

抗 VacA⁺ CagA⁺ 幽门螺杆菌 IgY 的抗感染作用研究*

傅颖媛¹ 黎健² 李娟^{1,3} 曾小平¹ 况南珍¹

(南昌大学医学院免疫学教研室 南昌 330006)¹ (复旦大学公共卫生学院 上海 200032)²
(赣南医学院 赣州 341000)³

摘要: 为研究抗 VacA⁺ CagA⁺ 幽门螺杆菌 (Hp) IgY 的抗感染作用, 以 VacA⁺ CagA⁺ Hp 为抗原免疫蛋鸡, 聚乙二醇法和水稀释法从鸡卵黄中提取抗-VacA⁺ CagA⁺ Hp-IgY, 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 测定 IgY 抗体效价。建立胃腔感染 VacA⁺ CagA⁺ Hp 的昆明系小鼠模型, 观察抗-VacA⁺ CagA⁺ Hp-IgY 对小鼠胃腔感染 VacA⁺ CagA⁺ Hp 的防治效果。ELISA 法测定 IgY 效价均为 1: 20, 480; 抗-VacA⁺ CagA⁺ Hp-IgY 防治小鼠胃腔感染 VacA⁺ CagA⁺ Hp 效果较理想, IgY 高、中剂量组效果优于阳性对照组 ($P < 0.05$); 低剂量组效果等同于阳性对照组 ($P > 0.05$)。抗-VacA⁺ CagA⁺ Hp-IgY 较好的体内抗感染作用, 提示该 IgY 有望成为较理想的治疗 VacA⁺ CagA⁺ Hp 感染的生物制剂。

关键词: VacA⁺ CagA⁺ 幽门螺杆菌, IgY

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0017-05

Study on Effect of ANTI-VacA⁺ CagA⁺ *Helicobacter pylori*-IgY Against VacA⁺ CagA⁺ Hp*

FU Ying-Yuan¹ LI Jian² LI Juan^{1,3} ZENG Xiao-Ping¹ KUANG Nan-Zhen¹

(The Immunology Department of the Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006)¹

(College of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032)²

(Gannan Medical College, Ganzhou 341000)³

Abstract: To study effect of anti- VacA⁺ CagA⁺ *Helicobacter pylori* (Hp) -IgY against VacA⁺ CagA⁺ Hp, the titer of IgY extracted by PEG method and water dilution method from egg yolks of hens immunized with VacA⁺ CagA⁺ Hp was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The Kunming mice model infected by VacA⁺ CagA⁺ Hp were created and applied to observe the prevention and treatment effects of anti- VacA⁺ CagA⁺ Hp-IgY against VacA⁺ CagA⁺ Hp infection in stomach of model mice. The titer of anti- VacA⁺ CagA⁺ Hp-IgY is 1: 20, 480 by ELISA. The result *in vivo* showed that the IgY had good effects in protecting Kunming mice against VacA⁺ CagA⁺ Hp. The effects of high dose and medium dose IgY are better than that of the positive control ($P < 0.05$). The effect of low dose IgY is nearly equal with that of positive control ($P > 0.05$). The good effect of anti-VacA⁺ CagA⁺ Hp-IgY against VacA⁺ CagA⁺ Hp *in vivo* indicates that it could be a hopefully orally biological preparation against VacA⁺ CagA⁺ Hp.

Key words: VacA⁺ CagA⁺ *H. pylori*, IgY

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是一种引起人类消化道疾病的重要病原菌。Hp 分两型^[1], 其中 I 型 Hp (VacA⁺ CagA⁺ Hp) 能产生活性空泡细胞毒素 (active vacuolating cytotoxin, VacA) 和细胞毒素相关蛋白 A (cytotoxin associated gene, CagA), 为高毒株, 与人类胃炎、胃及十二指肠溃疡、胃腺癌和胃粘膜相关性淋巴组织恶性淋巴

* 江西省卫生厅资助课题 (No. 20042016)

通讯作者 Tel: 0791-6360563 (O), E-mail: hqfyy@126.com

收稿日期: 2006-01-14, 修回日期: 2006-02-20

瘤密切相关。世界卫生组织已将 Hp 纳入胃癌的第一类致癌因子^[2]。尽管 Hp 在体外对许多抗菌药物都很敏感,但在体内用药却并不十分如意,目前抗 Hp 治疗还没有一种理想的药物。为此,对 Hp 的预防与治疗已引起国内外学者的高度关注。

鸡抗体具有从母体传递到卵黄的特性,因卵黄中仅有 IgG 抗体,故称其为卵黄免疫球蛋白 IgG (Yolk IgG, 简称 IgY)。可从鸡卵黄中获得大量 IgY。近年来国内外对 IgY 在胃肠道疾病防治方面的研究报道越来越多,Shin JH 认为 IgY 对实验动物确有被动免疫保护作用^[3],并指出 IgY 对提高人体对胃肠道疾病的抵抗力具有十分积极的作用,在免疫学研究和疾病的检测诊断、治疗中具有很好的应用前景。

本研究旨在以 VacA⁺ CagA⁺ 幽门螺杆菌为抗原免疫产蛋母鸡,制备抗 VacA⁺ CagA⁺ Hp-IgY,测定其抗体效价;建立昆明杂系小鼠胃腔感染 VacA⁺ CagA⁺ 幽门螺杆菌的动物模型,并探讨抗 VacA⁺ CagA⁺ Hp-IgY 对昆明小鼠胃腔感染 VacA⁺ CagA⁺ Hp 的防治作用,为诊断和防治幽门螺杆菌感染提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

幽门螺杆菌 *Sydney strain 1* (SS1) 菌株由南昌大学医学院一附院消化研究所提供,该菌株 VacA、CagA 均为阳性,是目前国际上一致使用的菌株。

1.2 实验动物

美国良种莱昂产蛋母鸡;昆明系小鼠:体重 18g ± 2g,雌雄各半,南昌大学医学院动物科学部提供。

1.3 抗 VacA⁺ CagA⁺ Hp-IgY 的制备

美国良种莱昂产蛋母鸡 20 只,隔离饲养 3d,将浓度为 1×10^9 cfu/mL 的 Hp 悬液(反复冻融 3 次)辅以氟氏不完全佐剂,于蛋鸡多处皮下注射 1.0mL/只;距初免 1 周和 4 周后,用单纯抗原悬液于蛋鸡腋下静脉加强免疫两次 0.5mL/只。收集鸡蛋,聚乙二醇两步沉淀法和水稀释法提取 IgY。

1.4 抗 VacA⁺ CagA⁺ Hp-IgY 的效价测定(间接 ELISA 法)

幽门螺杆菌菌液包被聚苯乙烯微孔。TBS-block 封闭过夜。加 TBS 倍比稀释的 IgY,加山羊抗鸡 IgG-AP,加底物(NBT/BCIP)室温显色 4h。加终止液后酶标仪测 OD_{490} 值。

1.5 建立昆明杂系小鼠胃腔感染 VacA⁺ CagA⁺ Hp 的动物模型

首先将小鼠禁食禁水 12h,然后经胃给 40% 乙醇 0.2mL,再继续禁食禁水 12h。取 1×10^9 CFU/mL VacA⁺ CagA⁺ Hp,每只小鼠经胃给 0.5mL。隔 12 h 重复 1 次,共 3 次,末次给菌 2h 后恢复饮食饮水。4、8 周后解剖观察小鼠感染情况^[4]。

1.6 抗 VacA⁺ CagA⁺ Hp-IgY 对昆明小鼠胃腔感染 VacA⁺ CagA⁺ Hp 的保护作用

1.6.1 实验分组:将昆明小鼠随机分为 6 组: IgY 高剂量组(15mg/mL), IgY 中剂量组(10mg/mL), IgY 低剂量组(5mg/mL),阳性对照组(丽珠得乐组),阴性对照组(单纯感染组),健康对照组(NS 对照组)。

1.6.2 实验步骤: IgY 组各鼠经胃给 10mg/mL 的 IgY 溶液 0.5mL (对照组给 NS),禁食禁水 12h,再经胃给 40% 乙醇 0.2mL,继续禁食禁水 12h 后, IgY 防治组各鼠经胃给予不同浓度 IgY 溶液 0.5mL (对照组给 NS); 1h 后除健康对照组外的各组小鼠均经胃给 1×10^9 CFU/mL VacA⁺ CagA⁺ Hp 菌液 0.5mL/只,隔 12h 各重复 1 次,共 3 次,末次给菌 2h 后恢复饮食饮水。距首次给菌 4 周后禁食禁水 12h, IgY 防治组各鼠经胃各给予

不同浓度的 IgY 溶液 0.5 mL; 阳性对照组给 27 mg/15 mL 丽珠得乐药液 0.5 mL (小鼠给药量 = 人口服剂量 (0.3) \times 9.01 \times 20 \times 10⁻³/60g); 阴性对照组和健康对照组给 NS 0.5 mL, 各重复 3 次, 间隔时间为 12h, 完成后 2h 恢复饮食饮水, 继续喂养 4 周。

处死小鼠 (前 24h 禁食禁水), 无菌取胃, 剖开, 肉眼观察胃粘膜大体情况。在胃幽门处取 2mm \times 2mm 组织数块进行涂片镜检、尿素酶试验, 其余胃组织做石蜡切片, HE 染色 (组织学检查) 和 Warthin-Starry 镀银染色 (观察 Hp), 阅片时两种染色片对照观察。

1.6.3 实验结果判定方法及标准: 鼠胃粘膜 Hp 涂片镜检: 以 -、+、++、+++、++++ 对每个视野的 Hp 数量作相对计数评分^[5], 每标本观察 5 个视野, 单个视野满分 5 分, 共 25 分。计算各组均数及标准差。尿素酶试验: 取胃幽门处粘膜 2mm \times 2mm 在无菌 NS 中漂洗干净, 放入快速尿素酶诊断试剂孔中, 滴加酶促反应液一滴, 室温 10min 后观察结果并评分。Warthin-Starry 染色切片镜检参照文献^[6]评分。HE 染色切片镜检评分: 按炎症程度、炎症活动度、萎缩性胃炎程度、肠化生、胃炎发生部位分别评分^[6]。上述尿素酶试验、W-S 染色、HE 染色 3 项, 每项 15 分, 共 45 分, 计算各组均数及标准差。

1.7 统计方法

计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析比较各组间差异有无显著性。

2 实验结果

2.1 抗 VacA⁺CagA⁺Hp-IgY 效价测定

2.1.1 免疫鸡卵黄和血清抗-VacA⁺CagA⁺Hp 抗体效价: ELISA 法测 VacA⁺CagA⁺Hp 标准菌株免疫鸡卵黄 IgY (水稀释法) 效价为 1: 20, 480, 初免 4 周和 8 周血清 IgG 效价均为 1: 10, 240 (ELISA 诊断标准: \geq 对照 OD 均值 + 4 \times 标准差), 抗 VacA⁺CagA⁺Hp-IgY 的效价高于鸡血清抗 VacA⁺CagA⁺Hp-IgG 效价。

2.1.2 免疫鸡卵黄抗-VacA⁺CagA⁺Hp-IgY 效价随时间变化: 初免 1 周后, ELISA 法测聚乙二醇法提取的抗 VacA⁺CagA⁺Hp-IgY 效价较低, 为 1: 1, 280, 然后随时间递增而上升, 2 周后为 1: 5, 120, 3 周后达到高峰, 为 1: 20, 480, 并在此水平上一直维持数月。

2.2 建立昆明杂系小鼠胃腔感染 VacA⁺CagA⁺Hp 的动物模型

小鼠在经胃给 VacA⁺CagA⁺Hp 菌液 4、8 周后, 胃粘膜涂片镜检、尿素酶试验、组织学检查均为阳性, 感染率均达到 100%。感染 4 周后小鼠胃粘膜可见轻微充血及炎症, 偶见糜烂、条索状出血和溃疡等改变; 感染 8 周后小鼠胃粘膜可见明显出血、炎症及溃疡病变 (见图 9、10)。

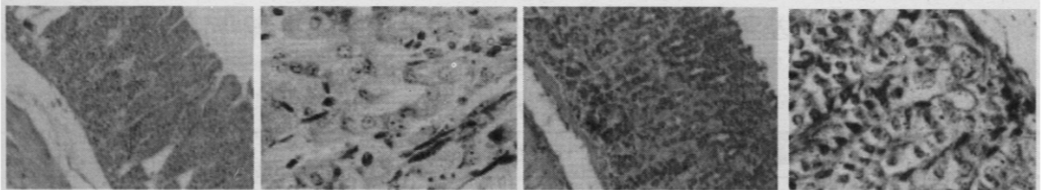


图1 IgY 高剂量组 HE \times 150 粘膜未见异常

图2 IgY 高剂量组 WS \times 600 粘膜表面未见 Hp

图3 IgY 中剂量组 HE \times 150 粘膜内有少量炎症细胞浸润

图4 IgY 中剂量组 WS \times 600 粘膜内偶见杆状 Hp 和球形体

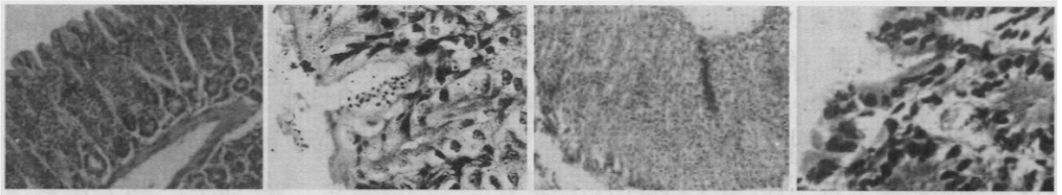


图5 IgY 低剂量组 HE ×150 粘膜内有炎症细胞浸润,腺体可见萎缩

图6 IgY 低剂量组 WS ×600 小凹内可见少量 Hp 球形体

图7 实验阳性对照组 HE ×150 粘膜及粘膜下层有少量炎症细胞浸润

图8 实验阳性对照组 WS ×600 小凹内可见少量杆状 Hp 和球形体

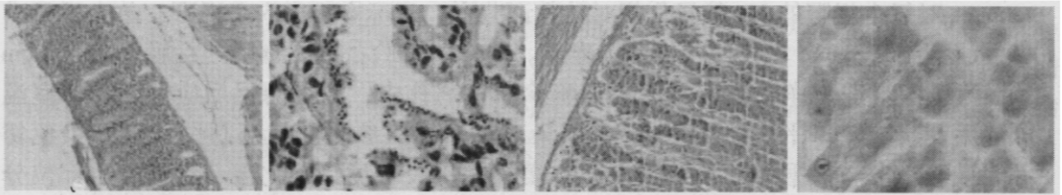


图9 实验阴性对照组 HE ×150 慢性萎缩性胃炎,腺腔扩大,粘膜变薄

图10 实验阴性对照组 WS ×600 小凹内可见大量 Hp, 大多是球形体

图11 健康对照组 HE ×150 正常胃粘膜

图12 健康对照组 WS ×600 正常胃粘膜

2.3 抗 VacA⁺CagA⁺Hp-IgY 对昆明小鼠胃腔感染 VacA⁺CagA⁺Hp 的保护作用

2.3.1 鼠胃粘膜 Hp 涂片镜检: 镜检结果显示, 除 IgY 低剂量组与阳性对照组 (丽珠得乐) 比较差异无显著性 ($P > 0.05$) 外, 其余各组间两两比较差异均有显著性 ($P < 0.01$), 说明 IgY 防治效果具有剂量依赖性。IgY 高、中剂量组效果优于阳性对照组, IgY 低剂量组效果与阳性对照组相似 (表 1)。

表 1 小鼠胃粘膜 Hp 涂片镜检评分 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

	IgY 高剂量	IgY 中剂量	IgY 低剂量	阳性对照	阴性对照	健康对照
评分	2.1667 ± 1.1690	6.6667 ± 2.5033	11.8333 ± 1.7224 [▲]	11 ± 1.8974	23.8333 ± 1.3292	0

注: ▲ VS 阳性对照组 $P > 0.05$, 其余组间两两比较 $P < 0.01$

2.3.2 尿素酶试验、W-S 染色和 HE 染色结果: (各组组织学病理变化见附图 1~12) IgY 剂量越高组小鼠组织学病理改变和 Hp 数量越少 (高剂量组胃粘膜未见 Hp 和病理改变); 阴性对照组小鼠则有明显的炎症等病理变化和大量 Hp。小鼠体内试验综合评分, 结果见表 2。经两两比较的方差分析 (q 检验) 显示, IgY 高剂量组和健康对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 即 15mg/mL IgY 组对小鼠胃腔感染 VacA⁺CagA⁺Hp 的保护作用很理想。除 IgY 低剂量组与阳性对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$) 外, 其余各组之间两两比较差异均有显著性 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 即与胃粘膜 Hp 涂片镜检结果相同。

表 2 小鼠体内试验综合评分结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

	IgY 高剂量	IgY 中剂量	IgY 低剂量	阳性对照	阴性对照	健康对照
尿素酶试验	1.0000 ± 1.5492	2.3333 ± 1.9664	4.3333 ± 3.3267	4.1667 ± 3.7639	11.6667 ± 2.5820	0
HE 染色	1.0000 ± 1.0954	3.5000 ± 2.0736	6.5000 ± 2.5100	6.3333 ± 2.5820	8.0000 ± 2.1909	0.3333 ± 0.8165
W-S 染色	1.6667 ± 2.5820	5.0000 ± 4.4721	5.8333 ± 2.0412	6.6667 ± 4.0825	7.5000 ± 2.7386	0
综合评分	3.6667 ± 2.2852 [▲]	10.8333 ± 5.4191 [*]	16.6667 ± 3.3267 [*]	17.1667 ± 2.0412 ^{**}	27.0000 ± 3.3116	0.3333 ± 0.8165 [▲]

注: ▲或#符号相同者, 两组比较 $P > 0.05$, * 者两组比较 $P < 0.05$, 其余组间两两比较 $P < 0.01$

3 讨论

Hp已被公认是上消化道疾病的重要致病因素。国外的研究表明, Hp的CagA及其表达产物CagA蛋白与胃部疾病的严重性相关^[7]。有文献指出, 拥有CagA的Hp, 无论是基因型还是表现型都与CagA⁻菌株明显不同, 其致病能力也存在明显差异。空泡细胞毒素(VacA)是Hp的一种重要的毒力因子, 它直接介导细菌毒素活性, 与消化性溃疡及胃癌密切相关。研究表明, Hp以II型分泌系统排泌VacA毒素于菌体外环境, VacA再以受体介导内吞方式进入宿主细胞并引起空泡变性。Montecucco^[8]研究了VacA基因活动的分子特征和机制, 认为VacA基因导致组织改变, 这又促进了Hp在营养缺乏的胃内生态环境中生存所必需的营养素的释放。现已知所有Hp均含有VacA基因。在体外实验中, 空泡毒素可使细胞变性、皱缩、存活率下降。陈翠萍等^[9]利用IgY抗体制剂在体外实验中发现IgY可中和空泡毒素的细胞毒活性, 使已侵入体内的Hp所产生毒素不能对机体产生毒效应。在体内, IgY与Hp结合后, 能使Hp大部分粘附因子被封闭, 阻止粘附, 降低Hp对胃粘膜的损害, 表现在病理切片上, 炎症的消退更为明显。本实验支持IgY在细菌感染初期, 可阻止Hp粘附, 感染后期可中和空泡毒素对胃粘膜上皮细胞作用的结论。

本研究以VacA⁺CagA⁺Hp为抗原免疫蛋鸡, 采用聚乙二醇法和水稀释法从鸡卵黄中提取出抗VacA⁺CagA⁺Hp-IgY, ELISA法检测其抗体效价为1:20,480。初免1周后, 抗VacA⁺CagA⁺Hp-IgY(聚乙二醇法)效价较低, 为1:1,280, 然后随时间递增而上升, 3周后达到高峰, 为1:20,480。本实验就抗VacA⁺CagA⁺Hp-IgY对昆明小鼠胃腔感染幽门螺杆菌的防治作用进行了探索。用40%乙醇破坏鼠胃内环境, 引起胃内菌群的失调, 使Hp易于定植于胃黏膜, 建立了昆明杂系小鼠胃腔感染VacA⁺CagA⁺Hp的动物模型。并应用该动物模型进行了体内实验, 结果提示, 抗VacA⁺CagA⁺Hp-IgY在预防昆明小鼠胃腔感染VacA⁺CagA⁺Hp中的作用较理想, 优于阳性对照组(丽珠得乐), 而且存在剂量依赖关系, 即在实验剂量范围内, IgY剂量越大, 预防效果越好。

抗VacA⁺CagA⁺Hp-IgY具有较好的体内抗感染作用, 且IgY稳定性及特异性好, 耐热耐酸耐碱, 制备方便产量大, 无毒副作用, 能口服。因此, 抗VacA⁺CagA⁺Hp-IgY有望成为防治Hp感染的口服免疫治疗生物制剂或食品添加剂。

参考文献

- [1] Xiang Z Y, Censini S, Bayeli P F, et al. *Infect Immun*, 1995, **63** (1): 94~98.
- [2] 胡伏莲主编. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 北京: 中国科技出版社, 2002. 329.
- [3] Shin J H, Yang M, Nam S W, et al. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, **9** (5): 1061~1066.
- [4] 朱 萱, 李弼民, 谢 勇, 等. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, **21** (3): 159~159.
- [5] 代丽萍, 陈晶晶, 张建中, 等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1999, **19** (6): 458~458.
- [6] 胡伏莲主编. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 北京: 中国科技出版社, 2002. 75.
- [7] Peek R M Jr, Moss S F, Tham K T, et al. *J Natl Cancer Inst*, 1997, **89** (12): 863~868.
- [8] Montecucco C, de Bernard M. *Microbes Infect*, 2003, **5** (8): 715~721.
- [9] 陈翠萍, 杨朝晖, 王永谦, 等. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, **22** (1): 37~40.