

• 基础实验研究论著 •

# HP1188-IgY 体内抗幽门螺杆菌感染的实验研究\*

韩 飞<sup>1</sup>, 杨致邦<sup>2</sup>, 李建英<sup>1△</sup>, 周 政<sup>1</sup>, 王长本<sup>1</sup>

(1. 重庆三峡中心医院微生物免疫科, 重庆 404100; 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 研究抗幽门螺杆菌(*H. pylori*)HP1188 蛋黄抗体(HP1188-IgY)在小鼠体内抗感染作用。方法 用 Western blot 法分析 HP1188-IgY 抗原特异性。建立 *H. pylori* 感染 Balb/c 小鼠的动物模型, 预防组在小鼠灌喂 *H. pylori* 菌液前灌喂不同剂量(1, 3, 5 mg/mL)的 HP1188-IgY, 同时设 PBS 对照组、阴性对照组、阳性对照组。通过小鼠胃组织 *H. pylori* 培养、快速尿素酶实验和组织学检查观察 *H. pylori* 定植情况。结果 Western blot 结果显示在相对分子质量 30 000 附近出现反应条带。阳性对照组 8 周后 *H. pylori* 的感染率为 100%。HP1188-IgY 剂量为 3 mg/mL 和 5 mg/mL 时, 小鼠胃黏膜的 *H. pylori* 定植量减少, 炎性反应减轻( $P < 0.05$ )。随 HP1188-IgY 剂量的增加, 感染率降低。结论 该实验成功制备了 HP1188-IgY, 在小鼠体内能阻止 *H. pylori* 的定植, 为进一步制备预防 *H. pylori* 感染的口服制剂奠定了基础。

**关键词:** 幽门螺杆菌; HP1188 蛋白; 蛋黄抗体; 体内试验

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.010

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)24-3292-02

## HP1188-IgY prevents the infection of *Helicobacter pylori* in vivo\*

Han Fei<sup>1</sup>, Yang Zhibang<sup>2</sup>, Li Jianying<sup>1△</sup>, Zhou Zheng<sup>1</sup>, Wang Changben<sup>1</sup>

(1. Department of Microbiology and Immunology, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404100, China; 2. Department of Pathobiology, Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** Objective To study the effect of HP1188-IgY against *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) in Balb/c mice. Methods The purity of HP1188-IgY was analyzed by Western blot. Before infection with *H. pylori*, Balb/c mice were administrated with diferent dosages(1, 3, 5 mg/mL)of HP1188-IgY by using an oral feeding needle in the prevention group. The planting of bacteria in stomach was assayed by observing bacterial culture, rapid urease test and pathological section. Results Western blot exhibited the protein bands with molecular weight of 30 000. The total rate of infection in the positive control group was 100% after 8 weeks. The infection rate of the prevention group(3 and 5 mg/mL) was much lower than that of the PBS control group at the same period of infection( $P < 0.05$ ), and was negatively related to the addition of HP1188-IgY. Conclusion The HP1188-IgY was successfully constructed, which is able to inhibit the adhesive attraction of *H. pylori* in vivo and be used to prevent *H. pylori* infection.

**Key words:** *Helicobacter pylori*; HP1188 protein; immunoglobulin yolk; in vivo experient

幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌等有密切关系<sup>[1-4]</sup>, 防治 *H. pylori* 感染具有重要的临床意义。*H. pylori* 在胃内定植的关键环节是黏附, HP1188 蛋白是 2005 年 Rubinsztein-Dunlop 等<sup>[5]</sup>利用镍珠模型法从 *H. pylori* 中筛选到一种新的黏附素, 研究表明 HP1188 能介导 *H. pylori* 与胃黏膜发生特异性黏附, 从而使其定植于胃内。目前抗生素治疗 *H. pylori* 感染存在副作用较大、耐药性等问题<sup>[6]</sup>, 因此寻找能防治 *H. pylori* 感染且没有耐药性问题的新方法就显得尤为重要。近年来, 国内外对鸡蛋黄抗体(IgY)在胃肠道疾病防治方面的研究报道较多<sup>[7-9]</sup>, 这些研究为制备抗 *H. pylori* 的特异性 IgY 抗体提供了可能。本研究用 *H. pylori* 重组 HP1188 蛋白免疫产蛋鸡获得的 HP1188-IgY, 通过小鼠灌胃实验, 观察 HP1188-IgY 抑制 Balb/c 小鼠胃内 *H. pylori* 定植的作用, 为研制预防 *H. pylori* 感染的口服制剂奠定基础。

### 1 材料与方 法

**1.1 动物及主要试剂** HP1188 蛋白和 HP1188-IgY<sup>[10]</sup>为本实验室制备并保存, *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。SPF 级 BALB/c 小鼠, 6~8 周龄雌性, 体质量 17~19 g, 购自重庆医科大学实验动物中心。布氏肉汤为北京陆桥商检新技术公司产品。

**1.2 Western blot 鉴定 HP1188-IgY 的抗原特异性** 将纯化的 HP1188 蛋白做 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。

**1.3 *H. pylori* 菌株的培养** 将 *H. pylori* 标准菌株 NCTC 11637 接种于布氏琼脂选择培养基上, 产气袋法形成微需氧环境(5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>), 37 °C 培养 3 d, 根据菌落形态、革兰染色和生化反应鉴定确认后传代纯培养。用 pH7.0 的布氏肉汤洗涤 2 次, 分光光度计比浊法调整菌悬液终浓度为 1 × 10<sup>9</sup> CFU/mL(OD<sub>600nm</sub> = 1, 菌液浓度相当于 1 × 10<sup>9</sup> /mL)备用。

**1.4 建立 Balb/c 小鼠感染 *H. pylori* 的动物模型** 小鼠禁食禁水一夜, 灌喂无菌 3% NaHCO<sub>3</sub> 0.3 mL 中和胃酸, 20 min 后灌喂 1 × 10<sup>9</sup> CFU/mL *H. pylori* 11637 菌液 0.5 mL, 4 h 后恢复进食和进水。同法隔天灌喂 1 次, 共灌喂 3 次; 于末次灌喂的 4、6、8 周后分批麻醉处死 5 只小鼠, 取胃组织做细菌培养、快速尿素酶实验和组织学检查观察小鼠感染情况。

\* 基金项目: 重庆市万州区科委重点科技计划项目(201203006)。 △ 通讯作者, E-mail: hanfei2006@126.com。

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。

1.5 HP1188-IgY 预防 *H. pylori* 感染的保护作用

1.5.1 实验分组 70 只 Balb/c 小鼠随机分成 4 组:阳性对照组(15 只)、阴性对照组(15 只)、预防组(40 只)。预防组分别再按 HP1188-IgY 的不同剂量分成 1、3、5 mg/mL 组和 PBS 对照组 4 组,每组 10 只。

1.5.2 实验方法 阳性对照组:处理方法同 1.4。阴性对照组:用布氏肉汤代替菌液,方法同阳性对照组。预防组:小鼠禁食禁水一夜,灌喂无菌 3% NaHCO<sub>3</sub> 0.3 mL 中和胃酸,20 min 后给小鼠灌喂不同剂量(1、3、5 mg/mL)的 HP1188-IgY 1 mL,30 min 后再灌喂含 1×10<sup>9</sup> CFU/mL *H. pylori* 11637 菌液 0.5 mL,4 h 后恢复进食进水,隔天 1 次,一共 3 次,连续 2 周。8 周后麻醉处死小鼠,检测 *H. pylori* 的定植情况。

1.5.3 HP1188-IgY 预防 *H. pylori* 感染作用的评价 以小鼠胃黏膜细菌培养,快速尿素酶实验,切片 Giemsa 染色镜检均阳性判定为小鼠 *H. pylori* 感染;以组织切片 HE 染色镜检判定炎症反应。先麻醉后颈椎脱臼法处死小鼠,无菌条件下取出鼠胃置于消毒滤纸上,沿胃大弯剖开,用无菌生理盐水轻轻洗掉胃内容物后纵切为 3 份。1 份用于细菌培养;1 份用于快速尿素酶实验;1 份用于组织病理学检查(10%中性甲醛溶液固定,石蜡包埋后切片,改良 Giemsa 法染色后镜检观察 *H. pylori* 定植情况,HE 染色判断胃黏膜炎症程度)。*H. pylori* 定植情况判断标准:观察 10 个视野胃小凹 *H. pylori* 的定植,按下法进行半定量评分:0 分,无 *H. pylori* 定植;1 分,部分胃小凹有 1~2 条 *H. pylori*;2 分,多数胃小凹有 3~10 条 *H. pylori*;3 分,多数胃小凹有超过 10 条 *H. pylori*。组织切片 HE 染色判断炎症的分级参照新悉尼系统<sup>[11]</sup>的直观模拟评分方案进行,以中性粒细胞的活跃性和单核细胞密度进行胃黏膜的炎症分级,将正常、轻度、中度、重度 4 个等级分别评分为 0、1、2、3 分,将各实验组的评分结果用 SPSS11.0 软件进行统计学分析。

2 结 果

2.1 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,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.2 分离培养的 *H. pylori* 菌落及细菌形态特征 经传代培养出的 *H. pylori* 菌落呈圆形、凸起、光滑、湿润、无色半透明,针尖大小,边缘整齐。菌落涂片革兰染色后,油镜下观察可见 *H. pylori* 为革兰阴性,形态呈“S”形,螺旋形,杆状,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。生化反应:尿素酶、氧化酶、触酶试验均阳性;马尿酸水解试验阴性。

2.3 *H. pylori* 感染 Balb/c 小鼠的动物模型构建情况 5 只 Balb/c 小鼠在灌胃 4 周后,感染率为 40%(2/5),灌胃 6 周后,感染率为 80%(4/5),在灌喂 8 周后,胃黏膜细菌培养、尿素酶实验、组织学检查均为阳性,感染率均达到 100%(5/5)。小鼠胃组织 Giemsa 染色,镜下可清楚地显示 *H. pylori* 菌体为 S 形等典型形态,多位于胃小凹。HE 染色可见胃黏膜充血水肿,胃上皮糜烂和溃疡,固有层炎症细胞浸润,说明本实验中构建的 *H. pylori* 感染 Balb/c 小鼠的动物模型是成功的。

2.4 HP1188-IgY 对 Balb/c 小鼠胃内感染 *H. pylori* 的预防效果

2.4.1 对照组结果 阴性对照组胃黏膜细菌培养,快速尿素酶实验,切片 Giemsa 染色镜检结果全为阴性,显示所有小鼠均无 *H. pylori* 感染,胃组织全层未见明显炎症细胞浸润、壁细胞脱

落等病理改变,排除了 Balb/c 小鼠自然感染的存在,见图 3(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。阳性对照组胃黏膜细菌培养有 10 例为阳性,快速尿素酶实验和切片 Giemsa 染色镜检有 10 例阳性,阳性率 100%。

2.4.2 预防组结果 各预防组小鼠胃组织细菌培养及尿素酶实验,胃组织病理切片 *H. pylori* 定植和炎症反应情况见表 1。由病理组织学检查结果显示,PBS 对照组多数胃小凹上部及胃腺腔内有较多 *H. pylori*,胃黏膜呈现中重度炎症改变,可见淋巴细胞及浆细胞浸润,中性粒细胞向黏膜下层浸入形成溃疡,胃黏膜腺体破坏甚至萎缩,见图 4(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。当 HP1188-IgY 的剂量为 1 mg/mL 时,*H. pylori* 定植密度评分,胃黏膜慢性炎症活动度及慢性炎症情况评分与 PBS 对照组评分差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 1,说明低剂量 HP1188-IgY 不能减少 *H. pylori* 在胃黏膜的定植数量及改善小鼠胃黏膜慢性炎症浸润。随 HP1188-IgY 剂量的增加,当剂量为 3 mg/mL 和 5 mg/mL 时, *H. pylori* 定植密度评分,胃黏膜慢性炎症活动度及慢性炎症情况评分与 PBS 对照组评分差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。随着 HP1188-IgY 剂量的增加,小鼠胃黏膜的 *H. pylori* 定植量明显减少,炎症反应显著减轻,图 4(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。在 IgY 的剂量为 3 mg/mL 时,能达到较理想的预防效果,预防率为 70%,说明中、高剂量的 HP1188-IgY 具有较好的体内抗感染作用。

表 1 预防组感染 *H. pylori* 的情况

组别	<i>n</i>	感染动物数( <i>n</i> )	<i>H. pylori</i> 定植数量( <i>n</i> )	荧光强度	感染率 (%)	预防率 (%)
对照组	10	10	2.7±0.4	2.4±0.3	100	0
预防组						
1 mg	10	9	2.3±0.2	1.6±0.3	90	10
3 mg	10	3	1.0±0.4*	0.7±0.2*	30	70
5 mg	10	2	0.4±0.3*	0.3±0.3*	20	80

\* : $P<0.05$ ,与对照组比较。

3 讨 论

IgY 生物学功能与 IgG 相似,并且还具有良好的化学性质稳定、成本低等优势,其被动免疫功能已用于抗病毒和细菌性疾病的研究。在防治 *H. pylori* 方面 IgY 的应用也受到了国内外学者关注。黄进等<sup>[12]</sup>针对 *H. pylori* 的一种黏附素 HpaA 成功制备了 HpaA-IgY,实验发现 HpaA-IgY 剂量为 6 mg/mL 时,在小鼠体内能够阻止 *H. pylori* 定植。本研究选择的 HP1188 蛋白是从 *H. pylori* 中筛选到一种新的黏附素,免疫产蛋鸡制备的 HP1188-IgY 有良好的抗原结合特异性,通过小鼠体内实验结果表明 HP1188-IgY 亦能在小鼠体内阻止 *H. pylori* 定植,分析 HP1188-IgY 可能通过以下作用达到抗 *H. pylori* 感染:HP1188-IgY 能直接黏附于 *H. pylori* 的细胞壁上,改变其完整性,使之不能黏附于胃黏膜上皮细胞,直接抑制其生长。实验研究发现当剂量为 3 mg/mL 时就能达到较理想的预防效果,预防率为 70%,说明 HP1188-IgY 在预防 Balb/c 小鼠胃内感染 *H. pylori* 中的作用较理想,并存在剂量依赖关系,即在实验剂量范围内,剂量越大,预防效果越好,提示 HP1188-IgY 有望成为防治 *H. pylori* 感染的口服免疫治疗生物制剂。目前国内外未见 HP1188-IgY 研究的报道,在本研究中制备了特异性的 HP1188-IgY,尚有较多问题需要解(下转第 3296 页)

转变(EMT)在肿瘤的迁移侵袭中扮演着重要的角色,此型 EMT 被分类为 III 型 EMT [6]。体外实验已经证实,在 EMT 过程中,已分化的上皮细胞失去极性和黏附性(E-cadherin 下调)获得肌成纤维细胞表型( $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白和波形蛋白上调),并伴随着细胞迁移和侵袭能力的增强[7-8]。缺氧微环境普遍存在于多种恶性实体瘤中,主要是由于肿瘤生长十分迅速、氧消耗量及弥散的距离增加;肿瘤血管增生异常血流淤滞、血供不足,因而使得肿瘤区域氧的供求失衡而出现相对缺氧[9-11],其被认为是引发 EMT 过程的诱因[8,12]。因此,研究肝癌在缺氧条件下发生转移的机制,寻找有效的干预靶点显得尤为重要。

GLIPR-2 是 PR 蛋白质超家族中的一种位于高尔基体的膜蛋白,具有 PR 保守结构域,在体内的分布较为局限,具有一定的组织和细胞特异性。本研究发现 GLIPR-2 促进了 II 型 EMT 的发生,但该基因是否能够促进 III 型 EMT 并在肿瘤的发展进程中发挥作用尚不清楚。数据显示缺氧刺激 0、24、48、72 h 后能显著上调 HepG2 细胞 GLIPR-2 蛋白水平,为此进一步探讨 GLIPR-2 基因在肝癌细胞侵袭转移中的作用,发现分子机制,有望以 GLIPR-2 为靶点,为临床防治肝癌早期转移提供新的途径和理论基础,具有广阔的社会应用前景。

目前慢病毒被广泛地应用于 RNA 干扰的研究中。慢病毒载体较反转录病毒载体具有宿主范围更广,能够有效感染周期性和非周期性细胞等特点,能够实现多种类型细胞中稳定的基因功能性沉默,为在人和动物组织的原代细胞中快速而高效地抑制特定基因的表达,研究基因功能,提供了可能性。在本实验中所使用的 pMAGic7.1 是一种高效慢病毒表达载体,通过与干扰片段连接,成功构建重组慢病毒质粒,达到干扰 GLIPR-2 表达的目的,并能够在 HepG2 细胞中高效表达,为进一步研究 GLIPR-2 的生物学功能奠定了基础。

参考文献

[1] van Loon LC, van Kammen A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus [J]. *Virology*, 1970, 40 (2): 190-211.

[2] Groves MR, Kuhn A, Hendricks A, et al. Crystallization of a Gol-

gi-associated PR-1-related protein(GAPR-1) that localizes to lipid-enriched microdomains[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, 60(Pt 4): 730-732.

[3] Baxter RM, Crowell TP, George JA, et al. The plant pathogenesis related protein GLIPR-2 is highly expressed in fibrotic kidney and promotes epithelial to mesenchymal transition in vitro[J]. *Matrix Biol*, 2007, 26(1): 20-29.

[4] Huang S, Liu F, Niu Q, et al. GLIPR-2 Overexpression in HK-2 Cells Promotes Cell EMT and Migration through ERK1/2 Activation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58574.

[5] Christofori G. New signals from the invasive front[J]. *Nature*, 2006, 441(7092): 444-445.

[6] Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(4): 265-273.

[7] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(1): 1-12.

[8] Harrison L, Blackwell K. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? [J]. *Oncologist*, 2004, 9 Suppl 5: S31-40.

[9] Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, et al. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(17): 6392-6397.

[10] Simon F, Bockhorn M, Praha C, et al. Deregulation of HIF1-alpha and hypoxia-regulated pathways in hepatocellular carcinoma and corresponding non-malignant liver tissue--influence of a modulated host stroma on the prognosis of HCC [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2010, 395(4): 395-405.

[11] Tanaka M, Masaki Y, Tanaka K, et al. Reduction of fatty acid oxidation and responses to hypoxia correlate with the progression of de-differentiation in HCC[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(2): 365-370.

[12] Subarsky P, Hill RP. The hypoxic tumour microenvironment and metastatic progression[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2003, 20(3): 237-250.

(收稿日期:2013-07-28)

(上接第 3293 页)

决,如口服 HP1188-IgY 后在体内的分布、稳定性、抗感染作用的发挥、储存稳定性以及质量标准的确立等都有待进一步研究和探索。

参考文献

[1] Agarwal K, Agarwal S. Helicobacter pylori vaccine: from past to future[J]. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83(2): 169-175.

[2] 胡伏莲. 中国幽门螺杆菌耐药研究现状[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2008, 17(7): 517-518.

[3] Sugiyama T, Asaka M. Helicobacter pylori infection and gastric cancer[J]. *Med Electron Microsc*, 2004, 37(3): 149-157.

[4] 谢川,吕文华. 幽门螺杆菌与胃肠外疾病的关系[J]. *中华消化杂志*, 2011, 31(12): 843-845.

[5] Rubinsztein-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.

[6] 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.

[7] 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.

[8] Rudiger Sejade, 张小莺, 郑礼. IgY 技术及其医药应用理论基础[J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(5): 491-595.

[9] 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 Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(5): 1061-1066.

[10] 韩飞,杨致邦,王长本,等. 抗幽门螺杆菌 HP1188 蛋黄抗体的研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(4): 390-392.

[11] Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, et al. Classification and grading of gastritis: the updated Sydney system[J]. *Am J Surg Pathol*, 1996, 20(10): 1161-1181.

[12] 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.

(收稿日期:2013-08-18)