

蛋白质组学技术在幽门螺杆菌研究中的应用

陈 阳, 徐维明

陈阳, 徐维明, 中国医学科学院中国协和医科大学医学生物学研究所
云南省昆明市 650118

项目负责人: 陈阳, 650118, 云南省昆明市, 中国医学科学院中国协和医科大学医学生物学研究所. xuwmm@imbcamcs.com.cn

电话: 0871-8334579 传真: 0871-8335702

收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-12-09

摘要

蛋白质组学是旨在研究蛋白质表达谱和蛋白质与蛋白质之间相互作用的新领域. 他的研究以双向电泳和质谱技术为核心. 其技术为幽门螺杆菌基本生物学特性研究, 探讨致病机制, 寻找保护抗原与研究免疫机制等提供了新的思路和方法.

陈阳, 徐维明. 蛋白质组学技术在幽门螺杆菌研究中的应用. 世界华人消化杂志 2005;13(2):243-245

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/243.asp>

0 引言

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *Hp*) 感染是慢性胃炎和消化性溃疡的主要病因, 与胃腺癌、胃黏膜相关性淋巴样组织恶性淋巴瘤的发生亦密切相关^[1], 世界卫生组织 (WHO) 已将其列为一类致癌因子^[2]. 随着对 *Hp* 生物特性、致病机制以及疫苗等的研究日趋深入, 积极地应用当前不断涌现的新策略与新技术, 将使 *Hp* 的研究更为高效与系统. 蛋白质组学是以蛋白质组为研究对象的新领域, 可分为表达蛋白质组学、结构蛋白质组学和功能蛋白质组学, 旨在研究特定条件下细胞内的蛋白质表达谱, 以及每一种蛋白质的表达水平; 描绘蛋白质在亚细胞水平的分布和空间结构特征; 阐明蛋白质与蛋白质之间的相互作用问题. 蛋白质组学最基本的技术是蛋白质的分离和鉴定, 目前主要包括有双向电泳 (2-DE) 技术^[3]、质谱分析技术^[4-5]与生物信息学技术. 随着双向电泳技术及各种质谱技术的完善以及生物信息学的发展, 蛋白质组学技术已在生命科学诸多领域得到应用. 现就蛋白质组学相关技术在幽门螺杆菌研究中的应用综述如下.

1 在 *Hp* 基本生物特性研究中的应用

1983 年 Warren *et al* 首次发现 *Hp* 后, 人们就对其生物特性进行了不断地研究, 以期阐明其适应胃微环境生长的特殊生理机制、生化代谢途径、基因调控机制及与宿主相互作用过程等.

在 *Hp* 的感染过程中定植是关键, *Hp* 既可以暂时性地暴露在低 pH 值的胃酸环境中, 也能够长期地定植在胃表皮细胞周围的中性 pH 值的微环境下. Slonczewski *et al*^[6] 利用 2-DE 和蛋白质 N 端测序技术对此进行了研究. 通过对

在 pH 值 5.7 和 pH 值 7.5 下培养的 *Hp* 的 2-DE 结果比较, 发现在不同 pH 值下 UreB 和 HspA 始终是 *Hp* 表达最多的蛋白. 虽然 UreB 的表达并非是如前人所述的组成性表达, 但是其表达却和 pH 值的变化存在相关性. 另外还在低 pH 值培养的 *Hp* 中发现哺乳动物脂蛋白 A-I, 这意味着 *Hp* 很有可能利用吸收宿主高密度脂蛋白以利于自身糖脂膜的形成.

在延长培养时间或暴露于大气时, 典型的 *Hp* 会发生球体样的形态变化. 这种球型体有两种类型, 一种较大, 可能是一种退化型, 在传代中不能再生, 另一种是小圆球体, 在透射电镜下可见其细胞电子密度较高, 且具有完整的细胞膜. 他已经被证明至少在 30 d 内对物理和化学因素有一定的耐受性, 且在 4-6 wk 内在适合条件下能重新生长和繁殖. 认识 *Hp* 在不利环境下形态的变化, 或许对了解某些治疗 *Hp* 失败的原因有积极作用. 贾继辉 *et al*^[7] 在研究 *Hp* 由螺杆菌状转变成球形休眠体的相关蛋白时, 就运用双向电泳技术比较螺杆菌状 *Hp* 及其球形休眠体全菌蛋白表达谱, 之后将差异蛋白进行胶内酶切, 将肽混合物用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF-MS) 进行质谱分析, 将肽质量指纹谱数据输入 Mascot 数据库 (<http://www.matrixscience.com>) 和 Peptident 数据库 (<http://www.expasy.ch/tools/peptident.htm>) 进行检索. 结果获得 9 个与 *Hp* 球形休眠体形成相关的蛋白, 即相对分子质量 (M_r) 为 26×10^3 的过氧化物酶、硫氧还蛋白、烯醇酶、黄素氧化还原蛋白、单链 DNA 结合蛋白、翻译起始因子 1、延长因子 P、中性粒细胞激活蛋白和 M_r 为 10×10^3 的热休克蛋白. 该项研究为幽门螺杆菌球形休眠体形成机制的研究提供新的实验依据.

此外, McAtee *et al*^[8] 在对 *Hp* 对甲硝唑 (MTZ) 的耐药性研究中, 应用 2-DE 和质谱分析, 发现了和 *Hp* 耐受 MTZ 相关的蛋白 AHP. Govorun *et al*^[9] 亦应用 2-DE 和 MALDI-MS 对俄罗斯不同地区进行了 *Hp* 菌株分型的基础实验. 蛋白质组学技术已为 *Hp* 的基本生物学研究提供了快速而有效的手段^[10-11].

2 在 *Hp* 致病机制研究中的应用

在全世界范围内 *Hp* 在人群中的定植率高达 50-60%^[12], 且现已明确 *Hp* 与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌和黏膜相关性淋巴样组织 (MALT) 淋巴瘤等消化道疾病密切相关. 在分子层面人们也认识了和 *Hp* 致病相关的尿素酶复合物, 引发一系列宿主机体病变的 Cag 致病岛和诱发空泡产生的空泡毒素等蛋白, 但是在 *Hp* 对宿主黏膜的侵袭,

对炎症细胞的激活及其致癌机制上仍有很多具体问题还困扰着人们. 蛋白质组学技术及其策略有可能会为我们打开另外一扇窗户.

Kimmel *et al*^[13]用幽门螺杆菌 G27 的全菌裂解液进行 2-DE, 之后用 16 例 *Hp* 阳性患者 (其中慢性胃炎患者 6 例, 消化性胃溃疡 5 例, 胃癌 4 例, MALT 淋巴瘤 1 例) 血清, 5 名 *Hp* 阴性健康志愿者的血清逐个进行免疫印迹实验. 对比后发现一共有 29 个和以上疾病相关的蛋白斑点. 对其逐个进行质谱分析, 确定他们在 *Hp* 中所对应的蛋白后, 选出 20 个免疫反应明显的蛋白进行比较, 发现鞭毛蛋白 A (HP0601) 是唯一一个在所有 16 个病例的免疫反应中均呈阳性的蛋白, 而鞭毛钩状相关蛋白 (HP0752) 及分子伴侣 GroEL (HP0010) 和 14 个病例的血清产生反应. 此外, UreB (HP0752), 嗜中性粒细胞激活因子 (HP0243), 过氧化氢还原酶 (HP1563), 铁氧化还原蛋白还原酶 (HP1110), EF-Tu (HP1205), 核糖体蛋白 L7/L12 (HP1199), Omp18 (HP1125) 以及 DnaK 蛋白 (HP0109) 和超过 2/3 病例的阳性血清有反应. 然而值得注意的是 FlaA, UreB, GroEL, EF-Tu 和核糖体蛋白 L7/L12 以及 Omp18 在 *Hp* 阴性的血清中也有低频的免疫反应. 对这些蛋白功能的进一步研究将有望推动人们对 *Hp* 致病机制的认识.

在国内, 李波清 *et al*^[14]在寻找 *Hp* 与胃癌相关蛋白的研究中, 利用 2-DE 分离 *Hp* 的全菌蛋白, 应用 ImageMaster 2 D v3.11 软件对 3 株分离自胃癌患者的 *Hp* 菌株、1 株胃癌动物模型菌株及 9 株分离自非胃癌患者的 *Hp* 菌株的蛋白图谱进行比较, 对目的蛋白进行基质辅助激光解析及电离飞行时间质谱分析, 应用 Mascot 软件进行蛋白搜库, 结果发现 3 种蛋白可能与胃癌相关, 经肽指纹图谱鉴定, 一种为酰基神经氨酸胞苷酰基转移酶, 另两种蛋白在现有的质谱库中无明确匹配蛋白存在. 从而提出酰基神经氨酸胞苷酰基转移酶可能是与胃癌相关的 *Hp* 特异蛋白, 而另两种为新发现的可能与胃癌相关的 *Hp* 特异蛋白, 其相关机制尚待进一步阐明.

3 在 *Hp* 保护性抗原研究中的应用

虽然全菌粗制抗原制成疫苗一直用于疫苗开发与生产, 而且也有研究者使用 *Hp* 全菌裂解液免疫动物后获得了良好的效果, 但使用全菌粗制抗原存在因交叉反应引起的一系列不良反应等问题, 且 *Hp* 是对营养要求较高的微需氧菌, 生长周期长、产量低、易污染、菌种保存不易, 因而以 *Hp* 全菌制备传统的菌苗几乎无可行性.

大多学者认为, 发展基因工程疫苗是较为合理的研究方向, 目前已发现的 *Hp* 抗原虽不下数十种, 但有实验基础并较为认可的保护性抗原并不多, 主要有尿素酶、空泡毒素、某些黏附素、鞭毛蛋白等. 在 *Hp* 编码的一千多个蛋白中还可能存在着其他与 *Hp* 的生存和致病性关系更为密切的蛋白. 这些未知功能的蛋白, 一直还在吸引着研究者不断探索, 蛋白质组学技术及策略也适用于对 *Hp* 保护性抗原的高通量筛选.

在疫苗的开发研究中, 对分泌型蛋白的全面深入地了解有着重要意义. 然而由于目前 *Hp* 的培养大多还需要添加外来血清, 在无血清培养中存在 *Hp* 自溶的现象, 这为 *Hp* 分泌型蛋白的研究带来很大困难. Bumann *et al*^[15]在研究中, 通过优化培养条件, 在基础培养基中完成 HP26695, J99 的培养, 并获得胞外蛋白, 之后将其进行 2-DE 和肽指纹图谱鉴定, 与全细胞 2-DE 结果对比后发现 33 个胞外蛋白, 其中有 26 个为已知蛋白, 包括氧化还原蛋白, 鞭毛蛋白, VacA 的三个已知的片段, 丝氨酸蛋白酶 HtrA, 另外还有 8 种未知功能蛋白 (HP0906, HP0367, HP0175, HP0231, HP1098, HP1173, HP0231, HP1454). 这是在 *Hp* 研究中首次应用蛋白质组学技术对其分泌型蛋白进行全面分析, 该研究为阻断 *Hp* 对宿主地侵袭和寻找潜在保护性抗原提供了新的思路 and 实验依据.

寻找具有良好免疫原性、氨基酸序列保守的膜蛋白, 对于疫苗的研究也有着重要意义. Baik *et al*^[16]在研究中应用 HP26695 作为研究对象, 分离得到肌氨酸所不溶的膜蛋白后, 进行 2-DE 后得到 80 个蛋白斑点, 进行质谱分析和数据库对比后找到可能对应的 35 个膜蛋白基因. 之后再用 300 例 *Hp* 阳性患者血清和 13 名 *Hp* 阴性志愿者血清进行免疫印迹实验, 发现 9 个和阳性血清反应但未和阴性对照反应的 *Hp* 膜蛋白, 其中未知蛋白 (HP1173), FabZ (HP1376), Omp11 (HP0472) Omp14 (HP0671) 和 Omp21 (HP0913) 尚未见相关报道. 这为 *Hp* 膜蛋白的研究和保护性抗原的寻找提供了有力的实验依据.

另外, Jungblut *et al*^[17]对 *Hp* 全细胞裂解物进行 2-DE 分离后进行质谱分析鉴定出 152 个蛋白, 是目前对 *Hp* 蛋白质组较为全面的分析, 其 2-DE 图谱可在 <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/> 获得. 相信随着实验数据的快速丰富和更为有效的数据分析方法的提出, 对 *Hp* 保护性抗原的寻找与筛选效率将得到实质性的提升.

总之蛋白质组学技术被引入 *Hp* 的研究以来, 已将 *Hp* 的生物特性、致病机制、疫苗开发等研究带入了全面系统的层面. 但由于各种条件限制, 目前的研究还着重于应用表达蛋白质组学技术对不同生理病理状况下的 *Hp* 的表达进行分析与比较, 相信随着方法与技术的不断创新与发展, 蛋白质组学技术特别是功能蛋白质组学技术将在 *Hp* 的诊断与治疗、*Hp* 与相关致病机制研究、*Hp* 疫苗的开发等领域发挥独特的不可替代的作用.

4 参考资料

- 1 Lamarque D, Richard MP Jr. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003;8:21-30
- 2 NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. *J Am Med Assoc* 1994;272:65-69
- 3 O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007-4021
- 4 Nakanishi T, Okamoto N, Tanaka K, Shimizu A. Laser desorption time-of-flight mass spectrometric analysis of transferrin precipitated with antiserum: a unique simple method to

- identify molecular weight variants. *Biol Mass Spectrom* 1994; 23:230-233
- 5 Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246:64-71
- 6 Slonczewski JL, McGee DJ, Phillips J, Kirkpatrick C, Mobley HL. pH-dependent protein of *Helicobacter pylori* analyzed by two-dimensional gels. *Helicobacter* 2000;5:240-247
- 7 贾继辉, 陈春燕, 于修平, 郭辉玉, 张茂修, 周亚滨, 赵蔚明, 栾怡, 齐眉. 幽门螺杆菌球形休眠体形成的比较蛋白质组学研究. *中华微生物学和免疫学杂志* 2003;23:288-291
- 8 McAtee CP, Hoffman PS, Berg DE. Identification of differentially regulated proteins in metronidazole resistant *Helicobacter pylori* by proteome techniques. *Proteomics* 2001;1:516-521
- 9 Govorun VM, Moshkovskii SA, Tikhonova OV, Goufman E I, Serebryakova MV, Momynaliev KT, Lokhov PG, Khryapova EV, Kudryavtseva LV, Smirnova OV, Toropyguine YI, Maksimov BI, Archakov AI. Comparative analysis of proteome maps of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Biochemistry* 2003;68:52-60
- 10 Kim N, Weeks DL, Shin JM, Scott DR, Young MK, Sachs G. Proteins released by *Helicobacter pylori* in vitro. *J Bacteriol* 2002; 184:6155-6162
- 11 Bjorkholm B, Salama NR. Genomics of *Helicobacter* 2003. *Helicobacter* 2003;8:1-7
- 12 Parsonnet J. The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1995;9:45-51
- 13 Kimmel B, Bosserhoff A, Frank R, Gross R, Goebel W, Beier D. Identification of immunodominant antigens from *Helicobacter pylori* and evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies. *Infect Immun* 2000;68:915-920
- 14 李波清, 张建中, 邹清华, 何利华, 闫笑梅. 胃癌相关幽门螺杆菌蛋白图谱特征初步分析. *中华流行病学杂志* 2003;24:439-442
- 15 Bumann D, Aksu S, Wendland M, Janek K, Zimny-Arndt U, Sabarth N, Meyer TF, Jungblut PR. Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2002;70:3396-3403
- 16 Baik SC, Kim KM, Song SM, Kim DS, Jun JS, Lee SG, Song JY, Park JU, Kang HL, Lee WK, Cho MJ, Youn HS, Ko GH, Rhee KH. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Helicobacter pylori* strain 26695. *J Bacteriol* 2004;186:949-955
- 17 Jungblut PR, Bumann D, Haas G, Zimny-Arndt U, Holland P, Lamer S, Siejak F, Aebischer A, Meyer TF. Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 2000;36:710-725

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物, 可作为理工科研究生的教学用书或自学教材, 也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

书中全方位地分析和展示了科技写作的技巧与诀窍, 介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求。从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作, 通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则 - 准确(Accuracy)、简洁(Brevity)和清楚(Clarity), 分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写, 举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项, 总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题, 结合实例举证, 从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达, 较为详尽地总结了英文标点符号的使用, 从稿件录排、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系, 综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。

本书论述缜密、案例丰富。为方便读者进一步追溯和研读相关资料, 书中按章节形式标引了参考文献约 220 篇(次)。

编著: 任胜利, 理学博士, 《自然科学进展》责任编辑, 1998 年以来先后在 *Science*, *Nature*, *Scientometrics*, *Learned Publishing*, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学、科技编辑与写作方面的论文 30 余篇。出版: 科学出版社。定价: 28 元 + 2 元(邮费)。邮购地址: 100085, 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社办公室, 北京市海淀区双清路 83 号。联系人: 刘俐, 程宇。联系电话: 010-62327204; 传真: 010-62326921。开户银行: 中国工商银行北京北太平庄支行 开户名: 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社, 帐号: 0200010009200062483。(国家自然科学基金委员会科学基金杂志社 2004-05-20)