

黏附素保守区疫苗防治鼠幽门螺杆菌感染

白杨, 梁燕玲, 刘秀丽, 施理, 王继德, 张兆山, 周殿元, 张亚历

白杨, 梁燕玲, 施理, 王继德, 周殿元, 张亚历, 南方医科大学南方医院
全军消化病研究所 广东省广州市 510515
刘秀丽, 张兆山, 军事医学科学院生物工程研究所 北京市 100071
白杨, 男, 1973-10-30 生, 山西太原人, 汉族, 2002 年第一军医大学博士研
究生毕业, 主治医师, 讲师, 主要从事消化系统疾病的基础与临床研究
国家自然科学基金资助项目, No. 30170890, No. 30270078
“863” 计划专题资助项目, No. 102-07-03-06
军队“十五”医药卫生科研课题资助项目, No. OIMA-132
项目负责人: 张亚历, 510515, 广东省广州市广州大道北 1838 号, 南方医科
大学南方医院全军消化病研究所. Baiyang1030@hotmail.com
电话: 020-61641531
收稿日期: 2004-12-10 接受日期: 2005-01-08

Prevention and treatment of *Helicobacter pylori* infection with adhesin conservatory region vaccine: an animal model study

Yang Bai, Yan-lin Liang, Xiu-Li Liu, Li Shi, Ji-De Wang, Zhao-Shan Zhang, Dian-Yuan Zhou, Ya-Li Zhang

Yang Bai, Yan-Lin Liang, Li Shi, Ji-De Wang, Dian-Yuan Zhou, Ya-Li Zhang, PLA Institute for Digestive Medicine, Nan Fang Hospital, Nan Fang Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Xiu-Li Liu, Zhao-Shan Zhang, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30170890, No. 30270078, State “863” Program of China, No. 102-07-03-06; and the Tenth Five-year Plan for Medical Science Development of the Army, No. OIMA-132
Correspondence to: Professor Ya-Li Zhang, Chinese PLA Institute for Digestive Medicine, Nan Fang Hospital, Nan Fang Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. Baiyang1030@hotmail.com
Received: 2004-12-10 Accepted: 2005-01-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of *Helicobacter pylori* (*H pylori*) adhesin conservatory region vaccine in the prevention and treatment of *H pylori* infection in a mouse model.

METHODS: The study was divided into two parts. In the first part, the specific germ free C57BL/6 mice were orally immunized with vaccine (100 μ g) plus cholera toxin (CT) (2 μ g), vaccine (100 μ g), CT(2 μ g), or PBS once a week for four weeks. Two weeks after the last immunization, all animals were challenged by live *H pylori*, and were sacrificed 4 weeks after the challenge. In the second part, *H pylori* infected mice were treated in the same way as in the first part. Four weeks after the last treatment, all animals were sacrificed, and the stomach biopsies were collected to detect *H pylori* by the semi-quantitative bacterial culture assay.

RESULTS: The prophylactic rate from *H pylori* infection was 61.5% (16/26) in the mice immunized with vaccine plus CT. The eradication rate of the vaccine plus CT group was 38.5% (10/26). No protective or therapeutic effect was observed in all other 3 groups. The *H pylori* colony density in the vaccine plus CT group was significantly lower than those in other three groups in the second part of experiment ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The vaccine consisting of adhesin conservatory region and adjuvant is not only effective in the prevention, but also in the treatment of *H pylori* infection.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Adhesin; Conservatory region; Vaccine

Bai Y, Liang YL, Liu XL, Shi L, Wang JD, Zhang ZS, Zhou DY, Zhang YL. Prevention and treatment of *Helicobacter pylori* infection with adhesin conservatory region vaccine: an animal model study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(4):468-471

摘要

目的: 利用人类幽门螺杆菌(*H pylori*)感染的小鼠模型研究黏附素保守区(AB)疫苗在预防与治疗*H pylori*感染的作用。

方法: 实验分为预防与治疗两部分.预防部分把实验动物无特定致病菌 C57BL/6 小白鼠分成 4 组, 分别通过灌胃方法给予 AB(100 μ g)加 CT(2 μ g)、生理盐水、单纯 AB(100 μ g)、单纯 CT(2 μ g), 1 次/wk, 共 4 次. 2 wk 后再用活 *H pylori* 灌胃, 再 4 wk 后处死动物.治疗部分把已感染 *H pylori* 的小白鼠分成 4 组, 分组与治疗部分同预防部分, 治疗结束后 4 wk 处死动物, 取胃黏膜行半定量细菌培养检查 *H pylori* 情况。

结果: 预防实验的保护率分别为 AB 加 CT 61.5%(16/26), 单纯 AB、单纯 CT 和 PBS 保护率均为 0. AB 加 CT 治疗组 *H pylori* 根除率为: 38.5%(10/26), 生理盐水组、单纯 AB、单纯 CT 组均无治疗作用. 治疗组未根除 *H pylori* 的小鼠, 疫苗组 *H pylori* 的定植密度明显低于其他 4 组($P < 0.05$).

结论: 由 AB 加免疫佐剂组成的口服疫苗, 不仅有预防 *H pylori* 感染的作用, 同时也有根除已感染的 *H pylori* 的作用. AB 可用于 *H pylori* 疫苗的研制。

关键词: 幽门螺杆菌; 黏附素; 保守区; 疫苗

白杨, 梁燕玲, 刘秀丽, 施理, 王继德, 张兆山, 周殿元, 张亚历. 黏附素保守区疫苗防治幽门螺杆菌感染. 世界华人消化杂志 2005;13(4):468-471
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/468.asp

0 引言

我们已构建了幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H pylori*) 黏附素保守区 AB 的高效原核表达体系^[1-2], 表达产物经过纯化后已在体外探讨了其安全性、免疫原性和生物活性^[3-4]. 现利用 *H pylori* 感染的小鼠模型研究黏附素保守区 (AB) 疫苗在预防与治疗 *H pylori* 感染的作用, 为黏附素源 *H pylori* 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, 无特定病原体 (specific-pathogen free, SPF) C57BL/6 雄性小鼠 140 只, 4 周龄, 12-13 g, 饲养条件符合 2 级动物要求. 重组黏附素保守区 rAB, 快速尿素酶试剂由本所制备; 其余试剂为国产分析纯.

1.1.1 *H pylori* 的培养与鉴定 *H pylori* 的固体培养: 取冷冻保存的 *H pylori* 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 (50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂, 850 mL/L N₂) 中培养 72 h, 湿度保持 95% 以上. *H pylori* 的菌落呈圆形, 凸起、光滑、灰白色、半透明, 直径 0.2-0.8 mm. 液体培养: 取固体培养基上生长的 *H pylori* 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, 恒温振荡培养 120 r/min 培养 48-72 h. *H pylori* 的鉴定包括菌落形态、涂片观察 (包括革兰染色观察细菌形态、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 *H pylori* 感染时试剂由黄色变为红色). 灌胃用 *H pylori* 的要求: 革兰染色阴性, 形态呈 S 形、螺旋形、杆状, 暗视野下有活力, 不含杂菌, 密度约为 10¹²/L.

1.1.2 *H pylori* 感染小鼠模型的建立 采用文献 [5] 方法驯化 *H pylori* ss1 株, 分离可在小鼠胃内稳定定植的 *H pylori* ss1 株, 固体培养 2-3 d, 菌落经鉴定后用布氏肉汤洗下, 调整细菌浓度至 10¹² CFU/L, 每只小鼠灌胃 0.5 mL (约 10¹²/L). 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 wk 完成. 采用胃管法以确保 *H pylori* 灌入胃内. 末次灌胃后 4 wk 随机处死 5 只小鼠, 剖腹取胃, 沿纵轴将胃切为三部分, 一份行快速尿素酶试验, 一份置 40 g/L 甲醛固定供组织学检查, 一份细菌培养, 检查是否感染 *H pylori*. 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 *H pylori*. 细菌培养发现

H pylori 的定植密度为 10⁵⁻⁶/g.

1.2 方法

1.2.1 免疫预防实验 共设 4 组. 单价黏附素保守区疫苗组经口喂饲黏附素保守区 100 μg 加 CT2 μg; 单纯黏附素保守区组经口喂饲黏附素保守区 100 μg; 单纯 CT 组经口喂饲 CT2 μg; PBS 组经口喂饲 PBS 200 μL. 免疫前小鼠禁食 12 h, 禁水 4 h. 每只小鼠先用 30 g/L 的碳酸氢钠 100 μL 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 3 次, 剂量同前. 末次接种后 2 wk 按前述方法接种 *H pylori* SS1. 末次接种 *H pylori* SS1 后 4 wk 处死动物, 去除前胃, 余胃黏膜行半定量细菌培养法检查.

1.2.2 免疫治疗实验 将前述已鉴定感染 *H pylori* 的小鼠分成 4 组. 分组、治疗剂量与方法同免疫预防实验, 1 次/wk, 共 4 次. 治疗结束后 4 wk 处理动物, 取材方法同上. 免疫预防和治疗后幽门螺杆菌根除的鉴定采用半定量细菌培养法^[6].

统计学处理 采用 SPSS10.0 软件, 行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 免疫预防效果 胃组织培养 *H pylori* 为阴性者定为完全保护. 黏附素保守区疫苗组的保护率为 61.5% (16/26), 其他 3 组保护率均为 0%, 其差异具有显著性 ($P < 0.05$).

2.2 免疫治疗效果 胃组织培养 *H pylori* 为阴性者定为根除. 黏附素保守区疫苗组根的根除率为 38.50 mL/L, 显著高于其他 3 组 (0%, 0%, 0%, $P < 0.05$). 未根除 *H pylori* 的小鼠, 我们进行了 *H pylori* 定植密度的分析, 结果发现疫苗治疗组 *H pylori* 的定植密度明显



图1 感染 *H pylori* 小鼠的胃黏膜.

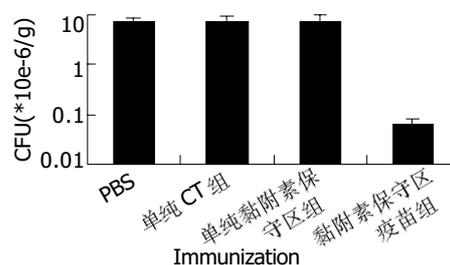


图2 菌落计数法评价免疫治疗后小鼠胃黏膜 *H pylori* 的定植情况.

低于其他3组(图2),其差异有显著性($P < 0.05$).

3 讨论

广泛用于临床根除 *H pylori* 的手段是抗菌治疗有一定的疗效^[7-9],但所需的费用是一项沉重的医疗负担.因此,世界各国政府和企业为 *H pylori* 的防治研究,特别是为既有治疗又有预防作用的 *H pylori* 疫苗的研制投入了大量经费.因为谁率先研制出 *H pylori* 疫苗,谁就将抢先占领治疗 *H pylori* 感染所面对的数百亿的市场.除了上述可观的经济效益,还会有预防数以亿计的消化性溃疡、MALT 淋巴瘤及胃腺癌发生所带来的巨大的社会效益.目前国内外已有全菌超声抗原和以尿素酶 B、过氧化氢酶等为主的多种基因重组抗原作为疫苗候选抗原^[10-12].但前者由于成分复杂、具有潜在毒副作用而渐遭淘汰;后者尽管大多已被现有资料证明是有效的疫苗抗原,但单独使用作为疫苗是不够的.因此,必须寻找其他有效抗原成分或研制多价疫苗防治 *H pylori* 感染.目前采用的基因重组抗原基本上着眼于阻断 *H pylori* 的毒力因素,而与 *H pylori* 定植密切相关的黏附素评价较少.如从黏附素出发寻找保护性抗原也许是一种有益的尝试.目前文献报道的 *H pylori* 黏附素较多,其中已经证实的有四种^[13-15],包括迄今为止唯一明确受体的 *H pylori* 黏附素 BabA,和经体外黏附及其相应抗体的抑制实验证明的黏附素 AlpA、AlpB 和 HopZ;然而这四种黏附素并不是存在于所有菌株中,如 BabA 存在于 CagA 致病岛阳性的菌株中,而且他们在不同的菌株中存在一定程度的变异,因此究竟选取哪种或哪些黏附素一直是困扰我们的问题.我们以前通过对4种黏附素进行同源性分析,发现了保守区,并对其进行克隆、表达、纯化和鉴定.在此基础上,评价了针对 *H pylori* 黏附因素的黏附素保守区构成疫苗的预防和治疗效果.动物实验表明,单价黏附素保守区疫苗的 *H pylori* 的完全保护率和根除率分别为 61.50 mL/L 和 38.50 mL/L,其中治疗组即使未根除的小鼠,其 *H pylori* 定植密度也有明显的降低($P < 0.05$),表明黏附素保守区可用于 *H pylori* 疫苗候选抗原.这一候选抗原的研制既是对寻找针对 *H pylori* 黏附因素有效抗原的探索,又为研制针对 *H pylori* 多种因素的多价疫苗奠定了基础.

在 *H pylori* 保护率和根除率的研究中,我们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,这也可能是本研究保护率和根除率较其他报道低的缘故.因为在建立 *H pylori* 感染小鼠模型的预实验中,我们发现接种 *H pylori* 1 wk 后的部分小鼠,细菌培养阳

性,而尿素酶实验和组织病理学检测结果阴性.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?张振华 *et al* 发现尿素酶实验形成阳性需要的细菌浓度是细菌培养阳性的 100-1 000 倍;并且由于试剂、技术以及胃内存在着产尿素酶杂菌的原因,与细菌培养相比,其还存在着较高的假阳性.组织病理学检查也存在着上述问题,特别是在 *H pylori* 量较少时,仅凭形态特征与胃内可能出现的成百上千种其他杂菌区别是非常困难的,甚至是不可能的.所以,作者认为,就敏感性与特异性而言,金标准只有一个,就是细菌培养.国外学者也研究了各种评价 *H pylori* 定植方法的敏感性^[16-21],结果表明,尿素酶实验和组织学检查显示的9只细菌阴性的免疫小鼠,细菌培养检测均呈阳性.尿素酶试验的敏感性与组织学检测相同,其敏感性大约是每克胃组织 10^5 细菌;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 *H pylori* 定植的唯一标准.我们仅是对 *H pylori* 黏附素源疫苗的初步尝试,未来 *H pylori* 疫苗可能是针对 *H pylori* 多种因素^[22-29],包括过氧化氢酶、尿素酶 B 亚单位、黏附素保守区等构成的多价疫苗,有关这方面的研究,我们的实验正在进行中.

4 参考文献

- 1 白杨,张亚历,王继德,林焕健,张兆山,周殿元.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;22:869-871
- 2 白杨,但汉雷,王继德,张兆山, Odenbreit S,周殿元,张亚历.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;29:922-926
- 3 白杨,张亚历,王继德,张兆山,周殿元.幽门螺杆菌黏附素基因保守区的克隆及免疫原性研究.中华医学杂志 2003;83:736-739
- 4 白杨,张亚历,陈焯,王继德,周殿元.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.生物化学与生物物理进展 2003;30:422-426
- 5 Marchetti M, Arico B, Burrioni D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. Science 1995;267:1655-1658
- 6 Sutton P, Danon SJ, Walker M, Thompson LJ, Wilson J, Kosaka T, Lee A. Post-immunisation gastritis and *Helicobacter* infection in the mouse: a long term study. Gut 2001;49:467-473
- 7 史彤,刘文忠,萧树东,徐蔚文.上海地区幽门螺杆菌对抗生素耐药率的变迁史彤.中华内科杂志 2000;39:576
- 8 郑松柏,项平,徐富星,顾同进.四种短程三联疗法根除幽门螺杆菌的随机对照临床研究.中华内科杂志 1999;38:117
- 9 梁晓,陆红,刘文忠,徐蔚文,萧树东.3种幽门螺杆菌根除方案和抗生素耐药对其根除率的影响.胃肠病学 2003;8:340-343
- 10 Lin HJ, Xue J, Bai Y, Wang JD, Zhang YL, Zhou DY. Pathogenicity and immune prophylaxis of cag pathogenicity island gene knockout homogenic mutants. World J Gastroenterol 2004;10:3289-3291
- 11 Bai Y, Li LR, Wang JD, Chen Y, Jin JF, Zhang ZS, Zhou DY, Zhang YL. Expression of *Helicobacter pylori* Hsp60 protein and its immunogenicity. World J Gastroenterol 2003;9:2711-2714
- 12 Bai Y, Zhang YL, Jin JF, Wang JD, Zhang ZS, Zhou DY. Recombinant *Helicobacter pylori* catalase. World J Gastroenterol 2003;9:1119-1122

- 13 白杨, 唱韶红, 王继德, 陈焯, 张兆山, 张亚历. 表达幽门螺杆菌黏附素 BabA 重组蛋白菌株的构建及其黏附活性评价. 第一军医大学学报 2003;23:293-295
- 14 白杨, 张亚历, 王继德, 杨云生, 张兆山, 周殿元. 幽门螺杆菌黏附素 AlpA 基因的克隆及高效表达. 第四军医大学学报 2002;23:1490-1492
- 15 Bai Y, Zhang YL, Wang JD, Zhang ZS, Zhou DY. Construction of attenuated *Salmonella typhimurium* Strain expressing *Helicobacter pylori* conservative region of adhesin antigen and its immunogenicity. *World J Gastroenterol* 2004;10:2498-2502
- 16 Graham DY, Kudo M, Reddy R, Opekun AR. Practical rapid, minimally invasive, reliable nonendoscopic method to obtain *Helicobacter pylori* for culture. *Helicobacter* 2005;10:1-3
- 17 Lee A. Animal models for host-pathogen interaction studies. *Br Med Bull* 1998;54:163-173
- 18 Panthel K, Faller G, Haas R. Colonization of C57BL/6J and BALB/c wild-type and knockout mice with *Helicobacter pylori*: effect of vaccination and implications for innate and acquired immunity. *Infect Immun* 2003;71:794-800
- 19 Lucas B, Bumann D, Walduck A, Koesling J, Develioglu L, Meyer TF, Aebischer T. Adoptive transfer of CD4+ T cells specific for subunit A of *Helicobacter pylori* urease reduces *H pylori* stomach colonization in mice in the absence of interleukin-4(IL-4)/IL-13 receptor signaling. *Infect Immun* 2001;69:1714-1721
- 20 Sutton P, Wilson J, Lee A. Further development of the *Helicobacter pylori* mouse vaccination model. *Vaccine* 2000;18:2677-2685
- 21 Del Giudice G, Ghiara P, Rappuoli R. Experimental model of *Helicobacter pylori* infection. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998;30(Suppl 3):S261-S263
- 22 Nomura S, Suzuki H, Masaoka T, Kurabayashi K, Ishii H, Kitajima M, Nomoto K, Hibi T. Effect of dietary anti-urease immunoglobulins on *Helicobacter pylori* infection in mongolian gerbils. *Helicobacter* 2005;10:43-52
- 23 Gottwein JM, Blanchard TG, Targoni OS, Eisenberg JC, Zagorski BM, Redline RW, Nedrud JG, Tary-Lehmann M, Lehmann PV, Czinn SJ. Protective anti-*Helicobacter* immunity is induced with aluminum hydroxide or complete Freund's adjuvant by systemic immunization. *J Infect Dis* 2001;184:308-314
- 24 Ozpolat B, Rao XM, Lachman LB, Osato MS, Graham DY. Quantitative and bioluminescent assay to measure efficacy of conventional and DNA vaccinations against *Helicobacter pylori*. *Comb Chem High Throughput Screen* 2000;3:289-302
- 25 林焕建, 王继德, 白杨, 张亚历, 周殿元. 幽门螺杆菌表面抗原免疫保护作用的体外与活体研究. 中国微生态学杂志 2003;15:4-6
- 26 Messina GA, Torriero AA, De Vito IE, Olsina RA, Raba J. Continuous-flow/stopped-flow system using an immunobiosensor for quantification of human serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori*. *Anal Biochem* 2005;337:195-202
- 27 Calvet X. *Helicobacter pylori* eradication treatment in non-ulcerous disease. *Gastroenterol Hepatol* 2005;28:40-46
- 28 Veneri D, Franchini M. Onset of idiopathic thrombocytopenia after *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter* 2005;10:95
- 29 Pearce MS, Steele JG, Campbell DI, Thomas JE. Tooth Loss and *Helicobacter pylori* Seropositivity: the Newcastle Thousand Families Cohort Study at Age 49-51 Years. *Helicobacter* 2005;10:90-94

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第一届全球华人消化内镜学术大会征文通知

本刊讯 2005-10-14/2005-10-16将在上海隆重召开由中华消化内镜学会主办、第二军医大学承办的第一届全球华人消化内镜学术大会。大会的官方语言为中文和英文，现将会以征文有关事项通知如下：

1 会议内容

有关消化内镜基础和临床应用研究相关内容：包括上消化道内镜、大肠镜、超声内镜、小肠镜、胶囊内镜、ERCP 的诊断与治疗各个领域。

2 征文要求

(1)所投论文须为尚未在国内外相关领域杂志刊出或尚未被其他国际或国内学术会议收录的摘要。(2)凡报送的论文要求中英文摘要(中文摘要1000字以内)各一份,英文摘要的格式及具体要求请参考大会论文摘要投稿须知。此外从大会的官方网站 <http://www.csde.org.cn/wcge/> 直接下载论文摘要表。(3)摘要的内容可以电子邮件的形式发至WCGE2005秘书处收;也可以直接邮寄打印稿寄3.5寸软盘。(4)所有被大会接受的论文摘要都将被收入大会论文集。(5)截稿日期:2005-05-31。(6)大会秘书处的联系方式:北京市东四西大街42号中华医学会学术会务部 刘亚君;邮编:100710, 电话:010-65251575。