

论著

文章编号:1000-5404(2013)03-0212-04

幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位优势 Th 表位的系统筛选与鉴定

李滨¹, 陈立¹, 杨武晨², 李海波¹, 胡健², 何亚非², 章金勇¹, 赵卓¹, 吴超¹ (400038 重庆, 第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室, 国家免疫生物制品工程技术研究中心¹; 400037 重庆, 第三军医大学新桥医院消化内科²)

[摘要] 目的 筛选幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)尿素酶 B 亚单位(UreB)中 CD4⁺ 细胞优势应答表位, 并确定其 MHC 限制性。方法 以重组 UreB 蛋白(rUreB)与弗氏佐剂联合皮下多点注射免疫 BALB/c 小鼠, 从小鼠脾脏中体外扩增 UreB 特异性 T 淋巴细胞, 采用步移重叠合成肽法筛选 CD4⁺ T 细胞优势应答表位, 分析其 MHC 分子限制性。结果 18mer 短肽筛选发现 UreB₄₀₃₋₄₂₀ 和 UreB₄₀₉₋₄₂₆ 可显著刺激 UreB 特异性 CD4⁺ T 细胞产生 IFN- γ 。13mer 短肽鉴定实验结果显示, UreB₄₀₉₋₄₂₁ 可刺激产生与 18mer 短肽 UreB₄₀₃₋₄₂₀ 和 UreB₄₀₉₋₄₂₆ 等同的应答强度。同时抗体阻断实验表明, 抗 H-2^d(I-A) 单克隆抗体能有效阻断该表位的应答。结论 UreB₄₀₃₋₄₂₀ 和 UreB₄₀₉₋₄₂₆ 为 UreB 抗原中的优势 Th 表位, 其刺激免疫反应的核心位置为 UreB₄₀₉₋₄₂₁, 且存在 H-2^d(I-A) 限制性。

[关键词] 幽门螺杆菌; 尿素酶 B 亚单位; Th 表位

[中图分类号] R377; R392-33; R392.11

[文献标志码] A

Systemic identification of immunodominant Th epitopes from urease B subunit of *Helicobacter pylori*

Li Bin¹, Chen Li¹, Yang Wuchen², Li Haibo¹, Hu Jian², He Yafei², Zhang Jinyong¹, Zhao Zhuo¹, Wu Chao¹ (¹Department of Clinic Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Laboratory Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; ²Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective** To identify systematically MHC-restricted immunodominant T helper lymphocyte (Th) epitopes from urease subunit B of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and to confirm the MHC-restricting profile. **Methods** BALB/c mice were immunized with recombinant UreB protein (rUreB) and Freund's adjuvant by subcutaneous injection. Antigen-specific CD4⁺ T cells were amplified *in vitro* from spleens of immunized mice. The MHC-restricted immunodominant Th epitopes were identified by synthesizing overlapping peptides and antibody-blocking assay. **Results** UreB₄₀₃₋₄₂₀ and UreB₄₀₉₋₄₂₆ induced the strongest secretion of IFN- γ in all the 93 18mer peptides, while 13mer peptide UreB₄₀₃₋₄₂₆ within UreB₄₀₃₋₄₂₀ and UreB₄₀₉₋₄₂₆ induced equivalent responses compared with the 18mer peptides. The results of antibody-blocking assay showed that the H-2^d(I-A) monoclonal antibody efficiently blocked the T cell activation induced by peptide UreB₄₀₃₋₄₂₆. **Conclusion** UreB₄₀₃₋₄₂₀ and UreB₄₀₉₋₄₂₆ are immunodominant Th epitopes of urease subunit B antigen. The core reactive sequence is UreB₄₀₉₋₄₂₁ and its restriction molecule is H-2^d(I-A).

[Key words] *Helicobacter pylori*; urease B subunit; T helper lymphocyte epitopes

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81072493) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BB5043). Corresponding author: Wu Chao, E-mail: wuchao99261@gmail.com

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)定植于人胃黏膜, 致全球 50% 以上的人群感染, 成为慢性胃炎、胃十二指肠溃疡及胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤等胃肠疾病的主要致病因素^[1-2]。目前临床疗法存在多种不足^[3], 而表位疫苗的免疫接种有可能成为彻底消除 Hp 感染

和治疗相关胃肠疾病的有效手段。研究表明: 抗原特异性 CD4⁺ T 淋巴细胞在抗 Hp 感染中发挥着重要作用, 其中以产 IFN- γ 的 CD4⁺ T 淋巴细胞的免疫保护作用较为明确^[4-5]。为了有效激发机体产生抗原特异性 IFN- γ ⁺ CD4⁺ T 淋巴细胞应答, 需对现有疫苗候选保护性抗原中免疫优势表位进行系统的筛选与鉴定。

尿素酶作为目前公认的 Hp 疫苗候选抗原分子, 与细菌定植、代谢及感染密切相关。尿素酶 B 亚单位(urease subunit B, UreB)作为尿素酶发挥生物学作用的功能亚基, 可诱导机体产生强烈的免疫应答^[6]。因

[基金项目] 国家自然科学基金(81072493); 重庆市自然科学基金(CSTC2011BB5043)

[通信作者] 吴超, E-mail: wuchao99261@gmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121129.1158.006.html> (2012-11-29)

此,本研究以 UreB 为研究对象,采用合成重叠肽技术和细胞内因子染色的流式细胞分析方法,对 UreB 抗原中可激发 CD4⁺ T 淋巴细胞应答的免疫优势表位进行系统的筛选与鉴定,明确其基本免疫学特性,旨在为 Hp 表位疫苗的研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 动物及免疫

6~8 周龄雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠[体质量(20±2)g]购自第三军医大学实验动物中心。所有动物实验经第三军医大学实验动物管理及伦理委员会审核通过。

实验分为 UreB 免疫组和 PBS 对照组,每组 10 只小鼠。UreB 免疫组采用重组 UreB(rUreB)抗原(本实验室制备)结合弗氏佐剂进行免疫接种。首次免疫以 rUreB 加完全弗氏佐剂皮下多点注射,再次免疫以 rUreB 加不完全弗氏佐剂接种,末次免疫仅注射 rUreB 抗原。rUreB 接种剂量 100 μg/只,共 3 次,每次间隔 10 d。

1.2 细胞培养

小鼠末次免疫 1 周后脱颈处死,取脾脏,研磨,制成单细胞悬液,经小鼠淋巴细胞分离液密度梯度离心后收集白膜层淋巴细胞。以 RP-10 细胞培养基(RPMI1640,10%胎牛血清,50 μmol/L 2-ME,25 mmol/L HEPES,100 U/mL 青霉素,100 U/mL 链霉素)重悬细胞至 2×10⁶/mL,接种于 24 孔培养板,添加 mL-2(Peprotech 公司)至终浓度 5 U/mL,同时以 0.5 μmol/L 终浓度 rUreB 刺激培养用于建抗原特异性 T 细胞,或以 5 μmol/L 终浓度表位刺激培养用于建表位特异性 T 细胞。5 d 后再次进行淋巴细胞分离,在 20 U/mL mL-2 条件下继续培养,直至检测。

1.3 肽段合成与流式抗体

所有的肽段经上海吉尔生化公司采用步移重叠法合成。18 个氨基酸长度(18mer)肽段每次步移 6 个氨基酸,重叠 12 个氨基酸。13 个氨基酸长度(13mer)肽段每次步移 2 个氨基酸,重叠 11 个氨基酸。所有的肽段用 DMSO 溶解。抗小鼠 CD3 抗体(FITC)、抗小鼠 CD4 抗体(APC)、抗小鼠 IFN-γ 抗体(PE)均

购自 Biolegend 公司。

1.4 细胞内因子染色(ICS)

IFN-γ 细胞内因子染色采用标准程序操作^[7],细胞内因子染色试剂盒购自 BD 公司。所用肽库/多肽刺激终浓度为 5 μmol/L。对照孔以 DMSO 代替,1 μL/孔。

1.5 主要组织相容性复合体(MHC)限制性分析

采用抗小鼠 MHC-I、MHC-II(I-A)、MHC-II(I-E)抗体(eBioscience 公司)进行抗体阻断实验。特异性 T 细胞在短肽刺激之前预先分别与上述抗体(终浓度 5 μg/mL)于 37 °C 条件反应 30 min,反应结束后洗去上清中的抗体,再以短肽刺激(终浓度 5 μmol/L)5 h 后进行细胞内 IFN-γ 染色,流式细胞仪检测分析。

1.6 自然递呈实验

正常小鼠腹腔巨噬细胞贴壁 2 h 作为抗原递呈细胞,与 UreB 抗原于 37 °C 培养箱共孵育 1 h,之后洗去上清中抗原成分,加入 T 细胞及高尔基体阻断剂共培养,5 h 后进行细胞内 IFN-γ 染色和流式细胞分析。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异行两独立样本 *t* 检验。

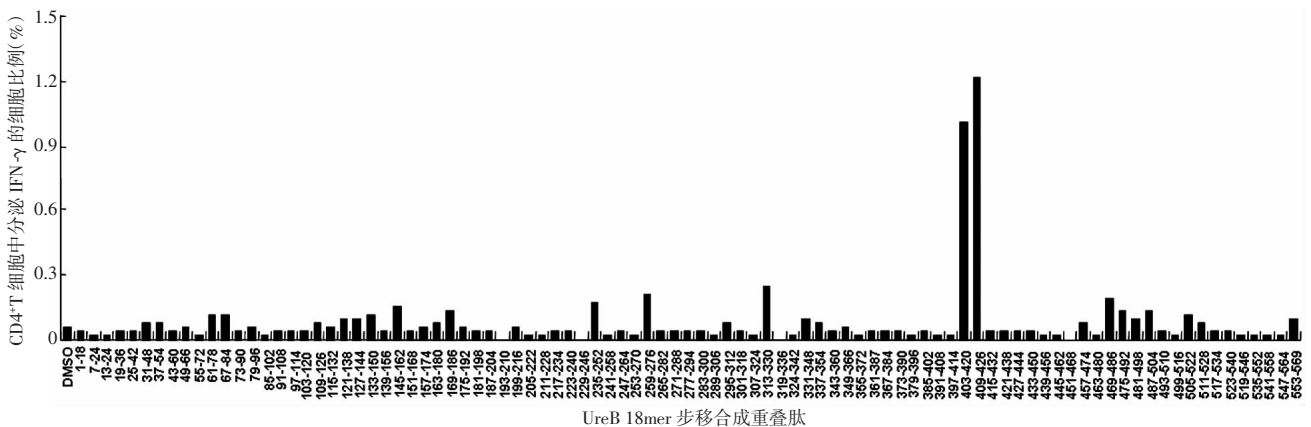
2 结果

2.1 UreB 抗原特异性 CD4⁺ T 细胞的体外扩增与鉴定

UreB 免疫组小鼠脾淋巴细胞体外培养后,经 UreB 肽库刺激可诱导相当一部分 CD4⁺ T 细胞分泌 IFN-γ,而 PBS 对照组无此现象。对所有实验小鼠进行检测发现 UreB 免疫组产生了特异性 CD4⁺ T 细胞应答[CD4⁺ T 细胞中分泌 IFN-γ 的细胞比例(7.00±0.05)%],而 PBS 对照组[CD4⁺ T 细胞中分泌 IFN-γ 的细胞比例(0.30±0.07)%]无明显应答(*P*<0.01)。

2.2 步移合成重叠肽法筛选优势应答表位

UreB 全蛋白氨基酸序列中 UreB₄₀₃₋₄₂₀、UreB₄₀₉₋₄₂₆ 可刺激产生明显的 CD4⁺ T 淋巴细胞应答(图 1),提示 UreB 蛋白中 CD4⁺ T 细胞优势应答表位可能位于 UreB₄₀₃₋₄₂₆ 区域。

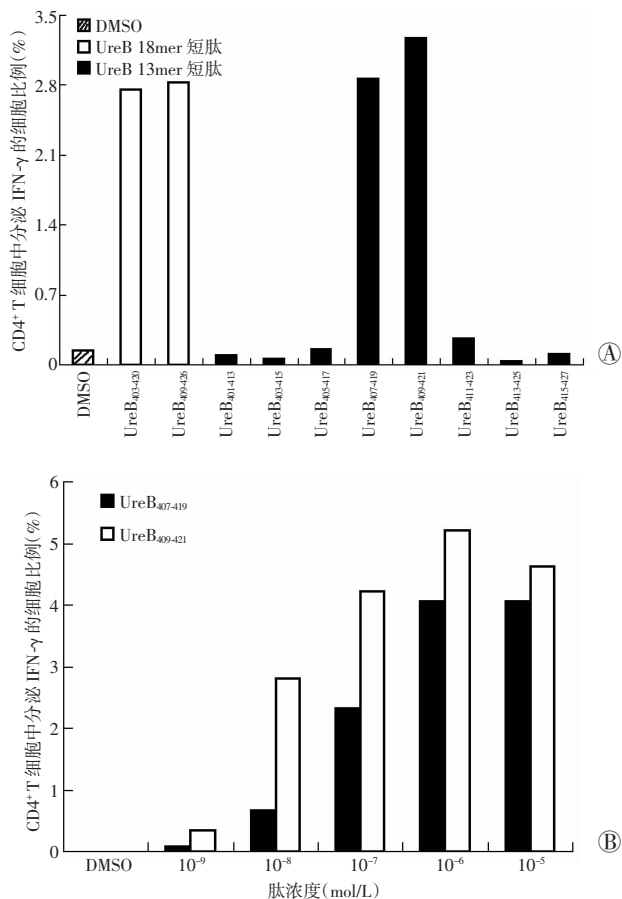


免疫优势表位氨基酸序列:UreB₄₀₃₋₄₂₆ KRYLSKYTINPAIAHGISEYVGSV

图1 UreB 抗原中优势 18mer 氨基酸短肽的筛选

2.3 免疫优势应答区域中更小表位(13mer)的确认

13mer 短肽 UreB₄₀₇₋₄₁₉、UreB₄₀₉₋₄₂₁ 可刺激产生与 18mer 短肽 UreB₄₀₃₋₄₂₀、UreB₄₀₉₋₄₂₆ 同样强度的细胞应答(图 2A)。为确证优势应答表位,采用 Titration 实验将 2 个 13mer 短肽(UreB₄₀₇₋₄₁₉、UreB₄₀₉₋₄₂₁)进行系列浓度梯度稀释后,分别与 UreB₄₀₃₋₄₂₆ 特异性 T 细胞共培养 5 h,流式细胞术检测 CD4⁺ T 细胞的 IFN- γ 应答水平。结果显示 UreB₄₀₉₋₄₂₁ 在所有浓度梯度下所刺激产生的 CD4⁺ T 细胞应答水平均强于 UreB₄₀₇₋₄₁₉(图 2B),提示 UreB₄₀₉₋₄₂₁ 为 UreB 抗原中优势应答的 CD4⁺ T 细胞表位。



A: 针对 18mer 应答短肽 UreB₄₀₃₋₄₂₀、UreB₄₀₉₋₄₂₆ 步移合成 13mer 短肽; B: 不同浓度 13mer 短肽刺激下 CD4⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 的细胞比例

图 2 UreB₄₀₃₋₄₂₆ 中免疫优势 13mer 短肽的筛选

2.4 MHC(H-2^d)限制性分析

抗 MHC-II(I-A) 抗体阻断后可明显降低特异性 CD4⁺ T 细胞应答水平,而其他抗体无阻断作用(图 3),提示优势应答表位 UreB₄₀₉₋₄₂₁ 为 H-2^d(I-A) 限制性。

2.5 自然递呈实验

UreB 蛋白经抗原递呈细胞加工处理和递呈后可有效刺激 UreB₄₀₉₋₄₂₁ 特异性 CD4⁺ T 细胞应答,其强度与表位肽 UreB₄₀₉₋₄₂₁ 直接刺激无明显区别(图 4),提示筛选到的优势应答表位 UreB₄₀₉₋₄₂₁ 可以在自然情况下被加工递呈。

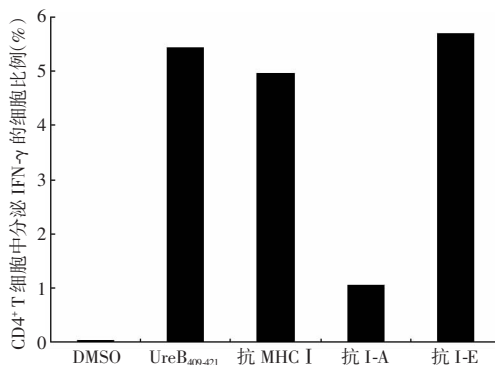


图 3 优势表位 UreB₄₀₉₋₄₂₁ MHC 限制性分析

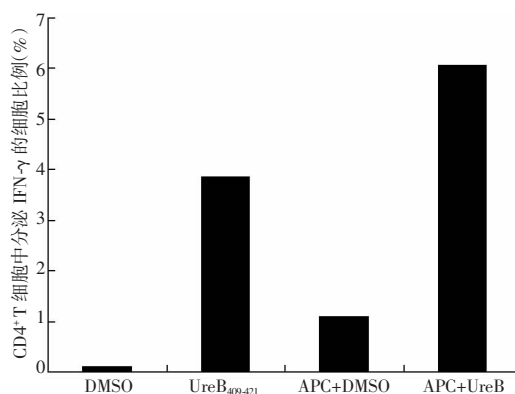


图 4 优势表位 UreB₄₀₉₋₄₂₁ 自然递呈实验结果

3 讨论

Hp 感染与多种胃部疾病密切相关,已被世界卫生组织列为一类致癌因子。为彻底根除 Hp,达到治愈疾病的目的,现已广泛开展 Hp 疫苗的研究,其中多采用全菌抗原、超声上清、外膜蛋白或重组蛋白免疫机体,诱导产生强烈的体液免疫应答,然而研究发现其免疫保护效果并不理想。因此筛选优势应答表位,用于构建 Hp 表位疫苗以避免全抗原中非保护性表位的副作用使免疫效果安全且有针对性已成为 Hp 疫苗研发的新策略。

有研究表明,分泌 IFN- γ 的抗原特异性 CD4⁺ T 淋巴细胞在抗 Hp 感染过程中发挥了关键作用^[4]。尽管 B 细胞的功能也有一定的报道,然而认识尚不统一。因此,本研究以抗原特异性 CD4⁺ T 淋巴细胞为研究对象,对 Hp 重要保护性抗原的优势 Th 表位进行筛选和鉴定。目前表位的筛选与鉴定方法主要包括质谱法、软件预测、步移合成重叠肽等多种方法。质谱法操作简单、省时、快速,但不能排除自身反应性表位和在自然状态下不能被 APC 加工递呈的表位^[8-9]。软件预测法虽简便、快速,但预测结果常与真实情况存在一定的出入,需实验加以验证^[10-11]。步移合成重叠肽

是一种系统筛选表位的方法,可有效克服质谱法和预测法的不足,明确表位的免疫优势应答特性,避免漏筛和误筛现象。因此,本研究采用步移合成重叠肽法对UreB抗原中所有可能的小鼠H-2^d限制性Th表位进行了全面系统的筛选。虽然操作较为复杂,却可以如实反映机体的免疫应答情况,结果真实、可信。目前此方法已广泛用于肿瘤抗原^[7, 12]和病毒抗原^[13-14]表位的筛选与鉴定。

目前Hp表位疫苗的研究多集中于B细胞表位,研究发现UreA不同B细胞表位的单抗具有抑制尿素酶的活性^[15],采用UreB B细胞表位制作的疫苗可诱导机体产生有效的中和抗体^[16],对过氧化氢酶(Kat)抗原B细胞表位的研究也得到了同样的结论^[17]。然而报道中很少涉及对T细胞功能的研究。产IFN- γ 的CD4⁺T淋巴细胞在抗Hp感染过程中的作用已较为明确。因此有必要对Hp抗原的Th表位进行研究。本实验室前期通过预测的方法从UreB抗原中筛选到3个Th表位^[18],基于此制作的表位疫苗证实可以有效抑制Hp在胃黏膜局部的定植^[19]。然而前期实验采用预测方法,并未对UreB的全部表位进行全面系统的筛选鉴定,所以不排除可能存在更具免疫优势的保护性表位。本研究采用步移重叠肽法对UreB所有可能的Th表位进行了系统筛选,从中筛选到优势应答表位UreB₄₀₉₋₄₂₁。结果与采用软件预测法得到的数据^[18]相比存在一定的区别。然而究竟何种表位在机体抗Hp感染中发挥关键作用还需要进一步研究。

综上所述,本研究通过小鼠皮下注射重组UreB抗原,在体外成功扩增出抗原特异性CD4⁺T淋巴细胞,筛选到优势Th表位UreB₄₀₉₋₄₂₁,对其MHC限制性进行了分析,同时证实此优势应答表位可被自然加工递呈。本研究结果将为认识抗原和表位肽的免疫保护作用,进一步设计Hp表位疫苗奠定实验基础。本研究虽然筛选鉴定出1个新的优势Th表位,但该表位的免疫保护作用和其他免疫学特性仍需进一步研究。

参考文献:

[1] Guo L, Li X, Tang F, et al. Immunological features and the ability of inhibitory effects on enzymatic activity of an epitope vaccine composed of cholera toxin B subunit and B cell epitope from *Helicobacter pylori* urease A subunit[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93(5): 1937-1945.
[2] Zhang J Y, Liu T, Guo H, et al. Induction of a Th17 cell response by *Helicobacter pylori* Urease subunit B[J]. Immunobiology, 2011, 216(7): 803-810.
[3] Kwon S B, Lee K L, Kim J S, et al. Antibiotics-associated diarrhea and other gastrointestinal abnormal responses regarding *Helicobacter pylori* eradication[J]. Korean J Gastroenterol, 2010, 56(4): 229-235.
[4] Kopitar A N, Stegel V, Tepes B, et al. Specific T cell responses to

Helicobacter pylori predict successful eradication therapy[J]. J Infect, 2007, 54(3): 257-261.
[5] Otsu S, Gotoh K, Yamashiro T, et al. Transfer of antigen-pulsed dendritic cells induces specific T-Cell proliferation and a therapeutic effect against long-term *Helicobacter pylori* infection in mice[J]. Infect Immun, 2006, 74(2): 984-993.
[6] Liu X F, Hu J L, Quan Q Z, et al. Systemic immune responses to oral administration of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* urease in mice[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(14): 2154-2156.
[7] Ebert L M, Liu Y C, Clements C S, et al. A long, naturally presented immunodominant epitope from NY-ESO-1 tumor antigen: implications for cancer vaccine design[J]. Cancer Res, 2009, 69(3): 1046-1054.
[8] Jarmalavicius S, Welte Y, Walden P. High immunogenicity of the human leukocyte antigen peptidomes of melanoma tumor cells[J]. J Biol Chem, 2012, 287(40): 33401-33411.
[9] Bozzacco L, Yu H, Dengjel J, et al. Strategy for identifying dendritic cell-processed CD4⁺T cell epitopes from the HIV gag p24 protein[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41897.
[10] Gao J, Faraggi E, Zhou Y, et al. BEST: improved prediction of B-cell epitopes from antigen sequences[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e40104.
[11] Mori M, Matsuki K, Maekawa T, et al. Development of a novel in silico docking simulation model for the fine HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitope mapping[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41703.
[12] Chen Q, Jackson H, Parente P, et al. Immunodominant CD4⁺ responses identified in a patient vaccinated with full-length NY-ESO-1 formulated with ISCOMATRIX adjuvant[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(25): 9363-9368.
[13] Semeniuk C A, Capina R E, Mendoza M G, et al. Identification and characterization of HLA-A * 0301 epitopes in HIV-1 gag proteins using a novel approach[J]. J Immunol Methods, 2010, 352(1/2): 118-125.
[14] Nayak J L, Richards K A, Chaves F A, et al. Analyses of the specificity of CD4 T cells during the primary immune response to influenza virus reveals dramatic MHC-linked asymmetries in reactivity to individual viral proteins[J]. Viral Immunol, 2010, 23(2): 169-180.
[15] Guo L, Liu K, Xu G, et al. Prophylactic and therapeutic efficacy of the epitope vaccine CTB-UA against *Helicobacter pylori* infection in a BALB/c mice model[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 95(6): 1437-1444.
[16] Qiu Y, Wang Y C, Tao H X, et al. Identification of B-cell epitopes in urease B subunit of *Helicobacter pylori* bound by neutralizing antibodies[J]. Vaccine, 2010, 28(32): 5220-5227.
[17] Li Y, Ning Y S, Wang Y D, et al. Production of mouse monoclonal antibodies against *Helicobacter pylori* Catalase and mapping the antigenic epitope by phage display library[J]. Vaccine, 2008, 26(9): 1263-1269.
[18] Shi Y, Wu C, Zhou W Y, et al. Identification of H-2d restricted Th epitopes in Urease B subunit of *Helicobacter pylori* [J]. Vaccine, 2007, 25(14): 2583-2590.
[19] Zhou W Y, Shi Y, Wu C, et al. Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model[J]. Vaccine, 2009, 27(36): 5013-5019.

(收稿:2012-09-08;修回:2012-11-07)

(编辑 吴培红)