

变形链球菌表面蛋白 P1 粘膜免疫动物模型的建立及霍乱毒素的免疫增强作用

李富明 罗宗莲 张静仪 吉庆勇 周学东 岳松龄

摘要 用共价偶联的方法,将变形链球菌表面蛋白 P1 与霍乱毒素 B 亚单位或前霍乱原类毒素进行偶联后,用灌胃的方法将不同的免疫剂进行大鼠免疫实验,检查不同时间大鼠体内特异抗体的产生情况。结果证实了霍乱毒素 B 亚单位的佐剂效果,同时发现前霍乱原类毒素具有强的胃肠免疫增强作用。

关键词 变形链球菌 表面蛋白 粘膜免疫 动物模型 前霍乱原类毒素 霍乱毒素 B 亚单位

大量研究结果表明,抗变形链球菌表面蛋白 P1 的抗体能有效地阻止变形链球菌(变链)的粘附。在已有的免疫防龋研究中,为提高口腔唾液 S IgA 的特异抗体采用了许多的免疫方法和途径,其中以胃肠道粘膜免疫最多见。胃肠粘膜免疫是提高外分泌液中特异性 S IgA 传统的免疫途径。由于胃肠道中的酸液和多种水解酶的作用,单独用 P1 作抗原,免疫应答反应多不理想。人们为此作了较多努力以加强胃肠粘膜免疫的效果。1989年, Cz-erkinsky 等¹学者研究表明,Ag I/II(即蛋白 P1)与霍乱毒素 B 亚单位(CTB)偶联,在全毒素 CT 的参与下,可显著提高 P1 的免疫原性。

前霍乱原类毒素(PCG)是经热聚合处理减毒的产物,具有 CTA 和 CTB。PCG 与抗原偶联如果能起到增强抗原免疫原性作用,则可免去提纯 CTB 的复杂过程,但至今国内外尚未见报道。

本研究是利用共价联结的方法,将 P1 和 CTB 及前霍乱原类毒素(PCG)偶联后,经大鼠胃肠道免疫(intragastric immunization, IG)来观察大鼠体内特异抗体水平的变化规律。为防龋疫苗的应用研究提供重要的实验数据。

1 材料和方法

1.1 抗原的制备

变链的培养, P1 的纯化、鉴定以及与 PCG, CTB 的偶联见参考文献 2。

1.2 动物的免疫实验, 参照 Russell 等³的方法。

1.2.1 动物 选择健康、体重为 $100 \pm g$ 的 SD 大鼠为对象 雌雄各半, 每组 8 只, 共 48 只。

1.2.2 免疫剂的组成及剂量 a P1 30 μg ; b P1 30 μg + PCG 10 μg ; c P1-CTB 30 μg ; d P1-PCG 30 μg ; e P1-CTB 30 μg + PCG 10 μg ; f Buffer 自配。

1.2.3 免疫方法和时间 每次每只鼠灌液量为 0.4 ml, 按剂量配成相应浓度的抗原液。用灌胃针灌胃进行免疫。分别于第 1, 14, 38 d 进行免疫, 共 3 次。

1.2.4 实验鼠样品收集和处理 分别在 0, 8, 28, 35, 52 d 收集大鼠尾静脉血和刺激唾液。将血和唾液置 4 过夜, 次日将血置 37 孵育 30 min, 3000 rpm 离心 20 min 后收集血清; 将唾液置 56 30 min, 9000 rpm 离心 20 min, 收集上清, 置 -20 保存待测定。

1.2.5 阳性参考血清制备 大鼠 10 只, 雌雄各半。共免疫 4 次。每次间隔 10 d, 每次 P1 量为 100 μg 。加弗氏佐剂, 经大鼠双侧腹股沟及背部皮下注射, 涎腺周围注射 2 次。最后 1 次免疫后 7 d 开始收集唾液, 处死收集血液, 样品处理后 -20 保存。

1.3 ELISA 测定

参照罗宗莲、李成文等的方法^{4,5}。

1.3.1 包板, 用碳酸盐缓冲液 pH9.6 将蛋白 P1 配成一定浓度, 以 100 μl 的量包被聚苯乙烯多孔板(美国, Flwk Laboratories, Inc), 37, 4 h 后放 4 保存, 备用。

1.3.2 加入待测血清或待测唾液, 血清样品用 PBST 稀释为 1:100, 唾液为 1:4, 每孔 100 μl , 室温 2 h。用 EL404 洗板机进行洗板(美国 B D-TEK Instruments)。标准曲线每板各作 5 个梯度。

1.3.3 加入第一抗体, 血清样品加入兔抗大鼠 IgG 血清(北京军事科学院流行病学研究室提供)。稀释比为 1:200,

本研究为国家教委博士点科研基金资助

作者单位: 610041 华西医科大学口腔医学院(李富明, 罗宗莲, 周学东, 岳松龄), 卫生部口腔医学工程重点实验室(张静仪, 吉庆勇)

唾液样品测定,加入兔抗大鼠 S IgA 血清(英国 Serotec, CODE NO: SERT 109),稀释比为 1 1000,室温 2 h。同上洗板。

1.3.4 加入第二抗体,羊抗兔 IgG 联酶血清(辣根过氧化酶),稀释比为 1 1000,每孔 100 μl。室温,静置过夜,次日洗板。

1.3.5 加入 TMB,每孔 100 μl,室温 20 min 后加入 1% SDS 终止反应,在 EL 312 e 读数器(美国 B D-TEK Instruments)上测双波长 630/490 nm 下的 OD 值。以原倍阳性参考血清或唾液的酶联免疫法单位 EU 值为 100 EU/ml,进行参考曲线计算并作统计处理⁶。

2 结 果

2.1 唾液中抗 P1 S IgA 在单独用 P1 免疫时,各时间点都与对照组无显著差异($P > 0.05$)。在 P1-CTB 组第 1 次免疫后第 1 周,可以测出抗 P1 的 S IgA 升高($P < 0.05$),而 P1-PCG 组及 P1-CTB +

PCG 组,虽然可测出一半以上的大鼠抗 P1 S IgA 升高,但无统计学意义($P > 0.05$)。在第二次免疫后第二周,除单独免疫 P1 组和对照组外($P > 0.05$),其余各组都出现抗 P1 的抗体 S IgA 升高($P < 0.05$)。以 P1-PCG 组和 P1-CTB + PCG 组的效果最佳。P1-PCG 和 P1-CTB 组之间, S IgA 的水平差异无显著性($P > 0.05$)。但这两组都比 P1 和 PCG 混合组要高($P < 0.05$),见表 1 和图 1。

2.2 S IgA 抗体的峰值在本实验中出现的时间为第 28 d,为第 2 次免疫后的第 2 周。在第 52 d 时, P1-PCG 组仍能测出特异抗体的存在($P < 0.05$),而其余各组则无显著差异($P > 0.05$)。

2.3 血清中抗 P1 IgG 在各时间点升高都不明显。各组特异 IgG 水平与对照组相比较,均无显著差异性($P > 0.05$),见表 2,图 2。

表 1 唾液抗 P1 S IgA (EU/ml, $\bar{x} \pm s$)

免疫(d)	采样(d)	P1-PCG	P1-CTB	P1+ PCG	P1-CTB+ PCG	P1	Buffer
1	0	3.23 ± 3.34	0.83 ± 2.65	6.53 ± 6.32	5.22 ± 6.28	3.76 ± 5.92	1.35 ± 2.32
	8	23.82 ± 31.28	28.67 ± 24.96	24.19 ± 19.07	26.53 ± 10.89	10.13 ± 9.36	9.76 ± 6.19
14	28	95.04 ± 100.48	45.52 ± 25.52	23.53 ± 18.41	90.42 ± 109.46	5.12 ± 5.28	6.23 ± 5.80
	35	14.45 ± 17.88	14.38 ± 30.17	20.64 ± 22.56	33.68 ± 21.83	9.05 ± 14.75	1.57 ± 2.51
38	52	43.12 ± 61.23	20.71 ± 30.45	12.71 ± 23.34	28.59 ± 52.28	10.48 ± 10.27	3.84 ± 4.71

(n= 8)

表 2 血清抗 P1 IgG (EU/ml, $\bar{x} \pm s$)

免疫(d)	采样(d)	P1-PCG	P1-CTB	P1+ PCG	P1-CTB+ PCG	P1	Buffer
1	0	0.007 ± 0	0.007 ± 0	0.007 ± 0	0.007 ± 0	0.007 ± 0	0.007 ± 0
	8	0.338 ± 0.195	0.281 ± 0.229	0.281 ± 0.261	0.588 ± 0.255	0.263 ± 0.222	0.313 ± 0.357
14	28	0.194 ± 0.140	0.224 ± 0.109	0.236 ± 0.160	0.175 ± 0.112	0.399 ± 0.308	0.184 ± 0.146
	35	0.303 ± 0.266	0.313 ± 0.180	0.205 ± 0.180	0.359 ± 0.223	0.206 ± 0.064	0.280 ± 0.137
38	52	0.246 ± 0.108	0.192 ± 0.122	0.186 ± 0.180	0.327 ± 0.240	0.241 ± 0.175	0.283 ± 0.165

(n= 8)

3 讨 论

3.1 口腔防龋免疫模型的建立

采用不同的蛋白 P1 组合抗原经大鼠胃肠免疫实验,在大鼠唾液中测出了高水平的抗蛋白 P1 的特异抗体 S IgA,说明蛋白 P1 作为疫苗抗原具有良好免疫原性,能诱导产生抗蛋白 P1 特异抗体,通过本实验成功地建立了大鼠防龋抗原免疫应答反应模型,为进一步免疫防龋研究提供了实验基础。

3.2 不同佐剂的效果

CT 及 CTB 的某些免疫增强作用的确切机制尚未完全明了。本实验发现,单独应用 P1 机体免疫应答反应较低。P1 与 PCG 混合后口服免疫,虽然也可测出特异的 S IgA 抗体出现,但其强度和持续时间都较差。而经与 CTB 或 PCG 偶联后口服免疫,则唾液中抗 P1 的特异抗体明显增强,持续时间延长。这可能由于 CTB 具有与神经节苷脂 GM 1 特异性地结合的作用, P1 与之偶联后经胃肠道免疫后,

能更直接地刺激肠道相关淋巴组织(GALT)中的M细胞,从而诱导机体产生特异的SIgA抗体⁷。同时P1借助CTB与GALT粘附后,停留时间也得到延长,从而达到增强抗原刺激的目的。

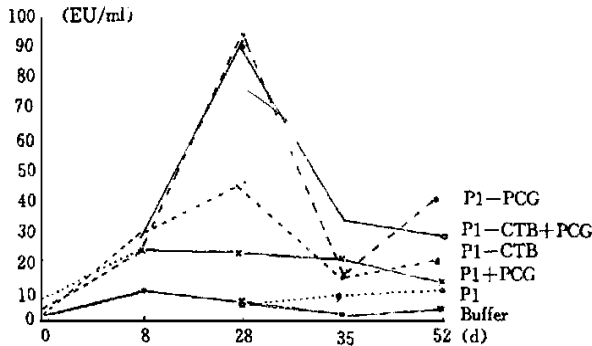


图1 唾液抗P1的IgA水平曲线

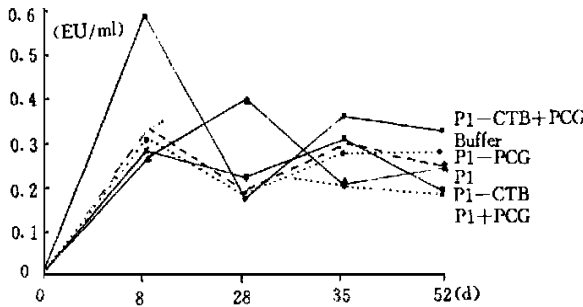


图2 血清中抗P1的IgG水平曲线

Lykke等⁸研究表明,CTB的免疫增强作用在有CT(含CTA和CTB)的参与下效果更好。作者首次采用了含有CTB和CTA的前霍乱原类毒素PCG(属于全毒素),进行免疫实验,发现具有优良的粘膜免疫增强作用。同时还发现实验组P1-CTB混合PCG其SIgA增强优于不混合PCG组,证实了CTA及CTB同时存在,可使P1免疫反应更强,这一结果与文献报道相同。这可能与活化腺苷酸环化酶有关^{3,8}。Lykke等学者发现,CTB和CT可能协同作用以加强其它抗原的免疫原性。Tamura等⁹学者认为,在CTB存在下,CT易于与M细胞粘附,由于只有CT能活化腺苷酸环化酶,而经体外实验证明,在M细胞中的腺苷酸环化酶活化后,其抗原传递能力才得到加强,从而说明,含有微量CT的CTB通过作用于抗原传递细胞而起佐剂的作用。一些学者通过利用M细胞、T细胞、B细胞进行体外实验研究也发现,CT可能影响所有参与免疫反应的细胞,因而,CT可能作为一种免疫增强剂

作用于局部粘膜及全身系统免疫的应答反应⁹。Czerkinsky, Russell等学者研究表明,P1-CTB经胃肠免疫后,在血清和唾液中能同时分别测出特异的IgG和SIgA抗体。而在全毒素CT的参与下,这种免疫效果得到加强^{1,3}。本研究在经胃肠免疫实验组中始终未测出血清中有统计意义的抗P1的IgG抗体。说明未能观察到P1-PCG和P1-CTB的这种通过肠胃途径诱导系统免疫反应的作用。

3.3 抗体的产生途径

SIgA产生的机理虽未完全得以阐明,但许多学者对此提出了较为一致的观点^{1,3}。

抗原刺激Peyer's patch后,致敏的淋巴细胞,如双体IgA生成细胞,经肠系膜淋巴结、脾脏、胸导管,进入血液,经循环后到达唾液腺,分布于腺体周围的淋巴组织中,与腺上皮细胞合成的分泌片结合后形成SIgA,并随唾液分泌到达口腔而起保护作用¹⁰。

唾液SIgA的产生来源于口腔局部唾液腺周围的淋巴组织,极少来源于血液中。

这些淋巴组织与胃肠道的GALT等粘膜处的淋巴组织功能上相互联系,协同作用,共同构成粘膜免疫系统。

SIgA抗体产生机制问题极为复杂。本研究在大鼠体内测出了抗P1的SIgA,在第二次免疫后2周达到高峰,以后有所下降,在实验结束时,仍能测出较高的SIgA水平。但是,血清中IgG的水平升高远不如唾液明显。这与Smith等¹¹报告基本一致。而与Russell等报告有差异。通过本模型的研究,提示利用CTB,PCG能明显增强变链表面蛋白P1的免疫原性;即使微克的抗原剂量,也能成功地诱导出特异性SIgA的产生;并首次发现PCG具有很强的粘膜免疫增强作用,有关机理尚待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Czerkinsky C, Russell MW, Lykke N, et al Oral administration of a Streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues *Infect Immun*, 1989, 57: 1072
- 2 李富明 变形链球菌表面蛋白P1主动免疫防龋的动物实验初步研究 华西医科大学博士研究生学位论文, 1996
- 3 Russell MW, Wu HY. Distribution, persistence, and recall of serum and salivary antibody responses to peroral immu-

- nization with protein antigen I/II of *Streptococcus mutans* coupled to the cholera toxin B subunit *Infect Immun*, 1991, 59: 4061
- 4 李成文著. 现代免疫化学技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1992: 235~ 238
 - 5 罗宗莲, 史密斯. 对口腔链球菌及其葡萄糖基转移酶的特异性血清抗体水平变化的探讨. *口腔医学纵横*, 1988, 4 (2): 69
 - 6 张静仪, 吉庆勇, 徐光忠, 等. 医学实验数据处理智能系统在临床中的应用. 见: 魏世成主编. 中国人工智能进展. 成都: 成都科技大学出版社, 1993: 183~ 187
 - 7 Vajdy M, Lycke NY. Cholera toxin adjuvant promotes longterm immunological memory in the gut mucosa to unrelated immunogens after oral immunization. *Immunology*, 1992, 75: 488
 - 8 Lycke N, T suji T, Holmgren J. The adjuvant effect of vibrio cholerae and *E. coli* heat labile enterotoxins is linked to the ability to stimulate cAMP. *Eur J Immunol*, 1992, 22: 2277
 - 9 Tumura SI, Yamanaka A, Shimohara M, et al. Synergistic action of cholera toxin B subunit (and *E. coli* heat-labile toxin B subunit) and a trace amount of cholera whole toxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine*, 1994, 12: 419
 - 10 Ivanyi L. Immunological Aspects of Oral Diseases. England: MTP Press Limited, 1986: 47~ 84
 - 11 Smith DJ, Taubman MA. Oral immunization of humans with *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase. *Infect Immun*, 1987, 27: 576
- (1996- 10- 24 收稿)

An Animal Model for the Mucosal Immunization with the Surface Protein Antigen P1 from *Streptococcus mutans* and Immune Enhancement of Cholera Toxin

Li Fuming, Luo Zonglian, Zhang Jingyi, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

To study the immune enhancement of cholera toxin by developing an mucosal immune animal model, SD rats were immunized using different antigen composition through intragastric route (IG). The results showed that the effects of immunization became stronger after P1 was conjugated to cholera toxin B subunit (CTB) or procholeraegenoid (PCG). Even μg dose of P1 could induce the rising of anti-P1 SIgA antibodies in the rat's saliva, but the antibodies risied little without this adjuvant. These implied that the conjugation was much necessary in IG immunization. The immune enhancement of PCG was greater than that of CTB.

Key words: mucosal immunization procholeraegenoid (PCG) intragastric route (IG)

(上接第 30 页)

A Study of Therapeutic Efficacy of Koukangning Gargle in the Treatment of Oral Mucositis

Zeng Guangming, Li Binqi, Zhang Wenqing, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

A study of therapeutic efficacy was carried out in 118 patients with oral mucositis (recurrent oral aphthous ulceration, erosive lichen planus, herptic stomatitis and infectious oral mucosal hematomia) at random. As a topical medication, Koukangning gargle was applied to 59 patients of the experimental group, 29 patients of the control group 1 applied Dobell's solution to rinse their mouths, and 30 patients of the control group 2 applied Koutai solution. A satisfactory result was observed in the experimental group, its effectiveness and effective rates rose more than those of control group 1 at both treatments for 3 days and 6 days. Between the two groups, there were markedly significant difference ($P < 0.005$, $P < 0.01$, $P < 0.005$, $P < 0.005$). Koukangning gargle was nontoxic and no side-effects in the clinical tests. Its efficacy was no significant difference compared with the control group 2. Experimental study demonstrates that it possesses anti-inflammation effect and excellent antibiotic effect, therefore it is a new gargle for rinse mouth combined traditional Chinese medicine with Western medicine.

Key words: Koukangning gargle oral mucositis Koutai solution