

幽门螺杆菌 IV 型分泌系统 *cagT* 基因的克隆表达及其重组蛋白对 SGC-7901 细胞增殖和分泌细胞因子功能的影响

崔蕾蕾, 邵世和*, 李良菊, 王华, 母润红, 鞠小丽, 董苏荣, 钟桥

(江苏大学医学技术学院, 镇江 212013)

摘要: 【目的】初步研究幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)NCTC 11637 *cagT*(HP0532)基因对 SGC-7901 细胞增殖和白细胞介素-8(IL-8)分泌的影响。【方法】应用 PCR 技术从 *H.pylori* 基因组 DNA 中扩增 *cagT* 编码基因片段, 将其定向插入 pQE30 载体中, 双酶切鉴定筛选阳性克隆。测序分析确认后, IPTG 诱导表达, 表达蛋白以 Ni²⁺-NTA 柱进行纯化, 并经 Western blot 鉴定, 纯化的蛋白作用于 SGC-7901 细胞, 提取细胞总 RNA, RT-PCR 扩增 IL-8, 并用 MTT 法检测蛋白对细胞增殖的影响。【结果】成功克隆了 *cagT* 基因, 全长 843bp(GenBank 登录号为 EF114758), 编码 280 个氨基酸, 与 GenBank 公布的其他 *H.pylori* 菌株基因序列的核苷酸同源性为 97%~99%。工程菌诱导后 SDS-PAGE 显示新生表达蛋白带, 相对分子质量约为 32kDa, 经 Ni²⁺-NTA 柱纯化后可获得纯度为 98%重组蛋白。经透析复性后的蛋白(终浓度 10 μ g/mL)作用于 SGC-7901 细胞后, 可诱导细胞因子 IL-8 在 mRNA 水平上的表达。不同浓度 CagT 蛋白与 SGC-7901 细胞作用, 细胞增殖的程度随着蛋白浓度的增加逐渐降低, 细胞的增殖受到抑制。【结论】CagT 蛋白可刺激 SGC-7901 细胞 IL-8 的表达, 并抑制细胞增殖, 为进一步研究其生物学功能奠定了基础。

关键词: 幽门螺杆菌; *cagT*; 表达; 白细胞介素-8; 增殖

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0452-07

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, 简称 *H.pylori*) 感染在世界范围内广泛流行。已证实 *H.pylori* 感染是慢性胃炎和消化性溃疡的重要病因, 与胃癌和胃黏膜相关性淋巴样组织(MALT)恶性淋巴瘤的发病也有密切关系^[1,2]。*H.pylori* 的 *cagT*/ *hp0532* 由 *cag* 致病岛编码, 与 *A.tumefaciens* 的 *virB7* 基因具有同源性, 是组成 IV 型分泌系统(TFSS)的成分之一, 具有稳定自身和其他 VirB 蛋白的作用^[3]。Tanaka 等^[4]用免疫金电子显微镜检测发现, 细菌表面的丝状结构与 TFSS 的主要成分 *cagT*(Hp0532) 和 Hp0528 相关。Rohde 等^[5]用激光共聚焦扫描电镜和免疫场致发射扫描电镜技术发现, *H.pylori* 的 CagT 定位于细菌的外膜上, 分布在细菌表面纤毛样结构的基底部,

推测其可能是分泌素或是与分泌素相关的脂蛋白(引导蛋白), 允许 HP0527 和针样纤毛结构通过, 并起着稳固其他蛋白的作用。

本文通过 *H.pylori cagT* 基因的克隆和生物信息学分析, 构建原核表达载体, 表达出 CagT 蛋白, 初步研究了其对促炎细胞因子 IL-8 的分泌及对细胞增殖的影响, 旨在进一步认识其理化特性、同源性及结构与功能, 为进一步研究 *H.pylori* 的致病机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *H.pylori* NCTC11637 购自中国预防科

基金项目: 江苏省科技厅项目(BS2004021); 江苏大学高级人才项目(JDG2004008)

*通讯作者。Tel: +86-511-85038375-326; Fax: +86-511-85038449; E-mail: shaoshihe2006@163.com

作者简介: 崔蕾蕾(1980-), 女, 江苏盐城人, 研究生, 研究方向: 幽门螺杆菌致病机制。E-mail: cuiilei180@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-09-14; 修回日期: 2007-12-09

学院流行病学研究所, 大肠埃希菌 DH5 α 及 M15 为江苏大学医学技术学院中心实验室保存。

1.1.2 试剂和仪器: 哥伦比亚培养基、厌氧袋购自 OXOID 公司; Ex TaqDNA 聚合酶、dNTP、限制性核酸内切酶 *Bam*H 及 *Hind*、TakaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver 2.0、T4DNA 连接酶(快速连接试剂盒)、IPTG、DL2000 DNA Marker 及蛋白质分子量标准(低)购自 TakaRa 公司; Ni²⁺-NTA 购自 Qiagen 公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(武汉博士德公司); 二氨基联苯胺(DAB)(上海生工)。去内毒素亲和填料 FF 购自北京韦氏博慧色谱科技有限公司; RNA 提取试剂盒购自 Fastagen; 1kb DNA Ladder 购自 TOYOBO, ReverTra Ace- α -TMRT-PCR Kit 购自 TOYOBO; pGEM-T 载体购自 Promega 公司; pQE30 载体由江苏大学医学技术学院中心实验室保存; DEPC 水、LPS 及 MTT 购自 TakaRa 公司; RPM11640 购自 GIBCOBRL; PCR 基因扩增仪(Mastecycler Gradient, Eppendorf 公司)、自动凝胶成像系统(美国 UVP 公司), 其他常规试剂按照《分子克隆实验指南》要求配制。

1.2 *H. pylori* 的培养与鉴定及基因组 DNA 提取和 *cagT* 编码基因的扩增

H. pylori NCTC11637 标准菌株按常规微需氧方法培养。DNA 用常规酚、氯仿抽提法获得, -20 保存备用。

根据 GenBank 中已报道的 *H. pylori* 26695 NC_000915 的 *cagT* 基因(HP0532 基因)序列, 利用软件 Primer 5.0 设计 PCR 引物: P1: 5'-TCCGGATCCA-TGAAAGTGAGAGCAAGTGT-3' (29bp); P2: 5'-GCC-AAGCTTTCACCTTACCACTGAGCAAAC-3' (29bp)。在上游引物 5' 端加 *Bam*H 酶切位点; 在下游引物 5' 端加 *Hind* 酶切位点(下划线处)。预期的 PCR 产物长度为 843bp。引物由上海生工生物技术有限公司合成。以 *H. pylori* NCTC11637 菌株基因组 DNA 为模板, 用 Ex Taq 聚合酶进行 PCR 扩增(25 μ L 反应体系)。扩增参数为: 94 5min, 94 30s, 55.4 30s, 72 1min, 30 个循环, 72 10min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, GeNius 凝胶电泳图像分析系统分析鉴定并用胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

1.3 TA 克隆及鉴定和重组质粒的构建

胶回收的 PCR 产物与 pGEM-T 载体(摩尔比 8:1), 加 1 μ L T₄ DNA 连接酶, 4 连接过夜。连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。转化后的细菌涂布于含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 培养 16h。挑取菌落接种于含氨苄青霉素 50 μ g/mL 的 LB 液体培养

基, 37 振荡 12h, 用碱裂解法进行质粒小量提取, 并进行 *Bam*H、*Hind* 双酶切鉴定和质粒 PCR 鉴定。

将质粒 pQE30 和 TA 克隆鉴定阳性的质粒分别经 *Bam*H 和 *Hind* 双酶切后, 回收酶切片段, T4 连接酶试剂盒作用下 16 连接过夜, 转化感受态细菌 *E. coli* M15, 转化好的细菌涂布含氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基培养 12~16h, 挑选单菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 置 37 摇床振荡培养 12h, 抽提质粒, 酶切鉴定。

1.4 DNA 序列测定分析及编码蛋白理化特性预测

将经过鉴定的阳性重组质粒寄至上海生工测序。基因片段的同源性分析登陆 NCBI 使用 Blastn 在 nr 数据库中对 *cagT* 基因的同源性进行比对分析; 使用 Blastp 在 nr 数据库中对 *cagT* 编码氨基酸序列的同源性进行比对, 使用保守序列数据库(conserved domain database CDD)寻找 *cagT* 编码氨基酸序列是否和已知保守序列相关。应用序列分析软件包 Omega 2.0 分析 *cagT* 编码氨基酸序列的理化特性。

1.5 Western blot 分析

取经酶切鉴定构建成功的重组工程菌, 接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 在 37 振荡至 OD₆₀₀ 达到 0.6, 以不同浓度的 IPTG 诱导不同的时间, 收集菌液进行全菌蛋白的 SDS-PAGE 电泳, 通过诱导前后全菌蛋白染色条带与阴性对照的对比, 检出相应分子质量的外源蛋白 CagT 的表达条带并确定最佳诱导条件。蛋白大量诱导表达后用 Qiagen 的镍柱 Ni²⁺-NTA 纯化目的蛋白。

取纯化后的蛋白 10 μ L 上样进行 SDS-PAGE 电泳后, 然后电转移至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的封闭液室温封闭 3h, 换新鲜的封闭液, 加入一抗, 37 摇床反应 1h。1 \times PBST 洗涤 3~5 次, 每次 5min, 于 1 \times PBST 中加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 作为二抗, 37 摇床反应 1h, 最后 DAB 显色至目的条带清晰时将膜转移至双蒸水终止反应。

1.6 蛋白透析及去除内毒素

透析之前将透析袋放入含 2%NaHCO₃ 和 1mmol/L EDTA 的蒸馏水中煮沸 10 分钟, 用蒸馏水反复冲洗, 再放入含 1mmol/L EDTA 的蒸馏水煮沸 10 分钟, 自然冷却, 加入待透析的蛋白, 分别用含 6mol/L、4mol/L、3mol/L、2mol/L、1mol/L 尿素 PBS 在 4 条件下梯度透析, 各 4h, 最后用不含尿素的 PBS 平衡过夜。收集透析液, 15000r/min 离心 15min, PEG 包埋法浓缩, 将去内毒素亲和填料 FF 在滤器中先用 1~2 倍凝胶体积的 Buffer 1 抽洗, 再用 3~5 倍凝胶体积的 Buffer 1 将凝胶充分混匀, 保持 10min, 用 50~100 倍凝胶体积的注射水分 10~20 次抽洗,

加入去内毒素亲和填料 FF 至样品中, 4、150r/min 振荡 48h, 将以上样品无菌过滤, 去除内毒素, BCA 法测蛋白浓度。

1.7 细胞因子 IL-8 和细胞增殖的检测

SGC-7901 细胞常规培养 2d 至细胞达 80%~90%融合, 加入一定量的已透析的原核表达的目的蛋白至终浓度为 10 μ g/mL, 作用 4h, 用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 用 LPS 做阳性对照, 以 pQE30 空质粒转化的宿主菌的平行提取物为阴性对照, 处理步骤相同。以 RNA 为模板, 用 ReverTra Ace- α -TMRT-PCR Kit 将其逆转录成 cDNA, -20 保存。以此为模板进行常规 PCR, 参照文献设计 IL-8 及磷酸甘油醛脱氢酶(GADPH, 内参照)引物^[6], 由上海生工生物工程公司合成。PCR 扩增参数为: 94 5min 后, 94 30s, 60 45s, 72 45s, 30 个循环, 72 15min。

SGC-7901 细胞经胰酶消化制成单细胞悬液, 按 1 \times 10⁴/孔的密度接种于 96 孔板, 复 3 孔, 加入不同浓度的蛋白, 分别于 6、24、及 48h 取板, 各孔中加 MTT(5mg/mL)20 μ L, 继续孵育 4h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液。每孔加 150 μ L DMSO, 振荡 10min。测取 OD₅₇₀ 的光密度值, 重复 3 次实验。根据 OD 值绘制生长曲线。

2 结果

2.1 *H. pylori* 的分离培养与鉴定

培养 96h 的 NCTC11637 经革兰染色后, 油镜下可见海鸥状、弧形、S 形的革兰阴性菌, 尿素酶、氧化酶、触酶试验均阳性。

2.2 *cagT* 基因 PCR 扩增结果

PCR 结果发现在 843bp 左右有一条带, 与预计大小一致, 无非特异性条带。

2.3 TA 克隆重组质粒的筛选与鉴定

将 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接产物转化至 DH5 α , 随机挑取菌落, 抽提质粒, 双酶切产物电泳后, 阳性克隆出现的两条带分别位于约 3003bp 和 843bp 处(图 1)。

2.4 重组表达质粒的酶切鉴定

质粒 pQE30 和 TA 克隆鉴定阳性的质粒分别经 *Bam*H 和 *Hind* 双酶切后, 回收酶切片段, 16 连接过夜, 连接产物转化至 *E. coli* M15, 随机挑取菌落, 抽提质粒, 双酶切产物电泳后, 阳性克隆出现的两条带分别位于 3.4kb 和 843bp 处(图 2)。

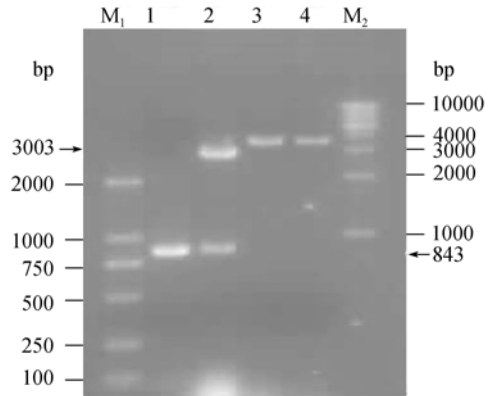


图 1 重组质粒 pGEM-T/cagT 的双酶切鉴定结果

Fig. 1 Double restriction enzyme digestion map of the recombinant plasmid pGEM-T/cagT. M₁. DNA Marker DL2000; 1. PCR product; 2. pGEM-T/cagT/*Bam*H + *Hind*; 3. pGEM-T/cagT/*Bam*H; 4. pGEM-T/cagT/*Hind*; M₂. 1kb DNA Ladder.

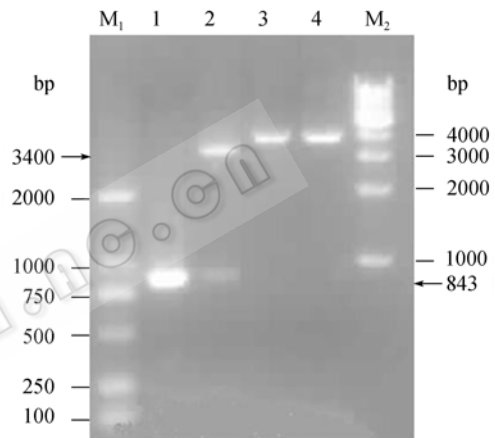


图 2 重组质粒 pQE30/cagT 的双酶切鉴定结果

Fig. 2 Double restriction enzyme digestion map of the recombinant plasmid pQE30/cagT. M₁. DNA Marker DL2000; 1. PCR product of *cagT*; 2. pQE30/*cagT*/*Bam*H I + *Hind*; 3. pQE30/*cagT*/*Bam*H I; 4. pQE30/*cagT*/*Hind*; M₂. 1kb DNA Ladder.

2.5 *cagT* 基因片段的序列测定及编码蛋白的理化特性预测

将经鉴定后的重组质粒送往上海生工进行核苷酸序列测定, DNA 测序结果表明, 构建的重组质粒上的 *cagT* 长度为 843bp, 与设计序列大小完全一致, GenBank 登录号为 EF114758。

使用 Blastn 2.2.15 在目前 nr 数据库 4677810 条非冗余序列中分析, 得到 109 个期望值小于 10 的 *cagT* 基因同源序列, 但均为 *H. pylori* 不同菌种间的相关序列。与已知的两种国际标准菌株 *H. pylori* 26695 和 J99 的 *hp0532* 基因的核苷酸序列进行比对, 与 26695 菌株的 *hp0532* 比较, 同源率为 97%(822/843), 与 J99 菌株的 *cagT* 比较, 同源率为 97%(826/843), 碱基总数相同。而

与 Censini 等^[7]报道(GeneBank 登录号: AF282852)的几乎一致, 同源性高达 99%(841/843)。使用 Blastp2.2.15 在目前 nr 数据库 4318227 条蛋白序列中分析, 得到 31 个期望值小于 10 的 *CagT* 同源蛋白, 但均为 *H. pylori* 不同菌株间的所属蛋白。使用 NCBI 保守序列搜索服务器 (CD-Search service v2.02) 在数据库 CDD v2.02-12589 PSSMs 和 Smart v4.0-663 PSSMs 中分析, 得到 *cagT* 编码氨基酸序列和目前已知的氨基酸保守序列无关联。

应用序列分析软件包 Omega 2.0 分析得到 *CagT* 的分子质量为 32.333kDa, 等电点 pI 为 9.455, 在 pH7.0 时所带电荷为 8.252, 280nm 紫外摩尔消光系数为 0.641(1mg/mL)。

2.6 目的蛋白在 *E.coli* 中的表达与纯化

重组质粒 pQE30-*cagT* 转化至 *E.coli* M15 中获得重组工程菌, 接种 LB 液体培养基, 于 37 培养至 OD_{600} 达到 0.6 时, 加入终浓度为 1mmol/L IPTG 诱导 4h, 收集菌体进行 SDS-PAGE 检测可见在约 Mr32kDa 处出现 1 条新的蛋白带(见图 3), 与理论预测值基本相符。空载体转化菌 pQE30/M15 诱导后和未诱导重组工程菌在同一位置未出现相应的蛋白带。收集菌体溶解于裂解液中, 冰上 30min 后, 超声破碎, 10000×g 离心收集上清和沉淀, 沉淀溶解于裂解液中, SDS-PAGE 电泳分析目的蛋白的溶解度, 目的蛋白存在于沉淀中, 以包涵体形式存在。按照 Qiagen 说明书, 在变性条件下纯化蛋白。重组工程菌大量诱导后, 收集细菌, 沉淀置冰上 15min, 每克菌体重悬于 4mL BufferA 中, 室温裂解细胞 1h, 10000×g 离心 30min, 留上清, 加 1mL 50% Ni^{2+} -NTA 至裂解上清中, 室温混匀 1h, 装柱, 用 BufferC 洗涤至 A_{280} 低于 0.01, 0.5mL BufferD 洗脱 4 次, 再用 0.5mL BufferE 洗脱 4 次。SDS-PAGE 电泳分析纯化的目的蛋白的量, 结果目的蛋白存在于 BufferE 中, 纯度达 98%, 见图 3。

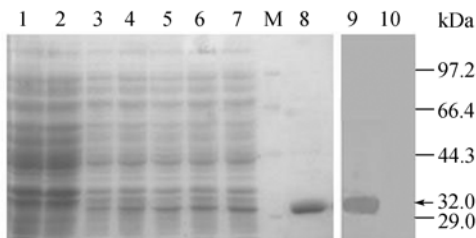


图 3 SDS-PAGE 电泳检测 *CagT* 重组蛋白诱导表达、纯化及 Western blot 结果

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression and purification using the QIAexpress System (pQE30) and the result of Western blot. 1. negative control(pQE30 vector); 2. noninduced control; 3-7. induced for 1-5h respectively; M. markers; 8. purification with Ni-NTA; 9. western blot result; 10. negative control.

2.7 Western blot 分析

将 SDS-PAGE 分离的纯化后的蛋白电转移至 NC 膜上, 依次加抗 His 抗体和 HRP 标记的羊抗兔二抗, DAB 显色后在相对分子量为 32.0kDa 的新生蛋白带处, 有一特异性条带, 同时以空载体菌为对照, 未发现条带, 说明该蛋白带为目的蛋白 *CagT*, 见图 3。

2.8 细胞因子 IL-8 的检测结果

经 *CagT* 重组蛋白、LPS、pQE30 转化的宿主菌的平行提取物及不加入任何刺激物作用 4h 后提取细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA, 以逆转录的 cDNA 为模板, 进行 PCR, LPS 和 *CagT* 重组蛋白作用的细胞扩增出 IL-8 片段, 而阴性对照(pQE30 转化的宿主菌的平行提取物作用的细胞)及不加处理的细胞未扩增出 IL-8 片段, 见图 4。

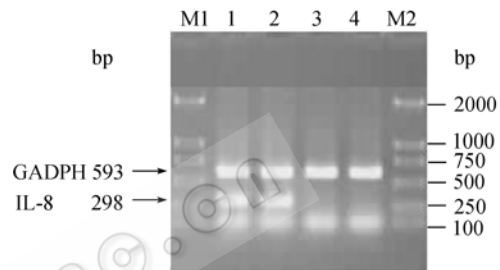


图 4 *CagT* 重组蛋白诱导 SGC-7901 细胞 IL-8 mRNA 表达结果

Fig. 4 IL-8 mRNA expression in SGC7901 cells stimulated with PBS, LPS and recombinant *CagT* protein. M1 and M2. DNA Marker DL2000; 1. Posive control(SGC7901 cells co-cultured with LPS); 2. SGC7901 cells co-cultured with recombinant *CagT*; 3. SGC7901 cells co-cultured with the extrative of bacterium transformed with pQE30 ; 4. SGC7901 cells.

2.9 MTT 检测细胞增殖结果

SGC-7901 细胞经不同浓度的 *CagT* 蛋白作用不同时间, 其 OD_{570} 值均低于不加 *CagT* 的对照组, 且随着浓度的增大, 其 OD_{570} 值逐渐降低, 说明 *CagT* 蛋白抑制 SGC-7901 细胞的增殖。结果见图 5。

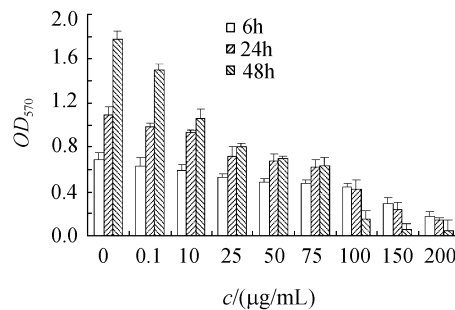


图 5 不同时间不同浓度 *CagT* 蛋白对 SGC-7901 细胞增殖的影响

Fig. 5 Effect on the growth of SGC7901 cells by *CagT*, treated with various doses of *CagT* for different times.

3 讨论

H. pylori 是定植于人胃部特定的病原菌, 感染呈全球分布, 感染率高达 50% 以上。现已证实它是轻度胃炎, 消化性溃疡及胃癌的主要病因。导致严重胃部疾病的 *H. pylori* 菌株中含有一个 *cag* 致病岛 (cytotoxin associated gene pathogenicity island, *cag* PAI)。*cag* 致病岛是一个约 40kb 的特殊基因片段, 该片段只出现于致病相关菌株, 可有部分或全部丢失等不稳定表现, 随着 *cag* 致病岛的分割及缺失, *H. pylori* 的毒力梯度呈下降趋势。*cag* 致病岛基因呈高密度分布并编码一个分泌转运系统 (type secretion system, TFSS)。目前认为由 *cag* 致病岛编码的蛋白构成的细菌 IV 型分泌系统 (TFSS), 通过转运细胞相关毒素 *cagA* 而参与 *H. pylori* 诱导上皮细胞内的酪氨酸磷酸化、细胞骨架重排、基垫结构形成、活化核转录因子 NF- κ B、诱导促炎细胞因子白细胞介素-8 的表达等, 在 *H. pylori* 致病中起着关键作用^[8-13]。

本文从 *H. pylori* NCTC11637 菌株中成功克隆了 *cagT* 基因并对其 DNA 序列进行了测定, 同时, 利用生物信息数据库及生物学软件对 *cagT* 基因的序列同源性和保守性、编码蛋白理化特性及抗原表位进行了分析。结果表明 *cagT* 基因是一类高度保守的原核型基因, 与 *H. pylori* 其他菌株的同源性在 97%~99%, 与真核生物无同源序列。应用 NCBI CDD 分析没能得到 *cagT* 基因编码氨基酸序列和目前数据库中保守序列匹配, 这可能是因为以上数据库的信息相对物种的多样性与变化性还显得比较有限。应用序列分析软件包 Omega 2.0 分析得到 CagT 的分子质量为 32.333kDa, 等电点 pI 为 9.455, 在 pH7.0 时所带电荷为 8.252, 280nm 紫外摩尔消光系数为 0.641(1mg/mL)。重组工程菌在 IPTG 诱导下表达出目的蛋白, 纯化后得到纯度较高的蛋白, 由于未能得到抗 *H. pylori* 全菌抗体, 故用抗 His 抗体进行 Western blot 鉴定, 结果 DAB 显色后在相对分子量为 32.0kDa 的新生蛋白带处, 有一特异性条带, 同时以空载体菌为对照, 未发现条带, 说明该蛋白带为目的蛋白 CagT。上述结果为进一步研究 CagT 蛋白的生物学功能奠定了一定的实验基础。然而, *H. pylori* 致病过程并非为单一因子所致, 有效地应用当前不断丰富的序列同源性分析、结构功能预测、表位分析、信号通路分析等生物信息学技术必将进一步明确 *H. pylori* 的致病机制。

在 *H. pylori* 引起的胃粘膜炎症中, IL-8 起着重要

的作用。它作为中性粒细胞趋化及活化因子, 是涉及 *H. pylori* 感染、导致胃粘膜炎症反应的第二信使, 在 *H. pylori* 致病中起重要的中介作用^[14]。究竟 *H. pylori* 表面何种成分在诱导 IL-8 的表达中起主要作用仍是目前有关 *H. pylori* 致病机制研究的主要问题。由 *cag* PAI 编码的多种蛋白质可形成一复杂的分泌装置 (型分泌系统), 后者参与触发胃上皮细胞 IL-8 蛋白的从头合成 (de novo synthesis)^[15,16]。体内外研究^[17,18] 证实, 感染 *cag* PAI 阳性 *H. pylori* 菌株者的胃黏膜 IL-8 mRNA 和 IL-8 蛋白水平明显高于感染 *cag* PAI 阴性菌株者。因此, *cag* PAI 基因产物与胃黏膜接触诱导 IL-8 蛋白产生以及由此介导的细胞炎症反应是 *H. pylori* 引起胃黏膜损害的重要免疫致病机制。CagA 阳性的 *H. pylori* 诱导 IL-8 表达的能力远远大于 CagA 阴性的菌株^[19], 但是令人疑惑的是, 剔除 CagA 并不影响 NF- κ B 及 MAPK 的激活和 IL-8 的生成, 这提示 CagA 阳性的 *H. pylori* 引发的 IL-8 生成尚有其他调控因素, 如可能有 *cag* PAI 的其它产物蛋白进入了宿主细胞或者 IL-8 的生成从根本上是由 TFSS 对宿主细胞的影响决定的, 而与分泌内容无关^[20]。Selbach 等^[21] 发现所有接触-依赖 IV 型运载体运载体复合物的 *virB* 基因敲除株 (*virB4*, *virB7*, *virB8*, *virB9*, *virB10* 和 *virB11*) 及缺失整个 *cag* PAI 的突变株不能分泌 IL-8, 因此, 认为细菌刺激 IL-8 分泌的能力很大程度上与它们易位 CagA 的能力有关, 即 TFSS 可诱导 IL-8 的分泌。本实验中, 由于不能够直接从 *H. pylori* 菌体直接分离得到 CagT 蛋白, 我们通过大肠杆菌原核表达系统表达出目的蛋白, 将纯化的蛋白通过去内毒素亲和填料 FF 以排除宿主菌中内毒素的影响, 以此蛋白在体外与 SGC-7901 细胞共培养, 结果发现, 所获得的原核表达的蛋白可以在体外诱导 SGC-7901 细胞细胞因子 IL-8 在 mRNA 水平上的表达, 说明其在 *H. pylori* 引起炎症反应以及进一步病理损害的过程中可能起着重要作用, 这一结果亦支持了 Selbach 等^[21] 的推断, 为进一步揭示 *H. pylori* 感染相关疾病的致病机制奠定了基础, 但是其具体通过何种途径发挥作用还有待进一步的研究。

已观察到 *H. pylori* 感染与胃黏膜上皮细胞增殖增加有关^[22], 为了解 *H. pylori* 本身是否刺激细胞增殖, 一些学者观察了 *H. pylori* 对体外培养的胃黏膜细胞的直接作用, 除了一组实验结果显示当加入 *H. pylori* 或其培养上清至胃细胞可产生细胞增殖效应以

外, 其余各组均得到相反结果。一般而言, 当 *H. pylori* 或其提取物加入短期培养的胃细胞后, 经过细胞周期的细胞数明显减少, 即细胞增殖受抑。本实验中我们将原核表达的 CagT 蛋白加入 SGC-7901 细胞中, SGC-7901 细胞经不同浓度的 CagT 蛋白作用不同时间, 其 OD_{570} 值均低于不加 CagT 的对照组, 且随着浓度的增大, 其 OD_{570} 值逐渐降低, 说明 CagT 蛋白抑制 SGC-7901 细胞的增殖。虽然利用体外系统来观察 *H. pylori* 对胃上皮细胞增殖有着较多优势, 但是要利用这些体外实验结果来推测体内所发生的确切情况, 则显得有些困难。特别是被研究的胃细胞并非“正常”, 但是不管怎样, 它揭示了 *H. pylori* 可能会诱导细胞损伤和死亡。

参 考 文 献

- [1] Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastroenteral disease. *Annu Rev Med*, 1992, 43: 135-145.
- [2] Backert S, Schwarz T, Miehlke S, et al. Functional analysis of the *cag* pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. *Infect Immun*, 2004, 72(2): 1043-1056.
- [3] Spudich GM, Fernandez D, Zhou XR, et al. Intermolecular disulfide bonds stabilize VirB7 homodimers and VirB7/VirB9 heterodimers during biogenesis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(15): 7512-7517.
- [4] Tanaka J, Suzuki T, Mimuro H, et al. Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type secretion apparatus. *Cell Microbiol*, 2003, 5(6): 395-404.
- [5] Rohde M, Puls J, Buhrdorf R, et al. A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* *cag* type secretion system. *Mol Microbiol*, 2003, 49(1): 219-234.
- [6] Yamada H, Aihara T, Okabe S. Mechanism for *Helicobacter pylori* stimulation of interleukin-8 production in a gastric epithelial cell line (MKN 28): roles of mitogen-activated protein kinase and interleukin-1beta. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61(12): 1595-1604.
- [7] Censini S, Lange C, Xiang Z, et al. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(25): 14648-14653.
- [8] Asahi M, Azuma T, Ito Y, et al. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med*, 2000, 191(4): 593-602.
- [9] Bourzac KM, Guillemin K. *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol*, 2005, 7(7): 911-919.
- [10] Naumann M, Wessler S, Bartsch C, et al. Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the *cag* pathogenicity island. *Biol Chem*, 1999, 274(44): 31655-31662.
- [11] Wataru S, Yoshihiro H, Haruhiko Y, et al. NF- κ B and ERK-signaling pathways contribute to the gene expression induced by *cag* PAI-positive-*Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(39): 6134-6143.
- [12] Covacci A, Rappuoli R. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. *J Exp Med*, 2000, 191(4): 587-592.
- [13] Oliveira MJ, Costa AC, Costa AM, et al. *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell invasion in a c-Met and type IV secretion system-dependent manner. *J Biol Chem*, 2006, 281(46): 34888-34896.
- [14] 刘炯, 许国铭. 幽门螺杆菌感染与 IL-8 表达的关系. 国外医学内科学分册 [Foreign Medical Sciences (Section of Internal Medicine)], 1999, 26(12): 527-529.
- [15] Backert S, Churin Y, Meyer TF. *Helicobacter pylori* type IV secretion, host cell signalling and vaccine development. *Keio J Med*, 2002, 51 Suppl 2: 6-14.
- [16] Backert S, Meyer TF. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9(2): 207-217.
- [17] Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, et al. Relationship of *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* to *cagA* status, cytotoxin production, and clinical outcome. *Helicobacter*, 1998, 3(4): 241-253.
- [18] Hsu PI, Hwang IR, Citty D, et al. Clinical presentation in relation to diversity within the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97(9): 2231-2238.
- [19] Kim SY, Lee YC, Kim HK, et al. *Helicobacter pylori* CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. *Cellular Microbiology*, 2006, 8(1): 97-106.
- [20] Rieder G, Hatz RA, Moran AP, et al. Role of adherence in interleukin-8 induction in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Infect Immun*, 1997, 65(9): 3622-3630.
- [21] Selbach M, Moese S, Meyer TF, et al. Functional analysis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island reveals both VirD4-CagA-dependent and VirD4-CagA-independent mechanisms. *Infect Immun*, 2002, 70(2): 665-671.
- [22] Fan XG, Kelleher D, Fan XJ, et al. *Helicobacter pylori* increased proliferation of gastric epithelial cells. *Gut*, 1996, 38: 19-22.

Cloning and expressing *cagT* gene of type secretion system in *Helicobacter pylori* and influence of cytokine secretion and cell proliferation on SGC-7901 cell

Leilei Cui, Shihe Shao^{*}, Liangju Li, Hua Wang, Runhong Mu, Xiaoli Ju, Surong Dong, Qiao Zhong

(School of Medical Technology, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu, 212013, China)

Abstract: [Objective] To detect the influence of the CagT protein on interleukin-8 secretion and proliferation in SGC-7901 cells. [Methods] *Helicobacter pylori cagT* gene was amplified by PCR with the genomic DNA of *H. pylori* NCTC 11637 as template, then it was inserted into an expression vector pQE30. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* M15. Recombinant protein was expressed by Isopropylthio- β -D-Galactoside (IPTG) induction and confirmed by Western blot. Fusion protein with 6 \times His tag was purified using Ni²⁺-NTA agarose. Interleukin-8 mRNA expression of SGC7901 cells was determined by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Cell viability was determined by methyl thiazolyl tetrazolium assay (MTT). [Results] The GenBank accession number of the amplified sequence is EF114758. The sequence analysis for *cagT* showed that it shares 97%–99% homology with other strains of *H. pylori* in Gene bank. The molecular mass of the product is 32kDa, and its purity is 98% analyzed by SDS-PAGE. After the protein was dialyzed, it can stimulate SGC7901 cells to express interleukin-8 and the growth of cells was inhibited in a dose- and time-dependent manner. [Conclusion] It is indicated that we have obtained the correct *cagT* gene and expressed in *E. coli* M15. The protein can stimulate the cells to express cytokine interleukin-8 and inhibit proliferation of cells, which posed a basis for further research on its biological function.

Keywords: *Helicobacter pylori*; *cagT*; expression; interleukin-8; proliferation

Supported by the Science and Technology Office Program of Jiangsu Province (BS2004021) and the High-Grade Talented Individuals Program of Jiangsu University (JDG2004008)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-511-85038375-326; Fax: +86-511-85038449; E-mail: shaoshihe2006@163.com

Received: 14 September 2007/ Revised: 9 December 2007

《微生物学报》对摘要写作的要求

2007年12月修定

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论，并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围，采用的手段和方法，得出的结果和重要的结论。在结果和结论中应写明本文的创新之处。
2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
3. 英文摘要的内容应与中文摘要一致，但比中文摘要更详尽。要求在文中给出[Objective], [Methods], [Results], [Conclusion]等 words。英文摘要完成后，务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的，即使学术上可以达到刊出的水平，本刊也将推迟发表。
4. 英文摘要的撰写要点：
 - (1) 在英语摘要中，不要使用任何汉字字符，包括标点、括号、温度、希腊字母等。
 - (2) 建议使用第一人称，以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
 - (3) 建议用主动语态，被动语态表达拖拉模糊尽量不用，这样可以免好多长句，以求简单清晰。
 - (4) 摘要应当使用过去时态，语法正确，句子通顺。
 - (5) 摘要中不用缩写语，除非是人人皆知的，如：DNA, ATP 等。