[19]中华人民共和国专利局　　[11] 公开号 CN 1121311A

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号　94191793.2

[51]Int.Cl[6]
A61K 31/70

[43]公开日　1996 年 4 月 24 日

[22]申请日　94.2.25
[30]优先权
[32]93.2.26 [33]DK[31]0222/93
[32]93.6.25 [33]DK[31]0760/93
[86]国际申请　PCT/IB94/00023　94.2.25
[87]国际公布　WO94/18986　英　94.9.1
[85]进入国家阶段日期　95.10.16
[71]申请人　扬·施塔芬·诺马克
地址　瑞典斯德哥尔摩
共同申请人　佩·法尔克
托马斯·波伦
[72]发明人　扬·施塔芬·诺马克　佩·法尔克
托马斯·波伦
[74]专利代理机构　中国专利代理(香港)有限公司
代理人　谭明胜　姜建成

权利要求书 6 页 说明书 41 页 附图页数 7 页

[54]发明名称　应用低聚糖苷作为细菌粘连的抑制剂

[57]摘要

幽门螺旋菌作为致病因子与许多病理疾病有牵连，包括急性（B 型）胃炎、胃溃疡和十二指肠溃疡、胃腺癌和胃淋巴瘤。本发明涉及含有至少一个末端 L-岩藻糖单元的二-或低聚糖苷在制备用于治疗或预防由人胃粘膜中幽门螺旋菌感染引起的人的多种疾病的药用组合物中的应用，此外还涉及应用所述二-或低聚糖苷治疗上述疾病的方法，该方法包括给需要该治疗的患者使用有效剂量的含有至少一个末端 L-岩藻糖单元的二-或低聚糖苷。

权 利 要 求 书

1. 含有至少一个末端L－岩藻糖单元的二－或低聚糖苷在制备用于治疗或预防与人胃粘膜幽门螺旋菌感染有关的人的疾病的药用组合物中的应用。

2. 权利要求1所述的应用，其中所述糖苷能够结合存在于幽门螺旋菌表面的细菌细胞表面配基(adhesins)。

3. 权利要求1或2所述的应用，其中含有至少一个末端L－岩藻糖单元的二－或低聚糖苷能够抑制或明显地减少幽门螺旋菌细胞与人胃粘膜组织切片的上皮细胞的粘连。

4. 权利要求1～3中任何一项所述的应用，其中含有至少一个末端L－岩藻糖单元的二－或低聚糖苷能够抑制幽门螺旋菌细胞的粘连，与相应的非－预培育的细菌细胞的粘连相比，所述细菌细胞与浓度最高至500μg/ml的上述糖苷一起进行预培育，能够至少50%地抑制上述幽门螺旋菌与人胃粘膜组织切片上皮细胞的粘连。

5. 权利要求3或4中任何一项所述的应用，其中人胃粘膜组织切片制备如下：用福尔马林固定非－病变的人胃粘膜组织标本，嵌入标本于石蜡中，得到约5μm嵌入标本的切片，将该切片置于载玻片上，用二甲苯和异丙醇洗涤，使切片脱去石蜡，切片与缓冲液一起培育，所述缓冲液为磷酸盐缓冲的盐水，其中含有牛血清白蛋白和非离子型表面活性剂聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯，其浓度分别为约0.2%和0.05%。

6. 权利要求3～5中任何一项所述的应用，其中幽门螺旋菌

细胞被标记，优选荧光染料标记，尤其选用异硫氰酸酯荧光素标记。

7. 权利要求 6 所述的应用，其中细菌细胞按下法标记：将细菌细胞在缓冲液（含有氯化钠和碳酸钠，优选浓度分别为约 0.15M 和 0.1M, pH 约 9.0）中的混悬液用异硫氰酸酯荧光素（浓度约 0.1mg/ml）处理，于室温培育 1 小时，通过离心分出细菌细胞，接着用含有非离子型表面活性剂聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯（优选浓度为约 0.05%）的磷酸盐缓冲的盐水洗涤细菌细胞。

8. 权利要求 4－7 中任何一项所述的应用，其中细菌细胞与所述糖苷一起预培育是如下进行的：将浓度最高至 500μg/ml 的所述糖苷加到细菌细胞缓冲液的混悬液中，并优选于室温下预培育约 2 小时，所述缓冲液为磷酸盐缓冲的盐水，其中含有牛血清白蛋白和非离子型表面活性剂聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯（优选浓度分别为约 0.2%和 0.05%），通过离心分出细胞，并用相同缓冲液洗涤细菌细胞。

9. 权利要求 4－8 中任何一项所述的应用，其中预培育或非预培育的细菌细胞的粘连用下法测定：将稀释的含有约 10^6～10^8 细菌细胞/ml 的细菌细胞混悬液加到组织切片中，于室温和调湿室中将所述切片与细菌细胞混悬液一起培育 1 小时，以磷酸盐缓冲的盐水洗涤载玻片，并确定切片上皮细胞的粘连程度。

10. 权利要求 9 所述的应用，其中所应用的细菌细胞按权利要求 7 所述方法制备，而与切片上皮细胞粘连的程度是在荧光显微镜下用视察法确定。

11. 权利要求 1－10 中任何一项所述的应用，其中所应用的

细菌细胞系选自幽门螺旋菌 NCTC 11637 菌株、NCTC 11638菌株、WV 229 菌株和 P466 菌株。

12. 权利要求 1－11 中任何一项所述的应用，其中与由幽门螺旋菌所引起的胃肠感染有关的疾病包括慢性活动性 (B 型) 胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、胃腺癌和胃淋巴瘤。

13. 权利要求 1－12 中任何一项所述的应用，其中二－或低聚糖苷为糖蛋白。

14. 权利要求 1－13 中任何一项所述的应用，其中所述糖蛋白系选自人 K－酪蛋白、人初乳 IgA 和牛颌下腺粘蛋白。

15. 权利要求 1－13 中任何一项所述的应用，其中所述低聚糖苷具有二个末端 L－岩藻糖单元。

16. 权利要求 15 所述的应用，其中低聚糖苷糖链的非还原端上末端四糖为路易斯 b－四糖，Fucα1－2Galβ1－3(Fucα1－4)G1cNAcβ1－。

17. 一种治疗和/或预防由人胃粘膜幽门螺旋菌感染所引起的人的疾病的方法，所述方法包括给需要医治的患者使用有效量的含有至少一个末端 L－岩藻糖单元的二－或低聚糖苷。

18. 权利要求 17 所述的方法，其中含有至少一个末端 L－岩藻糖单元的二－或低聚糖苷能够结合存在于幽门螺旋菌表面的细菌细胞表面配基。

19. 权利要求 17 或 18 所述的方法，其中含有至少一个末端 L－岩藻糖单元的二－或低聚糖苷能够抑制或明显地减少幽门螺旋菌细胞与人胃粘膜组织切片的上皮细胞的粘连。

20. 权利要求 17－19 中任何一项所述的方法，其中含有至少

一个末端L－岩藻糖单元的二－或低聚糖苷能够抑制幽门螺旋菌细胞的粘连，与相应的非－预培育的细菌细胞的粘连相比，所述细菌细胞与浓度最高至500μg/ml的上述糖苷一起进行预培育，能够至少50%地抑制上述幽门螺旋菌与人胃粘膜组织切片上皮细胞的粘连。

21. 权利要求19或20中任何一项所述的方法，其中胃粘膜组织切片制备如下：用福尔马林固定非病变的人胃粘膜组织标本，嵌入标本于石蜡中，得到约5μm嵌入标本的切片，将该切片置于载玻片上，用二甲苯和异丙醇洗涤使切片脱去石蜡，切片与缓冲液一起培育，所述缓冲液为磷酸盐缓冲的盐水，其中含有牛血清白蛋白和非离子型表面活性剂聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯，其浓度分别为约0.2%和0.05%。

22. 权利要求19－21中任何一项所述的方法，其中幽门螺旋菌细胞被标记，优选荧光染料标记，尤其选用异硫氰酸酯荧光素标记。

23. 权利要求22所述的方法，其中细菌细胞按下法标记：将细菌细胞在缓冲液（含有氯化钠和碳酸钠，优选浓度分别为约0.15M和0.1M，pH约9.0）中的混悬液用异硫氰酸酯荧光素（浓度约0.1mg/ml）处理，于室温培育1小时，通过离心分出细菌细胞，接着用含有非离子型表面活性剂聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯（优选浓度为约0.05%）的磷酸盐缓冲的盐水洗涤细菌细胞。

24. 权利要求20－23中任何一项所述的方法，其中细菌细胞与所述糖苷一起预培育是如下进行的：将浓度最高至500μg/ml的所述糖苷加到细菌细胞缓冲液的混悬液中，并于室温下预培育

约 2 小时，所述缓冲液为磷酸盐缓冲的盐水，其中含有牛血清白蛋白和非离子型表面活性剂聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯（优选浓度分别为约 0.2% 和 0.05%），通过离心分出细菌细胞，并用相同缓冲液洗涤细菌细胞。

25. 权利要求 20－24 中任何一项所述的方法，其中预培育或非预培育的细菌细胞的粘连用下法测定：将稀释的含有约 10^6～10^8 细菌细胞/ml 的细菌细胞混悬液加到组织切片中，于室温和调湿室中将所述切片与细菌细胞混悬液一起培育 1 小时，以磷酸盐缓冲的盐水洗涤载玻片，并确定切片上皮细胞的粘连程度。

26. 权利要求 25 所述的方法，其中应用的细菌细胞按权利要求 23 所述方法制备，而与切片上皮组织粘连的程度是在荧光显微镜下用视察法确定。

27. 权利要求 17－26 中任何一项所述的方法，其中应用的细菌细胞系选自幽门螺旋菌 NCTC 11637 菌株、NCTC 11638 菌株、WV 229 菌株和 P466 菌株。

28. 权利要求 17－27 中任何一项所述的方法，其中与由幽门螺旋菌引起的胃肠感染有关的疾病包括慢性活动性（B 型）胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、胃腺癌和胃淋巴瘤。

29. 权利要求 17－28 中任何一项所述的方法，其中二－或低聚糖苷为糖蛋白。

30. 权利要求 17－29 中任何一项所述的方法，其中所述糖蛋白系选自人 K－酪蛋白、人初乳 IgA 和牛颌下腺粘蛋白。

31. 权利要求 17－29 中任何一项所述的方法，其中所述低聚糖苷具有二个末端 L－岩藻糖单元。

32. 权利要求31所述的方法，其中低聚糖苷糖链的非还原端上末端四糖为路易斯b－四糖，Fucα1－2Galβ1－3(Fucα1－4)G1cNAcβ1－。

说　明　书

应用低聚糖苷作为细菌粘连的抑制剂

本发明所属技术领域

本发明涉及含有至少一个末端L－岩藻糖单元的二－或低聚糖苷在制备用于治疗或预防与人胃粘膜中幽门螺旋菌感染有关的人的多种疾病的药用组合物中的应用，此外还涉及应用所述二－或低聚糖苷治疗上述疾病的方法。

本发明的背景

幽门螺旋菌是微量需氧的螺旋状细菌（原来确定为弯曲杆菌属），它在胃中被发现，并且一般看来似乎在人的胃肠粘膜中是其唯一的生境。据估计，当人的年龄达到60岁时，60%以上的成人胃粘膜会感染幽门螺旋菌。此外，幽门螺旋菌作为致病因子与许多病理疾病有牵连，包括急性（B型）胃炎、胃和十二指肠溃疡以及胃腺癌。

细菌的组织向性部分地由细菌株在其特定生境中调节局部化学环境的能力所决定。此外，为了防止从该新的生境移动，粘连是移地发育必需的先决条件，例如通过在胃肠道中蠕动。在哺乳动物中，细菌粘连到蛋白质或糖共轭体（糖鞘脂类、糖蛋白）上，或上皮细胞表面（粘膜）附近以及许多特定细菌的细菌细胞表面配基－蛋白质和细菌细胞表面配基－糖相互作用在文献中已有叙述。

关于幽门螺旋菌在模型系统（例如小鼠肾上腺Y－1细胞）中

的研究，D. G. Evans， D. J. Jr. Evans， 和 D. Y. Graham (1989) (Infect. Immun. 57, 2272－2278) 提出了与表面有关的弯曲微丝结构，该结构使得该细菌具有细菌细胞表面配基或移地发育因子抗原的功能，以便作为引起幽门螺旋菌与含有细胞唾液酸的糖蛋白受体结合的媒介。

本发明的概要

通过对幽门螺旋菌和人胃粘膜上皮细胞之间相互作用的研究，现在人们惊奇地发现，第一，幽门螺旋菌只是与由胃单元组成的含腺上皮中的某些分化的上皮细胞粘连或结合。在含腺上皮中的胃单元与已分化的细胞一起排成行列，以实施各种功能。因此，胃单元的上部凹区域（胃小凹）与粘膜产生的表面上皮细胞一起排成行列，而胃单元缩窄的中央部分（胃峡）是由增殖的和非增殖的发育未全的细胞、粘液颈细胞和壁细胞组成，胃单元的较低部分（腺体）可以含有产生固有因子和胃蛋白酶原的主要细胞、产生酸的壁细胞、粘液颈细胞和腺细胞，以及各种类型肠内分泌细胞。本研究已经表明，幽门螺旋菌只与上部胃小凹中产生粘液的表面上皮细胞（即表面粘液细胞）结合。

第二，本研究表明，幽门螺旋菌与产生粘液的表面上皮细胞的结合不涉及在细菌的细胞表面配基 (adhesins) 和含有唾液酸的受体之间的相互作用，但是涉及与含有 L－岩藻糖（也称为 6－脱氧－L－半乳糖）末端单元的糖结构之间的相互作用。

因此，一方面，本发明涉及含有至少一个末端 L－岩藻糖单元的二－或低聚糖苷在制备用于治疗或预防与人胃粘膜中幽门螺旋菌感染有关的人的多种疾病的药物组合物中的应用。本发明

也涉及治疗和/或预防由幽门螺旋菌感染引起人的多种疾病的方法，该方法是给需要治疗的患者使用有效剂量的含有至少一个末端L－岩藻糖单元的二－或低聚糖苷。

本发明的详细说明

在本发明的上下文中，术语“末端L－岩藻糖单元”是意指通过1－位连结的、本身未被其他糖单元或基团糖基化的所述一个或多个L－岩藻糖单元。但是，这不排除由L－岩藻糖单元糖基化的糖单元本身被其他糖单元或基团糖基化。

在本发明的上下文中，术语“低聚糖”是意指糖苷的糖部分含有3个或更多个糖单元，例如3－10个糖单元。

按照本发明，具有至少一个末端L－岩藻糖单元的二－或低聚糖苷是较优选的，它们可以与存在于幽门螺旋菌表面的细菌细胞表面配基结合。

目前，测定含有至少一个末端L－岩藻糖单元的二－或低聚糖苷抑制幽门螺旋菌与胃上皮细胞结合能力的最有用的模型系统，是涉及应用含有胃上皮的人胃组织的组织切片的体外组织学模型。

因此，本发明的用途或本发明方法的较好具体实施方案是：其中含有末端L－岩藻糖单元的二－或低聚糖苷能够抑制或明显地减少幽门螺旋菌细胞与人胃粘膜组织切片中上皮细胞的粘连。

更好的是，当将幽门螺旋菌细胞与浓度最高到500μm/ml的二－或低聚糖苷一起进行预培育时，与相应的非－预培育的细菌细胞的粘连相比，用于本发明用途或方法中的二－或低聚糖苷

能够至少50%地抑制上述细菌细胞与人胃粘膜组织切片的上皮细胞的粘连。

在目前较好的组织模型系统中，人胃粘膜的组织切片是用下述方法制备的：用福尔马林固定非－病变的人胃粘膜组织标本，将标本嵌入石蜡中，得到嵌入了标本的约5μm切片，将该切片置于载玻片上，用二甲苯和异丙醇洗涤脱去切片上的石蜡，切片与缓冲液一起培育，该缓冲液为磷酸盐缓冲的盐水，其中含有牛血清白蛋白和非离子型表面活性剂聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯(如吐温－20)，优选浓度分别为0.2%和0.05%，参见实施例。

为了测定幽门螺旋菌细胞与胃粘膜切片粘连的程度，以某种方式将所述细菌细胞标记是有利的，以便在切片的具体位置上能检出该细菌细胞。所述标记方法相信可以按照标记活的细菌细胞或标记固定在显微镜标本上细菌细胞的任一已知方法进行，例如用染料(如用对革兰氏阴性细菌染色的染料)染色，接着用显微镜检查；用放射性同位素或含有同位素的化合物进行标记，接着用微观自动放射显像术检查；用标记的(酶标记，放射性标记等)抗体识别的幽门螺旋菌进行处理(在与上皮细胞粘连之前或之后)，然后用第二抗体酶共轭体或ELISA类型检查或用微观自动放射显像术检查或显影粘连的抗体。

然而，当前优选的标记方法是荧光标记法，尤其是用异硫氰酸酯(isothiocyanate)荧光素进行标记。该法可以有利地按下述方法进行：将幽门螺旋菌细胞在缓冲液(含有氯化钠和碳酸钠，优选浓度分别为约0.15M和0.1M，pH约9.0)中的混悬液用浓度约0.1mg/ml异硫氰酸酯荧光素处理，在室温下培育细菌细胞混悬

液 1 小时，离心分出细菌细胞，接着用含有非离子型表面活性剂聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯（优选浓度为约 0.05%）的磷酸盐缓冲的盐水(pH约 7.5)洗涤所述细菌细胞。

为了测定具有至少一个末端 L－岩藻糖单元的二－或低聚糖苷抑制幽门螺旋菌与人的胃肠道上皮细胞粘连的能力，在使该细菌与组织切片进行接触之前，通常将该细菌与所述糖苷一起进行预培育，以便使该细菌粘连到上皮细胞的表面。预培育细菌细胞的一个常用的方法是：将浓度最高到500μg/ml 的二－或低聚糖苷加到细菌细胞有缓冲液的混悬液中，并于室温下一起预培育 2 小时，所述缓冲液为磷酸盐缓冲的盐水(pH约 7.5)，其中含有牛血清白蛋白和非离子型表面活性剂聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯，优选浓度分别约为 0.2%和 0.05%，然后经离心分离细菌细胞，并用相同缓冲液洗涤该细胞。

如果测定幽门螺旋菌的细胞（不论是否预培育，不论是否标记）与人胃肠粘膜中上皮细胞粘连的能力，通常是将稀释的幽门螺旋菌细胞混悬液（含有约 10^6～10^8细菌细胞/ml）加到组织切片中，于室温和调湿室中将所述切片与细菌细胞混悬液一起培育 1 小时，以磷酸盐缓冲的盐水洗涤载玻片，并确定切片的上皮细胞粘连的程度。在具体实施例中，如果所述细菌为荧光（例如异硫氰酸酯荧光素）标记的，那么通过在荧光显微镜下研究切片，可以典型和方便地确定粘连的程度，并且可以从附着到切片上皮表面细胞的荧光细菌的数目评定粘连的程度。参见实施例，尤其是下面附图说明。

粘连试验可以用幽门螺旋菌株 NCTC 11637、NCTC 11638、

WV 229 或 P466 进行(参见下面的实施例)。

应用本发明制备的药用组合物以及本发明的方法可以治疗或预防与由幽门螺旋菌引起的胃肠感染有关的疾病，包括例如慢性活动性 (B 型) 胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、胃腺癌和胃淋巴瘤。

在优选的实施方案中，如以上所述，低聚糖含有 2 个末端岩藻糖单元。

在优选的实施方案中，所用二－或低聚糖苷是糖蛋白。所用化合物的重要实例是人 K－酪蛋白、人初乳 IgA 以及牛颌下腺粘蛋白。

在进一步优选的实施方案中，在低聚糖链的非－还原端上的末端四糖为路易斯 b－四糖，即 Fucα1－2Galβ1－3(Fucα1－4)G1cNAcβ1－。

在药用组合物中，可以含有任一合适量的二－或低聚糖苷，通常含有组合物总重量的 0.01～99%，或 0.1～99%。

含有上述活性成分的药用组合物可以配制成制剂，以提供在上述范围内的剂量，或者为单剂量单位形式或者为多倍剂量单位形式。

本发明所用活性二－或低聚糖苷以及含有该糖苷的组合物一般可以给患者使用的剂量为每天约 1mg～50g，最好为每天约 10mg～5g 活性糖苷成分。

二－或低聚糖苷的剂量通常取决于所选择的给药途径、需治疗的具体疾病和其严重程度，是治疗还是预防该疾病，以及需医治的人的年龄和体重。

本发明的药用组合物最好是口服、非经胃肠道给药或直肠给药。

通过下面非限制性实施例进一步详细叙述本发明。

实施例 1

生物学实验

材料和方法

从人乳中纯化 K－酪蛋白

人乳一直冰冻保存在－20℃。实验前将此人乳解冻，并通过在转速15000×g 下离心 45 分钟，得到脱脂乳。小心地除去离心管表面的脂肪层，而将其可溶性部分和沉淀凝块混匀。然后将此混合液用 HCl 酸化至 pH 4.3，再加入 $CaCl_2$，使 $CaCl_2$的浓度达到 60mM。接着在室温下培育 1 小时，然后再在转速 18000×g 下离心 90 分钟，并收集沉淀的酪蛋白部分。

将收集的酪蛋白部分，在 pH 9.5 下溶解于 20mM 的乙醇胺和 6M 的尿素中。将此水溶液用 4 倍体积的己烷抽提 3 次，以除去全部残存的脂肪。然后将水相对蒸馏水进行透析并冷冻干燥。将冷冻干燥的蛋白质在 pH 7.0 下溶解于 50mM 咪唑－HCl，0.5% SDS，0.5%2－巯基乙醇中，然后在 Sephadex G－200 层析柱 (1.6×120cm，Pharmacia－LKB，Uppsala，Sweden) 上作柱层析处理，在温度为 37℃，pH 7.0 下，以 50mM 咪唑－HCl，0.5% SDS，0.5%2－巯基乙醇进行平衡，含 K－酪蛋白的组分可用 Schiff 染色法鉴定，将收集的含 K－酪蛋白组分混合，对 40% 甲醇蒸馏水溶液透析 3 小时，然后进行冷冻干燥，以便进一步减少体积。将此蛋白质在 pH 7.0 下再次溶解于 50mM咪唑－HCl，0.5%

SDS, 0.5%2－巯基乙醇中，并再次在 Sephadex G－200 层析柱上，以如上同样的条件进行柱层析。收集完全没有 β－酪蛋白的含人 K－酪蛋白的组分，对 40% 甲醇进行透析，并冷冻干燥。

牛成熟乳 K－酪蛋白和初乳 K－酪蛋白的纯化

分娩后 24 小时内采集的牛成熟乳和初乳是从 Agrisera AB (Tvärabäck, Sweden) 获得。先对二种乳分别作脱脂处理，然后按如上在纯化人乳中所述的方法，分别制得酪蛋白部分，所不同的是不必再用己烷进行脱脂处理。将酪蛋白沉淀块在 pH 7.0 下溶解于 10mM 咪唑－HCl，3.3M 尿素，10mM 2－巯基乙醇后，用 Q－Sepharose 柱 (2.6×15cm, Pharmacia LKB, Sweden) 作柱层析处理。洗柱后，用 0.1－0.5M NaCl 的与上述相同的缓冲液的线性梯度液进行洗脱。将含有牛 K－酪蛋白的组分对水进行透析后，冷冻干燥。并用凝乳酶断开法对牛酪蛋白作定性鉴定。

幽门螺旋菌原位粘连作用测定

多种成年人的非病变组织标本，如食道、胃、十二指肠、结肠、肾、子宫颈、子宫内膜和中脑等，均从华盛顿大学病理系的外科病理和尸检档案中获得。选用 250 克的 Sprague－Dawleg 大白鼠和 6－12 周龄的 FVB/N 小白鼠，用颈部脱位法处死后，取出胃肠道，并按下列文献中所述的方法作局部性解剖 (Sweetser, D. A., Birken－meier , E. H., Hoppe, P. C., Mckeel, D. W., and Gordon , J. I., Genes Devel. 2 (1988), 1318－1332。成年犬胃从 St. Louis 大学医学中心的外科系获得。将所有的组织固定在 10% 福尔马林或苦味酸/甲醛/冰醋酸 (15: 5: 1) 混合液中 (即 Bouin's 液)。随后嵌入石蜡 (见 Sweetser. D. A, Birkenmeier,

E. H., Hoppe, P. C, Mckeel, D. W., and Gordon, J. I., Genes Devel. 2 (1988), 1318－1332)。制备厚度5μm的切片，置于载玻片上，用于苏木精和曙红染色（以便鉴定在胃单位中存在的细胞类型，并证实该组织标本没有任何病理改变），和/或用于随后的粘连、组织化学和/或免疫细胞化学测定。

选用了5株从临床分离出的，已被鉴定的幽门螺旋菌。NCTC 11637和NCTC 11638用作参照菌株，是1982年从慢性活动性胃炎病人分离出的菌株(见 Warren, J. R., and Marshall, B., Lancet 1 (1983), 1273－1275)。菌株WV 229是从胃溃疡病人分离出的(见 Westblom, T. U., Madan, E., Subik, M. A., Buriex, D. E. and Midkiff, B. R., Scand. J. Gastroenterol. 27 (1992), 249－252)，而P46 6(从 The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore 获得) 是从患有急性胃炎的病人分离出的菌株。菌株MO 19是从无症状带菌者分离得到的（见 Barthel, J. S., Westblom, T. U., Havey, A. D., Gonzalez, F. and Everett, E. D., Arch. Intern. Med. 148 (1988), 1149－1151)。幽门螺旋菌菌株的生长培养条件是：于37℃微好气性条件(5% O_2, 10% CO_2, 85% N_2)和湿度98%下，生长于添加有10%牛血和1% IsoVitalex (Becton Dickinson 微生物系统, Cockeyville, MD) 的 Brucella 琼脂培养基上。接种后第5天，从培养皿中用无菌接种环取出大约1μl细菌，用移液管小心地重新悬浮于1ml pH 9.0的0.15M NaCl/0.1M碳酸钠溶液中。将10μl新配制的10mg/ml荧光素异硫氰酸酯(FITC, Sigma Chemical Co.)的二甲基亚砜溶液加到上述混悬液中，然后将其于暗处室温下培育1小时。再在转速3000

×g 下离心 5 分钟，回收细菌细胞，然后再次用移液管小心地悬浮于 1ml 含有 0.2% 牛血清白蛋白和 0.05% 聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯的，pH 7.4的磷酸盐缓冲的生理盐水（保护缓冲液 1，BB1）中，再如上所述用离心法使其沉积，将此细菌细胞反复洗涤三次。正如通过用荧光显微镜检查比较细菌数目所判断的那样，所有细菌株的 FITC－标记强度是相似的。通过在波长 600nm 测定光吸收率（A），将具有 1.00 O.D./ml 光密度的最终细菌混悬液分成 100μl 等分试样，并应立即使用，或者用前一直贮存于－20℃下。测定表明，被标记后立即使用的细菌与使用前已被冷冻并解冻过一次的细菌之间，在粘连方式上没有任何不同。

将载玻片上的组织切片在二甲苯和异丙醇中作脱蜡处理（二甲苯 10 分钟；二甲苯 3 分钟；异丙醇 3 分钟；异丙醇 3 分钟；再异丙醇 3 分钟），然后在水中漂洗，接着在 PBS 中漂洗 3 次后，在保护缓冲液 1（含 0.2% 牛血清白蛋白/0.05% 聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯的 PBS 液）中培育 30－60 分钟。将 FIFC 标记的细菌混悬液用保护缓冲液 1 稀释 20 倍，取200μl 等分试样加于载玻片上的组织切片上，然后将载玻片置于调湿室内，在室温下培育 1 小时。在用荧光显微镜观察检查之前，用 PBS 依次漂洗此载有已被处理的组织切片的载玻片 4－6 次。

为了分析各种糖蛋白或游离的低聚糖抑制粘连的能力，分别将200μl等分试样 FITC 标记的细菌混悬液与下列成分在室温下预培育 2 小时：牛颌下粘蛋白（Sigma，溶于 pH 7 的 PBS，最终浓度为 500μg/ml），胎盘球蛋白（Sigma，溶于 pH 7 的 PBS 中，浓度为 100μg/ml），唾液分泌抑制胎球蛋白（asialofetuin，Sigma，溶于

pH 7 的 PBS 中，浓度为 100μg/ml，人唾液酰基－乳糖 (NeuAc－α2→6Gal β1→4Glc) (Sigma，溶于 pH 7的 PBS 中，浓度为 5μg/ml，牛唾液酰基－乳糖 (NeuAcα2→3Galβ1→4Glc) (Sigma，溶于 pH 7 的 PBS 中，浓度 5μg/ml)，纯化的人 K－酪蛋白 (溶于 pH 7 的 PBS 中，浓度分别为 1000、500、250、50、10 和1μg/ml)，或者纯化的牛成熟乳或初乳 K－酪蛋白 (溶于 pH 7 的 PBS 中，浓度 1000μg/ml)，人血清 IgA (Cappel Research 产品，溶于 PH 7 的 PBS中，浓度 500μg/ml)，或者人初乳分泌性 IgA (Cappel Research 产品)，溶于 pH 7 的 PBS 中，浓度 15μg/ml)。先用保护缓冲液 1 洗细菌一次，然后将此混合液加于组织切片上。

然后，用 M_r= 10, 000 的 Cutoff Centricon滤器 (Amicon)，以 PBS洗人 K－酪蛋白或人初乳分泌性 IgA。在与细菌共同培育之前，将人 K－酪蛋白和人初乳分泌性 IgA 先与 100MU 牛肾 α－L －岩藻糖苷酶或 Vibrio Colerae 神经氨酸苷酶 (Boehringer－Mannheim, Germany)，在 37℃下共同培育 2 小时。并以在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲的生理盐水中培育的 K－酪蛋白作为对照。在 K－酪蛋白与细菌共同培育之前，经糖苷酶处理过的样品和其对照物，均在 80℃下培育 20 分钟，以便使酶灭活。以在 PBS 中培育的IgA 作为对照。在 IgA 与细菌共同培育之前，经糖苷酶处理过的样品和其对照物，均在 80℃下培育 20 分钟，以便使酶失活。

为了进一步测定人 K－酪蛋白和人初乳分泌性 IgA 的受体活性区的性质，可按如下所述，分别进行高碘酸氧化处理。

为了确定组织切片中细菌受体的性质，还需要另外二个实验。首先，将经脱蜡处理过的切片在37℃用200mU蛋白酶K处理2小时，此酶是一个丝氨酸蛋白酶，能够催化脂肪族氨基酸和/或芳香族氨基酸COOH－位点的肽键水解（见Ebeling等人的Eur. J. Biochem. 4(1974)，91－97)，此酶购自Trichiratum albus (Boehringer－Mannheim，Germany)，在PBS中配制成1mg/ml的贮备液。随后将组织切片在PBS中洗3次，并用保护缓冲液1处理，然后如前面所述，将FITC标记的幽门螺旋菌P466菌株或WV 229菌株的混悬液，覆盖在组织切片之上。第二个实验是，将已脱蜡的组织切片，在pH 4.5, 0℃, 以10mM偏高碘酸钠/50mM醋酸钠处理10分钟，以便选择性地在末端唾液酸未被取代的侧链的第8和第9位碳原子之间断开碳原子(见Manz. A. E., Dell, A.， Azadi，．，和Varki. A.， J. Biol. Chem. 265 (1990)，8094－8107)，或者是将已脱蜡的组织切片，在pH 4.5，室温下，以10mM偏高碘酸钠/50mM醋酸钠处理1小时，以便断开大多数在第3位上具有游离羟基的糖中邻位羟基之间的C－C键（因此打开了单糖化合物的环状结构，并因此破坏了此糖的抗原决定簇，而保留了肽结构的完整，见Woodward，M. P.，Young，W. W. Jr. and Bloodgood，R. A.，J. Immunol. Meth. 78 (1985)，143－153)。对照组织切片仅与50mM醋酸钠缓冲液共同培育。将切片用PBS洗二次后，加上以pH 7.6的PBS配制的50mM硼氢化钠，对切片作还原处理。再用PBS洗几次后，加入FITC－标记的菌株WV 229、P466或MO19的混悬液，然后如前面所述，进一步处理载有组织切片的载玻片。

对照实验被用于证实在pH 4.5下在“更严酷”的高碘酸氧化作用之下，存在于胃上皮细胞系中的蛋白质抗原性仍然被保存下来了。从而，将经高碘酸处理的大白鼠胃组织切片与一个兔多克隆抗血清(10μg蛋白质/ml)在4℃共同培育过夜，这种兔多克隆抗血清是针对内在因子 (IF) 和随后以Texas Red结合的驴抗兔IgG所测定的抗原－抗体复合物所产生的(见Roth, K. A., Cohn, S. M., Rubin, D. C., Trahair, J. F. Neutra, M. R. and gordon, J. I. Am. J. Physiol . (Gastrointest. Liver Physiol.) 263 (1992), G186－G187, and Lee, E. Y., Seetharam, B., Alpers, D. H. and DeSchryve r－Kecskemet i, K., Gastroenterol. 97 (1989), 1171－1180, 从中可了解所应用的有关染色的原始记录和有关血清特异性的详情)。在高碘酸处理的组织切片中主细胞IF染色的强度与仅和缓冲液共同培育的组织切片中的主细胞染色强度相似，但是在相同的条件下，α－L－岩藻糖特异性Ulex europaeus 1型外源性凝集素对表面粘液细胞的粘连完全被消除了。

免疫组织化学研究

在含有酶原腺的人胃组织脱蜡切片中，唾液酰基化的低聚糖在细胞内的分布，可通过与下列二种标记结合物共同培育的方法来测定：(i) 与荧光素、硫氰酸胺，(LIST Biological Laboratories Inc.) 或过氧化物酶(Sigma) 结合的霍乱素B亚单位，。这种毒素可识别与半乳糖连接的，内部已定位的NeuAc α2→3残基 (见Holmgren, J., Lonnroth, I., Mansson, J. E., and Svennerholm, L, Proc. Natl, Acad. Sci. USA 72 (1975), 2520－2524, 溶于保护缓冲液1，最终浓度为5μg蛋白质/ml)，(ii) 与地高辛配基(DIG)结合

的 Sambucus nigra 外源性凝集素(SNA)，这种外源性凝集素可识别NeuAcα 2→6Gal/GalNAc （见 Knibbs, R. N., Goldstein, I. J. Ratcliffe R. M., and Shibuya, N., J. Biol. Chem. 266 (1991), 83－88, 溶于保护缓冲液 1, 浓度为10μg 蛋白质/ml), 以及与 DIG 结合的 Maackia amurensis外源性凝集素(MAA)，这种外源性凝集素能够与 NeuAcα 2→3Gal β1→4GlcNAc 反应（见 Knibbs, R. N., Goldstein, I. J., Ratcliffe, R. M., and Shibuya, N. J. Biol. Chem. 266 (1991), 83－88, 溶于保护缓冲液 1, 浓度为 10μg 蛋白质/ml)。DIG－结合的外源性凝集素可用过氧化物酶结合的小白鼠抗－DIG 单克隆抗体来测定 (此单克隆抗体溶于保护缓冲液 1 中，浓度为 500MU 蛋白质/ml)，先在 PBS 中洗组织切片 3 次，再将第二抗体复盖在组织切片上，在室温下培育 1 小时，然后进行标准的 H_2O_2/DAB 测定。

岩藻酰基化的血型抗原可通过首先用直接针对组织血型抗原 A、B 和 H (Dakopatts A/S, Glostrup, Denmark, 溶于保护缓冲液 1, 最终浓度为 1μg蛋白质/ml)，或者 Le^a和 Le^b (Immucor, Norcross, GA, 溶于保护缓冲液1, 最终浓度为 10μg 蛋白质/ml) 的小白鼠单克隆抗体处理组织切片来测定。抗原－抗体复合物可通过观测用 FITC－, TRITC－或 HRP－结合的 (即荧光素－, 硫氰酸胺－或过氧化物酶－结合的) 兔抗鼠免疫球蛋白 (Dakopatts A/S, Glostrup, Denmark, 溶于保护缓冲液 1, 最终浓度为30μg 蛋白质/ml) 再次复盖的方法来测定，并可以在荧光显微镜下观察研究组织切片。除此之外；岩藻糖酰基化的糖类结合物在细胞内的分布也可以用类似的方法来测定，即通过以 FITC－结合的

Ulex europaenus 1 型外源性凝集素 (UEA1, 溶于保护缓冲液 1, 浓度为 5μg 蛋白质/ml) 处理组织切片, 然后在荧光显微镜下观察, 因为此外源性凝集素可识别 α－L－岩藻糖基, 并与之结合。

结果和讨论

用原位粘连试验分析幽门螺旋菌对细胞系的特异性结合

先将 5 株从临床病例中分离的幽门螺旋菌以荧光素异硫代氰酸酯标记后, 随之在微好气性条件下, 使菌株在富集琼脂培养基上培养生长 5 天, 然后将菌液复盖在福尔马林固定的人胃组织切片上。菌株 NCTC 11637, NCTC 11638, WV 229 和 P466 均从患有消化不良综合症的病人获得, 能粘接于位于上穴窝和管腔表层的表层粘液细胞上(见图 2A、B)。明显可见, 细菌对定位于胃单位腺体节上部的颈粘液细胞的结合呈阴性, 表明这些细菌能够区分存在于胃中的二种不同的　生粘液的细胞系 (见Ota, H., Katsuyama , T., Ishii, K., Nakayama, J., Shiozawa, T., and Tsukahare, Y., Histochem. J. 23 (1991), 22－28)。在酶原腺体中, 没有见到细菌对壁细胞或主细胞的结合。菌株 MO19 是测定菌株中唯一一个从无症状的"健康"带菌者分离出的菌株, 该菌株对任何胃上皮细胞系没有发现可测定水平的结合(见图 2C)。

菌株 WV 229 和 P466 对人食管扁平上皮细胞没有粘连作用, 但是, 在应作同样反应条件时, 对食管粘膜下腺体和它们的导管, 以及对十二指肠绒毛相连的肠细胞有粘连作用(见图 2D)。这二株菌株对位于小肠绒毛的结肠同系细胞中的肠细胞—即环绕着每个隐窝孔边缘的表层上皮细胞也可看见有轻微的结合 (见图 2E)。荧光染色强度, 在此也就是粘连细菌的密度, 沿整个肠道的

头尾轴向观察，发现与在胃上皮细胞中看到的染色强度相比较，仅有相当少的降低（整个肠梯度降低）。对照实验表明，幽门螺旋菌P466株和WV 229株对存在于肾近端或远端肾单位中，子宫颈中，或子宫内膜中的任何上皮细胞群，都没有结合作用。对包括中脑在内的中枢神经系统检查表明，也没有发现高于背景荧光强度的结合信号。

用原位粘连试验可以确证，在人胃肠道组织中看到的特异性细胞系和异特性幽门螺旋菌的结合方式，是否在其他种哺乳动物中也能发生。用如上所述的方法培养并用FITC标记菌株WV 229、P466和MO19，分别与大白鼠和小白鼠的胃肠道及犬胃的组织切片共同培育。菌株MO19对从这三种动物的任何一种制备的组织切片，均不产生可测定量的结合作用。象对人胃组织细胞一样，菌株WV229和P466对大白鼠胃穴窝区有结合作用，但是对位于酶原区或纯粘液区的任何其他不同的上皮细胞群没有结合作用（见图2F）。与类似的人组织切片制品不同，大白鼠食管和前胃的分层扁平上皮细胞，在原位粘连试验中产生阳性结果，而其小肠上皮细胞，除Brunner's腺之外，是阴性结果。小白鼠的前胃对粘连细菌，表现出高密度的结合作用，而胃的其余部分，即酶原区、粘液腺体壁区和纯粘液区（见Lee, E. R., Trasler, J., Dwivedi , S., and leBlond, C. P., Am, J. Anat. 164 (1982), 187－207）以及肠组织的上皮和间质部分，与FITC标记的菌株WV 229和P466不产生结合信号。最后还表明，这二株菌株对犬胃组织切片都没有结合作用。

幽门螺旋菌与胃上皮细胞系之间相互作用的生物化学研究

为了研究幽门螺旋菌与表层粘液细胞之间相互作用的特性，对一系列化学物抑制FITC－标记的菌株P466和WV 229对人胃和近端小肠组织切片结合的能力进行试验。

当用小牛血清胎球蛋白、唾液分泌抑制性胎球蛋白和从牛乳中制备的可溶性唾液酰基乳糖（其中85%的唾液酸是通过α2→3键与半乳糖连接，15%的唾液酸是通过α2→6键与其相连，即NeuAc α2→3/6Gal β1→4Glc），或者人乳唾液酰基－乳糖（15%NeuAc α2→3；85%NeuAc α2→6）与上述二株幽门螺旋菌共同预培育，通过原位粘连试验判定，未见因此而引起的粘连作用降低，这些发现，即结合作用不依赖于唾液酸，与Fauchere, J. L和Blaser, M. J. 在Microb. Pathog. 9 (1990), 427－439中发表的研究结果是一致的。

但是，将细菌与作为岩藻糖酰基化和唾液酰基化的糖丰富来源的牛颌下腺粘蛋白（浓度0.5%，见Savage, A. V., D'Arcy, S. M. T., and Donoghue, C. M., Biochem. J. 279 (1991), 95－103 and 33）共同培育后，细菌对表层粘液细胞（见图1A、B），以及对十二指肠上皮细胞和绒毛相关的上皮细胞的结合完全被抑制了。人K－酪蛋白和人初乳分泌性IgA也是可能的抑制剂：250μg/ml人K－酪蛋白（见图3A）和15μg/ml人初乳分泌性IgA，可分别完全抵制幽门螺旋菌的粘连作用。

人K－酪蛋白低聚糖可经过α1→4键被岩藻糖酰基化成N－乙酰氨基葡萄糖，在这点上与牛K－酪蛋白不同。人初乳分泌性IgA载带有一整套高度变化的N－和O－连接的低聚糖。

因此，有趣的是只有人K－酪蛋白和人初乳分泌性IgA能够

阻止幽门螺旋菌对人胃表层粘液细胞的细胞系特异性粘连作用。几次实验观察表明，人初乳分泌性 IgA 对幽门螺旋菌的结合抑制作用，不是由细菌 FC－受体介导的，也不是由经典的与 Fab 片断的低度可变性有关的免疫球蛋白识别作用介导的。于是，可以看到 (i) 当人 K－酪蛋白或人初乳分泌性 IgA 以偏高碘酸预处理时，其抑制作用将会消失，(ii) 在 PBS 中，在 85℃下预培育30 分钟，不影响这二个糖蛋白的抑制活性，以及 (iii) 用 α －L－岩藻糖苷酶处理人 K－酪蛋白 (见图 3C) 或人初乳分泌性 IgA，能明显地降低它们的抑制活性，然而用神经氨酸苷酶处理，对人 K－酪蛋白的抑制活性仅有较小的影响，对人初乳分泌性 IgA 的抑制活性未见可测定的影响。

相比之下，来源于牛成熟乳和初乳的 K－酪蛋白 (见图 3B)，在高达1000μg/ml 的浓度下，对幽门螺旋菌的结合作用无抑制作用，并且，人血清IgA 在高达 100μg/ml 的浓度下，也不抑制结合作用。将人胃组织切片用蛋白酶 K 预处理，也导致二株幽门螺旋菌株 P466 和 WV 229 对细胞的结合作用明显地减弱。

综上所述，这些结果有力地表明，细菌对细胞的结合作用，是由出现在表层粘液细胞上的岩藻糖酰基化的糖蛋白受体介导的，而不是由其唾液酰基化的糖蛋白受体介层的。

上述有关幽门螺旋菌对人胃表层粘液细胞群的粘连作用不依赖于细胞受体中的唾液酸抗原决定簇的指证，并得到另外二个试验结果的进一步支持。

第一个试验表明，含有唾液酸的复杂糖类化合物在人胃粘膜内的分布与在原位细胞粘连测定中看到的粘连细胞的类型无关。

用 Maackia amurensis凝集素 (MAA) 作实验可测定这种分布，MAA 对 NeuAc α2→3 Gal β1→4GlcNAc 抗原决定簇(在唾液酰基化的 N/O－聚糖和糖神经鞘脂上)是特异性的 (见 Knibbs, R. N., Goldstein, I. J., Ratcliffe, R. M. and Shibuya, N., J－Biol, Chem, 266 (1991), 83－88)，同样还可以用 Sambucus nigra 凝集素(SNA) 作实验，测定这种分布，该凝集素可识别 NeuAc α2→6Gal/GalNAc 结构(见 Shibuya, N., Goldstein, I. J., Broekaert, W. F., Nsimba－Lubaki, M., Peeters, B., and Peumans, W. J., J. Biol. Chem. 262 (1987), 1596－1602)。结果表明，原来外源性凝集素 MAA 和 SNA 的结合作用仅局限于人胃的粘膜下隔室内。因此，它们不会与任何胃上皮细胞系的细胞起反应(见图 1C、D)。

类似的情况是，霍乱毒素 B 亚单位可识别糖蛋白和糖神经鞘脂内的内在连接的唾液酸，更确切地说是 GalNAc β1→4 (NeuAc α2→3) Gal－β－结构(见 Holmgren, J., Lonnroth, I., Mansson, J. E., and Svennerholm, L, Proc . Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975), 2520－2524)。结果表明，原来，与其说这个外源性凝集素不与表层粘液细胞结合，倒不如说是其结合作用仅局限于位于胃单位的上部腺体区域的颈部粘液细胞 (见图 1E)。用犬胃所作的对照试验证明 (i) MAA 可与表层粘液细胞结合，(ii) SNA 可与表层粘液细胞和壁细胞结合，(iii) 霍乱毒素 B 亚单位不与犬的任何胃上皮细胞系结合。这些结果暗示，这些外源性凝集素可以被用于确定，在犬和人之间，表层粘液细胞系在分化过程中的功能差异—这些差异可能是由于它们与幽门螺旋菌结合的能力各不相同。

第二个试验表明，当组织切片在0℃和pH 5.5下与10mM偏高碘酸/醋酸钠共同培育时，可以达到选择性地在末端唾液酸未被取代的侧链断开碳原子8和9的目的(见Manzi, A. E., Dell A. , Azadi, P. and Varki, A., J. Biol. Chem. 265 (1990), 8094－8107)，例如，通过SNA丧失对犬胃表层粘液细胞的结合能力可证明这点。当与仅用醋酸钠缓冲液处理的对照组织切片相比较，运用这些高碘酸氧化条件，没有发现任何结合菌株对人胃或小肠上皮细胞群的粘连能力有任何降低。

另一些试验观察支持下述观点，糖蛋白中岩藻糖酰基化的抗原决定簇，具有介导幽门螺旋菌对人胃表层粘液上皮细胞结合的作用。将含有酶原腺体的人胃组织切片与对三个血型抗原中的一个具有特异性的单克隆抗体共同预培育，细菌对其的结合作用则被减弱了 (例如，见图1F－H)。Ulex europaeus 1型凝集素(UEA1)对α－L－岩藻糖具有特异性，它也能与含有幽门螺旋菌细菌细胞表面配基受体相同细胞结合(见图1I)。用于上述试验的，“温和”的偏高碘酸氧化反应条件，对UEA1的结合作用没有任何影响(见图1J)。这种处理对幽门螺旋菌的结合作用也没有任何影响(见图1K、L)。为了消除UEA1和单克隆血型H抗体对人胃表层粘液细胞的结合作用，需要使用更严厉的断裂条件 (即降低pH至4.5，增加培育时间至1小时，升高培育温度至20℃)。这些条件也会导致霍乱毒素B亚单位丧失结合能力，使幽门螺旋菌WV 229和P466菌株丧失粘连能力。

上述多种标记免疫组织化学研究表明，针对FITC－标记的菌株P466和WV 229的受体位点，连同岩藻糖酰基化的组织血型

抗原 H、B和 Le^b，都共同表达在这种上皮细胞系的细胞之中。

综上所述，这些结果有力地表明，幽门螺旋菌对 VEA1 阳性的，和对岩藻糖酰基化的血型抗原阳性的人胃表层粘液细胞的结合作用是不依赖于末端非取代的唾液酸残基。而且据 MAA 和 SNA 外源性凝集素和霍乱毒素 B亚单位连接位点在细胞中的分布，加上胎球蛋白和可溶性唾液酰基－乳糖不能抑制结合作用等试验结果。都强烈地表明不涉及 α2→3 键连接的唾液酸残基，以前的研究也曾提出过这种观点(见 Evans, D. G., Evans, D. J. Jr., and Graham, D. Y., Infect, Immun. 57 (1989), 2272－2278, Evans, D. G., Evans, D. J. Jr., Moulds, J. J., and Graham, D. Y., Infect. Immun. 56 (1988), 2896－2906, and Saitoh, T., Natomi, H. , Zhao, W., Okuzumi. K., Sugano, K., Iwamort, M., and Nagai, Y., FEBS Lett. 282 (1991), 385－387)，以及使用尚不知道是这种细菌靶标的细胞所作的体内试验研究也曾提出过这种观点(见 Evans, D. G., Evans, D. J. Jr, and Graham, D. Y., Infect. Immun. 57 (1989), 2272－2278, and Evans, D. G., Evans, D. J. Jr. , Moulds, J. J., and Graham, D. Y. Infect, Immun. 56 (1988), 2896－2906)。

图 1 显示假定的幽门螺旋杆菌细菌细胞表面配基受体，具有缺乏唾液酰基－乳糖的糖蛋白的特点。

图 1A 和 1B: 将包含有带有酶原腺的胃单位的人胃组织切片与 FITC－标记的幽门螺旋菌株 WV229 (1A)，或者与用 0.5% 牛颌下腺粘蛋白溶液处理过的细菌 (1B) 共同培育。表明粘蛋白样品可使结合作用显著降低。

图 1C 和 1D: 将含有表层粘液细胞, 粘液颈细胞, 壁细胞和主上皮细胞系的人胃组织切片与地高辛配基标记的 Maackia amurensis凝集素 (MAA, 1C), 或者与同样标记的 Sambucus nigra 凝集素 (SNA 1D) 共同培育。DIG－结合标记的外源性凝集素可用过氧化物酶结合的小白鼠抗 DIG 单克隆抗体来测定。当组织切片与这些能识别含有唾液酸的糖类抗原决定簇的外源性凝集素共同培育后, 上述上皮细胞系均不能产生高于背景的染色信号。仅用单克隆抗体处理的对照试验也不产生任何染色信号 (资料未被显示)。

图 1E: 人胃邻近的组织切片与硫氰酸胺结合标记的霍乱毒素 B 单位共同培育。将位于胃单位腺体区的管峡部或上部产生粘液的细胞与这个毒素反应, 该毒素可识别在糖蛋白和糖神经鞘脂内连接的唾液酸。该毒素亚单位不与位于穴窝处的表层粘液细胞结合。

图 1F－1H: 人胃组织切片与 FITC－标记的幽门螺旋菌株 P466 (1F) 共同培育, 以及与直接针对岩藻糖酰基化的血型抗原 H 产生的小白鼠单克隆抗体共同培育 (图 1G 所示, 可用硫氰酸胺结合标记的免抗小白鼠 IgG, 使之可以观察)。图 1H 是显示表层粘液细胞共表达细菌的细菌细胞表面配基受体和血型抗原的双重曝光照片。与没有用这种单克隆抗体处理的组织切片相比较 (例如图 1A), 可见细菌对表层粘液细胞的粘连显著降低了 (1F)。用直接针对岩藻糖酰基化的血型抗原 B 和 Le^b 产生的小白鼠单克隆抗体处理组织切片, 也可看见细菌结合作用类似的降低 (资料未被显示)。非免疫的小白鼠 IgA 不产生这种作用 (资料未被显示)。

图 1I: 人胃组织切片与能识别 α－L－岩藻糖的 FITC－结合标记的 Ulex europaeus 凝集素 (UEAI) 共同培育。该外源性凝集素与表层粘液细胞结合。

图 1J: 在 0℃, 以 pH 5.5 的偏高碘酸钠预处理人胃组织切片 10 分钟, 对 UEAI 的结合作用不产生明显的降低。

图 1K 和 1L: 幽门螺旋菌对穴窝粘液细胞的结合作用 (1K) 也未受到偏碘酸钠预处理的影响(1L)。

图 2 显示幽门螺旋菌对胃肠道上皮细胞系结合作用的原位测定结果。

图 2A: 以苏木精和曙红染色的人胃细胞切片, 显示酶原区内胃单位的最上部位。表层粘液细胞(M)和壁细胞(P)已被标明。

图 2B 和 2C: 一个成年人的胃组织切片与 FITC 标记的幽门螺旋菌WV 229 菌株 (2B) 和 MO19 菌株 (2C) 共同培育, 在此之前, 细菌已经在微好气条件下, 在血琼脂上培养生长了 5 天。从一个患有胃溃疡的病人得到的菌株 WV 229 是与位于胃单位上穴窝的表层粘液细胞以及和它们相连的管腔表层相结合。菌株 MO19 是从一个健康的带菌者分离获得的, 它不与任何细胞系结合。

图 2D 和 2E: 菌株 WV 229 与取自一个成年人的十二指肠 (2D) 和结肠 (2E) 的组织切片共同培育。用于对胃组织切片染色显示的, FITC标记的细菌样品, 也可以用于对与绒毛相连的上皮细胞 (包括肠细胞) 的染色显示, 并且, 对位于结肠隐窝上部的结肠细胞和它们表面的上皮环口细胞也有非常微弱的染色显示作用。位于小肠和大肠隐窝内的低度分分化的、正在增殖的和非增

殖细胞不含有粘连细菌。位于间质间隙内的细胞群也呈阴性粘连反应。将人胃、小肠、和结肠组织切片分别与菌株 NCTC 11637, NCTC 11638 和 P466 共同培育，产生可以与在图 2B、2D和 2E 中显示的结果相比较的类似结果(资料未被显示)。

图 2F: 成熟 Sprague－Dawley 大白鼠胃酶原区的组织切片，与在微好气条件下，在血琼脂培养基上培养生长了 5 天的 FITC－标记的菌株 WV 229 共同培育。幽门螺旋菌与大白鼠胃表层粘液细胞相结合，但是，不与和大白鼠胃单位管峡区或腺体区相关的细胞系结合。

图 3 显示对各种 K－酪蛋白对幽门螺旋菌与人胃粘膜在原位相结合的抑制活性的评价。

图 3A: 幽门螺旋菌菌株 P466 在复盖于人胃组织切片之前，先与人K－酪蛋白 (250 μg/ml) 预培育。

图 3B: 幽门螺旋菌菌株 P466, 在复盖了人胃组织切片之前，先与牛初乳 K－酪蛋白 (1000 μg/ml) 预培育。

图 3C: 在复盖于人胃组织切片之前，人 K－酪蛋白以 α－L－岩藻糖苷酶预处理。复盖是在同一嵌入石蜡中组织的相邻的组织切片上。

实施例 2

糖蛋白的十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS－PAGE) 分析

用如实施例 1 中所叙述的方法，对细菌进行标记，所用的菌株是幽门螺旋菌 P466。对幽门螺旋菌所作的原位粘连测定和免疫组织化学研究，也按在实施例 1 中所述的程序进行。

对人初乳样品、羊乳和牛乳、人初乳和新糖共轭体的硫酸铵沉淀组分，以 4－20％或 12％的 Precast 凝胶 (Bio－Rad, Melville, NY) 作 SDS－PAGE 分析。蛋白质在 SDS－L－巯基乙醇中，以 100℃加热 3 分钟作变性处理。凝胶以 Coomessie 辉煌兰染色，分子量标准品来源于 Sigma, St, Louis, MO.

免疫印迹分析

经 SDS－PAGE 分离的蛋白质，用一个半干的 Multiphore Nova印迹系统转移至硝化纤维素膜上 1.5 小时。用 Poncean S 液 (Sigma, St. Lours Mo) 对蛋白质染色，然后将印迹斑点在保护缓冲液 2 (BB2) 中培育 1－3 小时，BB2 由 1％Tris 缓冲生理盐水 (TBS), 1％保护试剂 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.), 1mM $MnCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$, 0.05％聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯, 0.1％NaN_3组成。使用了下列血型特异性单克隆抗体：抗—Le^a (CBM－LA1) 和抗－Le^b (CBM－LB1)，来源于 Immucor, Norcross, GA; 抗－Le^x (630/7H1), 抗－Le^y (672/7E3), 抗－$Le^{b,y}$ (64/4D8) 和抗－H－2 (92FRA2)，来源于 Accurat Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY.,; 抗－1 型链 (LNT) (K21), 抗－H－1 (17－206) 和抗－Le^b (T218), 来源于 Signet Laboratories, Dedham, MA.。使用了下列外源性凝集素：生物素标记的 Ulex europaeus 1 型，Lotus tetragonolobus，和 Anguilla anguilla (Sigma, St. Louis, MD)，它们可识别 H－抗原；以及可识别糖结合物中分支的 Fuc α 1－6GlcNAc 的地高辛配基 (DIG)－标记的 Aleurie aurentia (Boehringer Mannheim)。印迹斑点与用 BB2 配制的浓度为 5－10 μg/ml 的抗体或外源性凝集

素共同培育6小时。然后在TBS中洗7次。单克隆抗体可用碱性磷酸酶（AP）－结合标记的羊抗小白鼠抗体（Boehringer Mannheim）测定。地高辛配基或生物素标记的外源性凝集素，可分别用AP－结合标记的羊抗DIG或抗－生物素Fab片断(Boehringer Mannheim)来测定。印迹斑点在TBS中洗5次，在0.1M Tris－HCl缓冲液（pH 9.5，含0.1M NaCl，5mM $MgCl_2$）(APBIII)中洗一次，以BCIP/NBT显色。

生物素标记外源性凝集素

用来源于Calbiochem Immunochemicals，Le Jolla，CA.的生物素－NHS试剂盒，对Anguilla anguilla外源性凝集素作生物素标记。根据分子量在SDS－PAGE上的位移，可测定其生物素化的程度(n = 7)。

对人分泌性IgA制备样品的分级分离

将来源于人混合初乳（Cappel Laboratories，Eest Chester，PA.）的人分泌性IgA 500μg加于Superose 6HR 10/30层析柱上，以pH 6.8的PBS洗脱，流速为0.21ml/min。收集400μl样品，并将每个UV吸收组分的20μl等分试样作SDS－PAGE分析。然后将分别与分泌性IgA和120－150KDa糖蛋白相对应的主峰组分和微量峰组分分开收集、混合，并以原位粘连测定法，测定其对细菌粘连的抑制作用特性(见下文)。

青霉素G酶F(PNGase F)消化人分泌性IgA样品

将50μg分泌性IgA在含有10mMβ－MSH，20mM EDTA和6单位PNG酶F(Boehringer Mannheim)的100μl，pH 8.0的0.1M磷酸盐缓冲液中培育(天然条件)，或者将50μg分泌性

IgA 首先在 100℃下，在 0.2% SDS和 10mM β－MSH 中培育 3 分钟，然后以 pH 8.0 的 0.1M 磷酸盐缓冲液稀释至100μl (变性条件)。将 0.5% 的正－辛糖苷加入此经变性处理的样品中，以便减小 SDS 对 PNG－酶 F 的干扰。最后加入 6 单位 PNG－酶 F。在 37℃下进行培育，并分别在 0 小时、1.5 小时、4 小时、7 小时和 18 小时后取样作 SDS－PAGE 和免疫印迹分析。

人初乳和乳样品的制备

人初乳来源于 Children's Hospital, St. Louis, MO. 先对初乳，羊乳和牛乳作脱脂处理，在将此脱脂后的样品用于抑制试验或 SDS－PAGE 分析之前，还需在转速 20krpm 下，在 Sorvall SS-34 转子中离心 30 分钟，以便除去细胞碎片。

糖结合物的抑制作用研究

糖结合物抑制细菌在原位粘连于人胃的能力，可以通过将 200μl 已被标记的细菌在 BB1 中的混悬液，在室温下与下面列举的糖结合物，共同预培育 1.5 小时来分析。预培育后，细菌被洗一次，并再次悬浮在 200μl BB1中，然后施加于组织切片上。其粘连作用与用来作抑制处理的细菌共同培育的组织切片相比较。下列糖结合物被用于试验，其中 (n) 代表用总糖蒽酮测定法测定的，以化学方式结合于新糖蛋白的碳水化合物链的数目：分泌性IgA，乳－N－丁糖 (LNT) －人血清白蛋白 (HSA) (n = 26)，乳－N－新丁糖 (LN_nT) HSA (n = 26)，乳－N－岩藻戊糖 I (H－1) －HSA (n = 35)，乳－N－岩藻戊糖 II (Lea) －HSA (n = 30)，乳－N－岩藻戊糖 III (Le^x) －HSA (n = 30)，乳－N－二岩藻已糖 I (Le^b) －HSA (n = 32)，Le^y－四糖化物 (Le^y) －HSA (n = 26)，乳－N－新

岩藻戊糖Ⅰ（H－2）－牛血清白蛋白（BSA）（n＝29），GlcNAcβ1－4(Fucα1－6)GlcNAcβ－BSA(全部来源于 Isosep AB, Tullinge, Sweden)．H1－HSA 也可以 Accurate Chemical& Scientific Corporation 得到。用于新糖结合物制备的所有低聚糖均用高效液相色谱法(HPLC)纯化，并作结构鉴定，定性检测并且其制造者均标明以核磁共振谱测定法检定的纯度大于95%。新糖蛋白的鉴定结果，借助免疫印迹技术，用下列抗体和凝集素作进一步验证：单克隆抗体 K21；可识别 LNT(非－岩藻糖酰基化的前体链)；抗－H－1 (17－206) (识别乳糖系 1 型链上的 H－抗原)；抗－H－2 (92FR A2)，(识别乳糖系 2 型链上的 H－抗原)；抗－Le^a (CBM－LA1)，(识别单岩藻糖酰基化的 1 型链)；抗－Le^b (CBM－LB1) (识别二岩藻糖酰基化的 1 型链)；抗－Le^b (T218) (识别我们手头保存的，具有很少交叉反应性的纯种细胞系)；抗－Le^x (630/7H1)，(识别单岩藻糖酰基化的 2 型链)；抗－Le^y (672/7E3)，(识别二岩藻糖酰基化的 2 型链)；抗－$Le^{b,y}$(64/4D8) (识别二岩藻糖酰基化的 1 型和 2 型链)；以及 H－抗原特异性外源性凝集素Ulex europaeus 1 型和 Anguilla anguilla。

低聚糖的抑制作用研究

糖结合物抑制细菌原位粘连作用的能力，可以通过将已标记的细菌在室温下，与下列用 BB1 稀释的低聚糖共同预培育 3.5 小时来分析：乳－N－岩藻戊糖Ⅰ（H－1），乳－N－岩藻戊糖Ⅱ(Le^a)，乳－N－二岩藻已糖Ⅰ(Le^b)，乳－N－岩藻戊糖Ⅲ(Le^x)，乳－二岩藻丁糖，2′－岩藻糖酰基－乳糖，3－岩藻糖酰基乳糖

(均来源于 Isosep AB), H－二糖化物(来自 Accurate Chemical& Scientific Corporation), Fuc α 1－4－GlcNAc β O－TMSE (来自 Symbicom AB, Umeá, Sweden), 以及 L－岩藻糖 (来自 Sigma. St. Louis. MO).

在原位粘连测定中, 抗体对细菌结合作用的抑制

将单克隆抗体抗－Le^b和抗－H－2 的二倍连续稀释液 (用 BB1稀释) 分别用于人胃组织切片, 在室温下培育过夜。组织切片用 PBS洗 5 次, 结合于组织切片上的抗体可用 FITC 结合标记的免抗小白鼠免疫球蛋白来测定, 将其用 BB1 稀释成 1: 100, 在室温下与组织切片共培育 1小时。产生相似荧光强度的抗体稀释液被选择用于细菌实验 (分别为1: 2000 和 1: 5000)。组织切片先如上所述与单克隆抗体共同预培育, 然后如上所述将细菌复盖在其上面。

细菌的蛋白质免疫印迹复印分析

分别将 20μg 未经分级分离处理的人初乳、羊乳、牛乳或者 1μg 不同的新糖结合物, 如上所述作 SDS－PAGE 分析。转移至硝化纤维素泸膜后, 将泸膜与 BB2 共同培育过夜, 然后用 TBS 洗 2 次。加上细菌混悬液($0.1OD_{600}$) (0. 2ml/cm^2在 BB2 中), 室温下, 在旋转瓶中培育过夜。泸膜在 TBS 中洗 6 次, 每次 5 分钟, 再加上 1: 100 的免抗血清, 培育 1 小时。印迹斑点在 TBS 中洗 5 次。然后将细菌结合物与 AP－结合标记的抗体(稀释度为 1: 2000×)共同培育 1 小时, 在 BB2中洗 5 次, 在 APBIII 中洗 1 次, 以 BCIP/NBT 显色处理, 或者将细菌结合物与金－标记的抗体共同培育, 在 BB2 中洗 5 次, 在 ddH_2O中洗 4 次, 以银增强剂 IntenSE BL

(Amersham, Arlington Heights, IL.) 显色处理。

糖脂制备物

免疫显色分析和细菌高效薄层色谱复印分析

如在“材料和方法”中称为“免疫印迹分析”的部分中所叙述的，单克隆抗体抗－Le^a (CBM－LA1) 和抗－Le^b (CBM－LB1) 可用于测定糖脂中是否存在相应的抗原，并应用第二抗体和作显色处理。

结果与讨论

用外源性凝集素和单克隆抗体分析人分泌性 IgA 和血清 IgA 中岩藻糖酰基化的血型抗原。

运用 H－抗原识别外源性凝集素 Ulex europaeus 1 型和 Anguille anguilla 的免疫印迹测定技术，已揭示，在分泌性 IgA 和血清 IgA 的重链和轻链中存在 H－抗原。用识别糖结合物中分支 Fuc α 1－6Glc NAC 链的 Aleuria aurantia 也可以鉴定普通的岩藻酰基化结构。综合这些观察结果表明，存在于 H－抗原中的末端 α－1－2 连结的岩藻糖或 α－1－6 连结的岩藻糖，本身并不构成幽门螺旋菌受体。针对 Lewis 血型抗原 Le^a、Le^b、Le^x和Le^y的单克隆抗体，可识别二种类型 IgA 的重链中存在的 Le^x和 Le^y，而 Le^b仅局限存在于分泌性 IgA 的分泌性成分中。在二种类型的 IgA 中未能发现 Le^a，但在与分泌性 IgA 共纯化的 120－150KD 的糖蛋白中检测到了 Le^a。另外，这种糖蛋白还作为 Le^b抗原，其强度与相当于 Le^b/蛋白质比率 10 倍以上的分泌性成分相等。

分级分离分泌性 IgA 样品

将人分泌性 IgA 加于 FPLC－Superose 6 柱上作层析处理，可将占绝对优势的分泌性 IgA 成分从微小量的 120－150 KD糖蛋白中分离出。对各个峰的收集物用 SDS－PAGE 法进行鉴定后分别混合在一起。然后分析各纯化的组分对幽门螺旋菌的抑制作用特性。这二种成分都没有表现出与它们各自蛋白质含量相关的对粘连作用的抑制活性，而是反映出 Le^b的含量，因为，如以前所述(PNAS)，为了能有效地抑制细菌粘连作用，需要分泌性 IgA 的浓度达 15 μg/ml，相当于 2 μg/ml 的120－150 KD 蛋白质。

对在 N－和 O－连接的糖链中 Le^b抗原

分布的分析

在变性和自然条件下，用 N－链解除酶 PNG 酶 F 消化处理未经分级分离的分泌性 IgA样品。在自然条件下，消化作用非常局限，只有糖含量的微小一部分被除去了，而经 SDS 变性处理之后，分泌性成分的低糖链被容易地解除了，对此可以通过在 SDS－PAGE 分析中分子量降低来观察，也可以通过在免疫印迹测量时，不存在 Le^b抗原来证明。但是，在用 PNG 酶 F 处理后，120－150 KD 糖蛋白中 Le^a和 Le^b的含量都没有受到影响，这表明在这种蛋白质上，在 O－连接的糖链中存在这些血型抗原。

人初乳样品对幽门螺旋菌粘连的抑制作用

在以 SDS－PAGE 转移的免疫印迹测定中，用 Le^a和 Le^-单克隆抗体保护人脱脂初乳样品中的 Lewis 血型活性。已发现表达一个 $Le^{2-}Le^{b+}$独特单位 (A) 的低水平 Le^a初乳糖蛋白和高水平 Le^b初乳糖蛋白。此外，具有高 Le^a水平的和未能测定的 Le^b水平的

一个 $Le^{a+}Le^{b-}$ 独特单位 (B) 也已被鉴定。这二个独特单位都能表达 H－抗原和 Fuc α 1－6GlcNAc, 正如分别用外源性凝集素Ulex europaeus 1 型和 Aleuria aurantia 识别测定所见。对初乳蛋白质抑制水平的滴定表明, 10 μg/ml 蛋白质浓度的 $Le^{a-}Le^{b+}$ 初乳蛋白可完全消除细菌的粘连作用 (图)。相反, 100 μg/ml 的 $Le^{a+}Le^{b-}$ 初乳蛋白仅导致细菌粘连作用微弱降低。

羊乳和牛乳抗原对幽门螺旋菌粘连的抑制作用

在脱脂处理过的羊乳和牛乳中, 未能测定出任何 Le^{a} 抗原或 Le^{b} 抗原活性。在 100 μg/ml 的浓度下, 这二种非人乳样品均不表现有抑制活性。

对岩藻糖酰化新糖蛋白的粘连抑制特性的分析

下列具有经高效薄层色谱法纯化的天然糖链的新糖蛋白, 或者具有人工合成糖链的新糖蛋白被用于实验, 已用核磁共振谱测定法对其糖链进行了鉴定, 这些糖链以化学键附着于血清白蛋白上, 这些新糖蛋白是: 乳－N－丁糖 (LNT) －HSA, 乳－N－新丁糖 (LNmT) －HSA, 乳－N－岩藻戊糖 I (H－1) －HSA, 乳－N－岩藻戊糖 II (Le^{a}) －HSA, 乳－N－岩藻戊糖 III (Le^{x}) －HSA, 乳－N－二岩藻己糖 I (Le^{b}) －HSA, Le^{y}－四糖 (Le^{y}) －HSA, 乳－N－新岩藻戊糖 I (H－2) －BSA, GlcNAc β 1－4 (Fuc α 1－6) GlcNAc β －BSA。对新糖蛋白的鉴定结果再用单克隆抗体通过免疫印迹法作进一步验证。结果肯定新糖蛋白的低聚

糖链具有高纯度，因为除抗－Le^b单克隆抗体之外，其余所有的抗体都选择性地对相应的新糖结合物染色。抗－Le^b (CBM－LB1)克隆与H－1－HSA 有交叉反应，与Le^y－HSA 有较小程度的交叉反应。抗－Le^b (T218) 能以同等的敏感性识别Le^b－HSA，而与Le^y－HSA 没有交叉反应，但对 H－1－HSA 有微弱的识别作用。因而，这些结果表明，与Le^y－HSA 的反应性是 CBM－LB1 克隆的真实交叉反应性。来自Isosep AB 的信息也可以确证这点，因为Le^y－低聚糖是通过化学合成得到的，因此可能不会被Le^b污染。但与 H－1－HSA 结合物的残存反应性仍然可以解释为Le^b－低聚糖的低水平污染(小于 5%)。

为了分析岩藻酰基化新糖蛋白对粘连作用的抑制特性，细菌被按如上所述的方法与 20μg/ml 新糖结合物共同预培育，其抑制活性与以前所述的20μg/ml 分泌性 IgA 的作用相比较。除分泌性 IgA 之外，Le^b新糖蛋白也是能够在这个浓度完全消除幽门螺旋菌结合作用的仅有的另一个糖结合物，虽然用 H－1－新糖结合物也能看到结合作用降低。然而，如前所述，这也可能被解释为，是由于少量Le^b污染了 H－1－新糖结合物而引起的降低。用 H－2－BSA，Le^a－HSA，Le^x－HSA，Le^y－HSA 或 GlcNAcβ14(Fucα1－6)GlcNAcβ－BSA，即使这些糖结合物的浓度增加到 100μg/ml 也不能产生任何抑制作用。能够导致细菌作用几乎完全降低的Le^b－糖结合物和分泌性 IgA 的浓度水平估计分别为 5μg/ml 和 20μg/ml，虽然对前者在低于1μg/ml 的浓度下，也被证明具有部分抑制作用。

对岩藻糖酰基化低聚糖粘连抑制特性的分析

为了分析岩藻糖酰基化低聚糖对细菌的抑制作用，细菌分别与系列浓度0.25mM，2.5mM和25mM的H－1，Le^a、Le^b、Le^x和Le^y低聚糖预培育。H－1，Le^b和Le^y低聚糖在2.5mM浓度时能降低细菌的结合作用，在25mM浓度时，能几乎消除细菌的结合作用。而Le^a和Le^x低聚糖在25mM浓度时未表现出对细菌结合的抑制作用。H－二糖和2′－岩藻糖酰基乳糖在20mM浓度时降低细菌结合作用50－75%。Fuc α1－4GlcNAc β0－TMSE和3－岩藻糖酰基乳糖样品在50mM浓度时才能降低细菌结合作用。单糖2－L－岩藻糖即使在175mM浓度时也无抑制活性。

幽门螺旋菌对乳蛋白结合的蛋白质免疫印迹复印分析

先将人初乳、羊乳和牛乳在SDS－PAGE上分离，然后转移至硝化纤维素滤膜上，再将此滤膜与细菌共同培育。在用人初乳作实验时，细菌对固相化糖蛋白的结合发现在90KD蛋白质位置，而细菌对羊乳和牛乳样品没有显示出任何结合作用。

幽门螺旋菌对新糖蛋白结合的蛋白质免疫印迹复印分析

将一系列新糖蛋白在SDS－PAGE上跑电泳后转移至硝化纤维素滤膜上。然后将滤膜与细菌共同培育，细菌对因相化糖蛋白的结合用金－结合标记的抗体来测定。金－结合标记抗体的信号通过银增强剂加以放大。结果可以证明，幽门螺旋菌对Le^b－HSA有特异性结合，对H－1－HSA有微弱的结合。

幽门螺旋菌对糖脂结合的高效薄层色谱复印分析

将一组糖脂在HPTLC－板上作色谱层析，与细菌共同培育，用AP－结合标记的抗体测定细菌对固定的糖脂的结合作用。即使将色谱彻底展开后，也未能测定出幽门螺旋菌对任何糖脂有结合作用。用相应的单克隆抗体测定相关糖脂中的Le^a抗原和Le^b抗原。

操作：将单克隆抗体和细菌复盖于所有5个初乳样品上进行比较，并把单克隆抗体和细菌复盖于经纯化的分泌性IgA以及50%和80%的$AmSO_4$组分上（8份样品＋Le^b结合物和一份MW－参照物）。

幽门螺旋菌对人胃上皮细胞的结合作用可用原位粘连测定法测定，实施例表明这种结合作用可被人初乳分泌性IgA抑制，人初乳分泌性IgA是携带有一个高度可变的N－和O－键连接的低聚糖位点的分子，然而血清IgA则没有这种抑制特性。用2－L－岩藻糖酶处理分泌性IgA，其抑制活性可被明显降低。为描述对幽门螺旋菌的岩藻糖酶敏感性受体结构的努力，已转向集中于揭示岩藻糖残基在分泌性IgA分子中的分布上。以单隆抗体和外源性凝集素所作的免疫印迹实验显示，二种类型的IgA通常都具有岩藻糖酰基化的糖结构，例如H－抗原，分支的Fucα1－6Glc－MAC，以及Le^x和Le^y－血型抗原。这些观察表明，如在H－抗原，分支的α－1，6－键连接的岩藻糖，或血型抗原中，在α－型链(含有Galβ1，3GleNAc)上显示的末端α－1，2－链连接的岩藻糖，其本身并不构成幽门螺旋菌受体。发现Le^b－血型抗原是一个局限于分泌性IgA的分泌性成分中的糖类化

合物结构。以前曾有报告提出，游离的分泌性成分中都存在 Le^x－抗原和 GlcNAcβ1－4(Fucα1－6) GlcNAcβ (Mizoguchi/Kobata，1982)，以及特殊的岩藻糖酰基化的糖结构，如 Fucα1－3Fuc 和 Galβ14 (Fucα1－6) GlcNAc (Purkayastha/Lamm, 1979)。然而，在二种类型的 IgA 中均未发现 Le^a－血型抗原，只是在与分泌性 IgA 共纯化的 120－150 KD 糖蛋白中测定出这种抗原。

对分泌性 IgA 样品分级分离色谱层析处理，可从 120－150KD蛋白中分离出分泌性 IgA。此外，这个高分子量的糖蛋白中还存在与分泌性成分等量的 Le^b－抗原，相当于 10 倍以上 Le^b与蛋白质的比率。

然后对分离出的蛋白质组分进行原位粘连测定，结果表明，120－150KD蛋白质如同是一个幽门螺旋菌结合作用的有效抑制剂，具有反映其 Le^b－抗原含量的抑制效价。

这些观察结果表明，Le^b－抗原是唯一的岩藻糖酰基化糖结构，并且是二种分泌性 IgA 分子，以及具有幽门螺旋菌结合抑制活性组分中的独特性结构。

有报告指出，分泌性成分的糖链是专门以 N－键连接的。以后牟分泌性IgA 和 120－150 KD 蛋白质的 Le^b抗原分布进行分析显示，这些抗原可能存在于 N－键和O－键连接的糖链上，因为在分泌性成分中，只是具有 Le^b的糖链能够被PNG 酶 F 断开释放出，甚至在 SDS－变性处理糖蛋白之后，以具有最大作用活性的糖苷酶处理也是如此。这表明，在糖蛋白中，Le^b血型抗原可能存

在于各种复杂的糖链上，除了糖脂之外，受体外形的变化也可能影响它们在人胃上皮细胞中作为功能性受体的效能(G1, PNAS)。

对作为 Le^b－阳性和 Le^b阴性糖蛋白天然来源的人初乳样品，分析其对细菌粘连作用的抑制特性。对通过免疫印迹技术证明含有富于 Le^a－抗原，但没有 Le^b－抗原的糖蛋白的初乳作原位粘连测定表明，这种初乳对细菌的粘连只有微弱的抑制作用，而富有 Le^b－抗原，少有 le^a－抗原的初乳，在原位粘连测定中，却是一个强有力的细菌粘连作用抑制剂。相比之下，混合的羊乳和混合的牛乳，在原位粘连测定中，二者对细菌结合都无抑制作用，这正如通过免疫印迹测定所证实的，与它们缺乏 Le^a－抗原和Le^b抗原有关。

为了分析携带有明确岩藻糖酰基化结构的糖蛋白所具有的精确的抑制作用特点，对一个新糖蛋白库进行了分析，分析其中的新糖蛋白在原位粘连测定中的抑制作用特性。发现专门携带有 Le^b－抗血型抗原的样糖蛋白结合物，是在浓度 1 μg/ml 下能够干扰细菌粘连作用的唯一结构，而 Le^a、LE^x和 Le^y－新糖蛋白；在浓度 100 μg/ml 下，仍未表现出任何抑制活性。这说明，除了存在于一个 1 型链上的末端岩藻糖之外，存在更多的岩藻糖残基也是幽门螺旋菌受体类似物的重要特点。还可能有另外一种解释，认为在此幽门螺旋菌受体的特异性可能取决于完整的二岩藻糖酰基化的糖链，但是由于 Le^y－(二岩藻糖酰基化的 2 型链) 是人工合成的一个四糖，其中GlcNAcβ1－3Galβ1－4Glc 序列，与完整的 2 型链相比较，被遗漏了，这就可能在与幽门螺旋菌相互作用

中，影响其粘连特性。这种极端高程度的特异性，可能是取决于在糖结合物中存在低聚糖，，为了用实验证明这点，对一批游离的岩藻糖酰基化的低聚糖，用原位粘连测定法，分析了它们对粘连作用的抑制特性。有趣的是，幽门螺旋菌接受单岩藻糖酰基化的H－低聚糖和二岩藻糖酰基化的Le^b－及Le^y－低聚糖，在20mM的浓度下作为其细菌粘连作用的有效抑制剂。受体对游离低聚糖的特异性，与对糖结合物的特异性相比较有所减弱，这表明，由于存在空间自由度，分支的岩藻糖残基的重要作用减小了。这种现象与外源性凝集素的行为相似，在此，它们对糖的特异性常常不能区别游离的低聚糖和糖结合物。衍生出2－岩藻糖酰胺的2型链和Fucα1－2Gal (H) －二糖也是有效的，只是需要稍微高的浓度。这点可能表明与二型链相比之下，1型链的优越性，并且/或者进一步指出，糖链的长度，如上讨论中所述，可能是一个重要的参数。在二岩藻糖酰基化的Le^y－中，分支的岩藻糖残基也可能对受体粘连性相互作用有点贡献，因为2岩藻糖酰乳糖似乎具有稍微弱的受体活性。Fucα1－4GlcNAcβ0－TMSE低聚糖链，在稍微高的浓度下具有出奇的抑制作用，这着重表明末端岩藻糖残基是重要的，虽然这种特异连接可能并非特异性的，并且随后还表明这个具有一个Fucα1－3－末端的单岩藻糖酰基化的3－岩藻糖酰基－乳糖（短Le^x），在高浓度能减弱细菌的结合作用。这表明，在游离低聚糖中，最好是在一条足够长的1型链上的末端Fucα1－2Gal－链，是幽门螺旋菌受体相似的最有效结构，但是，这种构型有可能缩减至H－二糖，并仍然保留抑制活性。

因为Le^b－抗原有可能存在于许多有或多或少复杂结构的糖

结合物中，所以观察抗 Le^b－抗原决定簇的单克隆抗体是否能够抑制细菌对人胃上皮细胞的结合也是很有意义的。识别 2 型链上 H－抗原的单克隆抗体被用作合适的阴性对照。通过将相同量的单克隆抗体加于胃上皮细胞组织切片上，如用 FITC－结合标记的抗小的白鼠抗体所测定的，当在加入细菌复盖切片之前，将组织切片与 Le^b－单克隆抗体共同培育，并同 H－2 单克隆抗体相比较，结果发现细菌的结合作用降低了。这表明，除了天然可溶性受体相似物或间隙因子的受体结构，例如初乳之外，Le^b－抗原也可能是宿主靶组织的幽门螺旋菌的受体结构。但是，当人们试图将存在于细胞表面的受体看作是凝固化的结构，那么，幽门螺旋菌与可溶性的，含有 Le^b的糖蛋白的相互作用就可被曲解。为了研究与固相化的糖受体相互作用的精确的特异性，应用了二种固相测定系统：将细菌受益于以蛋白质免疫印迹技术分离的新糖蛋白上，以及将细菌复盖于在高效薄层色谱板上分离的糖脂上。细菌的蛋白质免疫印迹复盖结果证明，细菌与 Le^b－新糖蛋白质之间有特异性相互作用，此外对 1 型链 (LNF1) 上的 H－抗原也有某些微弱的结合作用。

参考文献

Barthel, J. S., Westblom, T. U., Havey, A. D., Gonzalez, F. and Everett, E. D., *Arch. Intern. Med.* 148 (1988), 1149-1151

Ebeling et al. *Eur. J. Biochem.* 4 (1974), 91-97

Evans, D. G., Evans, D. J. Jr., and Graham, D. Y., *Infect. Immun.* 57 (1989), 2272-2278

Evans, D. G., Evans, D. J. Jr., Moulds, J. J., and Graham, D. Y., *Infect. Immun.* 56 (1988), 2896-2906

Fauchére, J.-L., and Blaser, M. J., *Microb. Pathog.* 9 (1990), 427-439

Holmgren, J., Lönnroth, I., Månsson, J.-E., and Svennerholm, L, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975), 2520-2524

Knibbs, R. N., Goldstein, I. J., Ratcliffe, R. M., and Shibuya, N., *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 83-88

Lee, E. R., Trasler, J., Dwivedi, S., and leBlond, C. P., *Am. J. Anat.* 164 (1982), 187-207

Lee, E. Y., Seetharam, B., Alpers, D. H. and DeSchryver-Kecskemeti, K., *Gastroenterol.* 97 (1989), 1171-1180

Manzi, A. E., Dell, A., Azadi, P., and Varki, A., *J. Biol. Chem.* 265 (1990), 8094-8107

Mizoguchi, A., Mizuochi, T., and Kobata, A., *J. Biol. Chem.* 257(16) (1982), 9612-9621

Ota, H., Katsuyama, T., Ishii, K., Nakayama, J., Shiozawa, T., and Tsukahare, Y., *Histochem. J.* 23 (1991), 22-28

Purkayastha, S., Rao, C.V.N., and Lamm, M.E., *J. Biol. Chem.* 254(14) (1979), 6583-6587

Roth, K. A., Cohn, S. M., Rubin, D. C., Trahair, J. F., Neutra, M. R. and gordon, J. I, *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol.)* 263 (1992), G186-G187

Saitoh, T., Natomi, H., Zhao, W., Okuzumi, K., Sugano, K., Iwamort, M., and Nagai, Y., *FEBS Lett.* 282 (1991), 385-387

Savage, A. V., D'Arcy, S. M. T., and Donoghue, C. M., *Biochem. J.* 279 (1991), 95-103

Shibuya, N., Goldstein, I. J., Broekaert, W. F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B., and Peumans, W. J., *J. Biol. Chem.* 262 (1987), 1596-1602

Sweetser. D. A., Birkenmeier, E. H., Hoppe, P. C., McKeel, D. W., and Gordon, J. I., *Genes Devel.* 2 (1988), 1318-1332

Warren, J. R., and Marshall, B., *Lancet* 1 (1983), 1273-1275

Westblom, T. U., Madan, E., Subik, M. A., Buriex, D. E., and Midkiff, B. R., *Scand. J. Gastroenterol.* 27 (1992), 249-252

Woodward, M. P., Young, W. W Jr., and Bloodgood, R. A., *J. Immunol. Meth.* 78 (1985), 143-153



图 1A

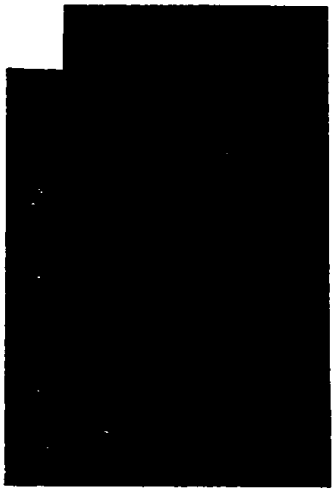


图 1B

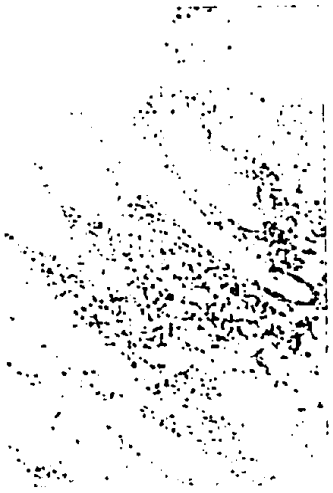


图 1C



图 1D



图 1E

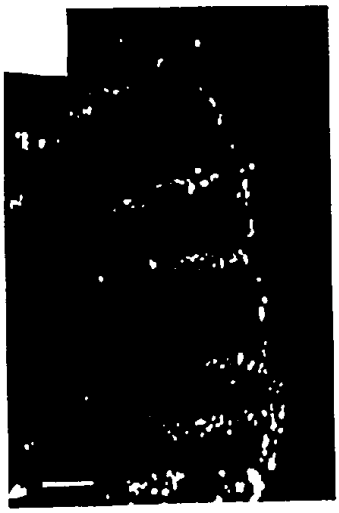


图 1F



图 1G



图 1H

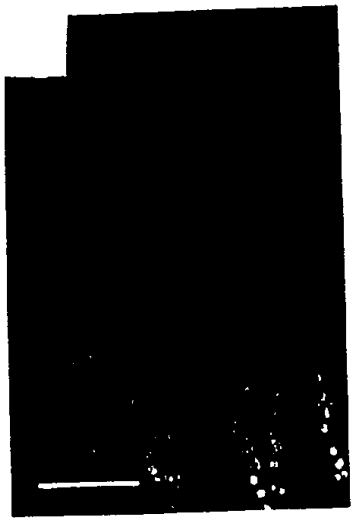


图 1I

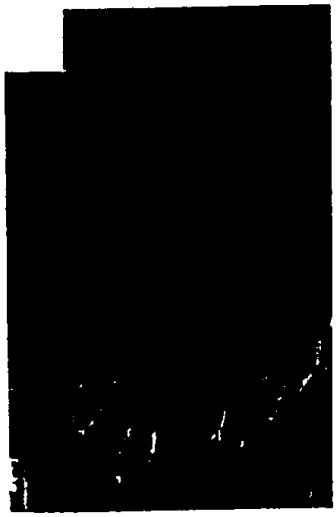


图 1J



图 1K



图 1L



图 2A



图 2B

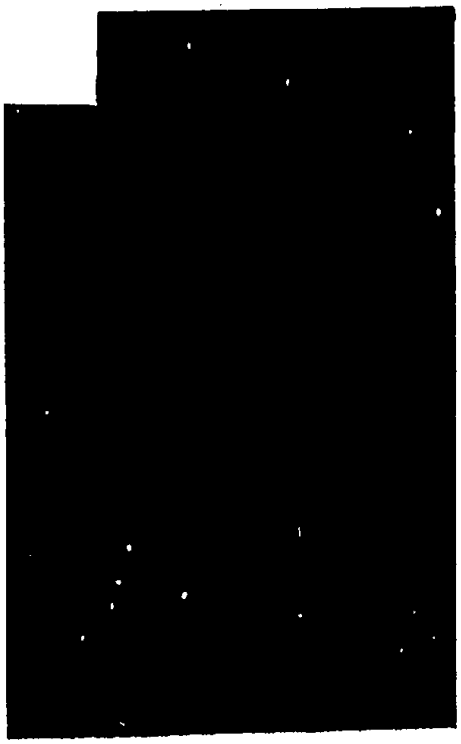


图 2C

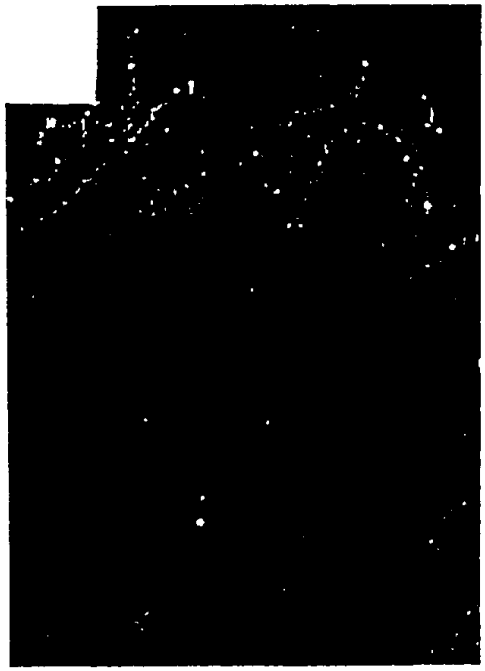


图 2D

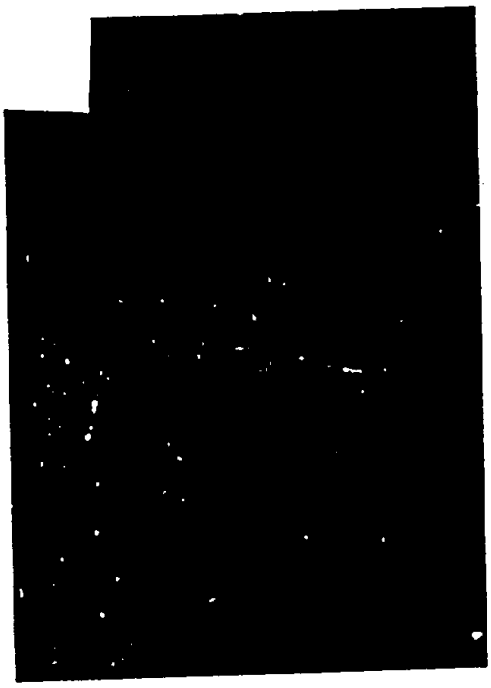


图 2E



图 2F

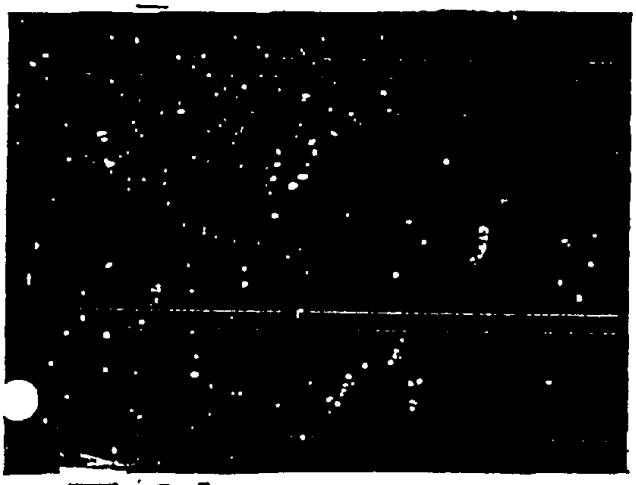


图 3A

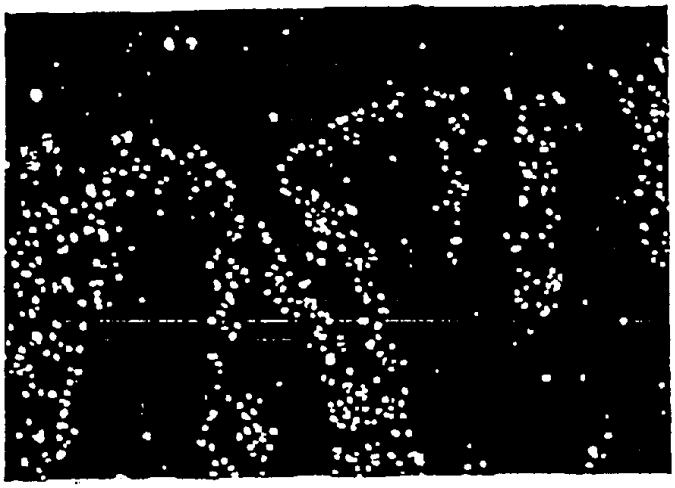


图 3B



图 3C