

表达幽门螺杆菌 UreB 减毒鼠伤寒沙门氏菌 对小鼠的免疫保护作用

朱森林, 陈敏湖, 廖文俊, 陈洁, 胡品津

(中山医科大学附属第一医院消化内科, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】构建表达幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)尿素酶 B 亚单位(UreB)减毒鼠伤寒沙门氏疫苗菌, 研究其对小鼠抗 *H. pylori* 的免疫保护作用。【方法】用 PCR 扩增 *ureB*, 将其克隆入高效原核表达质粒 pTrc99A, 进行基因测序, 重组质粒鉴定后导入减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261。用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳、Western blot 和薄层扫描进行目的蛋白表达分析。C57BL/6 小鼠用重组菌免疫, 4 周后用 *H. pylori* SS1 攻击, 再 4 周后处死小鼠, 取胃做快速尿素酶试验和 *H. pylori* 定量培养, 对照观察免疫效果。【结果】构建了携带 *ureB* 的重组原核表达质粒 pTrc99A-*ureB*, 并将它成功转化了减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261。重组菌 SL3261(pTrc99A-*ureB*)表达了约 66 ku 的 UreB。与对照组比, 重组菌免疫组 *H. pylori* 定植水平明显下降 ($P < 0.05$)。【结论】构建了表达 *H. pylori* UreB 的重组减毒鼠伤寒沙门氏疫苗菌, 该菌株对 C57BL/6 有免疫保护作用。

关键词: 螺杆菌, 幽门/免疫学; 沙门氏菌, 鼠伤寒/免疫学; 疫苗, 减毒/生物合成; 小鼠

中图分类号: R378.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)06-0418-05

Immunoprotection of Mice Against *Helicobacter pylori* Infection by Oral Immunization with Attenuated *Salmonella* *typhimurium* Expressing Urease Subunit B

ZHU Sen-lin, CHEN Min-hu, LIAO Wen-jun, CHEN Jie, HU Pin-jin

(Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To construct a recombinant live attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain expressing *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) urease subunit B (UreB), and to investigate its immunoprotection to mice against *H. pylori* infection. 【Methods】*ureB* was amplified by PCR and cloned into a procaryotic expression plasmid pTrc99A, and the identified recombinant plasmid was then used to transform an attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine vector SL3261, and the positive clones were screened by PCR and restriction enzyme digestion. The UreB expressed in the recombinant vaccine strain was analyzed by SDS-PAGE, Western blot and optical density scanning. C57BL/6 mice were immunized with recombinant vaccine strain, challenged with *H. pylori* SS1 4 weeks later, and sacrificed for rapid urea test and *H. pylori* quantitative culture of the gastric mucosa another 4 weeks later. 【Results】The *ureB* could be amplified from the plasmid extracted from the recombinant SL3261(pTrc99A-*ureB*) by PCR, and also the *ureB* fragment could be produced from this plasmid after restriction enzyme digestion. SDS-PAGE, Western blot and optical density scanning indicated that UreB was expressed in the recombinant vaccine strain SL3261(pTrc99A-*ureB*) as a 66 ku protein. *H. pylori* quantitative culture of the gastric mucosa indicated that, the colonized level of *H. pylori* in immunized mice was lower

收稿日期: 2000-12-15

基金项目: 卫生部临床学科重点基金资助项目(97040226); 广东省科技计划重点攻关基金资助项目(99M04802G); 广东省自然科学基金资助项目(990077); 广东省高教厅“千百十工程”优秀人才基金资助项目(2000-08)

作者简介: 朱森林(1968-), 男, 江西修水人, 医学博士, 主治医师, 陈敏湖, 博士生导师, 教授。rights reserved. <http://www.cnki.net>

than that of the control ($P < 0.05$). **【Conclusion】** A recombinant live attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain expressing *H. pylori* UreB was constructed and identified, and it induced immunoprotective effect against *H. pylori* in mice.

Key words: *Helicobacter pylori* /immunology; *Salmonella typhimurium*; vaccine, attenuated/biosynthesis; mice

人群幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 感染的防治应该建立在有效疫苗应用的基础上, 尿素酶 (urease, Ure) 已被证实为一种有效的保护性抗原, 最终可望成为 *H. pylori* 疫苗的重要组成部分, 而其中尿素酶 B 亚单位 (UreB) 起主要的作用^[1,2]。活减毒鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 能表达异种抗原, 在哺乳动物中经口、鼻、直肠和阴道粘膜途径免疫能诱导强大而特异的免疫反应^[3]。我们将 *ureB* 克隆入表达质粒 pTrc99A, 并进行了核苷酸测序, 再将重组质粒导入减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261, 构建成表达幽门螺杆菌 UreB 减毒鼠伤寒沙门氏菌疫苗菌, 并研究了重组疫苗菌对小鼠的免疫保护作用, 为探索制备 *H. pylori* 口服组份活疫苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

减毒鼠伤寒沙门氏菌 LB5000 (*S. typhimurium* LT2 Trp MetE rpsI flaA etc, R-M+ for all three systems) 和 SL3261 (*S. typhimurium* WARY hisG 46 aroA del 407 Fusaricres etc, R+M+) 为本室保存菌株, 用氨苄青霉素 (Amp)(-) LB 培养基 37 °C 培养。*H. pylori* Sydney strain 1(SS1) 为澳大利亚新南威尔士大学 Lee 教授惠赠, 用改良 Skirrow 培养基, 37 °C 微需氧培养。原核表达载体 pTrc99A 质粒 (有氨苄青霉素抗性基因 *amp^r* 筛选标志) 和 JM105 菌株 (用 LB 培养基 37 °C 培养) 购自 Amersham Pharmacia 公司。

1.2 试剂和仪器

高保真 *Taq* DNA 聚合酶 (*Taq* Plus DNA Polymerase) (用于基因克隆) 购自上海生工生物工程技术有限公司, *Taq* DNA 聚合酶 (用于重组质粒鉴定)、*Sal* I、T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司, *Nco* I 购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 丙烯酰胺与亚甲双丙烯酰胺 (均购自 PROMEGA 公司)。QIAprep spin miniprep kit, QIAquick gel extraction

kit 购自基因有限公司, ABI PRISM™ 377XL DNA 测序仪均为 Perkin Elmer 公司产品, 蛋白电泳仪为 Bio-Rad 公司产品, CS930 双波长薄层扫描仪为日本津岛公司产品。

1.3 pTrc99A-ureB 原核表达载体的构建

引物据基因文库中提供的 *ureB* 序列设计、由上海生工生物工程技术有限公司合成: P1 5'-CGCCATGGGAAAAAGATTAG-3', P2 5'-GCGT-CGACGAAAATGCTAAA-3'。据载体的多克隆位点已在 P1 的 5' 端加 *Nco* I 酶切位点, P2 的 5' 端加 *Sal* I 酶切位点, 并确保读框正确。提取 *H. pylori* 基因组 DNA 为模板, 以 P1, P2 为引物用 PCR 扩增 *ureB*。扩增前 94 °C 变性 10 min, 92 °C 变性 45 s, 55 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 循环, 最后 72 °C 再延长 5 min。琼脂糖凝胶电泳后, 用 QIAquick gel extracton kit 回收目的片段。后者与 pTrc99A 质粒同时用 *Nco* I 和 *Sal* I 双酶切, 去除小片段, 然后用 T4 DNA 连接酶将酶切后 *ureB* 连接入 pTrc99A *Nco* I - *Sal* I 位点。连接产物转化大肠杆菌 JM105 菌株, 挑选 Amp 抗性克隆, 用 QIAprep spin miniprep kit 提取质粒, PCR 和 *Nco* I 与 *Sal* I 双酶切后电泳鉴定, 筛选阳性克隆。

1.4 ureB 测序

挑选阳性克隆, 提取质粒, 以 P1, P2 为引物对 *ureB* 进行序列测定。

1.5 pTrc99A-ureB 转化减毒鼠伤寒沙门氏菌

pTrc99A-ureB 重组质粒用氯化钙法转化减毒鼠伤寒沙门氏菌 LB5000, 筛选阳性克隆, 提取修饰后质粒进一步转化终宿主疫苗菌 SL3261, 挑选 Amp 抗性克隆, PCR 和双酶切后电泳鉴定, 得重组菌 SL3261 (pTrc99A-ureB)。

1.6 重组疫苗菌的稳定性

在 Amp(+) 和 Amp(-) 的 LB 培养液中分别培养传代 50 次, 每 10 代提 1 次质粒, 双酶切后电泳鉴定。

1.7 重组蛋白表达、薄层扫描及 Western blot 分析

挑取重组菌落和对照菌落 (转化 pTrc99A 空载

体的SL3261),在LB培养液中37℃振荡过夜,取20μL加入1880μL LB培养液中振荡至微浑,各取1mL培养物制备成上样样品。取重组菌和对照菌各10μL在100g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳,凝胶于考马斯亮蓝R250液中染色,然后固定脱色,并进行薄层扫描分析。经相同方法电泳的凝胶电转移至硝酸纤维素膜,20mL/L牛血清白蛋白37℃封闭30min,加入一抗4℃过夜,山羊抗小鼠IgG-HRP 37℃温育1h,经TBS振洗后,用4-氯-1-萘酚显色。

1.8 重组菌对小鼠的免疫保护作用

Ⅱ级C57BL/6小鼠(雌性,8周龄,由中山医科大学动物中心提供)随机分成单纯*H. pylori*感染组,SL3261(pTrc99A)(即SL3261导入空载体pTrc99A)处理组和SL3261(pTrc99A-ureB)免疫组,每组15只,后两组灌喂相应菌落量每只均为0.3×10⁹/0.4mL,单纯*H. pylori*感染组只灌喂生理盐水0.4mL,均只处理1次。4周后,各组中每只小鼠均用10⁷CFU SS1攻击。又4周后,用颈椎脱臼法处死各组小鼠,去除前胃,取一部分胃组织做快速尿素酶试验,一部分做*H. pylori*定量培养,3d后鉴定并计算*H. pylori*菌落,结果以n(*H. pylori*, CFU)/g⁻¹表示。

1.9 统计学处理

各组间*H. pylori*定量培养结果用Kruskal-Wallis Test和Student-Newman-Keuls Test在SPSS 8.0 for windows软件上进行统计分析。

2 结果

2.1 pTrc99A-ureB重组质粒的构建

pTrc99A-ureB重组质粒PCR及Nco I和Sal I双酶切后显示,PCR能扩出1707bp目的片段,双酶切后可见线性化载体片段和目的基因,表明重组载体构建成功(图1)。

2.2 测序结果

测序结果显示ureB已克隆入载体,所测出ureB序列与基因文库中ureB序列比,有44个bp置换,一致性为97.42%(1663bp/1707bp),其中A/G置换12个,C/T置换23个,其它9个,但所有碱基置换均没改变所编码氨基酸残基,证实了该基因的保守性(图2)。

2.3 重组减毒鼠伤寒沙门氏疫苗菌的鉴定

从重组减毒鼠伤寒沙门氏疫苗菌提取质粒,以

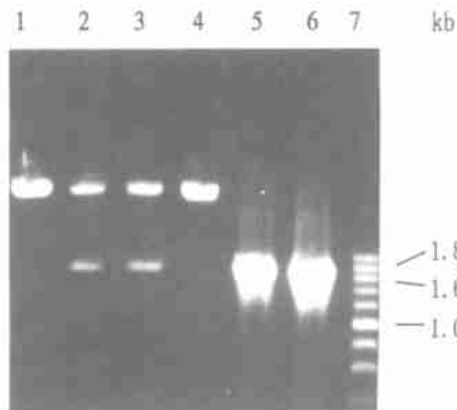


图1 重组表达质粒pTrc99A-ureB的鉴定

Fig 1 Identification of a recombinant expression plasmid pTrc99A-ureB (agarose gel electrophoresis)

Lane 1: pBR322/*Pst* I markers; Lane 2 and 3: pTrc99A-ureB expression plasmid digested by both restriction enzyme *Nco* I and *Sal* I; Lane 4: pTrc99A plasmid vector digested by both restriction enzyme *Nco* I and *Sal* I, as negative control; Lane 5: 1707 bp *ureB* amplified from *H. pylori* DNA by PCR; Lane 6: 1707 bp *ureB* amplified from the recombinant plasmid pTrc99A-ureB; Lane 7: molecular standard, 200 bp ladders (2.0, 1.8, 1.6, 1.4, 1.2, 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 kb)

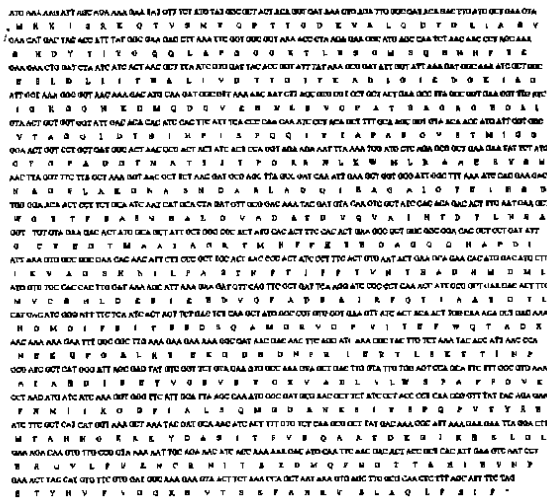


图2 ureB核苷酸顺序及其推导的氨基酸顺序

Fig. 2 Sequence of *ureB* and its deduced amino acid sequence

P1, P2为引物PCR能扩出1707bp目的片段, Nco I和Sal I双酶切后亦可见线性化载体片段和目的基因(图3)。

2.4 重组疫苗菌的稳定性

每10代抽提1次重组菌质粒,可见质粒不会因无选择压力而丢失,且均能酶解出目的基因(图3)。

2.5 H. pylori ureB的表达和分析

粗提蛋白进行SDS-PAGE电泳显示,重组菌体蛋白均在66ku左右出现1条新生蛋白带,大小与

UreB 相符,而对照菌体蛋白中无该条蛋白带。薄层扫描分析显示, UreB 量约占总菌体蛋白的 26%(图 4)。Western blot 显示 UreB 能免疫着色(图 4)。这一结果初步证实,我们构建的重组疫苗菌 SL3261 (pTrc99A-ureB)能特异性表达 *H. pylori* UreB。

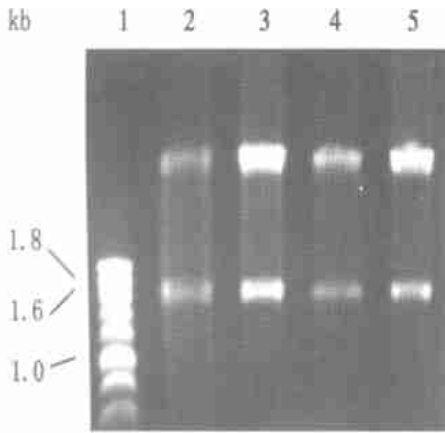


图3 携带 *ureB* 减毒鼠伤寒沙门氏疫苗菌的鉴定

Fig. 3 Identification of a recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain carrying *ureB* (agarose gel electrophoresis)

Lane 1: molecular standard, 200 bp ladders (2.0, 1.8, 1.6, 1.4, 1.2, 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 kb); Lane 2 and 3: plasmids from recombinant vaccine strain before passaging digested by both restriction enzyme *Nco* I and *Sal* I; Lane 4 and 5: plasmids from recombinant vaccine strain after passaging digested by both restriction enzyme *Nco* I and *Sal* I

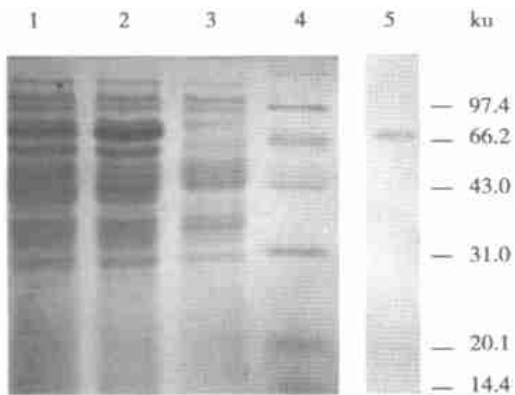


图4 UreB在疫苗菌中的表达

Fig. 4 UreB expressed in vaccine strain (SDS PAGE)

Lane 1 and 2 expressed UreB (about 66 ku); Lane 3: negative control (SL3261 transformed by pTrc99A); Lane 4: protein markers; Lane 5: Western blot result

2.6 疫苗菌对小鼠的免疫保护

各组 *H. pylori* 定量培养结果见表 1。统计表明,单纯 *H. pylori* 感染组和 SL3261 (pTrc99A) 处理组间无显著差异 ($P > 0.05$), 而 SL3261 (pTrc99A-ureB) 免疫组 *H. pylori* 定植水平少于另两组, 统计

差异显著 ($P < 0.05$)。该结果与快速尿素酶试验结果相当。

表 1 3组小鼠腺胃 *H. pylori* 定植数量

Table 1 Comparison of *H. pylori* colonization in mouse stomach among three groups $n(H. pylori, CFU)/g^{-1}$

NS control ($n = 15$)	SL3261(pTrc99A) treated ($n = 14$)	SL3261(pTrc99A-ureB) immunized ($n = 12$)
4 047 244	4 710 543	35 087
3 368 200	7 974 522	89 928
2 560 000	2 987 241	797 342
6 998 444	6 324 375	114 068
3 940 217	10 430 932	1 485 319
1 792 207	4 836 575	55 944
4 413 924	8 306 137	147 058
4 594 594	2 681 587	224 489
11 960 784	1 764 701	0
6 971 816	6 598 242	408 805
5 627 705	2 671 994	801 526
2 787 456	5 633 806	210 656
3 917 910	1 669 136	
10 424 710	7 580 218	
6 237 623		

NS, normal saline. *H. pylori* colonized in immunized group is less than that colonized in control or SL3261 (pTrc99A) treated group ($P < 0.05$), statistic difference of colonized *H. pylori* between NS and SL3261 (pTrc99A) treated group is not significant ($P > 0.05$)

3 讨论

H. pylori 疫苗的研究已显示免疫防治 *H. pylori* 感染的可行性。*H. pylori* 抗原加粘膜佐剂 [霍乱毒素 (CT) 或大肠杆菌热敏肠毒素 (LT)] 能在动物模型中诱导保护性免疫^[4~7], 但细菌毒素的毒性作用妨碍其临床应用。有报道用 LT 的无毒突变物 LTK63 或皂甙衍生物作佐剂, 取得了较好的免疫效果^[2, 4]。还有学者将 *ureB* 代替脊髓灰质炎病毒壳体基因, 构建成携有 *ureB* 的脊髓灰质炎病毒复制子, 经肌注免疫小鼠, 再单次肌注重组 UreB, 也诱导出免疫反应^[8]。更理想的免疫策略仍在积极探索中。

我们通过用活减毒鼠伤寒沙门氏菌载体改进口服疫苗释放系统, 同时筛选新的疫苗候选组分。活减毒鼠伤寒沙门氏菌属作为异种抗原载体, 可克服佐

剂的缺点, 与传统疫苗比有如下优点: 不必纯化抗原, 不需佐剂, 避免了抗原在胃内降解和变性, 对所表达的外源抗原的免疫应答不随粘膜免疫途径的变化而变化, 并且能诱导细胞介导的、体液的和分泌型 IgA 抗体反应^[3, 9, 10]。尿素酶已被证实为一种有效的保护性抗原, 最终可望成为 *H. pylori* 疫苗的重要组成部分, 尿素酶 A, B 两个亚单位中 UreB 起主要作用。本实验将 *ureB* 表达完整蛋白的开放读框克隆入原核表达载体 pTrc99A 质粒, 构建成 pTrc99A-*ureB* 重组质粒。核苷酸测序显示, 所克隆 *ureB* 与基因文库中 *ureB* 的一致性为 97.42% (1 663 bp/1 707 bp), 进一步证实了该基因的保守性, 这也是筛选疫苗抗原的基本条件之一。重组质粒转化减毒鼠伤寒沙门氏疫苗菌也得以实现, 并且重组质粒不会因重组菌无选择压力转种而丢失, 可见 pTrc99A-*ureB* 可在 SL3261 宿主菌中稳定存在, 且对宿主无明显毒性。进一步研究表明, *H. pylori* UreB 能在疫苗菌中特异表达。

动物实验结果表明, SL3261 (pTrc99A-*ureB*) 对 C57BL/6 小鼠 *H. pylori* 感染有免疫保护作用, 但不能完全清除感染的 *H. pylori*, 只能显著降低 *H. pylori* 定植水平。这提示, 减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 有可能作为 *H. pylori* 疫苗的有效载体, 但应开发多组分(效价)活疫苗, 以提高免疫效果。

参考文献:

- [1] Cortesy-Theulaz I, Porta N, Glauser M, *et al.* Oral immunization with *Helicobacter pylori* urease B subunit as a treatment against helicobacter infection in mice[J]. Gastroenterology 1995, 109(1): 115.
- [2] Marcetti M, Rossi M, Giannelli V, *et al.* Protection against *Helicobacter pylori* infection in mice by intragastric vaccination with *H. pylori* antigens is achieved using a

non-toxic mutant of *E. coli* heat-labile enterotoxin (LT) as adjuvant[J]. Vaccine 1998, 16(1): 33.

- [3] Hopkins S, Kraehenbuhl J, Schodel F, *et al.* A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization[J]. Infect Immun, 1995, 63(9): 3279.
- [4] Chen M, Lee A, Hazell S L. Immunisation against *Helicobacter* infection in a mouse/ *Helicobacter felis* model[J]. Lancet 1992, 339 (8801): 1120.
- [5] Lee A, Chen M. Successful immunization against gastric infection with *Helicobacter* species: use of a cholera toxin B-subunit-whole-cell vaccine[J]. Infect Immun, 1994, 62 (8): 3594.
- [6] Guy B, Hesler C, Fourage S, *et al.* Systemic immunization with urease protects mice against *Helicobacter pylori* infection[J]. Vaccine, 1998, 16(8): 850.
- [7] Lee C K, Soike K, Hill J, *et al.* Immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease decreases colonization levels following experimental infection of rhesus monkeys[J]. Vaccine, 1999, 17(11-12): 1493.
- [8] Novak M J, Smythies L E, McPherson S A, *et al.* Poliovirus replicons encoding the B subunit of *Helicobacter pylori* urease elicit a Th1 associated immune response[J]. Vaccine, 1999, 17(19): 2384.
- [9] Vancott J L, Staats H F, Pascual D W, *et al.* Regulation of mucosal and systemic antibody responses by T helper cell subunits, macrophages, and derived cytokines following oral immunization with live recombinant *Salmonella* [J]. J Immunol, 1996, 156(4): 1504.
- [10] Cortesy-Theulaz I E, Hopkins S, Bachmann D, *et al.* Mice are protected from *Helicobacter pylori* infection by nasal immunization with attenuated *Salmonella typhimurium phoP^c* expressing urease A and B subunits [J]. Infect Immun, 1998, 66(2): 581.

(编辑 黄小延, 张敏瑞)

(上接第 405 页)

- [13] 周国理, 黄炯烈, 吴瑜, 等. 白纹伊蚊细胞色素 P450 CYP 6N3 基因分子进化机制初探[J]. 广东寄生虫学会年报, 2000, 22: 4.
- [14] 周国理, 黄炯烈, 詹希美. 昆虫 CYP6 家族与抗药性及其转录调控[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2000, 7(4):

247.

- [15] 吴瑜, 周国理, 黄炯烈. 昆虫细胞色素 P450 的异源表达[J]. 广东寄生虫学会年报, 1999, 21: 57.

(编辑 张敏瑞)