

## 幽门螺杆菌 UreB 核酸疫苗的构建

徐 灿,李兆申\*,屠振兴,杜奕奇,孙 波,杨 骅,龚燕芳,满晓华,许爱芳

(第二军医大学长海医院消化内科,上海 200433)

**[摘要]** **目的:**构建含幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)尿素酶 B 亚单位(UreB)基因的核酸疫苗。**方法:**抽提 Hp 标准菌株 CCUG17874 基因组 DNA,应用 PCR 技术从基因组 DNA 扩增 UreB 基因,克隆入 PUCmT 载体,检测 UreB 基因序列。经过一系列酶切、连接反应将其克隆入真核表达载体 pIRES,转入感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,筛选阳性克隆,通过 PCR 和酶切反应进行鉴定。通过脂质体法将构建好的重组载体 pIRES-UreB 转染 COS-7 细胞,Western 印迹分析检测 pIRES-UreB 表达 UreB 蛋白的免疫原性。**结果:**扩增出长约 1 700 bp 的 UreB 基因,与基因库 Hp UreB 序列一致,PCR 和酶切鉴定结果证实成功构建了含 UreB 基因的 Hp 核酸疫苗 pIRES-UreB,并且 Western 印迹分析检测到特异性的蛋白条带。**结论:**构建了具有免疫反应性 UreB 基因的 Hp 核酸疫苗,为进一步探索其免疫作用奠定了基础。

**[关键词]** 幽门螺杆菌;尿素酶 B 亚单位;疫苗;DNA

**[中图分类号]** R 378.99; R 392-33

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0051-04

### Construction of *Helicobacter pylori* urease B subunit nucleic acid vaccine

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

**[ABSTRACT]** **Objective:** To construct nucleic acid vaccine of *Helicobacter pylori* (Hp) urease B subunit gene (UreB). **Methods:** The genomic DNA of the standard Hp strain 17 874 was isolated. UreB gene fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into PUCmT vector; DNA sequence of the amplified UreB gene was assayed and cloned into the eukaryotic expression vector pIRES. The recombinant plasmid was used to transform competent *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , and the positive clones were screened by PCR reaction and restriction enzyme digestion. Then the recombinant pIRES-UreB was transfected to COS-7 cells with Lipofectamine<sup>TM</sup>2000; the immunogenicity of UreB protein expressed was detected with Western blot. **Results:** A 1 700 bp UreB gene fragment was amplified from the genomic DNA and was consistent with the sequence analysis of the Hp UreB. PCR and restriction enzyme digestion confirmed that Hp UreB gene was inserted into the eukaryotic expression vector pIRES and the nucleic acid vaccine pIRES-UreB was successfully constructed; the specific strip of UreB expressed by pIRES-UreB was detected by Western blot. **Conclusion:** The nucleic acid vaccine pIRES-UreB with immunogenicity has been constructed, and it is helpful for further investigation on the immune action of the nucleic acid vaccine.

**[KEY WORDS]** *Helicobacter pylori*; urease B subunit; vaccines, DNA

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 51-54]

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染已经被公认为慢性胃炎、胃十二指肠溃疡的重要病因,与胃癌、胃黏膜相关性淋巴瘤密切相关,已被世界卫生组织列为 I 类致癌原。在全世界范围内,无论在发达国家还是发展中国家人群的 Hp 的感染率都较高,目前 Hp 的根治性治疗方案是联合应用质子泵抑制剂、铋剂、抗生素的“三联”或“四联”疗法<sup>[1]</sup>。由于 Hp 感染范围广,治疗费用较高、药物存在一定不良反应、而且随着抗生素的普遍应用耐药菌株逐渐增多,且停药后易复发等因素,使以上治疗的临床应用受到较大限制<sup>[2]</sup>。疫苗的预防成为防治人群 Hp 感染的最有前景的方法之一。

既往对 Hp 疫苗的研究主要集中在减毒、灭活和亚单位疫苗。核酸疫苗(nucleic acid vaccine)是新

兴的第 3 代疫苗,近年来,核酸疫苗取得可喜进展,已研究开发出如肿瘤相关基因、流感病毒、乙肝病毒、人类免疫缺陷病毒、狂犬病毒、结核杆菌、疟原虫等疫苗<sup>[3,4]</sup>,而 Hp 的核酸疫苗罕见研究报道。本实验选取尿素酶 B 亚单位(urease B subunit, UreB)为疫苗候选抗原,构建 Hp UreB 的核酸疫苗。

### 1 材料和方法

1.1 菌株和质粒 幽门螺杆菌 CCUG17874 由意大利 IRES 研究中心提供,大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由第二

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30170427)。

**[作者简介]** 徐 灿(1976-),女(汉族),博士,讲师、主治医师。

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

军医大学东方肝胆外科医院病毒与分子研究所惠赠。COS-7 细胞由第二军医大学基础医学部免疫学教研室提供。质粒 pIRES 购自 Clontech 公司。兔抗 Hp 的全菌抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 购自 DAKO, Lipofectamine™ 2000 购自 Gibco 公司。

1.2 试剂和仪器 限制性内切酶购自 New England Biolabs 公司, Extaq premix、T4 ligation Kit、DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司大连分公司。QIA prep Spin Miniprep、QIA quick Gel Extraction Kit 购自 Qiagen 公司。PCR 反应在 Eppendorf authorized thermal cycler 中进行。

1.3 UreB 基因片段的扩增 培养 CCUG17874, 收集菌落, 采用 CTAB 法抽提基因组 DNA<sup>[5]</sup>, 于 -20℃ 保存。根据基因库的 Hp 的序列及质粒 pIRES 的酶切位点, 设计扩增 UreB 的上下游引物序列, 上游 5'GCT AGC CAC CAT GAA AAA GAT TAG CAG AAA AG 3', 下游: 5'CTC GAG CTA GAA AAT GCT AAA GAG TTG CGC C 3', 分别含有 *Nhe* I 及 *Xho* I 酶切位点。引物由上海生物工程服务有限公司合成。以 Hp 的基因组 DNA 为模板, 在 50 μl 体系中进行 PCR 反应, 条件如下: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 30 s, 55℃ 50 s, 72℃ 90 s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.4 扩增的 UreB 的序列分析 UreB 的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 割胶经回收试剂盒回收(上海申能博彩公司), 然后通过 T-A 克隆连接入 pUCmT 载体, 转化入 DH5α 感受态细胞, 挑选阳性克隆, 酶切鉴定, 由上海申能博彩公司以全自动序列分析仪双向测定插入片段 UreB 的序列完成测序。

1.5 pIRES-UreB 真核表达载体的构建 *Nhe* I 及 *Xho* I 双酶切 pIRES 质粒及插入 UreB 的 pUCmT 重组质粒, 回收纯化 UreB 片段及 pIRES 质粒, 通过连接反应把 UreB 片段插入酶切后的 pIRES, 转化 DH5α 感受态细胞, 挑选阳性克隆, 抽提重组阳性克隆菌的质粒, 经双酶切及 PCR 反应鉴定重组质粒。

1.6 pIRES-UreB 真核表达载体转染 COS-7 细胞 为了检测重组载体能否表达 UreB 蛋白, 采用脂质体法把 pIRES-UreB 转入真核细胞 COS-7。具体方法: 应用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 (100 U/ml 青霉素, 100 μg/ml 链霉素, 15 mmol/L HEPES, 2 mmol/L L-glutamine), 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 常规培养 COS-7 细胞, 在转染前 1 d 消化细胞, 并计数转种入 6 孔板, 然后按照一定的比例混合 Lipofectamine™ 2000 和重组载体 pIRES-UreB, 并和 COS-7 细胞共

同培养, 24~48 h 收集细胞上清液, -80℃ 冻存待测。

1.7 Western 印迹分析检测表达蛋白免疫原性 采用 10% SDS-PAGE 进行蛋白电泳, 电转至硝酸纤维素膜, 2% 牛血清白蛋白(BSA)封闭, 加入兔抗 Hp 的全菌抗体为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 并显影。

## 2 结果

2.1 UreB 基因的扩增 通过 PCR 方法扩增出 1 700 bp 的 UreB 基因片段, 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。

2.2 扩增的 UreB 基因序列分析结果 PCR 法扩增出的 UreB 基因片段通过 T-A 克隆入测序载体 pUCmT 载体, 成为重组的 pUCmT-UreB, 测序结果分析显示扩增出的 UreB 基因序列与报道的 Hp 原序列同源性达 98%, 以该序列推导出的氨基酸序列与文献报道完全一致。

2.3 真核表达质粒 pIRES-UreB 的构建及鉴定 重组质粒 pUCmT-UreB 经 *Nhe* I 及 *Xho* I 双酶切后琼脂糖凝胶电泳, 回收长度约 1 700 bp 的基因片段即 UreB 片段, 克隆入真核表达载体 pIRES 相应的酶切位点, 筛选阳性克隆, 以双酶切及 PCR 反应鉴定, 酶切后可见长约 1 700 bp 及 6.1 kb 大小的片段, 与预期结果相符, PCR 可扩增出 1 700 bp 的 UreB 基因片段, 表明成功将 UreB 基因插入了 pIRES, 构建了真核表达质粒 pIRES-UreB, 结果见图 2。

2.4 Western 印迹分析检测表达蛋白免疫原性 pIRES-UreB 以脂质体法转染后, 有少量 COS-7 细胞死亡。把重组质粒表达后的蛋白上清进行 Western 印迹分析, 可见在相对分子质量约 66 000 左右出现特异性的蛋白条带, 而对照组无 pIRES-UreB 转染的 COS-7 细胞则无条带表达, 结果见图 3。

## 3 讨论

大量的研究证实幽门螺杆菌感染与消化道疾病密切相关, 而且在世界范围内幽门螺杆菌的人群感染率较高, 以往对控制 Hp 感染的研究集中在如何根治 Hp 感染, 然而随着 Hp 耐药菌株的日益增多, 且停药后易复发等及治疗费用等因素, 人们渐渐把目光转向预防即疫苗的研制上来。

迄今为止, 国内外对 Hp 疫苗的研究主要是进行蛋白疫苗的研制, 如采用 PCR 法从 Hp 基因组 DNA 扩增 Ure 基因片段, 克隆入载体并转入大肠杆菌大量表达, 然后纯化重组尿素酶蛋白, 再与黏膜

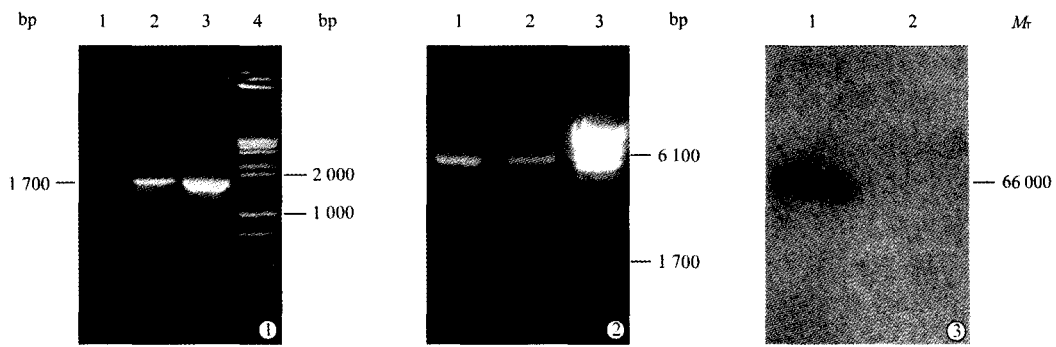


图 1 UreB 的 PCR 产物电泳图

Fig 1 Electrophoresis of UreB PCR product

1; Blank control; 2,3; 1 700 bp PCR product of UreB; 4; Marker(DL2000+15000)

图 2 pIRES-UreB 的酶切电泳图

Fig 2 Electrophoresis of pIRES-UreB restriction enzyme digestion

1,2; pIRES-UreB after digestion with *Nhe* I and *Xho* I ; 3; DNA Marker  $\lambda$  *Hind* III

图 3 pIRES-UreB 表达蛋白的 Western 印迹分析

Fig 3 Western blot of protein expressed by pIRES-UreB

1; COS-7 cell transfected by pIRES-UreB; 2; COS-7 cell without transfection as control

免疫佐剂如霍乱毒素结合后进行免疫接种,可部分获得一定时期内的免疫保护作用。该类疫苗制作步骤较复杂,而且黏膜免疫佐剂如霍乱毒素有较大的胃肠道毒性,剂量大时可能难以接受<sup>[6~8]</sup>。尚有研究发现,重组 Ure 和霍乱毒素组成的疫苗接种鼠后,可保护 BALB/c 鼠免受 *H. heilmannii* 感染,显著减少预先感染的菌数量,然而同时也加剧了鼠胃体黏膜的损伤,导致胃黏膜萎缩<sup>[9]</sup>。

核酸疫苗是将编码某种保护性抗原蛋白的外源基因克隆到真核表达载体上构建成重组质粒,然后将重组质粒直接导入动物或人体内,使外源基因直接在活体内表达,产生相应抗原激活机体免疫系统引起体液及细胞免疫反应,从而达到预防治疗疾病的目的。因其具有以下特点而备受关注:(1)不仅能诱导体液免疫,还能激活细胞毒性 T 淋巴细胞诱导细胞免疫,而传统疫苗中仅减毒活疫苗能诱导细胞免疫,但活疫苗安全性问题较难解决,使其实际应用受一定限制;(2)诱导针对多个抗原的免疫保护作用,可能对病原体的变异种具有免疫效应;(3)可在体内持续较长时间甚至产生终生免疫保护;(4)疫苗本身是重组质粒,制作成本简单,价格低廉,具有热稳定性,运输方便;(5)应用广泛,不仅有预防作用,还可以作为治疗性疫苗使用<sup>[10]</sup>。

核酸疫苗主要由保护性抗原及真核表达载体构成,保护性抗原的筛选是构建核酸疫苗的关键。Ure 由 Hp 产生并释放到周围环境,是 Hp 胃内定植的重要因素,能水解尿素产生二氧化碳和氨,氨中和胃酸

使 Hp 处于相对稳定的酸碱环境,因而 Ure 对 Hp 在胃肠道酸性环境中定植并存活至关重要。不同菌株的 Ure 具有高度保守性,故 Ure 是第 1 个被用于疫苗研制且研究最广泛的候选抗原,它由相对分子质量为 30 000 大小的 A 亚基和 66 000 的 B 亚基构成。UreB 由于缺乏 Ure 活性而保留其免疫原性,而且高度保守,成为最佳候选抗原。过氧化氢酶位于 Hp 表面或以活性形式分泌,具有两个相同的亚单位,相对分子质量约 50 000。Miyashita 等<sup>[11]</sup>把 Hp 过氧化氢酶的 DNA 克隆入真核表达载体 pcDNA3.1,构建了编码过氧化氢酶的核酸疫苗 pcDNA3.1-kat,通过经皮及经鼻两种方式把 pcDNA3.1-kat 直接注入 C57/BL6 小鼠体内,于末次免疫后的 3 个月,用 Hp SS1 活菌株细胞攻击鼠,检测血清的抗体及胃内 Hp 定植及胃粘膜炎症反应,结果实验组小鼠均能获得明显的免疫保护,与对照组相比,实验组鼠胃粘膜仅可见少数炎症细胞浸润,胃炎积分明显降低。以上结果表明编码 Hp 过氧化氢酶的 DNA 疫苗可诱导机体产生抗 Hp 的免疫保护,鼻腔免疫与经皮免疫同样有效。

但本实验选用了 UreB 作为候选抗原,从 Hp 的基因组 DNA 扩增出 UreB 基因片段,测序鉴定准确后,通过一系列酶切连接反应成功克隆入真核表达载体 pIRES,成功构建了含有 UreB 的核酸疫苗 pIRES-UreB。

我们通过脂质体法把 pIRES-UreB 转入真核细胞 COS-7 进行表达,收集表达后的细胞上清液,进

行 Western 印迹分析, 可见在相对分子质量约 66 000 左右出现特异性的蛋白条带, 即 UreB 蛋白, 而对照组则未出现条带。这证实本实验构建的 pIRES-UreB 核酸疫苗具有免疫反应性, 为进一步开发 Hp 的核酸疫苗打下良好的基础。但对于该疫苗经接种后能在体内起多大的免疫保护和治疗作用及其可能的作用机制尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] Anagnostopoulos GK, Kostopoulos P, Margantinis G, et al. Omeprazole plus azithromycin and either amoxicillin or tinidazole for eradication of *Helicobacter pylori* infection[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2003, 36(4): 325-328.

[2] Go MF. Treatment and management of *Helicobacter pylori* infection[J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2002, 4(6): 471-477.

[3] Hodge JW, Grosenbach DW, Schlom J. Vector-based delivery of tumor-associated antigens and T-cell co-stimulatory molecules in the induction of immune responses and anti-tumor immunity[J]. *Cancer Detect Prev*, 2002, 26(4): 275-291.

[4] Curtiss R 3rd. Bacterial infectious disease control by vaccine development[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(8): 1061-1066.

[5] 徐 灿, 李兆申, 屠振兴, 等. cagE 在胃肠疾病患者中的分布及其临床意义[J]. 第二军医大学学报, 2002, 21(8): 874-876. Xu C, Li ZS, Tu ZX, et al. The distribution of cagE gene in gastroenterological patients and its clinical significance[J]. *Di-er*

*Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2002, 21(8): 874-876.

[6] Banerjee S, Medina-Fatimi A, Nichols R, et al. Safety and efficacy of low dose *Escherichia coli* enterotoxin adjuvant for urease based oral immunisation against *Helicobacter pylori* in healthy volunteers[J]. *Gut*, 2002, 51(5): 634-640.

[7] Myers GA, Ermak TH, Georgakopoulos K, et al. Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease confers long-lasting immunity against *Helicobacter felis* infection[J]. *Vaccine*, 1999, 17(11-12): 1394-1403.

[8] 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): 2560-2565.

[9] Dieterich C, Bouzourene H, Blum AL, et al. Urease-based mucosal immunization against *Helicobacter heilmannii* infection induces corpus atrophy in mice[J]. *Infect Immun*, 1999, 67(11): 6206-6209.

[10] Henke A. DNA immunization-a new chance in vaccine research [J]? *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 2002, 191(3-4): 187-190.

[11] Miyashita M, Joh T, Watanabe K, et al. Immune responses in mice to intranasal and intracutaneous administration of a DNA vaccine encoding *Helicobacter pylori*-catalase [J]. *Vaccine*, 2002, 20(17-18): 2336-2342.

[收稿日期] 2003-06-20 [修回日期] 2003-11-14  
[本文编辑] 曹 静

(上接第 50 页)

表 1 血清皮质醇浓度昼夜变化情况

( $\bar{x} \pm s, \mu\text{B}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

组 别	n	0:00	8:00	16:00
对照组	30	64.15±71.67	121.38±73.44	81.21±69.85
无心衰组	45	96.57±82.15	181.14±106.57	134.16±91.39*
心衰组	54	184.45±91.34**	△203.11±99.49*	△146.61±83.31**

\* P<0.05, \*\* P<0.01 与对照组比较; △P<0.05 与无心衰组比较

对照组但在正常范围内; 心衰组昼夜节律性异常, 8:00 值异常升高, 但 0:00 值高于 16:00 值。昼夜节律正常的患者中, 测值正常者心衰组与无心衰组分别为 12 例(22.22%)和 18 例(40.00%), 1 项以上升高者 2 组分别为 10 例(18.52%)和 16 例(35.56%), 差异无显著性; 昼夜节律异常的患者中, 测值正常者心衰组与无心衰组分别为 15 例(27.78%)和 5 例(11.11%), 1 项以上升高者 2 组分别为及 17 例(31.48%)和 6 例(13.33%), 有显著性差异(P<0.05)。

3 讨 论

正常成人皮质醇日分泌量约为 25~37 mg, 应激时分泌迅速增加, 可达正常日分泌量的 3~5 倍<sup>[1]</sup>。正常人皮质醇呈脉冲分泌且有昼夜节律性变化, 在晨醒来时达到最高水平, 下午和夜晚为低水平, 谷值在夜间睡眠 1~2 h 后<sup>[2]</sup>。本资料

显示对照组及无心衰组存在昼夜节律性, 而心衰组昼夜节律性异常, 0:00 值高于 16:00 值, 与无心衰组及对照组比较均有显著性差异。有心脏病者, 无论有无心衰昼夜节律异常, 测值正常者所占比例 2 组相比差异显著; 而昼夜节律正常者, 测值升高者所占比例 2 组相比无显著性差异。分析原因为: 皮质醇水平与习惯性睡眠、觉醒周期逐渐形成相似和同步的昼夜节律, 而心衰发病或加重时打破了这种昼夜节律性, 多数患者夜间憋醒或不能平卧, 出现节律异常; 也可能预示疾病的严重性, 即使皮质醇测值在正常范围内。

无器质性疾病的正常对照组和心衰组比较各时间点均有非常显著性差异, 而和无心衰组比较 8:00 值、16:00 值也有显著性差异; 心衰组尽管 8:00 值超出正常范围, 但与无心衰组比较无显著性差异。分析原因为: (1) 老年心脏病患者无论有无心衰, 作为对机体的一种损害, 均可使皮质醇分泌处于应激状态; (2) 老年人常有多种疾病并存, 而各种疾病间的相互影响可掩盖或加重心脏病的症状和体征, 或产生与心衰类似的 症状, 导致诊断的困难; (3) 不少老年人即使有心衰存在, 但活动时并不感到明显气短, 而是表现为极度疲倦, 易漏诊; (4) 老年心脏病人肝肾功能生理和/或病理的影响, 使皮质醇代谢减少。

(下转第 71 页)