

福氏 2a 志贺氏菌 2457T HtpG 蛋白诱导小鼠炎症反应

卜歆^{1,2}, 朱力², 刘先凯², 赵格², 冯尔玲², 张静飞², 袁静^{2*}, 王恒樑^{2*}

(¹西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 712100)

(²军事医学科学院生物工程研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘要:【目的】构建福氏 2a 志贺氏菌 2457T 株的 *htpG* 缺失突变株和回复株, 对 HtpG 蛋白的功能进行初步研究。【方法】采用 λ -Red 重组系统对 *htpG* 基因进行缺失突变, 构建了福氏 2a 志贺氏菌 2457T 株的 *htpG* 缺失突变株, 并利用低拷贝质粒构建了 *htpG* 突变株的回复株。在此基础上, 对野生株、突变株和回复株的生长曲线、生化反应、豚鼠角膜试验进行了比较分析, 并考察了野生株、突变株和回复株腹腔注射引起小鼠炎症反应的强弱。【结果】HtpG 蛋白功能与福氏志贺氏菌的基本生化代谢无关, 也不影响细菌穿透上皮细胞的能力, 但腹腔注射后能够引起小鼠强烈的炎症反应。【结论】HtpG 蛋白功能可能与细菌的免疫致病性相关。

关键词: 福氏 2a 志贺氏菌 2457T 株; 热休克蛋白 HtpG; 缺失突变株; 炎症因子

中图分类号: Q816 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0905-06

细菌 HtpG 蛋白属于热休克蛋白 90 家族成员, 具有分子伴侣功能。此蛋白家族中的蛋白分子量均为 90 kD 左右, 包括哺乳动物细胞胞浆中的 Hsp90 与内质网中的 Grp94 (Erp90 或内质网素 endoplasmic reticulum chaperone) 果蝇胞浆中的 Hsp83 以及酵母胞浆中的 Hsp83 与 Hsc83。目前对于细菌中 HtpG 蛋白的研究主要集中在其分子伴侣功能方面。例如, 研究发现 HtpG 能够与 σ^{32} 或亲环素 (cyclophilin) 结合, 在热休克状态下辅助新合成蛋白进行正确折叠^[1]; Nemoto TK 等人发现纯化的 HtpG 蛋白具有 ATP 酶活性, 在水溶液中以二聚体形式存在, 温度升高时 (65 °C) 形成寡聚体, 发挥分子伴侣作用^[2]; HtpG 蛋白在热休克和酸休克时被诱导^[3,4]; 在缓和的热休克条件下, HtpG 参与新合成蛋白的折叠^[5]; 而在氮源饥饿时 HtpG 蛋白的表达被抑制^[6]。此外, Mason 等发现了一个有趣的现象, 大肠杆菌 HtpG 蛋白的表达受到生长环境的影响: 在 LB 复合培养基中培养时, 可以观察到 HtpG 蛋白热休克时诱导表达; 而在含葡萄糖的基础培养基中培养

时, HtpG 蛋白的表达与温度无关^[7]。这种现象暗示 HtpG 蛋白的表达除受温度调控外, 还受到其他信号分子的调控, 也提示我们此蛋白可能存在其它的未知功能。

通常认为, 细菌引起宿主炎症反应的分子主要是脂多糖 (LPS), LPS 通过 Toll 样受体 (TLR) 诱导宿主产生炎症效应分子^[8]。但近年来, 研究者又发现某些致病菌胞内的 Hsp60 等分子伴侣蛋白能够引起宿主急性炎症反应^[9,10]。在单核细胞中, Hsp60 蛋白与白介素-8 (Interleukin 8, IL-8) 的产生有着密切的联系^[9]。衣原体热休克蛋白 60 (cHsp60) 能引起血管上皮细胞和小鼠巨噬细胞的炎症反应^[10]。那么同为分子伴侣的 HtpG 蛋白能否引起宿主的炎症反应呢?

2003 年, Wei 等^[11]完成了福氏 2a 志贺氏菌 (*Shigella flexneri* serotype 2a) 2457T 株的基因组测序。据注释结果知, 该菌株的 *htpG* 基因位于染色体正编码链 431446~433320 处, 其编码的蛋白产物 (NP_836144.1) 是相对分子质量为 71.39 kDa、含

基金项目: 国家自然科学基金(30470101, 30700035); 国家“973 项目”(2005CB522904)

*通讯作者: Tel: +86-10-66948836; E-mail: wanghl@nic.bmi.ac.cn; yuanjing6216@163.com

作者简介: 卜歆(1983-), 女(汉族), 陕西西安人, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: julia0102@126.com

收稿日期: 2007-12-27; 修回日期: 2008-03-18

624 个氨基酸残基的热休克蛋白(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。本研究将由 Datsenko 和 Wanner^[12]建立的 λ 噬菌体 Red 重组系统稍加改进,成功地敲除了福氏 2a 志贺氏菌 2457T 株的 *htpG* 基因,并构建了回复株加以验证,对 *HtpG* 进行了初步的功能研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雌性 SPF 级 Balb/c 小鼠(6~8 周龄)及豚鼠(250 g)购自军事医学科学院动物中心。

1.1.2 菌株和质粒: 福氏 2a 志贺氏菌野生株 2457T (NaI^r)为本实验室保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 购自 TaKaRa 公司。pMD18-T 质粒购自 TaKaRa 公司;pET-22(b)购自 Novagen 公司;pKD46(温度敏感型,含有受阿拉伯糖启动子调控的 *exo*、*bet* 和 *gam* 基因, Ap^r) pKD4(含有两端带有 FRT 位点的卡那霉素抗性基因, Km^r) pCP20(温度敏感型,编码能够识别 FRT 位点的 FLP 重组酶, Ap^r, Cm^r) 质粒由 Hilary M. 实验室馈赠, pAK 质粒(低拷贝质粒,仅含 p15A 质粒复制子和卡那霉素抗性基因, Km^r) 由本实验室自行构建。

1.1.3 主要试剂和仪器: Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA 分子量标准、限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶购自 New Biolab 公司;质粒提取试剂盒购自 Promega 公司;凝胶回收试剂盒购自法特捷公司;L-阿拉伯糖、氨苄青霉素、卡那霉素、萘啶酮酸购自 Sigma 公司;细菌生化鉴定试剂盒购自生物梅里埃公司;小鼠 IL-1 β 、IFN- γ 、TNF- α ELISA 试剂盒购自晶美公司。

1.2 突变株的构建和分子水平验证

1.2.1 引物: 本研究所用引物的设计是根据 NCBI 上福氏 2a 志贺氏菌 2457T 株全基因组序列(GenBank accession no.: NC-004741)中所列基因 *htpG* 及上、下游同源臂序列,由 Primer Premier5.0 分析软件完成的(表 1)。

在 *htpG* 基因的上游(N 端)和下游(C 端)各设计一对引物,即 *htpG5P1/htpG5P2* 和 *htpG3P1/htpG3P2*, 分别从该基因的上游和下游扩增长约 600 bp 的基因片段作为线性打靶 DNA 片段(长同源臂突变盒)的同源臂 H1 和 H2。为方便以后的长同源臂突变盒构建工作,在上游同源臂 H1 的引物末端分别加上限制性酶切位点 *BamH* 和 *Sal*, 下游同源臂 H2 的引物末端分别加上限制性酶切位点 *Hind* 和 *Xho*。

表 1 引物列表
Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequences(5'→3')	Restriction site
K1	GCGTCGACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	<i>Sal</i>
K2	CCAAGCTTATGGGAATTAGCCATGGTCC	<i>Hind</i>
<i>htpG5P1</i>	CGGGATCCGCACTTTCACCGAACAGG	<i>BamH</i>
<i>htpG5P2</i>	GCGTCGACGTAGGTCTACCTCAATAATGC	<i>Sal</i>
<i>htpG3P1</i>	CCAAGCTTTCGCCATTAACCGTTTCAG	<i>Hind</i>
<i>htpG3P2</i>	CCCTCGAGGTGATAAACACGACCAGAC	<i>Xho</i>
<i>htpGP1</i>	CTGACCTGGAGCCACAACC	<i>BamH</i>
<i>htpGP2</i>	GAACCTCGATGCCTTCTTAC	<i>Xho</i>
<i>htpGH1</i>	CGGGATCCGAACTGGAAATGGTCGATG	<i>BamH</i>
<i>htpGH2</i>	GCGTCGACCAGAATGATACGCATTGCG	<i>Sal</i>

1.2.2 长同源臂突变盒的具体构建过程: 首先,以 pKD4 为模板,使用引物 K1、K2 扩增质粒上两端带有 FRT 位点的卡那霉素抗性基因,经 *Sal* 和 *Hind* 双酶切后,与同样双酶切的 pET-22b 载体连接,验证正确后命名为 pETkan。然后,使用引物 *htpG5P1*、*htpG5P2* 扩增上游同源臂 H1,使用 *BamH* 和 *Sal* 双酶切后,与同样双酶切的 pETkan 连接,从而将上游同源臂导入 pETkan 质粒上卡那霉素抗性基因上游 FRT 位点之前。同样,使用引物 *htpG3P1* 和 *htpG3P2* 扩增、*Hind* 和 *Xho* 双酶切,将下游同源臂 H2 导入

pETkan 质粒上卡那霉素抗性基因下游 FRT 位点之后,即可获得含有长同源臂突变盒的目的质粒。获得目的质粒后,只需使用引物 *htpG5P1*、*htpG3P2*,以质粒为模板大量扩增上述构建的长同源臂突变盒,即可获得高浓度的含有 FRT 位点及卡那霉素抗性基因的线性打靶 DNA 片段。操作原理及流程图可参见文献[13]。

将含有 pKD46 质粒的志贺氏菌 2457T 株于 30 培养至 OD_{600} 值为 0.5~0.6,制备电转化感受态,并在 OD_{600} 值达到 0.5~0.6 前 1 h 加入终浓度为 1 mmol/L

的 L-阿拉伯糖,诱导 Red 重组系统的表达。通过 PCR 扩增上述构建的长同源臂打靶 DNA 片段,电击转化至含有 pKD46 的 2457T 株感受态细胞中(电击参数:电阻 200 Ω ,电容 25 μF ,电压 2.5 kV)。复苏 1~2 h,然后涂布于含卡那霉素抗性的 LB 平板,并于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养约 24 h,长出的阳性克隆即为带有卡那霉素抗性的缺失突变株。将筛选到的阳性克隆转入液体 LB 培养基中,42 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 左右去除 pKD46 质粒,即可获得含卡那霉素抗性的 2457T Δ htpG::Kan 突变株。

将编码 FLP 位点特异性重组酶的 pCP20 转入突变菌株 2457T Δ htpG::Kan,在含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上筛选阳性克隆,转入无抗性的液体 LB 培养基中,于 42 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 左右,即可获得不含 pCP20 质粒且去除了卡那霉素抗性基因的 2457T Δ htpG 突变株。

1.3 回复株的构建

设计包含 htpG 基因自身启动子和上下游调控序列的引物 htpGH1、htpGH2,见表 1。同时两端各加上 BamH 和 Sal 的酶切位点,PCR 扩增 htpGH 片段,双酶切 pMD-htpGH 后与 pAK 载体连接,转化 DH5 α ,构建 pAK-htpGH 质粒,然后转化到突变株 2457T Δ htpG 感受态中,在卡那霉素抗性的 LB 平板上长出的菌落即为回复株 2457T htpGH。

1.4 突变株、回复株与野生株生长状态的测定

从 LB 平板上挑取 2457T Δ htpG 突变株、2457T htpGH 回复株与野生型 2457T 株单菌落,分别接种于 5 mL 相应抗性的液体 LB 培养基中过夜培养,以 1:100 转接于 100 mL 相应抗性的液体 LB 培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 同步培养,每隔 0.5 h 取样测定 OD_{600} 值。

1.5 突变株、回复株与野生株生化实验比较

用接种针从新鲜培养平板上挑取单菌落至 5 mL 含 0.85% NaCl 的培养基中,配制均一的菌悬液,然后用吸管将细菌悬液加入到生物梅里埃公司的 API 20E 生化鉴定试剂条上,盖上盖子,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h。参照说明书判读结果,试剂呈黄色为阳性反应,蓝色或蓝绿色为阴性反应。

从新鲜的培养平板上挑取几个一致菌落,转接至含有 10 mL API 50CB/E 培养基中,仔细混匀制成浊度相当于 2 McFarland 的均一细菌悬液,然后用吸管将此细菌悬液滴入生物梅里埃公司的 API 50CH 生化鉴定试剂条中,用灭菌的石蜡油封好,盖上盖子,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 24 小时后观察结果,参照说明判读

结果。

1.6 突变株、回复株与野生株豚鼠角膜实验(Sereny Test)比较

挑取 2457T Δ htpG 突变株、htpGH 回复株与野生型 2457T 株单菌落,分别接种于 5 mL 相应抗性的液体 LB 培养基中培养 8~9 h 后,取 1 mL 菌液 10000 \times g 离心 1 min,弃去上清,用 20 μL 生理盐水重悬沉淀,再取 10 μL ($\sim 10^9$ CFU) 滴注豚鼠角膜。每组 2 只豚鼠,同时用生理盐水作对照。

1.7 突变株、回复株与野生株小鼠炎症因子的 ELISA 检验

挑取 2457T Δ htpG 突变株、htpGH 回复株与野生型 2457T 株单菌落,分别接种于 5 mL 相应抗性的液体 LB 培养基中过夜培养 12 h 后, OD_{600} 值为 1.0 时,取 200 μL 菌液用生理盐水洗菌一次后腹腔注射 Balb/c 小鼠,每组 4 只小鼠,作用 5 h 后眼球取血,室温下静置 30 min~1 h,3000 r、4、5 min 离心后取上清分别作 IL-1 β 、IFN- γ 、TNF- α ELISA 检测。检验方法参照试剂盒里的说明书。

2 结果

2.1 2457T Δ htpG 突变株和 2457T htpGH 回复株的构建与验证

将获得的基因缺失突变株于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,用 htpG5P1 与 htpG3P2 为外部鉴定引物,htpGP1 与 htpGP2 为内部鉴定引物,进行 PCR 验证,结果见图 1。如果突变株与回复株构建成功,当用外部引物进行检测时,野生株的扩增产物大小应当为 2927 bp;抗性基因替换目的基因后获得的突变株(Δ htpG::kan 株)的扩增产物大小应当为 2549 bp;去除抗性基因后的突变株(2457T Δ htpG 株)以及回复株扩增产物大小应当为

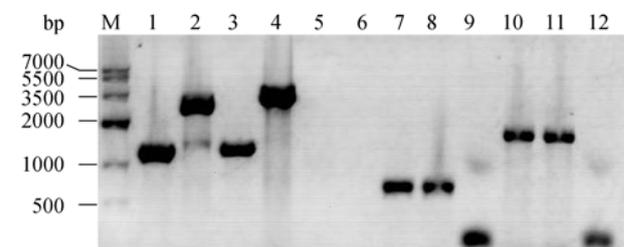


图 1 htpG 基因缺失突变株和回复株的 PCR 验证

Fig. 1 PCR verification of the htpG deletion mutant. M: Marker; 1/5/9: 2457T Δ htpG mutant; 4/6/10: 2457T Δ htpG::kan mutant; 3/7/11: 2457T recovery mutant; 4/8/12: 2457T wild strain; 1/2/3/4: PCR products using external primers; 5/6/7/8: PCR products using internal primers; 9/10/11/12: PCR products using Kan primers.

1140 bp。而且,当使用内部引物进行检测时,应当只有野生株与回复株为阳性结果(592 bp);当使用卡那霉素抗性基因的引物进行检测时,由于 pAK 质粒含有卡那霉素抗性基因,因此应当只有 $\Delta htpG::kan$ 株与回复株为阳性结果(1512 bp)。从图中可以看出,电泳结果与预期完全一致,说明 *htpG* 基因缺失突变株和回复株构建成功。

2.2 突变株、回复株与野生株生长状态的测定

使用 LB 液体培养基,将野生株 2457T 和突变株 2457T $\Delta htpG$ 、回复株 *htpG*H 在 37 °C 条件下同步培养,每隔 30 min 测定一次 OD_{600} 值,绘制生长曲线如图 2 所示,可见突变株 2457T $\Delta htpG$ 和回复株的生长曲线与野生株 2457T 基本一致。

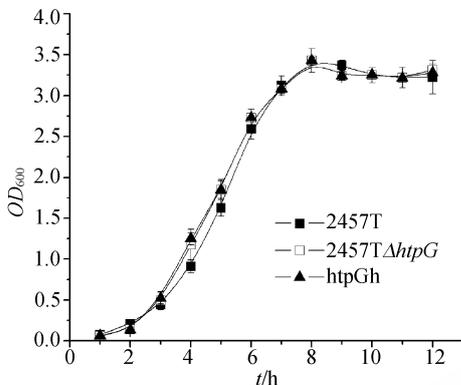


图 2 野生株、突变株与回复株的生长曲线
Fig. 2 The growth curves of wild-type, mutant and recovery mutant strain.

2.3 突变株、回复株与野生株在生化水平上的比较

用生物梅里埃公司的生化鉴定试剂条检测突变株、回复株与野生株在生化水平上的差异。将野生株和突变株、回复株划线于 LB 固体平板,培养一定时间后,挑单菌落至含有 8.5 g/L NaCl 的液体培养基中,充分混匀。接种于 API 20E 生化鉴定试剂条,37 °C 培养 24 h 参照说明书判读结果,表明野生株、突变株与回复株没有明显差异。我们又进一步利用 API 50CH 生化试剂条,对比了野生株、突变株与回复株对 49 种糖的发酵情况。结果表明这三株菌在糖类代谢方面也没有明显差异。

2.4 突变株、回复株与野生株豚鼠角膜实验(Sereny Test)比较

豚鼠角膜实验结果显示:野生株、突变株与回复株均能够引起豚鼠角膜强烈炎症反应。此结果说明,缺失 HtpG 蛋白对志贺氏菌侵袭角膜上皮细胞的过程没有明显影响。

2.5 突变株、回复株与野生株小鼠炎症因子的 ELISA 检验

2.5.1 IL-1 β 检测:结果如图 3-A 所示,实验数据首先使用单因素方差分析进行检测,结果显示三组数据有显著性差异。随后依据参考文献方法^[14],使用单尾 Student's T 检验对数据进行分析,发现野生株、回复株与突变株相比,血清中 IL-1 β 含量具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.5.2 IFN- γ 检测:结果如图 3-B 所示,实验数据使用单因素方差分析进行检测,结果显示三组数据没有显著性差异 ($P > 0.05$)。但从均值看,IFN- γ 浓度的变化趋势与 IL-1 β 一致,野生株最高,突变株最低。

2.5.3 TNF- α 检测:结果如图 3-C 所示,实验数据使用单因素方差分析进行检测,结果显示三组数据有显著性差异;使用单尾 Student's T 检验对数据进行分析,发现野生株与突变株相比,血清中 TNF- α 含量具有显著性差异 ($P < 0.05$),而回复株与突变株差异不显著 ($P > 0.05$)。

综合这 3 种细胞因子的含量测定结果中可以看出,野生株诱导产生炎症因子的浓度最高,突变株诱

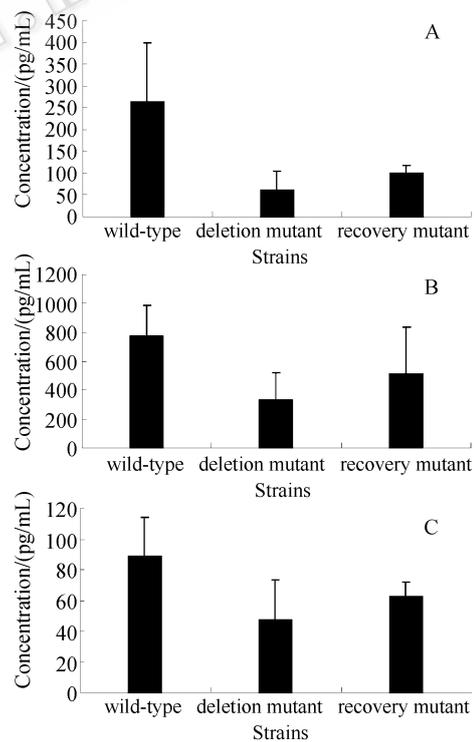


图 3 小鼠血清中 IL-1 β (A)、IFN- γ (B) 和 TNF- α (C)的 ELISA 检测结果

Fig. 3 Comparison of IL-1 β (A), IFN- γ (B) and TNF- α (C) production in mouse sera evoked by wild-type strain, deletion mutant and recovery mutant.

导产生的炎症因子浓度最低。此外, HtpG 蛋白诱导产生不同细胞因子的能力不同, HtpG 诱导产生 IL-1 β 的能力强于诱导产生 IFN- γ 和 TNF- α 的能力。

3 讨论

最新研究表明^[14], 牙龈卟啉单胞菌中的 HtpG 蛋白能够诱导人单核细胞和上皮细胞分泌白介素-8 (IL-8)。文章还同时证明, HtpG 蛋白是通过细胞表面的人源 Hsp90 蛋白受体 CD91 和 TLR4 诱导宿主细胞分泌 IL-8。在福氏志贺氏菌侵袭宿主过程中, 宿主细胞同样分泌 IL-8, 在募集白细胞的同时造成上皮细胞之间产生空隙。细菌能够利用这些空隙进入宿主粘膜下层。而且, 如果宿主细胞不能在短时间内下调 IL-8 的表达, 就会造成宿主组织损伤, 导致长期炎症反应症状^[15]。因此, 我们认为, 志贺氏菌 HtpG 蛋白可能与牙龈卟啉单胞菌的 HtpG 蛋白一样, 在细菌侵袭过程中具有诱导宿主产生炎症反应的作用。Shelburne C E 等人^[14]的实验在细胞水平上验证了牙龈卟啉单胞菌中的 HtpG 蛋白能诱导宿主产生炎症反应, 但缺少真正的动物实验结果。本研究通过建立动物模型, 考察了志贺氏菌中 HtpG 蛋白诱导宿主产生炎症反应的能力。遗憾的是, 我们无法购得合适的小鼠白介素-8 (IL-8) ELISA 试剂盒进行进一步的实验。因此, 本研究中小鼠炎症反应的强弱主要通过 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 这 3 个细胞因子的浓度进行评价。

1975 年, Carswell 等人发现卡介苗攻击小鼠后再用内毒素处理, 小鼠血清中出现一种能诱导肿瘤组织出血坏死的物质, 故命名为肿瘤坏死因子 (TNF- α)。TNF- α 的生物学活性非常复杂, 包括对造血、免疫和炎症的调节; 对血管和凝血的影响和对多种器官(肝、心脏、骨、软骨、肌肉和其它组织)的作用等^[16]。TNF- α 对不同的细胞有不同的作用: 诱导敏感细胞凋亡; 快速、强烈、不可逆地抑制红细胞系前体 (CFU-ET 和 BFU-E) 和红系、粒系肿瘤细胞 (K562、HE2、HL-60) 的生长。此外, TNF- α 还能诱导 IL-1、IL-6、IL-8、IFN- γ 、GM-CSF、TGF- β 、NGF 和 PDGF 等细胞因子产生^[16]。白细胞介素-1 (IL-1) 又称淋巴细胞激活因子, 分为 IL-1a, IL-1 β 两种。IL-1 是急性期免疫反应的主要调节因子, 它在 T 细胞激活, 诱导 IL-2 产生过程中起着重要的作用, 而这些调节作用大多数是 IL-1 β 直接产生的, 但有些是与其他细胞因子如 IL-6、IFN、TNF 协同作用下发挥效应的。正常人血液中不

含 IL-1 β 或者含量很低, IL-1 β 含量升高表明机体内有组织损伤或者感染产生^[17]。型干扰素即 γ -干扰素 (IFN- γ), 主要由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生。IFN- γ 的生物学活性主要包括: 激活巨噬细胞; 促进 B 细胞分化, 产生抗体; 即或中性粒细胞和 NK 细胞杀伤活性; 即或血管内皮细胞等功能^[18]。

综合 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 这 3 个细胞因子的检测结果可知, 野生株引起炎症反应的能力最强, 突变株引起炎症反应的能力最差, 回复株的水平介于二者之间。尽管回复株未达到野生株的水平, 但与缺失株相比, 其诱导产生炎症因子的能力明显强于突变株。也就是说, 缺失 HtpG 蛋白后野生株引起小鼠炎症因子的能力明显减弱。目前有文献报道, 志贺氏菌侵袭相关的毒力大质粒动态性很高, 可移动原件甚至可以占整个基因组的 50% 左右^[19], 在目前已知的所有基因组序列中是比例最高的。因此, 为了排除我们实验操作过程中大质粒自发突变对实验结果可靠性造成的影响, 我们分别在毒力大质粒侵袭相关基因 *ipaA*、*mxiD*、*ipgC*、*virG* 基因以及一段基因间区序列内设计了 5 对引物进行 PCR 检测, 野生株、突变株和回复株的检测结果均为阳性 (电泳图未列出)。结合野生株、突变株和回复株的生长曲线、生化反应分析以及豚鼠角膜试验结果, 我们认为 *htpG* 基因缺失过程没有引起其他基因, 特别是毒力相关基因的突变。因此, 回复株引起炎症反应的能力与野生株不完全相同的现象, 可能是由于回复株是通过导入外源低拷贝质粒构建, 而不是在染色体上的原位回复突变造成的。HtpG 蛋白功能与福氏志贺氏菌的基础代谢无关, 也不直接影响细菌侵袭角膜上皮细胞, 但能够诱导小鼠产生炎症因子, 因此可能在细菌穿透宿主上皮组织后, 具有诱导宿主产生炎症浸润效应的作用。但是, HtpG 蛋白序列中没有分泌信号, 生物信息学预测定位于细菌胞质中, 那么这个蛋白是通过什么样的机制诱导宿主产生炎症反应呢? 这一问题将是我们下一步研究的重点。

参 考 文 献

- [1] Nadeau K, Das A, Walsh CT. Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *J Biol Chem*, 1993, 268(2): 1479-1487.
- [2] Nemoto TK, Ono T, Tanaka K. Substrate-binding characteristics of proteins in the 90 KDa heat shock protein family. *Biochem J*, 2001, 354(Pt 3): 663-670.
- [3] Heyde M, Portalier R. Acid shock proteins of *Escherichia coli*.

- FEMS Microbiol Lett, 1990, 57(1-2): 19–26.
- [4] Heitzer A, Mason CA, Hamer G. Heat shock gene expression in continuous cultures of *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 1992, 22(1-2): 153–169.
- [5] Thomas JG, Baneyx F. ClpB and HtpG facilitate de novo protein folding in stressed *Escherichia coli* cells. *Mol Microbiol*, 2000, 36(6): 1360–1370.
- [6] Kabir MS, Sagara T, Oshima T, *et al.* Effects of mutations in the *rpoS* gene on cell viability and global gene expression under nitrogen starvation in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2004, 150(Pt 8): 2543–2553.
- [7] Mason CA, Dunner J, Indra P, *et al.* Heat-induced expression and chemically induced expression of the *Escherichia coli* stress protein HtpG are affected by the growth environment. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(8): 3433–3440.
- [8] Bainbridge BW, Coats SR, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide displays functionally diverse interactions with the innate host defense system. *Ann Periodontol*, 2002, 7(1): 29–37.
- [9] Bulut Y, Faure E, Thomas L, *et al.* Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J Immunol*, 2002, 168(3): 1435–1440.
- [10] Lin SN, Ayada K, Zhao Y, *et al.* *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces production of the pro-inflammatory cytokine IL8 in monocytic cells. *J Med Microbiol*, 2005, 54(Pt 3): 225–233.
- [11] Wei J, Goldberg MB, Burland V, *et al.* Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. *Infect Immun.*, 2003, 71(5): 2775–2786.
- [12] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [13] 张影, 朱力, 袁静, 等. 弗氏 2a 志贺氏菌 2457T 株 *yciD* 基因缺失突变株的构建. *生物技术通讯(Letters in Biotechnology)*, 2006, 17(4): 483–488.
- [14] Shelburne CE, Coopamah MD, Sweier DG, *et al.* HtpG, the *Porphyromonas gingivalis* HSP-90 homologue, induces the chemokine CXCL8 in human monocytic and microvascular vein endothelial cells. *Cell Microbiol*, 2007, 9(6): 1611–1619.
- [15] Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 1998, 392(6676): 565–568.
- [16] Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med.*, 1994, 45: 491–503.
- [17] 罗艳. 全身性炎症反应综合征免疫因子研究进展. *国外医学: 麻醉学与复苏分册(Foreign Medical Science: Anesthesiology & Resuscitation)*, 2000, 21(4): 234–236.
- [18] 龚非力等. *医学免疫学(第二版)*. 北京: 科学出版社, 2004. 77.
- [19] Venkatesan MM, Goldberg MB, Rose DJ, *et al.* Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*. *Infect Immun*, 2001, 69(5): 3271–3285.

HtpG protein of *Shigella flexneri* 2a strain 2457T evokes inflammatory response in mice

Xin Bu^{1,2}, Li Zhu², Xiankai Liu², Ge Zhao², Erling Feng², Jingfei Zhang²,
Jing Yuan^{2*}, Hengliang Wang^{2*}

⁽¹⁾College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling 712100, China

⁽²⁾Beijing Institute of Biotechnology, National Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing 100071, China

Abstract: [Objective] To analyze the function of *htpG* of *S. flexneri* 2a 2457T, we constructed an *htpG* deletion mutant and a recovery mutant. [Methods] γ -Red recombination system was used to construct an *htpG* deletion mutant of *S. flexneri* 2a 2457T. In addition, a recover mutant was obtained by introducing a low-copy plasmid containing one copy of *htpG* gene into the deletion mutant. Then, the growth curves of wild-type strain, deletion mutant and recover mutant were measured. Some of biochemical tests were also investigated. Furthermore, the Sereny tests were performed to evaluate the virulence of these strains. [Results] No significant difference were observed among three strains. However, the titers of some inflammatory factors evoked by wild-type strain, deletion mutant and recovery mutant in intraperitoneal injected mice were quite different. [Conclusion] These results suggest that the HtpG protein of *Shigella flexneri* 2a strain 2457T might be involved in the immunopathogenesis.

Keywords: *Shigella flexneri* 2a strain 2457T; HtpG; deletion mutant; inflammatory factor

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470101 and 30700035) and the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB522904)

*Corresponding author. Tel: +86-10-66948836; E-mail: wanghl@nic.bmi.ac.cn; yuanjing6216@163.com

Received: 27 December 2007/ Revised: 18 March 2008