

幽门螺杆菌热休克蛋白 60 基因的克隆、表达及免疫原性研究

白杨¹,张亚利¹,王继德¹,杨云生²,陈焯¹,张兆山³,周殿元¹(¹第一军医大学南方医院全军消化病研究所,广东广州 510515;²解放军总医院消化内科,北京 100853;³军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

摘要:目的 构建表达幽门螺杆菌热休克蛋白 60 (Hsp60) 的候选菌株并研究其免疫原性。方法 利用 PCR 技术扩增 Hsp60 基因,将其定向插入 pET-22b(+)载体,在 BL21(DE3)大肠杆菌中表达并通过动物实验研究其免疫原性。结果 克隆的 Hsp60 基因序列与 Genbank 公布的一致,Hsp60 重组蛋白表达量占菌体总蛋白的 27.2%,并可被幽门螺杆菌感染者血清所识别,用其免疫小鼠可产生抗该重组蛋白的抗体。结论 Hsp60 有可能成为一种有效的疫苗用于幽门螺杆菌感染的预防和治疗。

关键词:幽门螺杆菌;热休克蛋白 60;免疫原性

中图分类号:R378.2 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2002)01-0003-03

Study on the cloning expression and the immunogenicity of *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 gene

BAIYang¹,ZHANGYa-li¹,WANGJi-de¹,YANGYun-sheng²,CHENYe¹,ZHANGZhao-shan³,ZHOUdian-yuan¹
¹InstituteofDigestiveDiseasesofPLA, NanfangHospital, First MilitaryMedicalUniversity, Guangzhou510515, China; ²Department of Digestive Medicine, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; ³Institute of Biotechnology,AcademyofMilitaryMedicalSciences,Beijing100071,China

Abstract Objective Toconstructarecombinantstrainofbacteria expressingheatshockproteinof (Hsp) *Helicobacter pylori*(Hp) andstudytheimmunogenicityofHsp60. Methods PCR amplificationofHsp60DNAwasperformedbefore it was inserted into the prokaryoticexpressionvectorpET-22b(+) totransformBL21 (DE3) *E. coli* strain.Hsp60expressedbythe recombinant *E. coli* wascollected andpurifiedforimmunogenicityassessment in mice. Results DNA sequence analysis showedidentical DNA sequenceofHsp60thusproducedtothatpublished inGenbank. Accountingforaratioof 27.2% among the total protein production in the bacterium, recombinant Hsp60 protein was recognized by the serum from Hp-infected patients and produced corresponding antibody in Balb/c mice in response to immunization. Conclusion RecombinantHsp60proteincanbeusedpotentiallyasavaccineforcontrollingandtreating Hp infection.

Key words: *Helicobacter pylori*;heatshockprotein60;immunogenicity

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 感染是慢性胃炎和消化性溃疡的主要病因,与胃腺癌、胃粘膜相关性淋巴样组织 (MALT) 恶性淋巴瘤的发生亦密切相关。此外,血清流行病学研究表明 Hp 感染与循环、呼吸以及自身免疫疾病的发生也有关^[1,2]。目前根除 Hp 的主要手段是抗菌疗法,但有相当的局限性。免疫预防已成为防治 Hp 感染最有效、最有前景的方法之一。

在 Hp 的免疫防治研究方面,目前已有以尿素酶 B 为主的多种 Hp 抗原作为疫苗候选抗原,但效果均不理想。在小鼠和人类的分枝杆菌感染模型中^[3,4],热休克蛋白 60 (Hsp60) 的免疫应答处于优先地位,特别表现在 Hsp60 成为抗体和 T 细胞应答的免疫优势靶抗原,提示我们 Hp Hsp60 也许是防治 Hp 的优良疫苗候选成分。国内尚未见有关 Hp Hsp60 的研究报

道。本实验对 Hsp60 的目的基因进行了克隆和表达并研究了其免疫原性。

1 材料与方 法

1.1 质粒和菌株

菌株 BL21 (DE3) 及质粒 pET-22b (+) 由军事医学科学院生物工程研究所提供。幽门螺杆菌 SS1 为本所保存。

1.2 工具酶及试剂

限制性内切酶 Not I、Nco I 及 T4DNA 聚合酶、VentDNA 聚合酶购自 NewEngland Biolabs 公司, Taq DNA 聚合酶、DNA 分子量标准 DNA/EcoRI + HindIII 购自华美生物工程公司,琼脂糖、dNTPs、DNA 快速纯化试剂盒购自 Promega 公司,测序质粒纯化试剂盒购自美国 Qiagen 公司,病人血清来自解放军总医院消化内科,以病人的胃窦粘膜作尿素酶实验和病理组织切片染色判断是否为 Hp 感染,选取 Hp 阳性患者血 8 份,正常人血 3 份。其他试剂为国产分析纯。

收稿日期:2001-09-11

基金项目:“863”计划专题 (102-07-03-06); 国家自然科学基金 (30170890); 军队“十五”医药卫生科研课题 OIMA-132)

作者简介:白杨 (1973-),男,山西太原人,1996 年毕业于第一军医大学,在读博士,医师,电话 020-85141545

2.5 Hsp60 重组蛋白质的免疫原性分析

酶联免疫吸附试验阳性结果显色,阴性结果不显色或显色弱。测定结果显示,用 rHsp60 免疫的小鼠血清都显阳性,而对照组的小鼠血清显阴性。这说明 Hsp60 诱导产生了针对 Hsp60 的特异性抗体。

3 讨论

热休克蛋白 (Hsp) 广泛存在于自然界,并且是生物圈中最为保守的蛋白之一。过去人们对 Hsp 的研究方向主要集中在其作为“分子伴侣”参与细胞生理活动的作用机制上,而近来大量的研究表明,当人或动物受到细菌和寄生虫感染时,病原体来源的 Hsp 是一种非常重要的保护性抗原^[8]。到目前为止,已经报道了 20 多种传染病的保护性免疫应答是针对 Hsp 的,如结核、麻风等,其中对 Hsp60 的免疫应答最多。特别是在感染结核的小鼠实验模型中^[8],Hsp60 的特异性抗体可与原核细胞的 Hsp60 相应物产生交叉反应,而不与小鼠自身的 Hsp60 相应物反应,这解决了长期以来困扰人们的 Hsp60 作为疫苗成分由于其高度保守性所引起的自身免疫问题。此外,在小鼠和猴疟疾模型中^[9],与 Hsp60 交联的多肽诱导的抗疟疾特异性免疫应答并不依赖于佐剂,显示了 Hsp60 具有类似佐剂的作用。由此提示,我们在当前以尿素酶 B 亚单位为主的多种候选抗原防治 Hp 感染效果的不确定性情况下^[10],将 Hp Hsp60 纳入 Hp 疫苗成分,既可作为多价疫苗,又解决了 CT 或 LT 作为佐剂价格昂贵和具有潜在毒性的缺点。

事实上,Hp Hsp60 的免疫保护作用已经在一些体内及体外实验取得初步证实。Yamaguchi 等^[11]运用 Hp Hsp60 的单克隆抗体 H20 处理后的 Hp 粘附于人胃癌细胞 -MNK45 和原代培养的人胃上皮细胞的能力明显低于未处理的 Hp,初步显示了 Hp Hsp60 的免疫防治作用。最近,该学者又用 Hsp60 氨基酸序列 189 至 203 位的肽段 (VEGMQFDRGYLSPYF) 结合佐剂免疫小鼠取得了较好的保护效果^[12]。本实验用纯化的重组蛋白 Hsp60 免疫小鼠,在全部免疫小鼠血清中均可检测到抗 Hsp60 的抗体,而对照组此种抗体 (-)。另外用重组蛋白 Hsp60 作为抗原包被平板,经

酶联免疫吸附实验检测发现,8 例 Hp 感染阳性病人的血清中有 6 例与重组蛋白 Hsp60 反应阳性,而 3 例正常人血清与之无交叉反应。由此初步认为,本实验制备的 Hsp60 可能作为疫苗而用于 Hp 的预防,但其是否具有佐剂及免疫保护作用尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Tsang KW, Lam SK. Helicobacter pylori and extra-digestive diseases [J]. J Gastroenterol Hepatol, 1999, 14 (9): 844-50.
- [2] Fireman Z, Trost L, Kopelman Y, et al. Helicobacter pylori: seroprevalence and colorectal cancer [J]. Isr Med Assoc J, 2000, 2 (1): 6-9.
- [3] Zigel U, Schoel B, Yamamoto S, et al. Cross recognition by CD8T cell receptor of alpha beta cytotoxic T lymphocytes of peptides in the self and the mycobacterial hsp60 which share intermediate sequence homology [J]. Eur J Immunol, 1995, 25 (2): 451-8.
- [4] Zigel U, Kaufmann SH. Activation of CD8T cells with specificity for mycobacterial heat shock protein 60 in Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin-vaccinated mice [J]. Infect Immun, 1997, 65 (9): 3947-50.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 35.
- [6] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. 精编分子生物学指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 39.
- [7] Macchia G, Massone A, Burroni D, et al. The hsp60 protein of Helicobacter pylori: structure and immune response in patients with gastro-duodenal diseases [J]. Mol Microbiol, 1993, 9 (3): 645-52.
- [8] Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, et al. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine [J]. Vaccine, 1997, 15 (8): 834-8.
- [9] Del Giudice G. Stress proteins in medicine [M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1996: 533-45.
- [10] Solnick JV, Canfield DR, Hansen LM, et al. Immunization with recombinant Helicobacter pylori urease in specific-pathogen-free rhesus monkeys (Macaca mulatta) [J]. Infect Immun, 2000, 68 (5): 2560-5.
- [11] Yamaguchi H, Osaki T, Kurihara N, et al. Heat-shock protein 60 homologue of Helicobacter pylori is associated with adhesion of H. pylori to human gastric epithelial cells [J]. J Med Microbiol, 1997, 46 (10): 825-31.
- [12] Yamaguchi H, Osaki T, Kai M, et al. Immune response against a cross-reactive epitope on the heat shock protein 60 homologue of Helicobacter pylori [J]. Infect Immun, 2000, 68 (6): 3448-54.

启 示

本刊决定从今年第 1 期起增加“专家论坛”和“学术争鸣”栏目,每期刊载相关文章 1~2 篇。设立该栏目旨在为各科专家、学者提供充分表达自己的学术思想、观点的园地和机会,对当前基础医学、临床医学和医学相关学科领域里的热点问题、争议问题进行学术讨论,达到互相交流、活跃学术气氛、促进科技发展的目的。我们热忱欢迎校内外广大专家就自己专业内感兴趣的问题发表自己的主张,谨希不吝赐稿。