

## 胃癌相关幽门螺杆菌蛋白图谱特征初步分析

李波清 张建中 邹清华 何利华 闫笑梅

**【摘要】** 目的 寻找幽门螺杆菌(*Hp*)与胃癌相关蛋白。方法 利用双向电泳分离 *Hp* 的全菌蛋白,应用 ImageMaster 2D v 3.1 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,其 Mowse 分值为 79,序列覆盖率为 32%,另两种蛋白在现有的质谱库中无明确匹配蛋白存在。结论 酰基神经氨酸胞苷酰基转移酶可能为与胃癌相关的 *Hp* 特异蛋白,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。

**【关键词】** 幽门螺杆菌;胃肿瘤;双向电泳;蛋白图谱分析

**Primary analysis on protein maps of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric carcinoma** LI Bo-qing, ZHANG Jian-zhong, ZOU Qing-hua, HE Li-hua, YAN Xiao-mei. Department of Diagnosis, Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

**【Abstract】 Objective** To identify specific proteins of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) that associated with gastric carcinoma. **Methods** The whole-cell proteins of *H. pylori* were separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE). The protein maps of four *H. pylori* strains associated with gastric carcinoma and nine strains that isolated from patients with non-gastric carcinoma were then compared by ImageMaster 2D v 3.1. MALDI-TOF mass spectrometry was performed to identify the proteins of interest. The proteins were searched by software mascot and identified by peptide fingerprint map. **Results** Three proteins seemed to be associated with gastric carcinoma including acylneuraminate cytidylyltransferase with Mowse score 79 with the sequence coverage of 32%. The other two had no unambiguous protein to match. **Conclusion** Acylneuraminate cytidylyltransferase seemed to be a specific *H. pylori* protein associated with the presence of gastric carcinoma. Other two were novel proteins that might be associated with gastric carcinoma. However, the mechanism needs to be explored.

**【Key words】** *Helicobacter pylori*; Stomach neoplasms; Two-dimensional electrophoresis; Analysis of protein map

为开发有效控制幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *Hp*)感染的抗生素和疫苗,阐明其与胃癌的确切关系,以及为开展胃癌与 *Hp* 感染的分子流行病学调查打下基础,有必要对其生物学特征作进一步深入研究分析。*Hp* 已有 3 个菌株(26695、J99、SS1)的全基因组序列被测出,其资源的利用加深了对 *Hp* 生物学特征和它与宿主相互作用的理解。然而,很多开放读码框架还缺少实验性验证,并且 *Hp* 各菌株在基因水平上存在较大差异,而蛋白组学方法可同时多种蛋白同时进行平行分析,是开展功

能基因组学研究有效的工具。双向电泳(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2-DE)和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析是当今通用的蛋白组学研究方法。*Hp* 的蛋白组学研究在很多国家已广泛开展,至今,应用 2-DE 已成功分离了 *Hp* 的 1 800 多种蛋白,其中的 200 多种已被鉴定,而在国内这一研究才刚刚起步。本研究对 4 株胃癌相关 *Hp* 菌株及 9 株分离自非胃癌患者的 *Hp* 菌株的 2-DE 图谱进行了比较分析,并对其中 3 种可能为胃癌相关 *Hp* 的特有蛋白进行了 MALDI-TOF-MS 分析。

基金项目:国家高技术研究发展计划“863”计划资助项目(2001AA21516102)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病诊断室

通讯作者:张建中 E-mail: helico@public.bta.cn

## 材料与amp;方法

1. *Hp* 菌株来源:胃癌相关 *Hp* 菌株 TN-2(已成功利用此菌株在蒙古沙鼠中诱导出胃腺癌)

CAPMN62、CAPMN111、Zhou183 和非胃癌 Hp 菌株 CAPMN93、RM1、RM3、RM4、RM5、RM7、RM8、YN1-18、YN1-16 全部由本室保存(表 1)。

表1 Hp 菌株分离情况

编号	分离地区	菌株背景
TN2	日本	胃癌动物模型菌株
CAPMN62	北京	胃癌患者
CAPMN111	北京	胃癌患者
Zhou183	浙江	胃癌患者
CAPMN93	北京	十二指肠溃疡、胃炎患者
RM1	北京	慢性胃炎患者
RM3	北京	慢性胃炎患者
RM4	北京	慢性胃炎患者
RM5	北京	慢性胃炎患者
RM7	北京	慢性胃炎患者
RM8	北京	慢性胃炎患者
YN1-18	云南	慢性胃炎患者
YN1-16	云南	慢性胃炎患者

2. 试剂 :IPG 干胶条(24 cm, pH 3~10)、CHAPS、尿素、二硫苏糖醇(DTT)、甘油、IPG 缓冲液、覆盖油、溴酚蓝、银染试剂盒(以上试剂均购自 Amersham Biosciences)、胰蛋白酶(Sigma)、碘乙酰胺(Fluka)、硫脲(Sigma)、PMSF(Amersco)、低熔点琼脂糖(Promega)、正丁醇(北京化工厂)、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、丙酮、三氯醋酸、考马斯亮蓝 G-250、考马斯亮蓝 R-250、ZipTip18(Millipore)、 $\alpha$ -氰-4-羟基肉桂酸(CCA)。

3. 仪器 :等电聚焦电泳仪(IPGphor)、垂直电泳仪(Ettan DALT II)、扫描仪(Amersham Biosciences)、酶标仪(MR 710 Microplate, Dynatech)、超声波破碎仪(Vibro cell)、冷冻离心机(HITACHI)、厌氧培养箱(浙江省义乌冷冻机厂)、Reflex III 质谱仪(Bruker)。

4. Hp 菌株培养 :各菌株接种于 8% 绵羊血哥伦比亚琼脂平板上,置于厌氧培养箱,在混合气体(5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>、85% N<sub>2</sub>)中 37℃ 培养 72 h。

5. 丙酮干粉全菌蛋白样品制备<sup>[1]</sup> :以无菌操作分别刮取 4 块平皿的 Hp 放于生理盐水中,用冷冻离心机 2 000 g 4℃ 离心 10 min,去上清后用生理盐水洗 1 次。将菌块打开,加入 5 ml 0.2% DTT、20% TCA 丙酮溶液,置 -20℃ 冰箱过夜。冷冻离心机 2 000 g 4℃ 离心 10 min,去上清后加入 5 ml 0.2% DTT 丙酮溶液,置 -20℃ 冰箱 30 min,2 000 g 4℃ 离心 10 min,去上清后置 -20℃ 冰箱 1 h,转 -80℃ 深低温冰箱 4 h,真空冷冻干燥。加入 0.5 ml 样品裂解液 1 h 后,12 000 g 4℃ 离心 10 min,取上清,每管 100  $\mu$ l 分装,-

80℃ 深低温冰箱保存备用。

6. 蛋白样品定量 :用 Bradford 法<sup>[2]</sup>。

7. 双向电泳 :

(1) 等电聚焦(IEF)<sup>[3,4]</sup> :① 加样 :分别于加样器中加入 240  $\mu$ g 全菌蛋白样品,再加溶胀液至 450  $\mu$ l,各加样器中分别加入 3 ml 覆盖油。② IEF :把加样器平行放于等电聚焦电泳仪(IPGphor)上,在 20℃ 聚焦 90 000 Vh 左右。

(2) 平衡 :IEF 结束后,分别取 10 ml 平衡储存液 2 份,各加入 100 mg DTT 和 480 mg 碘乙酰胺,将干胶条浸入其中依次振荡平衡 15 min。

(3) SDS-PAGE :将平衡后的干胶条转至 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶上,加 0.5% 低熔点琼脂糖封好。电泳至溴酚蓝移至离下界面约 5 mm 处时停止电泳。

8. 银染 :按试剂盒说明书进行。用于分析型凝胶显色。

9. 考马斯亮蓝染色<sup>[5]</sup> :用于制备型凝胶显色。

10. 图像扫描、分析 :图像经扫描数字化后应用 ImageMaster 2D v 3.1(Amersham Biosciences 产品)图像分析软件进行分析。

11. MALDI-TOF-MS<sup>[3,6]</sup> :将蛋白斑点精确切下后分别置于 0.25 ml 硅烷化的离心管中,加入 0.1 mmol/L 的 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>、50% 乙腈 100  $\mu$ l 室温振荡 45 min,重复 2 次,直至胶粒脱至无色,去上清,冷冻干燥。加入 10  $\mu$ l 10 mmol/L DTT、40 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液,56℃ 1 h,去上清,加入等体积 55 mmol/L 碘乙酰胺、40 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液,于暗处不断摇动 45 min,去上清,冷冻干燥。加入 5  $\mu$ l 胰蛋白酶(20  $\mu$ g/ml),再加 5  $\mu$ l 40 mmol/L 的 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液,将胶粒碾碎,4℃ 30 min,加入 10  $\mu$ l 40 mmol/L 的 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液,37℃ 16 h,将上清转入另一离心管中,再在原管中加入 100  $\mu$ l 60% 乙腈、0.1% 三氟乙酸,冰浴超声 5 min,合并上清,冷冻干燥,用 5  $\mu$ l 0.1% 三氟乙酸溶解酶解产物,经 ZipTip18 脱盐后,0.5  $\mu$ l 样品加 0.5  $\mu$ l CCA 混合后,做 MALDI-TOF。

12. 蛋白质系列数据库检索 :利用 Mascot 软件等将 MALDI-TOF-MS 所测各蛋白点质量指纹谱数据在互联网上的蛋白质数据库(<http://www.matrixscience.com> 和 <http://www.expasy.ch/tools/peptide.htm> 等)进行搜索。

## 结 果

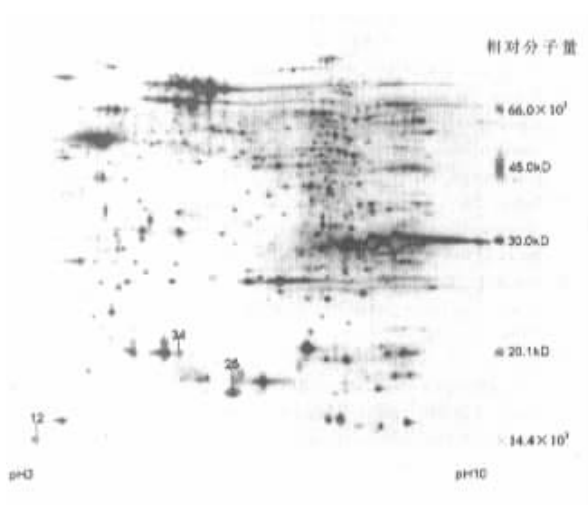
1. Hp 菌株蛋白在各实验菌株中的分布 :经 2-DE

ImageMaster 分析 ,12、25、34 蛋白位点可能为胃癌相关 Hp 菌株的特有蛋白 ,他们在各菌株中的分布情况见表 2。

表2 12、25、34 蛋白位点在各 Hp 菌株中的分布情况

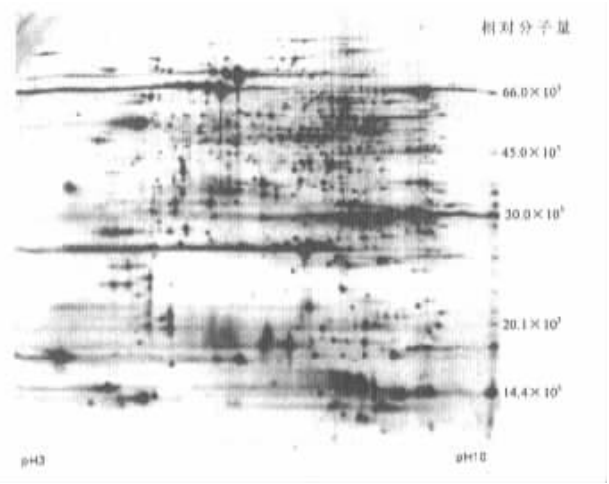
菌株	蛋白位点		
	12	25	34
TN2	+	+	+
CAPMN62	+	-	+
CAPMN111	+	+	+
Zhou183	+	-	-
CAPMN93	+	-	-
RM1	-	-	-
RM3	-	+	-
RM4	-	-	-
RM5	-	+	-
RM7	+	-	-
RM8	-	+	-
YN1-18	-	-	-
YN1-16	+	-	-

2. Hp 菌株蛋白谱分析 :本项实验所用的 13 个 Hp 菌株的 2-DE 蛋白基本相同 相似率在 90%左右 ,这说明 Hp 各菌株虽然在基因组水平上差异较大 ,但它们在蛋白质组水平上却差异较小。胃癌菌株 CAPMN62 和非胃癌菌株 RM3 的 2-DE 图谱见图 1 , 2。



第一向 IEF 应用 24 cm ,pH3 ~ 10 非线性干胶条 ;第二向应用 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶(银染)

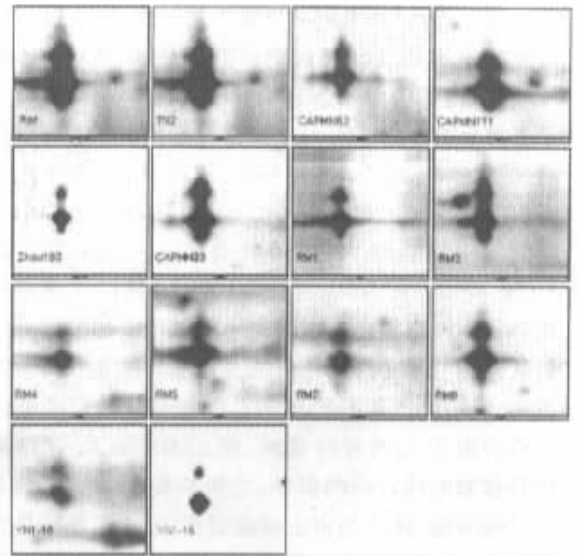
图1 胃癌菌株 CAPMN62 的 2-DE 图谱



电泳条件同图 1(银染)

图2 非胃癌菌株 RM3 的 2-DE 图像

3. 各实验菌株 34 位点蛋白的 montage 图像 :结果见图 3。



Ref :参考胶 ;TN2、CAPMN62、CAPMN111 :胃癌相关 Hp 菌株 ;CAPMN93、RM1、RM3、RM4、RM5、RM7、RM8、YN1-18 :非胃癌 Hp 菌株

图3 各实验菌株 34 蛋白位点的 montage 图像

4. 肽指纹图谱鉴定结果 经肽指纹图谱鉴定 ,12 与 34 位点无明确匹配蛋白。25 位点 MALDI-TOF-MS 结果见图 4。经 Mascot 搜库 ,25 位点为酰基神经氨酸苷酰基转移酶 ,其 Mowse 分值为 79 ,序列覆盖率为 32% ,氨基酸序列为(黑体序列为匹配序列):

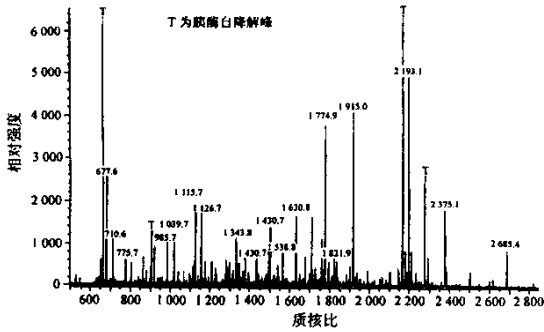


图4 25 蛋白位点的肽指纹图谱

## 讨 论

Hp 作为胃癌发生的重要生物学因子,已被大量的流行病学调查和实验室研究所证实,WHO 已将其列为致癌物。但 Hp 感染导致胃癌发生的确切分子生物学机制仍不明确。很多地区的 Hp 感染率很高,但胃癌的发病率却并不高,并且 Hp 感染在世界各地的型别也不相同,对这一现象,有的研究提出胃癌的发生与感染 Hp 的菌型别有关。Segal 等<sup>[7]</sup>及 Stefan 等<sup>[8]</sup>的研究认为细胞毒素相关蛋白 A 的磷酸化与胃癌密切相关。本研究中所鉴定出的酰基神经氨酸胞苷酰基转移酶很可能为胃癌相关的 Hp 特有蛋白,它催化三磷酸胞苷和乙酰神经氨酸反应形成一磷酸胞苷-乙酰神经氨酸,而 CMP-NeuAc 是唾液酸转移酶的核糖的供体,它可以使细菌脂多糖末端带唾液酸,使之与宿主细胞表面的 N-乙酰基乳糖胺结合,这对细菌致病性是很重要的。而慢性萎缩性胃炎和胃癌患者群体的胃上皮细胞表面具有含唾液酸表位配体的受体<sup>[9]</sup>,这也揭示胃癌的发生不只与感染 Hp 的菌型有关,同时也与被感染个体的基因型有关。另外,酰基神经氨酸胞苷酰基转移酶也可能会修饰细菌的鞭毛蛋白,而鞭毛蛋白是很多细菌的黏附因子,这样也会改变细菌的致病能力。12 和 34 位点未能在蛋白库中找到相应蛋白,为两种新的相关蛋白成分,由于这些蛋白在胃癌菌株和非胃癌患者来源菌株间的分布存在明显差异,对其进一步分析可能对 Hp 与胃癌相关性研究、特定菌株的识别和相关人群流行病学工作的开展有重要意义。

本实验中发现的 Hp 胃癌菌株相关蛋白还有待进行深入的功能验证。对于两种尚未明确的新蛋白可通过末端分析等进行进一步确认。

本研究结果表明,蛋白质组研究在 Hp 研究领域有广泛的应用前景,由于采用了多株菌间的蛋白质组比较,以及在此基础之上的对目标蛋白的快速质谱分析,绕过了对蛋白研究中传统的建库筛选和克隆表达工作,效率明显提高;由于直接面向蛋白质中的差异蛋白(特定功能相关蛋白)进行分析,研究的成功率较高。相信此类研究方法在 Hp 的致病性研究、耐药菌株分析、菌株代谢分析、特定状态下的菌株分析等多个领域具有广泛的应用前景,也必将带动对 Hp 的深入研究。

## 参 考 文 献

- 1 Angelika G, Christian O, Gunther B, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized Hp gradient. Electrophoresis, 2000, 21: 1037-1053.
- 2 Marshak DR, Kadonaga JT, Burgess RR, et al. 蛋白质纯化与鉴定实验指南. 朱厚础,译. 北京: 科学出版社, 2000. 158-159.
- 3 Thomas L, Jorgen B, Carol N, et al. Use of an affinity proteomics approach for the identification of low-abundant bacterial adhesins as applied on the Lewis<sup>b</sup>-binding adhesin of *Helicobacter pylori*. FEBS, 2000, 469: 155-158.
- 4 Helena E, Thomas A, Anna S, et al. Clustering of clinical strains of *Helicobacter pylori* analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7: 301-306.
- 5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1996. 885-886.
- 6 Brigitte K, Armin B, Rainer F, et al. 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.
- 7 Segal ED, Cha J, Lo J, et al. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. PNAS, 1999, 96: 14559-14564.
- 8 Stefan O, Jurgen P, Bettina S, et al. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science, 2000, 286: 1497-1500.
- 9 Ritta M, Janaki L, Jung D, et al. Colonization of germ-free transgenic mice with genotyped *Helicobacter pylori* strains from a case-control study of gastric cancer reveals a correlation between host responses and HsdS components of type I restriction-modification systems. JBC (in press, 2002).

(收稿日期: 2003-03-24)

(本文编辑: 段江娟)