepted: June 28, 2003