

幽门螺杆菌脂蛋白Lpp20的研究进展

刘志杰, 张艳

刘志杰, 张艳, 南华大学病原生物学研究所 湖南省衡阳市 421001

通讯作者: 张艳, 421001, 湖南省衡阳市, 南华大学病原生物学研究所. nhzhangyan@yahoo.com.cn

电话: 0734-8282913

收稿日期: 2006-11-30 接受日期: 2006-12-28

Research progress in the lipoprotein Lpp20 of *Helicobacter pylori*

Zhi-Jie Liu, Yan Zhang

Zhi-Jie Liu, Yan Zhang, Institute of Pathobiology, Nanhua University, Hengyang 421001, Hu'nan Province, China

Correspondence to: Yan Zhang, Institute of Pathobiology, Nanhua University, Hengyang 421001, Hu'nan Province, China. nhzhangyan@yahoo.com.cn

Received: 2006-11-30 Accepted: 2006-12-28

Abstract

Lpp20 is a kind of conserved membrane-associated lipoprotein of *Helicobacter pylori*. It contains typical signal peptide of the bacterial lipoprotein. Recent studies suggested that Lpp20 had represented high immunogenicity and immunoprotection. The purpose of this article is to conclude the current knowledge about the structure, immunogenicity and immunoprotection of Lpp20.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Lipoprotein; Immunoprotection

Liu ZJ, Zhang Y. Research progress in the lipoprotein Lpp20 of *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):729-732

摘要

Lpp20是一种保守的幽门螺杆菌膜相关脂蛋白, 他含有细菌脂蛋白的典型信号肽。近几年研究显示, Lpp20具有良好的免疫原性和免疫保护性。本文即对Lpp20的结构及其免疫原性和免疫保护性的研究进展作一综述。

关键词: 幽门螺杆菌; 脂蛋白; 免疫保护性

刘志杰, 张艳. 幽门螺杆菌脂蛋白Lpp20的研究进展. 世界华人

消化杂志 2007;15(7):729-732

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/729.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H. pylori*)是定植于胃黏膜表面与黏膜层之间的微需氧菌, 自1982年Warren和Marshall首次从患有慢性胃炎患者胃黏膜活检组织中发现*H. pylori*以来, 大量的研究表明他是导致慢性胃炎、胃溃疡和胃癌等胃部疾病的主要致病菌^[1-3], 1994年国际防癌症研究所将*H. pylori*列入第一类致癌原。已证实, 作为许多致病菌主要抗原之一的脂蛋白是一类多样的膜锚定多肽^[4-7]。他是由带有脂蛋白氨基末端信号肽的分泌性前体合成的^[8]。这种信号肽可由被球圆霉素特异性抑制的脂蛋白信号肽酶或信号肽酶II切开, 此酶可以特异地切在酶切位点后带有半胱氨酸残端的预分泌蛋白^[9]。通常成熟脂蛋白的一半脂质插入菌膜的脂质双层中^[10]。翻译后脂质的连接决定了脂蛋白的免疫原性, 而且在没有毒性佐剂的情况下其自身或重组的脂蛋白能够诱导较强的免疫保护性, 这使脂蛋白成为比较理想的疫苗候选抗原。有报道称*H. pylori* CCUG 17874株的HpaA也是一种脂蛋白^[11]。但目前, 对*H. pylori*脂蛋白的研究几乎都基于脂蛋白Lpp20。故本文就*H. pylori*脂蛋白Lpp20的研究现状作一概述。

1 Lpp20的结构特征

Kostrzynska *et al*^[12]用*H. pylori*全菌免疫新西兰兔得到的抗血清采用免疫印迹法分析*H. pylori*抗原, 结果发现一种分子量大约为20 kDa的主要抗原蛋白-Lpp20, 他们也首次研究了Lpp20的分子特征。

Lpp20基因长528 bp, 初始翻译产物有175个氨基酸, 分子量为19 094 Da。开始的21个氨基酸显示了细菌脂蛋白信号肽的典型特征, 他包括一个七氨基酸残基的氨基端带电结构域和一个中心疏水性结构域。Lpp20信号肽的羧基末端区也符合前脂蛋白的相同加工位点, 即细菌

■背景资料

幽门螺杆菌(*H. pylori*)已被证实是慢性胃炎和消化性溃疡的病因之一, 且与胃癌、胃黏膜相关性淋巴样组织(MALT)恶性淋巴瘤的发生密切相关, 已被IARC/WHO定为I类致癌原。*H. pylori*的Lpp20蛋白是定位于细菌外膜上的一种高度保守的脂蛋白, 有研究表明, Lpp20具有良好的免疫原性和免疫保护性, 故Lpp20在*H. pylori*感染的诊断和疫苗开发中有重要价值。

■研发前沿

近年来,国内外对Lpp20的研究主要集中在对其免疫原性和免疫保护性的研究,但此蛋白在致病中所起作用尚未了解。

脂蛋白的一致序列Leu-X-Y-Cys,表明成熟脂蛋白的第一个残基是一个脂化半胱氨酸,也是此蛋白中唯一的半胱氨酸。但*H pylori*的Lpp20中的亮氨酸被异亮氨酸所替代,这一稀有现象的原因尚不清楚。前脂蛋白的相同加工位点的存在,及用SDS-PAGE和分子量光谱测定法测得的*H pylori* Lpp20的大小和由核酸序列推导所得成熟蛋白的分子量的差异都说明了该蛋白存在翻译后的脂化修饰,也就是经过脂蛋白信号肽酶II的加工。为了证明这一点他们用抑制信号肽酶II的球圆霉素处理含有表达Lpp20质粒的大肠杆菌后显示了有未加工蛋白的积聚。但这一过程在*H pylori*中却未能得到证实,他们分析可能是由于球圆霉素不能有效的穿透*H pylori*细胞膜,或信号肽酶II在*H pylori*中含量很高,也可能他本身对球圆霉素有抗性。他们推断其成熟蛋白有154个氨基酸组成,分子量为16 865 Da,含有35.1%的疏水氨基酸,并用Kyte-Doolittle^[13]疏水索引分析其疏水性得分为-6.04。另外, Lpp20蛋白有31.8%的极性, 14.3%的酸性和18.8%的基本氨基酸残基。用Rost和Sander的PHD运算法则,测得成熟脂蛋白包含50.6%的螺旋结构, 17.5%的线性结构和31%的环状结构^[14]。

国内,张荣光 *et al*^[15]利用生物信息学分析了*H pylori*郑州分离株MEL-*H pylori* 27 Lpp20的主要化学特征:其也由175个氨基酸组成,分子量为19 122 Da,等电点为9.95, pH7.0时电荷为9.035, 280 nm摩尔消光系数为12210, 280 nm吸光度为0.639。研究显示, Lpp20在*H pylori*和表达重组Lpp20的大肠杆菌中都表达于菌体表面^[16]。然而Kostrzynska *et al*^[12]却未能证实这一点,可能是由于*H pylori*表面的Lpp20和他们用来免疫兔产生抗Lpp20多抗兔血清的SDS变性蛋白构象不同的原因。*H pylori*在体外培养时, Lpp20还存在于释放到胞外的外膜小泡中^[16], Cao *et al*^[17]也证实肉汤培养*H pylori*时Lpp20可被释放到胞外。有研究显示,当*H pylori*在人胃部生存时,同样有外膜小泡释放于胞外,但Lpp20是否如同体外实验那样存在于外膜小泡中而释放到胞外尚未明确阐明^[18]。为了研究Lpp20对*H pylori*生命力的影响,通过对*H pylori* Lpp20的同源突变,在无Lpp20表达的同源突变株中, *H pylori*的表型特征、正常细胞形态和生长率并未受到影响,这表明Lpp20对*H pylori*的生存能力并不起重要作用^[12]。

2 Lpp20的免疫原性及免疫保护性

用抗*H pylori*兔血清识别*H pylori*全菌蛋白时, Lpp20作为主要抗原之一显示了其良好的免疫原性^[12]。Cao *et al*^[17]用针对*H pylori*肉汤培养基上清的抗血清筛查*H pylori*基因组文库时, Lpp20就是被识别的六种抗原之一。Keenan *et al*^[16]收集肉汤培养基中生长的*H pylori* 60190表面释放的外膜小泡和黏膜佐剂一起口服免疫小鼠后,发现其能够诱导出特异性的血清IgG抗体的产生,对*H pylori* SS1株的攻击能够起到100%的保护作用。免疫印迹分析在外膜小泡中其免疫保护作用的成分是一种分子质量为18 kDa的蛋白,进一步用单克隆抗体分析后,这种具有免疫优势的抗原蛋白就是Lpp20。将能产生针对Lpp20的IgG1杂交瘤细胞回输入已感染*H pylori*小鼠的体内后发现能够显著减少细菌感染数量,证实Lpp20确实是一理想疫苗候选抗原,同时也揭示了血清IgG1在*H pylori*感染中的重要保护作用。随后, Keenan *et al*^[19]又将外膜小泡经鼻内分组免疫小鼠,均可产生抗Lpp20血清IgG抗体。用*H pylori*攻击后显示,细菌减少的数量与血清和胃灌洗液的IgG数量相关。用产生这种抗体的杂交瘤细胞被动免疫小鼠后发现胃灌洗液中的IgG可以起到保护作用,进一步研究发现, *H pylori*感染中血清抗体可以渗出到胃部,并且不影响其抗原结合能力。说明血清抗体在*H pylori*免疫保护机制中的重要作用。他们还发现,当*H pylori*暴露于抗Lpp20 IgG抗体时小鼠胃黏膜有正常的S形*H pylori*聚集现象,然后把*H pylori*置于从杂交瘤小鼠收集到的血清中孵育,随着抗Lpp20 IgG1浓度的增加,也可使细菌的凝集作用增加。在体内,可能通过这种机制从而阻碍其正常的迁移能力,这就使得他们易于通过胃蠕动而被清除。计时免疫标记实验显示随着时间的延长抗Lpp20单抗和*H pylori*的结合也随之减少,提示要使机体对细菌的免疫清除大于免疫逃避就要维持特异性抗体的有效浓度。Keenan *et al*^[20]又以霍乱毒素为佐剂的重组Lpp20和*H pylori*外膜小泡经鼻免疫小鼠和豚鼠。结果表明,这两种疫苗都可以引起小鼠的系统和局部IgG产生,并且可以显著减少感染细菌的数量。然而对于豚鼠,只有外膜小泡可以引起免疫反应,但这些抗体未能起到免疫保护作用。这一研究说明,对于*H pylori*疫苗的研究不仅抗原的选择很关键,而且疫苗形式也很重要。这些研究均表明, Lpp20是*H pylori*的免疫优势抗原,以

佐剂和Lpp20共同免疫动物可以起到免疫保护作用, 并发现IgG在此免疫保护反应中起重要作用. 然而在小鼠和豚鼠实验中的免疫反应差异, 表明在不同动物中起免疫保护作用的疫苗形式也不同. 至于在人体中Lpp20能否起到免疫保护作用尚有待研究.

3 Lpp20与致病性关系

经研究一些脂蛋白在细菌致病性方面起着重要作用^[21-22]. Opazo *et al*^[23]在研究*H pylori*抗原与不同临床表现*H pylori*感染患者的关系时, 发现多在非溃疡性消化不良患者血清中检测到抗Lpp20抗体, 这也是在人体中检测到抗Lpp20抗体的首次报道. 而*H pylori* Lpp20与胃部疾病的具体关系尚不清楚. 据Bakos *et al*^[24]研究推测, 通过菌体Lpp20和皮肤抗原成分的交叉反应, 抗*H pylori* Lpp20 IgG和部分IgA抗体可能会引起机体自身免疫反应, 在慢性荨麻疹的致病性中起一定作用, 但其致病的具体机制尚有待进一步研究.

由于Lpp20的免疫原性好, 特异性强, 有文献报道从人体中检测到的*H pylori* Lpp20蛋白与*H pylori*感染、胃癌以及胃癌高发人群都具有密切相关性^[25-26]. 最近, Li *et al*^[27]又成功制备了针对Lpp20的单克隆抗体, 因此*H pylori* Lpp20可能会成为一种高效的免疫诊断抗原^[28]. 当然其最重要的意义就是在研究疫苗方面的重要作用. Lpp20在所有*H pylori*菌株中均表达^[12,17,29-31], 且免疫筛查*H pylori*相关细菌均无交叉反应^[12,29-30], 再加上如前所述Lpp20有较强的免疫原性及免疫保护性, 使其成为较理想的疫苗候选抗原. 总之, 对*H pylori* Lpp20的致病性研究, 及其在疾病诊断和疫苗研发中的应用研究都有很重要的价值.

4 参考文献

- 1 郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周. 幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1766-1768
- 2 卢启明, 曹萍, 姜瑞, 张岫兰, 张丽萍, 李淑兰, 陈翔, 石丽清, 董桂梅, 周彦萍, 薛群基. 胃癌高发区幽门螺杆菌的家庭感染. 世界华人消化杂志 2005; 13: 118-120
- 3 霍晓辉, 朱振龙, 储建坤, 王志峰, 李超, 张丽静, 马金城, 于君. 幽门螺杆菌感染与胃癌前病变胃内分布的特点. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1992-1994
- 4 Green BA, Quinn-Dey T, Zlotnick GW. Biologic activities of antibody to a peptidoglycan-associated lipoprotein of *Haemophilus influenzae* against multiple clinical isolates of *H. influenzae* type b. *Infect Immun* 1987; 55: 2878-2883
- 5 Anderson BE, Baumstark BR, Bellini WJ. Expression of the gene encoding the 17-kilodalton antigen

- from *Rickettsia rickettsii*: transcription and posttranslational modification. *J Bacteriol* 1988; 170: 4493-4500
- 6 Ma Y, Weis JJ. *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins OspA and OspB possess B-cell mitogenic and cytokine-stimulatory properties. *Infect Immun* 1993; 61: 3843-3853
- 7 Erdile LF, Brandt MA, Warakowski DJ, Westrack GJ, Sadziene A, Barbour AG, Mays JP. Role of attached lipid in immunogenicity of *Borrelia burgdorferi* OspA. *Infect Immun* 1993; 61: 81-90
- 8 Wu HC, Tokunaga M. Biogenesis of lipoproteins in bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* 1986; 125: 127-157
- 9 Dev IK, Harvey RJ, Ray PH. Inhibition of prolipoprotein signal peptidase by globomycin. *J Biol Chem* 1985; 260: 5891-5894
- 10 Hayashi S, Wu HC. Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 1990; 22: 451-471
- 11 O'Toole PW, Janzon L, Doig P, Huang J, Kostrzynska M, Trust TJ. The putative neuraminylactose-binding hemagglutinin HpaA of *Helicobacter pylori* CCUG 17874 is a lipoprotein. *J Bacteriol* 1995; 177: 6049-6057
- 12 Kostrzynska M, O'Toole PW, Taylor DE, Trust TJ. Molecular characterization of a conserved 20-kilodalton membrane-associated lipoprotein antigen of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 1994; 176: 5938-5948
- 13 Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982; 157: 105-132
- 14 Rost B, Sander C. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* 1993; 232: 584-599
- 15 张荣光, 段广才, 范清堂. 利用生物信息学分析幽门螺杆菌Lpp20蛋白的化学和免疫学分子特征. 河南预防医学杂志 2003; 14: 193-195
- 16 Keenan J, Oliaro J, Domigan N, Potter H, Aitken G, Allardyce R, Roake J. Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate. *Infect Immun* 2000; 68: 3337-3343
- 17 Cao P, McClain MS, Forsyth MH, Cover TL. Extracellular release of antigenic proteins by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1998; 66: 2984-2986
- 18 Keenan J, Day T, Neal S, Cook B, Perez-Perez G, Allardyce R, Bagshaw P. A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 182: 259-264
- 19 Keenan J, Neal S, Allardyce R, Roake J. Serum-derived IgG1-mediated immune exclusion as a mechanism of protection against *H. pylori* infection. *Vaccine* 2002; 20: 2981-2988
- 20 Keenan JI, Rijpkema SG, Durrani Z, Roake JA. Differences in immunogenicity and protection in mice and guinea pigs following intranasal immunization with *Helicobacter pylori* outer membrane antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 36: 199-205
- 21 Chanyangam M, Smith AL, Moseley SL, Kuehn M, Jenny P. Contribution of a 28-kilodalton membrane protein to the virulence of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1991; 59: 600-608
- 22 Ma Y, Weis JJ. *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins OspA and OspB possess B-cell mitogenic and cytokine-stimulatory properties.

■应用要点

Lpp20有望成为可应用于临床的一种有效的疫苗抗原和*H pylori*感染的诊断抗原.

■名词解释

外膜小泡: 细菌在生长时由于外膜生长速度超过下层的肽聚糖层, 部分外膜形成小泡从菌体脱落而成.

■同行评价

本文就*H. pylori* Lpp蛋白的有关研究作了综述,内容有一定的新颖性和可读性,是一篇较好的综述。

- Infect Immun* 1993; 61: 3843-3853
- 23 Opazo P, Muller I, Rollan A, Valenzuela P, Yudelevich A, Garcia-de la Guarda R, Urrea S, Venegas A. Serological response to *Helicobacter pylori* recombinant antigens in Chilean infected patients with duodenal ulcer, non-ulcer dyspepsia and gastric cancer. *APMIS* 1999; 107: 1069-1078
- 24 Bakos N, Fekete B, Prohaszka Z, Fust G, Kalabay L. High prevalence of IgG and IgA antibodies to 19-kDa *Helicobacter pylori*-associated lipoprotein in chronic urticaria. *Allergy* 2003; 58: 663-667
- 25 Shiesh SC, Sheu BS, Yang HB, Tsao HJ, Lin XZ. Serologic response to lower-molecular-weight proteins of *H. pylori* is related to clinical outcome of *H. pylori* infection in Taiwan. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 781-788
- 26 Konturek PC, Konturek SJ, Starzyska T, Marlicz K, Bielanski W, Pierzchalski P, Karczewska E, Hartwich A, Rembiasz K, Lawniczak M, Ziemniak W, Hahn EC. *Helicobacter pylori*-gastrin link in MALT lymphoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1311-1318
- 27 Li Y, Ning YS, Hong YH, Liu YC, Luo J, Long M, Dong WQ, Li M. Preparation and identification of monoclonal antibodies against *Helicobacter pylori*. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2006; 26: 425-427
- 28 宁云山, 李妍, 龙敏, 董文其, 李明. 幽门螺杆菌5种候选疫苗抗原基因的克隆、表达及抗原性的鉴定. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2605-2609
- 29 Drouet EB, Denoyel GA, Boude M, Wallano E, Andujar M, de Montclos HP. Characterization of an immunoreactive species-specific 19-kilodalton outer membrane protein from *Helicobacter pylori* by using a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1620-1624
- 30 Keenan JI, Allardyce RA, Bagshaw PF. Dual silver staining to characterise *Helicobacter* spp. outer membrane components. *J Immunol Methods* 1997; 209: 17-24
- 31 Muller I, Medina-Selby A, Palacios JL, Martinez P, Opazo P, Bruce E, Mancilla M, Valenzuela P, Yudelevich A, Venegas A. Cloning and comparison of ten gene sequences of a Chilean *H. pylori* strain with other *H. pylori* strains revealed higher variability for VacA and CagA virulence factors. *Biol Res* 2002; 35: 67-84

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2007 年《世界华人消化杂志》

本刊讯 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》,荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》,俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容:消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。

《世界华人消化杂志》2007年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号 ISSN 1009-3079,国内统一刊号CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期每月8,18,28日,月价72.00,年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址:100023,北京市2345信箱,世界胃肠病学杂志社。联系电话:010-85381901-1020;传真:010-85381893;E-mail: wcjd@wjgnet.com;网址: www.wjgnet.com。