

抗体,使从中获得高活性的治疗剂成为可能。由于出现的时间较短,核糖体展示和共价展示技术至今未成功生产任何人抗体作为自身免疫性疾病的候选

药物。但是,这两项技术较之噬菌体展示技术和化学库具有更大的潜力,能生产更多的库,因此今后更有可能被广泛采用。

幽门螺杆菌疫苗的研究进展

王毅超综述 邹全明审校

(第三军医大学临床微生物及免疫学教研室,重庆 400038)

摘要:幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)是引起胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡乃至胃癌的主要致病菌。近年来,HP感染呈上升趋势,有效疫苗的研制是根除HP的最简单、经济、快捷的手段。随着疫苗研究的深入,诸如灭活全菌疫苗、亚单位疫苗、载体疫苗、DNA疫苗及缓释疫苗等相继问世,其优、缺点也比较明显。本文对以上几种疫苗的研究进展作一综述。

关键词:幽门螺杆菌;疫苗

中图分类号:R975 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0971(2004)02-0097-04

早在1994年,WHO就已将幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)确认为一级致癌因子,但长期以来对HP感染的药物治疗一直受到治愈率低、费用昂贵、病人依从性差及耐药菌株出现等诸多因素的制约,使现阶段全球感染人数仍呈上升趋势。HP疫苗的研制和应用对有效控制及降低HP感染率、发病率会起到举足轻重的作用。近年来,随着基因工程技术、疫苗载体技术的发展,以及HP基因组、蛋白质组研究的深入,HP疫苗的研究也取得长足进步。

1 HP全菌灭活菌苗

HP全菌灭活菌苗的应用在疫苗研究的早期就已经出现,应用其粗制抗原免疫小鼠能产生高效的局部粘膜免疫反应。最近,Raghavan等^[1]应用甲醛处理后的HP SS1全菌+霍乱毒素(CT)免疫C57BL/6小鼠,发现其能有效抑制HP感染,而且亦能有效控制再次感染。此外,有人研究了HP全菌抗原还可以治疗HP长期感染。可见,应用全菌灭活菌苗免疫动物能得到明显的免疫保护。但全菌疫苗仍有一些不足之处:(1)HP细菌本身成分复杂,难于标准化;(2)粗制抗原本身含有多种蛋白及其他未知成分,且它们的功能还未完全了解,进入机体后可能引起免疫病理变化或其他不可预测的副作用;(3)

由于其本身成分复杂,容易引起交叉免疫反应,使肠道内的菌群失调,破坏机体自身生理环境;(4)HP本身为微需氧菌,在培养时对氧含量、营养状况、温度和湿度等条件要求非常苛刻,且培养时间长,费用较高,产量偏低,大量培养非常困难。因此,HP全菌疫苗的开发尚有待进一步探索。

2 亚单位疫苗

作为HP疫苗研究的重点,菌体本身的亚单位保护性抗原以其结构简单、成分清楚、安全性好、便于工业化生产等诸多优点而备受关注。近年来,HP疫苗研究的热点主要包括以下几种保护性抗原。

2.1 脲酶

脲酶(urease)是由A、B两个亚单位组成的,暴露于细胞表面。在胃内强酸性环境条件下,脲酶能够分解胃液中的尿素而形成氨和二氧化碳,氨水呈碱性包裹在细菌周围,能够有效抵抗胃酸对细菌的破坏,脲酶在细胞中的含量约为6%,而且其本身高度保守。可以利用以上性质进行疫苗研究。Liu等^[2]将脲酶构建成重组的伤寒沙门菌菌株SL3261后经口服免疫小鼠,12周后发现胃粘膜中出现大量的IgA抗体,血清中亦有大量的IgG出现,而且动物体内亦有 γ -干扰素(IFN- γ)及白介素-10(IL-10)的分泌,胃粘膜的炎症在免疫后没有进一步发展。Londono-Arcila等^[3]将抗原经鼻腔给药可以在鼠肺内诱发大量的单核细胞及以Th1型为主的抗脲酶免疫反应;再经肠道给药时,可诱导大量抗脲酶IgG2a和

收稿日期:2003-06-11

基金项目:国家“九五”重点科技攻关项目(96-901-01-54)及全军“九五”医药卫生科研基金项目(98D044)

IgG1 抗体产生,以及 IFN- γ , IL-4, IL-5 和 IL-1 产生,这些产物对提高动物的抗感染能力具有十分重要的意义。Keller 等^[4,5]也报道了类似的实验结果,可见脲酶以其自身诸多优点可以作为 HP 疫苗的首选保护性抗原进行研究。

2.2 热休克蛋白

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)作为 HP 主要保护性抗原早已得到公认,以 HSP 为疫苗主要抗原成分的研究也取得了一定的进展。Miyashita 等^[6]利用编码 HSP 的 DNA 疫苗免疫小鼠后,可引起小鼠以粘膜免疫为主的强烈的应答反应,并能有效地降低小鼠 HP 感染率。作为 HSP 的主要成分之一的 HSP60 有助于在胃强酸性环境中维护 HP 及对胃蛋白酶的稳定性。Bai 等^[7]应用聚合酶链反应(PCR)技术将 HSP60 的 DNA 扩增后构建成原核表达载体 pET-22b(+),在大肠埃希菌 *E. coli* 菌株 BL21(DE3)内表达并免疫 BALB/c 小鼠,结果发现表达的蛋白能够被抗 HP 血清特异性结合,且免疫后的小鼠具有很好的抵抗 HP 感染能力,说明 HSP60 作为抗原物质可以使机体产生针对 HP 的抗体。因此,HSP 可以作为 HP 的主要保护性抗原进行疫苗成分的研究。

2.3 中性粒细胞激活蛋白

当机体感染 HP 时,胃粘膜组织以有大量中性粒细胞和单核细胞浸润为主要特征,作为 HP 菌体的一种重要蛋白类物质,中性粒细胞激活蛋白(neutrophil-activating protein, NAP)具有刺激中性粒细胞粘附到内皮细胞的作用。近来研究表明,NAP 可以刺激组织因子及纤维蛋白溶酶原激活抑制物-2 的产生,其结构近似于大肠埃希菌 DNA 结合蛋白 Dps,而且此蛋白在菌体内相当稳定,在细菌培养过程中基本上不发生变异^[8]。Satin 等^[9]研究发现,大多数人在感染 HP 后机会产生针对 NAP 的特异性抗体,提示 NAP 在免疫反应中具有重要的作用。应用 NAP 为主要抗原成分免疫动物也能得到很好的保护,说明 NAP 在 HP 疫苗的研究中极有可能发挥重要作用。

2.4 外膜蛋白

2002 年, Jiang 等^[10]将外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)扩增后,发现其有 1% 基因和 1.51% 的氨基酸残基发生变异。重组子多肽编码 198 个氨基酸,与整个细菌蛋白复合率为 38.96%。将上述蛋白经过镍离子层析,纯度接近 90% 后酶联免疫吸附

测定(ELISA)及免疫 BALB/c 小鼠,结果表明,重组子蛋白能够被抗 HP 血清所识别,而应用此蛋白免疫 BALB/c 小鼠能获得明显的免疫保护作用。Lembo 等^[11]也报道了用 HP OMP 脂多糖免疫机体可以产生针对单核细胞的化学诱导剂的作用,同时得到诸如 IFN- γ , IL-10, IL-1, IL-8 和 IL-6 等多种免疫产物,这些物质对机体均有很好的免疫保护作用,降低机体的 HP 感染率。可见 OMP 作为 HP 菌株的主要蛋白成分,本身可诱导很好的免疫应答反应。Peck 等^[12]研究发现,OMP 由 hopV, hopW, hopX 和 hopY 四个亚单位组成,且应用免疫荧光技术已将它们在细胞膜上完全定位,由于其序列高度保守,其中任何一种均有可能作为疫苗的主要成分加以研究。

2.5 粘附素

Kim 等^[13]研究发现,由 HP 粘附素(adhesin)及霍乱毒素 A, B 两个亚单位共同嵌合而成的 CTXA2B,经大肠杆菌表达后进行纯化,应用纯化产物口服免疫试验小鼠可以得到高水平的粘膜 IgA 和血清 IgG 抗体,这些抗体的出现可以使 62.5% 的试验小鼠得到很好的免疫保护作用。

2.6 其他保护性抗原

2002 年, Bumann 等^[14]通过二维电泳方法及肽图谱对 HP 抗原成分进行了研究,发现能有效诱导机体产生免疫反应的抗原蛋白在菌体内含量具有一定的区别,其中以氧化还原酶(oxidoreductases)居多,占所分析蛋白的 6/26,其作用可能与蛋白质二硫键的修饰有关;分别占 3/26 的鞭毛蛋白(flagellar proteins)和空泡毒素(vacuolating toxin)也是抗原蛋白的主要组成部分;另外,还有丝氨酸蛋白水解酶、脲酶、过氧化氢酶等有效抗原成分存在,这些抗原都有望成为 HP 疫苗的主要组成部分。近来一些实验者采用脂蛋白(Lpp20)、空泡毒素作为疫苗的主要成分进行研究,可以使 HP 在动物胃粘膜上的定植量明显降低,且抗 HP 再次感染的免疫力明显增强,说明应用脂蛋白及空泡毒素作为疫苗的主要成分对机体起到很好的免疫保护作用^[15,16]。

3 载体疫苗

蛋白疫苗的制备步骤繁琐,费时费力,而且需加以佐剂才能发挥较好的免疫效力,在口服给药免疫过程中还不可避免地会被胃酸及胃蛋白酶破坏,而造成大量的疫苗有效成分丧失。经过对载体疫苗的研究,发现其因诸多优点而越来越受到人们的重视:

省去了纯化蛋白抗原所消耗的大量时间、费用和精力;不需要抗原佐剂的辅助免疫,从而不再需要对抗原进行繁琐的乳化处理,减少了疫苗有效成分损失;应用载体转运疫苗,可以有效减少疫苗在胃内强酸环境下的损失。

3.1 减毒沙门菌载体疫苗

在近期 HP 疫苗的研究中有关减毒沙门菌作为疫苗载体的研究报道较多,取得的成果也较令人鼓舞。Liu 等^[2]将 SS1 菌株脲酶 B 亚单位经 PCR 扩增后导入原核表达载体 pTC01,再将其成功地转入减毒鼠伤寒沙门菌 SL3261 中,获得重组鼠伤寒沙门菌 SL3261/pTC01-UreB,口服减毒疫苗后 12 周检测小鼠血清、肠液中的抗体及脾细胞悬液中 IFN- γ 和 IL-10 的含量,发现胃粘膜上有 IgA 分泌,肠液中亦有大量 IgG 抗体产生,脾细胞悬液中 IFN- γ 和 IL-10 也有明显升高,小鼠的抗感染能力显著增强。有人将 ureAB 基因亚单位构建的质粒重组进减毒沙门菌菌株 CVD908 和 CVD908-htrA 中并复制表达。接种此载体疫苗后的小鼠能够表现出强烈的 TH1 型免疫反应,同时诱导大量抗脲酶 IgG2a 和 IFN- γ 分泌。不经肠道途径给药一样可以诱导 IgG1, IgG2a 抗体及 IFN- γ , IL-4, IL-5 和 IL-1 产生,经免疫后的小鼠能够明显增强对 HP 感染的免疫力。

3.2 大肠杆菌载体疫苗

Bai 等^[7]将 PCR 扩增后的 Hsp60 DNA 构建进入 pET-22b(+)载体,在大肠埃希菌菌株 BL21(DE3)中表达,经口服免疫 BALB/c 小鼠后发现小鼠对 HP 感染的免疫力明显增强。Jiang 等^[10]将 OMP 体外扩增后重组进入原核表达载体 pET32a 中,构建成 BL-21(DE3)大肠埃希菌菌株内进行表达,免疫 BALB/c 小鼠后可使其获得明显的保护作用。

3.3 病毒载体疫苗

Novak 等^[17]将 HP 脲酶亚单位基因插入减毒脊髓灰质炎病毒的基因中,代替部分脊髓灰质炎病毒的外壳蛋白,用这种复制子免疫转基因小鼠,能够使小鼠产生抗 HP 脲酶亚单位的 IgG 抗体,并且能够诱导产生 IFN- γ 和 IL-4。

4 DNA 疫苗

Miyashita 等^[18]报道应用 HP 编码 HSP 的 DNA 疫苗皮内免疫小鼠曾引起强烈的粘膜免疫,降低了小鼠的感染率。同时应用编码过氧化氢酶基因的 DNA 疫苗(pcDNA 3.1-kat)免疫 C57/BL6 小鼠,经鼻

腔给药 50 mg,经皮内给药 10mg。检测发现血清中 IgG 含量明显增高,两种方法对动物均起到保护作用,并且可有效地降低胃炎的严重程度。

5 缓释疫苗

药物剂型发展至今,应用以可降解的高分子材料为代表的缓释药物载体已成为发展趋势,它以自身诸多优点而越来越受到医药界的重视。此缓释剂型也同样可以应用到 HP 疫苗研究中,并取得较满意的结果^[19]。

6 其他疫苗

Panthei 等^[20]通过 PhiX174 基因 E 介导的细菌溶解机制,使 HP 变为一个细菌空壳,利用磁控技术作为免疫原同时辅以 CT 为佐剂口服免疫 BALB/c 小鼠,发现所有实验动物均完全(10/10 和 8/8)得到免疫保护。

7 结语

在众多的 HP 疫苗成分候选方案中,各种方案都有其明显的优、缺点。最近,国内外研究都倾向于灭活全菌疫苗,它虽有一定程度的副作用,但治疗及预防效果也是显而易见的。此为无毒、高效、使用简便的 HP 疫苗的进一步深入研究提供了思路。相信经过科研工作者的辛勤努力,在不远的将来 HP 疫苗的研制难题终将被攻克,并为人类健康服务。

参考文献

- [1] Raghavan S, Hjulstrom M, Holmgren J, et al. Protection against experimental *Helicobacter pylori* infection after immunization with inactivated *H. pylori* whole-cell vaccines [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(11):6383-6388.
- [2] Liu X, Hu J, Zhang X, et al. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* urease B subunit [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2002, 115(10):1513-1516.
- [3] Londono-Arcila P, Freeman D, Kleanthous H, et al. Attenuated *Salmonella enterica* serovar typhi expressing urease effectively immunizes mice against *Helicobacter pylori* challenge as part of a heterologous mucosal priming-parenteral boosting vaccination regimen [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(9):5096-106.
- [4] Keller WC, Michetti P. Vaccination against *Helicobacter pylori* - an old companion of man [J]. *Expert Opin Biol*

- Ther*, 2001, 1(5):795-802.
- [5] Solnick JV, Carfield DR, Hansen LM, et al. Immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease in specific-pathogen-free rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(5):2560-2565.
- [6] Miyashita M, Joh T, Watanabe K, et al. Immune responses in mice to intranasal and intracutaneous administration of a DNA vaccine encoding *Helicobacter pylori*-catalase [J]. *Vaccine*, 2002, 20(17/18):2336-2342.
- [7] Bai Y. Study on the cloning, expression and the immunogenicity of *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 gene [J]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(1):3-5.
- [8] Dundon WG, Nishioka H, Polenghi A, et al. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* [J]. *Int J Med Microbiol*, 2002, 291(6/7):545-550.
- [9] Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, et al. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor[J]. *J Exp Med*, 2000, 191(9):1467-1476.
- [10] Jiang Z, Tao XH, Huang AL, et al. A study of recombinant protective *H. pylori* antigens[J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(2):308-311.
- [11] Lembo A, Caradonna L. *Helicobacter pylori* infection, immune response and vaccination[J]. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2001, 1(3):199-208.
- [12] Peck B, Ortkamp M, Nau U, et al. Characterization of four members of a multigene family encoding outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* and their potential for vaccination[J]. *Microbes Infect*, 2001, 3(3):171-179.
- [13] Kim BO. Peroral immunization with *Helicobacter pylori* adhesin protein genetically linked to cholera toxin A2B subunits[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2001, 100(3):291-298.
- [14] Bumann D, Aksu S, Wendland M, et al. Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*[J]. *Infect Immun*, 2002, 70(7):3396-3403.
- [15] Keenan J, Neal S. Serum-derived IgG1-mediated immune exclusion as a mechanism of protection against *H. pylori* infection[J]. *Vaccine*, 2002, 20(23/24):2981-2988.
- [16] Marchetti M, Rossi M, Giannelli V, et al. Protection against *Helicobacter pylori* infection in mice by intragastric vaccination with *H. pylori* antigens is achieved using a non-toxic mutant of *E. coli* heat-labile enterotoxin(LT) as adjuvant[J]. *Vaccine*, 1998, 16(1):33-37.
- [17] Novak MJ, Smythies LE, McPherson SA, et al. Poliovirus replicons encoding the B subunit of *Helicobacter pylori* urease elicit a Th1 associated immune response[J]. *Vaccine*, 1999, 17(19):2384-2391.
- [18] Miyashita M, Joh T, Watanabe K, et al. Immune responses in mice to intranasal and intracutaneous administration of a DNA vaccine encoding *Helicobacter pylori*-catalase [J]. *Vaccine*, 2002, 20(17/18):2336-2342.
- [19] Ren JM, Zou QM, Wang FK. PELA microspheres loaded *H. pylori* lysates and their mucosal immune response[J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(6):1098-1102.
- [20] Panthel K, Jechlinger W, Matis A, et al. Generation of *Helicobacter pylori* ghosts by PhiX protein E-mediated inactivation and their evaluation as vaccine candidates[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(1):109-116.

疫苗开发的新策略

刘耀文编译

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 目前, 接种疫苗已成为预防感染性疾病强有力的手段之一。然而, 感染性疾病仍是全世界死亡率较高的疾病。因此, 开发新的疫苗以阻止目前尚无疫苗的疾, 改善现有疫苗的安全性和有效性已备受重视。特别是近年来分子生物学和免疫学的发展更有助于新型疫苗的开发。本文讨论病原体基因组及免疫系统新知识在发现新的抗原靶位及开发新的预防接种策略方面的应用潜力。

关键词: 疫苗; 预防接种; 抗原; 佐剂

中图分类号: R979.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2004)02-0100-04

1 引言

尽管接种疫苗极大地降低了感染性疾病的发病

率和死亡率, 但数十年来, 疫苗的开发技术无明显改进。目前, 制备的疫苗主要归为三类, 即活的减毒微生物、完全灭活的微生物和纯化的类毒素等亚单位