

· 论 著 ·

幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白 DNA 疫苗的构建及其免疫保护作用

孙波, 杨 骅, 满晓华, 李兆申*, 屠振兴, 龚燕芳

(第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 构建携带幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白(Hp neutrophil-activating protein, Hp-NAP)基因(*napA*)活减毒鼠伤寒沙门菌重组 DNA 疫苗, 初步观察其对慢性 Hp 感染的免疫保护作用。**方法:** 应用基因工程技术扩增全长 *napA*, 测序并经同源性分析后, 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构建 Hp-NAP 口服 DNA 疫苗。口服 Hp-SS1 建立 SS1 长期感染小鼠模型, 30 周后随机均分为 3 组, 每组各 5 只。治疗组予 10^9 cfu/0.4 ml 疫苗菌灌胃, 1 次/周 \times 3 周; 2 个对照组分别予等体积生理盐水或空白质粒。末次免疫 4 周后行快速尿素酶检测, ELISA 测定血清抗体效价。**结果:** 重组真核表达质粒 pIRES-*napA* 成功转化活减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207; 所克隆 *napA* 与 GenBank 中 SS1-*napA* 核苷酸和蛋白质的同源性均 $>98\%$ 。免疫后 4 周治疗组 75% (3/4) 小鼠快速尿素酶检测阴性, 对照组均阳性, 差异显著 ($P < 0.05$); 治疗组血清抗 Hp-NAP 抗体效价明显升高。**结论:** 成功构建了具有较好免疫保护作用的 Hp-NAP 口服重组 DNA 疫苗, 为进一步研制多价抗 Hp 核酸疫苗奠定了基础。

[关键词] 螺杆菌, 幽门; 中性粒细胞激活蛋白; 疫苗, DNA**[中图分类号]** R 379.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2004)08-0842-04Construction of an oral DNA vaccine carrying *H. pylori* neutrophil-activating protein and its immunoprotection effect

SUN Bo, YANG Hua, MAN Xiao-Hua, LI Zhao-Shen*, TU Zhen-Xing, GONG Yan-Fang (Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct a live attenuated *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) strain carrying *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) neutrophil-activating protein (Hp-NAP) gene as an oral recombinant DNA vaccine, and to observe its immunotherapy effect against chronic *H. pylori* infection. **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 transformed into a live attenuated *S. typhimurium* strain SL7207, and then lavaged into a long-term (30 weeks) model of mice infected by Sydney strain (SS1). **Results:** Using polymerase chain reaction (PCR) and restriction enzyme digestion, a recombinant eukaryotic expression plasmid pIRES-*napA* harboring *napA* gene of *H. pylori* was constructed, and the recombinant plasmid was successfully transformed into the live attenuated *S. typhimurium* strain SL7207. After 4 weeks of immunization, 75% of mice treated with DNA vaccine were rapid urease test negative, while those treated with vacant plasmid or normal saline alone were all positive ($P < 0.05$). And the titre of serum Hp-NAP antibody was significantly elevated in treated group. **Conclusion:** An effective recombinant live attenuated *S. typhimurium* strain carrying Hp-NAP gene is successfully constructed, which may help to develop polyvalent DNA vaccine against *H. pylori* infection.

[KEY WORDS] *Helicobacter pylori*; neutrophil activating protein; vaccines, DNA

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(8): 842-845]

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染为慢性活动性胃炎和消化性溃疡的主要病因, 与肠型胃癌和胃黏膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤的发生密切相关^[1,2]。随着细菌耐药、药物不良反应及药效经济学等问题的突出, 迫切需要其他方法防治 Hp 感染, 其一便是研制有效的核酸疫苗。Hp 中性粒细胞激活蛋白(Hp-NAP)为新近发现的 Hp 主要毒力因子之一^[3]。目前对 Hp-NAP 免疫原性及保护性研究尚处于起步阶段, 我们将其编码基因亚克隆入真

核表达载体并导入活减毒鼠伤寒沙门菌, 口服接种后取得了较好的保护效果, 为进一步研究多价抗 Hp 核酸疫苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒 Hp 标准株 CCUG 17874(即

[基金项目] 国家自然科学基金(30170427)。**[作者简介]** 孙波(1972-), 男(汉族), 博士, 讲师、主治医师。

* Corresponding author. E-mail: zhsl@81890.net

NCTC 11638)由意大利 IRIS 研究中心提供,悉尼株(SS1)为本室保存,均以弯曲菌选择培养基(Merck 公司)37℃微需氧培养。大肠杆菌 DH5 α 及活减毒鼠伤寒沙门菌 LB5000、SL7207 为本室保存。克隆载体 pBT 为上海生工产品,真核表达载体 pIRES 购自 Clontech 公司。

1.2 试剂 *EX Taq*TM, DNA Marker 及限制性内切酶 *Xho* I、*Mlu* I 购自宝生物工程(大连)有限公司。纯化 Hp-NAP 抗原为本室制备。马抗鼠 IgG 抗体为 Vector Laboratories 公司产品。HPUT-H102 快速尿素酶诊断试剂盒购自福建三强生物化工有限公司。

1.3 重组真核表达质粒 pIRES-*napA* 的构建 根据 GenBank 中 Hp-*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服务有限公司合成,确保克隆基因开放读码框正确。少量抽提 CCUG 17874 基因组 DNA 为模板,于 100 μ l PCR 反应体系扩增 *napA*: 94℃预变性 5 min, (94℃变性 60 s, 60℃复性 60 s, 72℃延伸 60 s) \times 30 个循环, 72℃延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳鉴定。将纯化 PCR 产物 T-A 克隆入载体 pBT(pBT-*napA*), 转化受体菌 DH5 α 感受态细胞(氯化钙法^[4]), 蓝白斑筛选并扩增氨苄西林抗性克隆, 碱裂解法^[4]少量抽提质粒, 测序鉴定。pBT-*napA* 经 *Xho* I、*Mlu* I 消化后切胶回收 *napA*, 将其亚克隆入 pIRES 载体相应酶切点(pIRES-*napA*), 挑取抗性克隆, PCR 及双酶切鉴定。

1.4 测序和同源性分析 扩增 *napA* 由上海生工生物工程技术服务有限公司行序列测定。测序结果与 GenBank 中 Hp-*napA* 核苷酸和蛋白质序列行 BLAST 分析。

1.5 口服 DNA 疫苗的构建 将重组质粒 pIRES-*napA* 转化 LB5000 进行甲基化修饰, 然后进一步电击转化^[4]终宿主菌 SL7207。挑取抗性菌落于含 100 μ g/ml 氨苄西林培养液扩增 60 代, 每 10 代抽提质粒行 PCR 及双酶切鉴定。

1.6 DNA 疫苗免疫保护作用 SPF 级 BALB/c 小鼠 15 只(雌性, 4 周龄)购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。参照文献^[5]制作 SS1 长期感染模型, 30 周后取 15 只随机均分为 3 组, 治疗组予 10⁹ cfu/0.4 ml 疫苗菌灌胃, 每周 1 次, 连续 3 周; 2 个

对照组分别予等体积生理盐水或空白质粒。末次免疫后 4 周处死小鼠, 剪取部分胃窦组织行快速尿素酶检测, 30 min 内变色者为阳性。收集血清, 1/2 梯度稀释后加入预包被纯化 Hp-NAP 之酶标板, ELISA 法测定抗 Hp-NAP 抗体效价。

1.7 统计学处理 采用 Fisher 精确概率检验。

2 结果

2.1 Hp-NAP 基因的扩增及重组质粒的鉴定 PCR 自 Hp 基因组 DNA 中扩增出一约 435 bp 条带, 与预计相符; pIRES-*napA* 经 PCR 和双酶切, 各获得一约 435 bp 目的片段(图 1), 表明重组真核表达质粒构建成功。

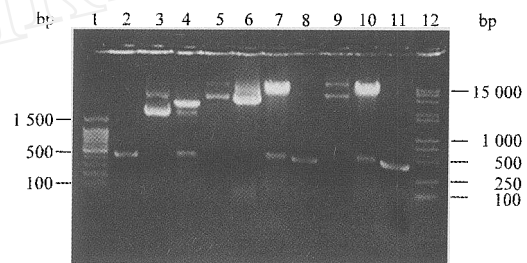


图 1 重组质粒 pIRES-*napA* 鉴定图谱
Fig 1 Identification map of recombinant plasmid pIRES-*napA*

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 plasmid pIRES-*napA*; 7: pIRES-*napA*/*Xho* I + *Mlu* I; 8: PCR amplified product templated on pIRES-*napA*; 9: Plasmid SL7207/pIRES-*napA* extracted from ending-host SL7207; 10: SL7207/pIRES-*napA*/*Xho* I + *Mlu* I; 11: PCR amplified product templated on SL7207/pIRES-*napA*; 12: DNA marker DL 2000 + 15000

2.2 目的片段同源性分析 将扩增片段测序结果与 GenBank 中相关序列行 BLAST 分析, 结果与 SS1-*napA* 核苷酸的同源性为 98.2%(427/435), 其中 C-T 置换 3 个, A-G 置换 4 个。与其他常见 Hp 菌株, 如 5D、5A、2B、2A、RHP901a、DB2、1811a 等同源性均 >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 SS1 株蛋白质同源性为 98.6%(142/144), 与其他常见 Hp 菌株的同源性均 >97%。

2.3 疫苗稳定性及鉴定 携带 pIRES-*napA* 之 SL7207 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)。

2.4 疫苗免疫保护作用 治疗组小鼠因操作不当死亡1只,余小鼠生长良好,未见明显发热及腹泻。末次免疫后4周治疗组75%(3/4)小鼠快速尿素酶检测阴性,优于生理盐水及空白质粒组的100%阳性($P < 0.05$)。血清抗Hp-NAP抗体效价测定结果如图2,生理盐水及空白质粒组均为1:512(2^9),口服DNA疫苗治疗组为1:32768(2^{15}),较对照组明显升高。

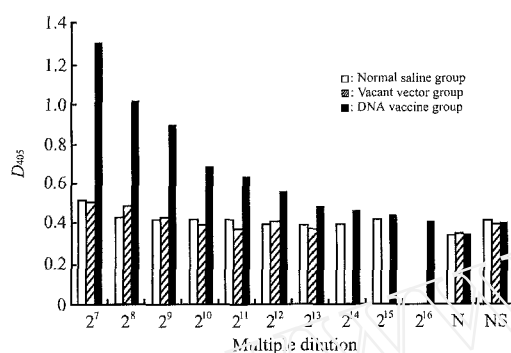


图2 血清抗Hp-NAP抗体效价测定

Fig 2 Serum Hp-NAP antibody titer

N: No serum; NS: Non-specific serum

3 讨论

胃黏膜感染Hp以中性粒细胞和单核炎症细胞浸润为特征,其损害程度与中性粒细胞浸润密切相关^[6]。早期研究发现,Hp水提取物中有一种或几种蛋白成分具有直接吸引和激活中性粒细胞及其他炎症细胞的作用,由此提纯一具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物质,即Hp-NAP^[7]。

Hp-NAP位于Hp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^[8],或者与多形核白细胞神经鞘磷脂结合^[9]。Hp-NAP对人类中性粒细胞和单核细胞具有化学趋化作用^[3],并诱导内皮细胞移行所必需的 β_2 整合素的表达^[7],提示Hp-NAP具有使上述细胞积聚于Hp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^[10]。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^[11]。

Hp-NAP亦可促进单核细胞组织因子合成和纤维蛋白溶酶原激活剂抑制剂的分泌。通过诱导细胞前凝血质和抗纤溶活性的协同表达,Hp-NAP

可促进纤维蛋白沉积和由Hp引起的胃黏膜炎症反应^[12]。Hp-NAP亦可穿过上皮单层,诱导肥大细胞的激活^[13],进一步支持Hp-NAP在Hp感染过程中体内炎症事件的触发和维持中具有重要作用。

Hp-NAP高度保守。临床研究发现,60%的Hp感染者体内存在Hp-NAP特异抗体。Satin等^[3]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Hp全抗原(90%)。提示Hp-NAP为Hp主要的毒力因子,可作为有效的保护性抗原用于Hp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。我们前期研究^[14]表明Hp尿素酶B亚单位核酸疫苗具有良好的免疫反应性,为进一步开发Hp核酸疫苗打下良好的基础。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^[15]。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SL7207,成功构建了Hp-NAP口服重组DNA疫苗。动物实验结果表明,疫苗口服后耐受良好,未见明显不良反应;75%小鼠快速尿素酶检测阴性,优于对照组100%阳性($P < 0.05$),表明所构建Hp-NAP口服重组DNA疫苗具有较好的免疫保护作用。ELISA显示Hp慢性感染小鼠血清中存在抗Hp-NAP特异抗体,但滴度较低;以Hp-NAP重组DNA疫苗口服免疫后抗体滴度明显升高,表明重组疫苗能够在体内表达Hp-NAP并诱导机体产生保护性免疫反应,进一步支持Hp-NAP具有良好的免疫原性,为多价抗Hp核酸疫苗的后继研究奠定了重要的实验基础。

[参考文献]

[1] Sanders MK, Peura DA. *Helicobacter pylori*-associated diseases[J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2002, 4(6): 448-454.
 [2] 孙波, 杨骅, 屠振兴, 等. 幽门螺杆菌与胃癌[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(12): 1356-1358.
 Sun B, Yang H, Tu ZX, et al. *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma[J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2003, 24(12): 1356-1358.
 [3] Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, et al. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor[J]. *J Exp Med*, 2000, 191(9): 1467-1476.
 [4] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Labora-

- tory Press, 2001. 19-56.
- [5] 秦敏, 杨宗新, 雒小玲, 等. 幽门螺杆菌动物感染模型的建立及较适感染剂量的确定[J]. 微生物学免疫学进展, 2002, 30(1):18-22.
- Qin M, Yang ZX, Luo XL, et al. Establishment of *Helicobacter pylori* infection mouse model and determining of the optimum infection dosage [J]. *Weishengwuxue Mianyixue Jinzhan (Adv Microbiol Immunol)*, 2002, 30(1):18-22.
- [6] Bayerdorffer E, Lehn N, Hatz R, et al. Difference in expression of *Helicobacter pylori* gastritis in antrum and body[J]. *Gastroenterology*, 1992, 102(5):1575-1582.
- [7] Evans DJ Jr, Evans DG, Takemura T, et al. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein[J]. *Infect Immun*, 1995, 63(6):2213-2220.
- [8] Namavar F, Sparrius M, Veerman EC, et al. Neutrophil-activating protein mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfated carbohydrates on high-molecular-weight salivary mucin [J]. *Infect Immun*, 1998, 66(2):444-447.
- [9] Teneberg S, Miller-Podraza H, Lampert HC, et al. Carbohydrate binding specificity of the neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(30):19067-19071.
- [10] Nishioka H, Baesso J, Serenzato G, et al. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP) activates the MAPK pathway in human neutrophils[J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(4):840-849.
- [11] Dundon WG, Nishioka H, Polenghi A, et al. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* [J]. *Int J Med Microbiol*, 2002, 291(6-7):545-550.
- [12] Montemurro P, Barbuti G, Dundon WG, et al. *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein stimulates tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 production by human blood mononuclear cells[J]. *J Infect Dis*, 2001, 183(7):1055-1062.
- [13] Montemurro P, Nishioka H, Dundon WG, et al. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a potent stimulant of mast cells[J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(3):671-676.
- [14] 徐灿, 李兆申, 屠振兴, 等. 幽门螺杆菌 UreB 核酸疫苗的构建[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(1):51-54.
- Xu C, Li ZS, Tu ZX, et al. Construction of *Helicobacter pylori* urease B subunit nucleic acid vaccine [J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2004, 25(1):51-54.
- [15] Gentschev I, Dietrich G, Spreng S, et al. Recombinant attenuated bacteria for the delivery of subunit vaccines [J]. *Vaccine*, 2001, 19(17-19):2621-2628.
- [收稿日期] 2004-02-18 [修回日期] 2004-04-20
[本文编辑] 曹静

(上接第 826 页)

者恢复良好,第3天拔除气管插管,改面罩双水平气道正压通气模式呼吸,第5天改鼻导管吸氧自主呼吸,呼吸频率约23次/min,心率110次/min,血压约130/65 mmHg,血氧饱和度97%~98%。血气分析:pH 7.38,氧分压98 mmHg,二氧化碳分压42 mmHg。术后第8天出现肺部感染,体温升高,血氧饱和度下降,波动于94%~95%之间。痰细菌培养示:大量革兰阳性菌,予以万古霉素抗感染,行气管切开,予呼吸机辅助呼吸。术后13d,纤维支气管镜检查见右下支气管腔内大量脓痰,痰培养检出曲霉菌,遂改用两性霉素B(0.02 mg·kg⁻¹·d⁻¹静脉滴注,0.2%~0.3%局部冲洗并雾化吸入)和伊曲康唑(200 mg/d口服),3d后痰培养阴性,胸片示肺部炎症明显好转。术后第25天,支气管镜见左主支气管内出现肉芽肿,表面覆盖大量坏死组织。其后出现3次咯血,每次量约200 ml,行纤维支气管镜下肉芽肿电切术,病理证实为曲霉菌肉芽肿。术后第33天,支气管肉芽肿溃疡,破入纵隔,形成气管纵隔瘘,行左主支气管支架置入术,但因置入技术欠熟练造成出血将左主支气管堵塞,导致感染进一步加重,出现感染性休克,同时因两性霉素B造成急性肾功能衰竭,最后死于多器官功能衰竭,存活41d。

2 讨论 单肺移植治疗终末期慢性阻塞性肺气肿病例,我国已经有多例报道,但双肺移植报道不多。本例术式为整体双肺移植,受体为慢性阻塞性肺气肿,有以下几点经验教训:(1)适应证的选择:慢性阻塞性肺气肿是肺移植的手术适应证,但

行双肺还是单肺移植,目前尚无定论。Weill 和 Keshavjee^[1]认为对于终末期肺气肿患者双肺移植效果好于单肺移植。本例患者手术前体质尚可,年龄不大,而且 ECT 显示双肺灌注均差,肺功能显著降低,担心单肺移植不能有效改善患者呼吸功能,会影响血流动力学,增加感染机会故行双肺移植。(2)手术方式:目前国际上一般用序贯式双肺移植,左右肺依次移植^[2]。本例因顾虑供肺保存时间故采用整体双肺移植,虽然吻合口少,手术省时,但要分离受体纵隔,创伤大,术后渗血多。本例术后胸腔引流液较多与此有关。(3)术后感染的处理:肺移植成功率不高的主要原因之一是肺部感染。本例术后出现严重的细菌及曲霉菌感染,治疗上主要是根据药敏结果调整抗生素,每天定时纤支镜冲洗吸痰。但由于经验的欠缺,我们在发现了曲霉菌感染后未及时停用对曲霉菌无效的传统抗真菌药氟康唑,延误了有效的治疗,其后虽用两性霉素B使曲霉菌感染得到一定程度的控制,但两性霉素B引起了急性肾功能衰竭,此为本例手术的主要教训。

[参考文献]

- [1] Weill D, Keshavjee S. Lung transplantation for emphysema: two lungs or one [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2001, 20(7):739-742.
- [2] 陈肖嘉. 临床肺移植进展 [J]. 中华胸心血管外科杂志, 2002, 18(1):60.
- [收稿日期] 2003-12-08 [修回日期] 2004-03-10
[本文编辑] 孙岩