

• 基础实验研究论著 •

抗幽门螺杆菌 HP1188 蛋黄抗体的研究*

韩 飞¹, 杨致邦^{2△}, 王长本¹, 李建英¹, 周 政¹, 牟君成¹

(1. 重庆三峡中心医院微生物免疫科, 重庆 404000;

2. 重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室, 重庆 400016)

摘要: 目的 制备抗幽门螺杆菌(*H. pylori*) HP1188 蛋黄抗体(immunoglobulin yolk, IgY), 即 HP1188-IgY, 了解其理化特性和生物学活性, 为研制 *H. pylori* HP1188-IgY 型抗体口服制剂提供实验依据。方法 用纯化的重组 HP1188 蛋白免疫产蛋鸡, 以水稀释法结合氯仿有机沉淀法提取蛋黄抗体(HP1188-IgY), 采用 SDS-PAGE 电泳检测其纯度, Bradford 法测定蛋白含量, Western blot 分析抗原特异性。间接 ELISA 评价 HP1188-IgY 对热、酸及胃蛋白酶消化作用的耐受情况。分别检测不同浓度 HP1188-IgY 及不同 pH 相同浓度 HP1188-IgY 对 *H. pylori* 的生长抑制试验。用 MTT 法检测不同浓度 HP1188-IgY 对 *H. pylori* 细胞毒活性的中和作用。结果 HP1188-IgY 纯度约为 68%, 蛋白浓度为 7.79 mg/mL, Western blot 结果显示在相对分子质量 30 000 附近出现反应条带。HP1188-IgY 具有一定的耐热性、耐酸性和耐胃蛋白酶消化的能力。HP1188-IgY 在体外可抑制 *H. pylori* 生长, 并具有浓度依赖性和 pH 依赖性。HP1188-IgY 能阻断 *H. pylori* 菌体蛋白对 HeLa 细胞的毒性作用, 且该作用具有浓度依赖性。结论 成功制备了 HP1188-IgY, 其具有良好的理化性质和生物特性, 为进一步制备预防幽门螺杆菌感染的口服制剂奠定了基础。

关键词: 螺杆菌, 幽门; 黏附素; HP1188 蛋白; 蛋黄抗体; 体外试验

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.003

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2013)04-0390-03

Preparation of immunoglobulin yolk against recombinant HP1188 protein in *Helicobacter pylori**

Han Fei¹, Yang Zhibang^{2△}, Wang Changben¹, Li Jianying¹, Zhou Zheng¹, Mou Juncheng¹

(1. Department of Microbiology and Immunology, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China;

2. Department of Pathobiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the physicochemical and biological properties of HP1188-IgY extracted from the yolk of hen's egg immunized with recombinant HP1188 protein of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and provide basis for preparation of oral administration HP1188-IgY. **Methods** The purified HP1188 protein was used to immunize hens and the HP1188-IgY was extracted from the yolk by water dilution combined with chloroform methods. The purity of HP1188-IgY was analyzed by SDS-PAGE, bradford method and western blot. The indirect ELISA was used to detect heat-stability, acid-stability and pepsin-stability of HP1188-IgY. The HP1188-IgY in certain pH and concentration was added into liquid medium only containing *H. pylori* and cultured some time in 37 °C in order to observe the ability of different concentrational HP1188-IgY in inhibiting *H. pylori* growth. MTT was applied to assay the neutralization of HP1188-IgY to the cytotoxicity of *H. pylori*. **Results** The purity of HP1188-IgY was about 68%, and the protein content was 7.79 mg/mL. Western blot exhibited the protein bands with molecular weight of 30 000. The HP1188-IgY showed a well heat-stability, a favorable acid-stability and a good ability of anti-pepsin digestion. HP1188-IgY inhibited the growth of *H. pylori* in vitro. The growth of *H. pylori* could be concentration-dependently and pH-dependently blocked by the HP1188-IgY. The HP1188-IgY neutralized the cytotoxicity of *H. pylori* in a concentration-dependent manner. **Conclusion** The HP1188-IgY was successfully constructed, with good stabilities and well biologic speciality. It might play an important role in further preparing oral product to prevent the infection of *H. pylori*.

Key words: helicobacter pylori; adhesin; HP1188 protein; immunoglobulin yolk; vitro

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染及其引起的相关疾病越来越受关注,对该菌感染的防治已成为当前研究的热点^[1-3]。*H. pylori* 表面的黏附素是其黏附在胃黏膜引起感染的先决条件。HP1188 蛋白是 2005 年 Rubinsztein-Dunlop 等^[4]利用镍珠模型法从 *H. pylori* 中筛选到一种新的黏附素蛋白。该蛋白的特点是:(1)存在于所有 *H. pylori* 菌株表面,表达量高;(2)编码基因为 *H. pylori* 所特有且高度保守,与已知的黏附素序列无同源性;(3)有黏附功能,免疫原性强,能持续刺激机体免疫应答,符合理想保护性抗原的要求。目前抗生素治疗 *H. pylori* 引起的感染存在不足^[5]:(1)耐药菌株的产生;(2)易复发和再感染;(3)不良反应较强和医疗费用较高;(4)无

法达到群体防治的效果,无法有效控制 *H. pylori* 的传播和感染。因此寻找抗菌药物替代疗法具有重要的现实意义。鉴于胃癌、胃溃疡均属消化道疾病,因此,通过食品加以预防意义重大。自从 1893 年有研究者发现鸡蛋中存在抗体以来,蛋黄抗体(immunoglobulin yolk, IgY)技术正成为医药领域的热点,它适于生产特异性抗体,具有开发功能性食品和新药的潜能^[6]。近年来,国内外许多研究已经证实口服特异性 IgY 可通过被动免疫有效防治消化道感染性疾病^[7-8],现在已有许多学者将其制成口服制剂以防治龋齿、轮状病毒引起的腹泻和其他胃肠道感染性疾病,并取得满意效果。本研究用 *H. pylori* 重组 HP1188 蛋白免疫产蛋鸡制备 HP1188-IgY,初步探讨了

* 基金项目:重庆市万州区科委项目(201203006)。 作者简介:韩飞,女,主管检验师,主要从事机会致病菌感染与免疫研究。 △ 通讯作者, E-mail: dryangfm365@sina.com。

HP1188-IgY 的理化特性、体外抑制 *H. pylori* 生长、中和 *H. pylori* 超声破碎提取物对 Hela 细胞的毒性作用,为进一步研究 HP1188-IgY 体内外试验和开发防治性 IgY 抗体制剂奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 HP1188 蛋白为本室制备并保存。Hela 细胞为本室冻存。*H. pylori* 标准菌株 NCTC 11637 来源于重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室。HRP 酶标羊抗鸡 IgY 为 Promega 公司产品。HRP 标记的羊抗人 IgG 为武汉博士德公司产品。蛋白质标记物为 Fermentas 公司及中国医科院产品。 Ni^{2+} -NTA 亲合层析柱为 QIAGEN 公司产品。琼脂粉为日本公司产品。IPTG、SDS、DTT、EDTA、丙烯酰胺、N,N'-亚甲丙烯酰胺、考马斯亮蓝 R250、考马斯亮蓝 G250 均为 Sigma 公司产品。胰蛋白胨、酵母抽提物均为 OXOID 公司产品。布氏肉汤为北京陆桥商检新技术公司产品。胃蛋白酶 (Pepsin 1:3 000) 为 Amresco 公司产品。胰蛋白酶 (1:250)、RP-MI1640、胎牛血清、96 孔平底细胞培养板、二甲基亚砜 (DM-SO)、MTT 为中山公司产品。

1.2 免疫动物 选择 22 周龄健康罗曼产蛋鸡,按该种属鸡要求进行饲养。注射抗原前,收集鸡蛋,用作提取阴性对照 IgY。将重组黏附素 HP1188 蛋白与等体积完全弗氏佐剂混匀并充分乳化后,采用肌肉多点注射法进行免疫。初次免疫:100 微克/只;第二次免疫:200 微克/只;第三次免疫和加强免疫:300 μg /只,共免疫 4 只母鸡。初次免疫后 15 d 进行第二次免疫,1 个月后进行第三次免疫,间隔 1 个月后再加强免疫一次。观察免疫部位未发现溃烂。第二次免疫 1 周后开始收集鸡蛋,每天收一次,编号后 4 ℃ 保存备用。

1.3 HP1188-IgY 的分离和纯化 取出收集的鸡蛋,取蛋黄液,加入 2 倍于卵黄液体积的生理盐水稀释,用力振荡至充分乳化,加入与卵黄液同体积的氯仿,上下用力震荡至少 15 min,4 ℃,10 000 $\times g$ 离心 20 min。小心吸取上层水溶性液体(含 IgY)于灭菌容器中,常规饱和硫酸铵法纯化后,用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,−20 ℃ 保存^[9]。

1.4 HP1188-IgY 纯度和浓度测定 用 120 g/L SDS-PAGE 电泳测定纯化的 HP1188-IgY 的纯度;Bradford 法测定其蛋白含量^[10]。

1.5 HP1188-IgY 效价的测定 采用间接 ELISA 法^[11]。重组 HP1188 蛋白用包被液倍比稀释为 1.2~20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每孔 100 μL 包被聚苯乙烯反应板;酶标羊抗鸡 IgG 用酶稀释液作 1:1 000~1:8 000 稀释,纯化的 HP1188-IgY 倍比稀释为 1:10~1:640,方阵滴定法确定最佳工作浓度。测定 20 份免疫前的蛋黄提取纯化液 A_{450} 值,取其平均值作为阴性对照,测定免疫后提取纯化的 HP1188-IgY 效价。

1.6 Western blot 鉴定 HP1188-IgY 的抗原特异性 将纯化的 HP1188 做 SDS-PAGE 电泳,采用半干湿法将凝胶上蛋白电转移至 NC 膜,加封闭液室温封闭 2 h,PBS 洗膜后,依次加上 HP1188-IgY 和 HRP 酶标羊抗鸡 IgY(1:1 000 稀释)。最后,将 NC 膜浸泡在 DAB 显色剂中 10~15 min,用双蒸水冲洗,以终止染色。同时用免疫前提取的 IgY 作为对照。

1.7 HP1188-IgY 稳定性试验

1.7.1 HP1188-IgY 巴氏消毒后效价检测 将 HP1188-IgY 用 PBS 稀释成 1 mg/mL;分装试管,每管 1 mL,取其中一管测定其效价,作为对照。取上述稀释好的 HP1188-IgY 10 管,分 2 组,每组 5 管,分别放入 65 ℃ 水浴中维持 30 min,72 ℃ 水浴中维持 15 s,同时设立未水浴 HP1188-IgY 为对照,用已建立的检测 HP1188-IgY 的间接 ELISA 测定抗体效价。

1.7.2 HP1188-IgY 耐酸试验 用 pH 值为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 的 Tris-HCl 缓冲液将 HP1188-IgY 稀释成 1 mg/mL,37 ℃ 孵育 2 h,然后加入 2 mol/L Tris 碱中和,使 pH 值均为 7.0,间接 ELISA 测定抗体效价。

1.7.3 HP1188-IgY 耐胃蛋白酶消化试验 用 pH 4.0 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液将 HP1188-IgY 稀释成 1 mg/mL,在 100 μL HP1188-IgY 稀释液中分别加入 5、10 μL 胃蛋白酶(1:3 000)溶液,37 ℃ 分别作用 1、2、4、6 h 后,用 2 mol/L Tris 碱调 pH 至 7.0,同时设立空白对照,间接 ELISA 测定抗体效价。

1.8 HP1188-IgY 抗体对 *H. pylori* 的生长抑制试验

1.8.1 不同浓度 HP1188-IgY 的抑菌作用 HP1188-IgY 样品分组:A 组,1 mg/mL HP1188-IgY;B 组,2 mg/mL HP1188-IgY;C 组,3 mg/mL HP1188-IgY;D 组,4 mg/mL HP1188-IgY;E 组,5 mg/mL HP1188-IgY;F 组,6 mg/mL HP1188-IgY,以上各组均用 pH 7.0 无菌布氏肉汤稀释而成。将以上 A~F 组 HP1188-IgY 各 2 mL 分别与 1×10^7 cfu/mL *H. pylori* 菌液按 1:1 体积比混合;G 组不加 HP1188-IgY 作为对照组,在 2 mL *H. pylori* 菌液中加等体积的布氏肉汤;H 组为空白组,不加 *H. pylori* 菌液和 HP1188-IgY。以上各组均置于 37 ℃,微需氧培养 24 h。用无菌生理盐水对上述各组以倍比稀释法稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 。取上述各组 5 个稀释度的 *H. pylori* 菌液 100 μL 接种 *H. pylori* 选择性培养基,37 ℃ 微需氧培养 3 d(每个稀释度同时接种 3 个平板)。选择菌落数在 20~200 的稀释度计算各组的菌落数。计算方法:各组菌落数=某稀释度平均菌落数×稀释度/接种体积(mL);实验组生长率=试验组菌落数/对照组菌落数×100%,各个稀释度的菌落数以 3 个平板的菌落数的平均值来计算。*t* 检验判断各实验组与对照组是否具有统计学意义。

1.8.2 HP1188-IgY 在不同 pH 条件下的抑菌作用 将 pH 1~7 的 6 mg/mL HP1188-IgY 和 1×10^7 cfu/mL *H. pylori* 菌液按 1:1(v/v)混合;同时设对照组和空白组。各组均置 37 ℃,微需氧培养 24 h,按上述方法测定生长率。

1.9 HP1188-IgY 对细胞毒活性的中和作用 参照文献[12],采用 MTT 法。收集选择性培养基培养 3 d 的 *H. pylori* 菌落,离心(4 ℃,8 000 $\times g$)10 min,PBS 洗涤 2 次后用小体积 PBS 重悬,于冰浴下超声破碎 10 min,离心(4 ℃,12 000 $\times g$)20 min,收集上清液,沉淀再次冰浴超声破碎 10 min,重复上述过程一次,合并两次上清液,Bradford 法测定蛋白含量,分装后−20 ℃ 保存备用。吸取 Hela 细胞 200 μL (1×10^8 /L)转种于 96 孔细胞培养板中, CO_2 孵箱(37 ℃,5% CO_2 ,饱和湿度)中培养 24 h。实验孔加入 10、20、40、60、80、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 *H. pylori* 超声碎菌提取物,每个稀释度作 5 孔平行,同时设空白孔(不加细胞,不加 *H. pylori* 超声碎菌提取物)、对照孔(加细胞,不加 *H. pylori* 超声碎菌提取物),做 3 块平行板,分别在 CO_2 孵箱中继续培养 48 h 后,1 000 r/min,离心 5 min,弃去上清液,每孔加入 200 μL 不含血清 RPMI1640 和 20 μL 5 mg/mL MTT 溶液,37 ℃ 继续孵育 4 h。1 000 r/min 离心后弃去孔内培养液,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min。以空白孔调零,测定实验组和对照组的 570 nm 吸光度值(A_{570}),计算各个稀释度 4 孔 A_{570} 平均值(\bar{x}),用 $\bar{x} \pm s$ 表示各稀释度的 A 值。以不加超声粉碎提取物(对照组)的细胞存活率为 100%,以细胞存活率=实验组 A_{570} 值/对照组 A_{570} 值 × 100% 计算细胞存活率,*t* 检验分析计算结果。吸取 200 μL (2×10^8 /L)Hela 细胞培养液转种于 96 孔细胞培养板中, CO_2 孵箱(37 ℃,5% CO_2 ,饱和湿度)中培养 24 h。将 *H. pylori* 超声提取物(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与

不同浓度 HP1188-IgY(10、20、40、80、160、320 $\mu\text{g}/\text{mL}$)在无菌条件下按1:1混合,37℃作用2 h后吸20 μL 加入各细胞板孔中,同时设对照组和空白组,每组作6孔平行,在上述条件下继续培养48 h。其余同上。

2 结 果

2.1 HP1188-IgY的纯度和浓度 纯化后的HP1188-IgY经SDS-PAGE分析,在相对分子质量64 000处出现与IgY重链相符的条带,在相对分子质量25 000处出现与IgY轻链相符的条带。凝胶扫描图象软件分析其纯度为68%,Bradford测定蛋白含量为7.79 mg/mL。

2.2 ELISA测定HP1188-IgY效价 抗原包被浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,HP1188-IgY稀释比例为1:160,酶标二抗稀释度为1:8 000,测定纯化后的HP1188-IgY ELISA效价为1:3 200。

2.3 HP1188-IgY的抗原特异性 Western blot显示,提纯的HP1188-IgY能与重组HP1188发生特异性结合,在相对分子质量30 000处出现单一条带,而对照组(免疫前提取IgY)未见此条带,表明HP1188-IgY具有良好的抗原结合特异性。

2.4 HP1188-IgY稳定性 HP1188-IgY经两种巴氏消毒法消毒后,效价未见明显下降,表明巴氏消毒对其活性影响不大。HP1188-IgY在pH 5~7时,抗体活性较稳定,在pH<5时,抗体活性下降较快,在pH 2.0左右,抗体活性几乎完全丧失。HP1188-IgY在pH 4.0与40~60 U/mL胃蛋白酶(体内正常胃蛋白酶浓度)共同温育1 h后保持其抗体效价,说明其具有一定的耐胃蛋白酶消化的能力。

2.5 HP1188-IgY抗体对H. pylori的生长抑制试验 HP1188-IgY抗体对H. pylori的生长抑制试验HP1188-IgY可浓度依赖性地抑制H. pylori的生长,HP1188-IgY \geqslant 5.0 mg/mL时可完全抑制H. pylori的生长。在pH \leqslant 4.0时,H. pylori不能生长,在pH 5~7时,HP1188-IgY对H. pylori的生长有很好的抑制作用。

2.6 H. pylori超声提取物的Hela细胞毒活性试验 MTT测定结果显示,H. pylori超声裂解蛋白能明显降低Hela细胞的增殖能力。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 裂解蛋白即可降低Hela细胞增殖能力的50%,随H. pylori超声裂解蛋白浓度的增高,Hela细胞的增生能力逐渐降低。

2.7 HP1188-IgY对H. pylori菌体蛋白细胞毒活性的中和作用 测定结果显示,HP1188-IgY浓度160~320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可基本中和H. pylori菌体蛋白对Hela细胞的毒性作用;随着HP1188-IgY浓度的降低,其保护活性亦随之降低。

3 讨 论

IgY与IgG相似,具有中和病毒、抑杀细菌和中和毒素等重要的生物学功能,IgY还具有较强的耐热、耐酸、抗离子强度和一定的抗酶降解能力^[13]。本研究制备的HP1188-IgY在稳定性方面的实验结果与此基本相符,这种稳定的理化性质对于将HP1188-IgY开发成为治疗药物或者食品添加剂提供了有利的条件。

口服特异性IgY被认为是对胃肠道感染的被动免疫和治疗的有效制剂^[14]。抑制H. pylori生长是IgY发挥其保护性作用的重要表现。在本实验中,通过体外培养研究发现,HP1188-IgY抗体可以浓度依赖性地抑制H. pylori生长,在HP1188-IgY \geqslant 5.0 mg/mL(pH 7.0)时可完全抑制其生长。pH \leqslant 4.0时,H. pylori不能生长;在pH 5~7时,对照组H. pylori生长较好,而实验组在加入HP1188-IgY后,对H. pylori的生长有很好的抑制作用。在实验中笔者发现pH对H. py-

lori的生长有很大影响,而正常的临床感染株H. pylori能够在pH 1~3胃酸环境中长期生存,由此可知实验室经传代培养的H. pylori在生理生化方面有某些改变,如耐酸性,那么它是否能代表在临床感染株H. pylori的生长活性会被该HP1188-IgY抑制,尚待进一步探讨。

近年来IgY用于人类疾病防治的研究已经开始,毛小琴等^[15]用VacA+H. pylori超声破碎的菌体蛋白制备了VacA-IgY,通过MTT法体外试验表明该IgY能中和H. pylori菌体蛋白诱导的Hela细胞毒活性,本研究针对黏附这一H. pylori定植的关键环节,用重组HP1188蛋白免疫产蛋鸡成功制备了HP1188-IgY,获得的HP1188-IgY从浓度、纯度、效价、特异性上都达到了体内外试验的要求,理化性质较稳定,在体外能抑制H. pylori生长,且具有中和H. pylori细胞毒活性的作用,为进一步的体内外验证试验提供了材料,奠定了基础。

参 考 文 献

- Penta R, De Falco M, Iaquinto G, et al. Helicobacter pylori and gastric epithelial cells: from gastritis to cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2005, 24(3):337-345.
- 胡伏莲.中国幽门螺杆菌耐药研究现状[J].胃肠病学和肝病学杂志,2008,17(7):517-518.
- Sugiyama T, Asaka M. Helicobacter pylori infection and gastric cancer[J]. Med Electron Microsc, 2004, 37(3):149-157.
- Rubinstein-Dunlop S, Guy B, Lissolo L, et al. Identification of two new Helicobacter pylori surface proteins involved in attachment to epithelial cell lines[J]. J Med Microbiol, 2005, 54(Pt 5):427-434.
- 邹全明.幽门螺杆菌疫苗的研究进展[J].胃肠病学,2007,12(9):567-570.
- 郭立君,李春晖,赵锋,等.抗轮状病毒IgY的研制[J].中国生物制品学杂志,2001,14(1):24-26.
- Sarker SA, Casswall TH, Juneja LR, et al. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea[J]. Pediatr Gastroenterol Nutr, 2001, 32(1):19-25.
- Shin JH, Yang M, Nam SW, et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of helicobacter pylori Infection[J]. Clin Diagnostic Lab Immunol, 2002, 9(5):1061-1066.
- Akita EM, Nakai S. Preparation and purification of Fab' immuno-reactive fragments from chicken egg immunoglobulin using pepsin and Aspergillus saitoi protease. Egg uses and processing technologies[M]. Wallingford, Canada: CAB International, 1994: 228-240.
- 萨姆布鲁克J,弗里奇EF,曼尼阿蒂斯T.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,1992:880-887.
- 杨廷彬,尹学念.实用免疫学[M].长春:长春出版社,1992:365-378.
- 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].北京:世界图书出版公司,2004:250-252.
- Mine Y, Kovacs NJ. Chiken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infections disease[J]. J Med Food, 2002, 5(3):159-169.
- 黄进,秦思栋,杨致邦,等. HpAa IgY抑制小鼠胃内幽门螺杆菌的定植[J].免疫学杂志,2008,24(5):522-526.
- 毛小琴,杨致邦,张绍兰,等.幽门螺杆菌重组VacA蛋白的体外活性[J].世界华人消化杂志,2006,14(8):789-794.

(收稿日期:2012-10-09)