维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2001)04-0467-04

幽门螺杆菌空泡毒素分子生物学研究进展

(重庆医科大学基础医学院微生物学教研室 重庆 400016)

陈 全,综述 杨致邦,审校

【中国图书分类法分类号】R378.2 【文献标识码】B 【收稿日期】1999-10-08

自 1983 年 Warren 与 Marshall[1]从人胃粘膜分离出幽门螺杆菌(Helicobacter pylori,HP)后,HP 已被证实是 B 型胃炎的条件致病菌,是消化性溃疡的重要致病因素,与胃癌的发生有密切关系。HP 感染非常普遍,人群中的感染率达 50%,但是真正发病却很少。感染 HP 后是否发病,一方面与宿主因素有关,另一方面与 HP 毒力有关。HP 的致病因素除鞭毛、尿素酶、蛋白酶等以外,1988 年 Leunk 等[2]还发现了由部份 HP 产生的一种能使哺乳类细胞产生空泡样变的毒素,称之为空泡毒素(Vacuolating cytotoxin A,VacA),据此将 Hp 分为空泡毒作用阳性的 HP(Tox^+)及空泡毒作用阴性的 HP(Tox-),动物实验证实,Tox^+ HP 较 Tox^- HP 致病力更强。通过近几年的分子生物学研究,HP VacA 在其编码基因结构、生物学性状以及作用机制等方面都有许多新进展。

1 vacA 基因的多态性

编码 VacA 的基因已被成功克隆出,据报道,vacA 基因有一 3864bp 的开放读码框架(open reading frame,ORF),其上游基因≥567 bp 区域与大肠杆菌半胱氨酸 t-RNA 合成酶有同源性。ORF 起始于 797 位的 ATG 密码,终止于 4658 位的 TAA 密码,在其上游 AGGAA 序列为核蛋白结合部位[3]。

1.1 vacA 等位基因的多态性

Atherton 等[4]研究表明,vacA 基因存在信号区 s 和中间区 m,分别由多种等位基因(sla、slb、s2、ml、m2)组成多种重组体(sla/ml、sla/m2、slb/ml、slb/m2、s2/m2),其中 sl/ml 表现为较高细胞毒活性。Van[5]等用 PCR-LiPA 法研究世界各地 vacA 基因类型时,从东亚地区相关病人中发现了信号区的另一等位基因 slc,并成为该地区 sl 等位基因的主要类型,同时 m 区检测出了三种不同等位基因 ml、m2a、m2b,从而为 vacA 基因多态性研究提供了依据。Han 等[6]对 HP 作 vacA 基因类型分析和 RFLP(restriction fragments length polymorphism)分析时,从两株 HP 中发现了一段新的中间区域等位基因 m3,这是一段不能用特异性的 ml、m2 引物来扩增的独特的中间区域等位基因。Strobel 等[7]用 DNA 序列分析法研究 vacA 基因时,发现有部分 HP 的中间区域序列不能按以前的原则分类,但这些序列又与 ml 有高度同源性,只是有多个碱基对发生了交换,这些不能分型的中间区域的变化表明,vacA 基因的中间区域有更进一层亚家族存在,称为 m1a,并已经设计出了相应引物以供研究。因此 vacA 基因的信号序列和中间区域的等位基因有 sla、slb、slc、s2、ml、mla、m2a、m2b、m3 等多种类型,这些类型便构成了 vacA 等位基因的多态性。临床分离的 HP 表现出不同的生物学活性可能与 vacA 等位基因的多态性有关,从而使不同基因型的 HP 感染导致不同的临床表现。

1.2 vacA 基因转录水平的异质性

Nagata 等[8]研究表明,Tox^+ HP 与 Tox^- 都具有 vacA 基因,都能编码产生 VacA,只是 Tox^- HP 产生的 VacA 量极少,常规方法不足以检测出而已。Forsyth 等[9]用 PCR 法分析 Tox^+ HP(sl/m2 型)与 Tox^- HP(s2/m2 型)基因转录时,发现大多数菌株的 vacA 基因都有相同的转录起点,但 Tox^+ 株产生的引物扩增信号强度(15.8+/-1.9)明显强于 Tox^- 株(8.9+/-1.7)。相应地,将 vacA-xylE 转录融合子引入标准 Tox^+ HP 和标准 Tox^- HP 染色体中进行表达,结果发现 Tox^+ HP 产的 xylE 活性水平比 Tox^- HP 产生的 xylE 活性水平要高 30 倍,序列分析和启动子交换试验结果也揭示了这两种 HP vacA 基因转录水平的不同,这种差异不能单纯用启动子强度不同来解释。因此 Tox^+ HP 和 Tox^- HP

作者介绍:陈 全(1969-),男,籍贯:重庆大足人,讲师,硕士生,主要研究方向:机会致病菌研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

的主要区别不仅在于 vacA 基因序列不同，而且 vacA 基因转录水平也有差异，这些区别导致了 Tox^+ HP 产生的 VacA 水平要比 Tox^- HP 高得多，致使两种类型 HP 感染导致不同的临床后果。

1.3 vacA 基因类型在不同地区分布的多样性

Van 等[10]用 PCR－LiPA 法分析了从欧洲两个国家的部份胃溃疡、胃炎、胃癌病人(葡萄牙人 55 例、荷兰人 48 例)中分离的 HP vacA 基因类型分布情况，72％葡萄牙人分离株含有 slb，61％荷兰人分离株含有 sla。结果有明：在欧州 vacA 基因 sl 型(sla 或 slb)与溃疡和胃癌的发生有显著性联系。

Letley 等[11]用 PCR 法对 16 例南非病人(15 例南非黑人，1 例高加索人)分离的 HP vacA 基因类型进行了研究，1/16(高加索人)分离株为 sla/ml 型，其余的 10/15 为 slb/ml 型、4/15 为 slb/m2 型、1/15 为 s2/ml 型，其中的 s2/ml 这种组合形式是第一次从自然分离株中检测到，是 Tox^- HP，这一发现具有重要的意义。亚洲人 HP 分离株中 sla 型分布最普遍，美国分离株 sl 的三种亚型都有(sla、slb、slc)，其中 sla 占 34％，sla 在美国的检出率也远远高于南非分离株。据分析，在美国 sla 型与消化性溃疡的发生密切相关，检出 sla 型 HP 被认为是消化性溃疡发生的一种前兆。但是，sla 型在南非分离株中很少见，HP 在南非人群中的感染率是比较高的，但消化性溃疡和胃癌的发病率却很低，这一现象与 HP vacA 基因中缺少 sla 亚型有一定关系。

在亚洲不同地区也存在 vacA 基因类型分布的多样性。在日本，Ito－Y 等[12]分析了 87 例病人(包括胃炎、十二指肠溃疡、胃溃疡、胃癌)中分离的 HP 的 vacA 基因型，84/87 为 sla/ml、1/87 为 slb/ml 型，0.73kb 中间区域 m 在 Tox^+ HP 和 Tox^- HP 中的分布没有显著性差别，结果表明：sla/ml 型 HP 感染在日本很普遍，vacA 基因类型与临床结果没有关系。在中国，对从消化性溃疡、胃炎病人胃粘膜中分离的 HP 进行 PCR 和 DNA 序列分析表明，95/96 带有 sla 基因、78/96 带有 m2 基因、14/96 带有 mlb 基因，另外有 4/96 是不常见的 ml 与 m2 杂合型(近端为 mlb 型，远端为 m2 型)。经分析，在从中国人分离的 HP 菌株中，mlb、mlb－m2 型 HP 有较高水平的细胞毒活性，但 vacA 等位基因与疾病没有关联性[13]。在中国台湾地区，Wang 等[14]分析了从该地区分离的 HP 的基因型，104/119 株为 sla/m2 型、13/119 株为 sla/mlT 型(与 sla/ml 有较大的同源性)、2/119 株为 sla/mlTm2 嵌合型，据分析，在台湾人中 sla/mlT HP 比 sla/m2HP 有更高细胞毒活性和更大的溃疡发生趋势。

HP vacA 基因型分布的地域性，揭示了特定基因型 HP 感染在一定地区的高发性，这对于该地区制定特异性预防产毒性 HP 感染的措施有重要价值。

1.4 vacA 基因类型在不同疾病中分布的多样性

在同一地区内，vacA 基因型在不同疾病中分布也有差异。从消化性溃疡、胃炎、胃癌患者分离的 HP 菌株中，Rudi 等[15]通过 PCR 法检测，发现 sl 型占 83.1％、s2 型占 15.4％，且 s1/m2 和 s1/m1 的发生率高于 s2/m2。结果表明，s1 型与消化性溃疡的发生、VacA 的表达有密切关系，同时 s1 型还与严重胃炎存在相关性。Van 等[10,16]的研究表明了消化性溃疡和胃癌的发生与 s1 型(sla、slb)有明显的关联性，但与 m 型不相关，并认为 vacA sl 型基因是 HP 容易导致消失性溃疡的标志。

Miehlke 等[17]研究了从低分化胃粘膜相关淋巴瘤病人分离 HP vacA 的基因类型，s1/m1 及 s1/m2 这两种嵌合体分别以 44％和 30％的比例在胃粘膜相关淋巴瘤中检测到，在对照胃炎组中，这两种嵌合体分别以 26％和 56％的比例检测到，vacA s1 型在这两种 HP 相关疾病中检出率无显著性差别。结果表明，vacA 基因的 s1 型可能对 VacA 的表达是必需的，但 vacA S1 型基因的检出不能预测细胞毒活性的存在，HP 细胞毒活性与低分化胃粘膜相关淋巴瘤的发病无关。

据 Atherton 等[18]报道，vacA sla 株比 slb、s2 株引起的胃窦粘膜内中性粒细胞和淋巴细胞浸润更严重，ml 型比 m2 型引起的胃表皮细胞损伤更严重，并认为 vacA 基因的 s1 型与加重胃炎和消化性溃疡相关联，s2 型与轻型炎病和溃疡发生率低有关。vacA 基因型在不同疾病中分布的多样性，揭示了特定基因型 HP 与相关疾病之间的联系，对探讨 HP 相关疾病的发病机制有重要意义。

2 HP VacA 的生物学特性

HP 空泡毒素是由 vacA 基因编码的一种蛋白质毒素，具有 33 个氨基酸的信号序列、87KD 的毒素活性部分、50KDa 的 C 末端区域，VacA 的结构与致病性奈瑟氏菌和流感嗜血杆菌产生与 IgA 蛋白酶相类似。研究发现，vacA 基因编码的 140KDa 前体蛋白由 3KDa 的前导肽介导通过细菌的内膜，前导肽则留于内膜中，再通过 C－末端插入外膜中，使 87KDa 有活性的 VacA 转运至细胞外，C－末端仍保留在外膜中，从而完成 VacA 的分泌[19]。

Lanzavecchia 等[20]研究结果支持 VacA 是一种 A－B 型外毒素的假说，由两个亚单位(37KD、58KD)组成一个外毒素分子，两个亚单位之间由一个暴露的环状结构相连，这个环状结构容易被蛋白酶水解。分子量较少的亚单位呈不规则的环状分布

维普资讯 http://www.cqvip.com

在分子表面,这样有利于毒素分子的稳定。

Cover 等[21]研究发现,纯化的 VacA 分子通过电子显微镜呈像为直径约为 30nm 的六角形"花"样结构,每一个这种结构由 6 个直径约为 6nm 的球形花瓣包绕直径为 15nm 的中心环构成。在酸性环境中,这些寡聚体"花"样结构离解成 12 个"泪滴状"的亚单位,每一个亚单位大小约为 6×14nm。甘油密度梯度离心结果表明,中性 PH 条件下 VacA 沉淀系数约为 22S,酸性 PH 条件下,由于 VacA 的离解,其沉淀系数变为 5S,免疫印迹和电镜观察分析表明:5S 的成份就是大小为 6×14nm、分子量为 90KDa 的"泪滴状"的 VacA 亚单位。结果证实,完整的 VacA 寡聚体由 12 个 90KDa 的亚单位组成,每 6 个亚单位结合在一起,然后相互重叠形成"花"样结构,这种立体构象与 Lupetti 等研究结果不一致。Lupetti 等认为:VacA"花"样结构是由 6 个 90KDa 亚单位构成的平展结构,Cover 等认为这种平展结构是 12 个亚单位"花"样结构在酸性条件下水解后形成的。VacA 在接触和进入靶细胞以前,由于暴露于酸性 PH 条件下而解离为有较强细胞素活性的平展结构,从而发挥细胞毒作用,这是 VacA 的一个重要特征。

3 VacA 作用机制

3.1 VacA 的致空泡化作用

HP 分泌出 VacA 后,通过 VacA 的 58KDa 片段结合到靶细胞特异受体上,3h 后进入靶细胞,4h 后细胞内开始出现空泡[22]。由于 HP 存在于胃内酸性环境中,当 PH 值≤5 时,VacA 会改变其形态,从而暴露其疏水部分,毒素的两个亚基都插入到靶细胞脂质双分子层中,与磷脂的脂肪链相互作用,从而进入靶细胞[23]。在正常真核细胞内,细胞膜可内陷形成核内体,然后与内质网、高尔基复合体等细胞器融合形成核内体小泡。在 VacA 作用下,这些膜性结构包绕毒素、受损细胞器,然后与初级溶酶体融合形成次级溶酶体,次级溶酶体释放各种消化酶,分解细胞器和细胞碎片,核内体膜逐渐失去细胞器功能[24,25]。VacA 的靶损伤部位是核内体膜上的 H^+-K^+ ATP 酶,由于核内体膜离子转运功能的紊乱,空泡内呈酸性,环境中的 NH_4^+ 等弱碱性离子则通过膜进入核内体小泡并浓缩聚集,通过渗透作用使空泡扩大。另外由 NH_4^+ 介导的核内体膜的相互融合也使空泡扩大,形成镜下可见的空泡[26,27]。Kimura 等研究发现[28] VacA 可损伤线粒体,导致 ATP 水平随时间降低,这种作用可被 bafilomycinA1 抑制,VacA 通过对线粒体破坏使细胞能量代谢失衡,最终导致靶细胞变性死亡。

3.2 VacA 干扰组织细胞损伤修复机制

在正常条件下,表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)可促进胃粘膜上皮细胞的生长,EGF 与上皮细胞的受体结合后的信号传递对于细胞增殖和溃疡愈合是必需的。Pai 等研究发现 HP VacA 可干扰 EGF 信号传递过程,故可抑制胃粘膜损伤的修复,促进了胃酸相关性疾病的发生[29]。

3.3 VacA 对机体免疫的影响

Molinari 等[30]研究了 VacA 对抗原处理细胞前溶酶体内抗原呈递过程的影响,结果表明,vacA 可以干扰破伤风毒素和破伤风类毒素在溶酶体内的蛋白水解作用,特异性抑制由 MHC-II 类抗原介异的抗原呈递过程,表明 VacA 可干扰机体保护性免疫而有利于 HP 在胃内的持续性感染,引起相应的临床表现。

4 结 语

近年来随着对 HP 在分子水平上研究的深入,HP 空泡毒素从编码基因、分子特性及对体内外细胞的作用等方面逐渐被人们所了解。vacA 基因多态性研究,揭示了该基因是由不同信号序列和中间区域等位基因构成的嵌合体。Tox^+ HP 与 Tox^- HP 在基因结构和转录水平上都存在差异,vacA 基因型分布具有地区差异性和疾病相关性。VacA 分子生物学特性及作用机制的研究,展示了 VacA 分子的构象及其在胃内独特环境中所具有的特性,从 VacA 对细胞的损伤、对机体损伤修复机制及免疫机制的干扰等方面揭示了 VacA 促进 HP 相关疾病发生的机制。这些研究成果为进一步探讨 VacA 与消化性溃疡等疾病的因果关系及致病机理打下了基础,为 HP 感染的预防、诊断、治疗提供了帮助。

参 考 文 献

[1] Warren JR, Marshall BJ, Normre L, et al. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium inactive chronic gastritis [J]. Lancet, 1983; I: 1273-1275.

[2] Leunk RD, Cain CC, Tsien RY, et al. Production of a cytotoxin by Helicobacter pylori[J]. Rev Infect Dis, 1991; 13 (s) 8: 686-689.

[3] Cover TL, Tummuru MKR, Cao P, et al. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among Helicobacter pylori strains [J]. J Biol Chem, 1994; 269(14): 10566-10573.

[4] Atherton JC, Cao P, Peek RM, et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori[J]. J Biol Chem, 1995; 270(30): 17771-17777.

维普资讯 http://www.cqvip.com

[5] Van Doorn LT, Figueiredo C, Sanna R, et al. Expanding allellic diversity of Helicobacter pylori vacA [J]. J Clin Microbiol, 1998;36(9):2597－2603.

[6] Han SR, Schreiber HJ, Bhakdi S, et al. VacA genotypes and genetic diversity in clinical isolates of Helicobacter pylori [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1998;5(2):139－145.

[7] Strobel S, Bereswill S, Balig P, et al. Identification and analysis of a new VacA genotype variant of Helicobacter pylori in different patient groups in Germany [J]. J Clin Microbiol, 1998;36(5):1285－1289.

[8] Nagata H, Wada A, Kurazono H, et al. Application of Bead－ELISA method to detect Helicobacter pylori VacA [J]. Microb Pathog, 1999;26(2):103－110.

[9] Forsyth MH, Atherton JC, Blaser MJ, et al. Heterogeneity in levels of vaculating cytotoxin gene (VacA) transcription among Helicobacter pylori strains [J]. Infect Immun, 1998;66(7):3088－3094.

[10] Van Doorn LT, Figueiredo C, Rossau R, et al. Typing of Helicobacter pylori VacA gene and detection of CagA gene by PCR and reverse hybridization [J]. J Clin Microbiol, 1998;36(5):1271－1276.

[11] Letley DP, Lastovica A, Louw JA, et al. Allelic diversity of the Helicobacter pylori vaculaing cytotoxin gene in South Africa: rarity of the VacA genotype and nature occurrence of an s2/m1 allele [J]. J Clin Microbiol, 1999;37(4):1203－1205.

[12] Ito Y, Azuma T, Ito S, et al. Analysis and typing of the VacA gene from CagA－positive strains of Hlicobacter pylori isolated in Japan [J]. J Clin Microbiol, 1997;35(7):1710－1714.

[13] Pan ZJ, Berg DE, Van der Hulst RW, et al. Prevalence of vaculating cytotoxin production and distribution of distinct vacA alleles in Helicobacter pylori from China [J]. J Infect Dis, 1998;178(1):220－226.

[14] Wang HJ, Kuo CH, Yeh AA, et al. Vacuolating toxin production in clinical isolates of Helicobacter pylori with different vacA genotypes [J]. J Infect Dis, 1998;178(1):207－212.

[15] Rudi J, Kolb C, Maiwald M, et al. Diversity of Helicobacter pylori vacA and cagA gene and relationship to VacA and CagA Protein expression, cytotoxin production, and associated disases [J], J Clin Microbiol, 1998;36(4):944－948.

[16] Van Doorn LT, Figueiredo C, Sanna R, et al. Clinical relevance of the cagA, vacA and iceA status of Helicobacter Pylori[J]. Gastroenterology, 1998;115(1):58－66.

[17] Miehlke S, Meining A, Morgner A, et al. Frequence of vacA genotypes and cytotoxin activity in Helicobacter pylori associated with low－grade gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphoma [J]. J Clin Microbiol, 1998;36(8):2369－2370.

[18] Atherton JC, Peek RMJr, Tham KT, et al. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of Helicobacter pylori [J]. Gastroenterology, 1997;112(1):92－99.

[19] Schmitt W, Haas R, Genetic analysis of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin structural similarities with the IgA protease type of exported protein [J]. Mol Microbiol, 1994;12(2):307－319.

[20] Lanzavecchia S, Bellon PL, Lupetti P, et al. Three－dimensional reconstruction of metal replicas of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin [J]. J Struct Biol, 1998;121(1):9－18.

[21] Cover TL, Hanson Pl, Heuser JE, et al. Acid－induced dissociation of VacA, The Helicobacter Pylori vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly[J]. J Cell Biol, 1997;138(4):759－769.

[22] Garner JA, Cover TL. Binding and interalization of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin by epithelial cells [J]. Infect Immun, 1996;64(10):4197－4203.

[23] Molinari M, Galli C, De Bernad M, et al. The acid activation of Helicobacter pylori toxin VacA: structural and membrane binding studies [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998;248(2):334－340.

[24] Murakita H, Hirai M, Ito S, et al. Cytoxin and urease activities of Helicobacter pylori isolates from Japanese patients with atrophic gastritis or duodenal ulcer [J] Gastroenterol Hepatol, 1996;11:819－824.

[25] Papini E, Bugnoli M, De Bernard M, et al. Bafilomycin Al inhibits Helicobacter pylori－induced vacuolization of Hela cell[J]. Mol Microbiol, 1993;7:323－327.

[26] Ricci V, Somni P, Fiocca R, et al. Helicobacter pylori vacuolating toxin accumulates within the endosomal－vacuolar compartment of cultured gastric cells and potentiates the vacuolating activity of ammonia [J]. J Pathol, 1997;183(4):453－459.

[27] Cover TL, Reddy LY, Blaser MJ, et al. Effects of ATPase inhibitors on the response of Hela cells to Helicobacter pylori vacuolating toxin [J]. Infect Immun, 1993;61(4):1427－1431.

[28] Kimura M, Goto S, Wada A, et al. Vacuolating cytotoxin purified from Helicobacter pylori causes mitochondrial damage in human gastric cells[J]. Microb Pathog, 1999;26(1):45－52.

[29] Pai R, Wyle FA, Cover TL, et al. Helicobacter pylori culture supernatant interfers with epidermal growth factor－activated signal transduction in human gastric KATOIII cells[J]. Am J Pathol, 1998;152(6):1617－1624.

[30] Molinari M, Salio M, Galli G, et al. Selective inhibition of T－dependent antigen presentation by Helicobacter pylori toxin VacA[J]. J Exp Med, 1998;187(1):135－140.