

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報

計畫名稱：
(中、英文)

探討細胞素及T細胞所執行的免疫反應在幽門螺旋桿菌
感染的致病機轉--利用小鼠及沙鼠動物模式
Role of cytokine and T cell-mediated immune response in
pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection--Using mouse
and Mongolian gerbil animal model

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 89 — 2315 — B002 — 041

執行期間：89年8月1日至90年7月31日

個別型計畫：計畫主持人：楊智欽
共同主持人：許秉寧

執行單位：國立台灣大學醫學院內科

中華民國 九十一 年 一 月 日

Abstract

胃幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*; *H. pylori*) 為造成人類胃部疾病的重要病原。感染的過程為一連串的胃黏膜病理變化，有些受感染者的病理變化從萎縮性胃炎 (atrophic gastritis)、消化性潰瘍 (peptic ulcer)、黏膜性淋巴瘤 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, MALToma)，甚至發展成胃癌 (gastric cancer)。對於胃幽門螺旋桿菌如何造成不同的胃黏膜變化的致病機轉，目前仍不清楚。小鼠動物模式發展，將可提供未來進行幽門螺旋桿菌的致病機轉、疫苗與治療的研究。為了控制菌體本身的生化活性，我們建立了液態培養系統，並成功的維持六個月的菌落形成 (colonization)。

小鼠腸胃道中有些既有的正常菌落，其中以乳酸桿菌 (*Lactobacillus*) 最常見。先前的研究中指出乳酸桿菌會藉由乳酸的分泌，在混合培養中抑制幽門螺旋桿菌的生長。為了能由小鼠胃黏膜中區分並分離出胃幽門螺旋桿菌。我們發展出 pH2 的 5mM 生理濃度的尿素，壓抑乳酸桿菌的生長而進行與門螺旋桿菌混合培養的分離。乳酸桿菌不僅在體外培養會抑制幽門螺旋桿菌的生長，於小鼠體內也抑制了幽門螺旋桿菌所造成發炎反應。四個月的感染結果，幽門螺旋桿菌只侷限在胃部的黏液中，無法入侵到黏膜層 (mucosa)。

受胃幽門螺旋桿菌感染的小鼠，雖然無法在胃部見到明顯的發炎反應，但仍可在小鼠體內偵測到具幽門螺旋桿菌專一性的 IgG 抗體，且主要為 IgG1 類抗體。顯示出受幽門螺旋桿菌感染但沒有顯著發炎反應的小鼠是偏向 Th2 型態的免疫反應。而此種型態的免疫反應可能造成較輕微的胃部病理變化。

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is an important human pathogen that induced gastric disease. Infection of *H. pylori* initiates series of pathological changes in the gastric mucosa, beginning with atrophic gastritis, leading to peptic ulcer disease, mucosa-associated lymphomas, and gastric adenocarcinoma. The pathogenesis of *H. pylori* infection in

gastric pathology is still not clear. Establishment of mouse animal model will be helpful in understanding of pathogenesis and in development of therapeutic agents as well as vaccines against *H. pylori* infection. In order to establish the mouse model for *H. pylori*, we set up the broth culture system and optimize the biological activity for growth of *H. pylori*. After improvement of the bacterial culture system, we have successfully demonstrated the long-term (6 months) colonization of *H. pylori* in mouse stomach after infection with *H. pylori*.

The gastrointestinal (GI) tract of mouse is colonized with a variety of normal flora that *Lactobacillus* is the predominant bacteria found in normal fasting mouse stomach. It has been demonstrated that lactobacilli could produce large amount of lactic acid to inhibit the growth of *H. pylori* in mixed culture. We developed a novel method for isolation of *H. pylori* from the mixed culture with *Lactobacillus* in mouse stomach by using the 5 mM physiological urea (pH2) to suppress the growth of *Lactobacillus*. Based on our studies, *Lactobacillus* could not only limit the growth of *H. pylori* in vitro but also inhibit the inflammation response of *H. pylori* in vivo. It is shown that most of the growth of *H. pylori* was limited up on the mucous later but not down to infiltrate the gastric mucosa during the 4 months infection period.

The *H. pylori* specific IgG could be detected in the mouse serum after infection with *H. pylori*, even without significant pathological change. There was significant elevation of *H. pylori*-specific IgG1 antibody level after infection with *H. pylori*, which indicated a Th2 predominant immune response. A Th2 type immune response induced after infection with *H. pylori* may contribute to the mild gastric pathological changes observed in our mouse animal model.

簡介

胃幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*; *H. pylori*) 首先於 1982 年由 Robin J. Warren 及 Barry Marshall 兩位醫師於慢性胃潰瘍病人之胃黏膜上分離出 [1]，至此打破胃內不可能有細菌之觀念，成為廿世紀消化醫學界最大之突破。同時，此菌之發現，也帶動許多相關之研究，進而發現許多胃部疾病，如胃炎 (gastritis)、萎縮性胃炎 (atrophic gastritis)、胃潰瘍 (gastric ulcer)、消化性潰瘍 (peptic ulcer)、十二指腸潰瘍 (duodenal ulcer) [2]、腸化生 (intestinal metaplasia)、黏膜性淋巴瘤 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, MALToma) [3]，甚至於胃癌，都與它脫離不了關係；而世界衛生組織在 1994 年將幽門螺旋桿菌列為第一級的致癌物 (Class I carcinogen) [4]。根據統計，胃幽門螺旋桿菌在已開發國家之成人感染率為 25~50%，在開發中國家為 70~90% [5]；而在台灣地區則約有 50~55% 的成人曾遭受幽門螺旋桿菌的感染 [6-7]。但是在這麼高之感染率下，真正在臨床上出現胃潰瘍的比例卻並不那麼高；甚至是感染十幾二十年之後才有症狀產生。

人類受到幽門螺旋桿菌的感染，其病理變化可由無症狀慢性胃炎 [8] 到胃癌 [9-10]，造成如此大的差異度可歸因於宿主遺傳背景、環境因子與幽門螺旋桿菌菌株的不同，而此差異也可由實驗動物模式的研究成果顯示出來。幽門螺旋桿菌的實驗動物模式的發展仍屬於未完成階段，因此許多實驗室變因尚待標準化，如不同的實驗使用不同的動物品係、不同的菌株、不同的實驗方法與實驗動物組織學上的評估，因此無法進行不同實驗室之間的比較。此外發展與建立動物模式的過程中，最需要進行考量的要素在於是否能利用現有的實驗動物，去模擬幽門螺旋桿菌感染人體之後所造成的病理變化，包含病程中的免疫反應至最終成疾病的結果。

幽門螺旋桿菌的實驗動物模式的發展，可讓幽門螺旋桿菌的菌落形成因子 (bacterial colonization factors)、疾病的治療與疫苗的發展及整個疾病的病程更為

明確。一般而言，菌株因素 (bacterial factors) 可區分為菌落形成因子與毒力因子 (virulence factors)。菌落形成因子使菌體在宿主體內的存活，但並不直接造成疾病。毒力因子則為造成宿主疾病的因素。

宿主受到幽門螺旋桿菌的感染，不同個體之間的病理差異極大，因此促使我們想去了解宿主的免疫機制在幽門螺旋桿菌感染中扮演何種角色。T 細胞的免疫反應型式大致上可區分成兩個類型，第一型免疫反應 (Type 1, T1) T 細胞包括 Th1 與 Tc1，主要為細胞型免疫作用；而第二型免疫反應 (Type 2, T2) T 細胞包括 Th2 與 Tc，主要為血清型免疫反應。人類對於對抗外來入侵的致病菌，主要的淋巴球次群為 $CD4^+$ T 細胞。當受到外來抗原的刺激，Th1 型反應所分泌的細胞激素主要有 $IFN-\gamma$ 、IL2 與 lymphotoxin 而這些活化的 T 細胞籍由本身所分泌的這些細胞激素，作用到其他免疫相關細胞上，而引起細胞型免疫反應以對抗胞內致病菌 (intracellular pathogens)。Th2 型反應則分泌 IL-4、IL-5 與 IL-10 而引起以抗體為媒介的血清型免疫反應，並且可對抗胞外致病菌 (extracellular pathogen) 的感染與過敏原 (allergen)。未決定命運的 (uncommitted) Th0 受到週遭局部的微環境的影響進而分化為 Th1 或 Th2。IL-2 促使 Th0 分化成 Th1；而 IL-4 則驅使 Th2 細胞型態的形成。

於幽門螺旋桿菌感染中不同的 T 細胞型態所造成的疾病結果迥異，依據先前的研究 Th2 型反應產生較輕微的發炎反應而導致較微的病症，相反的，Th1 反應對細菌而產生發炎反應較明顯。在慢性感染中主要為 Th1 型反應較為顯著，其免疫反應走向 Th1 細胞性免疫反應 [11-12]，且此細胞性的免疫反應則引起感染個體胃部的發炎反應。

成功的動物模式則與幽門螺旋桿菌本身的活性與小鼠的品系有密切的關係，所以我們實驗室正著手於改進幽門螺旋桿的液體培養方式以及嘗試著建立幽門螺旋桿菌的動物模式。在本研究中，我們也將試著建立之幽門螺旋桿菌小鼠動物模式，以研究 T 細胞性免疫在幽門螺旋桿菌感染上所扮演的角色，取

受感染的小鼠之脾臟進行細胞內細胞素染色 (intracellular cytokine staining) 或 coating 幽門螺旋桿菌超音波震盪蛋白偵測血清中幽門螺旋桿菌專一性 IgG1 與 IgG2a 的存在，研究受幽門螺旋桿菌感染的小鼠，其淋巴球細胞素及 T 細胞次群的型式，並且觀察血清中是否具有幽門螺旋桿菌專一性抗體的存在。

材料與方法

幽門螺旋桿菌菌株的生長條件

將來自臨床或 ATCC 幽門螺旋桿菌標準菌株培養於含有 10% 羊血、1% Isovitallex 與含有下列抗生素：Vancomycin (6 μ g/ml) 與 Amphotericin B (2 μ g/ml) 的血液平板培養基中，將培養皿放置在 37°C 且為微嗜氧的培養箱中 (包括 N₂: 80%, CO₂: 15%, O₂: 5% 的混合氣) 培養 3 至 4 天。

若以液體的方式進行培養，則以 Brucella 液體培養基，加入 10% 胎牛血清 (或 1% β -cyclodextrin)、1% Isovitallex 與含有下列抗生素：Vancomycin (6 μ g/ml) 與 Amphotericin B (2 μ g/ml)。若液體培養基保存於 4°C，則必須回溫至 37°C。以接種環刮下經 3 天培養幽門螺旋桿菌菌體 (約 1/4 平板)，經過增菌的菌液接種於含有 100 毫升的液態培養基，每 24 小時取出 2 毫升進行吸光值測定，另 1 毫升則以連續十倍的稀釋方式，進行活菌計數 (viable count)，由活菌數調整最佳生長的時間及培養方式，一般培養至 72 小時即可得到 10⁸ 左右的活菌數。

菌株

TN2GF4、ATCC43504 與由臨床病人所分離出的菌株，其特性均為 Cag A⁺ 與 Vac A⁺。ATCC 43504 為標準菌株，TN2GF4 菌株則自日本帶回來的，TN2GF4 由幽門螺旋桿菌感染蒙古沙鼠的動物模式中分離出來，除了可穩定感染蒙古沙鼠，並且可於蒙古沙鼠造成胃癌的病理變化 [13]。

小鼠品系

C3H/HeN(H-2^k)、BALB/cByJ(H-2^d) 與 C57BL/6J(H-2^b) 雌性，五週大。動物來源為國家實驗動物中心。小鼠由國科會進入台大動物中心之前先以抗生素處理 7 天，餵菌之後以普通飲水及飼料，養於國立台灣大學醫學實驗動物中心普通動物房中。

餵菌方法

經由 70 至 105 小時生長的幽門螺旋桿菌菌液，進行 3000 rpm，離心 15 分鐘。以液態培養基懸浮體配合軟管進行餵食，每隻小鼠則給予 0.2 毫升的菌液。進行一次或三次的餵食，於餵菌前 12 小時，小鼠給予禁食，餵菌後 6 小時解除禁食。

犧牲小鼠並取淋巴結、脾臟及胃

小鼠以頸椎脫臼法犧牲之，以無菌刀剪除去外皮毛，將鼠蹊部之淋巴結採下，置 10% 中性福馬林固定液中，再以無菌刀剪剪開腹膜，取脾臟及胃。沿胃大彎剪開，於無菌 PBS 中清除胃中內含物；置無菌解盤中攤平，以無菌解剖刀，沿食道至十二指腸縱切方向，將胃分為二份：一份置中性福馬林固定液中，並送交病理部進行病理及染色；另一份以無菌刀剪取下胃黏膜置於 BHI broth 做細菌培養。

M3 血液平板培養

將小鼠犧牲之後，胃組織研磨液培養在含有 10% 羊血、1% Isovitallex 與含下列抗生素：Vancomycin (100 μ g/ml)、Nalidixic acid (10 μ g/ml)、Polymycin B (3.3 μ g/ml)、Bacitracin (200 μ g/ml) 與 Amphotericin B (50 μ g/ml) 的血液平板培養基中，將培養皿放置在 37°C 且為微嗜氧的培養箱中 (包含 N₂: 80%, CO₂: 15%, O₂: 5% 的混合氣) 培養 7 天，以進行 DNA 的萃取。

萃取幽門螺旋桿菌菌體 DNA

以 tissue and blood genomic DNA

minipre kit (Viogene Co.) 萃取菌體 DNA。

以 PCR 偵測幽門螺旋桿菌

所用偵測 *H. pylori* 之引子如下：
16S rRNA 引子[14]；CagA 引子 [15]。
16S rRNA 引子：5'-GCTAA'GAGAT'
CAGCC'TATGT'CC-3' 5'-CAATC'AG
CGT'CAGTA'ATGTT'CC-3' 可得到
522 bp 之 PCR 產物。

CagA 引子：5'-GATTA'CAGGC'AAGC
T'TTTGA'GG-3' 5'-CTGCA'AAAGA'
TTGTT'TGGCA'GA-3' 可得到 349 bp
之 PCR 產物。

以 5mM 生理尿素濃度 pH2，進行混合 培養之分離

取 300 μ l 小鼠之胃組織研磨液加入
2.7 毫升 5mM 生理尿素濃度 pH2 於
微需氧環境下處理 30 分，取 100 μ l 菌
液置於含有 100%羊血、1% isovitalex 與
含有下列抗生素：Vancomycin (6 μ g/ml)
與 Amphotericin B (2 μ g/ml) 的血液平板
培養基中培養。

5mM 生理尿素濃度液態培養基

5mM 生理尿素濃度 pH2 加入
10%FCS、1% Isovitalax 與含有下列抗生
素：Vancomycin (6 μ g/ml) 與
Amphotericin B (2 μ g/ml)，培養 96 小
時，取出 100 μ l 菌液置於含有 10%羊
血、1% Isovitalax 與含有下列抗生素：
Vancomycin (6 μ g/ml) 與 Amphotericin B
(2 μ g/ml) 的血液平板培養基中培養。

抗原製備

(A) 幽門螺旋桿菌超音波震盪蛋白質
(Sonicated protein)

將大量體培養之幽門螺旋桿菌，離
心，而後懸浮在 1×PBS 中，以 maximum
amplitude 處理 30 秒至 1 分鐘，並置於
冰上 30 秒至 1 分鐘，在超音波震盪器上
反覆處理 8 次。之後離心，去除較大的
菌體團塊。

(B) 幽門螺旋桿菌外膜蛋白的製備
(outer membrane protein)

將幽門螺旋桿菌培養至 late log
phase，離心，再將菌體懸浮在 0.25ml
的 0.2M Tris-HCl，pH 8.0 溶液中，靜置
室溫 5-10 分鐘。當大部分細胞都以形成
spheroplasts 時，以 2.5 ml 的 extraction
buffer 及 0.5 ml Dnase I 溶液混合後在圓
形轉盤上，室溫作用，直至溶液不再黏
稠狀為止。離心 60 分鐘，將上清液倒
去。將沉澱溶解在去離子水中，並定量
蛋白質後，儲存於 4°C 中。

(C) 去除外膜蛋白中的 LPS。

(D) 以 Bradford Dye 定量蛋白含量

以 1:4 = Bradford Dye; ddH₂O 的
比例進行稀釋，取 10 μ l 的欲測蛋白至
96 孔滴定盤，再加入已稀釋的染劑
200，並充分混合，然後讀取 O.D. 550nm
的吸光質(以已知濃度 BSA 建立標準曲
線)。

分離小鼠脾臟細胞 (splenocyte)

以頸椎脫臼法犧牲小鼠，取出脾
臟，置於事先準備有 10ml 1×HBSS 的培
養皿內，已載玻片切成數段以磨砂面於
1×HBSS 內輕輕的磨開，小心將細胞團
塊均磨開之後離心，然後以 10 ml RBC
lysis buffer 去除紅血球，接著再以
1×HBSS 清洗一次，並以水平慢滴的方
式去除細胞 debris，然後以完全細胞培
養液(RPMI)培養。

細胞增殖分析 (Proliferation Assay)

取 96 孔培養盤中加入小鼠脾臟細
胞 (2×10^5 cell/well)，分別以幽門螺旋桿
菌超音波震盪蛋白質(5 μ g/well)、幽門
螺旋桿菌外膜蛋白(1 μ g/well)加入 1 μ
Ci [³H] thymidine /well 一起培養，當細
胞開始進行 DNA 複製時會併入
(incorporate)加入的 [³H] thymidine 的程
度得知細胞增殖的情形。

胞內細胞素染色 (Intracellular Cytokine Staining)

1×10^6 cells/well 以 sonicated protein ($5 \mu\text{g/well}$) 或外膜蛋白 ($1 \mu\text{g/well}$) 進行刺激，分別於刺激 12 小時與 18 小時，收集細胞。且每次收集細胞前 4 小時加入 BFA 抑制蛋白質分泌 [16]。以 FACS staining buffer 洗 2 次，加入 $1 \mu\text{g/ml}$ anti-mCD4-CyChrome 抗體， 4°C 避光染 30 分鐘，以 FACS staining buffer 2 次後加入 $250 \mu\text{l}$ fixation buffer， 4°C 避光處理 20 分鐘，再以 permeabilization buffer 洗 2 次，加入 $1 \mu\text{g/ml}$ anti-mIFN γ -FITC 及 anti-mIL-4-PE 抗體， 4°C 避光染 30 分鐘，以 permeabilization buffer 洗 2 次，最後以 $0.5\sim 1 \text{ ml}$ staining buffer 使細胞懸浮其中，上流式細胞儀(FACS)分析。

偵測小鼠血清中幽門螺旋桿菌專一性抗體之存在

將幽門螺旋桿菌超音波震盪蛋白質 (sonicated protein)，以 $20 \mu\text{g/ml}$ 取 $50 \mu\text{l}$ coating 於 96 孔 ELISA 專用盤中， 4°C 處理 12 小時。wash buffer 清洗 3 次，加入 Blocking buffer， 4°C 處理 12 小時。再以 wash buffer 清洗，加入 $50 \mu\text{l}$ 經 1:50 稀釋之待測血清， 37°C 作用 2 小時。清洗 3 次，加入 $100 \mu\text{l}$ Goat anti-mouse IgG-Fc-HRP， 37°C 作用 1 小時。以 wash buffer 清洗 3 次，加入 $100 \mu\text{l}$ TMB substrate，之後以 $100 \mu\text{l}$ 的 0.18mM H_2SO_4 終止反應。A450 讀取 O.D. 值。

結果

(一) 幽門螺旋桿菌活性的測定方法與培養系統之改進

於 ATCC43504 胃幽門螺旋桿菌活菌數所得的生長曲線中，可得知細菌的濁度(即吸光值)並不與活菌數成正比。在小量體積液態培養基增菌 37 小時之後，培養到大量體積的液態培養基中，在 24 小時之前活菌數均會先上升，24 小時之後則下降，尤其培養至 48 到 63 小時。在這段間活菌數下降，過了 63 小時之後，活菌數才逐漸上升。在整個培養過程中，決定了是否可達到高量的活菌數，增菌時間佔了很重要的因素。不同來源的幽門螺旋桿菌均以 10^8 的活

菌數進行小鼠的感染。

將小鼠在不同的時間點犧牲，並將研磨後的胃組織液進行血液平板培養，之後將此平板培養送至細菌室化驗，經檢查結果發現於革蘭氏染色中有似幽門螺旋桿菌存在，但卻無法分離開 (isolation)，多次生化鑑定的結果顯示培養出的菌種為 *Lactobacillus* species。

為了使幽門螺旋桿菌成為優勢菌，本實驗室最終則決定以人的胃部生理環境進行擇選 (selection)，即藉由 5 mM 生理尿素濃度 pH 值為 2 (physiological urea)，經由繼代作用 (succession) 而將原本的混合培養 (mix culture) 區分開來，並可進行菌落計數 (表一)。利用 5 mM 生理尿素濃度 pH2 處理進行選擇血液平板培養的結果中，顯示出兩種不同的菌落，若同時單獨以選擇血液平板培養基培養(未利用 5 mM 生理尿素濃度 pH2 處理)，則僅出現一種菌落，且經細菌室化驗之後的結果顯示存在一般的血液平板培養基的菌落為 *Loctobacillus*。而以 5 mM 生理尿素濃度 pH2 短時間處理，之後加入等體積之含 5 mM 生理尿素濃度之液態培養基，培養 96 小時也可進行幽門螺旋桿菌專一性的 16S rRNA PCR 偵測 (圖一)，確定所分離出的小且偏透明的菌落為幽門螺旋桿菌，而證明幽門螺旋桿菌確實成功的在小胃部形成群落 (colonization)。

(二) 幽門螺旋桿菌感染之免疫反應

小鼠脾臟細胞對於幽門螺旋桿菌外膜蛋白 (outer membrane protein) 之細胞增殖反應。

小鼠受幽門螺旋桿菌感染 1 個月之後犧牲，並取出脾臟細胞進行細胞增殖反應。我們選擇了兩種不同處理方式而得到的抗原，分別為幽門螺旋桿菌超音波震盪蛋白質 (sonicated protein) 與幽門螺旋桿菌外膜蛋白 (outer membrane protein)，對小鼠脾臟細胞進行刺激。脾臟細胞在抗原不存在之下細胞增殖的狀況低，若加入 $5 \mu\text{g/ml/well}$ 的幽門螺旋桿菌超音波震盪蛋白質則引起中等程度的

增殖反應，而幽門螺旋桿菌外膜蛋白僅需 $1\text{ }\mu\text{g/ml/well}$ 即可引起強烈的細胞增殖，表示多數的脾臟細胞均可接受幽門螺旋桿菌外膜蛋白的刺激而活化處於分裂狀況之下（圖二）。若將外膜蛋白中的 LPS 去除，則需要提高蛋白質濃度為 $10\text{ }\mu\text{g/ml/well}$ 才可引起細胞增殖反應，但對於細胞增殖的效果則明顯的降低（圖三）。

以體外超音波震盪蛋白質與幽門螺旋桿菌外膜蛋白質進行抗原刺激之細胞內細胞素染色分析。

我們以三種不同的抗體：分別為 CD4、IFN- γ 、IL-4 抗體，進行細胞內色素染色，以了解 T 細胞次群的型態。小鼠犧牲後取出脾臟細胞，分別以超音波震盪蛋白質與幽門螺旋桿菌外膜蛋白質進行抗原刺激，經刺激培養之後的脾臟細胞，則以細胞內染色分析 T 細胞次群。

經幽門螺旋桿菌感染一個月，C3H/HeN 小鼠分別以超音波震盪蛋白質與幽門螺旋桿菌外膜蛋白質進行抗原刺激，以細胞內細胞素染色之後，分別顯示出 CD4⁺ IFN- γ ⁺ cells 與 CD4⁺ IL-4⁺ cells 所佔有的比例，由量化結果（圖四與圖五）可看出 CD4⁺ IFN- γ ⁺ cells 與 CD4⁺ IL-4⁺ cells 所佔有的比例相當低，其中 CD4⁺ IL-4⁺ cells 所佔的比例，不論以超音波震盪蛋白質或幽門螺旋桿菌外膜蛋白質進行抗原刺激，或者感染與否並沒有任何的差異。而 CD4⁺ IFN- γ ⁺ cells 所佔的比例，分別進行超音波震盪蛋白質或幽門螺旋桿菌外膜蛋白質進行抗原刺激，雖然受幽門螺旋桿菌感染的小鼠與未受感染的小鼠進行比較有稍高比例產生，但兩者之間並沒有顯著的差異存在。顯示出感染幽門螺旋桿菌之小鼠，並無法在脾臟細胞中見到明顯之 T 細胞反應。

受幽門螺旋桿菌感染的小鼠（C3H/HeN）其血清中幽門螺旋桿菌專一的 IgG 血清效價比未感染的小鼠高，並隨著感染的時間而升高（圖六），同時在抗體類別上，明顯呈現以 IgG1（圖七與圖八）。我們的研究結果中顯示著幽門螺旋桿菌感染的小鼠，雖然在脾臟內並沒有出現明顯的 T 細胞反應，但在小鼠體

內，的確有明顯體液性免疫反應，且主要為 IgG1 的免疫反應。而 IgG2a 並沒有差異（圖七與圖八），因此在我們感染模式中似乎在受幽門螺旋桿菌感染，引起偏向不引發發炎反應的偏向 Th2 細次群的 T 細胞，也因比較不易見到發炎反應。

討論

小鼠腸胃（gastrointestinal tract）中原本就存在一些正常菌落，這些正常菌落多為 *Lactobacillus*，縱使在正常的經禁食的胃禁食的胃液中所佔的量為每毫升至多到 10^3 活菌，而幽門螺旋桿菌在 *in vitro* 受到 *Lactobacillus* 所分泌的乳酸抑制其生長 [17] 之現象首次被觀察到。甚至在幽門螺旋桿菌動物模式建立的早期，*Lactobacillus* 與幽門螺旋桿菌相關性也受到注意，通常在傳統的小鼠 *Lactobacillus* 為 predominant indigenous bacteria，而造成幽門螺旋桿菌短暫的菌落形成與感染的失敗 [18]。

幽門螺旋桿菌小鼠動物模式建立初期，我們遇到的困難在於無法判定感染，混合培養的污染很嚴重，僅可由革蘭氏染色中懷疑有幽門螺旋桿菌的存在。而無法抽取到幽門螺旋桿菌菌體的 DNA 進行 PCR 判定，之後將小鼠犧牲後之胃組織研磨後，培養到 M3 平板培養基，可抽取到幽門螺旋桿菌菌體的 DNA，進行 16S rRNA 與 CagA PCR 產物偵測，但卻沒有任何幽門螺旋桿菌菌落的出現。而直到我們以 5 mM 生理尿素濃度 pH 值為 2（physiological urea）進行 30 分處理，才逐步的將幽門螺旋桿菌與 *Lactobacillus* 的混合培養區分開。Urease 為幽門螺旋桿菌的毒力因子之一，也決定其存活於人類胃部 pH2 環境中的重要因子。pH2 酸性的環境對於任何菌株都是一種壓力（stress），即使對於幽門螺旋桿菌而言也是生存的壓力，但幽門螺旋桿菌具有 urease 會催化 urea 產生 ammonia 而中和菌體週遭的酸鹼值，創造出適合生長的微環境。因此我們設計了酸性的環境，並且利用幽門螺旋桿菌所具有的 urease，外加入 urea 則提供一個正向選擇，在這樣的環境，幽門螺旋桿菌則成為優勢菌，因此可與

Lactobacillus 進行分離，*Lactobacillus* 無法產生乳酸抑制幽門螺旋桿菌的生長。

此外，在幽門螺旋桿菌之菌落形成與產生胃部病理變化之關係上，幽門螺旋桿菌與胃黏膜表皮黏附(adherent)之後，會引起表皮細胞的訊號傳遞，產生 IL-8 而對 PMN (polymorphonuclear cell) 產生趨化性引起胃部發炎反應 [19]，因此在 colonization 之後必須藉著黏附，釋放毒力因子而引起胃部病理變化。我們的實驗中以 C57BL/6 易引起發炎反應的小鼠，其以幽門螺旋桿菌感染 4 個月的胃黏膜組織切片上也僅僅侷限於 mucus 處，但卻無法深入 mucosa 中，其因素可能因為 *Lactobacillus* 將棲所佔據，致使幽門螺旋桿菌無法與小鼠胃部表皮細胞 (epithelium cell) 黏附，更無法引起發炎反應。因此顯示著，胃幽門螺旋桿菌的 colonize 並不一定會引起病理變化。這點與臨床上所觀察到受幽門螺旋桿菌感染但卻沒有症狀的人相似，多數受到感染的人雖然有幽門螺旋桿菌的 colonize，可是無法引起發炎反應。但有些受感染的病人，幽門螺旋桿菌卻可入侵到 mucosa 中，並引起發炎反應。幽門螺旋桿菌所引的病理變化是一個複雜的過程，雖然致病機轉廣被探討，但真正的原因至今仍然不清楚，可能與宿主的免疫反應，胃部環境及其他因子皆有關係。而在我們的小鼠動物模式中，除了幽門螺旋桿菌之外，我們更看到了另一株細菌 (*Lactobacillus*) 與幽門螺旋桿菌之間的平衡性，這也是使得我們的小鼠在感染幽門螺旋桿菌之後，不易見到病理變化原因之一，除此之外，感染小鼠胃部所引起的免疫反應，也可能是造成無明顯病理變化的原因。

在我們的小鼠動物模式中受幽門螺旋桿菌感染的小鼠，在胃部並沒有見到明顯的發炎反應。至於是否有產生對於幽門螺旋桿菌的免疫反應，我們可由受感染的小鼠血清中偵測出具有幽門螺旋桿菌專一性 IgG 抗體，顯示出受感染的小鼠體內的確產生對於幽門螺旋桿菌專一性的 IgG1 抗體。顯示出在感染幽門螺旋桿菌後所產生的是偏向 Th2 的 T 細胞反應，因此較不易產生明顯的胃部發炎反應。

在 T 細胞免疫反應中 Th1/Th2 cytokine 表現量的平衡，對於是否引起胃部病理變化極為重要。以 IFN- γ ^{-/-} 小鼠感染幽門螺旋桿菌的研究中顯示，受幽門螺旋桿菌感染的 IFN- γ ^{-/-} 小鼠之胃部中，可造成較多的菌數形成菌落；但卻無明顯發炎反應產生 [20]。另外以 C57BL/6J IFN- γ ^{-/-} 小鼠也顯示出無發炎反應且 IL-4 表現量上升的現象 [21]。由小鼠動物模式證實 IFN- γ 的缺乏確實可減輕胃炎的發生，所以 Th1 型造成感染小鼠雖有 colonization 卻無法產生發炎反應的原因。

在胃部局部的免疫反應，Type I 的幽門螺旋桿菌 (CagA⁺Vac⁺) 會單獨藉由抗原直接促使 T 細胞分化為 Th1 型的免疫反應或經由 macrophage 的活化產生 IL-1、IL-6、IL-8 與 IL-12，並且由 IL-12 所產生的微環境而 CD4⁺ T cell 驅使為 Th1 型免疫反應。而 Th1 型的免疫反應釋放一些 pro-inflammatory cytokine 如 TNF- α 與 IFN- γ ，造成胃部發炎反應。而 B 細胞則可能透過抗原的相似性 (antigen mimicry) 而產生自體抗體造成胃部疾病 [19]，B 細胞除了產生有害的自體抗體外，也可產生認識幽門螺旋桿菌專一性抗體。如幽門螺旋桿菌專一性 IgA 抗體，與疾病的嚴重程度也有正相關的關係 [22]。在 in vitro 研究中 IgG 與 IgM 的調理 (opsonization) 角色，可促使 phagocyte 對幽門螺旋桿菌的毒殺作用 [23]。此外有些中和性抗體可負責中和幽門螺旋桿菌的毒性因子 [24]。另一方面，血清中專一性的幽門螺旋桿菌 IgG 抗體用偵測幽門螺旋桿菌的感染 [25]。顯示出對幽門螺旋桿菌的免疫反應，除了可藉以清除幽門螺旋桿菌的感染，但也可能同時造成胃部的損傷。

免疫系統發展成應變性的免疫 (adaptive immunity) 過程相當的複雜，microbial peptide 被 MHC 所呈現，則選擇出適當且具有 antigen-receptor specificity 的 T lymphocyte，此即為 clonal selection。Specific T lymphocyte 被選擇之後，隨即進行 clonal expansion，並且隨機產生各種不同的 effector T cell。而這些 effector T cell 仍必須透過微生物與先天性免疫反應 (innate immunity) 之間的作用所產生的

cytokine 與 costimulatory receptors, 提供某一特定的 effector cell 進行生存與細胞增殖之用, 並且具有記憶性而產生對抗感染原的保護性 T 細胞反應 [26]。

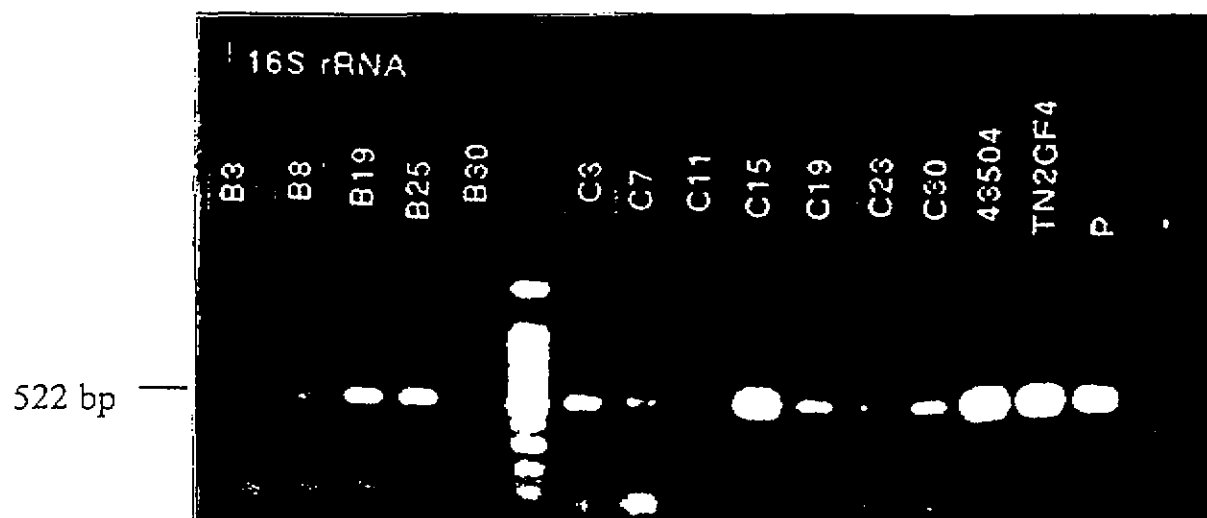
一般探討幽門螺旋桿菌引起之細胞素的免疫反應, 不論在人體 [27-29] 或 Rhesus monkey [30] 多數的研究方式仍以 gastric mucosa 為主, 即 local immune response, 而小鼠則以 gene deficient mice 利用 ELISA kit 偵測脾臟細胞受幽門螺旋桿菌 urease 抗原刺激所產生的細胞激素 [21], 在這些研究中早期感染為 Th1 的免疫反應為主。在我們的人類幽門螺旋桿菌感染小鼠動物模式, 所產生的全身性免疫反應中, 在脾臟中所測得具抗原專一性的 CD4+ T cells 比例相當低, 另一方面胃部缺乏明顯浸潤的 T 細胞所造成的發炎, 因此無法進一步探討 T 細胞次群的反應。

脾臟細胞雖收納來自身體各處被 antigen priming 過的 T 細胞, 為了維持免疫系統的多變性(diversity), 因此特定抗原專一性的 effector T cell, 其存在的比例必須相當低, 如此低比例的抗原專性 T 細胞, 則很難進行 T 細胞次群探討。若想探討抗原專一性 T 細胞次群, 則有賴於瞭解幽門螺旋桿菌抗原專性的 T cell epitope, 並利用 tetrameric peptide/MHC complexes 進行胞內細胞素染色 (intracellular cytokine staining), 才能清楚的瞭解抗原專一性 T 細胞次群之免疫反應。

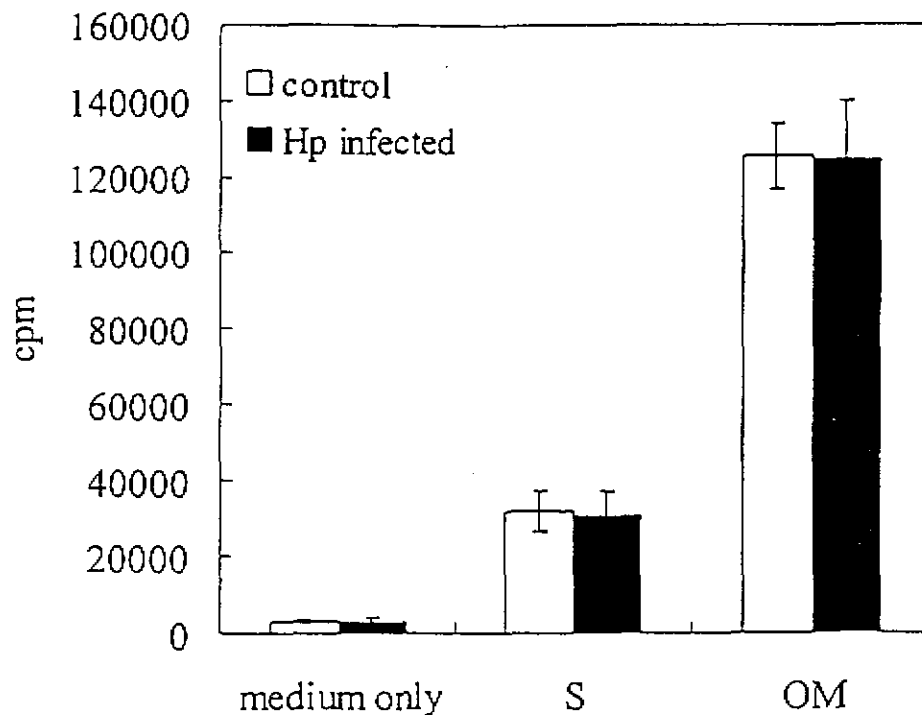
參考文獻

1. Warren, JR, and Marshall BJ. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet I*, 1273-1275.
2. Blaser MJ et al. 1987. Gastric CLOs, gastritis & peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 93:371-383.
3. Wotherspoon AC et al. 1991. *Helicobacter pylori*-associated gastritis & primary b-cell gastric lymphoma. *Lancet* 388:1175-1176.
4. NIH consensus conference. 1994. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA* 272:65-69.
5. Taylor NS et al. 1995. Long-term colonization with single & multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol*, 33:918-923.
6. Lin JT et al. 1993. *Helicobacter pylori* infection in a randomly selected population, healthy volunteers, and patients with gastric ulcer and gastric adenocarcinoma. A seroprevalence study in Taiwan. *Scand J Gastroenterol* 28:1067-1072.
7. Teh BH et al. 1994. Seroprevalence and associated risk factors of *Helicobacter pylori* infection in Taiwan. *Anticancer Res*. 14:1389-1392.
8. Marshall BJ et al. 1984. Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Letters* 25:83-88.
9. Parsonnet J, et al. 1991. *Helicobacter pylori* infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. *J Nat Cancer Inst* 83:640-643.
10. Parsonnet J, et al. 1994. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 330:1267-1271.
11. Haeblerle HA, et al. 1997. Differential stimulation of interleukin-12 and IL-10 by live and killed *Helicobacter pylori* in vitro and association of IL-12 production of gamma interferon-producing T cells in human gastric mucosa. *Infect Immun* 65:4229-4235.
12. Karttunen, RA, et al. 1997. Expression of mRNA for interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-12 (p40) in normal gastric mucosa and mucosa infected with *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol.* 32:22-27.
13. Watanabe T, et al. 1998. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 115:642-648.
14. Engstrand L, et al. 1992. Reverse transcription and polymerase chain

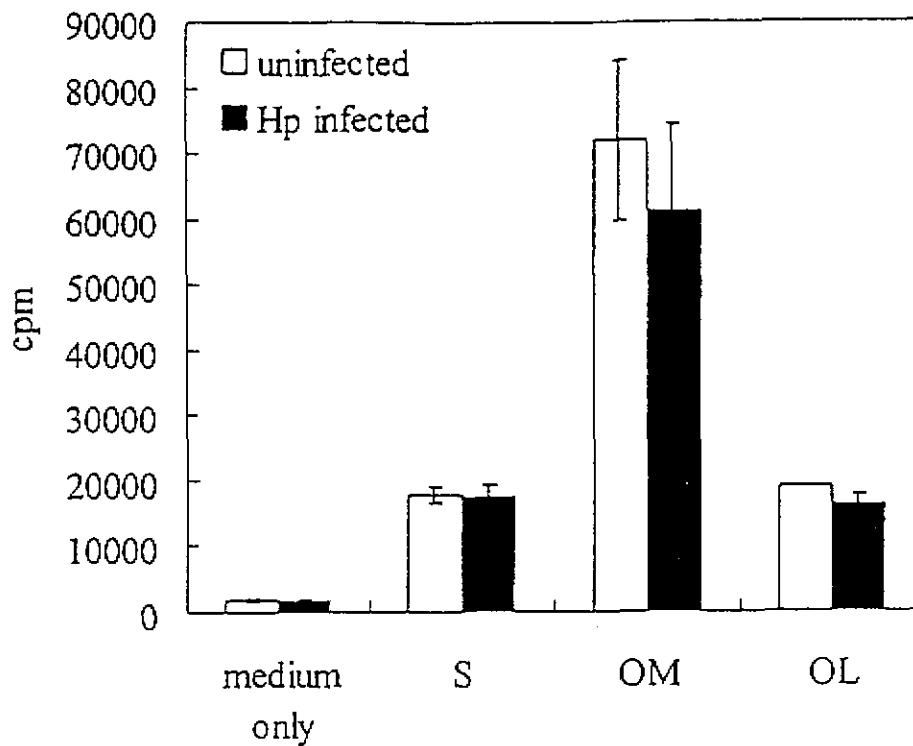
- reaction amplification of rRNA for detection of *Helicobacter* species. J. Clin. Microbiol. 30:2295-2301.
15. Atherton JC, et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J. Biol. Chem. 270:17771-17777.
 16. Nylander S., et al. 1999. Brefeldin A, but not monensin, completely blocks CD69 expression on mouse lymphocytes: efficacy of inhibitors of protein secretion in protocols for intracellular cytokine staining by flow cytometry. J. Immunol. Method. 224:69-76.
 17. Bhatia SJ, et al. 1989. *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. J Clin Microbiol. 27:2328-2330.
 18. Karita M., et al. 1994. Establishment of a small animal model for human *Helicobacter pylori* infection using germfree mouse. Am J Gastroenterol 89:208-213.
 19. Telford JL., et al. 1997. Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. Corr. Opin. Immunol. 9:498-503.
 20. Sawai N., et al. 1999. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. Infect. Immun. 67:279-285.
 21. Smythies LE., 2000. *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN- γ , gene-deficient mice. J Immunol. 165:1022-1029.
 22. Watanabe T., et al. 1997. Relationship between local immune response to *Helicobacter pylori* and the diversity of disease: investigation of *Helicobacter pylori*-specific IgA in gastric juice. J. Gastroenterol. Hepatol. 12:660-665.
 23. Tosi MF., and Czinn SJ. 1990. Opsonic activity of specific human IgG against *Helicobacter pylori*. J. Infect. Dis. 162:156-162.
 24. Cover TL., 1992. Serum neutralizing antibody response to the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. J Clin Invest. 90:913-918.
 25. Luzzi F., et al. 1995. Salivary-specific immunoglobulin G in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients. Am J Gastroenterol. 90:1820-1823.
 26. Hunter CA., et al. 2000. Cytokines and T cells in host defense. Corr. Opin. Immunol. 12:413-418.
 27. Tanahashi T., et al. 2000. Cytokine expression and production by purified *Helicobacter pylori* urease in human gastric epithelial cells. Infect. Immun. 68:664-671.
 28. Sommer F., et al. 1998. Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4⁺ lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype. Infect Immun. 66L:5543-5546.
 29. Yamaoka Y., et al. 1996. *Helicobacter pylori* cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. Gastroenterology 110:1744-1752.
 30. Mattapallil JJ., et al. 2000. A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute *Helicobacter pylori* infection in Rhesus Macaques. Gastroenterology 118:307-315.



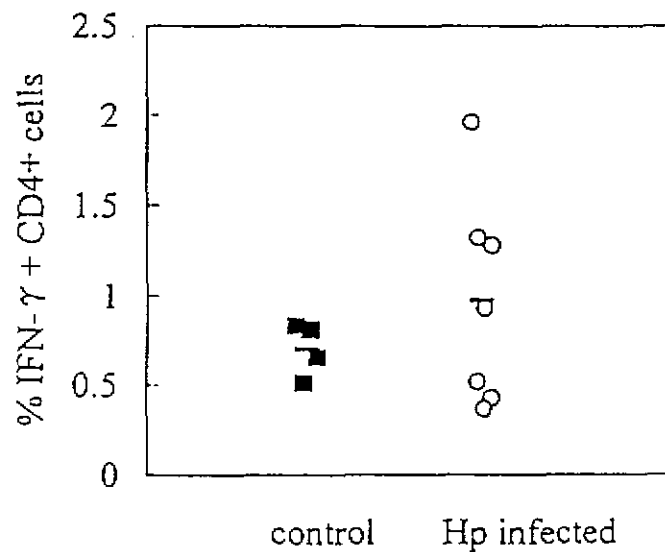
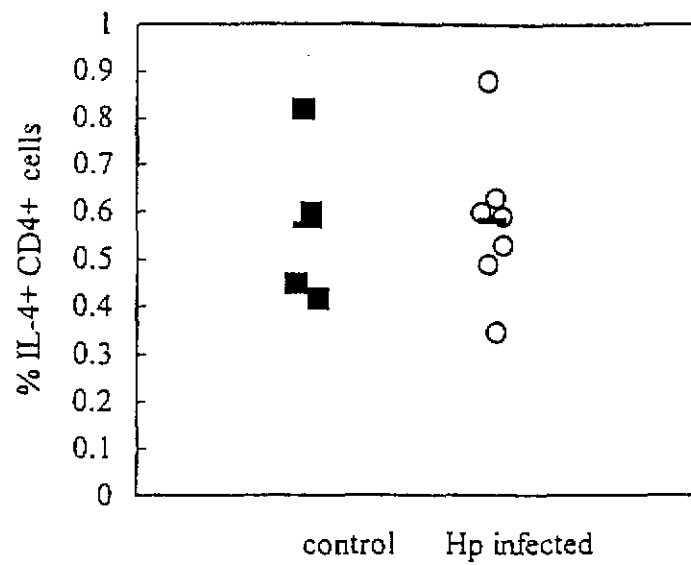
圖一 以 5 mM 生理尿素濃度 pH2 處理，之後進行 16S rRNA PCR 偵測：以 5 mM 生理尿素濃度 pH2 處理 30 分，之後加入等體積含之 5 mM 生理尿素濃度之液態培養基，經 96 小時培養後，收集菌體並進行幽門螺旋桿菌專一性 16S rRNA PCR 偵測。圖中分別顯示不同鼠胃部組織研磨液，經 5 mM 生理尿素濃度 pH2 處理之 PCR 偵測結果。進一步確定處理之後的微小透明菌落為幽門螺旋桿菌。



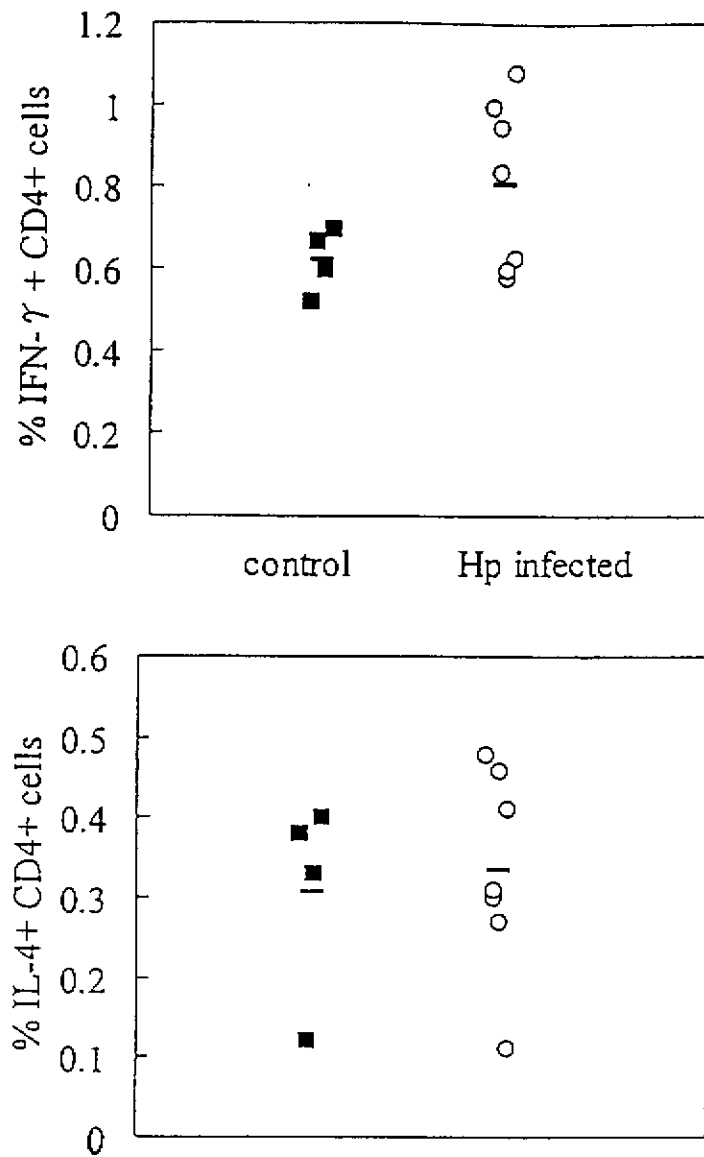
圖二 比較不同的幽門螺旋桿菌蛋白質，對於未感染幽門螺旋桿菌或感染幽門螺旋桿菌之小鼠(C3H/HeN) T細胞增殖反應的情況：C3H/HeN 小鼠經幽門螺旋桿菌感染 1 個月，於 96 孔培養盤中加入小鼠脾臟細胞(2×10^5 cell/well)，分別以幽門螺旋桿菌超音波震盪蛋白質($5 \mu\text{g/ml/well}$)、幽門螺旋桿菌外膜蛋白($1 \mu\text{g/ml/well}$)培養至距離 harvest 之前的 18hr 加入 $1 \mu\text{Ci} [^3\text{H}]$ thymidine/well 一起培養。S 表示超音波震盪蛋白質，OM 則表示幽門螺旋桿菌外膜蛋白，均會引起脾臟細胞的增殖反應，但幽門螺旋桿菌外膜蛋白可引起較強的細胞增殖反應，這樣的細胞增殖反應並不因為受幽門螺旋桿菌感染而有統計學上的差別。



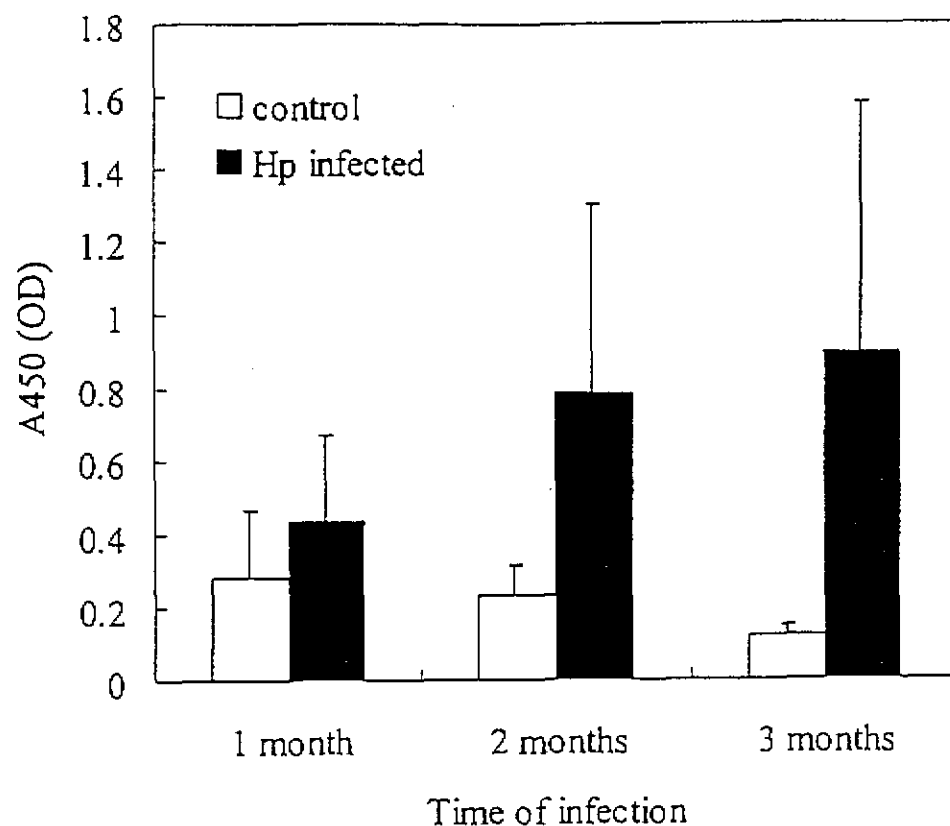
圖三 比較不同的幽門螺旋桿菌蛋白質，對於未感染幽門螺旋桿菌或感染幽門螺旋桿菌之小鼠(BABL/c) T細胞增殖反應的情況：BABL/c 小鼠經幽門螺旋桿菌感染 1 個月，於 96 孔培養盤中加入小鼠脾臟細胞(2×10^5 cell/well)，分別以幽門螺旋桿菌超音波震盪蛋白質($5 \mu\text{g/ml/well}$)、幽門螺旋桿菌外膜蛋白($1 \mu\text{g/ml/well}$)培養至距離 harvest 之前的 18hr 加入 $1 \mu\text{Ci} [^3\text{H}]$ thymidine/well 一起培養。S 表示超音波震盪蛋白質，OM 則表示幽門螺旋桿菌外膜蛋白，OL 為外膜蛋白去除 LPS。幽門螺旋桿菌外膜蛋白可引起較強的細胞增殖反應，而外膜蛋白去除 LPS，則降低了細胞增殖反應，同樣的細胞增殖反應並不因為受幽門螺旋桿菌感染而有統計學上的差別。



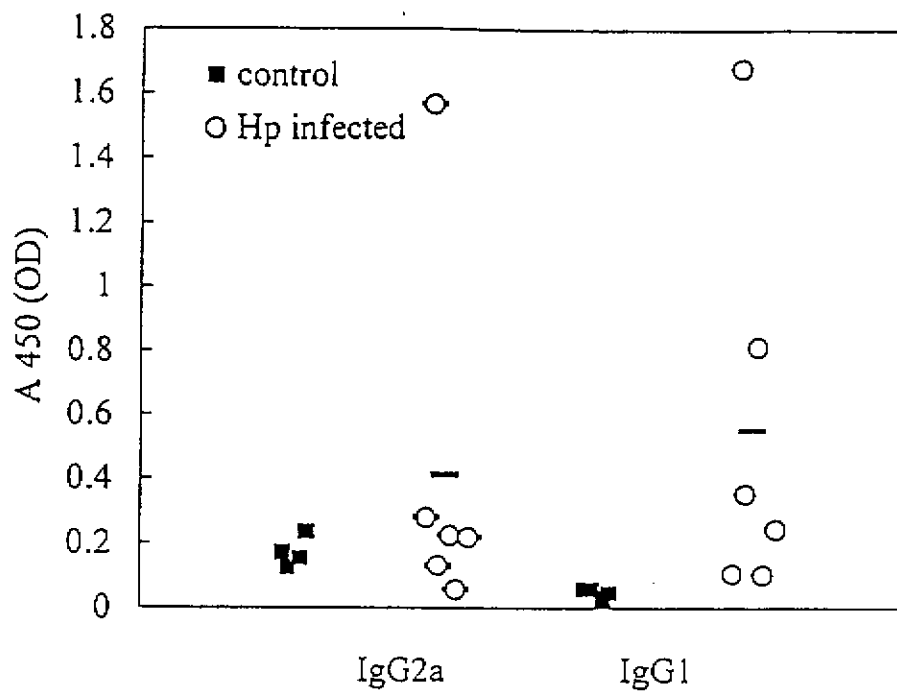
圖四 以胞內細胞素染色(intracellular cytokine staining)分析 C3H/HeN 小鼠脾臟細胞對於超音波震盪蛋白質的細胞素反應量化之結果：經幽門螺旋桿菌感染一個月的小鼠與控制組之脾臟細胞，以超音波震盪蛋白質進行刺激，進行胞內細胞素染色，再以 FACS 分析。經幽門螺旋桿菌感染一個月的小鼠有較高的 IFN- γ 產生，但兩者的差異並無統計學上顯著差異。



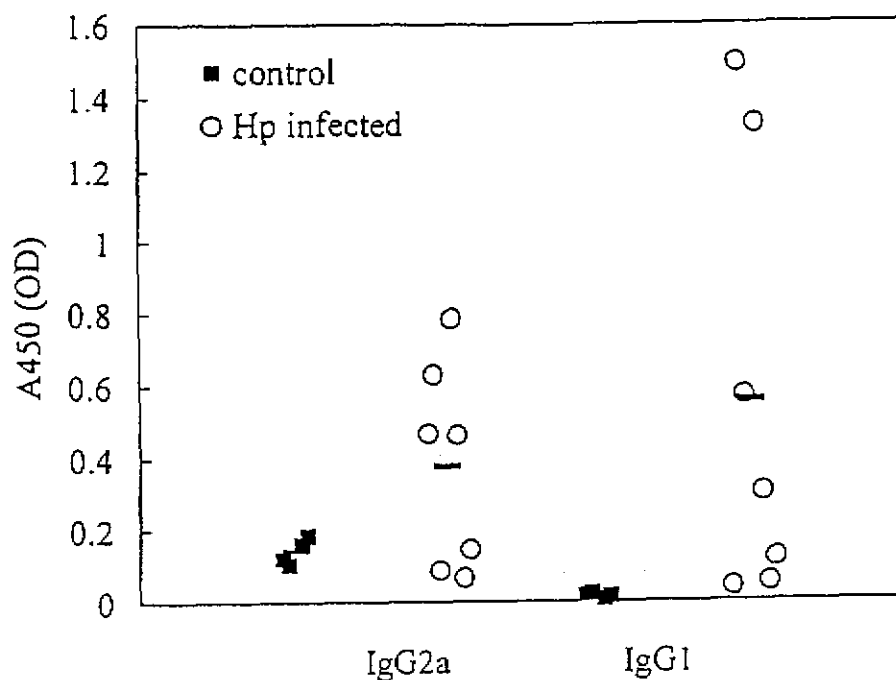
圖五 以胞內細胞素染色分析 C3H/HeN 小鼠脾臟細胞對於幽門螺旋桿菌外膜蛋白質的細胞素反應，量化之結果：經幽門螺旋桿菌感染一個月的小鼠與控制組之脾臟細胞，以幽門螺旋桿菌外膜蛋白質進行刺激，進行胞內細胞素染色，再上 FACS 分析。經幽門螺旋桿菌感染的小鼠有較高的 IFN- γ 產生，但兩者並無統計學上顯著差異。



圖六 ELISA 方式偵測幽門螺旋桿菌感染小鼠週邊血液中之幽門螺旋桿菌專一的 IgG 血清效價：以幽門螺旋桿菌超音波震盪蛋白質進行抗原 coating，將小鼠血清進行 1：50 稀釋，分別加入受幽門螺旋桿菌感染 1 個月、2 個月、或 3 個月的小鼠血清。受幽門螺旋桿菌感染的小鼠其血清中幽門螺旋桿菌專一的 IgG 血清效價比未感染的小鼠高，並隨著感染的時間而升高。



圖七 ELISA 方式偵測幽門螺旋桿菌感染 2 個月小鼠週邊血液中之幽門螺旋桿菌專一的 IgG2a 與 IgG1 血清效價：以幽門螺旋桿菌超音波震盪蛋白質進行抗原 coating，加入受幽門螺旋桿菌感染 2 個月的小鼠血清。以小鼠血清 50×稀釋所得之吸光值(OD)進行作圖。受幽門螺旋桿菌感染的小鼠其血清中幽門螺旋桿菌專一的 IgG1 血清效價均比未感染的小鼠高($P = 0.1$ ；Student t test)。



圖八 ELISA 方式偵測幽門螺旋桿菌感染 3 個月小鼠週邊血液中之幽門螺旋桿菌專一的 IgG2a 與 IgG1 血清效價：以幽門螺旋桿菌超音波震盪蛋白質進行抗原 coating，加入受幽門螺旋桿菌感染 3 個月的小鼠血清。以小鼠血清 50×稀釋所得之吸光值(OD)進行作圖。受幽門螺旋桿菌感染的小鼠其血清中幽門螺旋桿菌專一的 IgG1 血清效價均比未感染的小鼠高($P < 0.05$; Student t test)。

表一 幽門螺旋桿菌感染 3 個月之小鼠胃研磨液，以 5 mM 生理尿素濃度 pH 2 處理，經由平板培養 3 至 4 天菌落計數之結果。

小鼠編號	菌株	30 分	24 小時	48 小時	72 小時	96 小時
B3	<i>H. pylori</i>	>300	>300	NC	NC	NC
	<i>Lactobacillus</i>	138	38			
B8	<i>H. pylori</i>	>300	65	NC	NC	NC
	<i>Lactobacillus</i>	5	0			
B19	<i>H. pylori</i>	NC	NC	NC	NC	NC
	<i>Lactobacillus</i>					
B25	<i>H. pylori</i>	14	18	NC	NC	NC
	<i>Lactobacillus</i>	21	8			
B30	<i>H. pylori</i>	0	>300	>300	>300	NC
	<i>Lactobacillus</i>	>300	>300	14	2	
C3	<i>H. pylori</i>	29	0	54	NC	NC
	<i>Lactobacillus</i>	108	0	0		
C7	<i>H. pylori</i>	0	>300	NC	NC	NC
	<i>Lactobacillus</i>	79	1			
C11	<i>H. pylori</i>	>300	100	NC	NC	NC
	<i>Lactobacillus</i>	114	15			
C15	<i>H. pylori</i>	59	64	NC	NC	NC
	<i>Lactobacillus</i>	2	0			
C19	<i>H. pylori</i>	80	50	NC	NC	NC
	<i>Lactobacillus</i>	6	1			
C23	<i>H. pylori</i>	35	103	NC	NC	NC
	<i>Lactobacillus</i>	3	0			
C30	<i>H. pylori</i>	79	1	NC	NC	NC
	<i>Lactobacillus</i>	33	0			

NC: 無單一菌落故無法計數。