文章编号:1000-5404(2009)02-0109-04

论著

重组表达幽门螺杆菌致病岛 CagL 蛋白及其中和抗体初步研究

钟　情,邹全明,郭　刚,章金勇,张晓丽　　(第三军医大学医学检验系临床微生物及免疫学教研室,重庆 400038)

摘　要:目的　重组表达幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,*Hp*)cagL 基因,并制备兔抗多克隆抗体及阻断 *Hp* 黏附宿主细胞实验。**方法**　用 PCR 方法扩增出 cagL 基因片段,将目的基因构建至表达载体 pET22b 中并诱导表达。采用亲和层析法纯化蛋白,以纯化蛋白为抗原免疫家兔,制备兔抗 CagL 多克隆抗体血清,并用多克隆抗体血清进行阻断 *Hp* 黏附宿主细胞实验及细胞因子 IL-8 活性分析。**结果**　成功构建表达纯化了 CagL 重组蛋白,制备 CagL 蛋白兔抗多克隆血清,并初步验证了多克隆抗体血清在体外和 *Hp* 黏附作用的关系。与对照菌相比,重组菌 CagL 在 25×10^3 附近均出现新的蛋白表达条带,且诱导 6 h 时表达量最高。UVP 扫描分析目的蛋白占菌体总蛋白的 35% ~40%。SDS-PAGE 显示重组蛋白 CagL 主要以包涵体形式存在于超声沉淀中。ELISA 结果显示兔抗 CagL 多克隆抗体的滴度为 1∶16 000 EU。Giemsa 染色后显微镜观察可见 *Hp* 菌与 HeLa 细胞呈典型的聚集性黏附,抗体中和后 *Hp* 与 HeLa 细胞未见黏附,加入 DH5α 的 HeLa 细胞也未见细菌黏附。**结论**　多克隆抗体血清对 *Hp* 黏附定植有一定阻断作用,并且可以减少 *Hp* 促进细胞分泌 IL-8 的能力。

关键词: 幽门螺杆菌;Ⅳ型分泌系统;CagL 蛋白;IL-8;黏附阻断
中图法分类号: R378;R392-33;R392.1　　**文献标识码:** A

Preparation of recombinant CagL protein of *Helicobacter pylori* and its neutralization antibody

ZHONG Qing, ZOU Quan-ming, GUO Gang, ZHANG Jin-yong, ZHANG Xiao-li (Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective　To study the function of CagL protein of recombinant *Helicobacter pylori* (*Hp*) through preparing rabbit anti-CagL specific polyclonal antibody and blocking the adhesion of *Hp* with host cells. **Methods**　CagL gene was amplified by PCR, then constructed into prokaryotic expression vector pET-22b. Expressed protein of CagL was purified by affinity chromatography, and then used to immunize rabbits to prepare anti-CagL polyclonal antibody serum, so as to detect whether CagL polyclonal antibody serum can block the adhesion of *Hp* with host cells and analyze the activity of IL-8. **Results**　Recombinant CagL protein was successfully constructed and purified. CagL polyclonal antibody serum played a stronger role in blocking the adhesion of *Hp* with host cells, and can induce host cells to secrete IL-8. **Conclusion**　Our study suggests that CagL plays a role in *Hp* pathogenicity and colonization, and secretion of IL-8.

Key words: *Helicobacter pylori*; type Ⅳ secretory system; CagL protein; IL-8; adhesion blocking

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *Hp*)为革兰阴性微需氧菌,是慢性胃炎、胃十二指肠溃疡的重要致病因素,与胃癌、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤发生密切相关,世界卫生组织已将其列为一类致病因子[1]。据统计,世界人群 *Hp* 感染率超过 50%,但其致病机制尤其是在宿主中持续感染的机制仍不是很清楚,治疗 *Hp* 感染所面临的形势日趋严峻。*Hp* 菌株含有 1 个约 40 kb 的特殊基因片段,即 cag 致病岛(cytotoxin associated gene pathogenicity island, cag PAI),该片段只出现于致病相关菌株,基因呈高密度分布,并编码 1 个分泌转运系统,称为Ⅳ型分泌系统(type Ⅳ secretion system, TFSS),由 32 种蛋白组成[2,3]。CagL 蛋白是其纤毛状结构表面的 1 个结构蛋白,它参与了转运 CagA 蛋白和 *Hp* 诱导上皮细胞内一系列致病作用,故在 *Hp* 的致病中起着关键作用[4]。因此,通过基因工程技术制备Ⅳ型分泌系统中的 CagL 蛋白,并利用 CagL 多克隆抗体血清进行 *Hp* 黏附阻断实验,探明 CagL 的作用,将有助于进一步明确 *Hp* Ⅳ型分泌系统这个装置是如何转运蛋白进入宿主细胞的确切机制,并为临床

作者简介:钟　情,女,江西省九江市人,硕士研究生,技师,主要从事分子生物学和致病机制方面的研究,现在广州军区武汉总医院检验科。E-mail: zqggm@163.com
通信作者:邹全明, 电话:(023)68752316
收稿日期:2008-06-20;修回日期:2008-10-20

诊断和研制 *Hp* 疫苗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 菌株与载体质粒

Hp(NCTC 11639 株)本室保存,受体菌 *E. coli* BL21 (DE3)本室保存,质粒 pET22b(+) 购自大连 TaKaRa 公司,本室保存。

1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Nde* Ⅰ、*Xho* Ⅰ(TaKaRa 公司),T_4连接酶(上海生工),质粒抽提试剂盒(Omega 公司),PCR 产物快速胶回收试剂盒(博大泰克公司),IPTG(上海申能博彩公司),SDS、丙烯酰胺(华美公司进口分装),低分子量蛋白标准(上海升正公司);其他化学试剂均为分析纯。

1.3 引物设计及 PCR 扩增

根据 GenBank 中幽门螺杆菌 cagL 的序列设计引物,利用软件 Primier Premier 5.0 进行引物的设计和分析:上游引物 P1:5′-CATATGAAAACACTCGTGAAAAATACC-3′, 下游引物 P2:5′-CGCTCGAGTTTAACAATGATCTTAC-3′, 在 P1 5′端引入限制性内切酶 *Xho* Ⅰ酶切位点,P2 5′端引入 *Nde* Ⅰ酶切位点(引物由北京华大有限公司合成)。按以下循环参数在 PCR 仪上进行反应:94 ℃预变性 5 min,然后 94 ℃ 1 min→60 ℃ 1 min→72 ℃ 1 min 进行 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。

1.4 重组 CagL 蛋白表达载体构建

将获得的 cagL 基因片段克隆入 pET22b(+), 转化至宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3), 氨苄抗性筛选阳性重组子,抽提质粒,分别用 *Xho* Ⅰ和 *Nde* Ⅰ做双酶切鉴定,获得重组工程菌并送上海英骏公司测序。

1.5 重组工程菌的诱导表达及形式鉴定

重组工程菌在 LB 液体培养基中培养,加入 IPTG 诱导,分别在 0、1、2、4、6 h 和 8 h 收集菌液,超声波破菌,差速离心分别留取上清和沉淀,处理后进行 SDS-PAGE,鉴定表达形式及表达量。

1.6 重组蛋白纯化

用 TE 缓冲液重悬细菌,对细菌进行高压破菌,差速离心收集包涵体,用 TE 缓冲液洗涤包涵体,用 8 mol/L 尿素溶解包涵体,采用镍离子亲和层析的方法进行蛋白纯化。Western blot 检测目的蛋白纯化后,目的蛋白按常规方法进行与抗 *Hp* 兔多抗血清(本室制备)的 Western blot 实验。

1.7 制备兔抗 CagL 多克隆抗体血清及其鉴定

以纯化蛋白为抗原加弗氏佐剂免疫家兔,制备兔抗 CagL 多克隆抗体血清,双扩实验和 ELISA 实验鉴定其免疫性。

1.8 兔抗 CagL 多克隆抗体血清对 *Hp* 菌黏附阻断实验

将 *Hp* 菌和 CagL 多克隆抗体中和后加入贴壁生长在盖玻片上的 HeLa 细胞中,设为实验组;分别以 *Hp* 和 DH5α 菌作为阳性对照及阴性对照组,共同孵育 4 h。Giemsa 染色,显微镜观察。

1.9 酶联免疫吸附测定分析 IL-8 浓度

用 1.8 的操作方法,取细胞培养上清液,用酶联免疫吸附试剂盒(武汉博士德公司提供)测定分析 IL-8 浓度。

1.10 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件行单因素方差分析。

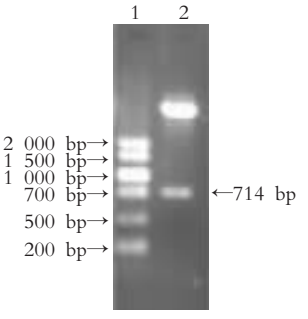
2 结果

2.1 目的基因的扩增和克隆

PCR 扩增产物 cagL 基因片段约为 714 bp,与预期大小相符。将扩增片段回收纯化后与 pET22b(+) 载体连接转化至宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)后抽提质粒,经 *Xho* Ⅰ和 *Nde* Ⅰ双酶切鉴定质粒并电泳检测,在约 714 bp 处可见到酶切片段(图 1)。测序结果显示,所构建的 pET22b(+)-CagL 核苷酸序列与 GenBank 公布的核苷酸序列完全一致。证实我们成功构建了重组工程菌 pET22b(+)-CagL/BL21。

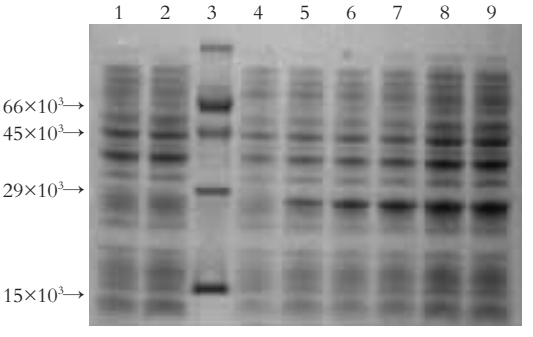
2.2 重组 CagL 工程菌诱导表达

重组工程菌 pET22b(+)-CagL/BL21(DE3)经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 观察目的蛋白表达情况(图 2)。与对照菌相比,重组菌 CagL 在相对分子质量 25×10^3 附近均出现新的蛋白表达条带,且诱导 6 h 表达量最高。UVP 扫描分析目的蛋白占菌体总蛋白的 35% ~40% 。



1:DNA 标准(DL 2000); 2:重组表达质粒经 *Xho* Ⅰ和 *Nde* Ⅰ双酶切

图 1 重组表达质粒酶切鉴定电泳图



1:pET22b(+)/BL21 未加 IPTG 诱导之前; 2:pET-22b(+)/BL21 经 IPTG 诱导 4 h 之后; 3:蛋白分子量标准; 4-9:pET22b(+)-CagL重组菌经 IPTG 诱导 0、1、2、4、6 h 和 8 h

图 2 SDS-PAGE 检测重组蛋白 pET22b(+)-CagL 表达

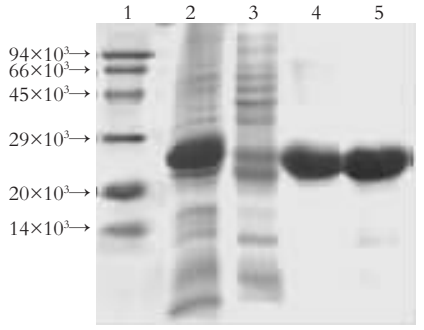
2.3 重组 CagL 工程菌表达形式的鉴定及包涵体洗涤

利用超声波裂解或高压均质破菌诱导后的工程菌 CagL 并洗涤包涵体,SDS-PAGE 显示重组蛋白 CagL 主要以包涵体形式存在于超声沉淀中。

2.4 亲和层析结果

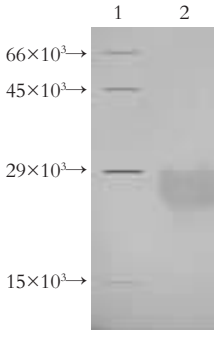
电泳结果显示亲和层析达到较好的分离纯化效果,经 UVP

扫描分析蛋白纯度达到 90%(图 3)。Western blot 实验结果表明重组蛋白 CagL 具有与抗 *Hp* 多抗血清免疫反应性(图 4)。



1:蛋白分子量标准;2:CagL 包涵体;3 -5:纯化后的蛋白

图 3　CagL 镍离子亲和层析纯化后 SDS-PAGE 分析



1:蛋白分子量标准;2:CagL 与抗 *Hp* 多抗血清

图 4　Western blot 检测 CagL 的免疫反应性

2.5　重组蛋白 CagL 多抗血清鉴定

双向免疫扩散结果显示兔抗 CagL 多克隆抗体效价为 1∶16。ELISA 结果显示兔抗 CagL 多克隆抗体的滴度为 1∶16 000 EU。

2.6　CagL 多克隆抗体血清对 *Hp* 黏附阻断实验结果

Giemsa 染色后显微镜观察可见:*Hp* 菌与 HeLa 细胞(阳性对照组)呈典型的聚集性黏附,抗体中和后 *Hp* 与 HeLa 细胞(实验组)未见黏附,加入 DH5α 的 HeLa 细胞(阴性对照组)也未见细菌黏附(图 5)。

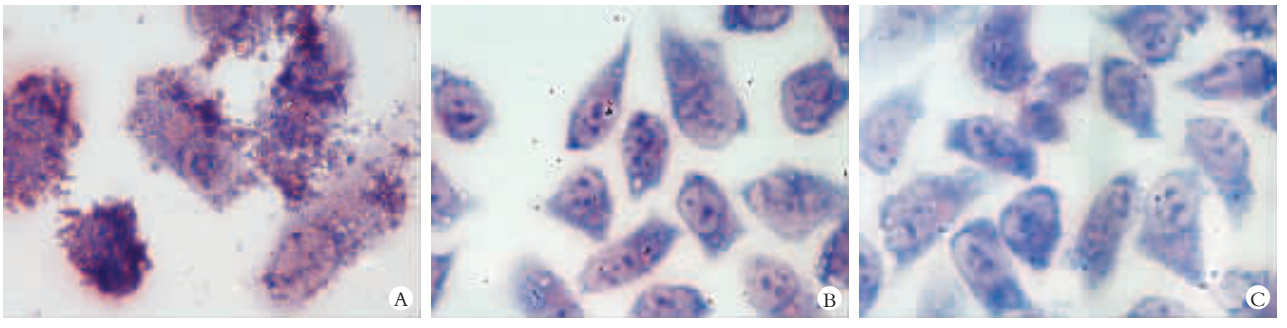
2.7　酶联免疫吸附测定分析 IL-8 浓度结果

实验组吸光度值为(0.121 ±0.002),阳性对照组吸光度值为(0.387 ±0.047),阴性对照组吸光度值为(0.155 ±0.024)。

经 SPSS 13.0 统计软件中的单因素方差分析,结果显示阳性对照组和阴性对照组之间差异具有统计学意义($F = 56.72$, $P < 0.01$),说明 *Hp* 促进 HeLa 细胞分泌 IL-8 的能力大大强于 DH5α;实验组与阳性对照组的 2 种方法间差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明抗体与 *Hp* 抗原充分结合后,可以减少 *Hp* 促进细胞分泌 IL-8 的能力;实验组与阴性对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3　讨论

近年来,*Hp* 的Ⅳ型分泌系统因与胃炎、消化性溃疡和胃癌的发生密切相关受到越来越多的关注[5,6]。*Hp* 感染宿主主要作用于胃上皮细胞,并通过Ⅳ型分泌系统将其效应毒力分子 CagA 转运至宿主细胞,经一系列的信号转导过程介导宿主细胞的损伤和疾病的发生。这一过程是通过其基因组中 Cag 致病岛编码的Ⅳ型分泌系统与宿主细胞直接相互作用所致[7,8]。CagL 蛋白作为 *Hp* Ⅳ型分泌系统纤毛状结构的一个表面蛋白,在 *Hp* 菌感染机体的过程中,CagL 蛋白通过与宿主的接触,再被传送到细菌菌毛上的同时,与整合素 α5β1 跨膜受体结合,刺激 *Hp* 菌毛伸长,同时通过其 RGD(arginine glycine aspartate)模序与宿主细胞整合素 α5β1 结合,活化这些受体。活化的整合素 α5β1 触发下游信号系统,导致 FAK 和 Src 激酶的活化及 CagA 酪氨酸磷酸化,从而诱导肌动蛋白细胞骨架重新排列,细胞浆膜的动态变化,整合素的聚集及其他受体的活化。这些改变对于 CagA 从菌毛进入宿主细胞质发挥了桥梁作用。同时被活化的 Src 刺激下游信号系统,导致宿主细胞伸长或 IL-8 表达[4,7,9]。这些形态的改变导致细胞的恶变和相关疾病的发生。我们成功构建、表达、纯化出 *Hp* 菌 CagL 蛋白,检测表明重组蛋白主要以包涵体的形式存在,纯化后的蛋白纯度为 90%,与抗 *Hp* 兔多抗血清具有良好的免疫反应性。我们又制备了 CagL 多克隆抗体血清进行体外阻断黏附实验,结果显示 CagL 多克隆抗体血清对阻断 *Hp* 的



A:阳性对照组;B:实验组;C:阴性对照组

图 5　CagL 多克隆抗体血清对 *Hp* 菌的黏附阻断实验　(Giemsa ×100)

黏附能力发挥了一定的作用。虽然目前其具体的机制尚不明确,但有助于后续深入研究 *Hp* 致病机制与阻断 *Hp* 黏附以后细胞内因子变化。

炎症反应是 *Hp* 感染致病的重要机制之一,起第二信使作用的 IL-8 诱导粒细胞聚集是非侵入性细菌 *Hp* 引起胃炎发生的关键因素。我们制备的 CagL 多克隆抗体血清与 *Hp* 抗原充分结合后和阳性对照组比较明显减少了 IL-8 分泌。这表明了 CagL 蛋白在 *Hp* 定植并转化 CagA 进入细胞和诱导细胞表达 IL-8 方面具有重要的作用。本研究为 *Hp* 致病性及定植机制研究奠定了基础,并为进一步探索其在 *Hp* 疫苗研制中的潜在作用提供了实验依据。

参考文献:

[1] Sette A, Keogh E, Ishioka G, *et al*. Epitope identification and vaccine design for cancer immunotherapy[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2002, 3(1): 132-139.

[2] Selbach M, Moese S, Meyer T F, *et al*. Functional analysis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island reveals both VirD4-CagA-dependent and VirD4-CagA-independent mechanisms[J]. Infect Immun, 2002, 70(2): 665-671.

[3] Kutter S, Buhrdorf R, Haas J, *et al*. Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type Ⅳ secretion system revealed by localization and interaction studies[J]. J Bacteriol, 2008, 190(6): 2161-2171.

[4] Kwok T, Zabler D, Urman S, *et al*. Helicobacter exploits integrin for type Ⅳ secretion and kinase activation[J]. Nature, 2007, 449(7164): 862-866.

[5] Amieva M R, Vogelmann R, Covacci A, *et al*. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA[J]. Science 2004, 300(5624): 1430-1434.

[6] Hatakeyama M. The role of *Helicobacter pylori* CagA in gastric carcinogenesis[J]. Int J Hematol, 2006, 84(4): 301-308.

[7] Backert S, Meyer T F. Type Ⅳ secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis[J]. Curr Opin Microbiol, 2006, 9(2): 207-217.

[8] Cascales E, Christie P J. The versatile bacterial type Ⅳ secretion systems[J]. Nat Rev Microbiol, 2003, 1(2): 137-149.

[9] Selbach M, Moese S, Hauck C R, *et al*. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein *in vitro* and *in vivo*[J]. J Biol Chem, 2002, 277(9): 6775-6778.

(编辑 王小寒)

(上接 104 页)

2.3 HU 与肝功能分级的关系

58 例 Child A 级患者中,有 6 例诊断为 HU(10.3%),而 97 例 Child B 级和 157 例 Child C 级的患者中诊断 HU 分别 22 例(22.7%)和 55 例(35.0%)。经统计学处理,HU 的发生率与肝功能分级不同的组间有统计学差异($P<0.05$),说明肝功能越差,HU 的发生率越高。

3 讨论

与正常人相比,肝硬化患者合并溃疡的发生率明显增高,陈德宁[1]经胃镜检查发现的 41 例 HU 患者中胃溃疡较十二指肠溃疡多见(65.8%、34.2%)。肝源性溃疡的发病机制至今不十分清楚,主要可能有以下几点:①门静脉高压使胃肠黏膜血流量减少。②血浆蛋白的减少至营养障碍,门脉高压,胃黏膜下广泛水肿。③肝功能不全造成内毒素血症,内分泌紊乱,免疫异常等。④肝炎后肝硬化主要是以乙型肝炎病毒引起,而慢性乙型肝炎患者幽门螺杆菌(*H. pylori*,Hp)感染率明显增加,且随着病变程度的加重,HP 感染率亦增加[3]。⑤乙肝并发胃黏膜损害的机制:乙肝病毒存在于胃黏膜上皮细胞内,乙肝抗原抗体复合物在细胞内沉积引起炎症反应,削弱和破坏胃黏膜屏障保护作用并能造成机体免疫功能紊乱[4]。⑥肝病时经常服用抗生素、氯化钾、利尿剂、维生素 C 等药物也可以损伤胃肠黏膜,刺激胃酸分泌,削弱黏膜屏障。

HU 的病理生理学基础和门脉高压性胃黏膜病变的基本相同,其病变主要是充血性变化。一般门脉高压越重,肝功能越差的患者患 HU 的可能性也越大,从本组病例也可看出食道静脉曲张程度和肝功能分级与 HU 的发生率的关系:HU 的发病率与肝功能分级及食管静脉曲张程度有关,各级间差异显著($P<0.05$)。而食管静脉曲张由门脉高压引起,静脉曲张的程度能在一定程度反映门脉高压的程度,Child 分级则能直接反映了肝功能损害程度。因此,可以认为 HU 发病与肝功能损害及门脉高压严重程度间呈正相关。

肝源性溃疡一旦诊断明确,应及时行内科综合治疗。杨万春[5]发现奥美拉唑联合普萘洛尔是治疗 HU 的有效方案,小剂量普萘洛尔有助于溃疡愈合。对长期溃疡不愈、易出血、溃疡易复发者可采用手术治疗,手术方法应根据病情选择。

关键词: 肝源性溃疡;临床分析;病因学

中图法分类号: R573.1 **文献标识码:** B

参考文献:

[1] 陈德宁. 肝源性溃疡的临床特点[J]. 中外医疗, 2008, (13): 56-57.

[2] 张晓明, 张 维. 肝源性溃疡 36 例临床分析[J]. 实用临床医药杂志, 2006, 10(12): 81.

[3] 季尚玮, 王江滨, 张永贵. 慢性乙型肝炎患者幽门螺杆菌感染状况分析[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(4): 479-481.

[4] 莫 梅, 彭贵勇. 四联疗法根除幽门螺杆菌感染对肝源性溃疡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(8): 721-723.

[5] 杨万春. 奥美拉唑联合普萘洛尔治疗肝源性溃疡的观察分析[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(11): 78-79.

(编辑 吴培红)