مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال هشتم ● شماره ۱ ● صفحات ۱ تا ۵ ● بهار ۱۳۸۹

اثر سینرژیسمی پروتئین نوترکیب CagA و LPS سروتیپ O_2 هلیکوباکتر پیلوری در بروز پاسخ ایمنی مناسب علیه این باکتری

داوود اسماعیلی[۱]، *اشرف محبتی مبارز[۲]، علی هاتف سلمانیان[۳]، احمد زواران حسینی[۴]، مهدی مهدوی[۵]

تاریخ اعلام وصول: ۸۹/۱/۷ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۸۹/۳/۱۶

چکیده

سابقه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری یکی از عوامل عفونی باکتریایی معده بوده که در سراسر جهان گزارش شده است. با توجه به اهمیت لیپوپلی ساکارید و cagA، این مطالعه در صدد بررسی اثر سینرژیسمی ایمنی زایی این دو فاکتور به منزله انتخاب کاندید ایمونیزاسیون مناسب علیه این باکتری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی لیپوپلی ساکارید سروتیپ O_2 هلیکوباکتر پیلوری به روش فنل داغ تخلیص و پروتئین نوترکیب CagA در وکتورهای مناسب بیان و با استفاده از ستون نیکل خالص شد. سپس موش‌های BALB/c با غلظت‌های مناسب از این آنتی ژن‌ها ایمونیزه و پاسخ ایمنی در آنها مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نسبت IgG۱/IgG۲α در موش‌های ایمونیزه شده با دو آنتی ژن لیپو پلی ساکارید و rCagA و rCagA به تنهایی و یا همراه با ادجوانت CpG کمتر از یک می‌باشد که موید پاسخ ایمنی به سمت Th۱ می‌باشد. پاسخ تولید اینترفرون گاما به هنگام تزریق این دو آنتی ژن با همدیگر افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان داد.

نتیجه‌گیری: ایمن سازی علیه هلیکوباکتر پیلوری به طور احتمال در آینده به عنوان اولین انتخاب در پیشگیری از بیماری به کار می‌رود. با توجه به اینکه ایمنی حفاظتی علیه این باکتر ی پاسخ ایمنی Th۱ و به عبارتی بالانس Th۱/Th۲ می‌باشد. در این تحقیق مشاهده شد که دو آنتی ژن لیپو پلی ساکارید و rCagA دارای اثرات سینرژیسمی در ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولار می‌باشند.

کلمات کلیدی: سینرژیسم، لیپوپلی ساکارید، سروتیپ O_2، CagA نوترکیب، هلیکو باکتر پیلوری

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یکی از عوامل عفونی باکتریایی معده بوده که در سراسر جهان گزارش شده است و در محیط‌های مختلفی که بقای سایر باکتری‌ها در آنها امکان پذیر نیست زنده می‌ماند (۱، ۲). این باکتری از عوامل اصلی گاستریت و کانسر معده، بیماری ایسکمیک قلبی و آدنو تانسیلار می‌باشد (۳، ۴، ۵، ۷، ۶). عفونت هلیکوباکتر یک بیماری جهانی است که حدود نیمی از جمعیت دنیا را تحت تاثیر قرار داده است. مشکل عفونت بیشتر در کشورهای فقیرتر است. آب آشامیدنی می‌تواند از منابع اصلی آلودگی در کشورهای در حال توسعه باشد (۹، ۸). از بین آنتی ژن‌های این باکتری لیپو پلی ساکارید از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است. این ترکیب سبب فعال شدن سلول‌های ایمنی و تحریک ترشح پپسینوژن،

۱ـ دانشجوی دکترا، ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری شناسی
۲ـ دانشیار، ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری شناسی (*نویسنده مسؤول)
تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۳۸۶۲ آدرس الکترونیک: mmmobarez@modares.ac.ir
۳ـ دانشیار، ایران، تهران، پژوهشگاه و مرکز ملی مهندسی ژنتیک، گروه بیوتکنولوژی
۴ـ استاد، ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی
۵ـ دانشجوی دکترا، ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی

www.SID.ir

هیستامین وگاسترین (که در این باکتری منحصر به فرد است) می‌شود. خصوصیات لیپو پلی ساکارید (LPS) هلیکوباکتر پیلوری هم در مزمن شدن عفونت و هم توسعه بیماری نقش دارند (۱۴– ۱۰). عفونت هلیکوباکتر پیلوری و آندوتوکسین آن باعث سپتی سمی و شوک سپتیک نمی‌شود. خصوصیات LPS هلیکوباکتر پیلوری هم در مزمن شدن عفونت و هم توسعه بیماری نقش دارند (۱۴– ۱۰). سمیت LPS این باکتری ۱۰۰۰۰–۵۰۰ برابر کمتراز LPS اشریشیا کلی و سالمونلا است و ساختار لیپید A مسوول سمیت پایین این باکتری می‌باشد. آندوتوکسین هلیکو باکتر پیلوری باعث سپتی سمی و شوک سپتیک نمی‌شود (۱۰). خصوصیات LPS هلیکوباکتر پیلوری هم در مزمن شدن عفونت و هم توسعه بیماری نقش دارند (۱۴– ۱۰). از طرفی سویه‌های تیپ ۱ که واجد ژن cagA (Cytotoxic associated gene A) هستند گاستریت‌های مزمن و شدید ایجاد می‌کنند و باعث بروز مراحل پیشرونده به سمت سرطان معده مثل دیسپلازی می‌شوند. از طرفی در دئودنیت و گاستریت حاد نیز سویه‌های $cagA^+$ دیده می‌شود. لذا ارتباط بین شدت بیماری زایی و حضوراین آنتی ژن از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (۱۹–۱۵). با توجه به اهمیت لیپوپلی ساکارید و cagA در هلیکوباکتر پیلوری، این مطالعه در صدد بررسی اثر سینرژیسمی ایمنی زایی این دو آنتی ژن به منزله انتخاب کاندید ایمونیزاسیون مناسب علیه این باکتری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری

در این مطالعه تجربی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری روی محیط بروسلا آگار غنی شده با سرم جنین گوساله (FCS)، خون دفیبرینه گوسفند و آنتی بیوتیک‌های ونکومایسین، پلی میکسین ب، تری متوپریم و آمفوتریسین ب کشت داده شدند ودر حضور ۱۰ درصد دی اکسید کربن به مدت ۷روز در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. کلنی‌ها با رنگ آمیزی گرم، تست‌های کاتالاز، اوره آز سریع و اکسیداز تاییدشدند. سپس DNA ژنومیک با استفاده از کیت استخراج DNA استخراج و در ۲۰– نگهداری شدند.

خالص سازی پروتئین نوترکیب CagA

یک جفت پرایمر باسایت‌های آنزیمی BamH۱ و Sac۱ برای تکثیر ژن cagA هلیکوباکتر پیلوری بر اساس بانک ژنوم طراحی و توسط شرکت سیناژن سنتز گردیدند. پرایمرهای پیشرو و معکوس (forward) F: ۵/- aaggatccactaacgaaaccattgacca-۳ و (reverse) R:۵/-aagagctcactccctcaactctaacatt-۳/ قادر بود قطعه‌ای به طول ۸۴۱ جفت باز را تکثیر نماید.

فرآورده‌های PCR با استفاده از کیت Bioneer تخلیص، سپس با استفاده از T۴ DNA ligase با نسبت مولکولی ۵:۱ قطعه هدف و وکتور pet ۲۸ a (فرمنتاز) در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت متصل شدند. سپس محصول در E. coli DH ۵α (Novagen) ترانسفورم و با PCR و هضم آنزیمی(Roche) شناسایی و تایید شدند. پلاسمیدهای نوترکیب مطابق با دستورالعمل کیت Bioneer استخراج پلاسمید و سپس به داخل وکتور بیانی۲۱ –E.coli BL pLysS (DE۳)ترانسفورم شدند و بعد روی محیط LB آگار حاوی ۳۰ug/ml کاناماسین و۳۴ ug/ml کلرامفنیکل کشت شدند و با هضم آنزیمی کم اثر و PCR شناسایی شدند. سلول‌های اشریشیا کلی بیانی حاوی pET-۲۸a/cagA بعد از کشت و رسیدن به ۰/۶-۰/۸ =OD۶۰۰ با IPTG (سیگما) با غلظت نهایی یک میلی مولار القا گردیدند و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت رشد داده شدند. سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری و سپس در بافر لیز کننده (EDTA ۱۰ mM,۱٪(v/v) Triton X-۱۰۰, ۲۰mM Tris-Hcl,PH=۷/۵, Nacl ۰/۵ M, PMSF ۱ mM) سوسپانسیون شدند. بعد فریز، ذوب و روی یخ در حضور PMSF (سیگما) سونیکت شدند. پروتئین‌های نوترکیب در۱۴۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و در فاز سوپرنتانت جمع آوری شدند.

کشت انبوه هلیکوباکتر پیلوری به منظور جداسازی لیپوپلی ساکارید

هلیکوباکتر پیلوری سروتیپ O_2 (اهدایی توسط دکتر گراهام از بوستون آمریکا) در محیط بروسلا براث غنی شده، در شرایط مناسب کشت و پس از رشد مناسب باکتری‌های موجود با افزودن فنل (w/v) ۰/۰۲ کشته، جمع آوری و سانتریفوژ گردیدند.

استخراج لیپو پلی ساکارید سروتیپ O_2 مطابق روش فنل–داغ انجام شد (۲۱). برای شناسایی LPS استخراج شده از روش SDS-PAGE و رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

تست تب زایی در خرگوش‌ها

سه عدد از خرگوش‌های نیوزیلندی با وزن ۰/۳ ± ۰/۲ kg از موسسه رازی تهیه شدند و در جه حرارت مقعدی سه بار و در فواصل ۱۵ دقیقه به مدت ۳-۱ ساعت اندازه گیری شدند.

تست کشندگی در موش‌ها

موش‌های Balb/c ۸-۶ هفته‌ای با وزن۳g ۱۷± خریداری شده از دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) درسه گروه ۶ تایی تقسیم شدند. هر کدام از موش‌ها در هر گروه با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میکروگرم از LPS به صورت داخل صفاقی تزریق شدند. مو ش‌های کنترل با ۰/۲ ml از PBS عاری از پیروژن تزریق شدند و نتایج تست طی ۶ روز بررسی گردیدند.

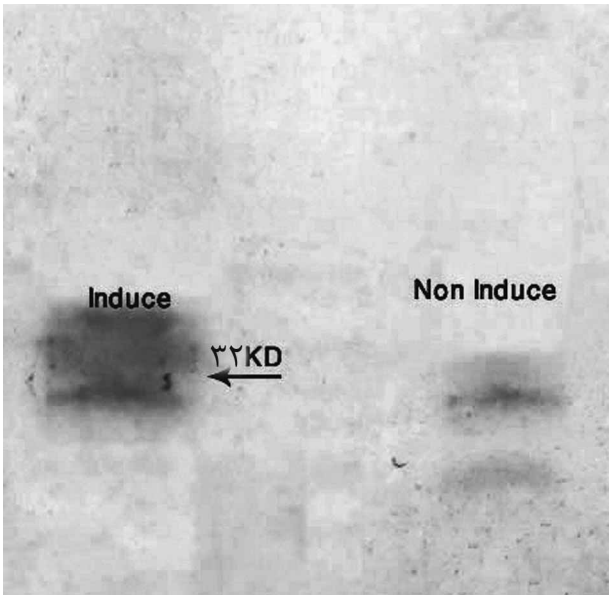
ایمونیزاسیون مدل آزمایشگاهی

سه گروه ۵ تایی از موش‌های Balb/c به صورت عضلانی در فواصل ۱۰ روزه ایمونیزه شدند. ایمونیزاسیون در گروه اول با ۱۰ میکروگرم rCagA، در گروه دوم با ۱۰ میکروگرم rCagA به همراه۱۰ میکروگرم ادجوانت CPG انجام گرفت. گروه سوم همان حجم از PBS را دریافت نمودند. سرم‌ها ۷ روز بعد از ایمونیزاسیون جمع آوری و آنتی بادی‌های IgG1 و IgG2α اختصاصی rCagA از طریق ELISA اندازه گیری شدند. همچنین سه گروه با همان دوز از لیپو پلی ساکارید سروتیپ O_2 هلیکوباکتر پیلوری ایمونیزه شدند. این تحقیق بخشی از پایان نامه دکتری تخصصی باکتری شناسی پزشکی می‌باشد که در دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

یافته‌ها

تکثیر قطعه cagA هلیکوباکتر پیلوری

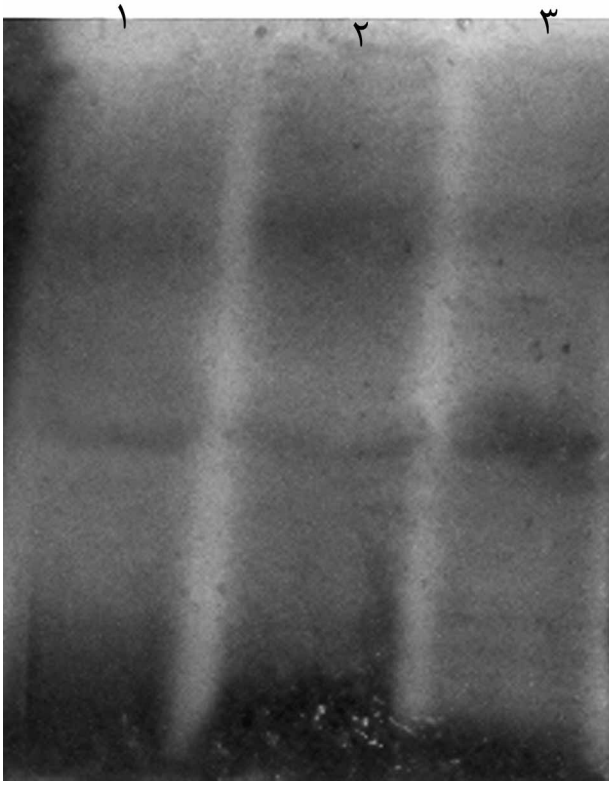
cagA با استفاده از پرایمر ذکر شده تکثیر و اندازه قطعه تکثیر شده ۸۴۱ جفت باز بود. پلاسمید نوترکیب از باکتری‌ها استخراج و به عنوان الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلی مراز مورد استفاده قرار گرفت. پلاسمید نوترکیب حاوی ژن مورد هدف بود که نشان دهنده ترانسفورم موفق ژن مزبور داخل E.coli DH5α می‌باشد. پروتئین نوترکیب CagA بیان شده با استفاده از ستون نیکل (کیاژن) تخلیص شد. فراکشن‌ها از طریق وسترن بلات شناسایی گردیدند. [شکل ۱]



شکل ۱- وسترن بلات پروتئین ریکامبینانت CagA (۳۲ کیلو دالتونی) با پلی کلونال آنتی بادی خرگوشی

آنالیز لیپو پلی ساکارید

لیپو پلی ساکارید سروتیپ O_2 با SDS-PAGE، ۱۴ درصد اوره، ۴ مولار آنالیز (شکل ۲) و با نیترات نقره رنگ آمیزی شدند. (شکل ۲)



شکل ۲- باندهای LPS خالص شده سروتیپ O_2 هلیکوباکتر پیلوری در رنگ آمیزی نیترات نقره در چاهک‌های ۱، ۲، ۳

Archive of SID
www.SID.ir

لیپو پلی ساکارید استخراج شده یک الگوی الکتروفورتیک نردبانی شکل نشان داد که در سه گروه با وزن‌های مولکولی بالا، متوسط و پایین قرار گرفتند.

ایمونیزاسیون

نسبت IgG۱/IgG۲a در موشهای ایمونیزه شده با r CagA به تنهایی و همراه با ادجوانت CpG کمتر از یک می‌باشد که نشانه پاسخ ایمنی Th۱ می‌باشد. در حالی که در گروه کنترل این نسبت بیشتر از یک بوده که نشانه پاسخ ایمنی Th۲ می‌باشد. (جدول ۱)

جدول ۱- مقایسه تولید ایزوتایپ‌های IgG در موش‌های ایمونیزه شده با پروتئین ریکامبینانت CagA

گروه	Immunization	IgG۱/IgG۲α ratio
۱	rCagA	۰/۵ ± ۰/۹۵
۲	rCagA+CPG	۰/۲ ± ۰/۷۳
۳	PBS	۰/۴ ± ۱/۳۷

در جدول ۲ اثرات سینرژیسمی دو آنتی ژن لیپو پلی ساکارید و rCagA در افزایش میزان اینترفرون گاما نسبت به گروه کنترل بخوبی قابل ملاحظه می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه اثر سینرژیسمی پروتئین ریکامبینانت CagA و LPS درموش‌های ایمونیزه شده با این آنتی ژن‌ها

گروه	آنتی ژن	اینترفرون گاما	IgG۱/IgG۲α
۱	LPS	۲۰۵ ± ۰/۴	۰/۶۳ ± ۰/۳
۲	rCagA+LPS	۲۷۹ ± ۰/۲	۰/۵۷ ± ۰/۲
۳	PBS	۱/۳۷ ± ۰/۴	۱/۰۲ ± ۰/۴

بحث و نتیجه‌گیری

شیوع بالای عفونت هلیکوباکتر پیلوری در جهان و نقش آن در بدخیمی‌های معده و پیدایش مقاومت آنتی بیوتیکی باعث شده که روش‌های درمانی مختلفی علیه این عفونت پیشنهاد شود. امروزه ایمن سازی به عنوان یک یافته هم در پیشگیری و هم درمان عفونت‌های هلیکو باکتر پیلوری مورد تایید قرار گرفته است (۲۴، ۲۳). هر چند تاکنون پیشرفت مطلوبی در این زمینه حاصل نشده که یکی از دلایل آن عدم شناخت کافی از فاکتورهای ویرولانس و ایمنی مطلوب علیه این باکتری می‌باشد. لذا توسعه فرمولاسیون آنتی ژن فعال که قابلیت القای پاسخ مطلوب ایمنی را در محل مناسب داشته باشد، ضروری است. به همین دلیل طراحی قطعه آنتی ژن و ایمونوژن مطلوب از اهمیت به سزایی برخوردار است. انتخاب نهایی آنتی ژن برای استفاده در واکسن به میزان حفاظت این آنتی ژن‌ها از بدن حین عفونت با هلیکوباکتر پیلوری بستگی دارد. همچنین نقش آنها به عنوان فاکتورهای بیماریزا و حفظ خواص ایمونولوژیک آنها وقتی به عنوان پروتئین‌های نوترکیب به کار می‌روند باید مد نظر باشد. تاکنون آنتی ژن‌های مختلفی از این باکتری جهت طراحی واکسنی مناسب مورد بررسی قرار گرفته اند. VacA (توکسین واکوئله کننده) به همراه cagA (سیتوتوکسین مربوط به ژن A) و NAP (پروتئین فعال کننده نوتروفیل) درمدل حیوان آزمایشگاهی و داوطلبین آلوده تست شده و توانسته است پاسخ ایمنی سلولار را تحریک نماید. اما به علت مشکلاتی که در تغییرات آنتی ژنی VacA و سلامتی این واکسن وجود دارد، نیاز به فرمولاسیون‌ها و ترکیبات آنتی ژنی جدید می‌باشد (۲۸). در این مطالعه قطعه مناسبی از cagA که پاسخ مناسب را تحریک و فاقد تنوع آنتی ژنی باشد در ۸۴۱ جفت باز اولیه قسمت N ترمینال این ژن طراحی گردید. که پاسخ تحریک ایمنی آن نسبت به تست کنترل بیشتر بود. (جدول ۱) همچنین از لیپوپلی ساکارید سروتیپ O_2 این باکتری که فاقد خاصیت تب زایی و سمی می‌باشد و قادر به بیان آنتی ژن لوئیس نمی‌باشد، برای این منظور استفاده شد که پاسخ ایمنی بیشتر از گروه کنترل و rCagA داشت. هنگامیکه LPS به همراه rCagA استفاده گردید، در تحریک پاسخ ایمنی و تولید IFNγ افزایش قابل ملاحظه‌ای مشاهده گردید. بنابراین به خاطر تحریک مناسب پاسخ ایمنی هومورال و سلولی توسط پروتئین نوترکیب (جدول ۲) و مناسب بودن LPS سروتیپ O_2 به عنوان کاندید ایمونیزاسیون در این تحقیق، این دو آنتی ژن را می‌توان در فرمولاسیون ترکیبات ایمونیزاسیون چند جزیی علیه هلیکوباکتر پیلوری پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

از آقای دکتر گراهام و دکتر کاستر به جهت همکاری‌های علمی و اهدا سویه‌های تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1- Talley NJ, Fock KM, Moayyedi P.Gastric cancer consensus conference recommends Helicobacter pylori screening and treatment in symptomatic persons from high-risk populations to prevent gastric cancer, Am. J. Gastroenterol. 2008;103: 510–514

2- Del Giudice G, Covacci A, Telford JI, Montecucco C, Rappuoli R. The design of vaccines against H. pylori and their development. Annu Rev Immunol. 2001; 19: 523-63.

3- Velin D, Michetti P. Immunology of H. pylori Infection. Digestion 2006; 73: 116-123.

4- Yamazaki S, Shunji K, Matsukura N. Identification of H. pylori and the cagA genotype in gastreic biopsies using highly sensitive real-time PCR as a new diagnostic tool. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2004; 44: 261-268.

5- Osamu H, Yuji Na, Toshikazu Y. CagA protein of H. pylori: A hijacker of gastric epithelial cell signaling. Biochemical Pharmacology 2007; 73: 1697-1702.

6- Mohammed S, Sheila N, Roger WS. CagA H. Pylori induce greater levels of PGE2 than cagA- strains. Prostaglindins & other lipid Mediator 2004; 73: 181-189.

7- Saltik IN, Hulya DDE. The cagA Status of H. pylori isolates from dyspeptic children in Turkey. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2003; 36: 147-149.

8- Antonio D, Alfonso B, Patrizia R. Coexpression of H. Pylori's Proteins CagA and HspB Induces cell proliferation in AGS gastric epithelial cells, independently from the bacterial infection. Cancer Research 2003; 63: 6350-6356.

9- Kivi M & Tindberg Y. Helicobacter pylori occurrence and transmission: a family affair? Scand J Infect Dis.2006; 38: 407–417.

10- Anthony P M. Lipopolysaccharide in bacterial chronic infection: Insights from H. pylori lipopolysaccharide and LipidA. International Journal of Medical Microbiology 2007; 327-335.

11- Ireneusz Tp, Anthony PM, Richard HH. Effect of purified lipopolysaccharides from strains of H. pylori and H. felis on acid secretion in mouse gastric glands In Vitro. Infection and Immunity 2001; 3891-3896.

12- Mario AM, Ben JA. Lipopolysaccharide structures of H. pylori genomic strains 26695 and J99, mouse model H. pylori Sydney strain, H. pylori P466 carrying sialyl lewis X and H. pylori UA 915 expressing Leb. Eur J Biochem 2000; 267: 305-320.

13- Christopher J, Henry A, Yan Huang A, Angela M, Wynne A, Jonathan P. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1b and anti-inflammatory IL-10 cytokines. Brain, Behavior, and Immunity. 2009; 23: 309-317

14- Ireneusz T P, Anthony P M, Richard H H. Effect of purified lipopolysaccharides from strains of H. pylori and H. felis on acid secretion in gastric glands in vitro. Infection and Immunity 2001; 3891-3896.

15- Markus R, Antonello C. Tyrosine phosphorylation of the H. pylori CagA antigen after cag-driven host cell translocation. PNAS 2000; 97: 1263 – 1268.

16- Yamazaki S, Shunji K, Matsukura N. Identification of H. pylori and the cagA genotype in gastreic biopsies using highly sensitive real-time PCR as a new diagnostic tool. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2005; 4: 261-268.

17- Osamu H, Yuji Na, Toshikazu Y. CagA protein of H. pylori: A hijacker of gastric epithelial cell signaling. Biochemical pharmacology. 2007; 73: 1697-1702.

18- Mohammed S, Sheila N, Roger WS. CagA H. pylori induces greater levels of PGE2 than cagA- strains. Prostaglindins& other lipid Mediator 2004; 73: 181-189.

19- saltik IN, Hulya D D E. The cagA status of H. pylori isolates from dyspeptic children in Turkey. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2003; 36: 147-149.

20- Britton S, Papp-Szabo E, Taylor DE. A Novel Helicobacter pylori Cell-Surface Polysaccharide. Carbohydrate Research 2005;340 (9): 1605-1611.

21- Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods in Carbohydrate Chemistry. In R. L. Whistler (ed.) Academic Press, Inc., New York, N.Y: 1965. 83- 91.

22- Bumette W. Helectrophoretic transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinate protein. Anal Biochem 1981; 112: 195-203.

23- Ohnishi, N, Yuasa H, Tanak S, Sawa H, Miura M, Matsui A, Higashi H, Musashi M, Iwabuchi K, Suzuki M, Yamada G, Azuma T and Hatakeyama M. Transgenic expression of Helicobacter pylori CagA inducesgastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. Proc. Natl. Acad. Sci.2008;105: 1003–1008.

24- Czin SJ, Cai A, Nedrub JG.Protection of germ-free mice from infection by H. felis after active oral or passive IgA immunization.Vaccine 1993;11: 63-642.

25- Nystrom J, Raghavan AMS. Mucosal immune responses are related to reduction of bacterial colonization in the stomach after therapeutic H. pylori immunization in Mice. Microbes and Infection. 2006; 8: 442-449.

26- Jie Y, Yuan W, Shi Heshao F, Mao Y. Construction of prokaryotic expression system of LTB-UreB fusion gene and identification of the recombination protein Immunity and adjuancity. World Journal of Gastroenterology 2004; 10 (18): 2675-2679.

27- Philips S, John W, Tadashi K, Isabelle W, Adrian L.Therapeutic immunization against Helicobacter pylori infection in the absence of antibodies.Immunology and Cell Biology.2000: 78: 28-30

28- Rossi G, Ruggiero P, Peppoloni S. Therapeutic vaccination against H. pylori in the Beagle Dog experimental model: Safety, immunogenicity, and efficacy. Infect Immun 2004; 72 (6): 3252–3259.

Archive of SID

www.SID.ir

Synergistic effect of rCagA and LPS of *H. pylori* O_2 serotype in induction of proper immune response against *H. pylori*

Esmaeili.D; Mcs[1], *Mobarez, M.A; Ph.D[2], SalmanianH, A; PhD[3], Zavaran.A; phD[4], Mahdavi.M; Mcs[5]

Received: 21 Mar 2010 Accepted: 30 May 2010

Abstract

Background: *H. pylori* is one of gastric bacterial infectious agents that reported from world whole. This organism is heterogen and have hyper variable regions in its genome that to cause organism escape from immune response. *H. pylori* cagA$^+$ strains will report that is stimulating factor for adenocarcinoma, gastritis in infected persons. *H. pylori* LPS have less toxicity, mitogenicity and pyrogenicity than Entrobactericeae. In this study we investigated the LPS and rCagA senergistic effect on stimulation of Th1 immune response in mice model.

Materials &Methods: LPS of *H. pylori* O_2 serotype was extracted by hot phenol-water method. Proper conserved fragment of cagA was expressed in proper vectors. These antigens were injected to Balb/c mice and immune response was assayed by ELISA

Results: The IgG1/IgG2a ratio in the immunized mice with rCagA and rCagA plus CpG was <1, indicating a Th1 type response, while the control group was >1, indicating a strong Th2 response. In mice immunized with LPS and rCagA, the immune response elevated which indicated synergistic effect of this antigen on stimulating of strong immune response against *H. pylori* infection

Conclusion: Effective immunizations against *H. pylori* will possible affected treatment in next future. Protective immune response in *H. pylori* is balance between Th1/Th2.These data suggest that immunization with rCagA and LPS promoted a Th1 immune response. *H. pylori* rCagA and LPS serve as an excellent antigen for immunization. In conclusion, we recommended multicomponent vaccine contain of rCagA and LPS for vaccine formulation against *H. pylori* infection.

Keywords: LPS, rCagA, O_2 serotype, Synergistic effect, *H. pylori*

1- Student of Phd, Tarbiat Modarres University, Faculty Of Medical Science, Dept. of Bacteriology, Tehran, Iran

2- (*Corresponding author) Associate Professor, Tarbiat Modarres University, Faculty Of Medical Science, Dept. of Bacteriology, Tehran, Iran. Tel: 02182883862 E-mail: mmmobarez @ modares.ac.ir

3- Associate Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

4- Professor, Tarbiat Modarres University, Faculty Of Medical Science, Dept. of Immunology, Tehran, Iran

5- Student of Phd, Tarbiat Modarres University, Faculty Of Medical Science, Dept. of Immunology, Tehran, Iran

Archive of SID

www.SID.ir