

幽门螺杆菌 VacA N 端在巨噬细胞中表达对其细胞因子分泌功能的影响

黎村艳, 张艳*, 刘志杰, 余敏君, 于文

(湖南省南华大学病原生物学研究所, 衡阳 421001)

摘要: 构建 pDsRed-Monomer-C1/vacA N 端真核表达载体, 研究幽门螺杆菌空泡毒素单一毒力决定簇对 THP-1 巨噬细胞细胞因子分泌的影响。PCR 扩增 vacA 目的基因片段, 克隆入真核表达载体 pDsRed-Monomer-C1 中, 经酶切、PCR 及测序鉴定后, 转染 THP-1 巨噬细胞中, Western blot 和荧光显微镜鉴定 VacA 蛋白在细胞中的表达; 电子显微镜和中性红摄入法观察巨噬细胞的空泡样变; ELISA 法检测巨噬细胞培养上清 TNF- α 、IL-1 β 含量。重组质粒转染 THP-1 巨噬细胞 24h, 部分细胞胞浆中出现大小不等的空泡, 且重组质粒组培养上清中 TNF- α 、IL-1 β 含量明显高于空质粒组和阴性对照组 ($P < 0.001$), 二硫代氨基甲酸吡咯烷 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) 下调细胞因子的分泌。结果显示, 成功构建 pDsRed-Monomer-C1/vacA 真核表达载体; VacA 蛋白瞬时高表达上调 THP-1 巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-1 β ; 核因子 κ B (nuclear factor kappaB, NF- κ B) 可能参与调节 VacA 诱导的 THP-1 巨噬细胞的分泌。

关键词: 幽门螺杆菌; 空泡毒素; 真核表达载体; 巨噬细胞; 细胞因子

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0349-06

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 可引起胃炎、消化性溃疡、胃腺癌以及胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤等, 全球人群感染率达 50% 以上。空泡毒素 (Vacuolating cytotoxin, VacA) 是 *H. pylori* 的主要致病因子之一, 因能使多种体外培养的真核细胞胞浆形成空泡而得名。研究显示, 表达 VacA 的 *H. pylori* 菌株与消化性溃疡发生的关系更为密切。*H. pylori* 在专职吞噬细胞如巨噬细胞系 THP-1 和 RAW264.7 内存活依赖 VacA 的产生。Menaker 等^[1] 也发现, 能产生 VacA 的 *H. pylori* 60190 株可诱导小鼠巨噬细胞 Raw264.7 凋亡, 且与介导细胞凋亡的线粒体通路的改变有关。而 VacA 缺陷型菌株无此作用。

巨噬细胞 (Macrophage, M Φ) 是机体重要的免疫调节和效应细胞, 活化的 M Φ 具有较强的吞噬杀伤能

力, 其分泌的 IL-1 β 、TNF- α 等细胞因子 (Cytokines, CKs) 既参与机体的免疫防御功能, 又在机体炎症反应、组织器官损伤过程中起重要的细胞毒作用。为进一步明确 VacA 单一毒力决定簇对 M Φ 功能的影响, 本研究拟构建 vacA 真核表达载体, 将其转入 THP-1 巨噬细胞, 通过检测 IL-1 β 和 TNF- α 等细胞因子的含量, 为明确 VacA 的致病机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞: 本研究使用的 *H. pylori* 菌株 HP0601 由本研究室从衡阳市慢性萎缩性胃炎患者体内分离并保种; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109、

基金项目: 湖南省自然科学基金 (06JJ2093); 湖南省教育厅资助项目 (05C471)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-34-8282907; E-mail: NHZhangYan@yahoo.com.cn

作者简介: 黎村艳 (1975-), 女 (白族), 湖南张家界人, 硕士研究生, 主管检验师, 主要从事抗感染免疫研究。

E-mail: lcunyan8@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-08-10; 修回日期: 2007-12-05

pDsRed-Monomer-C1 真核表达载体为本室保存。THP-1 细胞购自中国典型培养物保存中心(武汉)。

1.1.2 主要试剂和仪器：Super pfu DNA Polymerase 购于上海生工生物工程公司, 限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司, 佛波脂(PMA) 购于 Sigma 公司, TfxTM-20 Reagent 转染试剂盒购自 Promega 公司, 鼠抗 *H. pylori* 多克隆抗体购于 chemicon 公司, HRP 标记羊抗鼠 IgG 购自 Solarbio 公司, TNF- α 、IL-1 β 检测试剂盒购于晶美生物工程公司。倒置荧光显微镜是日本 Nikon 公司产品, 全自动酶标仪是芬兰雷勃公司产品。透射电子显微镜为日产/H-7500 型。

1.2 pDsRed-Monomer-C1/vacA 重组载体的构建

H. pylori 菌株 HP0601 DNA 的提取参照文献[2]。根据 vacA 基因序列 (GenBank 序列号为 GeneID: 899415) 设计上、下游含限制性核酸内切酶 *Xho* I、*Bam*H I 酶切位点的一对引物, P1 :5'-TTCCTCGAGC-CTTTTTCACAACCGTGATC-3' 和 P2 :5'-TGCCGGA-TCCACCTTTAAAATTAGCTGTATG AG-3'。以 *H. pylori* HP0601 基因组为模板, 通过 PCR 扩增出目的基因片段。以 *Xho*、*Bam*H 双酶切 PCR 产物及空载体 pDsRed-Monomer-C1, 用 T4 DNA 连接酶过夜连接, 转化 *E. coli* JM109 并提取质粒, 酶切鉴定后送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.3 重组质粒在 M Φ 中的表达鉴定

THP-1 细胞在体外培养经 PMA 活化后可分化为巨噬细胞^[3]。转染前一天, THP-1 细胞按 0.4×10^6 细胞/mL 转入 24 孔板, 每孔 1mL, 加入终浓度为 45ng/mL 的 PMA 诱导 48h, 分为空质粒组、重组质粒组, 同时设空白对照。参照 TfxTM-20 Reagent 转染试剂盒说明, 以 2 μ g 的质粒和 3 μ L 的 TfxTM-20 Reagent 转染每孔细胞。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中孵育 2h 后, 吸去培养基, 换新鲜的含 10% 小牛血清(FCS)的 RPMI-1640 培养基 1mL, 继续培养, 每 6h 观察细胞内红色荧光, 于荧光较多时收集细胞, 加入 160 μ L 细胞裂解液 4 $^{\circ}$ C 放置 60min, 10000r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5min, 收获细胞裂解上清液经 SDS-PAGE 后, 以鼠抗 *H. pylori* 多克隆抗体为一抗作 Western blot 鉴定。

1.4 VacA 空泡活性鉴定

1.4.1 电子显微镜观测 M Φ 的空泡样变：按上述方法分组并转染细胞后, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中孵育 2h 后, 吸去培养基, 换新鲜的含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养基 1mL, 并加入 5mmol/L NH₄Cl。转染后 24h, 弃去培养基, 用 3% 戊二醛固定细胞, 按电镜观察要求处

理细胞, 观察细胞形态。

1.4.2 中性红吸收实验鉴定 VacA 空泡活性：按上述方法转染细胞后, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中孵育 2h 后, 吸去培养基, 换新鲜的含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养基 1mL, 并加入 5mmol/L NH₄Cl。分别于转染后 0h、6h、12h、24h, 弃去培养基, 按文献方法^[4]用 0.05% 中性红染液染色, 1% 乙酸乙醇洗脱, 在 540nm 波长处测洗脱液吸光度。

1.5 重组质粒高表达对 M Φ 分泌活性的影响

按上述方法转染细胞, 分为 THP-1 巨噬细胞空白对照组、空质粒组、重组质粒组、重组质粒组加入 25mmol/L PDTC 组, 同时设 100ng/mL LPS 阳性对照, 每组设 5 个复孔。分别于转染后 6h、12h、24h、36h、48h 时取培养液 100 μ L, 用 TNF- α 和 IL-1 β 定量 ELISA 试剂盒按说明分别测定 492nm 处 OD 值, 求出 TNF- α 和 IL-1 β 含量 (ng/L)。

1.6 统计学分析

所有数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示, 均数之间的比较用统计学软件 SPSS13.0 软件作方差分析。

2 结果

2.1 *H. pylori* vacA 基因的 PCR 扩增及重组质粒的鉴定

以抽提的 *H. pylori* HP0601 株基因组 DNA 为模板, 用特异性 *H. pylori* P1、P2 引物 PCR 扩增 vacA 基因, 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在约 1400bp 左右位置可见一清晰的特异性条带。经 PCR 和酶切鉴定证明重组质粒含有与预期值相符的目的基因片段。测序结果显示重组质粒含有 1428bp 的目的片段, 经 BLAST 比对发现, 其氨基酸序列与 *H. pylori* 26695 同源性达 92%, p33N 末端第 19 位氨基酸由 T \rightarrow A, 但无缺失突变; 其核苷酸和氨基酸序列与 *H. pylori* 标准株 AF191645 同源性达 98% (第 19 位由 A \rightarrow T; 125 位 V \rightarrow I; 200 位 N \rightarrow T; 249 位 Q \rightarrow T; 367 位 S \rightarrow A; 394 位 V \rightarrow I; 404 位 S \rightarrow T)。

2.2 重组质粒在 THP-1 巨噬细胞中的表达

转染后 24h 用倒置荧光显微镜观察发现, 空质粒组表达的单纯红色荧光蛋白, 其荧光在细胞内呈弥散性分布, 而重组质粒组表达的 VacA 与红色荧光蛋白的融合蛋白, 在细胞质形成聚集的荧光颗粒 (图 1)。提取转染 48h 细胞总蛋白进行 SDS-PAGE, 以鼠抗 *H. pylori* 血清为一抗, Western blot 分析鉴定表达产物免疫反应性, 结果发现重组质粒转染组出现一条免疫反应带, 而空质粒转染组和 THP-1 巨噬细胞组未见免疫反应带 (图 2)。

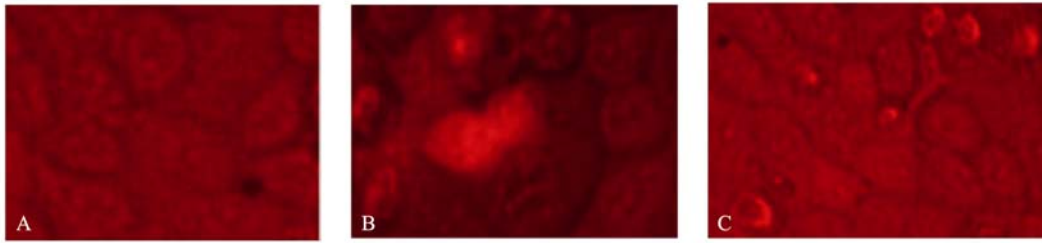


图 1 荧光蛋白在 THP-1 巨噬细胞中的定位

Fig.1 Fluorescence protein in THP-1 macrophages. A: THP-1 macrophages; B: THP-1 macrophages transfected with pDsRed-Monomer-C1; C: THP-1 macrophages transfected with pDsRed-Monomer-C1/vacA.

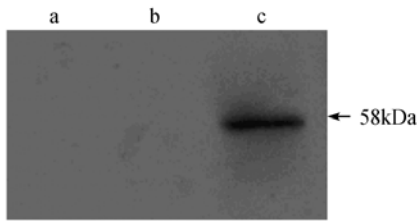


图 2 Western blot 鉴定 VacA 蛋白在 THP-1 巨噬细胞中的表达

Fig.2 Western blot analysis of VacA protein from transfected macrophages. a. THP-1 macrophages; b. THP-1 macrophages transfected with pDsRed-Monomer-C1; c. THP-1 macrophages transfected with pDsRed-Monomer-C1/vacA.

2.3 VacA 的空泡活性

2.3.1 电镜观察结果：用电子显微镜观测发现，重组质粒组约 15% 的细胞内有大小不等的空泡，其中部分细胞中可见空泡膜和细胞膜的融合。大多数发生空泡化的细胞其细胞核无异常改变，约 5% 的细胞发生凋亡改变，细胞表面微绒毛部分脱落、核固缩、碎裂、染色质浓缩和边缘化。而更多空泡化细胞出现细胞质溶解、细胞器破碎、细胞膜破裂等病理改变(图 3)。

2.3.2 VacA 高表达对 MΦ 摄取中性红的影响：中性红摄取实验(图 4)显示，转染后 6h，重组质粒组的吸光度升高，与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)；而

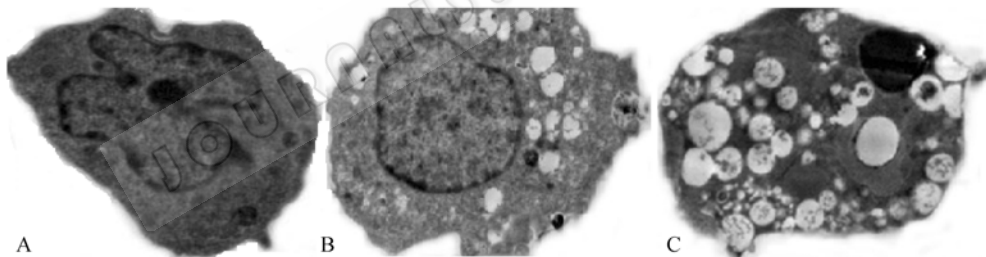


图 3 重组质粒 pDsRed-Monomer-C1/vacA 转染 THP-1 细胞 24h 后用电子显微镜观察细胞形态结果(10000×)

Fig.3 Vacuolated cells observed by electron microscopy. A: The THP-1 macrophage; B: The cytoplasm filled with vacuoles and the form of the cell nucleus was normal; C: The cytoplasm filled with vacuoles and the cell nucleus was pushed aside.

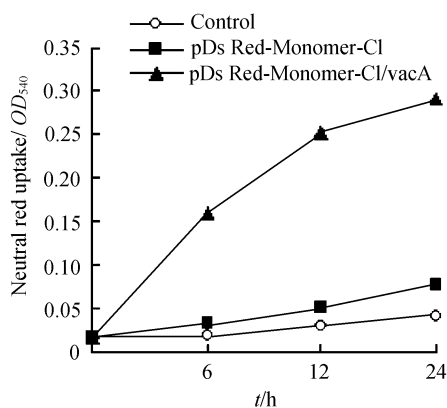


图 4 中性红摄取实验
Fig.4 Neutral Red Uptake.

转染后 24h，重组质粒组的吸光度达到最高 (0.291 ± 0.067)；6h、12h、24h 3 个时间段空质粒组的吸光度也有所升高，但与对照组相比，差异均无显著性($P > 0.05$)。

2.4 VacA 高表达对 MΦ 分泌活性的影响

分别于转染后 6h、12h、24h、36h、48h 测各组培养液中 TNF- α 和 IL-1 β 含量，结果(图 5)显示：重组质粒转染组两种细胞因子含量均明显升高，与对照组相比差异有显著性($P < 0.001$)，且分别于转染后 6h 和 24h 时达到高峰；空质粒组两种细胞因子与对照组相比也有升高，但差异无显著性($P > 0.05$)。重组质粒转染组加入 PDTC 后，两种细胞因子含量均明显降低，

与重组质粒转染组相比, $P < 0.001$ 。

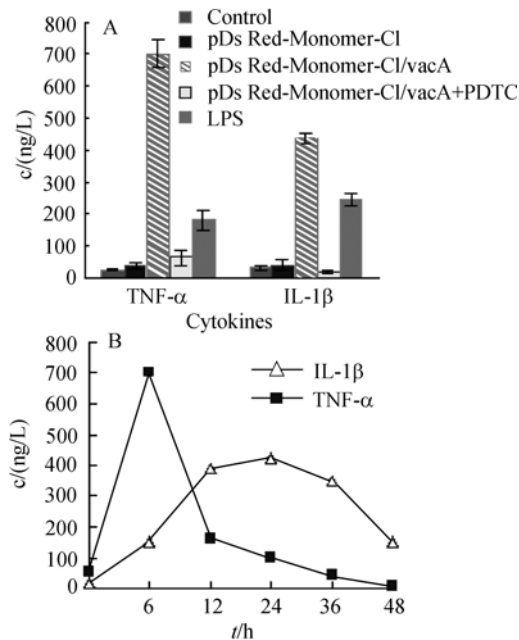


图5 细胞培养基上清中 TNF- α 和 IL-1 β 的浓度
Fig.5 The level of TNF- α or IL-1 β in the cell culture medium.
A. The effect of different group on the level of TNF- α or IL-1 β in the cell culture medium at 6h or 24h after transfection;
B. The effect of different time on the level of TNF- α or IL-1 β in the cell culture medium.

3 讨论

VacA 是一种 AB 型毒素, 位于 N 端的 A 亚单位 (p33,1-311 氨基酸残基) 是毒素活性亚单位, 位于 C 端的 B 亚单位 (p55,312-821 氨基酸残基) 是与宿主细胞结合的部位。VacA 可导致多种真核细胞发生空泡样变, 研究发现, 单独用 vacA p33 或 p55 真核表达载体转染 Hela 细胞, 细胞不产生空泡变性, 而用表达 N 端 478 个或更多的氨基酸残基的重组质粒转染 Hela 细胞时才有空泡活性, 证明 p55 N 端的部分氨基酸残基是 p33 功能所必需^[5]。当 p33N 末端 6~27 位氨基酸缺失时, VacA 虽能与宿主细胞膜结合, 但该细胞无空泡活性; 该区第 9 位脯氨酸或第 14 位甘氨酸发生点突变时, 宿主细胞空泡活性明显减弱^[6]。为探讨 VacA 单一毒力决定簇对 M Φ 功能的影响, 本研究构建了 vacA N 端 478 个氨基酸残基的重组质粒, 测序发现其氨基酸序列与 *H. pylori* 26695 同源性达 92%, p33N 末端第 19 位氨基酸由 T \rightarrow A, 但无缺失突变; 与 *H. pylori* 标准株 AF191645 同源性达 98%, VacA 编码基因有 1.5% (21/1428) 的碱基发生变异, 约 1.6% (7/476) 的氨基酸残基发生改变。变异的原因可能有: (1) *H. pylori* 具有

转化能力, 能将已死亡的 *H. pylori* DNA 转化而致基因组发生重排导致基因变异; (2) *H. pylori* 菌株间的变异引起^[7]。这个结果显示了 *H. pylori* 菌株的遗传特征与地理分布的相关性。将该重组质粒转入 THP-1 巨噬细胞后能表达带红色荧光的 VacA 融合蛋白, 电镜观察和中性红摄取实验显示该蛋白能使细胞产生空泡, 推测变异的氨基酸可能对 VacA 的空泡活性影响较小。空泡的形成可能与阴离子通道的形成有关。VacA 为一分泌型蛋白毒素, 快速冷冻深度蚀刻电镜技术显示天然毒素是由 6 或 7 个亚单位径向对称形成如“花”状结构的寡聚体。每一个单体为 95kDa, 由 33kDa 和 55kDa 两个亚单位通过含有蛋白水解位点的暴露环相连接^[8]。现有的证据表明在酸性环境下, VacA 的多聚体解离成单体结合到宿主细胞膜上, 接着在膜上多聚化形成离子通道插入细胞膜脂质双层, 经内吞后进入细胞^[9], 内吞的 VacA 在胞浆内形成早期内吞体, 并定居到线粒体或内吞体等细胞器的膜上, 在内吞体膜上形成阴离子选择性通道^[10], 导致大量阴离子流入内吞体, 进而活化内吞体膜上的 V-ATP 酶质子泵^[11], 质子泵使小泡酸化, 结果弱碱大量进入质膜, 使腔内渗透压增高而形成空泡。通过构建真核表达载体而表达的 VacA 是以单体形式在靶细胞内发挥作用的, 因此用在细胞内表达技术所获得的结果可能还需进一步验证。

M Φ 活化后能产生 TNF- α 和 IL-1 β 等前炎症细胞因子, 增强其吞噬、杀伤等活性, 促进它释放炎症蛋白和炎症介质 (如 NO、ROS 等), 直接参与炎症反应。研究发现, *H. pylori* 感染可以使局部细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 产生增加^[12]; 而 TNF- α 可引起胃上皮细胞过度凋亡^[13], 这可能造成胃黏膜上皮细胞凋亡与增殖平衡失调, 进而引起消化性溃疡、萎缩性胃炎、胃癌。本研究发现, VacA 能上调 M Φ 分泌 TNF- α 、IL-1 β , 当 M Φ 分泌 TNF- α 的量显著升高时, 也有可能影响 M Φ 的凋亡。

另外, 细胞核因子- κ B (nuclear factor kappaB, NF- κ B) 是一重要的多功能核转录因子, 激活后参与许多基因的转录调控, 在机体的炎症、免疫反应、氧化应激、细胞凋亡等过程中发挥作用。NF- κ B 的激活能诱导其炎症相关因子如 IL-1、TNF- α 等的过度表达, 而 TNF- α 和 IL-1 β 又能激活 NF- κ B, 导致持续放大的炎症反应。*H. pylori* 感染后能激活 B 淋巴细胞中的 NF- κ B^[14], *H. pylori* 通过激活 NF- κ B 诱导胃上皮细胞产生 COX-2、IL-8 和 MCP-1^[15,16]; Kim 等^[17] 发现

VacA能通过激活NF- κ B而促进嗜酸性细胞释放趋化因子。本研究中重组质粒组加入NF- κ B的阻断剂PDTC后TNF- α 和IL-1 β 的分泌量明显降低,提示NF- κ B可能参与调节M Φ 的活性,但VacA上调M Φ 分泌TNF- α 和IL-1 β 是否与NF- κ B的激活有关,有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Menaker RJ, Ceponis PJ, Jones NL. *Helicobacter pylori* Induces Apoptosis of Macrophages in Association with Alterations in the Mitochondrial Pathway. *Infect Immun*, 2004, 72(5): 2889–2898.
- [2] Fred Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, et al. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 等译. 第一版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] Li YH, Brauner A, Jonsson B, et al. *Ureaplasma urealyticum*-induced production of Proinflammatory Cytokines by Macrophages. *Pediatric Research*, 2000, 48(1): 114–119.
- [4] Cover TL, Puryear W, Perez-Perez GI, et al. Effect of urease on HeLa cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Infect Immun*, 1991, 59(4): 1264–1270.
- [5] Ye D, Willhite DC, Blanke SR. Identification of the minimal intracellular vacuolating domain of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Biol Chem*, 1999, 274(14): 9277–9282.
- [6] Ye D, Blanke SR. Mutational Analysis of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin Amino Terminus: Identification of Amino Acids Essential for Cellular Vacuolation. *Infect Immun*, 2000, 68(7): 4354–4357.
- [7] Jiang Z, Huang AL, Tao XH, et al. A study of recombinant protective *H. pylori* antigens. *World J Gastroenterol*, 2002, 8 (2): 308–311.
- [8] Cover TL, Hanson PI, Heuser JE. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J Cell Biol*, 1997, 138(4): 759–769.
- [9] Genisset C, Galeotti CL, Lupetti P, et al. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin mutant that fails to oligomerize has a dominant negative phenotype. *Infect Immun*, 2006, 74(3): 1786–1794.
- [10] Li Y, Wandinger-Ness A, Goldenring JR, et al. Clustering and redistribution of late endocytic compartments in response to *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(4): 1946–1959.
- [11] Montecucco C, de Bernard M. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes Infect*, 2003, 5(8): 715–721.
- [12] 孙燕, 刘南植. 幽门螺杆菌相关胃炎中TNF- α 和IL-1 β 分泌的原位研究. 临床消化病杂志(*Chinese Journal of Clinical Gastroenterology*), 2003, 15(6): 243–245.
- [13] Ierardi E, Di Leo A, Barone M, et al. Tumor necrosis factor alpha and apoptosis in *Helicobacter pylori* related progressive gastric damage: a possible mechanism of immune system involvement in epithelial turnover regulation. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2003, 25(2): 203–211.
- [14] Ohmae T, Hirata Y, Maeda S, et al. *Helicobacter pylori* activates NF-kappaB via the alternative pathway in B lymphocytes. *J Immunol*, 2005, 175(11): 7162–7169.
- [15] Chang YJ, Wu MS, Lin JT, et al. Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappaB activation. *Mol Pharmacol*, 2004, 66(6): 1465–1477.
- [16] Seo JH, Lim JW, Kim H, et al. *Helicobacter pylori* in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases, AP-1, and NF-kappaB and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS cells. *Lab Invest*, 2004, 84(1): 49–62.
- [17] Kim JM, Kim JS, Lee JY, et al. Vacuolating cytotoxin in *Helicobacter pylori* water-soluble proteins upregulates chemokine expression in human eosinophils via Ca²⁺ influx, mitochondrial reactive oxygen intermediates, and NF-kappaB activation. *Infect Immun*, 2007, 75(7): 3373–3381.

Helicobacter pylori VacA up-regulates secretion of macrophages by Transfection of vacA eukaryotic expression vector

Cunyan Li, Yan Zhang*, Zhijie Liu, Minjun Yu, Wen Yu

(Institute of Pathogenic Biology, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract: We constructed a recombinant plasmid containing the N-terminus gene of vacA gene of *Helicobacter pylori* and studied the effect of VacA on the secretion of macrophages as an individual virulence determinant. VacA gene amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) from *Helicobacter pylori* was cloned into eukaryotic expression vector pDsRed-Monomer-C1. The recombinant plasmids were verified by restriction endonucleases analysis and nucleotide sequencing. Then the recombinant plasmids pDsRed-Monomer-C1/vacA were transfected into macrophages. Their expression in macrophages was examined by Western blot and fluorescence microscope. Vacuolated phenotype in macrophages was observed by electron microscopy and neutral red uptake. The cytokine content of TNF- α or IL-1 β in the culture medium was tested quantitatively with Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit, respectively. The effect of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), an inhibitor of NF- κ B, on the secretion of macrophages transfected with the recombinant plasmids, was also studied. Restriction endonucleases analysis and nucleotide sequencing showed that the eukaryotic expression recombinant pDsRed-Monomer-C1/vacA was successfully constructed. A clear vacuolated phenotype developed in some of macrophages transfected with the recombinant plasmids. VacA over-expressed increased the level of TNF- α and IL-1 β . PDTC decreased the production of TNF- α and IL-1 β induced by VacA. In conclusion, we have successfully constructed the eukaryotic expression plasmid encoding VacA. The over-expression of VacA fusion protein can up-regulate secretion of macrophages. Activation of NF- κ B is probably involved in VacA induced cytokines production.

Keywords: *Helicobacter pylori*; VacA; eukaryotic expression vector; Macrophages; Cytokine

Supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province(06JJ2093) and the Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department(05C471)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-34-8282907; E-mail: NHZhangYan@yahoo.com.cn

Received : 10 August 2007/Revised: 5 December 2007

答 作 者 问

问：在学术会议上发表过的论文能否在《微生物学报》上发表？

答：这要分两种情况。(1)如果论文集属于正式出版物，有正式书号或刊号，则不能再在本刊发表；(2)如果不是正式出版物，则属于交流材料，论文可以投稿本刊。

问：投稿时都需要哪些材料，是否还需要纸稿？

答：从2006年起，本刊开始采用“稿件远程处理系统”。投稿时需要提供：(1)论文研究内容所属单位的介绍信(通常是第一单位)，介绍信模板可从本刊主页“下载专区”或“远程投稿时”下载。(2)在接到本刊E-mail发出的“收稿通知”后，需要及时补充纸样的1份稿件和介绍信，并缴纳100元稿件受理费。

问：贵刊的审稿程序是怎样的？一般多长时间可以知道稿件是否被录用？

答：收到来稿后，首先将请2位专家进行初审，再送主编进行最后的总审，这个过程一般不会超过2个月。如果初审的2位专家的意见分歧较大，编辑部将再请第3位专家进行初审，之后再送主编总审，那么此稿结果的时间可能会超过2个月。