

空肠弯曲菌 *Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139* 基因对比研究

李鑫 李震中 白欣立 刘慧 赵子春 刘卫卫 高爱民 邢丛丛 李春岩

【摘要】 目的 了解吉兰-巴雷综合征 (GBS) 相关空肠弯曲菌 (*C. jejuni*) 的 *Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139* 基因序列特征, 并同 GenBank 中的非 GBS 相关 *C. jejuni* 菌株对应序列进行比较, 找出可能使 *C. jejuni* 菌株具有致 GBS 能力的碱基突变。方法 选取分离自 GBS 患者粪便并经动物模型证实为致 GBS 的 AMAN 型 *C. jejuni* 3 株进行培养并提取基因组 DNA 测序。将基因测序结果与 NCTC11168 菌株进行对照比较, 寻找此 3 株 *C. jejuni* 的 *Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139* 基因突变位点, 并计算此 3 株致 GBS *C. jejuni* 的 *Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139* 基因序列间的遗传距离。结果 3 株致 GBS *C. jejuni* 菌株的 *Cj1136* 基因由 1173 个碱基构成; *Cj1138* 基因由 1170 个碱基构成; *Cj1139* 基因由 912 个碱基构成, 与 NCTC11168 的 *Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139* 基因序列相比, 此 3 株致 GBS *C. jejuni* 中只有 *Cj1138* 存在 2 个相同的碱基突变。遗传距离计算, 3 株致 GBS *C. jejuni* 的 *Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139* 基因之间最大遗传距离为 2.1%。结论 与 NCTC11168 相比 GBS 相关 *C. jejuni* 中 *Cj1138* 基因序列存在相同碱基突变, 这些碱基突变可能与 *C. jejuni* 致 GBS 能力的改变相关。该 3 株致 GBS *C. jejuni* 的 *Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139* 基因遗传距离较小, 反映河北地区致 GBS 的 *C. jejuni* 在进化上存在聚类现象, 具有一定的区域特征。

【关键词】 吉兰-巴雷综合征; 空肠弯曲菌; 基因; 序列分析

Comparison of *Cj1136*, *Cj1138* and *Cj1139* genes among *Campylobacter jejuni* strains Li Xin*, Li Zhen-zhong, Bai Xin-li, Liu Hui, Zhao Zi-chun, Liu Wei-wei, Gao Ai-min, Xing Cong-cong, Li Chun-yan. *Department of Neurology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding author: Li Zhen-zhong, Email: johndoctor@126.com

【Abstract】 **Objective** By sequenceing the *Cj1136*, *Cj1138* and *Cj1139* gene of *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) strains associated with Guillain-Barré Syndrome (GBS), features of *Cj1136*, *Cj1138* and *Cj1139* gene were studied. Results were compared with the *C. jejuni* strain NCTC11168, to find the mutations in sequence of *C. jejuni* which inducing GBS and their polygenetic relationship was analyzed. **Methods** Three GBS-associated *C. jejuni* strains were isolated from stools of GBS patients from Hebei province who had been diagnosed as clinical AMAN pattern and electrophysiological tests were performed. After distilling and sequencing *Cj1136*, *Cj1138* and *Cj1139* genes, results were spliced and assembled into a complete sequence by the terminals overlapped with each other. Sequences of *Cj1136*, *Cj1138* and *Cj1139* genes were compared with NCTC11168, to find the mutations and gene feature. **Results** The *Cj1136*, *Cj1138* and *Cj1139* gene of the three GBS-associated *C. jejuni* strains were composed by 1173 base pairs, 1170 base pairs, 912 base pairs respectively. The alignment with the related sequence of NCTC11168 showed that there were two same mutations in the *Cj1138* gene of the three *C. jejuni* stains. Data from phylogenetic analysis demonstrated that the three *C. jejuni* strains were genetically closed to NCTC11168, with the biggest phylogenetic distance between the three of them as 2.1%. **Conclusion** When compared with NCTC11168 the *Cj1138* gene of the three GBS-associated *C. jejuni* strains had the same mutations which might be related to the development of GBS. Relation between the variation and GBS-pathogenesis remained to be confirmed. The mutations found in the three *C. jejuni* strains established the foundation for exploring the biological characteristics of GBS-associated *C. jejuni* strains and demonstrated that the GBS-associated *C. jejuni* strains of Hebei province having its regional features.

【Key words】 Guillain-Barré syndrome; *Campylobacter jejuni*; Gene; Nucleotide sequence analysis

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.08.016

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划(2006AA02A237); 国家自然科学基金(30471919)

作者单位: 050000 石家庄, 河北医科大学第二医院神经内科(李鑫、李震中、赵子春、刘卫卫、高爱民、邢丛丛、李春岩), 儿科(白欣立); 中国医学科学院北京协和医院神经内科(刘慧)

通信作者: 李震中, Email: johndoctor@126.com

空肠弯曲菌 (*C. jejuni*) 是引起急性胃肠炎主要肠道病原菌之一, 近年的研究发现, *C. jejuni* 还是吉兰-巴雷综合征 (Guillain-Barré syndrome, GBS) 最常见的前驱感染病原, 尤其在中国和日本等亚洲国家, 42% ~ 76% 的患者血清中该菌特异性抗体滴度增高^[1]。GBS 是一种脱髓鞘性周围神经病, 部分发生于 *C. jejuni* 感染后^[2]。大量研究结果表明, GBS 相关和 GBS 无关两类 *C. jejuni* 全菌基因及蛋白质谱之间存在较明显差异^[3-5], GBS 相关 *C. jejuni* 感染后引起的细菌脂寡糖 (LOS) 与周围神经中神经节苷脂的交叉免疫反应可能是 GBS 的发病机制^[6]。自从 2000 年英国 Sanger 中心发表分离自腹泻患者的 NCTC11168 菌株全基因组序列以来^[7], 已发表 5 株非致 GBS 的 *C. jejuni* 全基因组序列。研究发现 LOS 编码区的变异极其活跃, 这种变异能够使细菌逃避宿主的免疫反应, 但由于 LOS 结构的变化, 同时也导致菌株致 GBS 能力的改变^[8]。Cj1136、Cj1138、Cj1139 三基因共同参与指导 *C. jejuni* 合成半乳糖基转移酶, 是 LOS 合成的重要酶分子。Godschalk 等^[9] 利用 htAFLP 证明与 LOS 合成相关的 Cj1136、Cj1138、Cj1139 基因与 GBS 的发生有明显关联。本研究对 3 株致 AMAN 型 GBS 的 *C. jejuni* 菌株 Cj1136、Cj1138、Cj1139 基因进行扩增及测序, 通过与已知 *C. jejuni* 菌株的相应序列进行对比及分析, 寻找碱基突变, 观察其序列特征, 计算遗传距离并分析其致 GBS 的可能性。

材料与方法

1. 菌株来源和培养: 选取分离自 GBS 患者粪便标本的 3 株 *C. jejuni* (由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所鉴定), 并经美国疾病预防控制中心鉴定血清型, 其分别为 penner O:2 型 qiaoyuntao 株, penner O:5 型 zhanxing 株, penner O:19 型 lulei 株。*C. jejuni* 菌株已经鸡、兔等动物模型证实为 GBS 的 AMAN 型致病菌株。

取 *C. jejuni* 专用 CM0739 培养基 (英国 Oxid 公司), 按说明书制备固体培养基。将菌株接种于 CM0739 固体培养基, 置于厌氧培养箱中, 在 37℃ 微需氧条件下培养, 传代 48 ~ 72 h 收菌。

2. 基因组 DNA 制备: 应用 Promega 公司的 Wizard 基因提取试剂盒 (包括核裂解液、蛋白沉淀液、DNA 溶解液) 按照试剂盒说明提取 *C. jejuni* 基因组 DNA。

3. 序列测定: 将此 3 株致 GBS *C. jejuni* 菌株的基

因组 DNA 送至深圳华大基因研究院测序。

4. 序列对比和进化聚类分析: 通过 Sequence Alignment 软件以 NCTC11168 为对照寻找此 3 株致 GBS *C. jejuni* 的 Cj1136、Cj1138、Cj1139 基因存在的碱基突变, 并应用 MEGA Version 4 软件将对应的基因序列分别做序列比对, 两两两对比时空位罚分为 15, 空位延伸罚分为 6.66 计算得到序列间的遗传距离。

结 果

1. 菌株基因测序: qiaoyuntao、zhanxing、lulei 3 株致 GBS *C. jejuni* 菌株的 Cj1136 基因由 1173 个碱基构成, Cj1138 基因由 1170 个碱基构成, Cj1139 基因由 912 个碱基构成。与 NCTC11168 的 Cj1136 基因序列相比, qiaoyuntao 株共有 10 个碱基突变, zhanxing 株共有 10 个碱基突变, lulei 株无碱基突变。其中 qiaoyuntao 株与 zhanxing 株相同碱基突变有 9 个: 1070300 C→T, 1072304 A→G, 1070320 T→C, 1070323 A→T, 1070344 T→C, 1070675 G→A, 1070677 G→A, 1070678 T→C, 1071217T→C。与 NCTC11168 的 Cj1138 基因序列相比, qiaoyuntao 株共有 2 个碱基突变; zhanxing 株共有 4 个碱基突变; lulei 株共有 4 个碱基突变。其中 3 株致病菌相同碱基突变有 2 个: 1072913 C→T, 1072931 A→T, 此 2 个碱基参与编码的氨基酸也发生相同改变: 159 位 T (苏氨酸)→I (异亮氨酸), 165 位 Y (酪氨酸)→F (苯丙氨酸)。与 NCTC11168 的 Cj1139 基因序列相比, qiaoyuntao 株共有 2 个碱基突变; zhanxing 株共有 2 个碱基突变; lulei 株无碱基突变。qiaoyuntao 株与 zhanxing 株碱基突变相同, 即 1074297 A→C, 1074298 G→A。

2. 遗传距离计算: 用 MEGA Version 4 软件计算此 3 株致 GBS *C. jejuni* 菌株 Cj1136、Cj1138、Cj1139 基因彼此间遗传距离。Cj1136 基因: qiaoyuntao 株与 zhanxing 株、lulei 株遗传距离分别为 0.4% 和 2.1%, zhanxing 株和 lulei 株遗传距离为 1.7%。Cj1138 基因: 3 者间遗传距离为 0%。Cj1139 基因: qiaoyuntao 株与 zhanxing 株遗传距离为 0%, 此 2 株与 zhanxing 株遗传距离均为 0.6%。

讨 论

C. jejuni 是引起腹泻的主要细菌之一, 全球每年由该菌感染导致的腹泻可达四五亿例^[10], 其导致的消化道感染亦有较高的发病率和死亡率。美国每年由 *C. jejuni* 所致腹泻病例超过 200 万, 其中约有 2000

例死亡^[11]。自2000年*C. jejuni* NCTC11168菌株的全基因组序列完成以来,现已有5株*C. jejuni*的全基因组序列发表在GenBank中。*C. jejuni*菌株致GBS的分子生物学基础是细菌表面的LOS糖链部分与机体周围神经中的神经节苷脂结构相似,从而引起交叉免疫反应,导致神经损伤^[6]。*Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139*基因参与编码指导合成的半乳糖基转移酶是LOS合成的重要酶分子^[7]。

本试验通过对3株从GBS患者粪便中分离得到的*C. jejuni*菌株*Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139*基因的测序、序列对比及进化遗传距离的研究,获得3株致GBS的*C. jejuni*菌株*Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139*基因序列特征及可能致GBS的基因基础。3株致GBS*C. jejuni*菌株及NCTC11168均存在*Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139*基因,这提示*Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139*蛋白的表达差异并非由于在GBS相关或非GBS相关*C. jejuni*中的*Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139*基因缺失所致,可能是基因在转录或翻译过程中某个环节导致基因的表达产物出现差别。*qiaoyuntao*、*zhanxing*及*lulei*3株致GBS*C. jejuni*的*Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139*基因的完整序列与非GBS相关NCTC11168*Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139*基因序列相比较,只有*Cj1138*基因存在2个相同碱基突变:1072913 C→T、1072931 A→T,且导致2个对应的相同氨基酸突变:159位T(苏氨酸)→I(异亮氨酸)、165位Y(酪氨酸)→F(苯丙氨酸)。苏氨酸与酪氨酸均为极性中性氨基酸其R基团有亲水性和极性,但仅极弱地解离;异亮氨酸和苯丙氨酸为非极性疏水性氨基酸其R基团不带电荷,为疏水性氨基酸。突变前后氨基酸的R基团极性及亲、疏水性的改变这必然导致其所参与的蛋白质即半乳糖基转移酶的二、三级结构的改变,这些改变很有可能造成半乳糖基转移酶功能、活性或其底物结合能力的改变,进而使半乳糖基转移酶参与编码的LOS结构具有与周围神经中神经节苷脂结构相似性,进而有了引起交叉免疫反应的可能性,使菌株获得致GBS的能力。*qiaoyuntao*、*zhanxing*、*lulei*3株致GBS*C. jejuni*菌株的*Cj1136*、*Cj1138*、*Cj1139*基因序列遗传距离的计算结果说明河北地区的致GBS的*C. jejuni*在进化上存在聚类现象,具有一定的区域特征性。

综上所述,在*C. jejuni*致GBS过程中*Cj1138*基因突变发挥着重要作用,它调节及指导合成的半乳糖基转移酶参与LOS合成,使LOS具有产生与周围神经中的神经节苷脂相类似结构的可能性,进而诱

发交叉免疫反应。*C. jejuni*具有致GBS能力很可能为多基因变异参与的结果,*Cj1138*基因突变是其中一个环节。今后将在试验中进一步验证*Cj1138*基因突变后指导合成的半乳糖基转移酶的活性和功能改变并探索其他*C. jejuni*基因变异与致GBS能力改变之间的关系,以明确*C. jejuni*致GBS的发病机制及分子基础,并为*C. jejuni*疫苗的研发提供理论指导。

参 考 文 献

- [1] 蔡方成, 钟敏. 吉兰-巴雷综合征的研究进展. 实用儿科临床杂志, 2006, 21: 729-731.
- [2] Barzegar M, Alizadeh A, Toopchizadeh V, et al. Association of *Campylobacter jejuni* infection and Guillain Barré syndrome: a cohort study in the northwest of Iran. Turk J Pediatr, 2008, 50 (5): 443-448.
- [3] 田新英, 张建中, 李春岩, 等. 吉兰-巴雷综合征相关空肠弯曲菌的蛋白质谱特征分析. 中华流行病学杂志, 2004, 25: 240-244.
- [4] 刘慧, 李震中, 张军峰, 等. 格林-巴利综合征空肠弯曲菌的*wla*基因簇序列对比研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2008, 28: 400-401.
- [5] 田新英, 李春岩, 曾得, 等. 吉兰-巴雷综合征相关空肠弯曲菌WLAX基因序列分析. 基础医学与临床杂志, 2006, 26: 823-826.
- [6] Godschalk PC, Kuijff ML, Li J, et al. Structural characterization of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide outer cores associated with Guillain-Barré and Miller Fisher syndromes. Infect Immun, 2007, 75: 1245-1254.
- [7] Parkhill J, Wren BW, Mungall K, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. Nature, 2000, 403: 665-668.
- [8] Godschalk PC, Heikema AP, Gilbert M, et al. The crucial role of *Campylobacter jejuni* genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barré syndrome. J Clin Invest, 2004, 114: 1659-1665.
- [9] Godschalk PC, Bergman MP, Raymond FJ, et al. Identification of DNA sequence variation in *Campylobacter jejuni* strains associated with the Guillain-Barré syndrome by high-throughput AFLP analysis. BMC Microbiology, 2006, 6: 32.
- [10] Friedman CR, Neimann J, Wegener HC, et al. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. Washington DC: ASM Press, 2000: 121-138.
- [11] Sails AD, Swaminathan B, Fields PI. Utility of multilocus sequence typing as an epidemiological tool for investigation of outbreaks of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4733-4739.

(收稿日期: 2009-02-15)

(本文编辑: 张林东)