

问号钩端螺旋体主要外膜蛋白免疫功能表位及其致炎作用的研究

徐丽慧¹, 严 杰¹, 阮 萍², 毛亚飞¹

(1. 浙江大学医学院 病原生物学教研室, 浙江 杭州 310031; 2. 绍兴文理学院医学院, 浙江 绍兴 312000)

[摘 要] 目的: 了解问号钩端螺旋体(简称钩体)主要外膜蛋白 OmpL1、LipL32 和 LipL41 免疫功能表位及其致炎作用。方法: 建立 Ni-NTA 亲和层析法, 提取不同基因型表达的目的重组蛋白 rOmpL1/1 和 OmpL1/2、LipL32/1 和 rLipL32/2、LipL41/1 和 rLipL41/2。采用 SDS-PAGE 检测上述目的重组蛋白的表达情况和提取物纯度。分别采用 Signal P3.0 预测服务器 Signal P-NN 软件、Propred MHC class-Ⅱ binding peptide prediction-ProPred 预测服务器 EMBOSS 软件, 对上述蛋白的信号肽、MHC-Ⅱ 类分子结合肽和 B 细胞表位进行分析。以人脐静脉内皮细胞株 EVC-304 为效应细胞, 采用 ELISA 检测上述目的重组蛋白诱导人脐静脉内皮细胞 EVC-304 分泌 IL-1、IL-8 和 TNF-α 的作用。结果: 在 IPTG 诱导下, 所构建的原核表达系统可有效表达 rOmpL1/1 和 rOmpL1/2、rLipL32/1 和 rLipL32/2、rLipL41/1 和 rLipL41/2, 其产量分别约占细菌总蛋白的 30% 和 15%、40% 和 35%、15% 和 10%。提纯后的目的重组蛋白 SDS-PAGE 后均仅见单一的蛋白条带。OmpL1s、LipL32/1 和 LipL32/2、LipL41s 的信号肽分别位于 N 端 1-24、1-21 和 1-24、1-24 位氨基酸残基。OmpL1s、LipL32s 和 LipL41s 分别有 2、2 和 1 个相同的主要 MHC-Ⅱ 结合肽和 B 细胞表位, 其中 OmpL1/2 另有 1 个主要 MHC-Ⅱ 等位基因结合肽和 B 细胞表位(59-78)。不同浓度的 OmpL1s、LipL32s 和 LipL41s 均可明显促进人静脉内皮细胞株 EVC-304 合成并分泌 IL-1α、IL-8 和 TNF-α($P<0.05$)。其中 IL-1α 水平以作用 24 h 时最高, 然后下降; IL-8 和 TNF-α 水平则作用 48 h 高于 24 h。结论: 问号钩体 *ompL1/1*、*lipL32* 或 *lipL41* 不同基因型的表达产物均存在相似的 MHC-Ⅱ 类分子结合肽和 B 细胞表位。rOmpL1/1 和 OmpL1/2、LipL32/1 和 rLipL32/2、LipL41/1 和 rLipL41/2 对 EVC-304 细胞均有直接的致炎作用。

[关键词] 钩端螺旋体, 问号/致病力; 细菌外膜蛋白/致病力; 免疫显性表位/分析; 细胞因子
[中图分类号] R 377; R 514.4 [文献标识码] A [文章编号] 1008-9292(2005)01-0009-06

Immune-functional epitopes and inflammation-inducing effects of the major outer envelope proteins of *Leptospira interrogans*

XU Li-hui¹, YAN Jie¹, RUAN Ping², et al (1. Department of Medical Microbiology and Parasitology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; 2. Department of Medical Microbiology and Parasitology, Medical School of Shaoxing University, Shaoxing 312000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the immune-functional epitopes and inflammation-inducing effects of the major outer envelope proteins of *Leptospira interrogans*. **Methods:** Ni-NTA affinity chromatography was established to extract the target recombinant proteins rOmpL1/1 and OmpL1/2, LipL32/1 and rLipL32/2, LipL41/1 and rLipL41/2 expressed by the different genotypes. By using Signal P-NN software in Signal P3.0 prediction server, EMBOSS software in propred MHC class-Ⅱ binding peptide prediction-ProPred prediction server, the possible signal peptides, MHC-Ⅱ binding peptides and lymphocyte B epitopes were analyzed. The IL-1, IL-8 and TNF-α

收稿日期: 2004-09-20 修回日期: 2004-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(39970678)。

作者简介: 徐丽慧(1981—), 女, 硕士生, 主要从事医学微生物学的研究工作。

通讯作者: 严 杰(1956—), 男, 博士, 教授, 博导, 主要从事细菌分子和细胞致病机制、基因工程疫苗及微生物相关药物的研究;

E-mail: yanchen@mail.hz.zj.cn.

secretion in human umbilical vein endothelial cell line EVC-304 induced by target recombinant proteins were measured by ELISA. **Results:** Under the inducement of IPTG, the constructed prokaryotic systems efficiently expressed rOmpL1/1 and rOmpL1/2, rLipL32/1 and rLipL32/2, and rLipL41/1 and rLipL41/2 with outputs of 30% and 15%, 40% and 35%, and 15% and 10% of the total bacterial proteins, respectively. Each of the purified target recombinant proteins showed a single protein band in SDS-PAGE. The signal peptides of OmpL1s, LipL32/1 and LipL32/2, and LipL41s were located at the N ends of 1-24, 1-21 and 1-24, and 1-24 amino acid residuals, respectively. OmpL1s, LipL32s and LipL41s displayed 2, 2 and 1 same major epitopes of MHC-Ⅱ binding peptides and lymphocyte B and OmpL1/2 had another one (59-78). The different dosages of rOmpL1s, rLipL32s and rLipL41s increased the secretion of IL-1 α , IL-8 and TNF- α ($P < 0.05$) in EVC-304 cells. The IL-1 α levels reached the highest at the 24 h and then declined, while the IL-8 and TNF- α levels after 48 h treatment were higher than those after 24 h. **Conclusion:** The expression products in *ompL1/1*, *lipL32* or *lipL41* genotypes of *L. interrogans* contain similar immune functional epitopes. rOmpL1/1 and rOmpL1/2, rLipL32/1 and rLipL32/2, and rLipL41/1 and rLipL41/2 are able to directly induce inflammatory reaction in EVC-304 cells.

[Key words] *Leptospira interrogans*/pathogen; Bacterial outer membrane proteins/pathogen; Immunodominant/anal; Cytokines

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2005, 34(1): 9-14.]

钩端螺旋体(简称钩体)病是由问号钩体感染引起的自然疫源性人兽共患传染病。钩体病发病机制至今不明,目前使用的钩体全菌疫苗副作用较大,交叉免疫保护作用微弱^[1]。近年我国科学家报道了问号钩体黄疸出血群赖型菌株的全基因序列^[2],国外学者报告跨膜蛋白 OmpL1、脂蛋白 LipL32 和 LipL41 是所有问号钩体外膜中主要的表面蛋白^[3~6]。我们曾证实我国流行的问号钩体参考标准株均含有编码上述外膜蛋白的 *ompL1*、*lipL32* 和 *lipL41* 基因,其重组表达产物具有良好的抗原性和免疫反应性^[7~9]。然而,OmpL1、LipL32 和 LipL41 可能的抗原表位,及其诱导细胞分泌炎性细胞因子的作用尚未见报道。为此,本研究建立了 Ni-NTA 亲和层析法,并提取了不同基因型表达的重组目的蛋白(rOmpL1/1 和 rOmpL1/2、rLipL32/1 和 rLipL32/2、rLipL41/1 和 rLipL41/2),以 SDS-PAGE 鉴定表达产物,采用多种预测服务器对表达产物分子的功能表位进行了分析,并以人脐静脉内皮细胞株 EVC-304 为效应细胞,检测了上述重组蛋白诱导细胞分泌炎性细胞因子的作用。

1 材料与方法

1.1 菌株和细胞株 问号钩体 *ompL1/1* 和

ompL1/2、*lipL32/1* 和 *lipL32/2*、*lipL41/1* 和 *lipL41/2* 基因型原核表达系统由本实验室提供^[7~9]。人脐静脉内皮细胞株 EVC-304 购自中国科学院上海细胞生物研究所,培养基为含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640。

1.2 目的蛋白的表达和鉴定 将上述工程菌株接种于 BL 培养基中,30℃ 300 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8,加入 0.25 mmol/L IPTG,30℃ 300 r/min 振荡培养约 4 h,诱导细菌表达目的重组蛋白。10 000 r/min 离心 15 min 收集细菌沉淀,用灭菌蒸馏水重悬,300 V、5 s×5 超声破碎。利用表达产物中 6×His 标签,以 Ni-NTA 亲和层析柱(Biocolor)收集并纯化目的蛋白。采用 10% SDS-PAGE 检测目的蛋白表达和提纯情况^[10]。

1.3 信号肽、MHC-Ⅱ 类分子结合肽和 B 细胞表位分析 蛋白质一级序列由本实验室提供^[7~9]。信号肽分析采用 Technical university of Denmark dtu 提供的预测服务器 Signal P 3.0 版本 Signal P-NN 软件,MHC-Ⅱ 类分子结合肽和 B 细胞表位分析分别采用 Institute of Microbial Toechnology, Chandigarh, India 提供的预测服务器 Propred MHC class-Ⅱ binding peptide prediction-ProPred 和

EMBOSS 软件包中 ANTIGENIC 程序。

1.4 炎性细胞因子的检测 在 96 孔细胞培养板中每孔加入 5×10^3 个 EVC-304 细胞,在 5% CO_2 、37℃ 条件下预培养 24 h。分别用 2% 胎牛血清 RPMI 1640 配制的不同浓度 rOmpL1/1 和 OmpL1/2、LipL32/1 和 rLipL32/2、LipL41/1 和 rLipL41/2 溶液换液,使上述 6 种重组蛋白的终浓度分别为每孔 1 μg 和 10 μg ,各重组蛋白的不同作用浓度均设置 3 个复孔。培养板于 5% CO_2 、37℃ 条件下分别培养 24 h 和 48 h。收集上清液,用 ELISA 检测试剂盒(TPI)按操作说明书分别检测 IL-1 α 、IL-8 和 TNF- α 的 OD₄₉₀ 值。试验中分别以每孔 0.1 μg 的重组 TNF- α 商品(SibEnzyme)和 2% 胎牛血清的 RPMI 1640 为阳性对照和阴性对照。根据试剂盒所提供的 IL-1 α 、IL-8 和 TNF α 标准品及操作说明书,以 OD₄₉₀ 值为纵坐标、各细胞因子标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线,并用 Excel 软件获得各细胞因子浓度计算公式。

1.5 数据分析 采用 SPSS 9.0 软件,以 OmpL1/1 和 OmpL1/2、LipL32/1 和 LipL32/2、LipL41/1 和 LipL41/2 诱导 EVC-304 细胞分泌炎性细胞因子的检测结果与对照阴性组进

行方差分析,各基因的不同基因型的组间比较采用 q 检验。

2 结 果

2.1 信号肽序列及切割位点 OmpL1s、LipL32s 和 LipL41s 的 N 端 1—21 或 1—24 位氨基酸构成信号肽,切割位点在 N 端的第 21—22 或 24—25 位(表 1)。

表 1 OmpL1s、LipL32s 和 LipL41s 的信号肽分析结果
Table 1 Analysis results of the signal peptides of OmpL1s, LipL32s and LipL41s

Proteins	Signal peptide positions	Cutting sites	Amino acid residuals
OmpL1/1	1—24	24—25	LSA-KT
OmpL1/2	1—24	24—25	LSA-KT
LipL32/1	1—21	21—22	ACG-AF
LipL32/2	1—24	24—25	AFG-GL
LipL41/1	1—21	21—22	NCA-AT
LipL41/2	1—21	21—22	NCA-AT

2.2 MHC-Ⅱ 类分子结合肽和 B 细胞表位 OmpL1s、LipL32s 和 LipL41s 能与半数以上目前已知的 51 个 MHC-Ⅱ 等位基因结合,其结合肽段分别有 3、3 和 1 个,但同时与 B 细胞结合的重叠表位分别为 3、2 和 1 个(表 2)。

表 2 OmpL1s、LipL32s 和 LipL41s 的 MHC-Ⅱ 类分子结合肽和 B 细胞表位分析结果
Table 2 Analysis results of the MHC-Ⅱ binding peptides and lymphocyte B epitopes of OmpL1s, LipL32s and LipL41s

Proteins	MHC-Ⅱ binding peptides	B cell epitopes	Scores	Complex positions	Sequences
OmpL1s	175—191	173—186	2.0207	173—191	SSI * VIP # ATVGI * KLNVTEDA
	297—320	297—315	1.7702	297—320	L * SPFPAY # PIVVGGQIY * RFGYKHEL
OmpL1/2	59— 67	64— 78	1.6114	59— 78	V * RSSNTCTVGPSDP # ACFQNP
LipL32s	206—218	202—216	2.1293	202—218	KKLLV * R # GLY * RISFTTYK
	81—103	79— 93	2.0483	79—103	AYY * LY * # VW * IPAV * IAEMGV * RMISPTGE
LipL41s	181—194	183—195	1.8829	181—195	V * RMMLI * PL # DATLIKV

* :the former residual possibly anchoring MHC-Ⅱ ; # :the former residual possibly binding lymphocyte B

2.3 目的蛋白的表达产量及产物纯度 SDS-PAGE 检测结果表明,rOmpL1/1 和 rOmpL1/2、rLipL32/1 和 rLipL32/2、rLipL41/1 和 rLipL41/2 的表达产量分别约占细菌总蛋白的 30%和 15%、40%和 35%、15%和 10%,经 Ni-NTA 亲和层析法提取的目的蛋白 SDS-PAGE

后均仅见单一的蛋白条带(图 1)。

2.4 OmpL1s、LipL32s 和 LipL41s 诱导内皮细胞分泌炎性细胞因子的作用 IL-1 α 、IL-8 和 TNF- α 浓度计算公式分别为 $Y_{\text{IL-1}\alpha} = 46.51X - 6.32$; $Y_{\text{IL-8}} = 42.46 X - 3.50$; $Y_{\text{TNF-}\alpha} = 362.64 X - 24.79$ 。1 μg 和 10 μg 的 OmpL1s、LipL32s

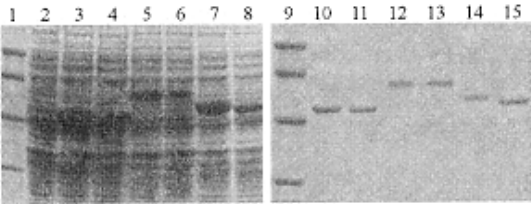


图 1 OmpL1s、LipL32s 和 LipL41s 的表达产量和提取物纯度

Fig. 1 Expression outputs and extract purities of OmpL1s, LipL32s and LipL41s

1 and 9: the markers with molecular weights of 97.4, 66.2, 43.0 and 31.0 KD from up to down; 2: pET32a without the target inserted fragments; 3 and 8: the expressed rLipL32/1 and rLipL32/2, rLipL41/1 and rLipL41/2, and rOmpL1/1 and rOmpL1/2, respectively; 10 and 15: the purified rLipL32/1 and rLipL32/2, rLipL41/1 and rLipL41/2, and rOmpL1/1 and rOmpL1/2 by Ni-NTA affinity chromatography, respectively

表 3 rOmpL1s 诱导人脐静脉内皮细胞 EVC-304 炎症细胞因子的合成和分泌

Table 3 Synthesis and secretion of inflammatory factors of human umbilical vein endothelial cell ECV-304 induced by rOmpL1s

Groups	Dosages (μg)	Duration (h)	Levels of cytokines (pg/ml)		
			IL-1α	IL-8	TNF-α
rOmpL1/1	1.0	24	22.52±4.36*△	15.61±2.43*△	152.90±24.96*△
		48	16.47±2.69*△	18.16±4.98*△	185.54±28.79*△
	10.0	24	24.84±5.56*△	12.64±2.33*△	167.41±37.90*△
		48	21.59±4.68*△	17.73±3.55*△	207.30±48.59*△
rOmpL1/2	1.0	24	21.12±5.01*	14.76±3.09*	142.02±21.61*
		48	14.61±3.25*	19.00±3.94*	174.66±31.76*
	10.0	24	22.52±4.72*	13.91±4.07*	152.90±37.45*
		48	19.26±3.85*	20.28±5.43*	189.17±44.89*
TNF-α	0.1	24	21.12±6.09*	16.46±3.50*	192.79±61.05*
		48	16.01±3.33*	23.25±5.91*	236.31±72.21*
2%FBS1640		24	1.59±0.47	4.99±1.00	58.62±20.39
		48	2.52±0.66	4.14±1.15	62.24±18.15

vs 2%FBS1640, * $P<0.05$; vs rOmpL1/2, △ $P>0.05$

表 4 rLipL32s 诱导人脐静脉内皮细胞 EVC-304 炎症细胞因子的合成和分泌

Table 4 Synthesis and secretion of inflammatory factors of human umbilical vein endothelial cell ECV-304 induced by rLipL32s

Groups	Dosages (μg)	Duration (h)	Levels of cytokines (pg/ml)		
			IL-1α	IL-8	TNF-α
rLipL32/1	1.0	24	11.35±2.09*△	12.75±2.55*△	105.76±14.69*△
		48	8.56±1.61*△	13.48±3.71*△	138.40±27.68*△
	10.0	24	12.95±3.11*△	12.21±2.64*△	116.64±32.90*△
		48	9.96±2.56*△	16.46±4.20*△	134.77±36.76*△
rLipL32/2	1.0	24	9.96±2.28*	12.75±3.28*	94.88±17.25*
		48	8.10±2.09*	15.18±3.80*	149.28±31.10*
	10.0	24	11.82±3.03*	11.79±2.62*	113.01±26.77*
		48	9.96±3.13*	17.73±4.61*	145.65±43.39*
TNF-α	0.1	24	21.12±6.09*	16.46±3.50*	192.79±61.05*
		48	16.01±3.33*	23.25±5.91*	236.31±72.21*
2%FBS1640		24	1.59±0.47	4.99±1.00	58.62±20.39
		48	2.52±0.66	4.14±1.15	62.24±18.15

vs 2%FBS1640, * $P<0.05$; vs rLipL32/2, △ $P>0.05$

和 LipL41s 均可明显促进人静脉内皮细胞株 EVC-304 合成并分泌 IL-1α、IL-8 和 TNF-α($P<0.05$),且同一基因不同基因型表达产物作用效果相似($P>0.05$)。其中 IL-1α 以作用 24 h 时最高,然后下降;IL-8 和 TNF-α 则 48 h 的作用高于 24 h。在上述不同基因产物中,诱导细胞分泌炎症细胞因子活性强弱依次为 OmpL1s、LipL41s 和 LipL32s,见表 3~表 5。

3 讨 论

众所周知,不同国家和地区流行的问号钩体血清群、型有明显差异^[1]。业已证实,我国流行的问号钩体血清群均有 *ompL1*、*lipL32* 和 *lipL41* 基因,但有 *ompL1*/1 ~ *ompL1*/3、*lipL32*/1 和 *lipL32*/2、*lipL41*/1 ~ *lipL41*/3 不

表 5 rLipL41s 诱导人脐静脉内皮细胞 EVC-304 炎性细胞因子的合成和分泌

Table 5 Synthesis and secretion of inflammatory factors of human umbilical vein endothelial cell ECV-304 induced by rLipL41s

($\bar{x}\pm s, n=3$)

Groups	Dosages (μg)	Duration (h)	Levels of cytokines (pg/ml)		
			IL-1 α	IL-8	TNF- α
rLipL41/1	1. 0	24	21. 12 $\pm$ 5. 37 * Δ	12. 63 $\pm$ 2. 99 * Δ	138. 40 $\pm$ 30. 76 * Δ
		48	14. 61 $\pm$ 3. 57 * Δ	17. 31 $\pm$ 4. 24 * Δ	163. 78 $\pm$ 40. 95 * Δ
	10. 0	24	27. 87 $\pm$ 6. 84 * Δ	15. 18 $\pm$ 3. 80 * Δ	131. 15 $\pm$ 33. 55 * Δ
		48	22. 98 $\pm$ 5. 11 * Δ	19. 85 $\pm$ 3. 61 * Δ	185. 54 $\pm$ 44. 79 * Δ
rLipL41/2	1. 0	24	19. 73 $\pm$ 4. 23 *	12. 64 $\pm$ 2. 66 *	116. 64 $\pm$ 26. 92 *
		48	15. 54 $\pm$ 3. 64 *	18. 16 $\pm$ 4. 98 *	145. 65 $\pm$ 30. 99 *
	10. 0	24	24. 84 $\pm$ 5. 93 *	15. 61 $\pm$ 3. 47 *	138. 39 $\pm$ 33. 83 *
		48	17. 86 $\pm$ 4. 12 *	19. 01 $\pm$ 5. 74 *	171. 04 $\pm$ 41. 18 *
TNF- α	0. 1	24	21. 12 $\pm$ 6. 09 *	16. 46 $\pm$ 3. 50 *	192. 79 $\pm$ 61. 05 *
		48	16. 01 $\pm$ 3. 33 *	23. 25 $\pm$ 5. 91 *	236. 31 $\pm$ 72. 21 *
2%FBS1640		24	1. 59 $\pm$ 0. 47	4. 99 $\pm$ 1. 00	58. 62 $\pm$ 20. 39
		48	2. 52 $\pm$ 0. 66	4. 14 $\pm$ 1. 15	62. 24 $\pm$ 18. 15

vs 2%FBS1640, * $P<0. 05$;vs rLipL41/2, $\Delta P>0. 05$

同基因型^[7~9]。ompL1/1 和 ompL1/2、lipL32/1 和 lipL32/2、lipL41/1 和 lipL41/2 几乎涵盖了我国所有人群中流行的问号钩体血清群,主要在由动物携带的爪哇、拜伦、塔拉索夫、明尼群含有 ompL1/3 基因型, lipL41/3 基因型仅见于明尼群中。因此,我们选择 rOmpL1/1 和 OmpL1/2、LipL32/1 和 rLipL32/2、LipL41/1 和 rLipL41/2 进行实验研究。

实验结果显示,我们以往构建的 ompL1/1 和 ompL1/2、lipL32/1 和 lipL32/2、lipL41/1 和 lipL41/2 基因型原核表达系统能有效地表达目的重组蛋白 rOmpL1/1 和 OmpL1/2、LipL32/1 和 rLipL32/2、LipL41/1 和 rLipL41/2,其产量分别约占细菌总蛋白的 30%和 15%、40%和 35%、15%和 10%。所建立的 Ni-NTA 亲和层析法可快速获得高纯度的上述目的重组蛋白。

MHC-Ⅱ类分子在启动特异性免疫应答中起重要作用,但因其等位基因众多,是导致不同个体之间特异性免疫力及对传染病易感性差异的主要遗传学原因。MHC-Ⅱ等位基因结合肽和 B 细胞表位研究将在免疫反应机制、疫苗研制中起重要作用,因而是近年国际上免疫学研究热点之一^[11]。采用现代计算机抗原表位预测系统,有助于快速、直观地确定可能的关键性抗

原肽,在国外已成为抗原研究的常用生物信息学手段^[12,13]。我们的分析结果显示,尽管我国流行的问号钩体血清群中存在 ompL1、lipL32 和 lipL41 不同基因型,但所表达的 OmpL1s、LipL32s 和 LipL41s 分别有 2、2 和 1 个相同的主要 MHC-Ⅱ等位基因结合肽和 B 细胞表位;OmpL1/2 则另有 1 个主要 MHC-Ⅱ等位基因结合肽和 B 细胞表位(59—78),可能与 ompL1 基因型之间的核苷酸和氨基酸序列差异明显大于 lipL32 和 lipL41 基因型有关。上述结果为今后问号钩体属特异性抗原的免疫机制和分枝肽疫苗研究奠定了良好的基础。

病原微生物代谢产物对人非吞噬性细胞直接致炎作用是近年细菌致病机制研究的热点之一^[14,15]。众所周知,IL-1 α 和 TNF- α 是具有代表性的炎性细胞因子,IL-8 则是中性粒细胞最为有效的趋化因子。目前已知,炎症反应初期可出现一过性中性粒细胞微静脉内皮细胞的黏附,此过程对增高微血管内皮通透性、中性粒细胞穿越内皮移行至感染部位至关重要。此外,微静脉内皮细胞还可分泌炎性细胞因子,因而静脉内皮细胞是最为常用的致炎因子效应细胞。我们的实验结果表明,1 和 10 μg 的 OmpL1s、LipL32s 和 LipL41s 均可明显促进人静脉内皮细胞株 EVC-304 合成并分泌 IL-1 α 、IL-8 和

TNF- α ($P < 0.05$), 同一基因不同基因型表达产物致炎效果相近 ($P > 0.05$); 其中 IL-1 α 以作用早期 (24 h) 时最高, 然后下降; IL-8 和 TNF- α 则作用时间长的高于时间短的。因此, 问号钩体 *ompL1*、*lipL32* 和 *lipL41* 基因的表达产物对 EVC-304 细胞有直接的致炎作用, 与问号钩体感染时诱导细胞分泌炎性因子、中性粒细胞趋化等炎症反应密切相关。

References:

[1] FAINE S, ADLER B, BOLIN C. *Leptospira* and leptospirosis [M]. 2 nd edition, Melbourne: MediSci, 1999.

[2] REN S X, FU G, JIANG X G, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing [J]. *Nature*, 2003, 422(6934): 888—893.

[3] HAAKE D A, CHAMPION C I, MARFINICH C, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding ompL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp [J]. *J Bacteriol*, 1993, 175(13): 4 225—4 234.

[4] SHANG E S, SUMMERS T A, HAAKE D A, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic leptospira species [J]. *Infect Immun*, 1996, 64(6): 2 322—2 326.

[5] HAAKE D A, CHAO G, ZUEMER R L, et al. The leptospiral major membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(4): 2 276—2 285.

[6] HAAKE D A, SUCHARD M A, KELLEY M M, et al. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer [J]. *J Bacteriology*, 2004, 186(9): 2 818—2 128.

[7] XU Yang, YAN Jie, MAO Ya-fei, et al (徐 颢, 严 杰, 毛亚飞, 等). Genotypes of the ompL1 gene from the dominant serogroups of *Leptospira interrogans* in China and construction of prokaryotic expression system of the gene and immunological identification of the recombinant protein [J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* (中华微生物学和免疫学杂志), 2004, 24(6): 439—444. (in Chinese)

[8] FAN Xin-li, YAN Jie and MAO Ya-fei, et al (范欣丽, 严杰, 毛亚飞, 等). Genotypes of the LipL32 gene from the dominant serogroups of *Leptospira interrogans* in China and construction of the expression system of the gene and immunological identificaion of the recombiant proteins [J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* (中华微生物学和免疫学杂志), 2004, 24(2): 92—97. (in Chinese)

[9] DING Wei, YAN Jie, MAO Ya-fei (丁 威, 严 杰, 毛亚飞). Genotyping of LipL41 genes from *Leptospira interrogans* serogroups and immunological identification of the expression products [J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* (中华微生物学和免疫学杂志), 2004, 24(11): 859—865. (in Chinese)

[10] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 2 nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[11] OLIVE C, CLAIR T, YARWOOD P, et al. Protection of mice from group A streptococcal infection by intranasal immunization with a peptide vaccine that contains a conserved M protein Lymphocyte B epitopes and lack a T cell autoepitope [J]. *Vaccine*, 2002, 20(21-22): 2 816—2 825.

[12] SINGH H, RAGHAVA G P S. Propred: Prediction of HLA-DR binding sites [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17(12): 1 236—1 237.

[13] AL-ATTIYAH R, MUSTAFA A S. Computer-assisted prediction of HLA-DR binding and experimental analysis for human promiscuous Th1-cell peptides in the 24 kDa secreted lipoprotein (LppX) of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Scand J Immunol*, 2004, 59(1): 16—24.

[14] TANAHASHI T, KITA M, KODAMA T, et al. Cytokine expression and production by purified *Helicobacter pylori* urease in human gastric epithelial cells [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(2): 664—671.

[15] INNOCENTI M, THORESON A C, FERRERO R L, et al. *Helicobacter pylori*-induced activation of human endothelial cells [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(8): 4 581—4 590.

[责任编辑 黄晓花]