

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2008)01-0023-03

## 幽门螺杆菌黏唾液酸黏附素疫苗治疗小鼠幽门螺杆菌感染

杨勤<sup>1</sup> 杨明刚<sup>1</sup> 董洋<sup>2</sup> Ellen Xind<sup>3</sup> 史俊容<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>当阳市人民医院消化科,湖北当阳 444100, <sup>2</sup>暨南大学研究生院,广东广州 510632, <sup>3</sup>美国辛辛那提大学儿童医院基础部,辛辛那提 3333 Burnet Avenue, Cincinnati, Ohio 45229-3039 )

## Immunization treatment of *Helicobacter pylori* infection with the vaccine composed of sialic acid adhesin and CT: An animal model study

YANG Qin<sup>1</sup>, YANG Ming-Gang<sup>1</sup>, DONG Yang<sup>2</sup>, Ellen Xind<sup>3</sup>, SHI Jun-Rong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, Dangyang People's Hospital, Dangyang 444100, China, <sup>2</sup>Graduate School of Jinan University, Guangzhou 510632, China, <sup>3</sup>Children Hospital, Cincinnati University, Cincinnati OH43210, USA

**【Abstract】** AIM: To investigate the effects of the vaccine consisting of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) sialic acid adhesin and cholera toxin (CT) in the treatment of *H. pylori* infection in a *H. pylori* infected mouse model. **METHODS:** The C57BL/6 mice infected with *H. pylori* were divided into 4 groups. The mice of each group were immunized by sialic acid adhesin (100 μg) plus CT (2 μg), sialic acid adhesin (100 μg), CT (2 μg), PBS orally respectively, once a week for 4 weeks. Four weeks after last treatment, all animals were sacrificed and stomach biopsies were collected to detect *H. pylori* by the semi-quantitative bacterial culture assay. **RESULTS:** The eradication rate of the vaccine group was 30% (3/10). The eradication rates of the other 3 groups were all 0%. There were significant differences in the eradication rate among the vaccination group and the other 3 control groups ( $P < 0.05$ ). In addition, the *H. pylori* colonized density of vaccination group was significantly lower than that of other 3 groups ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** Sialic acid adhesin could be an effective component of *H. pylori* multi-valence vaccine.

**【Keywords】** *Helicobacter pylori*; sialic acid adhesin; cloning; immune; vaccine

**【摘要】** 目的: 利用人类幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染的小鼠模型研究唾液酸黏附素疫苗治疗 *H. pylori* 感染的作用。方法: 把已感染 *H. pylori* 的小鼠分成 4 组, 分别通过灌胃方法给予唾液酸黏附素 100 μg 加霍乱毒素 CT 2 μg、单纯唾液酸黏附素 100 μg、单纯 CT 2 μg 或 PBS 1 次/wk 共 4 次, 治疗结束后

收稿日期 2006-09-05; 接受日期 2007-10-23

作者简介: 杨勤, 副主任医师。Tel (0717) 3155565 Email: qwey-ang2003@yahoo.com.cn

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: 治疗后各组 *H. pylori* 根除率分别为: 唾液酸黏附素加 CT 组 30% (3/10)、单纯唾液酸黏附素组、单纯 CT 组及 PBS 组根除率均为 0%。差异有统计学意义。未根除 *H. pylori* 的小鼠, 唾液酸黏附素加 CT 组 *H. pylori* 的定植密度明显低于其它 3 组 ( $P < 0.05$ )。结论: 唾液酸黏附素能够作为 *H. pylori* 多价治疗疫苗的组分之一。

**【关键词】** 幽门螺杆菌; 唾液酸黏附素; 克隆; 免疫; 疫苗

**【中图分类号】** R377 **【文献标识码】** A

## 0 引言

我们已经构建了幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)唾液酸黏附素的高效原核表达体系<sup>[1-2]</sup>, 并对其进行了纯化及功能研究<sup>[3]</sup>。现通过建立感染 *H. pylori* 的小鼠模型观察唾液酸黏附素疫苗治疗 *H. pylori* 感染的作用, 为 *H. pylori* 多价治疗性疫苗的研制奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 无特定病原体 (specific-pathogen free, SPF) C57BL/6 小鼠 30 只, 4 wk 龄, 雄性, 质量 12 ~ 13 g, 饲养条件符合 2 级动物要求。纯化的重组唾液酸黏附素在以前的研究中已经制备, 其余试剂为国产分析纯。*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, 2h 内置厌氧培养箱, 37℃ 微需氧环境 ( $O_2$  50 mL/L,  $CO_2$  100 mL/L,  $N_2$  850 mL/L) 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 左右。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 (包括革兰氏染色观察细菌形态、暗视野观察细菌活力)、尿素酶实验。灌胃用 *H. pylori* 的要求: 革兰氏染色阴性, 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  $10^{12}$ /L。

*H. pylori* 感染小鼠模型的建立: 采用参考文献<sup>[4]</sup>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  $10^{12}$  CFU/L, 每只小鼠灌胃 0.5 mL (约  $10^{12}$ /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 3 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*。

**1.2 方法** 将已鉴定感染 *H. pylori* 的剩余的 25 只小鼠 (共 30 只小鼠, 鉴定用已经处死 5 只) 随机分成 4 组: ①疫苗组: 经口喂饲唾液酸黏附素 100  $\mu$ g 加霍乱毒素 2  $\mu$ g; ②单纯唾液酸黏附素疫苗组: 经口喂饲唾液酸黏附素 100  $\mu$ g; ③单纯霍乱毒素组: 经口喂饲 CT 2  $\mu$ g; ④PBS 组: 经口喂饲 PBS 200  $\mu$ g/鼠/次。治疗组 10 只小鼠; 后 3 组为对照组, 每组 5 只小鼠。免疫治疗前小鼠禁食 12 h, 禁水 4 h。每只小鼠先用 30 g/L 碳酸氢钠 100  $\mu$ L 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。末次免疫后 4 wk, 禁食 1 d, 摘眼球放血处死动物, 用 750 g/L 乙醇浸泡小鼠体表 5 min 以上。在超净工作台内迅速取出胃用于免疫治疗后幽门螺杆菌根除的鉴定, 方法采用半定量细菌培养法<sup>[5]</sup>, 胃组织称重后, 制成匀浆, 用布氏肉汤倍比稀释后, 取 200  $\mu$ L 涂于 *H. pylori* 固体培养基, 菌落计数后, 计算单位胃组织的定植细菌密度。

**统计学处理:** 采用 SPSS10.0 软件, 计数资料用  $\chi^2$  检验, 计量资料的比较采用方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

经尿素酶实验、组织病理学检查及细菌培养证实 5 只随机处死的小鼠全部感染 *H. pylori*。细菌培养发现胃组织 *H. pylori* 的定植密度为  $10^{5-6}$ /g。胃组织培养 *H. pylori* 为阴性者定为根除, 疫苗治疗组 10 例中有 3 例根除, 根除率为 30%, 其它 3 组无 1 例根除, 根除率为 0.0%。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* 的定植密度为  $0.071 \times 10^6$  菌落形成单位/克胃组织, 明显低于其它 3 组 (单纯 CT 组, 单纯唾液酸黏附素疫苗组和 PBS 组分别为  $7.46 \times 10^6$  菌落形成单位/克胃组织,  $7.5 \times 10^6$  菌落形成单位/克胃组织和  $7.54 \times 10^6$  菌落形成单位/克胃组织),

其差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 1)。

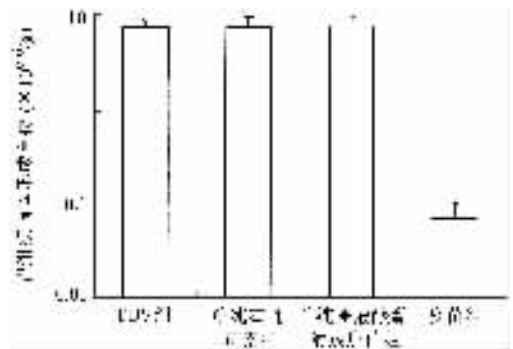


图 1 半定量培养法评价免疫治疗后 *H. pylori* 的定植密度

## 3 讨论

*H. pylori* 疫苗具有预防作用, 同时还有治疗作用。用重组尿素酶加上佐剂大肠杆菌不耐热毒素 (LT) 口服免疫已感染 *H. pylori* 的恒河猴, 大多数动物胃内 *H. pylori* 定植密度减少且胃炎明显好转<sup>[6-7]</sup>; 免疫治疗已成为治疗 *H. pylori* 感染最有效、最有前景的方法之一。同时也提示单一尿素酶抗原免疫不能达到最佳的治疗效果, 为了确保免疫治疗效果必须寻找其它有效抗原成分来配制更有效的多价疫苗。在 *H. pylori* 疫苗候选成分的研制过程中, 目前采用的基因重组抗原尿素酶、过氧化氢酶、细胞空泡毒素等基本上着眼于阻断 *H. pylori* 的毒力因素, 而与 Hp 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。唾液酸黏附素是 *H. pylori* 近年来研究中新确定的功能蛋白, 其相对分子质量约 17 500, 能够结合含唾液的鞘糖脂和胎球蛋白琼脂糖。在其它病原微生物的研究中如诺瓦克病毒 (NV), 已经发现 NV 能够与人的唾液相结合, 进一步研究表明, 与 NV 相结合的唾液中所含的受体广泛存在于人体的消化道黏膜表面, NV 通过与这些受体结合从而定植于人体, 才能进一步发挥其致病作用, 因此, 能够与这些受体相结合的 NV 蛋白配体是重要的功能蛋白<sup>[8-9]</sup>。由此, 我们推测唾液酸黏附素这种新的功能蛋白也许在 *H. pylori* 致病作用中也发挥着同样重要的作用。从它出发制备疫苗可能为 *H. pylori* 多价疫苗提供新的组分。动物实验表明, 唾液酸黏附素疫苗的 *H. pylori* 根除率为 30%, 即使未根除的小鼠, 其 *H. pylori* 定植密度也有明显的降低 ( $P < 0.05$ ), 可用于 *H. pylori* 治疗性疫苗候选抗原。未来的 *H. pylori* 疫苗可能是针对 *H. pylori* 自我防护因素、毒力因素、黏附因素等多种因素所构成的多价疫苗, 唾液酸黏附素可能在其中发挥重要的作用。

## 【参考文献】

- [1] 白杨, Ellen X, 王继德, 等. 幽门螺杆菌唾液酸黏附素的克隆与高效表达 [M]. 中华医学会消化病学分会第四次全国幽门螺杆菌学术会议论文汇编 [C]. 2005: 160-161.
- [2] Bennett HJ, Roberts IS. Identification of a new sialic acid-binding protein in *Helicobacter pylori* [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2005, 44(2): 163-169.
- [3] 白杨, Ellen X, 王继德, 等. 幽门螺杆菌唾液酸黏附素的纯化与功能研究 [M]. 中华医学会消化病学分会第四次全国幽门螺杆菌学术会议论文汇编 [C]. 2005: 156.
- [4] Lin HJ, Xue J, Bai Y, et al. Pathogenicity and immune prophylaxis of cag pathogenicity island gene knockout homogenic mutants [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(22): 3289-3291.
- [5] 王继德, 白杨, 林焕建, 等. 胃型上皮 Fas 表达的调节: 幽门螺杆菌致病的自身免疫机制之一 [J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(11): 1184-1187.

- [6] Bai Y, Zhang YL, Wang JD, et al. Construction of attenuated *Salmonella typhimurium* Strain expressing *Helicobacter pylori* conservative region of adhesin antigen and its immunogenicity [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(17): 2498-2502.
- [7] Bai Y, Li LR, Wang JD, et al. Expression of *Helicobacter pylori* Hsp60 protein and its immunogenicity [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(12): 2711-2714.
- [8] Tan M, Jiang X. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle [J]. Trends Microbiol, 2005, 13(6): 285-293.
- [9] Huang P, Farkas T, Zhong W, et al. Norovirus and histo-blood group antigens: Demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns [J]. J Virol, 2005, 79(11): 6714-6722.

编辑 许福明

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2008)01-0025-01

## 糖皮质激素局部注射治疗肩胛上神经痛 15 例

许凤琴, 苑继承, 金绍岐

(第四军医大学西京医院门诊部, 陕西 西安 710033)

【关键词】肩胛上神经 神经痛 糖皮质激素 局部注射  
【中图分类号】R745 【文献标识码】B

1 临床资料 2001/2006 接诊的 6000 余例软组织病痛患者中, 确诊为肩胛上神经痛者 15 例, 均为肌肉较发达的中年男性, 非运动员。主诉肩部疼痛, 部位多为外上, 阵发性加剧, 上肢运动无障碍, 活动可使疼痛加剧, 病程 1 至数周。查体: 肩关节活动正常。排除常引起肩部疼痛的肱二头肌长头肌腱、三角肌下滑囊、肩锁关节等处病变, 无臂上外侧皮神经分布区痛觉改变的体征, 仅在冈上窝中部有深压痛。15 例均无冈上肌与冈下肌受累体征。在肩胛骨背面上 2/3 范围内出现刺痛过敏 3 例, 减退 7 例, 5 例无刺痛改变。四邻皮肤均无痛觉改变。分析为肩胛上神经在通过肩胛上切迹处受到肩胛横韧带的卡压所致, 诊断为肩胛上神经痛。取强的松龙混悬液 25 mg, 加 20 mL/L 利多卡因 10 mL, 用 4 cm 以上的长针头, 于肩胛冈上缘中点上方约 2 cm 处下针, 穿过斜方肌及冈上肌, 触及冈上窝的骨面后, 注入药液约 1 mL, 然后沿骨面分别向前及内外找寻肩胛上切迹, 至触及韧带性结构时即可判定已达切迹附近, 于其附近分散注入药液。15 例患者, 皆在注射后数分钟内疼痛症状完全消失, 有皮支的 10 例患者注射后 5 min 皮肤分布区感觉消失, 2~3 h 麻醉药作用过后, 感觉恢复, 并再现轻度疼痛。1 wk 后复诊, 14 例疼痛消失痊愈, 1 例疼痛减轻, 再次注射 3 wk 时复诊, 仍残余轻度不适, 但无疼痛, 第 3 次注射治疗, 5 wk 时复诊, 局部皮肤刺痛感仍未完全恢复, 再经 1 次注射痊愈。

收稿日期 2007-09-21; 接受日期 2007-10-20

作者简介: 许凤琴, 副主任护师。Tel (029) 84775505 Email 505xfq@sina.com.cn

2 讨论 肩胛上神经痛是由于神经在行径中某处受到卡压所致, 有学者称之为肩胛上神经圈套(卡压)综合征, 临床上比较罕见, Ehetgruber 复习 1959~2001 年文献, 共查到 88 例报道<sup>[1]</sup>。肩痛属常见病变症状, 肩带肌肉创伤或劳损多见, 尤其是慢性劳损。病变多见于浅处的斜方肌、肩胛提肌以及内缘以内的大小菱形肌, 冈上肌者较为少见。需要特别注意的是冈上肌浅处的斜方肌上外侧部分常见慢性劳损, 压痛点极易与冈上肌中部压痛相混, 但是可以按压痛的深浅度鉴别。我们对肩胛上神经痛的诊断, 查体首先排除常见的肱二头肌腱鞘炎、三角肌及肩峰下滑囊炎、肩锁关节劳损以及邻近肌肉的慢性劳损等以后, 再作皮肤针刺痛检查, 按肩周各皮神经的分布区, 排除上方锁骨上神经(颈 3、4)分布区、外前后三面的臂上外侧皮神经(颈 5、6)分布区及背部中线旁的颈 4~胸 7 后支分布区, 有肩胛上神经皮支者即可按分布区的痛觉改变决定, 无皮支者可按肩胛骨上切迹处有无深压痛决定, 对病程较长者, 不论有无皮支, 皆可按肌肉有无萎缩决定。

据文献报道<sup>[2-3]</sup>, 对于肩胛上神经损伤或卡压病的治疗, 主要是采取手术方法, 切除肩胛横韧带, 去除病因。我们认为, 对于未能肯定诱发病因的病例, 或者已可排除外伤、囊肿等外因所致者, 可先试行局部注射糖皮质激素至肩胛上切迹附近及肩胛横韧带 1~3 次, 间隔 1 wk, 如无效, 可再考虑手术。对于因肩胛横韧带或切迹处的骨质改变所致者, 糖皮质激素可抑制成纤维细胞的增殖, 从而减轻骨膜炎, 使增生肥厚的韧带软化恢复, 消除对神经的卡压。神经受压后可以产生水肿及脱髓鞘改变, 对于短期病例, 压力消除后可以迅速恢复, 对于病程较长者, 恢复较慢, 查体已可见有冈上下肌萎缩者, 恢复更慢, 疼痛消失后仍需一定时间方可恢复。

## 【参考文献】

- [1] Zhetgruber H, Noske H, Lang T, et al. Suprascapular nerve entrapment: A meta-analysis [J]. Int Orthop, 2002, 26(6): 339-343.
- [2] Fansa H, Schneider W. Suprascapular nerve entrapment [J]. Handchir Mikrochir Plast Chir, 2003, 35(2): 122-126.
- [3] Kim DH, Murovic JA, Tiel RL, et al. Management and outcomes of 42 surgical suprascapular nerve injuries and entrapments [J]. Neurosurgery, 2005, 57(1): 120-127.

编辑 王雪萍