

携带幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白活减毒鼠伤寒沙门菌口服重组 DNA 疫苗株的构建

孙波, 何苗, 杨骅, 金晶, 满晓华, 龚燕芳, 屠振兴, 杜奕奇, 李兆申

孙波, 杨骅, 金晶, 满晓华, 龚燕芳, 屠振兴, 杜奕奇, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科 上海市 200433
何苗, 中国人民解放军第二军医大学医技检验专升本 26 队 上海市 200433
孙波, 男, 1972-04-29 生, 山东省平度市人, 汉族. 1999 年第二军医大学毕业, 博士生, 主治医师, 讲师. 主要从事幽门螺杆菌疫苗防治研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30170427
项目负责人: 杜奕奇, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科. duyiqi@hotmail.com
电话: 021-25070552 传真: 021-25070552
收稿日期: 2003-12-17 接受日期: 2004-02-09

Construction of an oral recombinant DNA vaccine strain of live attenuated *Salmonella typhimurium* carrying *H pylori* neutrophil activating protein

Bo Sun, Miao He, Hua Yang, Jing Jin, Xiao-Hua Man, Yan-Fang Gong, Zhen-Xing Tu, Yi-Qi Du, Zhao-Shen Li

Bo Sun, Hua Yang, Jing Jin, Xiao-Hua Man, Yan-Fang Gong, Zhen-Xing Tu, Yi-Qi Du, Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Miao He, Division of, Medical Technology and Laboratory (Brigade 26), Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Supported by the Natural Science Foundation of the Ministry of Health of China, No. 30170427
Correspondence to: Yi-Qi Du, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, 174 Changhai Road, Shanghai 200433, China. duyiqi@hotmail.com
Received: 2003-12-17 Accepted: 2004-08-16

Abstract

AIM: To construct a live attenuated *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) strain carrying *H pylori*-neutrophil activating protein (HP-NAP) gene as an oral recombinant DNA vaccine.

METHODS: By genetic engineering method, a 435 bp *napA* gene (encoding HP-NAP) was subcloned into an eukaryotic expression vector pIRES. After sequencing and BLAST analysis, the identified recombinant plasmid was then transformed into a live attenuated *S. typhimurium* strain SL7207.

RESULTS: By using polymerase chain reaction (PCR) and restriction enzyme digestion, a recombinant eukaryotic expression plasmid pIRES-*napA* containing *napA* gene of *H pylori* was constructed, and the recombinant plasmid was transformed successfully into the live attenuated *S. typhimurium* strain SL7207. Most of the *H pylori*-*napA* sequences in recombinant plasmid pIRES-*napA* were homologized with that of SS1 strain reported by GenBank, and the homology of nucleotide and protein was 98%, respectively.

CONCLUSION: A recombinant live attenuated *S. typhimurium*

strain carrying HP-NAP gene as DNA vaccine is successfully constructed. The results lay the foundation for developing multivalent oral DNA vaccine against *H pylori* infection.

Sun B, He M, Yang H, Jin J, Man XH, Gong YF, Tu ZX, Du YQ, Li ZS. Construction of an oral recombinant DNA vaccine strain of live attenuated *Salmonella typhimurium* carrying *H pylori* neutrophil activating protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(6):1317-1320

摘要

目的: 构建携带人幽门螺杆菌(*H pylori*)中性粒细胞激活蛋白(HP-NAP)基因(*napA*)的重组活减毒鼠伤寒沙门菌口服DNA疫苗。

方法: 应用基因工程技术扩增全长 *napA*, 测序并同源性分析后, 将其亚克隆入真核表达载体 pIRES, 鉴定正确后将重组质粒转化活减毒鼠伤寒沙门菌。

结果: 重组质粒经 PCR 及双酶切, 证实成功构建了携带 HP-NAP 基因的重组真核表达质粒 pIRES-*napA*, 后者成功转化活减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207. 所克隆 435bp *napA* 与 GenBank 中 SS1-*napA* 核苷酸和蛋白质的同源性均为 98%。

结论: 成功构建并鉴定了携带 HP-NAP 基因的重组活减毒鼠伤寒沙门菌口服 DNA 疫苗, 为多价抗 *H pylori* 口服 DNA 疫苗的研制奠定了基础。

孙波, 何苗, 杨骅, 金晶, 满晓华, 龚燕芳, 屠振兴, 杜奕奇, 李兆申. 携带幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白活减毒鼠伤寒沙门菌口服重组 DNA 疫苗株的构建. *世界华人消化杂志* 2004;12(6):1317-1320
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1317.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染为慢性活动性胃炎和消化性溃疡的主要病因^[1-8], 与肠型胃癌和胃黏膜相关淋巴样组织淋巴瘤的发生密切相关^[9-16]. 以抗生素为基础的药物疗法为 *H pylori* 感染的主要治疗方案, 但随着细菌耐药、药物不良反应及药效经济学等问题的突出, 迫切需要其他方法以防治 *H pylori* 感染, 其一便是研制有效的黏膜疫苗. 中性粒细胞激活蛋白(neutrophil activating protein, HP-NAP)为新近发现的 *H pylori* 主要毒力因子之一^[17]. 目前对 HP-NAP 的免疫原性及保护性研究尚处于起步阶段, 国内尚未见报道. 我们将 HP-NAP 基因亚克隆入真核表达载体 pIRES, 并

成功将重组质粒导入活减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207, 为进一步研究多价抗 *H pylori* 口服 DNA 疫苗奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori* 标准株 CCUG 17874 (即 NCTC 11638) 由意大利 IRIS 研究中心提供, 以弯曲菌选择培养基 (Merck 公司) 37 °C 微需氧培养. 大肠杆菌 DH 5 α 及活减毒鼠伤寒沙门菌 LB 5000, SL 7207 为本室保存. 胰蛋白酶及酵母提取物购自 Oxoid 公司. 克隆载体 pBT 为上海生工生物工程技术有限公司产品, 真核表达载体 pIRES 购自 Clontech 公司. EX TaqTM 限制性内切酶 Xho I, Mlu I 购自 TaKaRa 公司. 小量细菌基因组 DNA 及质粒抽提、纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司. DNA Ligation Kit Ver.2 及 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司. 氨苄青霉素(Amp)、IPTG 及 X-gal 为 Amresco 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 重组真核表达质粒 pIRES-napA 的构建及鉴定 根据 GenBank 中 *H pylori*-napA 序列, 设计上游引物 P1: 5' -GTC CTC GAG ATG AAA ACA TTT GAA ATT TTA AAA CAT TTG CAA GCG-3', 含 Xho I 酶切位点; 下游引物 P2: 5' -GTC ACG CGT TTA AGC CAA ATG GGC TTG CAA CAT CC-3', 含 Mlu I 酶切位点, 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 确保克隆基因开放读码框正确. CTAB 法^[18] 小量抽提 *H pylori* 基因组 DNA 为模板, 热循环仪行 PCR: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 60 s, 60 °C 复性 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 30 循环后再延伸 10 min. 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果. 将纯化 PCR 产物 TA 克隆入载体 pBT(pBT-napA), 转化受体菌 DH 5 α 感受态细胞(氯化钙法^[18]), 蓝白斑筛选并扩增 Amp 抗性克隆, 碱裂解法^[18] 小量抽提质粒, 测序鉴定. pBT-napA 经 Xho I 及 Mlu I 消化后切胶回收 napA, 将其亚克隆入 pIRES 之相同双酶切片段(pIRES-napA), 挑取阳性克隆, 抽提质粒行 PCR 及双酶切鉴定.

1.2.2 测序及生物信息学分析 重组质粒 pBT-napA 由上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定. 测序结果与 GenBank 中 *H pylori*-napA 核苷酸和蛋白质序列进行 BLAST 分析. Antheptot V5.0 软件分析其生物学特性.

1.2.3 口服 DNA 疫苗株的构建及鉴定 将重组质粒 pIRES-napA 转化 LB 5000 进行修饰, 挑取阳性菌落, 提取质粒进一步电击转化(25 μ F, 2.5 kV, 200 Ω , 5 ms)^[18] 终宿主菌 SL 7207, 挑取阳性菌落于含 100 mg/L Amp LB 培养液扩增 60 代, 抽提质粒行 PCR 及双酶切鉴定.

2 结果

2.1 *H pylori*-napA 基因的扩增 PCR 自 *H pylori* 基因组 DNA 中扩增出一 435 bp 条带, 与预计相符(图 1 泳道 2).

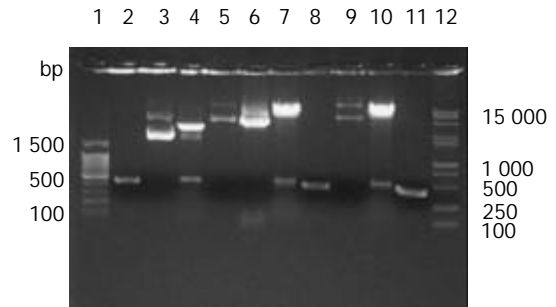


图 1 重组质粒 pBT-napA 及 pIRES-napA 鉴定图谱. 1: 100 bp DNA Ladder marker; 2: PCR amplified product of HP-NAP; 3: Recombinant plasmid pBT-napA; 4: pBT-napA/Xho I + Mlu I; 5: Plasmid pIRES; 6: Recombinant vector pIRES-napA; 7: pIRES-napA/Xho I + Mlu I; 8: PCR amplified product of pIRES-napA; 9: Plasmid SL 7207/pIRES-napA; 10: SL 7207/pIRES-napA/Xho I + Mlu I; 11: PCR amplified product of SL 7207/pIRES-napA; 12: DNA marker DL 2000 + 15 000.

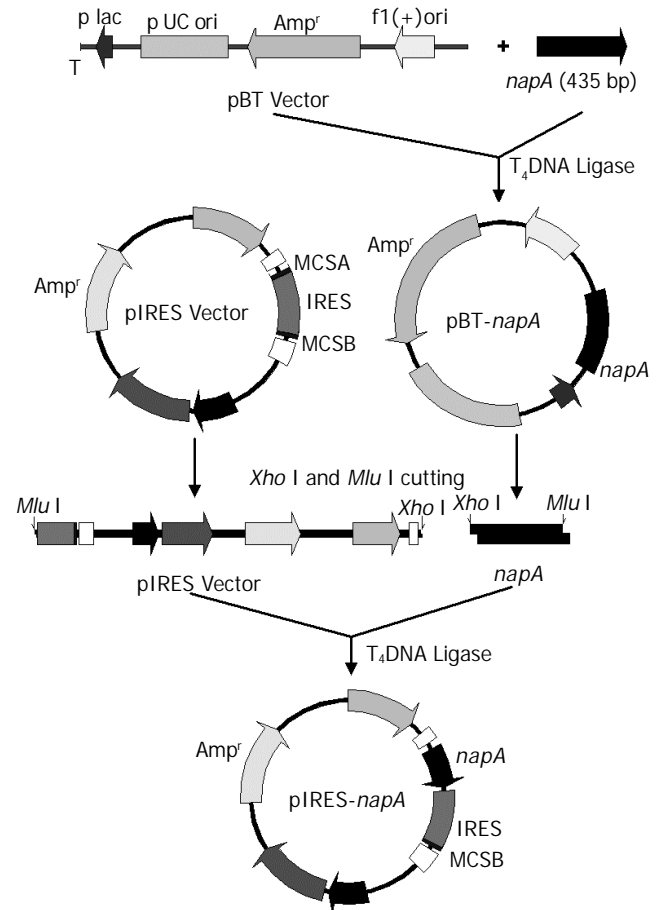


图 2 重组质粒 pBT-napA 及 pIRES-napA 构建示意图.

2.2 重组质粒的鉴定 重组质粒分别命名为 pBT-napA 及 pIRES-napA(图 2). 经双酶切和 PCR 鉴定, pBT-napA 及 pIRES-napA 均含有 435 bp 的目的片段(图 1), 表明重组质粒构建成功.

2.3 目的片段序列测定及生物信息学分析 将测序结果与 GenBank 中 *H pylori*-napA 核苷酸和蛋白质序列进行 BLAST 分析, 结果显示我们所克隆之 *H pylori*-napA 与 GenBank 中 *H pylori* SS1 株 napA 基因的同源性为 98% (427/435), 其中 C \rightarrow T 置换 3 个, A \rightarrow G 置换 4 个(图 3). 与其他常见 *H pylori* 菌株, 如 5D, 5A, 2B, 2A,

RHP901 α , DB2, 1811 α 等同源性均为 97% (426/435, 425/435). 克隆序列的碱基置换多数未改变氨基酸的编码, 与 GenBank 中 SS1 株的蛋白质同源性为 98% (142/144), 与其他常见 *H pylori* 菌株的同源性均为 97%. Antheprot 软件显示其蛋白质抗原性较 SS1 株无明显改变(图 4).

2.4 口服 DNA 疫苗稳定性及鉴定 携带重组质粒 pIRES-napA 之 SL 7207 扩增 60 代后未见明显质粒丢失. 以抽提质粒为模板, P1, P2 为引物, PCR 扩增出约 435 bp 目的基因; Xho I /Mlu I 双酶切亦可见线性化载体片段和目的基因(图 1 泳道 10, 11).

```

atg  aaa  aca  ttt  gaa  att  tta  aaa  cat  ttg  caa  gcg  gat  gcg  atc  gtg  tta  ttt  atg  aaa
M   K   T   F   E   I   L   K   H   L   Q   A   D   A   I   V   L   F   M   K
gtg  cat  aac  ttc  cat  tgg  aat  gtg  aaa  ggc  acc  gat  ttt  ttc  aat  gtg  cat  aaa  gcc  a c t
V   H   N   F   H   W   N   V   K   G   T   D   F   F   N   V   H   K   A   T
gaa  gaa  att  tat  gaa  gaa  ttt  gcg  gac  atg  ttt  gat  gat  ctc  gct  gaa  aga  atc  gct  c a a
E   E   I   Y   E   E   F   A   D   M   F   D   D   L   A   E   *   I   A   Q
tta  gga  cac  cac  ccc  tta  gtc  act  tta  tcc  gaa  gcg  ctc  aaa  ctc  act  cgt  gtt  aaa  gaa
L   G   H   H   P   L   V   T   L   S   E   A   L   K   L   T   R   V   K   E
gaa  act  aaa  acg  agc  ttc  cac  tct  aaa  gac  atc  ttt  aaa  gaa  att  cta  ggc  gat  tac  aaa
E   T   K   T   S   F   H   S   K   D   I   F   K   E   I   L   G   D   Y   K
cac  cta  gaa  aaa  gaa  ttt  aaa  gag  ctt  tct  aac  acc  gct  gaa  aaa  gaa  ggc  gat  aaa  g t t
H   L   E   K   E   F   K   E   L   S   N   T   A   E   K   E   G   D   K   V
acc  gta  act  tat  gcg  gac  gat  caa  ttg  gcc  aag  ttg  caa  aaa  tcc  att  tgg  atg  ttg  caa
T   V   T   Y   A   D   D   Q   L   A   K   L   Q   K   S   I   W   M   L   Q
gcc  cat  ttg  gct  taa
A   H   L   A
    
```

图 3 *H pylori*-napA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列.

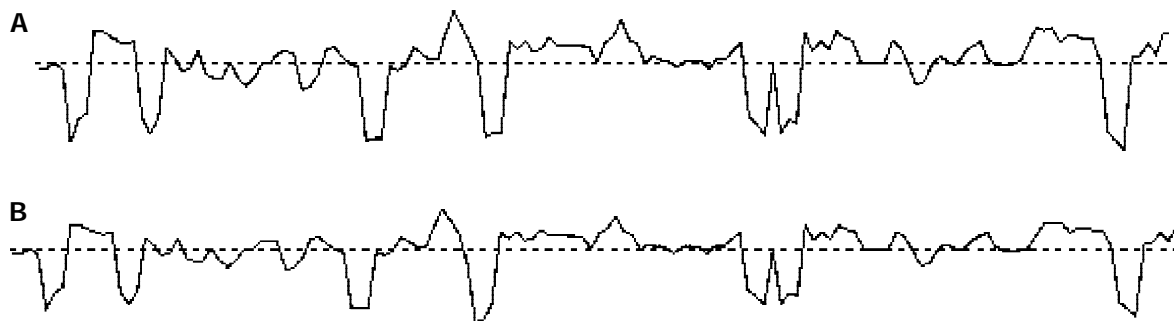


图 4 HP-NAP 抗原性分析(Welling 法). A: *H pylori* SS1 HP-NAP; B: 目的序列.

3 讨论

胃黏膜感染 *H pylori* 以中性粒细胞和单核细胞浸润为特征, 其损害程度与中性粒细胞浸润密切相关^[19]. *H pylori* 水提取物 150 ku 蛋白有促进中性粒细胞黏附内皮细胞及诱导中性粒细胞产生反应性氧自由基的作用, 命名为中性粒细胞激活蛋白(HP-NAP)^[20]. HP-NAP 位于 *H pylori* 菌体内, 通过自溶释放后, 结合于细菌表面, 于此起到黏附素的作用, 介导与粘蛋白的结合^[21], 或者与多形核白细胞神经鞘磷脂结合^[22]. 纯化的重组 HP-NAP 不含大肠杆菌脂多糖, 对人类中性粒细胞和单核细胞具有化学趋化作用^[17], 并诱导内皮细胞移行所必需的 β_2 整合素的表达^[20], 提示 HP-NAP 具有使上述细胞积聚于 *H pylori* 感染部位的作用. HP-NAP 为反应性氧自由基的强刺激剂, 其与特异受体结合, 级联激活细胞内事件, 胞质 Ca^{2+} 浓度及蛋白质磷酸化增加, 进而通过 PTX 敏感

途径(包括 ERK 和 p38-MAPK), 导致中性粒细胞表面功能性 NADPH 氧化酶的富集^[23]. 细胞因子 TNF 和 IFN- γ 可增强 HP-NAP 诱导的活性氧产生, 加重胃黏膜的损伤^[24]. HP-NAP 可促进纤维蛋白沉积和由 *H pylori* 引起的胃黏膜炎症反应^[25]. HP-NAP 亦可穿过上皮单层, 序贯激活肥大细胞脱颗粒和释放前炎症细胞因子 IL-6^[26]. 此外通过促进中性粒细胞和单核细胞募集和激活而直接作用于二者.

HP-NAP 高度保守, 60% 的 *H pylori* 感染患者体内存在 HP-NAP 特异抗体. Satin et al^[17]. 以纯化重组 HP-NAP 口服免疫 10 只小鼠, 结果 80% 个体获得保护性免疫, 高于 CagA(70%), 低于 *H pylori* 超声裂解物(90%). 提示 HP-NAP 为 *H pylori* 主要的毒力因子, 可作为有效的保护性抗原用于 *H pylori* 感染的疫苗防治.

DNA 疫苗因可诱导全面的免疫应答、提供同种异

株交叉保护作用、易于制备多价疫苗、兼有预防和治疗作用等特点在多种疾病的防治中显示出巨大的应用潜力。而与传统疫苗相比,活减毒鼠伤寒沙门菌这一新型口服疫苗载体释放系统亦具有无需纯化抗原,无需佐剂,可避免抗原在胃内降解和变性等优点^[27-29]。我们将HP-NAP基因亚克隆入真核表达载体pIRES,以其转化活减毒鼠伤寒沙门菌SL 7207,经PCR和双酶切鉴定,成功构建了HP-NAP活减毒鼠伤寒沙门菌口服DNA疫苗;所克隆HP-NAP全长DNA序列经BLAST分析与GenBank中相关序列具有高度同源性,生物信息学分析显示其具有良好抗原性。为多价基因工程疫苗的后继研究奠定了重要的实验基础。

4 ■ 参考文献

- Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004;113:321-333
- Sanders MK, Peura DA. *Helicobacter pylori*-Associated Diseases. *Curr Gastroenterol Rep* 2002;4:448-454
- Zhang J, Chen XL, Wang KM, Guo XD, Zuo AL, Gong J. Relationship of gastric *Helicobacter pylori* infection to Barrett's esophagus and gastro-esophageal reflux disease in Chinese. *World J Gastroenterol* 2004;10:672-675
- Mao YF, Yan J. Construction of prokaryotic expression system of ureB gene from a clinical *Helicobacter pylori* strain and identification of the recombinant protein immunity. *World J Gastroenterol* 2004;10:977-984
- Bai Y, Li LR, Wang JD, Chen Y, Jin JF, Zhang ZS, Zhou DY, Zhang YL. Expression of *Helicobacter pylori* Hsp60 protein and its immunogenicity. *World J Gastroenterol* 2003;9:2711-2714
- Qiao W, Hu JL, Xiao B, Wu KC, Peng DR, Atherton JC, Xue H. cagA and vacA genotype of *Helicobacter pylori* associated with gastric diseases in Xi'an area. *World J Gastroenterol* 2003;9:1762-1766
- Jiang Z, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Construction and characterization of bivalent vaccine candidate expressing HspA and M(r)18,000 OMP from *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2003;9:1756-1761
- Lai YC, Wang TH, Huang SH, Yang SS, Wu CH, Chen TK, Lee CL. Density of *Helicobacter pylori* may affect the efficacy of eradication therapy and ulcer healing in patients with active duodenal ulcers. *World J Gastroenterol* 2003;9:1537-1540
- Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S. *H pylori* infection and the development of gastric cancer. *Keio J Med* 2002;51(Suppl 2):63-68
- Lee SK, Lee YC, Chung JB, Chon CY, Moon YM, Kang JK, Park IS, Suh CO, Yang WI. Low grade gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphoma: treatment strategies based on 10 year follow-up. *World J Gastroenterol* 2004;10:223-226
- Al-Akwaa AM, Siddiqui N, Al-Mofleh IA. Primary gastric lymphoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:5-11
- Wang KX, Wang XF, Peng JL, Cui YB, Wang J, Li CP. Detection of serum anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin G in patients with different digestive malignant tumors. *World J Gastroenterol* 2003;9:2501-2504
- Lan J, Xiong YY, Lin YX, Wang BC, Gong LL, Xu HS, Guo GS. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. *World J Gastroenterol* 2003;9:54-58
- Wang RT, Wang T, Chen K, Wang JY, Zhang JP, Lin SR, Zhu YM, Zhang WM, Cao YX, Zhu CW, Yu H, Cong YJ, Zheng S, Wu BQ. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: evidence from a retrospective cohort study and nested case-control study in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:1103-1107
- Guo DL, Dong M, Wang L, Sun LP, Yuan Y. Expression of gastric cancer-associated MG7 antigen in gastric cancer, precancerous lesions and *H pylori*-associated gastric diseases. *World J Gastroenterol* 2002;8:1009-1013
- Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
- Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, Dusi S, Laudanna C, Tonello F, Kelleher D, Rappuoli R, Montecucco C, Rossi F. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med* 2000;191:1467-1476
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- Bayerdorffer E, Lehn N, Hatz R, Mannes GA, Oertel H, Sauerbruch T, Stolte M. Difference in expression of *Helicobacter pylori* gastritis in antrum and body. *Gastroenterology* 1992;102:1575-1582
- Evans DJ Jr, Evans DG, Takemura T, Nakano H, Lampert HC, Graham DY, Granger DN, Kviety PR. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun* 1995;63:2213-2220
- Namavar F, Sparrius M, Veerman EC, Appelmelk BJ, Vandenbroucke-Grauls CM. Neutrophil-activating protein mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfated carbohydrates on high-molecular-weight salivary mucin. *Infect Immun* 1998;66:444-447
- Teneberg S, Miller-Podraza H, Lampert HC, Evans DJ Jr, Evans DG, Danielsson D, Karlsson KA. Carbohydrate binding specificity of the neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1997;272:19067-19071
- Nishioka H, Baesso I, Semenzato G, Trentin L, Rappuoli R, Del Giudice G, Montecucco C. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP) activates the MAPK pathway in human neutrophils. *Eur J Immunol* 2003;33:840-849
- Dundon WG, Nishioka H, Polenghi A, Papinutto E, Zanotti G, Montemurro P, Del GG, Rappuoli R, Montecucco C. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 2002;291:545-550
- Montemurro P, Barbuti G, Dundon WG, Del Giudice G, Rappuoli R, Colucci M, De Rinaldis P, Montecucco C, Semeraro N, Papini E. *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein stimulates tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 production by human blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 2001;183:1055-1062
- Montemurro P, Nishioka H, Dundon WG, de Bernard M, Del Giudice G, Rappuoli R, Montecucco C. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a potent stimulant of mast cells. *Eur J Immunol* 2002;32:671-676
- Gentschev I, Dietrich G, Spreng S, Kolb-Maurer A, Brinkmann V, Grode L, Hess J, Kaufmann SH, Goebel W. Recombinant attenuated bacteria for the delivery of subunit vaccines. *Vaccine* 2001;19:2621-2628
- Del Giudice G, Covacci A, Telford JL, Montecucco C, Rappuoli R. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu Rev Immunol* 2001;19:523-563
- Dietrich G, Kolb-Maurer A, Spreng S, Scharl M, Goebel W, Gentschev I. Gram-positive and Gram-negative bacteria as carrier systems for DNA vaccines. *Vaccine* 2001;19:2506-2512