DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.016

论著

文章编号:1000-5404(2001)07-0786-04

人幽门螺杆菌热休克蛋白A基因的克隆、表达及初步应用

郭 红[1],邹全明[2],赵晓晏[1],吴 超[2],毛旭虎[2],文国义[1] (第三军医大学:[1]附属新桥医院消化内科,重庆 400037;[2]医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 获取重组表达人幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, Hp)热休克蛋白A(HspA)亚单位,并应用于临床诊断。方法 利用PCR技术扩增Hp HspA基因,将其构建至PinPoint™Xa-3载体中进行诱导表达,并对其产物进行SDS-PAGE、免疫印迹等检测。同时,将纯化的重组蛋白结合ELISA方法对幽门螺杆菌感染患者清除治疗前后血清中的抗HspA抗体进行检测。结果 所克隆的HspA DNA由354个碱基组成,可编码118个氨基酸残基的多肽,SDS-PAGE和免疫印迹显示所表达的蛋白分子量约为14×10³,并可与相应的抗血清发生特异反应;ELISA结果发现,消化性溃疡患者在清除治疗后早期只出现明显的抗HspA抗体滴度下降,而抗幽门螺杆菌抗体要在治疗后6月才出现明显下降。结论 重组表达HspA为诊断、预防和治疗幽门螺杆菌的进一步研究奠定了重要实验基础。

关键词:幽门螺杆菌;热休克蛋白A;免疫原性;清除治疗
中图法分类号:R377;R394.3 文献标识码:A

Cloning, expression and preliminary clinical application of heat shock protein A gene of human *Helicobacter pylori*

GUO Hong, ZOU Quan-ming, ZHAO Xiao-yan, WU Chao, MAO Xu-hu, WEN Guo-yi (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract Objective To obtain the recombinant human *Helicobacter pylori* (Hp) heat shock protein A(HspA) and apply it to clinical diagnosis. Methods The HspA DNA was amplified with PCR from the chromosomal DNA of clinically isolated *H. pylori* and then inserted into plasmid PinPoint™Xa-3. The vector pPin-HspA was transfected to *E. coli* JM109 for recombinant protein which were later analyzed with SDS-PAGE, Western-blot. The purified protein was used with ELISA to test HspA antibody in patients with Hp infection before and after eradication treatment. Results The cloned DNA consisted of 354 base pairs, and encoded 118 amino acid residues with a molecular weight of 14× 10³. Recombinant HspA was confirmed by the sera of Hp-infected patients and rabbits with Western blot. The levels of serum anti-recombinant HspA antibodies were declined significantly after eradication treatment, but changes of Hp antibodies were not apparent until almost 6 monthes later. Conclusion The identified recombinant HspA protein estabtishes a basis for experimental study on diagnosis, prevention and treatment of Hp infection.

Key words *Helicobacter pylori*; heat shock protein A; immunogenicity; eradication treatment

人幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)为上消化道疾病的重要致病菌,与B型(胃窦)胃炎,消化性溃疡,胃粘膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤以及胃癌发生等密切相关,WHO已将其列为一级致癌物质[1]。而且,目前在我国Hp的感染率也较高,约在50%~80%之间,故如何预防和治疗Hp是现今研究的重点之一。Hp的致病性包括它的动力、粘附力、尿素酶、磷脂酶A、热休克蛋白(Heat shock protein, Hsp)和毒素等。其中HspA为所有Hp共同的抗原成分。以Hsp为抗原的疫苗可使70%~80%试验小鼠获得保护[2]。由于Hp属微需氧菌,培养条件高,故难以获得大量的天然来源的HspA成分。本研究运用PCR技术克隆人Hp保护性抗原HspA基因,在大肠杆菌中进行表达和对其免疫原性进行研究,并将其应用于幽门螺杆菌感染的消化性溃疡患者在清除治疗前后的血清学检测。

1 材料和方法

1.1 对象

本组病例30例,来自本院经胃镜和组织学检查诊断为消化性溃疡的患者,其中男20例,女10例,平均年龄44岁(21~59岁);胃溃疡13例,十二指肠溃疡17例。根据中华医学会发布的幽门螺杆菌感染的诊断标准[3],每例均用^{13}C尿素呼气试验(^{13}C-UBT)、组织学Giemsa染色和ELISA试验3种方法检测Hp,如其中两种或以上方法阳性,则诊断为Hp感染阳性;如3项均阴性,则诊断为Hp感染阴性。所有患者采用四联疗法进行根除Hp治疗,即奥美拉唑20 mg, 2/d, 羟氨苄青霉素150 mg, 3/d, 枸橼酸铋钾120 mg, 3/d, 甲硝唑200 mg, 3/d, 疗程1周。在治疗后1月和6月分别再为患者作胃镜和活检,如Hp组织学和快速尿素酶试验均阴性,说明已根除Hp感染,同时分别取患者血清,并保存于-30 ℃冰箱备用。

1.2 主要材料

质粒和菌株:质粒PinPoint™Xa-3购自Promega公司。*E. coli* JM109系本室保存菌种,Hp菌株由本室从临床患者中分离鉴定并保存。工具酶及试剂:*BamH*Ⅰ、*Eco*RⅤ、T4连接酶、Taq DNA聚合酶、λDNA/*Hind*Ⅲ markers、PCR markers和羊抗人-HRP等购自华美公司。其它常规试剂按照《分子克隆实验指南》要求配制;^{13}C尿素呼气仪及相关试剂购自英国Europa Scientific公司。

1.3 方法

1.3.1 HspA基因的克隆及表达载体的构建 根据文献[4]的HspA序列设计一对特异引物,在上游引物设置了起始密码子ATG和*BamH*Ⅰ的酶切位点;下游引物引入*Eco*RⅤ的酶切位点。由上海生工公司合成。

P1: 5′-GCGGATCCATGAAGTTTCAACC-3′

P2: 5′-GCGATATCACAGCGTCATGGAGTT-3′

基金项目:国家"九五"重点攻关课题(96-901-01-54);全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(98D004)
作者简介:郭 红(1971—),女,湖南省湘潭县人,硕士研究生,医师,主要从事幽门螺杆菌方面的研究。电话:(023)68755604
收稿日期:2001-02-18;修回日期:2001-05-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

以幽门螺杆菌临床分离菌株基因组为模板, 按常规 PCR 条件扩增, 即 94 ℃加热预变性 5 min, 加入 3 U Taq DNA 聚合酶接着进入循环, 94 ℃变性 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min 共循环 35 次, 再于 72 ℃延伸 5 min, 反应完毕后取 4 μl 反应产物于 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳分析, 确定后回收, − 20 ℃保存备用。载体 PinPoint^{TM}Xa-3 和 PCR 产物均用 *BamH*Ⅰ和 *Eco*RⅤ酶切, 纯化回收酶切后 DNA 片段, 在 14 ℃连接 14 ~ 16 h。经双酶切鉴定和序列分析得到重组表达载体 pPin-HspA。

1.3.2　HspA 基因的表达、检测及纯化　　将重组表达载体 pPin-HspA 转化至 *E. coli* JM109 中, 在 LB 培养基(100 mg/L 氨苄青霉素)中 37 ℃震荡培养至 D_{600}= 0.8 时加入 IPTG(1 mmol/L)诱导表达 5 h, 离心收集菌沉淀, 加入 2× SDS-PAGE 上样缓冲液, 100 ℃处理标本 5 min, 12%SDS-PAGE 电泳, UVP 蛋白扫描仪分析。同时将凝胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 按《精编分子生物学实验指南》上免疫印迹杂交方法操作, 采用兔抗 Hp 抗血清作为一抗检测。按照 Promega 的 PinPoint Xa 蛋白纯化系统对重组融合蛋白进行纯化, 再将其用 Xa 因子蛋白酶切割并回收, 获得 14× 10^3 HspA 组分, 纯化后 HspA 蛋白用免疫印迹法检测纯度。

1.3.3　重组 HspA 蛋白的临床应用　　按照常规 ELISA 方法将重组 HspA 蛋白和 Hp(NCTC 11637)全菌超声上清(50 μg/ml)分别包被 96 孔板, 100 μl/孔, 4 ℃过夜。5% 牛血清白蛋白于 37 ℃封闭 3 h。将待测血清 1∶200 稀释作为一抗, HRP 标记羊抗人 IgG(1∶10 000)作为二抗, OPD 显色, 测定其 490 nm 波长下吸光度。

1.4　统计学分析

采用 *t* 检验。

2　结果

2.1　HspA 的扩增

PCR 结果电泳分析出现单一条带, 大小约为 487 bp, 与预计大小相符, 见图 1。

2.2　重组质粒的构建及 HspA 基因的序列分析

将 PCR 产物经 *BamH*Ⅰ/ *Eco*RⅤ双酶切后, 定向插入经同样双酶切的 PinPoint^{TM}Xa-3 载体中, 获得的重组质粒命名为 pPin-HspA; 经 *BamH*Ⅰ/ *Eco*RⅤ双酶切后产生的片段为大小约定的 487 bp 的片段, 见图 2。pPHspA 经全自动测序仪进行序列分析发现 HspA 基因序列与 Genbank 报道的相比, 有 4.2%(15/354)的编码碱基出现差异, 由于氨基酸简并性的存在, 仅有 0.84%(1/118)的氨基酸序列不同, 为缬氨酸 Val-74 变为苏氨酸 Thr-74, 同源性高达 99.15%, 见图 3。

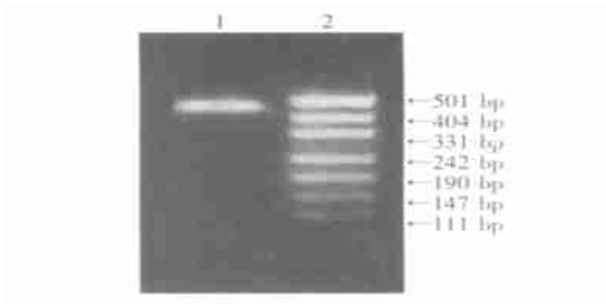


图 1　琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物

Fig 1　Identification of the PCR product by DNA agarose gel electrophoresis

1: PCR product; 2: PCR marker

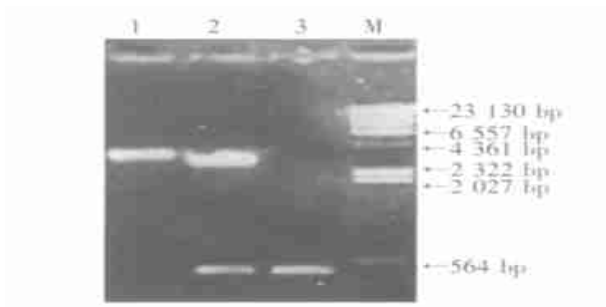


图 2　重组质粒 pPin-HspA 的酶切鉴定图谱

Fig 2　Restriction enzyme digestion map of recombinant plasmid pPin-HspA

1: Positive recombinant plasmid pPin-HspA *BamH*Ⅰ; 2: pPin-HspA *BamH*Ⅰ+ *Eco*RⅤ; 3: PCR product; M: Marker

ATG	AAG	TTT	CAA	CCA	TTA	GGA	GAA	AGG	GTC	TTA	GTA	GAA	AGA	CTT	GAA	GAA	GAG	AAC	AAA	ACC
M	K	F	Q	P	L	G	E	R	V	L	V	E	R	L	E	E	E	N	K	T
AGT	TCA	GGC	ATT	ATC	ATC	CCT	GAT	AAC	GCT	AAA	GAA	AAG	CCT	TTG	ATG	GGC	GTA	GTC	AAA	GCG
S	S	G	I	I	I	P	D	N	A	K	E	K	P	L	M	G	V	V	K	A
GTT	AGC	CAT	AAA	ATC	AGT	GAG	GGT	TGC	AAA	TGC	GTT	AAA	GAA	GGC	GAT	GTG	ATC	GCT	TTT	GGC	AAA
V	S	H	K	I	S	E	G	C	K	C	V	K	E	G	D	V	I	A	F	G	K
TAT	AAA	GGT	GCA	GAA	ATC	GTT	TTA	GAT	GGC	ACC	GAA	TAC	ATG	GTG	CTA	GAG	CTA	GAA	GAC	ATT	CTG
Y	K	G	A	E	I	V	L	D	G	T	E	Y	M	V	L	E	L	E	D	I	L
GGC	ATT	GTG	GGT	TCA	GGC	TCT	TGT	TGT	CAT	ACA	GGT	AAT	CAT	GAT	CAT	AAG	CAT	GCT	AAA	GAG	CAT
G	I	V	G	S	G	S	C	C	H	T	G	N	H	D	H	K	H	A	K	E	H
GAA	GCT	CGC	TGT	CAT	GAT	GAT	CAC	AAA	AAA	CAC	TAA									
E	A	R	C	H	E	D	H	K	K	H	*									

图 3　Hp HspA 基因编码区的核苷酸序列和推定的氨基酸序列

Fig 3　The nucleotide sequence of Hp HspA gene and deduced amino acid. The stop codon was marked with asterisk

2.3　HspA 基因在大肠杆菌中的表达

将含 pPin-HspA 的工程菌经 IPTG 诱导表达后进行 SDS-PAGE 电泳, 见图 4, 凝胶自动扫描分析可见分子量约为 27× 10^3 的重组融合蛋白。酶切纯化的重组 HspA 蛋白经 Western blotting 检测显示在 14× 10^3 处出现阳性条带, 阴性对照则未出现条带, 见图 5。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

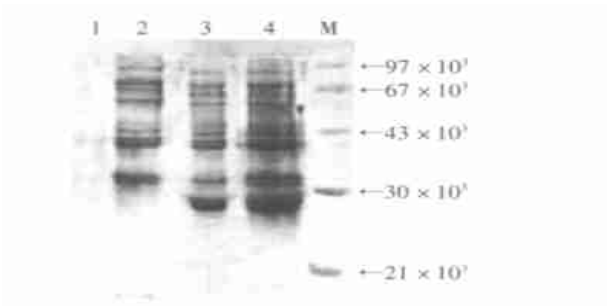


图 4 大肠杆菌重组 **HspA** 融合蛋白的 **SDS-PAGE**

Fig 4 SDS-PAGE analysis of HspA fusion protein expressed in *E. coli*

1: PinPointXa-3/JM109 before induction; 2: PinPointXa-3/JM109 after 5 h induction with IPTG; 3: pPin-HspA /JM109 before induction; 4: pPin-HspA/JM109 after 5 h induction with IPTG; M: Protein marker

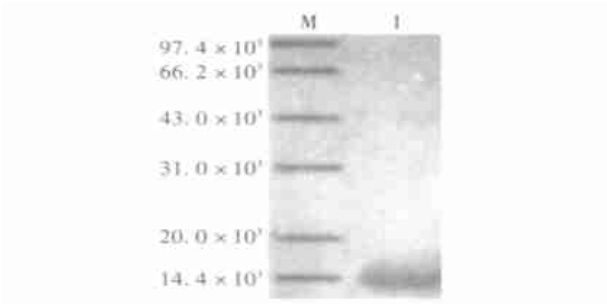


图 5 重组 **HspA** 蛋白的免疫印迹分析

Fig 5 Western blot analysis of purified recombinant HspA protein

M: Protein marker; 1: Recombinant HspA protein

2.4 清除治疗后患者血清中抗体水平检测

抗 HspA 抗体水平无论是胃溃疡(Gastric ulcer, GU)还是十二指肠溃疡(Duodenal ulcer, DU)均在治疗后 1 月就出现明显降低,治疗后 6 月复查抗体滴度仍然下降;但是,抗 Hp 全菌抗体水平在治疗后 1 月并未出现降低,直至 6 月后才出现明显下降,结果见表 1。

表 1 治疗前后患者抗体滴度变化

Fig 1 Antibody levels of patients before and after eradication treatment

	Pretreatment	1 month after treatment	6 months after treatment
Gastric ulcer			
Anti-HspA Ab	0.130±0.004	0.060±0.002 *	0.051±0.003 *
Anti-Hp Ab	0.101±0.045	0.080±0.020	0.030±0.005 *
Duodenal ulcer			
Anti-HspA Ab	0.111±0.003	0.050±0.002 *	0.042±0.003 *
Anti-Hp Ab	0.050±0.030	0.033±0.018	0.020±0.013 *

*: $P<0.05$ *vs* Pretreatment

2.5 清除治疗后患者病理结果

在治疗前,镜下和胃粘膜活检病理结果除发现有消化性溃疡外,30 名患者都伴有不同程度的胃炎,其中有 24 人(80%)为慢性中、重度活动性胃炎。在清除治疗后 1 月复查时,患者的胃粘膜炎症程度均有所降低,镜下和病理结果除未见溃疡外,26 人(86.7%)为慢性轻度胃炎;6 月复查时,结果与 1 月时基本相同。

3 讨论

幽门螺杆菌的热休克蛋白(Hsp)属于 Hsp60 族,并与尿素酶 B 亚单位(UreB)一样是有效的抗原成分,在胃粘膜的病理生理中有重要的作用,可以作为基因工程疫苗的侯选分子。Hsp 基因属于双顺反子操纵子包括 HspA 和 HspB 基因,分别编码 118 和 545 个氨基酸残基,相应的相对分子质量为 13.0×10^3 和 58.2×10^3。HspA 包括两个区域:N 区(A 区)与 GroES 家族同源高度保守,是免疫显性区[5],C 区(B 区)有 27 个氨基酸残基,其中 8 个是组氨酸残基,4 个是半胱氨酸残基,3~5个组氨酸残基能结合一个镍离子[6],故 HspA 可能在镍离子转运和呈递给脱辅基酶蛋白中起作用[7],由于其特殊的结构和结合镍离子的特性,已被认为是激发机体产生预防 Hp 感染的最有效的免疫成分之一[8]。

我们克隆的 HspA 基因序列与 Genebank 报道的相比,出现一定的差异,分析其原因,认为可能是由于所采用的 Hp 菌株不同。因为 Hp 是一种基因变异性较大的细菌,它通过点突变、等位基因变换、基因重排及序列插入等使基因出现多样性,不同感染者、尤其是不同地区差别更加明显。本实验中由于氨基酸简并性的存在,仅出现缬氨酸 Val-74 变为苏氨酸 Thr-74,同源性高达 99.15%,为该融合基因的准确表达奠定了基础;并且发生变化的氨基酸也只是非极性氨基酸,其高度的同源性决定了不同菌株所编码蛋白的主要抗原决定簇是一致的。

因此,我们采用重组 HspA 和 Hp 全菌超声上清分别来检测 Hp 感染阳性的消化性溃疡患者的血清,结果发现在清除治疗后早期就出现了明显的抗 HspA 抗体滴度下降,而抗 Hp 抗体滴度却要在治疗后 6 月才出现下降。Perez-Perez 等[9]发现 Hp 感染患者血清中的抗 HspA 抗体滴度明显升高且与胃粘膜炎症程度相关。Yokota 等[10]的研究认为由于 Hp 的 Hsp 位于细菌表面,故易被宿主识别,并与 Hp 诱导的胃粘膜炎症密切相关。我们在成功地进行清除治疗后,早期出现了患者胃粘膜炎症程度下降并伴有抗 HspA 抗体滴度降低,从而说明,清除 Hp 可治愈消化性溃疡和减轻胃炎,而且对抗 HspA 抗体滴度的测定可能在今后会应用于对清除 Hp 治疗后早期疗效的检测;同时也说明了 HspA 与胃粘膜损伤之间存在某种关联,但目前其具体的机制尚不明确。因此,重组 Hsp 将有助于研究 Hp 诱导的胃粘膜损伤机制,并为诊断、治疗、疗效监测以及预防幽门螺杆菌奠定了实验基础。

参考文献:

[1] Murray C J L, Lopez A D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020-global burden of disease study[J]. Lancet, 1997, 349

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(9 064): 1 498－1 504.
[2] Marchetti M, Arico B, Burroni D, *et al*. Development of a mouse model of Helicobacter pylori infection that mimics human disease[J]. Science, 1995, 267(5 204): 1 655－1 658.
[3] 中华医学会消化病学分会. 幽门螺杆菌若干问题的共识意见[J]. 中华消化杂志, 2000, 20(2), 117－118.
[4] Sebastian S, Thiberge J M, Kansau I, *et al*. Helicobacter pylori HspA-HspB heat-shock gene cluster: nucleotide sequence, expression, putative function and immunogenicity[J]. Mol Microbiol, 1994, 14(5): 959－974.
[5] Kansau I, Guillain F, Thiberge J M, *et al*. Nickel binding and immunological properties of the C-terminal domain of the Helicobacter pylori GroES homologue (HspA)[J]. Mol Microbiol, 1996, 22(5): 1 013－1 023.
[6] Wu L F. Putative nickel-binding sites of microbial proteins[J]. Res Microbiol, 1992, 143(3): 347－351.
[7] Tomb J F, White O, Kerlavage A R, *et al*. The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori[J]. Nature, 1997, 388(6 642): 539－547.
[8] Suerbaum S, Thiberge J M, Kansau I, *et al*. Helicobacter pylori hspA-hspB heat-shock gene cluster: Nucleotide sequence, expression, putative function and immunogenicity[J]. Mol Microbiol, 1994, 14(5): 959－974.
[9] Perez-Perez G I, Brown W R, Cover T L, *et al*. Correlation between serological and mucosal inflammatory responses to Helicobacter pylorir[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1994, 1(3): 325－329.
[10] Yokota K Y, Hirai M, Haque H, *et al*. Heat shock protein produced by Helicobacter pylori[J]. Microbiol Immunol, 1994, 38(5): 403－405.

(编辑　汪勤俭)

文章编号: 1000-5404(2001)07-0789-01

个案与短篇

尼扎替丁治疗十二指肠溃疡 52 例临床观察

Clinical observation of treating duodenal ulcer with nizatidine therapy in 52 cases

尹川波, 李宜辉, 达四平, 赵晓晏　(第三军医大学附属新桥医院消化内科, 重庆 400037)

尼扎替丁(Nizatidine, 商品名: 爱希 AXID)是一种新的 H_2 受体拮抗剂, 由美国礼来公司生产。有关尼扎替丁治疗十二指肠溃疡(DU)的临床疗效, 国外已有很多报道[1], 国内报道甚少[2]。为观察尼扎替丁对 DU 的疗效, 我们于 1997 年 3 月至 1999 年 3 月用尼扎替丁治疗 DU 52 例, 现将结果报道如下。

1　材料与方法

1.1　病例选择

用随机化分组表将胃镜检查确诊的 104 例 DU 患者随机分为 2 组, 即尼扎替丁组 52 例, 男 31 例, 女 21 例, 年龄 19～68 岁, 平均 39.6 岁; 西咪替丁组 52 例, 男 35 例, 女 17 例, 年龄 21～73 岁, 平均 41.4 岁。全部病例均为住院患者, 病程半年至 20 年, 溃疡直径在 3～20 mm 之间。有幽门梗阻、胃外科手术史、活动性上消化道出血等情况者均不作为观察对象。

1.2　治疗方法

患者进入治疗实验时, 停服任何特殊治疗药物。尼扎替丁组每次服尼扎替丁 150 mg, 每日 2 次; 西咪替丁组每次服西咪替丁 200 mg, 每日 4 次, 疗程均为 4 周。在服药期间, 详细记录各种症状; 疗程结束时全部病例复查胃镜 1 次。每例患者在用药前后均作血、尿常规, 肝、肾功能检查。

1.3　疗效判断

胃镜复查标准: ①愈合: 溃疡灶消失或仅留瘢痕; ②好转: 溃疡面积缩小＞50%, 溃疡面干净无苔; ③无效: 溃疡面积缩小＜50%, 或大小无变化, 或增大者。

作者简介: 尹川波(1963－), 男, 湖南省永州市人, 主治医师, 主要从事胃肠疾病诊治方面的研究, 发表论文 5 篇, 现在湖南省道县人民医院内科。电话: (023)68755604

收稿日期: 2000-06-01; 修回日期: 2000-08-04

1.4　统计学处理

率的比较采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　症状疗效见表 1

表 1　两组症状疗效比较

组别	例数	消失	减轻	无变化
		例数(%)	例数(%)	例数(%)
尼扎替丁组	52	38(73.0%)	12(23.0%)	2(4%)
西咪替丁组	52	33(63.4%)	16(30.7%)	3(5.9%)

2.2　溃疡愈合情况

用药 4 周, 尼扎替丁组 DU 愈合率 78.8%, 西咪替丁组 71.1%, 两组相比差异无显著性(χ^2 检验, $P>0.05$), 见表 2。

表 2　两组溃疡愈合比较

组别	例数	愈合	好转	无变化
		例数(%)	例数(%)	例数(%)
尼扎替丁组	52	41(78.8%)	8(15.3%)	3(5.9%)
西咪替丁组	52	37(71.1%)	12(23.0%)	3(5.9%)

2.3　药物副反应

尼扎替丁组有副反应 8 例, 其中轻度腹胀 2 例, 头昏 2 例, 口干 2 例, 腹泻 1 例, 便秘 1 例。西咪替丁组有副反应 11 例, 其中腹胀 3 例, 头昏 4 例, 皮疹 1 例, 恶心 3 例。副反应均较轻, 经对症处理后缓解。

(下转 792 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net