

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.09.004

慢性自发性荨麻疹患者的血清 抗幽门螺杆菌抗体研究

吴登艳, 杜茂涛, 谭燃景

重庆医科大学 附属第二医院, 重庆 400010

摘要: 目的: 调研感染幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)与慢性自发性荨麻疹(Chronic spontaneous urticaria, CSU)发病的相关性以及 Hp 血清特异性抗体对 CSU 发病的影响. 方法: 用标准 ELISA 试剂盒检测 CSU 组和健康对照组 Hp 感染阳性率; 制备 Hp 尿素裂解液并表达、纯化、鉴定 Hp-Lpp20 蛋白, ELISA 法分别检测 CSU 组和非 CSU 对照组中血清抗 Hp 全菌及抗 Lpp20 的 IgE, IgG, IgA 水平. 结果: 标准 Hp-ELISA 试剂盒检测显示, CSU 组的血清抗 Hp 抗体阳性率(73.46%, 155/211)高于对照组(51.82%, 71/137), 表现出差异具有统计学意义($\chi^2 = 17.08$, $p = 0.000$); ELISA 法检测显示, CSU(+)Hp(+)组血清的抗 Hp 全菌-和抗 Lpp20-IgE 水平(0.082 ± 0.002 , 0.085 ± 0.003)与 CSU(-)Hp(+)组(0.078 ± 0.003 , 0.082 ± 0.005)比较差异不具有统计学意义($P_1 = 0.382$, $P_2 = 0.597$); CSU(+)Hp(+)组抗 Hp 全菌-IgG 和 IgA 水平(1.053 ± 0.022 , 0.660 ± 0.022)显著低于 CSU(-)Hp(+)组(1.222 ± 0.034 , 0.849 ± 0.037)($P_1 = 0.000$, $P_2 = 0.019$), 两组间抗 Lpp20-IgG 和 IgA 水平差异不具有统计学意义(1.459 ± 0.012 , 1.494 ± 0.016 , $P_1 = 0.087$; 1.229 ± 0.020 , 1.251 ± 0.033 , $P_2 = 0.548$). 结论: Hp 感染和 CSU 发病密切相关, 但 Hp 和其 Lpp20 特异性血清抗体并不是触发荨麻疹的主要病因.

关键词: 幽门螺杆菌; 特异性抗体; 体液免疫; 慢性自发性荨麻疹

中图分类号: R758.24 文献标志码: A 文章编号: 1673-9868(2021)09-0030-08

Study on the Specific Antibodies to *Helicobacter pylori* in Sera from Patients with Chronic Spontaneous Urticaria

WU Dengyan, DU Maotao, TAN Ranjing

The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

Abstract: In order to explore the underlying pathogenesis of CSU (chronic spontaneous urticaria), the relationship between Hp (*Helicobacter pylori*) infection and CSU risk was analyzed and the levels of sera specific antibodies against Hp in CSU patients were detected. The standard ELISA kit was used to determine the prevalence rate of Hp-infection in the CSU group and the normal control group. Urea-lysed Hp and recombinant Lpp20 protein which was definitely expressed, purified and identified, were respectively pre-coated on microplate, and then all of the sera samples were tested by ELISA assay for their IgE, IgG and IgA antibodies against Hp and Lpp20. The standard ELISA assay showed that the Hp-infection rate was significantly higher in the CSU group (73.46%, 155/211) than that in the control group (51.82%,

收稿日期: 2020-05-12

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(cstc2019jcyj-msxmX0042).

作者简介: 吴登艳, 硕士, 主治医师, 主要从事荨麻疹发病机制研究.

71/137) ($\chi^2=17.08$, $p<0.001$). In ELISA assay, no obvious differences were detected in the levels of sera Hp- or Lpp20- IgE between the CSU(+)Hp(+) group (0.082 ± 0.002 , 0.085 ± 0.003) and the CSU(-)Hp(+) group (0.078 ± 0.003 , 0.082 ± 0.005) ($P_1=0.382$, $P_2=0.597$). The levels of sera Hp- IgG and IgA in the CSU(+)Hp(+) group (1.053 ± 0.022 and 0.660 ± 0.022 , respectively) were obviously lower than those in the CSU(-)Hp(+) group (1.222 ± 0.034 and 0.849 ± 0.037 , respectively) ($P_1=0.000$, $P_2=0.019$). The levels of sera Lpp20- IgG or IgA showed no obvious differences between the two groups (1.459 ± 0.012 , 1.494 ± 0.016 , $P_1=0.087$; 1.229 ± 0.020 , 1.251 ± 0.033 , $P_2=0.548$). In conclusion, Hp infection was found to be closely related to CSU attack, but the specific sera antibodies of Hp and Lpp20 were not critical factors to trigger urticaria.

Key words: *Helicobacter pylori*; specific antibody; humoral immunity; chronic spontaneous urticaria

慢性荨麻疹(Chronic urticaria, CU)是以反复发生的风团、瘙痒为主要表现的常见疾病,病程常迁延达 6 周以上. CU 的病因复杂且隐匿,因此将大多数(>80%)无明显诱因的 CU 归为慢性自发性荨麻疹(Chronic spontaneous urticaria, CSU)^[1]. 大量研究表明,CSU 患者常同时伴随幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染,经规范抗 Hp 治疗后,大部分患者的荨麻疹症状可得到缓解或完全消退,这些研究均提示 Hp 感染和 CSU 发病有着非常密切的相关性^[2-5].

肥大细胞的激活是荨麻疹发病的关键,它常由其胞膜外的 FcεRI 受体和 IgE 交联触发^[1]. 关于 Hp 相关体液免疫与 CU 发病机制的研究一直热度不断, Hizal 等^[6]发现血清抗 Hp IgG 阳性的荨麻疹患者自体血清皮肤试验阳性率(40%)显著高于血清抗 Hp IgG 阴性的荨麻疹患者(14.3%),而自体皮肤血清试验已被广泛用于检测与 CSU 发病密切相关的抗肥大细胞 FcεRI 抗体, Sun 等^[7]也发现抗 Hp 抗体阳性和抗 TGA_b 阳性的 CU 患者血清抗 FcεRI 抗体阳性率较对照组显著增高. 但也有一些研究表示 Hp 感染与致 CSU 发病的自身抗体的产生无关^[8]. Hp 是一种能长期定植于胃肠道粘膜上皮细胞的微需氧革兰氏阴性杆菌,宿主持续的带菌状态可产生特异性体液免疫,导致感染局部粘膜和全身抗 Hp 特异性抗体高表达,包括 IgA, IgE 和 IgG 类抗体. 鉴于肥大细胞的胞膜外尚有多种正性效应的受体,除了对 IgE 表现高亲和力的 FcεRI 受体外,循环免疫复合物受体、低亲和力的 IgG 受体、补体受体等的特异性结合也可促使肥大细胞活化. Acuña 等^[9]对 30 例 CU 进行检测,其中血抗 Hp IgG 抗体阳性率为 60.0%, IgM 阳性率为 33.3%; Galadari 等^[10]也发现血清抗 Hp IgG, IgM 抗体阳性率在 CU 患者中显著增高; Rostamy 等^[11]对 43 例 CU 患者血清特异性抗 Hp-IgG, IgA, IgG 联合 IgA 进行检测,发现阳性率分别为 72.1%, 46.5% 和 44.18%, 与 40 例正常对照(37.5%, 40%, 27.5%)比较差异具有统计学意义; Liutu 等^[12]甚至用免疫印迹的方法在 Hp 中发现了 IgE 结合表位,提示 Hp 诱导的循环细菌特异性抗体可能在 CU 发病中起了重要作用. 更早期的研究对比均伴 Hp 感染的 CU 及非 CU 患者,前组可检出高滴度血清抗 Hp-Lpp20 蛋白的 IgG, IgA 抗体,这也是目前为止仅有的一项提出 Hp 具体蛋白成分特异性抗体参与 CU 发病的研究^[13]. 但到目前为止, Hp 介导的体液免疫和 CU/CSU 发病的相关研究样本数量较少,针对大样本的 CSU 血清抗 Hp 和其 Lpp20 蛋白抗体水平的研究鲜有报道,迫切需要在 CSU 大样本中调研 Hp 特异性抗体水平,并探讨其可能的致病机制. 本研究拟纳入较大样本的 CSU 患者及对照组,检测各组血清抗 Hp 和抗 Hp-Lpp20 的 IgE、IgG 和 IgA 水平,明确抗体分布情况,并探讨 Hp 感染促发的体液免疫在 CSU 发病中的角色及可能的机制.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血清样本、菌株、质粒

CSU 病例的血清样本: 2014 年 7 月—2015 年 1 月在重庆大坪医院就诊并确诊为 CSU 的 211 例患者,其中 112 例女性(排除妊娠), 99 例男性, 年龄为 14—69 周岁(38.79 ± 4.22 岁). 本研究纳入的 CSU: ① 均符合 2018 年欧洲变态反应和临床免疫学(EAACI)会议的 CSU 诊断标准^[1]; ② 病程 6 周至 7 年不等, 平均 1.8 年; ③ 无用药史, 近一周否认抗组胺治疗, 近一月否认使用糖皮质激素、免疫抑制剂; ④ 否认重大基础疾病及遗传、传染病病史; ⑤ 从未接受过规范的抗 Hp 治疗. 健康对照组的血清样本: 同期大坪医院体

检中心常规体检结果正常的志愿者, 对照组在年龄、性别等一般条件上与 CSU 组匹配. 纳入志愿者 137 例, 其中 73 例女性(排除妊娠), 64 例男性, 年龄为 18—66 周岁(38.29 ± 3.37 岁). 纳入的对照组: ① 无过敏性疾病病史; ② 一般检查无异常(二便、血常规, 肝肾功); ③ 无重大基础疾病及遗传、传染病病史; ④ 从未接受过规范的抗 Hp 治疗. EDTA 抗凝管收集各受试者外周静脉血, 2 h 内静置离心、收集血清. 菌株和质粒 Hp 26695 标准株购自美国菌种保藏中心(ATCC); BL21(DE3) 感受态大肠杆菌购自北京天根公司; 由本实验室制备的 pET22b-Lpp20 重组质粒已转入 DH5 α 感受态大肠杆菌, 氨苄西林(Amp)抗性^[14].

1.1.2 主要试剂

标准 Hp-ELISA 血清检测试剂盒购于北京贝尔生物公司; 质粒抽提试剂盒购于 Omega 公司; 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购于北京达科为公司; Chelating Sepharose Fast Flow 纯化柱购于 Pharmacia 公司; 生物素-山羊抗人 IgE, IgA 购自英国 AbD serotec 公司; HRP-羊抗人 IgG 购自北京中杉公司; HRP-链霉亲和素购自美国 Abbkine 公司; TMB 显色液购于北京天根公司; BCA 蛋白浓度试剂盒购于 Sigma 公司; ECL 化学发光试剂盒购于上海碧云天公司; N-端测序送中国科学院测定.

1.2 试验方法

1.2.1 Hp 感染阳性率测定

用标准的 Hp-ELISA 试剂盒就 CSU 组和对照组 Hp 感染阳性率(抗 CagA 及 HSP 联合抗原的 IgG 抗体)进行检测. 具体操作严格遵守说明书, 酶标仪 450 nm 读取 OD 值.

1.2.2 血清特异性抗 Hp 全菌抗原 IgG, IgE 和 IgA 抗体检测

(1) Hp 的培养和菌体尿素裂解液的制备

① 细菌培养^[14]: 将保种的 Hp 菌液接种于固体 Hp 培养基上 37 °C 培养长出的菌落, 再次接种入布氏肉汤培养基(含 10% 胎牛血清)扩增到对数分裂期. ② Hp 尿素裂解液的制备: 菌液用磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)重悬洗涤 3 次, 离心后将菌体沉淀加入尿素溶液(8 M)中, 充分吹打后即成, BCA 法测蛋白质量浓度.

(2) 抗 Hp-IgG, IgE 和 IgA 抗体水平测定

① 间接 ELISA 法测定抗 Hp-IgG: 20 μ g/mL 的 Hp 尿素裂解液包被酶标板, 加入 1 : 40 稀释血清 100 μ L/孔, 37 °C 孵育 1 h, 洗板后加入 1 : 3 000 稀释的 HRP-羊抗人 IgG 100 μ L/孔, 孵育 1 h, 洗板后拍干板中液体, 加入显色液避光显色 15 min, 终止反应, 450 nm 读取 OD 值. 每样本设 3 复孔, 同时设无血清对照孔. ② 生物素-亲和素 ELISA 法测定抗 Hp-IgE/IgA: 将各血清 1 : 20 稀释后加样入 Hp 尿素裂解液包被的酶标板, 37 °C, 1 h 孵育后洗板, 加入 1 : 10 000 的生物素-山羊抗人 IgE 或 1 : 2 000 的生物素-山羊抗人 IgA 孵育 1 h, 洗板, 加入 1 : 6 000 HRP-链霉亲和素孵育 35 min, 加入 TMB 显色液显色 20 min, 终止反应, 450 nm 读取光密度(OD)值. 同时设置复孔及无血清对照.

1.2.3 血清特异抗 Hp-Lpp20-IgG, IgE 和 IgA 抗体检测

(1) Lpp20 的表达和纯化^[14]

将 pET22b-Lpp20-DH5 α 菌液培养扩增后提取重组质粒 DNA 并经 NdeI+XhoI 双酶切鉴定正确, 再将质粒转入感受态 BL21(DE3)中, 构建工程菌 pET22b-Lpp20-BL21(DE3)并诱导质粒表达. SDS-PAGE 凝胶电泳法鉴定重组 Lpp20 蛋白的表达, 镍离子亲和层析法纯化蛋白, 蛋白浓度测定(BCA)法测定浓度, 并送中国科学院进行 N-端测序, 增强化学发光法鉴定 Lpp20 重组蛋白的抗原反应性.

(2) 抗 Lpp20-IgG, IgE, IgA 抗体水平测定

取 Lpp20 以 5 μ g/mL 的质量浓度, 将各血清 1 : 20 稀释加入包被好的酶标版中, 检测各样本中抗 Lpp20-IgG, IgE, IgA 抗体水平. 同时设置复孔及无血清对照.

1.3 统计学方法

使用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行数据分析并作图, Hp 感染的阳性率(%)行卡方检验比较, p 小于 0.05 判定为差异具有统计学意义; 正态计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间进行非配对 t 检验比较, p 小于 0.05 判定为差异具有统计学意义.

2 结 果

2.1 CSU 组和对照组 Hp 感染阳性率

CSU 组和对照组均进行血清抗 Hp-ELISA 标准试剂盒检测, 结果表明, 在 CSU 组中, 抗 Hp 抗体阳

性率为 73.46%(155/211), 对照组中阳性率为 51.82%(71/137), 两组行卡方检验($\chi^2=17.08, p=0.000$)具有统计学意义(表 1), 可认为 CSU 发病与 Hp 感染有密切的相关性.

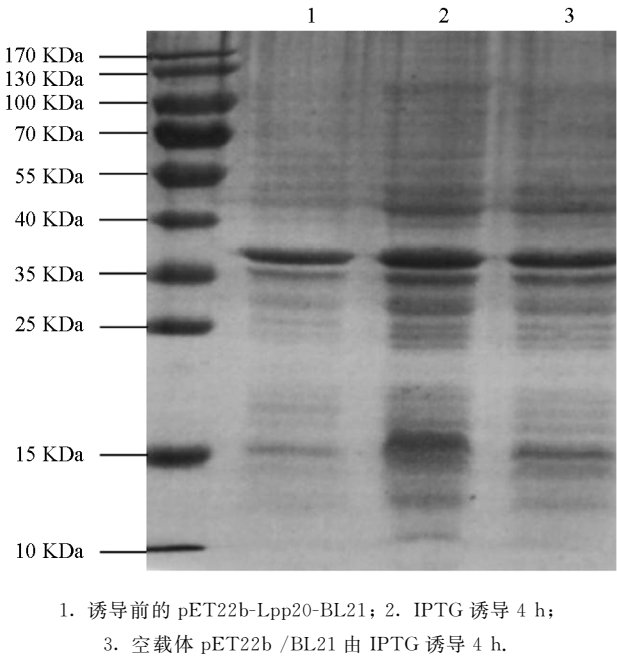
表 1 CSU 组和对照组的血清抗 Hp 抗体 ELISA 标准试剂盒阳性率

分 组	抗 Hp 抗体		合计	阳性率/%
	阳性(+)	阴性(-)		
CSU 组(例)	155	56	211	73.46*
对照组(例)	71	66	137	51.82

注: * vs 对照组, $\chi^2=17.08, p=0.000$.

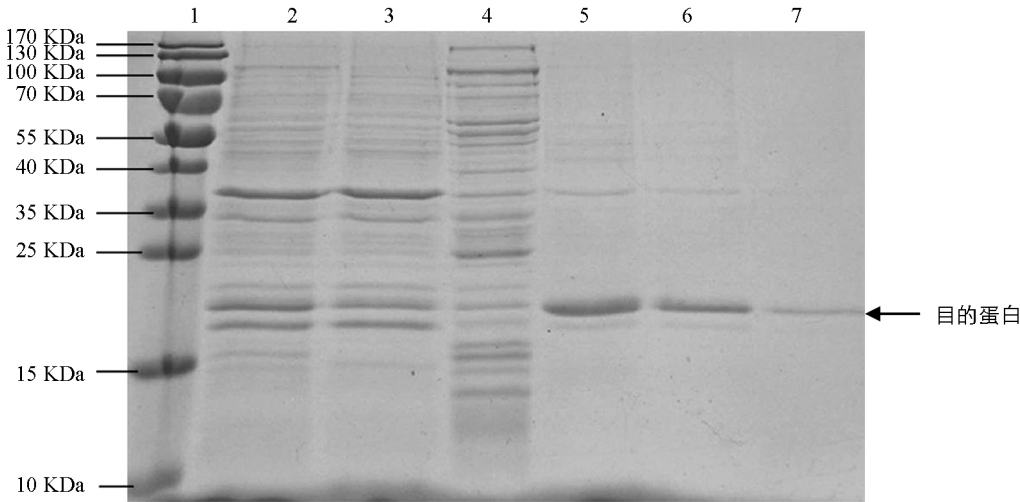
2.2 Lpp20 重组蛋白的表达、纯化和鉴定

将诱导表达的 pET22b-Lpp20-BL21 用 SDS-PAGE 凝胶蛋白电泳进行检测, 诱导 4 h 的工程菌在 20 kDa 附近有新的蛋白表达条带, 目的蛋白表达成功(图 1). 目的蛋白的纯化使用镍离子亲和层析法, 将不同设置参数下的收集液分别用 SDS-PAGE 电泳进行检测, 其中目的蛋白纯度可达 90%, 经分子筛浓缩后 BCA 法测定蛋白质量浓度为 2.2 mg/mL(图 2). 重组蛋白的 N 端测序为 NH2-Met-Lys-Asn-Gln-Val, Fasta 将此序列与蛋白质数据库进行比较, 与预期的 Lpp20 的 N-端蛋白序列一致; 重组 Lpp20 蛋白经增强化学发光法鉴定具有良好的抗原反应性(图略).



1. 诱导前的 pET22b-Lpp20-BL21; 2. IPTG 诱导 4 h;
3. 空载体 pET22b /BL21 由 IPTG 诱导 4 h.

图 1 SDS-PAGE 凝胶电泳检测重组蛋白 Lpp20 的表达



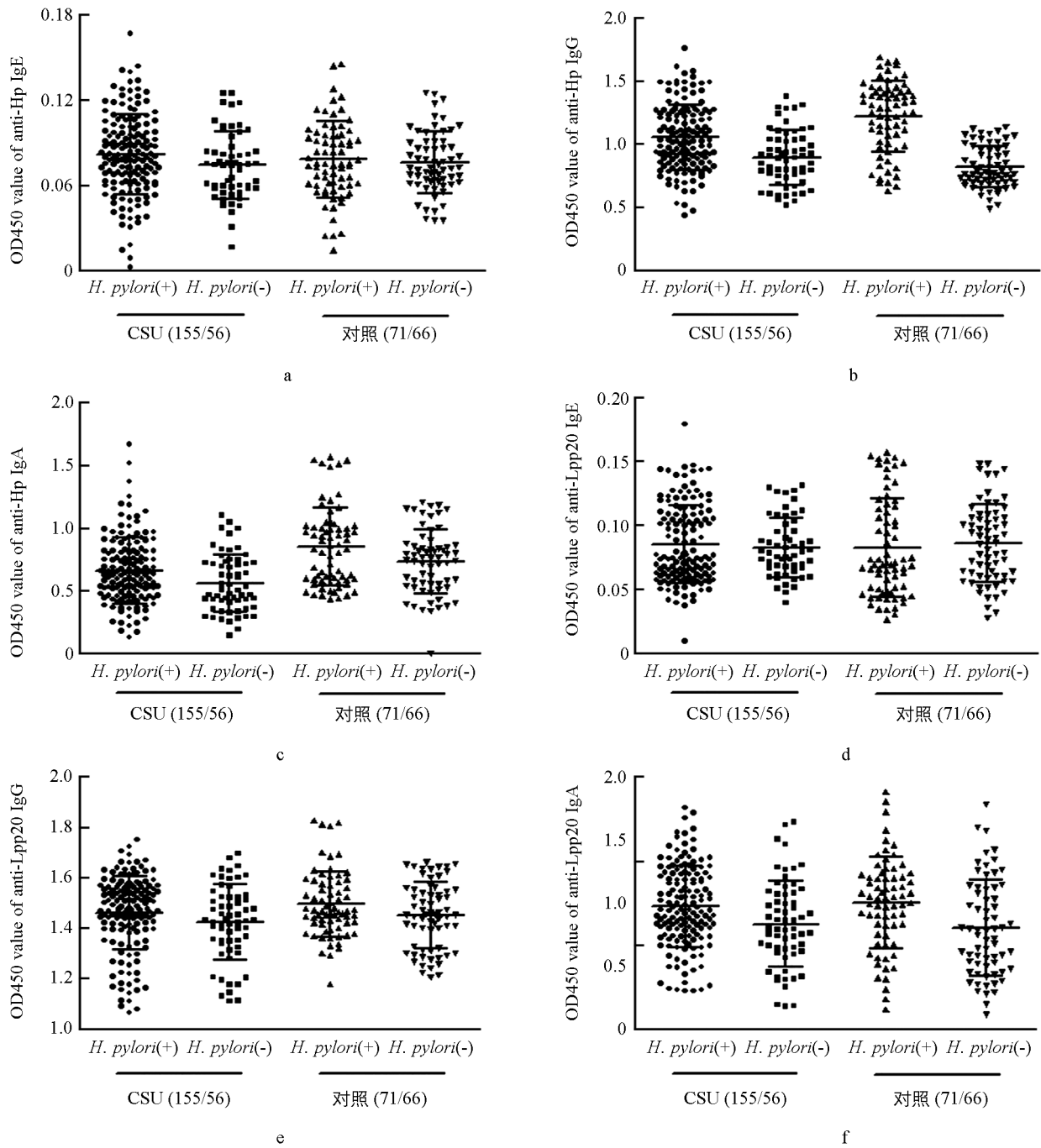
1. Marker; 2-6. 不同条件下的收集管; 7. 目的蛋白.

图 2 SDS-PAGE 凝胶电泳检测重组 Lpp20 蛋白的纯化

2.3 CSU 组及对照组的血清抗 Hp 全菌抗原和抗 Lpp20 的 IgE,IgG 及 IgA 水平

通过 2.1 的结果, 将 CSU 组分为: ①CSU(+)Hp(+)组, 计 155 例, ②CSU(+)Hp(-)组, 计 56 例; 将对照组分为: ③CSU(-)Hp(+)组, 计 71 例, ④CSU(-)Hp(-)组, 计 66 例. 经生物素-亲和素 ELISA 法测定显示, 抗 Hp-及抗 Lpp20-IgE 分别在 ①, ②组间(0.082 ± 0.002 vs $0.074 \pm 0.003, p_1 =$

0.076; 0.085±0.003 vs 0.083±0.003, $p_2=0.622$); ①,③组间(0.082±0.002 vs 0.078±0.003, $p_1=0.382$; 0.085±0.003 vs 0.082±0.005, $p_2=0.597$)比较,差异不具有统计学意义(图 3a、图 3d).



a. ①CSU(+)Hp(+)组抗 Hp 全菌-IgE(0.082±0.002), vs②CSU(+)Hp(-)组(0.074±0.003)、vs③CSU(-)Hp(+)组(0.078±0.003), $t_1=1.785$, $P_1=0.076$, $t_2=0.877$, $P_2=0.382$. b. ①组抗 Hp 全菌-IgG(1.053±0.022), vs②组(0.890±0.028)、vs③组(1.222±0.034), $t_1=4.256$, $P_1=0.000$, $t_2=4.312$, $P_2=0.000$, ③组 vs④CSU(-)Hp(-)组(0.816±0.020), $t_3=10.20$, $P_3=0.000$. c. ①组抗 Hp 全菌-IgA(0.660±0.022), vs②组(0.559±0.030)、vs③组(0.849±0.037), $t_1=2.600$, $P_1=0.01$, $t_2=2.381$, $P_2=0.019$; ③组 vs④组(0.730±0.032), $t_3=4.63$, $P_3=0.000$. d. ①组抗 Lpp20-IgE(0.085±0.003), vs②组(0.083±0.003)、vs③组(0.082±0.005), $t_1=0.494$, $P_1=0.622$, $t_2=0.530$, $P_2=0.597$. e. ①组抗 Lpp20-IgG(1.459±0.012), vs②组(1.422±0.019)、vs③组(1.494±0.016), $t_1=1.631$, $P_1=0.105$, $t_2=1.720$, $P_2=0.087$; ③组 vs④组(1.449±0.016), $t_3=2.017$, $P_3=0.046$. f. ①组抗 Lpp20-IgA(1.229±0.020), vs②组(1.124±0.033)、vs③组(1.251±0.033), $t_1=2.813$, $P_1=0.005$, $t_2=0.602$, $P_2=0.548$; ③组 vs④组(1.098±0.035), $t_3=3.171$, $P_3=0.002$. *H. pylori*: 幽门螺杆菌. 抗体水平用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示.

图 3 CSU 组及对照组血清抗 Hp 全菌-和抗 Lpp20-IgE, IgG, IgA 水平

经间接 ELISA 法测定显示,抗 Hp-IgG 在①,②组间(1.053 ± 0.022 vs 0.890 ± 0.028 , $p=0.000$),③,④组间(1.222 ± 0.034 vs 0.816 ± 0.020 , $p=0.000$)比较,差异具有统计学意义,表明 Hp 感染后,人群中血清抗 Hp 全菌-IgG 水平显著升高;①,③组间(1.053 ± 0.022 vs 1.222 ± 0.034 , $p=0.000$)比较,①组抗体水平明显低于③组,且差异具有统计学意义(图 3b). 抗 Lpp20-IgG 在①,②组间(1.459 ± 0.012 vs 1.422 ± 0.019 , $p=0.10$),①,③组间(1.459 ± 0.012 vs 1.494 ± 0.016 , $p=0.087$)比较,差异不具有统计学意义;但③,④组间(1.494 ± 0.016 vs 1.449 ± 0.016 , $p=0.046$)比较,差异具有统计学意义(图 3e). 经生物素-亲和素 ELISA 法测定显示,抗 Hp-IgA 在①,②组间(0.660 ± 0.02 vs 0.559 ± 0.030 , $p=0.01$),③,④组间(0.849 ± 0.037 vs 0.730 ± 0.032 , $p=0.000$)比较,差异具有统计学意义,表明 Hp 感染后,人群中血清抗 Hp 全菌-IgA 水平显著升高;①,③组间(0.660 ± 0.02 vs 0.849 ± 0.037 , $p=0.019$)比较,①组水平低于③组,且差异具有统计学意义(图 3c). 抗 Lpp20-IgA 在①,②组间(1.229 ± 0.020 vs 1.124 ± 0.033 , $p=0.005$),③,④组间(1.251 ± 0.033 vs 1.098 ± 0.035 , $p=0.002$)比较,差异具有统计学意义,表明 Hp 感染后人群中血清抗 Hp-Lpp20-IgA 水平显著升高;但是①,③组间(1.229 ± 0.020 vs 1.251 ± 0.033 , $p=0.0548$)比较,差异不具有统计学意义(图 3f).

3 讨 论

越来越多的研究揭示了 CSU 发病与 Hp 感染相关^[2-5],在 EAACI 最新发布的荨麻疹诊疗指南中,已将检测 Hp 感染情况纳入 CSU 常规诊疗计划中^[1]. 本研究首先用标准化 Hp-ELISA 试剂盒检测了 CSU 人群和健康对照中 Hp 感染阳性率(包括既往感染和现症感染),数据显示 CSU 人群中 Hp 感染阳性率明显高于健康对照,证明 Hp 感染和 CSU 发病存在密切的相关性(表 1). 荨麻疹发生的关键病理机制是肥大细胞活化、脱颗粒,继而合成和释放炎性介质,而其中最经典的肥大细胞激活途径是 IgE 与其胞膜外的 FcεRI 受体病理性结合, Hizal 等^[6]发现血清抗 Hp IgG 阳性的荨麻疹患者自体血清皮肤试验阳性率(40%)显著高于血清抗 Hp IgG 阴性的荨麻疹患者(14.3%),而自体皮肤血清试验已被广泛用于检测与 CSU 发病密切相关的抗肥大细胞 FcεRI 抗体, Sun 等^[7]也发现抗 Hp 抗体阳性和抗 TGAb 阳性的 CU 患者血清抗 FcεRI 抗体阳性率较对照组显著增高,提示 Hp 感染可能通过诱导产生外周血抗 FcεRI 抗体升高的途径促进荨麻疹发生;但也有些研究表示 Hp 感染和致 CSU 发病的自身抗体的产生无关. 同时,肥大细胞表面仍分布有其它正性调节受体,如循环免疫复合物受体、IgG 受体等,这些受体在特异性体液免疫亢进时和相应的配体结合,也能够引起细胞活化,促进后继炎症反应^[1]. 感染 Hp 后的长期带菌状态可使宿主产生持续性体液免疫,导致感染局部粘膜和循环抗 Hp 抗体水平增加,包括 IgG, IgA 和 IgE 等,虽然这些抗体对于清除 Hp 定植作用甚微,却可能在其他病理机制中发挥作用. 如已有研究揭示,在伴随 Hp 感染的 CU 病例中,血清抗 Hp-IgG, IgA 水平显著高于伴随 Hp 感染的非 CU 对照. Bakos 等^[13]的研究也发现,在伴随 Hp 感染的 CU 受试组中,存在高滴度血清抗 Hp-Lpp20-IgG 及 IgA, 这些研究都提示 Hp 感染介导的体液免疫可能在某些 CU 发病中发挥了重要作用. 但既往相关研究纳入的样本量极少,迄今未见关于大样本 CSU 中 Hp 全菌及 Lpp20 血清特异性抗体的调研分析,因此本研究就 CSU 患者和健康对照中抗 Hp 全菌和其 Lpp20 血清特异性的 IgE, IgG 和 IgA 水平进行调研,以期揭示 Hp 引起的体液免疫在 CSU 发病中所扮演的角色.

本研究通过对受试血清样本细菌特异性 IgE 进行检测发现,在各受试组中(CSU(+))Hp(+))组、CSU(-))Hp(+))组、CSU(+))Hp(-))组、CSU(-))Hp(-))组),血清特异性抗 Hp 全菌-和 Lpp20-IgE 抗体均处于差异不具有统计学意义的低值水平(组间比较 p 均大于 0.05)(图 3a、图 3d),表明 Hp 感染不能有效激发机体的 IgE 型体液免疫,且所产生的低水平细菌特异性 IgE 与 CSU 发病无相关性. 通过检测受试血清中细菌特异性 IgG 发现,不论在 CSU 组还是对照组,感染 Hp 后均能引起外周循环中抗 Hp 全菌-IgG 显著升高($p<0.05$),但 CSU(+))Hp(+))组中抗 Hp 全菌-IgG 水平显著低于 CSU(-))Hp(+))组($p<0.001$, 图 3b),揭示在 CSU 人群中, Hp 感染后激发 IgG 型体液免疫的强度远远小于无 CSU 人群,我们因此推测

虽然感染 Hp 可诱导宿主产生高水平特异性的 IgG 抗体,但是这种体液免疫效应并不是促进 CSU 发病的重要病理机制。同样的,不论在 CSU 组还是对照组中,感染 Hp 后血清中抗 Lpp20-IgG 水平均升高,但这种升高趋势只在 CSU(-)Hp(+)组中差异具有统计学意义,并且 CSU(+)Hp(+)组血清抗 Lpp20-IgG 水平也低于 CSU(-)Hp(+)组,但两组间差异不具有统计学意义(图 3e),因此我们认为 Hp 感染可以通过其 Lpp20 蛋白诱导宿主产生较高水平的血清特异性 IgG,虽然 Lpp20 是 Hp 中具备良好免疫原性的成分蛋白,但它却不是 Hp 感染致 CSU 发病的重要病因。通过检测受试血清细菌特异性 IgA 发现,不论在 CSU 组或对照组,感染 Hp 后都会引起血清抗 Hp 全菌-和抗 Lpp20-IgA 显著升高($p < 0.05$),且 CSU(+)Hp(+)组中血清特异性抗 Hp 全菌-IgA 水平显著低于 CSU(-)Hp(+)组($p < 0.05$),而这两组间的抗 Lpp20-IgA 水平差异不具有统计学意义(图 3c、图 3f)。我们推测,虽然感染 Hp 可激发宿主产生血清高水平特异性 IgA,而 Hp-Lpp20 又是参与此反应的具备良好免疫原性的成分,但是这种 IgA 型体液免疫反应并非 Hp 感染相关性 CSU 的主要致病机制。至于 CSU(+)Hp(+)组中抗 Hp 全菌-IgG, IgA 水平较 CSU(-)Hp(+)组更低($p < 0.05$),我们推测是由于部分病例 Hp 感染后更向 Th1 型免疫反应偏移^[15],表现为血清抗体水平低,而胃肠道粘膜细胞免疫增强使粘膜损伤更严重,细菌或其代谢产物可直接接触胃肠道固有层肥大细胞,进一步使其活化而诱发包括荨麻疹在内的炎症反应;或者也可能是 CSU 宿主在荨麻疹炎症状态和 Hp 感染定植的相互作用下,能够通过某些机制削弱 Hp 介导的体液免疫反应。已有研究表明, CU 患者血清 sIL-2R 水平与类胰蛋白酶水平显著相关,提示 CU 患者 T 细胞活化与肥大细胞脱颗粒成正比, CU 患者具有更亢进的外周血 T 细胞活性^[16]。

我们有理由推断,虽然感染 Hp 可以导致宿主产生高水平的血清特异性 IgG, IgA, 并且 Hp-Lpp20 因具备良好的免疫原性;也在 Hp 感染触发的体液免疫中占有重要权重,但在与 Hp 感染相关的 CSU 病程中, Hp 细菌特异性抗体的产生并不是主要致病机制,也即 Hp 并不是通过诱发体液免疫促进 CSU 发病。我们认为,机体感染 Hp 后存在除体液免疫外的其他一些途径促进肥大细胞活化参与 CSU 发病。已经有一些研究表明,某些 Hp 蛋白如 VacA 和 NAP, 可通过引起肥大细胞的胞内钙振荡或 G 蛋白介导的 MAPK, PI3K/Akt 信号通路活化的方式直接激活肥大细胞^[17-18], 提示 Hp 感染后极有可能通过直接作用的方式活化粘膜固有层肥大细胞,促进 CSU 发病。我们的研究成果也更加全面地对 Hp 这种直接活化肥大细胞的方式做了补充^[19]。

本研究揭示了 Hp 感染和 CSU 发病的相关性,首次在大样本的 CSU 病例中调研了血清特异性抗 Hp 全菌-及 Lpp20-IgE, IgG, IgA 水平,论证了 Hp 血清特异性抗体并非 Hp 感染相关性 CSU 的病因。虽然我们的研究并未完全揭示 Hp 感染致 CSU 的发病机制,但却给相关研究提供了新的思路,避免了某些研究资源的浪费。

参考文献:

- [1] ZUBERBIER T, ABERER W, ASERO R, et al. The EAACI/GA2LEN/EDF/WAO Guideline for the Definition, Classification, Diagnosis, and Management of Urticaria; The 2013 Revision and Update [J]. Allergy, 2014, 69(7): 868-887.
- [2] ABDOU A G, ELSHAYEB E I, FARAG A G A, et al. Helicobacter Pylori Infection in Patients with Chronic Urticaria: Correlation with Pathologic Findings in Gastric Biopsies [J]. International Journal of Dermatology, 2009, 48(5): 464-469.
- [3] AKASHI R, ISHIGURO N, SHIMIZU S, et al. Clinical Study of the Relationship between Helicobacter Pylori and Chronic Urticaria and Prurigo Chronica Multiformis: Effectiveness of Eradication Therapy for Helicobacter Pylori [J]. The Journal of Dermatology, 2011, 38(8): 761-766.
- [4] YOSHIMASU T, FURUKAWA F. Eradication Therapy for Urticaria with High Titers of Anti *H. Pylori* IgG Antibody [J]. Allergology International, 2014, 63(1): 37-40.
- [5] GU H Y, LI L, GU M, et al. Association Between Helicobacter Pylori Infection and Chronic Urticaria: a Meta-Analysis [J].

- Gastroenterology Research and Practice, 2015, 2015: 486974.
- [6] HIZAL M, TÜZÜN B, WOLF R, et al. The Relationship between Helicobacter Pylori IgG Antibody and Autologous Serum Test in Chronic Urticaria [J]. International Journal of Dermatology, 2000, 39(6): 443-445.
- [7] SUN L W, KANG E X, LI J, et al. Correlations between Anti-Mast Cell Autoantibodies and Chronic Idiopathic Urticaria [J]. Annals of Dermatology, 2014, 26(2): 145-149.
- [8] ATTA A M, RODRIGUES M Z A, SOUSA C P, et al. Autoantibody Production in Chronic Idiopathic Urticaria is not Associated with Helicobacter Pylori Infection [J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2004, 37(1): 13-17.
- [9] ACUÑA M T C, LÓPEZ GARCÍA A I, MARTÍNEZ D P, et al. Frequency of Helicobacter Pylori Infection in Patients with Chronic Urticaria of Puebla University Hospital [J]. Revista Alergia Mexico, 2006, 53(5): 174-178.
- [10] GALADARI I H, SHERIFF M O. The Role of Helicobacter Pylori in Urticaria and Atopic Dermatitis [J]. Skinmed, 2006, 5(4): 172-176.
- [11] ROSTAMY M M. Prevalence of the Helicobacter Pylori Infection in Chronic Urticaria [J]. Journal of Pakistan Association of Dermatologists, 2010, 20(3): 142-145.
- [12] LIUTU M, KALIMO K, UKSILA J, et al. Extraction of IgE-Binding Components of Helicobacter Pylori by Immunoblotting Analysis in Chronic Urticaria Patients [J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2001, 126(3): 213-217.
- [13] BAKOS N, FEKETE B, PROHÁSZKA Z, et al. High Prevalence of IgG and IgA Antibodies to 19-kDa Helicobacter Pylori-Associated Lipoprotein in Chronic Urticaria [J]. Allergy, 2003, 58(7): 663-667.
- [14] 张卫军, 邹全明, 毛旭虎, 等. 幽门螺杆菌疫苗候选抗原 lpp20 基因的克隆表达及其纯化研究 [J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(14): 1499-1501.
- [15] KUSTERS J G, VAN VLIET A H M, KUIPERS E J. Pathogenesis of Helicobacter Pylori Infection [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2006, 19(3): 449-490.
- [16] HIDVÉGI B, NAGY E, SZABÓ T, et al. Correlation between T-Cell and Mast Cell Activity in Patients with Chronic Urticaria [J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2003, 132(2): 177-182.
- [17] DE BERNARD M, CAPPON A, PANCOTTO L, et al. The Helicobacter Pylori VacA Cytotoxin Activates RBL-2H3 Cells by Inducing Cytosolic Calcium Oscillations [J]. Cellular Microbiology, 2005, 7(2): 191-198.
- [18] TSAI C C, KUO T Y, HONG Z W, et al. Helicobacter pylori neutrophil-activating protein induces release of histamine and interleukin-6 through G protein-mediated MAPKs and PI3K/Akt pathways in HMC-1 cells [J]. Virulence, 2015, 6(8): 755-765.
- [19] TAN R J, SUN H Q, ZHANG W, et al. A 21-35 kDa Mixed Protein Component from Helicobacter Pylori Activates Mast Cells Effectively in Chronic Spontaneous Urticaria [J]. Helicobacter, 2016, 21(6): 565-574.

责任编辑 夏 娟