

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200326138

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

铜绿假单胞菌外膜耐药和保护原
功能蛋白组学的研究

Functional Proteomic on Antibiotic Resistance and Protective
Immunogen of *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Proteins

章喻军

指导教师: 彭宣宪 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2007年6月8日

论文答辩时间: 2007年7月20日

学位授予日期: 2007年 月 日

答辩委员会主席: 李祺福教授

评 阅 人: _____

2007年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目 录

摘要	III
Arstract	IV
1 前言	1
1.1 革兰氏阴性菌	1
1.2 蛋白质组学研究	10
1.3 铜绿假单胞菌	14
1.4 本实验的研究内容与意义	24
2 材料与方法	25
2.1 材料	25
2.2 方法	30
3 结果与讨论	36
3.1 铜绿假单胞菌外膜蛋白解剖图谱的建立	36
3.2 铜绿假单胞菌外膜蛋白耐药性研究	42
3.3 铜绿假单胞菌外膜蛋白免疫原性研究	53
小结	73
展望	73
参考文献	74
附图	85
致谢	89

Table of Content

Abstract (in Chinese)	III
Abstract (in English)	IV
1 introduction	1
1.1 Gram-negative bacteria	1
1.2 Proteomics	10
1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
1.4 Research content of the thesis	24
2 Materials and methods	25
2.1 Materials	25
2.2 Methods	30
3 Results and discussion	36
3.1 The establishment of 2-DE profile of <i>P. aeruginosa</i> outer membrane proteins	36
3.2 Proteomic analysis on outer membrane proteins of <i>P.aeruginosa</i> antibiotic-resistant strains	42
3.3 Immuno-proteomic analysis on outer membrane proteins of <i>P. aeruginosa</i>	53
Conclusion	73
Expectation	73
References	74
Appendix	85
Acknowledgments	89

摘 要

铜绿假单胞菌是人类的机会致病菌, 极少感染健康个体, 但对免疫缺陷者, 如烧伤、艾滋病、癌症或囊性纤维化等患者则有较高的感染率。铜绿假单胞菌具有内在的耐药性, 该菌的耐药机制以及相关疫苗的开发一直以来都备受研究人员的重视。

本文运用蛋白质组学特别是免疫蛋白质组学的方法对铜绿假单胞菌的外膜蛋白进行了研究, 对其进行分离和鉴定, 在此基础上分析了耐药株外膜蛋白的表达变化以及铜绿假单胞菌外膜免疫原性蛋白。

首先, 我们用月桂酰肌氨酸钠的方法提取了铜绿假单胞菌的外膜蛋白, 对其进行了 2-DE, 并通过质谱分析鉴定了其中 26 个外膜蛋白, 构建了铜绿假单胞菌外膜蛋白的分子表达图谱, 为下一步的研究奠定了基础。

然后, 通过药物选择获得铜绿假单胞菌 5 种不同药物的耐药株, 进而对耐药株的外膜蛋白质组进行系统比较, 共鉴定出 8 种耐药相关外膜蛋白质, 包括红霉素耐药株 1 种, 氯霉素和巴洛沙星耐药株各有 2 种, 头孢曲松钠耐药株有 4 种, 氨苄青霉素耐药株有 5 种。在这 8 种变化的蛋白质中, OprD 为铜绿假单胞菌对氯霉素、氨苄青霉素、头孢曲松钠及巴洛沙星共同变化的蛋白质, OprF、OmpH1、MexA 是铜绿假单胞菌对氨苄青霉素和头孢曲松钠共同变化的蛋白质。这种耐药性研究的方法和规模在国内外尚未见报道。

最后, 我们应用免疫蛋白质组学的方法, 即双向电泳与 Western blot 相结合, 继之于 MALDI-TOF-MS 分析的方法, 发现了铜绿假单胞菌外膜蛋白中的 8 个免疫原性蛋白质。在对这 8 个蛋白进行克隆表达及纯化后, 进行小鼠免疫和攻毒实验, 发现了其中 3 个免疫保护作用较好, 可望作为铜绿假单胞菌潜在的疫苗候选靶位。

关键词: 铜绿假单胞菌; 外膜蛋白; 蛋白质组学

Abstract

Pseudomonas aeruginosa, an environmentally versatile bacterium, is an opportunistic human pathogen, infecting healthy individuals rarely, but immunocompromised patients, like burn victims, AIDS-, cancer- or cystic fibrosis-patients at increased risk. This bacterium is high intrinsic resistant to most antibiotics. Thus the understanding of the resistant mechanisms and the development of vaccines are of importance in control of *P. aeruginosa*.

This paper investigated the outer membrane proteins (OMPs) of *P. aeruginosa* by proteomic approach, especially immuno-proteomics. On the basis of the establishment of *P. aeruginosa* 2-DE map, we studied the OMPs expression difference of antibiotic-resistant strains and the immunogenic OMPs.

First, we extracted the *P. aeruginosa* OMPs by sodium lauroyl sarcosine and identified 26 OMPs with the use of 2-DE and PMF methods. This molecular expressional profile of *P. aeruginosa* OMPs provided useful data for further studies.

Then, we gained five *P. aeruginosa* antibiotic-resistance strains by antibiotic selection. Using the method of comparative proteomics, we found eight proteins with relate to the resistances, in which one is for erythromycin-resistance strain, two separately for chloramphenicol- and balofloxacin-resistance strains, four and five for ceftriaxone- and ampicillin- resistance, respectively.

Furthermore, we screened eight immunogens of *P. aeruginosa* OMPs by immuno-proteomics. Then the eight immunogen genes were cloned, expressed and their recombined immunogens were used to immunize the mice. Three highly protective immunogens were achieved by challenging with *P. aeruginosa* to these immunized mice.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*; outer membrane protein; proteomics

1 前言

1.1 革兰氏阴性菌

细菌是微生物的一个重要类群,是多种单细胞、结构简单的原核生物的总称。这个类群的生物通过革兰氏染色可初步分成革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌两大类,两者在细胞壁结构上存在极大的差异。

致病性细菌种类繁多,细菌性疾病涉及的感染对象广泛,所导致的疾病类型多种多样。许多与人类健康和生产相关的重要病原菌都属于革兰氏阴性细菌,如能引起肠道疾病的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 及其各类型致病株、诱发伤口感染的条件致病菌铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、传染病霍乱的病原体霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 和鼠疫的病原体鼠疫杆菌 (*Yersinia pestis*), 引发痢疾常见的志贺氏痢疾杆菌 (*Shigella. dysenteriae*) 以及水产养殖上引起病害的大部分病原菌,如嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*), 副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 等,其中不少都是人-畜-鱼共患菌。

许多革兰氏阴性菌造成的危害性是巨大的,历史上爆发的许多大规模的全球性传染病的病原体都是革兰氏阴性菌。例如,引起烈性传染病鼠疫的病原菌鼠疫杆菌 (*Yersinia pestis*),其传染性强,病死率高,曾给人类造成极大的危害^[1]。历史上曾有三次世界性大流行,第1次在公元6世纪,首先发生在地中海附近地区,流行几乎遍及所有国家,持续50年,死亡1亿人口。第2次发生于14世纪,蔓延了整个欧洲,当时称之为“黑死病”,波及亚洲和非洲北部,死亡约4000万人。第3次大流行期间,流行于我国东北各省、内蒙古、沿海等地,死亡共达10万人^[2]。

又如已有 180 多年流行历史的烈性肠道传染病霍乱,是由霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 引起的^[3]。自 1817 年到 1923 年发生 6 次古典型霍乱的大流行,全世界死亡人数均超过千万。每次大流行都波及我国,第 6 次大流行后到 1949 年,每年均有流行,仅 1932 年据称就有 2000 万人感染,死亡 40 万人。1961 年开始的埃尔托霍乱第七次世界大流行,起自印度尼西亚,后波及五大洲的 100 多个国家和地区,历时 30 多年仍未得到有效控制,给世界生命和财产造成严重损失。并且,霍乱并没有随着卫生等生活环境的改善而消失^[4],它的流行特点是爆发式的,开始在数个不同地点同时发生,迅速传播流行可累及许多国家并持续多年。1992 年霍乱的第 8 次世界性大流行中^[5],0139 霍乱弧菌引起的新型霍乱席卷印

度和孟加拉国的某些地区，至 1993 年 4 月已报告十万余病人，也已波及包括我国的许多国家和地区。

其它还有由奈瑟氏脑膜炎双球菌 (*Neisseria meningitidis*) 引起的流行性脑脊髓膜炎，例如英国于 1996 年初爆发有史以来最大规模的流行性脑脊髓膜炎流行，已有死亡病例；至 1997 年年初以来，非洲中部已经爆发脑脊髓膜炎疫情，已有一万五千人因罹患流行性脑脊髓膜炎而丧生；整个非洲大陆今年以来传出的流行性脑脊髓膜炎病例已经高达十四万^[6]。而二十世纪 90 年代，美国 C 群脑膜炎球菌病 (SCMD) 爆发越来越频繁^[7]，当地 SCMD 的发病率每年维持在大约 0.5/10 万。同样是革兰氏阴性的沙门氏菌属 *Salmonella meningitis* 也成为发展中国家的细菌性脑膜炎的最主要致病菌之一^[8]。此外，沙门氏菌属病原菌也能引发伤寒，如 1995 年，全球有 16000 万人感染了伤寒，死亡 60 万人。另外常见的痢疾杆菌志贺氏属也是革兰氏阴性病原体，其中的福氏 (*Shigella flexneri*) 痢疾杆菌能引发最具传染性的细菌性痢疾。全球每年有超过一亿六千四百万的志贺氏细菌性痢疾病例，一百多万的死亡人数，并且大多数来自发展中国家的儿童^[9]。

除了以上能引发传染性或流行性疾病的革兰氏阴性菌外，许多位于人体各部位与人体代谢和机能密切相关的正常菌群都属于革兰氏阴性菌，如位于肠道的大肠杆菌，皮肤和鼻咽腔的绿脓杆菌（即铜绿假单胞菌）等，但是如果其生态比例失调，以至机体某一部位的正常菌群中各细菌的比例关系发生数量和质量上的变化，就成为条件致病菌使人患病：①由于机体的防卫功能减弱，引起自身感染。例如皮肤粘膜受伤（特别是大面积烧伤）、身体受凉、过度疲劳、长期消耗性疾病等，可导致正常菌群的自身感染；②由于正常菌群寄居部位的改变，发生了定位转移，也可引起疾病。例如大肠杆菌进入腹腔或泌尿道，可引起腹膜炎、泌尿道感染。另外，革兰氏阴性细菌引起的疾病也普遍存在于其它各种生物，引发严重的疾病并导致巨大的经济损失。如大肠杆菌引起的禽类败血症、沙门氏菌引起的鸡白痢、禽伤寒、副伤寒等；在渔业中由气单胞菌、弧菌、爱德华氏菌等导致的疾病，每年都会导致上百亿的经济损失。

自 1928 年 Fleming 发现了第一种杀灭细菌的抗生素—青霉素，1944 年 Waksman 发现了链霉素以及抗生素概念的提出了以后，抗生素就在细菌感染和疾病的治疗中发挥了很大的作用。如 β -内酰胺类抗生素是普遍使用的广谱抗生素，

也是最常见的处方药之一。但随着抗生素使用的广泛推广和发展,人们很快就发现很多病原菌会对抗生素产生抵抗力。例如在医疗中常见的革兰氏阴性菌属于几类不同的细菌,如肠细菌、假单胞菌等,它们的毒力不同,但是都表现出天然的抗药性并且具备快速获得抗性的能力^[10]。这类细菌往往通过获得抗性基因或者基因突变从而对抗生素产生抗性,而新研制的抗生素很快就因为细菌抗药性而失去作用,而且研究发现有些抗药菌株在药物研发之前就已经存在了^[11]。普遍使用广谱抗生素不但导致许多革兰氏阴性菌抗性株的产生,甚至导致了在疾病感染中出现的革兰氏阴性病原菌普遍具有多重抗药性^[12],其原因主要是革兰氏阴性菌某些菌株具有的先天性的抗药能力以及个体之间很强的相互获取抗生素抗性决定因素的能力。因为抗药性是广泛使用抗生素的不可避免的结果,所以通过谨慎判断和合理的试验来进行非过量的选择性用药治疗是至关重要的。因此单纯采用抗生素的方法现今已不能满足革兰氏阴性菌预防和治疗的需要,必须找寻和开发其它有效的防治方法。

随着对病原菌感染过程的研究深入,面临革兰氏阴性菌日益趋增的抗生素抗药性现状,免疫调节和疫苗逐渐成为感染和疾病控制特别是预防的有效方法^[13]。随着19世纪后期疫苗问世^[14],到20世纪后期一些突破性的发展进步,如组分疫苗、重组疫苗、联合疫苗、核酸疫苗等几种新疫苗的出现。但从实际应用的情况来看,目前仍然是全菌疫苗为主,其它的类型则较少。全菌疫苗虽然具有制作相对简单而且成本也较低的优点,但它也存在不少缺点:如减毒全菌疫苗可能出现菌株突变而导致的毒性恢复等不良后果;灭活全菌疫苗则往往由于对细菌的灭活过程而导致一些免疫保护基团活性的改变,而影响免疫保护的效果。而且对全菌疫苗来说,由于细菌成分的复杂性,其中往往存在一些毒性成分(如LPS等),会导致机体产生不良反应。并且对很多细菌性疾病来说,按常规制得的全菌疫苗免疫保护效果很差,如迟钝爱德华氏菌。

因此,与致病细菌的斗争是长期而艰巨的,需要我们多方面的深入研究。

1.1.1 革兰氏阴性菌的外膜

革兰氏阴性菌的重要标志是它由两层膜^[15]包被,即内膜和外膜,中间由含一层薄的肽聚糖的周质空间隔开。虽然内膜和外膜都是内嵌蛋白的脂双层,但它们的组成和结构却有巨大的差异,这反映了它们在各自联系的不同环境中执行不同的功能。内膜直接与胞浆和周质空间接触,外膜将周质空间与外界环境隔开,因

此外膜作为选择性屏障可以阻止许多毒性分子进入细胞，这对许多环境中生存的革兰氏阴性菌极为重要，如大肠杆菌 *Escherichia coli* 的外膜（图 1-1）可以非常有效地阻止胆盐进入细胞内以适应生存环境大肠中的高浓度胆盐。

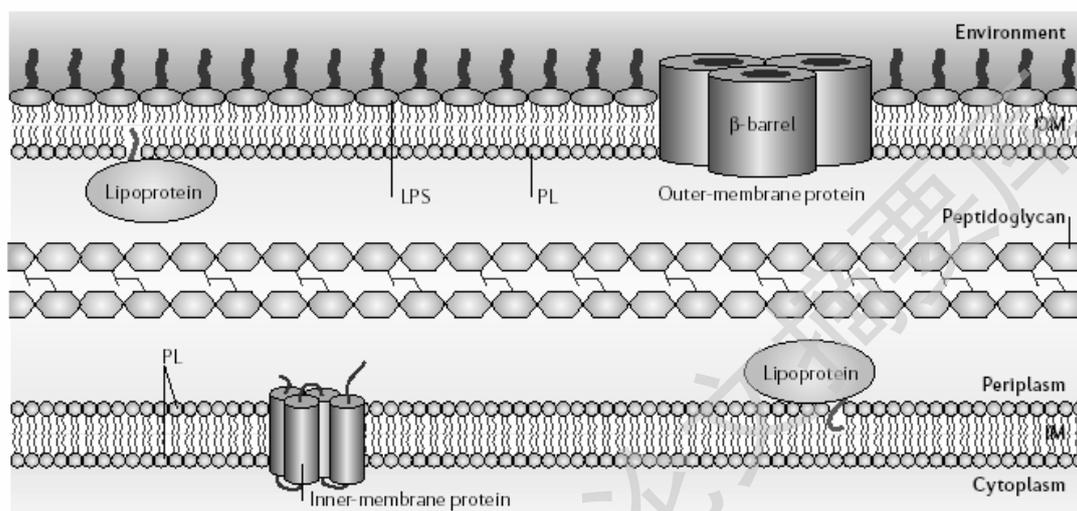


图 1-1. 大肠杆菌外围结构示意图（引自文献^[16]）

Fig.1-1 General structure of the *Escherichia coli* cell envelope.

1.1.2 革兰氏阴性菌外膜蛋白的结构

从基因组序列可以获得蛋白序列，如果对目前的蛋白库进行分析，可以发现所有蛋白中有 20% 位于膜上^[17]。这个比例是从跨膜 α 螺旋推论出的，具有很高的可信度。 α 螺旋的特点是一段连续的 20~30 个几乎以脂肪侧链为主的非极性残基和两端为芳香基团侧链的残基^[18]，每个 α 螺旋主链氨基均原位成对，因此 α 螺旋无一例外的是通过表面非极性侧链与膜内部非极性环境相连，这就是为什么膜蛋白跨膜部分都是 α 螺旋的形式。因此可以通过分析 α 螺旋来估计是否为膜蛋白。

膜蛋白还有另一种结构—— β 折叠，但膜上并不是 α 螺旋和 β 折叠混杂在一起，因为 β 折叠主链上的氢键供体和受体不能与 α 螺旋上的配对，但是 β 折叠相互之间反向平行构成桶状便可相互配对，桶表面为非极性侧链，与膜非极性内部相适应（图 1-2）。

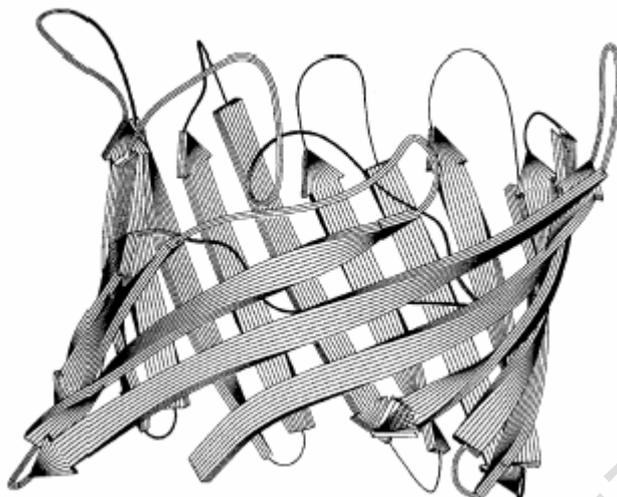


图 1-2. β -桶状结构示意图(引自文献^[19])

Fig.1-2 General structure of the β -barrel.

这种桶状蛋白位于革兰氏阴性菌的外膜上,而实际上革兰氏阴性菌外膜似乎缺少 α 螺旋结构的蛋白,只存在 β 折叠结构的跨膜蛋白,因此,所有的细胞质膜蛋白和革兰氏阴性菌特有的细胞外膜蛋白的区别在于前者大部分为 α 结构蛋白,后者只为 β 结构蛋白。

1.1.3 革兰氏阴性菌外膜蛋白的功能

革兰氏阴性菌外膜将周质空间与外界环境隔开,外膜蛋白除了具有让外界物质进入的通道功能、与外界物质相互作用及其与耐药方面的主要功能外,还发现外膜蛋白具有酶的功能,如有报道外膜蛋白 OmpT 在细菌的病原性研究中被认为是一个特别的酶,它以单体形式存在,活性中心向外^[20]。OmpLA 是磷酸酯酶,当它被激活时可在外膜上造成孔洞,以释放 colicin 和其它毒性因子。具体的激活机制目前尚未阐明,只知道需要 OmpLA 在膜上形成二聚体,并通过二聚体晶体结构的分析得到证实^[21],这表明其活性中心所必需的残基分别在两个亚基上,OmpLA 的活性中心的位置刚好将细菌外膜蛋白外叶脂多糖去甲基化。

(1) 外膜通道

形成外膜通道的外膜蛋白通常由至少 16 个 β 折叠构成桶状结构,所形成的孔径可以允许通过分子量达 600 Da 的分子^[22]。这些通道具有不同的选择性,例如, *R.capsulatus* 的通道在其外叶末端有一个相当非极性的接合位点,表明此菌在 adenosine 浓度极低的环境中仍然可能达到富集的目的。这种结构也说明了通

道中有电场充当极性选择器，来排除不需要的非极性物质^[23]。大肠杆菌外膜通道蛋白 OmpF 是第一个成功结晶并用于 X 光衍射分析的外膜蛋白^[24]，因而研究得较为透彻（图 1-3）。OmpF 与通道蛋白 PhoE^[25]和 OmpC 高度同源，这三个外膜通道蛋白有不同的特点以适应不同的外界环境，PhoE 极易让磷酸根离子通过，大肠杆菌中的 OmpC 及其在 *Klebsiella pneumoniae*^[26]中的同源蛋白 OmpK36 是渗透压通道，即它们在高盐导致的高渗透压环境下会大量表达，OmpC 的高盐性质是与 OmpF 的低盐性质相对应的，它们的通道效率相当，所不同的是 OmpC 的通道中有较多的带电残基。

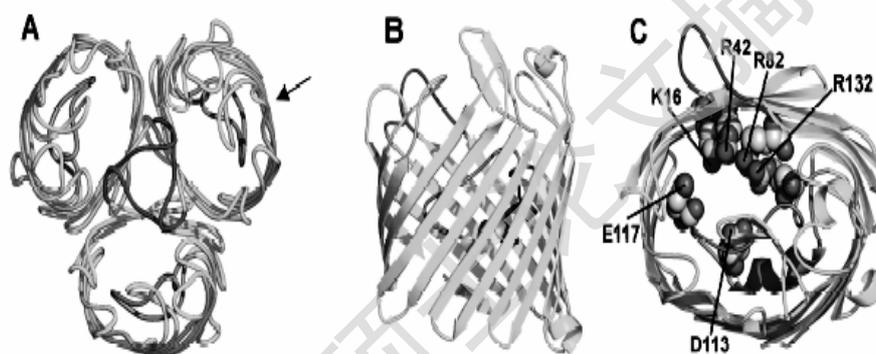


图 1-3. OmpF 的结构示意图（引自文献^[27]）

Fig.1-3 Structure of the OmpF porin of *E.coli*.(A)View of the trimer from the top, that is,in a direction perpendicular to the plane of th e membrane. (B)View of the monomeric unit from the side. (C) View of th e monomeric unit from the top, showing the “eyelet”or the constricted region of the channel.

麦芽糖孔蛋白 LamB(图 1-4)是一个高选择性通道，其通道较小，刚好允许直链淀粉螺旋通过，而它也只接受葡萄糖单位^[28,29]。蔗糖通道蛋白是麦芽糖通道蛋白的同源蛋白，它非常特异地只让小分子蔗糖通过，因此它的孔径比 LamB 还小^[30]。

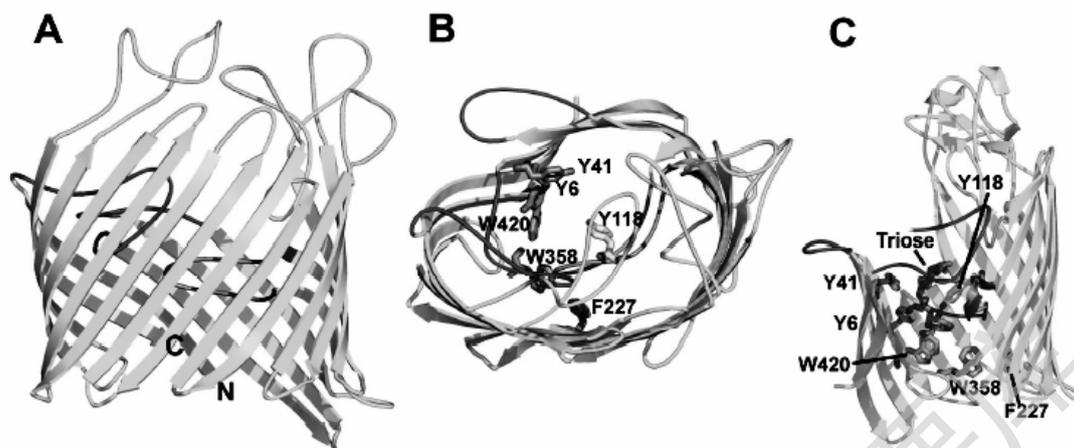


图 1-4. LamB 的结构示意图（引自文献^[27]）

Fig.1-4 X-ray crystallographic structure of LamB.(A)Side view of the monomeric unit.(B)View of the monomeric unit from the top.(C)View of the greasy slide and its interaction with maltotriose.

从不同细菌外膜通道蛋白如 *Paracoccus denitrificans*^[31] 中的主要通道蛋白和 *Comomonas acidovorans*^[32] 中的 Omp32 的结构分析揭示了大部分外膜通道蛋白的共同特点，即通道由三个平行的 β 桶状结构组成的三聚体，每个亚基为一条多肽链，由 16 或 18 个折叠构成，三个亚基紧密装配在一起，因此，不认为在膜上或周质空间中亚基会象单体一样具有稳定性。然而，单体具有通道功能也有报道^[33]，但它的结构还没有阐明。

除了上述三聚体通道，外膜上还有一种更大的蛋白通道，它由 22 个 β 折叠构成桶状，以单体形式存在，它也被称为铁离子转运通道，目前发现有 FhuA 和 FecA（图 1-5）。由于周质空间没有 ATP 或能量载体，这就限制了外膜通道只能以被动运输为主，最多带有选择性，无法逆浓度梯度进行主动运输。细菌采用了一种被称为‘加塞’的 β 桶和内膜上 TonB 蛋白的协同作用来解决这个问题。FhuA 和 FecA 是两个进化相关的加塞通道蛋白，它们的结构已经清楚，具有的孔径大约为 40 埃，它们通过其外半部分结合捕获的铁离子，并被 N 末端 150 个残基的‘塞子’阻隔在通道中，‘塞子’位于通道蛋白在周质空间的内半部分，其上具有 TonB 的结合位点。定向转运铁离子通过外膜是由内膜上的 TonB 蛋白提供能量，TonB 可以从胞质中的 ATP 获取能量^[34,35]，150 个残基构成的‘塞子’在与 TonB 结

合后即被移除以便让铁离子进入。

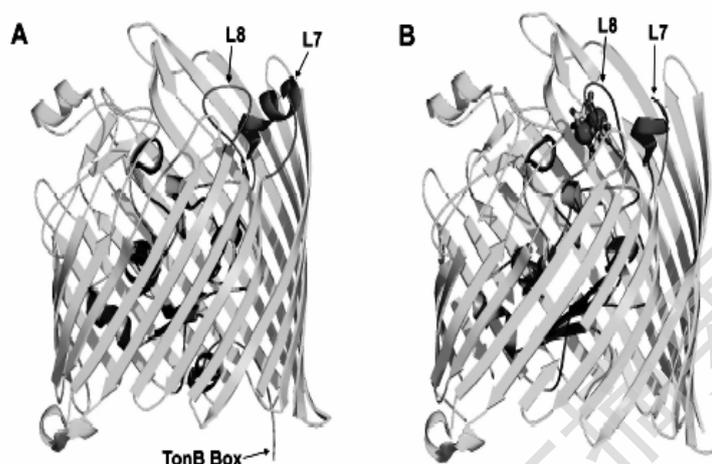


图 1-5. 大肠杆菌 FecA 的结构示意图（引自文献^[27]）

Fig.1-5 X-ray crystallographic structures of the ferric citrate receptor, FecA, of *E.coli*.(A)Side view of the unliganded FecA.(B)Liganded FecA.

除了具有让外界物质进入的通道，外膜上还有专门排出生物异源物质如杀虫剂、工业污染物或合成药物等的通道。TolC 是较早被研究的外膜上的外排通道，它是由 3 个亚基组成，顶部是由 12 个折叠构成的 β 桶状结构位于外膜，其中每个亚基贡献 4 个折叠，下部是由 12 个 α 螺旋构成的长周质空间通道^[36]。

(2) 与外界物质相互作用

外膜蛋白 OmpX 可能作为防御性武器与外界蛋白接合并相互作用，OmpX 的 β 桶形结构有一半突出进入外界基质中，这样外界任何表面带有 β 折叠的蛋白都可以与之接合^[37]，这类蛋白是很普遍的。通过 X-射线分析，OmpX 中所有 loop 的残基都位于电子密度中，这表明 OmpX 与外部蛋白结合的 β 折叠边是固定的，适合于稳定接合，与 OmpX 不同，OmpA 有长的向外突出的 loops，它们高度不稳定，大部分在反射电子密度图上不可见，而且不容易被酶降解，推测是 OmpA 与周围的脂多糖结合，显而易见，这样的结构是细菌适应外界环境所必需的^[38]。

外膜蛋白与粘附作用：病原菌感染的第一步就是要附着于宿主组织，这样才能避免被宿主的机械防御清除，并进而在宿主组织繁殖^[39-40]。病原菌的粘附作用通过一些蛋白、glycoconjugates或脂类物的调节参与来完成，这些分子可以与宿

主的细胞受体、浆蛋白与胞外基质发生特异性亲和作用。外膜蛋白中的一些种类就参与了 this 粘附过程，*Borrelia burgdorferi* 中的 decorin-binding protein A 和 B (DbpA, DbpB) 这两种外膜脂蛋白能够与宿主胞外基质的 Decorin 相作用而完成菌体的粘附过程。DbpA 的抗体能够阻止感染的发生，这清楚地表明外膜蛋白的粘附作用对 Lyme 病发生的重要性^[41-42]。

外膜蛋白与炎症反应：炎症反应对于宿主来说是一柄双刃剑，既是抗感染防御机制所必须，又往往会对宿主组织造成损伤。外膜蛋白，尤其是一些脂蛋白在宿主炎症反应的激发过程中起到了重要的作用。对螺旋菌的研究表明，其外膜中所具有的脂蛋白可以通过 CD14 受体及 Toll-like 受体 2 (TLR2) 激发固有免疫反应。在这个过程中 TLR2 的重要性在最近的实验中得到了证实，实验发现 TLR2 缺陷型的小鼠细胞不能对螺旋菌的脂蛋白产生反应，即使脂蛋白的浓度达到了正常激活浓度的 1000 倍^[43-45]。

外膜蛋白与疫苗开发：大量的实验数据表明，许多革兰氏阴性细菌的外膜蛋白可以激发宿主的免疫保护性。研究表明非典型的流感嗜血杆菌 (NTHI) 中的外膜蛋白 P4 和 P6 是高度保守的，并且是疫苗的首选靶抗原；随着含有 T、B 细胞抗原决定簇多肽的疫苗出现，P6 的抗原决定簇也得到了研究，提出其中 P6 的第八个重叠肽段可以作为抗 NTHI 感染的多肽疫苗候选物质^[46-47]。对溶血曼氏菌 (*Mannheimia haemolytica*) I 血清型的外膜蛋白 PlpE 疫苗研究发现在商品化疫苗中增加重组表达的 rPlpE 可以大大增强疫苗的效果^[48]，并且 PlpE 的 N 端区域 R2 被鉴定为特异的抗原决定簇，其产生的特异性抗体能有效杀灭 *M. haemolytica* 血清 I 型 (S1)^[49]。因此，具有较高免疫保护性的外膜蛋白是潜在的有效疫苗，而对具有免疫原性外膜蛋白进行筛选往往是疫苗研究的有效途径。

(3) 外膜蛋白与耐药性

伴随各种抗菌药物的使用，细菌也相应进化出多种抗药机制。这些抗药机制可以分成以下三类：产生相应的水解及修饰酶以破坏药物活性；改变药物靶位点的结构，使药物无法识别；阻止药物与靶位点接触，其中包括调节膜通透性以及抗生素排出系统的作用，而这两者都与外膜蛋白的作用紧密相关。外膜蛋白对膜通透性的调节可以通过两种方式来完成：(1) 通过外膜蛋白的作用改变外膜脂双层结构，降低通透性。*S. typhimurium* 通过 PhoP/PhoQ 调节基因 PagP 的激活，合成

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库