

猪幽门螺杆菌样细菌与人幽门螺杆菌关系的初步研究

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 北京

张建中 陈晶晶 蒋秀高 庄涛

R 378.2

A 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术和免疫印迹分析,初步对人幽门螺杆菌(Hp)与猪幽门螺杆菌样细菌(HpLO)进行了比较研究。结果发现,Hp与猪HpLO具有不同的SDS-PAGE图谱,但猪HpLO的48kD、62kD蛋白与Hp的51kD蛋白间有明显的交叉免疫反应,说明猪HpLO不是人Hp的传染源,但猪感染HpLO后可能会产生与Hp起交叉反应的高滴度循环抗体。

关键词: 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 免疫印迹; 幽门螺杆菌; 幽门螺杆菌样细菌

SDS-PAGE

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori* Hp)对人类的致病性已引起人们的高度重视。Hp感染的传染源及传播途径目前尚未完全清楚,其中有动物源性假说,认为人类可能从密切接触的动物或动物源性食物中感染Hp。有人在猪及兔血清中发现有高滴度的抗Hp抗体存在(血清经空肠弯曲菌吸收过)。但尚未见自猪及兔胃中分离到Hp及HpLO的报道。我们自猪胃中分离出数株HpLO,研究了HpLO与空肠弯曲菌等弯曲菌属细菌生物学性状方面的异同。我们初步应用SDS-PAGE技术和免疫印迹方法对Hp及HpLO进行了比较研究。

材料与方 法

1. 菌种: NCTC11637为Hp国际株准株,由山东医科大学中心实验室秦民德教授赠送。CAPMZ-4为北京市中医研究所分离Hp菌株,两株菌在实验前均经系统鉴定,符合Hp特征。HpLO1a, HpLO6b, HpLO7a, HpLO7b, HpLO9a, HpLO10a, HpLO10c为本室自猪胃粘膜中分离到的HpLO菌株。

2. 细菌培养条件: 细菌分别接种于含6%脱纤维绵羊血的布氏琼脂平皿中,置混合气体(85%N₂、10%CO₂和5%O₂)环境,37℃,培养3天。

3. 抗血清制备: 免疫用动物选用纯种新西兰白兔,免疫用抗原分别经0.5%福尔马林生理盐水固定的NCTC11637, CAPMZ-4及HpLO7a全菌。免疫前测知兔血清与免疫用菌间无自然凝集现象,每菌经耳静脉免疫2只动物,每次用抗原量分别为2毫升(每毫升按18

亿菌计)。两次免疫间隔为3~4天,第五次免疫7天后,测定相应血清抗体滴度,颈动脉放血,分离血清备用。

4. SDS-PAGE: 按文献[1],电泳样品采用细菌全菌,经电泳样品缓冲液直接裂解。电泳应用不连续系统,样品胶浓度为5%,分离胶浓度为11%,电泳缓冲液采用Tris—甘氨酸系统。电泳完毕,凝胶经考马斯亮蓝R-250染色。观察比较HpLO不同菌株间及HpLO与Hp间的电泳图谱情况。

5. 免疫印迹试验: 按参考文献进行^[1],抗原经SDS-PAGE电泳后,在60mA恒流下经5小时将其转移至硝酸纤维膜(NC)上,转膜后的NC用5%脱脂奶粉溶液封闭,分别加适当稀释的兔免疫前混合血清,兔抗CAPMZ-4血清、兔抗NCTC11637血清和兔抗HpLO7a血清,室温下震荡2小时,以SPA-HRP处理,4-氯-1-萘酚显色。其中在作兔免疫前混合血清免疫印迹分析中,延长显色时间,以有利于观察本底反应条带情况。

结果与讨论

1. 抗血清效价: 第五次免疫后,除1只免疫NCTC11637的家兔血清凝集效价为1:280外,其它5只家兔血清凝集效价均大于1:2560。

2. SDS-PAGE 分析: 猪HpLO不同菌株间有相似的全菌蛋白电泳图谱(图略)。HpLO与Hp菌间具有不同的全菌蛋白电泳图谱,不具有Hp菌所特有的66kD、44kD和30kD等蛋白条带(见341页图1)。

本文为国家自然科学基金资助项目

3. 抗原性分析, 免疫印迹结果显示, 正常兔血清中存在较弱的与 Hp 起反应的抗体和较强的与猪 HpLO 起反应的抗体, 后者主要表现在 45kD 位置(341页图2)。抗 HpLO7a 血清与 Hp 的 51kD 蛋白有较强的免疫反应(341页图3); 抗 NCTC11637 血清与 HpLO7a 菌株的 62kD、48kD 蛋白间、抗 CAPMZ-4 血清与 HpLO7a 菌株的 62kD 蛋白间有明显反应条带出现。(341页图4、5)。

人们认为人感染 Hp 可能存在三种方式, 即动物源性感染、人从环境中感染 Hp 及 Hp 的人—人传播。在前两种方式尚未取得直接证据的情况下, 目前认为人—人传播可能是人类感染 Hp 的主要方式^[2]。但有人曾在猪及兔血清中查到高滴度的抗 Hp 抗体(血清经空肠弯曲菌吸收过), 但未分离到 Hp 菌^[3], 我们在做免疫印迹实验时也曾观察到兔、鼠和羊(山羊)血清与 Hp 抗原间有很强的免疫反应条带出现(血清未经任何吸收处理)。猪、兔和羊是人们日常接触的动物和食物, 加之目前已知猪对人源性 Hp 敏感, 实验中已将其作为 Hp 动物模型使用, 猪可感染 Hp 并产生与人感染 Hp 相似的病变。自然状态下的猪、兔等动物是带有 Hp 菌, 还是其感染的某些菌与 Hp 相似而产生与 Hp 很强的交叉免疫反应? 这是一个急待弄清的问题。我们自猪(7/10)胃中分离到多株猪 HpLO, 从菌落及细菌形态, 培养特性及耐药性, 生化反应(但尿素酶试验为阴性或弱阳性)等方面与 Hp 非常相似。对感染 HpLO 的猪胃大体观察可见有

胃粘膜出血、糜烂, 病理组织学观察发现猪感染 HpLO 后胃粘膜出现与人感染 Hp 后胃粘膜相似的病理改变, 国外文献报道^[4], Hp 感染猪后, Hp 在猪胃中的分布以胃底和胃窦部为多, 胃体部定居 Hp 菌量很少, 与我们观察到的猪 HpLO 在猪胃中的分布情况非常一致(待发表资料)。这些结果提示猪 HpLO 与人 Hp 在致病性等方面有许多共同性。但从 SDS-PAGE 全菌蛋白图谱比较分析发现^[5], 猪 HpLO 不具备 Hp 菌的特征性蛋白条带, 说明猪 HpLO 不是人 Hp 感染的病原菌。由于猪 HpLO 在生物学特性和致病性等方面与 Hp 相似, 对猪 HpLO 的深入研究可能有助于对 Hp 的进一步了解, 在某些方面猪 HpLO 可能在 Hp 的研究中起替代作用。

参 考 文 献

1. 金灵, 苏新. Biotin-avidin 免疫转移技术. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16:148.
2. Vaira D, et al. Transmission and sources of helicobacter pylori in; Helicobacter pylori 1990, Menge H, et al ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1991, P107.
3. Vaira D, et al. Campylobacter pylori in abattoir workers; is it a zoonosis? Lancet, 1988, ii:725.
4. Engstrand, L et al. Topographic mapping of helicobacter pylori colonization in long-term-infected pigs. Infect Immun, 1992, 60(2):606.
5. Morgan DR, et al. Characterization of strains of helicobacter pylori; One-dimensional SDS-PAGE as a molecular epidemiologic tool. Rev Infect Dis, 1991, 13:S709.

(收稿: 1993-01-03)

THE PRELIMINARY RESEARCH ON THE RELATIONSHIP BETWEEN H. PYLORI AND H. PYLORI-LIKE ORGANISMS ISOLATED FROM PIGS

Zhang Jian-zhong, et al

(Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing)

Helicobacter pylori-Like Organisms (HpLO), isolated from the stomachs of pigs in our laboratory, were studied. We found that these organisms resembled Helicobacter pylori (H. pylori) in many respects but differed from the human isolates in their protein profiles on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Western blot analysis showed that the 48kD and 62kD proteins of HpLO had obvious cross-reactions with the 51kD protein of H. pylori. The results indicated that the pig-associated HpLO did not act as a source of H. pylori for humans, but the antibodies against HpLO might be detected by using H. pylori antigen.

Key words: H. pylori; H. pylori-like Organism; SDS-PAGE; Immunoblots