维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)04-0500-03

幽门螺杆菌尿素酶分子生物学研究进展

姜 政 综述；王丕龙 审校

（重庆医科大学临床学院消化内科，重庆 400016）

【中国图书分类法分类号】R573.1 【文献标识码】B 【收稿日期】2001-08-27

幽门螺杆菌（Helicobacter pylori ,Hp）是上消化道疾病的主要致病菌，它的感染不但与B型胃炎和消化性溃疡的发生有密切关系，而且与非溃疡性消化不良，MALT淋巴瘤和胃癌的发生也有重要关系[1,2]，并已被世界卫生组织列为胃癌等肿瘤发生的相关致病菌[3]。Hp在我国普通人群的感染率较高达50%～80%，并仍以每年1%～2%速度增加[4]。近年来，随着分子生物学技术的发展，幽门螺杆菌致病机理研究的进一步深入，有效抗原的确定，以及基因工程菌株的构建，为在人群中广泛接种基因工程疫苗，预防和治疗消化道疾病奠定了基础。现就将尿素酶（Ure）的致病机理、临床上的应用、以及疫苗的开发作一综述。

1 尿素酶基因及尿素酶

菌株J99和26695基因组大小分别为1643831bp和1697867bp[5,6]，上述两株基因组序列显示，Hp是高度保守的，两株Hp89%的读码框相同[7]，其中尿素酶基因是所有Hp菌株共同拥有的，编码的蛋白具有很强的尿素酶活性，尿素酶占Hp总蛋白量的6%，它是含有镍离子的金属酶，能够分解尿素为NH_3和CO_2，使Hp周围pH值增高，有利于Hp在低的pH值环境下生存。目前发现尿素酶基因大小约为7.5kb，共有9个读码框，分别为UreA、UreB、UreC、UreD、UreE、UreF、UreG、UreH、和UreI。UreA、UreB为尿素酶的两个结构亚单位，它们具有高度保守性，是PCR检测Hp感染常选择的目的基因；UreC、UreD为调节部分，是表达尿素酶活性所必需的；UreE、UreF、UreG、UreH、和UreI为尿素酶的附加基因，其中UreH、和UreI为Hp所特有[8]。Hp为单拷贝基因，在UreD和UreA、UreB和UreI之间有420bp和200bp的中间基因，从而使3组基因有可能以同方向转录并单独受到调节[9]。尿素酶结构基因转录为一个mRNA，而附加基因转录为另一个mRNA。在大约UreD和UreA基因的上游310bp处有一个δ54启动子，控制UreA、UreB、UreD基因的表达，而UreC基因上游则为δ70启动子，不同来源的Hp菌株，尿素酶基因存在差异。Claton在大肠杆菌中通过建库的方法克隆表达了Hp尿素酶A、B结构基因，但无活性；随后Courcoux成功地克隆和表达了有活性的尿素酶。研究认为附加基因编码的蛋白在金属Ni离子聚合到酶的活性位点上起重要作用：UreH是尿素酶的伴侣蛋白，与尿素酶蛋白组成复合物，维持尿素酶蛋白构象或者阻止无效的Ni离子的结合；UreE的功能是通过它的多聚组氨酸结合细胞中的Ni离子，从而在尿素酶的激活过程中作为Ni离子的供体；UreF和UreG形成一个复合物，使尿素酶对Ni离子处于感受状态而使Ni离子有效的结合在活性位点上，或者UreF和UreG使尿素酶蛋白与Ni离子的供体UreE顺利发生作用。研究发现UreF、UreG、UreH基因被破坏以后，由于不能结合镍离子而使尿素酶蛋白的活性完全丧失；而UreE基因被破坏仅降低尿素酶蛋白的活性而不完全丧失[10]。Hp尿素酶单体由A、B两个亚单位组成，呈六聚体，A、B两个亚单位的分子质量分别为29500道尔顿和66000道尔顿左右，其比例为1/1。尿素酶的活性需要在全酶的六个活性位点上插入两个镍离子，这个插入过程由尿素酶基因簇中附加基因编码的蛋白来完成。目前发现多种蛋白能够通过影响镍离子来调节尿素酶的活性：1、NixA一种位于Hp膜结构上的高亲合力镍转运蛋白，35kDa，能够独立地将镍离子输入细胞，在转染有nixA基因的大肠杆菌中，尿素酶基因表达的蛋白活性明显增强；2、P型ATP酶一种多肽链，是细胞膜蛋白成分，发现ATP酶突变的Hp菌株，其尿素酶活性可以下降99%；3、HspA在C端含有一个组氨酸丰富区，能够特异地结合镍离子，其作用类似一个镍离子库；4、Hpn是另一种富含组胺的蛋白，可以结合镍离子和其它阳离子，可能与镍离子处理有关。除了蛋白质调节尿素酶的活性外，不同的离子浓度对尿素酶的活性也有调节作用[11]。

2 尿素酶在Hp致病中的作用

实验证明，剔除尿素酶基因表达的Hp菌株在无菌乳猪感染模型中，Hp感染后不能定植于胃内，充分证明尿素酶的致病作用[12]。Hp尿素酶不仅能分解尿素，而且能激活单核吞噬细胞和刺激炎性细胞因子的产生，实验证明有活性的尿素酶在体外仍然对胃上皮细胞有毒力作用，因此Hp尿素酶即是定植因子，又是毒力因子[13]：Hp系非嗜酸菌，在体外低pH条件下不能生存，在体内，Hp靠尿素酶分解尿素产生的氨来中和胃酸，这种一过性的低酸和高的pH值使细菌能顺利穿过

作者介绍：姜 政（1965- ），男，博士，讲师，
主要研究方向：胃肠疾病的研究.

维普资讯 http://www.cqvip.com

胃粘液层达到近中性的粘膜表面，有利于定植，同时胞质中的尿素酶在Hp定植过程中对尿素等有趋化作用[14]；氨与水化合生成的羟基有细胞毒作用，导致胃粘膜上皮的增殖与凋亡失衡，增殖指数（LI）/凋亡指数（AI）明显增高，导致癌前病变的发生；铵离子会干扰胃粘膜的正常H^+反渗，导致组织损伤；尿素酶激活单核吞噬细胞，导致细胞因子和氧自由基的分泌，介导胃粘膜上皮炎症反应和空泡形成[13]；另外，细菌过度的生长，硝酸盐降解为亚硝酸盐及亚硝胺而致癌。

3 尿素酶在临床上的应用

1984年，Langenberg发现Hp能够产生大量的尿素酶，该酶具有很高的活性，相当于奇异变形杆菌的2倍以及尿素酶阳性肠道菌的7倍，基于这种特性，尿素酶活性的测定可以作为Hp的快速诊断方法。（1）尿素酶试验 ①、pH指示剂法：该法是目前临床上最常用的，试剂只含有尿素和pH指示剂（如酚红），从胃内取出的组织活检标本通常呈酸性，pH 6.0，一般情况下试剂颜色不变，如果有Hp的感染，当标本放入试剂中时，Hp所产生的尿素酶则分解尿素产生氨，使pH值升高，导致指示剂酚红变为粉红色。据报道其敏感性为86%-98%，特异性为95%-100%[15]。另据报道，由于快速脲酶试验所用活检标本不能避免Hp“灶性”分布差异的影响，加之其反应强度易受活检标本内Hp及其他产脲酶微生物的密度、环境温度、产品质量、服用药物因素的影响，以及缺乏明确的客观判断标准易受主观因素影响等，因此其与培养法相比较，总符合率为78.8%，阳性与阴性不符合率分别为12%和9.2%[16]。②、分析化学法：采用分析化学原理检测Hp尿素酶的最终产物，由于阳性显色反应不是取决于试剂中pH改变，可以避免一些影响pH的因素所致的假阳性，其敏感性为99%，特异性为100%[17]。由于快速脲酶试剂价格低廉，反应迅速，将酚红、尿素等组合制成试纸、胶粒、反应板以及试剂盒，使用方便，因此受到临床医师的欢迎。（2）呼吸试验 ①、^{13}C-呼吸试验：自1987年首先报道^{13}C-尿素呼吸试验诊断Hp感染以来，在研究Hp基础与临床方面，得到了广泛的应用。让受试者口服一定剂量的^{13}C-尿素，^{13}C-尿素随即被尿素酶分解成NH_3和$^{13}CO_2$，而$^{13}CO_2$进入血液循环，由肺脏呼出。每10min收集一次呼气标本，收集数次，收集的气体标本采用质谱仪分析，计算一定时间内呼出$^{13}CO_2$占总的CO_2含量，来判断是否有Hp的感染。^{13}C-尿素呼吸试验的检测要求受试者在空腹状态下进行，具体步骤如下：口服一杯试验餐（约120ml）；收集零时的呼气；口服^{13}C-尿素并开始计时（剂量：成人为100mg，^{13}C丰度大于99%；儿童：12岁以下，60 mg，^{13}C丰度大于99%）；收集10、20、30、40、和50min的呼气；样品分析。^{13}C-尿素呼吸试验采用了稳定同位素以及质谱学技术，不仅具有准确、特异、快捷的特点，而且根据国内及国外报道，该方法的敏感性、特异性都在95%以上。检查时，受试者无痛苦、无创伤、无放射性损伤。但$^{13}CO_2$测定较为复杂，需要特殊仪器，而且费用昂贵，目前大多数医院不能开展。②、^{14}C-呼吸试验：为了克服^{13}C-呼吸试验操作复杂，费用昂贵等缺点，1988年Marshall建立了无创性^{14}C-呼吸试验，仅需要液体闪烁计数仪，操作简单，诊断Hp感染同样具有高度的敏感性、特异性，但^{14}C属于放射性同位素，物理$T_{1/2}$很长，因此对机体和环境造成损害。如果加大氢氧化海胺（CO_2吸附剂）用量，可以避免上述的缺点。③、^{15}N-尿氨排出试验：利用国内生产^{15}N这一条件，设计了^{15}N-尿氨排出试验。其原理基本上与标记的^{14}C-、^{13}C-呼吸试验相同，即有^{15}N-尿素供受试者口服，经Hp的尿素酶作用后，分解成标记的$^{15}NH_3$和未标记的CO_2，同样经消化道吸收进入血液循环，而^{15}N标记的氨则随着机体代谢产物氨、尿素等一起由肾脏排出，采集尿液标本进行预处理，即可上色质联用仪检测，并计算出2h内^{15}N-尿氨排出率。^{15}N-尿氨排出试验也是一种非侵袭性的、无放射性的、有一定定量意义的、敏感性、特异性均极高的Hp感染诊断试验，但操作复杂，需要特殊仪器，而且费用昂贵，一般医院都无力开展。由于快速脲酶试验、呼吸试验以及^{15}N-尿氨排出试验都是检测活的Hp所产生的尿素酶的活力，因此要受到胃内杂菌（如草绿色链球菌、克雷伯菌等）、药物影响。（3）血清学检测 尿素酶位于Hp菌体的表面，能刺激机体产生细胞、体液免疫，因此为临床和流行病学筛选Hp感染提供了方便。检测Hp感染的血清学方法有：酶联免疫吸附试验（ELISA），目前已有多种商品化的ELISA试剂盒，实验操作简便；免疫酶试验，将Hp菌固定于玻片上，然后与被检查者血清结合，通过酶标二抗显色反应来进行诊断，操作简便，但准确性稍差；免疫印迹技术，首先将Hp的大小不同的蛋白质进行SDS-PAGE电泳，而后与被检查者血清抗体结合，通过酶标或发光标记的二抗作用，进行显色或发光来进行诊断，操作复杂，难度大且不稳定，不宜作为常规诊断方法；胶乳凝集试验，现已有商品化试剂盒，具有不需要特殊仪器，血液样品需要量少优点。通过比较血清学检测的抗体水平与内镜及组织学检查结果间相关性分析，认为ELISA法在检测Hp抗体中最为敏感，据报道其敏感性为93%、特异性达到100%[18]。（4）PCR方法的应用 聚合酶链式反应（PCR）于1985年问世以来，该技术迅速地引入到Hp的研究中。由于Hp普遍存在尿素酶基因，故常用尿素酶基因作为PCR检测的靶基因用于检测Hp的存在。目前报道最多的是以胃粘膜活检组织为标本。由于所选用的引物、标本的制备、细菌的密度、及PCR程序不同，所以得到的特异性、灵敏性就不一致。临床上还可以通过应用Hp的尿素酶基因PCR-RFLP方法来确定菌株间的差异。因此可以作为流行病学确定Hp感染的来源和途径的工具[19]。

4 尿素酶在疫苗中的应用

尿素酶对于Hp的定植和生存起着重要的作用，由于其主要活性部分位于菌体表面、含量丰富、广泛表达、高度保

维普资讯 http://www.cqvip.com

守、其大分子量和颗粒状结构有利于粘膜免疫接种，因此尿素酶分子是作为疫苗抗原的合理选择[20~22]。同时在体内，Hp的表面具有吸附胞浆蛋白的特性，能够将自溶释放的尿素酶和其他胞浆蛋白吸附到活菌表面，这给Hp疫苗的研究又提供了一重要的理论依据。实验发现用Ure结合大肠杆菌热不稳定毒素（LT）免疫Swiss Webster小鼠产生了对Helicobacter felis (Hf)的长期预防作用；同时也证实了用Ure结合LT免疫恒河猴，血清中抗尿素酶特性的IgG和IgA抗体水平成倍提高，而且接种组Hp的定植显著减少的特性[23]。在Hp慢性感染患者中，口服UreB+LT，使Hp的定植显著减少[24]。重组的Ure和LT口服、鼻腔、直肠免疫同样能够诱导小鼠产生免疫保护力[25]。Gomez-Durate[26]用表达HpUreA、B亚单位的减毒沙门菌SL3261aroA突变株；口服免疫Balb/c,C57/B6小鼠,然后用Hp野生株攻击，免疫组获得100%保护，血清、胃粘液中抗UreA、B抗体均增高，对照组则无保护作用。目前研究认为，Hp疫苗诱导机体产生保护性免疫和治疗作用可能与疫苗将胃内Th1型应答反应，转变为Th0或Th2型保护性反应有关[27]，对Hp感染的自然免疫可能以Th1为主，它不能清除Hp感染，也无保护作用；而Hp疫苗介导的免疫反应可能以Th0或Th2为主，这种免疫反应有治疗作用，同时也有保护作用[28~31]。

综上所述，大量事实证明：Ure在Hp致病过程中起了主要作用；为了根除Hp，既依赖于Ure的检测进行Hp感染的诊断和流行病学的调查；同时又依赖于Ure覆盖率高的特性来进行Hp疫苗的研制。因此，Ure在Hp致病、Hp检测、Hp疫苗的开发方面，具有重要的分子生物学特性。关于疫苗的研制是目前Hp研究的一个热点，是预防Hp的感染、降低Hp相关性疾病发病率的最佳选择。

参 考 文 献

[1] Helicobacter and Cancer Collaborative Group. Gastric cancer and Helicobacter pylori: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts[J]. Gut, 2001; 49(3):347-353.

[2]Suganuma M, Kurusu M, Okabe S, et al. Helicobacter pylori membrane protein 1: a new carcinogenic factor of Helicobacter pylori[J]. Cancer Res, 2001;61(17):6356-6359.

[3] Gotto T, Nishizono A, Fujioka T, et al. Local secretory immunoglobulin A and postimmunization gastritis correlated with protection against Helicobacter pylori infection after oral vaccination of mice[J]. Infect immun, 1999; 67(5): 2531-2539.

[4] 李明峰，凌 贞，马爱英，等. 幽门螺杆菌尿素酶B基因的克隆、表达及免疫原性研究[J]. 世界华人消化杂志，1999;7(7):596-600.

[5]Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori [J]. Nature, 1997; 389:412.

[6] Alm RA, Ling LS, Moir DT, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen Helicobacter pylori[J]. Nature, 1999; 397:176-180.

[7] Marshall DG, Dundon WG, Beesley SM, et al. Helicobacter pylori coundrum of genetic diversity[J]. Microbiol, 1998;144(Pt 11):2925-2939.

[8] 徐顺福，赵志泉. 幽门螺杆菌的分子生物学[J]. 国外医学·消化系疾病分册，2000,20(3):134-138.

[9] 王正祥. 幽门螺杆菌的分子生物学研究现状[J]. 微生物学通报，1996;23:224-227.

[10] Mobley HLT, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial urease[J]. Microbiol Rev, 1995;59:451-480

[11] Perez-perez GI, Gower CB, Blaser MJ. Effects of cations on Helicobacter pylori urease activity, release, and stability[J]. Infect Immun, 1994;62:299-320.

[12]Covacci A, Telford JL, Giudice GD, et al. Helicobacter pylori virulence and genetic geography[J]. Science, 1999;284: 1328-1333.

[13] Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. Helicobacter pylori[J]. Clin microbiol Rev, 1997;10:720-741.

[14] Nakamura H, Yoshiyama H, Takeuchi H, et al. Urease plays an important role in the chemotactic motility of helicobacter pylori in a viscous environment[J]. Infect Immun, 1998;66:4832-4837.

[15] Megraud F. Comparison of different tests for campylobacter pylori[J]. Scand J Gastroenterol, 1988;23(suppl 142):64-68 .

[16] 史肖云，张振华. 分离培养诊断HP感染的价值[J]. 世界华人消化杂志，2001;9(5):563-565.

[17] 黄 跃，许鲁宁. 幽门螺杆菌尿素酶依赖性试验[J]. 世界华人消化杂志，2000;8(5):549-550.

[18] 张玲霞，张 沥. 幽门螺杆菌感染诊断方法的评价[J]. 世界华人消化杂志，1998;6:162-164.

[19] Williams CL. Helicobacter pylori: bacteriology and laboratory diagnosis[J]. Infect, 1997;34:1-5.

[20] Lee A, Buck F. Vaccination and mucosal responses to helicobacter pylori infection aliment pharmacol[J]. Ther, 1996; 10:129-138 .

[21] Dieterich C, Bouzourene H, Blum AL, et al. Urease-based mucosal immunization against Helicobacter heilmannii infection induces corpus atrophy in mice[J]. Infect Immun, 1999;67:6206-6209.

[22] Ernst JD. Toward the development of antibacterial vaccine: report of a symposium and workshop. Organizing committee [J]. Clin Infect Dis, 1999;29:1295-1302.

[23] 江 华，孙振兴，李兆申. 幽门螺杆菌疫苗抗原的研究进展[J]. 国外医学·消化系疾病分册，2000;20(1):36-39.

[24] Pierre M, Christianna K, Karen L, et al. Oral immunization with Urease and Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin is safe and immunogenic in Helicobacter pylori-infected adults[J].