

幽门螺杆菌黏附素保守区蛋白的免疫原性、安全性和黏附作用的体外评价*

白 杨 张亚历** 陈 烨 王继德 周殿元

(第一军医大学南方医院全军消化病研究所, 广州 510515)

摘要 探讨幽门螺杆菌 (*Hp*) 保守区 (AB) 蛋白的体外安全性、免疫原性和黏附作用, 以确定 AB 在 *Hp* 疫苗研制中的应用价值. ELISA 法测定 *Hp* 感染者血清中抗 AB 抗体, 四唑盐比色法 (MTT) 测定 T 细胞对 AB 的增殖反应, 流式细胞术检测 AB 致 T 细胞表达 FasL 的作用, 二苯胺 (DPA) 法测定 AB 致 T 细胞凋亡率, 光镜计数法研究 AB 抗体对 *Hp* 与胃癌细胞黏附的影响. ELISA 法共检测了 55 份血清, 以快速尿素酶实验 (RUT) 作为平行对照, 两法的评价判断一致性程度的指标卡帕系数为 0.76. 同时, 低剂量 AB 即可刺激 Hp^+ T 细胞的增殖. 体外安全性实验表明, AB 无明显调节 T 细胞表达 FasL 的作用以及无明显致 Hp^- T 细胞凋亡的作用. AB 抗血清能部分阻断 *Hp* 与胃癌细胞系的黏附, 在光镜下表现为经抗 AB 兔血清预处理后, 每细胞周围黏附的细菌数较免疫前兔血清预处理组显著减少 ($P < 0.05$). 研究表明 AB 是安全的、具有免疫原性的 *Hp* 菌体成分, 既可以刺激体液免疫, 又能够提高细胞免疫, 并且其抗体还可防止 *Hp* 与胃上皮细胞的黏附.

关键词 幽门螺杆菌, 黏附素保守区, 免疫原性, 安全性, 黏附

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*) 黏附素保守区 AB 的高效原核表达体系, 并通过金属螯合亲和层析的方法获得了重组黏附素保守区 rAB 的纯化蛋白产物^[1]. 本研究的目的在于: 通过体外实验确定 rAB 的安全性、免疫原性及黏附作用, 探讨 rAB 在 *Hp* 疫苗应用中的可行性及可能的免疫机制.

1 材料和方法

1.1 材料

重组黏附素保守区 rAB 的纯化蛋白产物由本所制备. 幽门螺杆菌 ss1、ATCC26695 及胃癌细胞系 MGC-803 为本所保存. 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔和羊抗人 IgG 购自华美生物工程公司, *Hp* 阳性患者血清取自本院内镜中心就诊病人, 兔抗人 FasL 抗体、异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记羊抗兔 IgG 购自美国 PharMingen 公司, 刀豆素 A (ConA)、福氏完全佐剂及不完全佐剂均购自 Sigma 公司, 淋巴细胞分离液 Ficoll-hypaque 购自瑞典 Amersham Pharmacia 公司, 其余试剂为国产分析纯.

1.2 抗 rAB 兔血清的制备

家兔背部皮下多点注射重组蛋白 rAB, 制备抗血清, 方法见参考文献 [2]. 琼脂双扩散法测定抗血清的效价为 1:64.

1.3 人 T 细胞的制备

自 *Hp* 阳性或阴性者外周采血, 制备 T 细胞, 详见参考文献 [3].

1.4 ELISA 法检测患者血清中抗 rAB IgG 抗体

详见参考文献 [2]. 阳性对照为 3 份已知感染 *Hp* 的患者血清 (尿素酶试验、病理染色及细菌培养均呈阳性), 阴性对照为 3 份已知未感染 *Hp* 的患者血清 (上述 3 项检查均阴性), 同时以胃镜活检组织的快速尿素酶实验 (RUT) 结果作为平行对照. 结果判断待测样本 A_{490} 值大于阴性对照的 2 倍以上者为阳性.

1.5 细胞增殖实验

用以检测人 T 细胞对 rAB 抗原的增殖反应, 以鉴定抗原特异 T 细胞克隆的存在. 取上述孵育 T 细胞 (Hp^- 和 Hp^+), 等量接种 200 μ l (5×10^4 /孔) 至 96 孔板中, 并加入含不同浓度重组蛋白 rAB 的培养液, 空白为不含细胞的完全培养基, 阴性对照为不含 rAB 的空白培养基及细胞, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 72 h 左右, 四唑盐比色法 (MTT)

* 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: 020-85141532, E-mail: baiyang1030@hotmail.com

收稿日期: 2002-11-20, 接受日期: 2002-12-28

测定细胞增殖程度。

1.6 流式细胞术 (FCM) 检测 FasL 表达

取上述 *Hp* 阴性者 T 细胞 (无增殖效应), 用 4℃ 预冷的 PBS 离心洗涤 2 次, 1 000 r/min 10 min, 加入 PBS (含 1.0% 小牛血清白蛋白) 稀释的兔抗人 FasL 抗体, 置冰上 30 min, 用 4℃ 预冷的 PBS 离心洗涤 2 次, 1 000 r/min 10 min, 加入 PBS (含 1.0% 小牛血清白蛋白) 稀释的 FITC 标记羊抗兔二抗, 置冰上 30 min, 用 4℃ 预冷的 PBS 离心洗涤 2 次, 1 000 r/min 10 min, 加入 1% 的多聚甲醛固定, FCM 分析, 比较处理组与非处理组, 评价 FasL 升高情况。

1.7 二苯胺 (DPA) 法测定 T 细胞凋亡率

取上述 *Hp* 阴性者 T 细胞 (无增殖效应), 等量接种 100 μ l (2×10^5 /孔) 至 96 孔板中, 并分别加入培养液对照、rAB (10 mg/L) 和 *Hp* (ATCC26695) 孵育 24 h, 收集细胞, 采用 DPA 法测定 T 细胞凋亡率^[4]。

1.8 光镜定量计数法测定黏附作用

胃癌细胞 MGC 803 接种于带盖玻片的 6 孔板中培养至形成单细胞层, PBS 漂洗后将 *Hp* 悬液 (10^9 CFU/ml) 滴至盖玻片上, 37℃ 湿盒内孵育 40 min, 彻底漂洗以去除未黏附细菌, 自然干燥, 革兰氏染色, 油镜下计算每个细胞周围黏附的细菌数, 每份标本共随机计数 10 个细胞。本实验共分 2 组: 抗 rAB 血清处理组、免疫前兔血清处理组, 2 组分别以相应血清 (1:50) 与 *Hp* 在室温下预孵育 10 min 后再进行黏附试验。

2 结 果

2.1 rAB 的免疫原性研究

2.1.1 *Hp* 阳性患者血清中检测出抗 rAB 抗体: 共检测了 55 份血清, 以 rAB 包被抗原, 同时以胃镜活检组织的 RUT 结果作为平行对照。表 1 为 RUT 及 rAB 抗原包被下血清抗 *Hp* 抗体的检测结果, 评价判断一致性程度的指标卡帕系数 (Kappa)

Table 1 Results of RUT and detection of anti-*Hp* antibodies by ELISA coated with rAB antigen

rAB coated	RUT	
	+	-
+	33	1
-	5	16

为 0.76 (一般 Kappa 值大于 0.75, 说明一致程度已相当满意), 且两法检测 3 份阳性血清均为阳性。

2.1.2 人 T 细胞对 rAB 的增殖反应: 如图 1 所示, rAB 可刺激 *Hp*⁺ T 细胞的增殖 (>200%), 而不能刺激 *Hp*⁻ T 细胞的增殖, 说明在 *Hp*⁺ 者的外周血中存在 AB 的特异性淋巴细胞克隆, 当再次遇到 AB 时, 可发生明显增殖, 但这种增殖与抗原的刺激浓度无关。

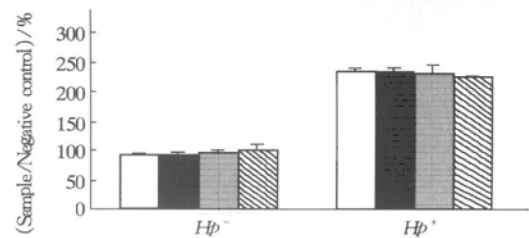


Fig. 1 Proliferation of T cells in response to recombinant rAB

□: 10 mg/L; ■: 3 mg/L; ▨: 1 mg/L; ▩: 0.3 mg/L.

2.2 rAB 的安全性研究

2.2.1 rAB 无明显调节 T 细胞表达 FasL 的作用: 为探求 rAB 在 Fas/FasL 介导的机体 T 细胞耐受中的作用, 应用 FCM 对 rAB 诱导 T 细胞表达 FasL 的能力进行了检测。结果发现 *cagA* 阳性 *Hp* 株 ATCC26695 提高了 T 细胞分泌 FasL, 而 rAB 无此作用 (图 2)。

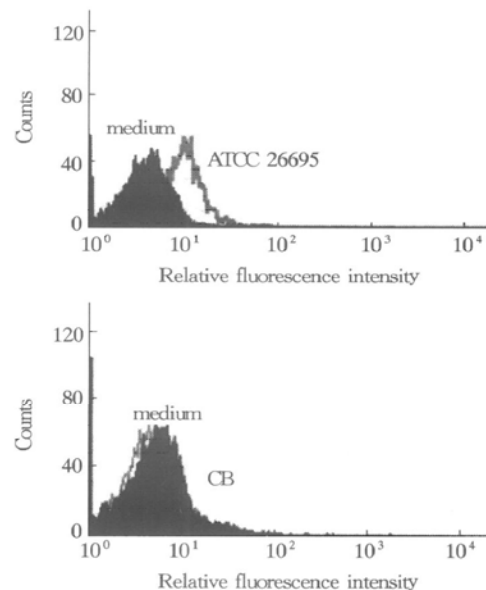


Fig. 2 FasL expressed by T cells in response to recombinant rAB

2.2.2 rAB 致 *Hp* 阴性者 T 细胞凋亡的能力: 比较了 rAB 和 *cagA* 阳性 *Hp* 活菌致 T 细胞凋亡的作用. 结果发现培养液对照、rAB 及 ATCC26695 的杀伤率 ($\bar{x} \pm s$) 分别为 7.4 ± 3.7 、 10.6 ± 4.7 及 61.3 ± 11.6 . 其中, ATCC26695 的杀伤率与培养液对照及 rAB 比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 而 rAB 的杀伤率与培养液对照之间无显著性差异.

2.3 rAB 抗血清抑制 *Hp* 与胃细胞的黏附

经免疫前兔血清或抗 rAB 兔血清预孵育后, 细胞周围黏附的细菌数 ($\bar{x} \pm s$) 分别为 157.9 ± 60.0 、 26.5 ± 11.3 . 光镜下可见, 与正常兔血清相比, 经抗 rAB 兔血清预处理后, 细胞周围细菌数明显减少 (图 3 和图 4, $P < 0.01$), 部分 *Hp* 发生球变.

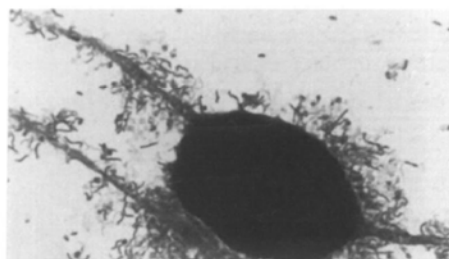


Fig. 3 Binding of *H. pylori* to human gastric epithelial cell MGC-803 under light microscopy when pretreated the bacteria with pre-immune rabbit serum (Gram staining $\times 1000$)

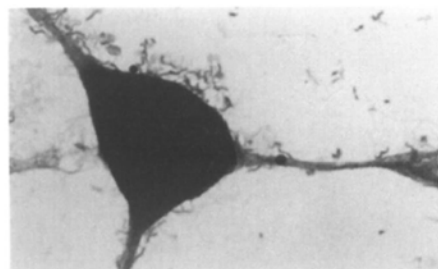


Fig. 4 The adhesion of *H. pylori* to MGC 803 was significantly inhibited when pretreated the bacteria with anti-rAB rabbit serum (Gram staining $\times 1000$)

3 讨 论

已有学者通过自然感染 *Hp* 患者的获得性细胞和体液免疫来寻找合适的 *Hp* 疫苗候选抗原^[5], 这些蛋白质包括尿素酶、热休克蛋白 60 等, 进一步的动物实验和人体实验已证明它们是有效的, 表明这种寻找 *Hp* 疫苗抗原的方法是可行的. 我们的研究显示 *Hp* 阳性患者血清中检测出抗 rAB 抗体与

RUT 实验一致, 表明抗 rAB 抗体存在于正在感染的患者血清中, 提示 rAB 可致机体产生特异的体液免疫. 同时, rAB 可刺激 *Hp*⁺ T 细胞的增殖, 并且这种增殖并不随着抗原浓度的增加而增加 ($P > 0.05$), 低剂量的抗原即可获得明显的增殖效果, 表明 *Hp* 阳性患者存在 rAB 致敏的 T 细胞, 提示低剂量 rAB 可致机体产生特异的细胞免疫. 然而 rAB 不能刺激 *Hp*⁻ T 细胞的增殖, 那么, 二者间的作用究竟如何呢?

在机体对外来病原的免疫反应中, T 细胞能直接参与细胞免疫并控制 B 细胞产生抗体, 对外来抗原的免疫耐受也多由 T 细胞介导. 已有文献证实^[6,7], *Hp* 感染时胃 T 细胞增殖不活跃, 且 *Hp* 体外可导致 T 细胞凋亡, 其可能的机制之一涉及 Fas 及其配体 FasL.

Fas 又名 Fas-R、载脂蛋白 I (Apo I) 和 CD95, 是 TNF 受体族的膜蛋白分子, 为最早发现的细胞凋亡相关蛋白之一, 广泛存在于多种组织来源的细胞表面, 其配体 Fas Ligand (FasL) 则主要存在于激活的 T 细胞和 NK 细胞上^[8]. Fas/FasL 的主要作用在于维持免疫稳定, 在胸腺中清除对自身抗原起作用的未成熟 T 细胞克隆. 但在病理情况下如病毒感染、肿瘤发生时 Fas/FasL 参与了自身免疫、肿瘤逃避免疫等过程^[9]. 静止 T 细胞中 FasL 为零, 但可被氧自由基、PMA 和 Ionomycin 等 T 细胞激活药物所激活^[10]. *Hp* 或其某些蛋白质成分能够通过激活转录因子而启动 T 细胞 FasL 表达, 不仅参与损害 Fas 阳性的胃型上皮, 更能促进 T 细胞之间互相残杀, 加剧机体对 *Hp* 抗原的无反应性和免疫耐受, 从而使感染持续终生. 较明显的证据是, *cagA* 阳性菌株更常见于炎症和/或疾病较重的患者. 研究发现 *cagA* 阳性菌株比阴性菌株能够显著提高 FasL 表达和 T 细胞杀伤率 ($P < 0.05$)^[11], 感染 *cagA* 阳性菌株患者胃型上皮 AP-1 及 NF- κ B 等转录因子活性升高^[12], 结合近来发现的 T 细胞 FasL 基因的启动子区域至少有 2 个 NF- κ B 的结合位点和 3 个 AP-1 结合位点^[13], 初步推测 *cagA* 可能通过激活转录因子而启动 T 细胞 FasL 表达导致 T 细胞的凋亡.

综上所述, 通过体外实验探求 *Hp* 候选抗原对 T 细胞生长及其 FasL 表达的影响, 能够预测其作为免疫原时在细胞与分子水平的安全性. 例如, 体外实验尿素酶不损害 T 细胞生长反而促进其增殖, 从而可用作安全、高效的免疫原. 外膜蛋白 *Hp* aA

和 Hop25 仅有微弱的抑制 T 细胞生长的作用, 可以在疫苗中试用^[6]. 而外膜蛋白 Hop38 显著提高 T 细胞 FasL 表达, 致使 T 细胞凋亡, 在实际应用中, 可能因不能刺激 T 细胞产生足够有效的辅助细胞因子, 而不能获得保护免疫所需的足量抗体^[6].

本研究表明, cagA 阳性 *Hp* 株 ATCC26695 明显提高了 T 细胞 FasL 的表达, 导致了大量 T 细胞的凋亡 ($P < 0.05$), 而 rAB 无此作用. 由此初步证实 rAB 不会通过抑制 T 细胞而导致免疫耐受机制的发生, 可安全用于疫苗研制.

事实上, 从 1990 年开始, 一些细菌外膜孔素 (porin) 较高分辨率的三维结构解析已不断获得成功^[14, 15], 并证实 porin 是一些物质 (如营养物质或药物) 进出细胞膜的运输通道, 涉及到多种功能, 如病原体耐药性的产生, 诱导宿主免疫等^[16]. 由于 porin 蛋白仅有中等程度的抗原变异且免疫电镜显示具有暴露于膜表面的抗原表位^[17], 并且 porin 蛋白可能被巨噬细胞提呈给 T 细胞而直接参与免疫反应的诱导^[18], 因此一些病原体的 porin 已用于疫苗的研制. 研究发现 porin 源疫苗诱导了体液和细胞免疫, 并具有明显的保护作用^[19]. 另外, 已有体外实验证实淋巴细胞与 *Hp* 的 porin 一起培养 3 h 后, 即有 IL-1 的分泌, 而 IL-1 能抑制组胺释放及介导 PGE₂, 进而抑制胃酸及胃蛋白酶分泌, 对胃粘膜具有保护作用^[20].

关于抗体黏附抑制实验的结果, 我们推测尽管配体通常是位于黏附素 N 端的一段小肽, 而我们克隆的黏附素保守区位于黏附素的 C 端, 但由于黏附素的 C 端保守区是形成膜孔素的重要部分, N 端的配体通过膜孔素分泌至胞膜表面, 而抗 rAB 抗体对膜孔素的“攻击”, 破坏了膜孔素结构, 使配体无法分泌至胞膜从而抑制黏附; 或者是这一膜孔素是涉及细胞重要功能物质的通道, 它的破坏直接影响细胞功能从而间接抑制黏附. 有关这一推测还有待证实.

参 考 文 献

- 1 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
- 2 Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学指南. 北京: 科学出版社, 1998. 414~ 435
- 3 Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Translated by Yan Z Y, Wang H L. Short Protocols in Molecular Biology. Beijing: Science Press, 1998. 414~ 435
- 3 唱韶红, 熊凌霜. 对 IL-4 两种测活方法的比较及 MTT 法最适条件确定. 免疫学杂志, 2000, **16** (4): 300~ 303
Cang S H, Xiong L S. Immun J, 2000, **16** (4): 300~ 303
- 4 蒋定文, 郭明秋, 陈立茵, 等. 热应激诱导的胸腺细胞凋亡及相关分子表达. 中国免疫学杂志, 2001, **17** (5): 232~ 235
Jiang D W, Guo M Q, Cheng L Y, et al. Chin Immun J, 2001, **17** (5): 232~ 235
- 5 Zevering Y, Jacob L, Meyer T F. Naturally acquired human immune responses against *Helicobacter pylori* and implications for vaccine development. Gut, 1999, **45** (3): 465~ 474
- 6 王继德, 陈 烨, 赖卓胜, 等. cagA 与其他种幽门螺杆菌疫苗候选抗原对 Fas/ FasLigand 介导 T 细胞凋亡的调节作用. 中华医学杂志, 2000, **80** (11): 816~ 820
Wang J D, Chen Y, Lai Z S, et al. Chin Med J, 2000, **80** (11): 816~ 820
- 7 Haeberle H A, Kubln M, Bamford K B, et al. Differential stimulation of interleukin 12 (IL-12) and IL-10 by live and killed *Helicobacter pylori* in vitro and association of IL-12 production with gamma interferon-producing T cells in the human gastric mucosa. Infect Immun, 1997, **65** (10): 4229~ 4235
- 8 Strater J, Wellisch I, Riedl S, et al. CD95 (APO-1/ Fas) - mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. Gastroenterology, 1997, **113** (1): 160~ 167
- 9 O'Connell J, O'Sullivan G C, Collins J K, et al. The Fas counterattack: Fas mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas Ligand. J Exp Med, 1996, **184** (5): 1075~ 1082
- 10 Wang R, Zhang L, Yin D, et al. Protein kinase C regulates Fas (CD95/ APO-1) expression. J Immunol, 1998, **161** (5): 2201~ 2207
- 11 王继德, 陈 烨, 赵进军, 等. 幽门螺杆菌感染时 Fas/ FasLigand 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. Chin Digestion J, 2001, **21** (3): 148~ 151
- 12 Glocker E, Lange C, Covacci A, et al. Proteins encoded by the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF-kappa B activation. Infect Immun, 1998, **66** (5): 2346~ 2348
- 13 Matsui K, Fine A, Ahu B, et al. Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: Functional analysis in T cell hybridomas. J Immunol, 1998, **161** (7): 3469~ 3473
- 14 Weiss M S, Wacker T, Weckesser J, et al. The three-dimensional structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 3 Å resolution. FEBS Lett, 1990, **267** (2): 268~ 272
- 15 王大成. 结构生物学研究的一些新进展. 生物化学与生物物理进展, 1998, **25** (5): 396~ 403
Wang D C. Prog Biochem Biophys, 1998, **25** (5): 396~ 403
- 16 Thompson D K, Deal C D, Ison C A, et al. A typing system for neisseria gonorrhoeae based on biotinylated oligonucleotide probes to PIB gene variable regions. J Infect Dis, 2000, **181** (5): 1652~ 1660
- 17 Haake D A, Champion C I, Martinich C, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. J Bacteriol, 1993, **175** (13): 4225~ 4234
- 18 Barnett J K, Barnett D, Bolin C A, et al. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. Infect Immun, 1999, **67** (2): 853~ 861
- 19 Haake D A, Mazel M K, McCoy A M, et al. Leptospiral outer

membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. Infect Immun, 1999, 67 (12): 6572~ 6582

20 Crabtree J E, Farmery S M. *Helicobacter pylori* and gastric

mucosal cytokines evidence that cag A-positive strains are more virulent. Lab Invest, 1995, 73 (6): 742~ 745

Study of Immunogenicity and Safety and Adherence of Conservative Region of Four *Helicobacter pylori* Adhesin *In vitro**

BAI Yang, ZHANG Ya-Li**, CHEN Ye, WANG Ji-De, ZHOU Dian-Yuan

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

Abstract To evaluate its safety, biological activity and immunogenicity of the recombinant *H. pylori* (*Hp*) adhesin conservation region (AB) *in vitro* so that to determine the feasibility of AB in *Hp* vaccination. ELISA assay was used to measure AB-specific antibody in serum of *Hp* infected patients. The proliferation of T cell in response to AB was examined by MTT test. Flow cytometry was used to evaluate the increase in FasL expression on T cells under the stimulation of *Hp* AB, T cell apoptosis induced by AB was detected by DAP assay. The effect of anti-AB serum on *Hp* binding of human gastric carcinoma cell lines was determined by light microscopy. Antibodies were detected in sera samples from 55 patients by ELISA, with RUT as parallel compare. Kappa value is 0.76. The low dose AB was capable of stimulating proliferation of T cells from *Hp* positive subjects. The effect of AB was significantly lower in both the induction of apoptosis and FasL expression of T cells than that of ATCC26695. Anti-AB serum could partially inhibit *Hp* binding to gastric epithelial cells. Under light microscopy, the adhesion of *Hp* to MGC-803 was significantly inhibited when pretreated the bacteria with anti-AB rabbit serum, compared with negative control which pretreated with pre-immunized rabbit serum. AB was a safe, immunogenicity thallus component, which can stimulate humoral and cellular immunity. Its antibody was capable of preventing the binding of *Hp* to gastric epithelial cell.

Key words *Helicobacter pylori*, conservative region of adhesin, immunogenicity, safety, adherence

* 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.

** Corresponding author. Tel: 86-20-85141532, E-mail: baiyang1030@hotmail.com

Received: November 20, 2002 Accepted: December 28, 2002