DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.032



综述

文章编号:1000-5404(1999)10-0772-03

# 幽门螺杆菌的毒力研究进展*

# Progress on the virulence of *Helicobacter pylori*

毛旭虎** 综述 邹全明 审校 (第三军医大学医学检验系临床微生物学教研室)重庆,400038

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,Hp)感染是慢性胃炎和消化性溃疡的主要病因,Hp也被认为是胃癌和淋巴瘤的重要危险因子。然而这些疾病仅发生在15%的感染患者中。感染者发生疾病与Hp菌株的毒力、宿主遗传易感性、环境因素等都有关,其中毒力是细菌致病的第一特征。因此,认识Hp的毒力对了解其致病性有着重要意义。

90年代,随着分子生物学技术的飞速发展,包括PCR、基因克隆与表达,突变序列分析、脉冲电场凝胶电泳(Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)等,有关Hp的遗传学知识越来越丰富。到目前为止,人们已成功绘制Hp的物理图谱和遗传图谱,Hp基因组全序列的测定工作业已完成[1],许多有重要生理和病理意义的基因如尿毒酶基因、空泡毒素基因、细胞毒性相关基因、热休克蛋白基因、16 s、23 s、5 s、rRNA基因等相继被克隆并鉴定。这些都有力地推动了Hp致病机制的研究。现就近年来Hp毒力的研究进展作一简要的综述。

## 1 空泡毒素(Vacuolating cytotoxin, VacA)

### 1.1 概述

1988年Leunk等证实有些Hp菌株的培养上清液含有能介导许多上皮细胞系发生空泡样变的毒素蛋白,同时在人体内也观察到了Hp致胃粘膜细胞的这种空泡变性作用,至1992年Timethyl等才首次通过色谱法分离纯化了此蛋白,并命名为空泡毒素,简称VacA。VacA的结构现已确定,编码它的基因vacA也已克隆并测序。

### 1.2 VacA的表达

1.2.1 vacA基因 vacA基因全长约3.9 kb,由3部分组成。根据编码N-端信号肽序列的等位基因其后1/2的不同分为sla、slb、s2 3种基因型,根据编码VacA的结构基因其C-端部分中间区序列的不同又可分为m1、m2 2种基因型。3种s等位基因型与2种m等位基因型重组可形成除s2/m1外的5种vacA基因型。不同vacA基因型与其毒性密切相关。

1.2.2 VacA的合成过程 vacA基因最初转译合成的是VacA的前体,再进一步加工成完整的具有活性的毒素蛋白。VacA的前体由N-端的33个氨基酸组成的信号肽、$87\times10^3$u的VacA单体以及C-端的多肽组成,分子量为$139\times10^3$u,约1 300个氨基酸,不同菌株间VacA的氨基酸数目有所不同。其中信号肽在毒素穿越胞质膜过程中起识别作用,尔后被切割,C-端多肽在毒素穿越细菌外膜过程中被分割,其作用是在毒素分泌之前于外膜上形成一个小孔,有利于余下多肽通过。中间$87\times10^3$u的VacA由2个亚基通过非共价键紧密相连,N-末端的亚基分子较小,为毒素的生物活性部位,其氨基酸序列与参与细胞离子转运的ATP酶的内部片段有一定的同源性;C-末端亚基的分子较大,能识别靶细胞膜上的受体并与Hp的粘附有关。6~7个这种VacA的单体呈花瓣形聚集成为成熟的毒素分子[2]。成熟的毒素分子特别适应存在于胃环境中,并在胃中被激活,激活后的毒素分子便能引起上皮细胞空泡样病变且毒素分子被激活后变得更能耐酸和耐胃蛋白酶,这或许是$VacA^+$ Hp菌株容易导致胃粘膜细胞损伤的原因之一。

### 1.3 VacA与疾病的关系

1.3.1 VacA引起空泡变性的机制 VacA可能通过干扰细胞内离子转运蛋白即空泡型ATP酶的功能造成跨膜pH梯度的形成与细胞内代谢产物的积聚,使之不能透过细胞膜而渗透性地吸水形成空泡。加入空泡型ATP酶抑制剂Bafilomycin,能抑制或逆转空泡的形成。除作用于空泡ATP酶外,空泡毒素还可作用于$Na^+$-$K^+$-ATP酶,抑制该酶的活性造成细胞水肿。

1.3.2 VacA可能在慢性胃炎→胃溃疡→癌前病变→胃癌的发展过程中起重要作用 在观察Hp的体外空泡作用形成作用时发现,从溃疡病、萎缩性胃炎患者分离的Hp分离株其空泡形成能力远比浅表性胃炎分离株高。Tee等也观察到几乎所有的胃癌患者所分离的Hp为$VacA^+$,胃溃疡病中分离的Hp 67%为$VacA^+$,而非溃疡病中分离的Hp$VacA^+$仅为30%。由此可见VacA在Hp毒性中的重要性。

1.3.3 vacA基因型与Hp毒性的关系 所有的Hp都含有vacA基因,但仅40%Hp菌株具有毒性,这与vacA的基因型有密切关系。病理研究发现:①vacA m1型株损伤胃上皮细胞的程度要比m2型深;②vacA s型株比m型株更与粘膜炎症细胞浸润关系紧密;③在vacA s型中sla型株引起炎症的严重程度要高于slb或s2型。临床上VacA sla基因型Hp绝大多数都是从有溃疡史的病人中分离到的,很少从溃疡病人中分离到s2型株。为什么vacA s基因型显得如此重要还不清楚,人们推测它或许是毒素产生水平的一个标志。当然这只是一些初步的结论,还有待更深入的分子生物学研究及更广泛的流行病学调查来证实。

* 国家"九五"重点科技攻关项目及全军"九五"医药卫生科研基金资助项目,No. 96-901-01-54;98D044

** 毛旭虎,男,30岁,讲师,博士研究生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 2 细胞毒相关 A 蛋白(Cytotoxin-associated gene A protein，CagA)和细胞毒相关基因(cytotoxin-associated gene，cag)毒力岛

### 2.1 CagA

2.1.1 CagA 蛋白　最初描述 CagA 是人们在研究 Hp 的空泡形成作用时，除发现 VacA 与空泡作用有关外，还发现另外一种分子量为 $128\times10^3$u 的蛋白质经常与空泡毒素同时存在，即在有毒株 Hp 中更常见。由于此种蛋白与 VacA 经常同时出现且更常见于有毒株，故将其命名为幽门螺杆菌细胞毒素相关 A 蛋白(Cytotoxin-associated gene A protein)简称 CagA。

2.1.2 cagA 基因　编码 CagA 毒素蛋白的 cagA 基因长约 4.9 kb，含有同向重复序列(Direct repeat，DR)，不同的 Hp 菌株 DR 的数目有所不同[3]。并不是在所有的 Hp 均具有 cagA 基因，一般不表达 CagA 蛋白的 Hp 菌株缺乏 cagA 基因。另外，cagA 虽然名为细胞毒素相关基因，但 cagA 基因并非空泡毒素表达所必需，它与 vacA 基因是分别表达的，cagA 基因的破坏并不影响 VacA 的活性及产生。

2.1.3 CagA 的致病性　CagA 在 Hp 中含量虽然甚微，却能引起强烈的免疫应答。临床资料表明，$CagA^+$ Hp 菌株更能导致胃粘膜组织强烈的炎症反应，体外细胞培养也证实 CagA 能刺激胃上皮细胞系产生大量的炎症细胞因子白细胞介素 8(Interleukin 8，IL-8)。另外，CagA 可能还与毒力增强有关，90%～100%的十二指肠溃疡患者分离的 Hp 为 $CagA^+$，而仅 50%～60%的浅表性胃炎病人分离的 Hp 为 $CagA^+$。

### 2.2 cag 毒力岛(cag pathogenicity island，cag PAI)

2.2.1 cag PAI 基因　对 cagA 周围的核苷酸序列分析显示 cagA 基因位于一簇基因的右末侧，这个基因群约含 40 个基因，通常作为一组呈现或缺失，编码许多毒力相关蛋白。Hp 染色体上这些编码毒力相关基因簇的 DNA 片段称为 Hp 的 cag PAI。cagA 只是 cag PAI 上的一个基因。cag PAI 长约 40 kb，位于谷氨酸消旋酶基因(Glutamatase racemase gene，glr)中，含有 29 个开放性阅读框(Open reading frame，ORF)，按顺序分别以字母 A、B……命名。cag PAI 在有些菌株被插入序列(Insert sequence，IS)605 分隔为 cag Ⅰ、cag Ⅱ 2 部分[4]。

2.2.2 cag PAI 特点　Hp 的 cag PAI 和其它细菌如大肠杆菌(*E. coli*)、沙门氏菌、耶尔森氏菌中发现的毒力岛有许多相同的特点[5]。①含有编码细菌毒力的基因簇；②核苷酸组成与其它基因有明显差异，cag 区(G+Cmol)%平均为 35%，而 Hp 染色体基因平均(G+Cmol)%为 38%～45%；③毒力岛两侧有同向重复序列，长约 31 bp，有的还含有插入序列 IS605，它编码与基因重排有关的转座酶(Transposases，Tnp)A 和 B，tnpA 与 *E. coli* 转座酶基因 IS200 核心序列明显相似，tnpB 与嗜热细菌 *PS3* 中转座酶基因同源性也甚高[3]；④遗传相对不稳定性等。

### 2.3 生物学意义

2.3.1 与毒力因子和致病性的关系　具有 cag PAI 的幽门螺杆菌株比 $cag^-$ 菌株与胃炎、消化性溃疡及胃癌关系更为紧密。$Cag^+$ 菌株诱导胃粘膜细胞产生大量炎症细胞因子如 IL-8 等，现已知 IL-8 基因表达的激活是受核转录因子 κB(Nuclear transcript factor，NF-κB)调节，cag PAI 编码至少 6 种外膜蛋白可激活 NF-κB，从而增强 IL-8 的表达[6,7]。与已知一些细菌毒力岛的核酸序列比较，cag 毒力岛编码与许多原核分泌途径相似的蛋白，包括Ⅳ型分泌系统(VirB4，PtlC，TraB，TraH 和 TrbE)，参与物质转运出细菌外周膜或在细菌表面的表达[3]。这些基因突变或缺失会降低 Hp 介导上皮细胞产生 IL-8 的能力，推测此分泌系统可能转运一种或多种能刺激上皮细胞产生 IL-8的因子。cag 区的一些基因发生突变或缺失，Hp 会丧失或减低破坏上皮细胞基底层以及细胞骨架等的能力；同时它在体外生长的能力也受到影响。

2.3.2 与细菌进化的关系　Hp cag PAI 不仅与其致病性和毒力有重要关系，而且在此病原体的进化过程中可能发挥作用。cag PAI 的两端具有重复序列和插入元件的结构特点，提示 DNA 重组的可能性是存在的。对近年来已鉴定的 Hp 菌株分析发现 33%的菌株含有一个 8.1 kb 的质粒，且此质粒 G+C 含量与 cag PAI 的非常接近。Stefano 等[3]认为 Hp 通过质粒基因的水平转移获取毒力岛并通过基因重排推动其进化，例如 vacA 基因的进化，不管Ⅰ型和Ⅱ型 Hp 菌株都存在 vacA 基因，只是在Ⅱ型菌株中 vacA 基因可能不表达或仅表达没有毒性但有免疫性的毒素分子。Hp 基因组序列在种间同源性达 87%以上，而 vacA 核苷酸序列相似性只为 50%～60%，Hp 通过获取毒力岛以及 IS 的插入，随后染色体内基因发生重组，恢复或产生 VacA 毒性决定簇。不同的基因突变会产生大量的幽门螺杆菌准种，这也就是我们今天在临床分离中所见的 vacA 遗传多样性。其它毒力因子的进化也是如此。当然，IS605 介导的基因移位和缺失产生大量的具有毒性性状的中间型细菌，同时也可能会出现 cag Ⅰ、cag Ⅱ 片段缺失的情况，这样的表型也就是临床分型中的Ⅱ型幽门螺杆菌。

### 2.4 CagA、cag PAI 与 VacA 的关系

临床分析发现 $CagA^+$ 菌株通常是 VacA sla 或 slb 基因型，这些细菌也常常是有毒性的，而 $CagA^-$ 菌株通常 VacA s2 基因型，这些细菌又常常是非毒性的[8]。虽然这种现象不是绝对的，但例外很少见，提示 CagA 的表达与 VacA 基因型之间存在某种关系。为什么出现这种遗传学上的联系原因还不清楚，有人推测 cag PAI 与 VacA 存在某种功能上的联系，cag PAI 编码一种或几种蛋白质能促进 VacA 毒素的运输[8]。

## 3 中性粒细胞激活蛋白(Neutrophil activation protein，NAP)

### 3.1 NAP 作为一种毒力的证据

Hp 在体外除能刺激上皮细胞产生 IL-8 外，还能直接激活中性粒细胞。实验证实，约 50% Hp 菌株能激活中性粒细胞介导快速、强烈的呼吸爆发，另有 50%的菌株介导的呼吸爆发缓慢、较弱，且前者比后者在胃溃疡病例中更常见。虽然 Hp 直接激活中性粒细胞的分子机制还不清楚，但从 Hp 中已分离纯化并鉴定出一种分子量为 $150\times10^3$u 的蛋白至少部分能引起中性粒细胞的呼吸爆发效应，称为 Hp-NAP。它由 10 个 $15\times10^3$u 的亚基组成，编码此亚基的基因(napA)已被克隆和测序。支持 Hp-NAP 作为一种毒性因子的证据主要有：①纯化的这种 Hp-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

NAP具有激活中性粒细胞产生氧自由基、粘附培养的内皮细胞等能力，且这种行为呈剂量依赖关系；②Hp的水溶液提取物亦具有以上作用，且这种影响能被抗NAP特异抗体所阻断。不支持的理由是：①不同Hp菌株的水溶液提取物刺激中性粒细胞趋向内皮细胞的能力不同，但从胃溃疡患者中分离的Hp菌株与从非溃疡患者中分离出的有些菌株的这种能力差别又不大；②napA的核苷酸序列与一些编码胞浆蛋白的基因具有同源性，而这些胞浆蛋白通常又不认为与中性粒细胞激活有关。因此，Hp-NAP作为一种重要的毒力因子还有待于更进一步的证实[9]。

### 3.2 NAP与VacA、CagA的关系

Hp-NAP与VacA、CagA的关系目前还不清楚，只是发现从临床上分离到的具有强烈的中性粒细胞激活作用的Hp菌株通常是有毒的，且毒性强；而具有VacA毒素的Hp菌株似乎并不都具有强烈的中性粒细胞激活作用。另外，从溃疡病人中分离的非毒性株激活中性粒细胞的能力要比非溃疡病人中分离到的非毒性株要强[10]。这表明毒素与NAP的作用有一定的相关性，但没有直接的因果联系。

## 4 铁清除系统(Iron-scavening system)

和其它病原菌一样，Hp为了在宿主中生存可能也需要铁清除系统[10]。对Hp基因组序列分析发现，Hp有比人们预先想象要多得多的用于编码铁清除系统的基因，推测在Hp中有四套摄取利用铁的系统：第1套类似于*E. Coli*的由铁载体介导的摄取铁的fec系统，其不同于*E. coli*之处在于Hp缺乏FecR和FecI调节蛋白且其调节蛋白没有形成单一的操纵子结构，另外还分别有3个拷贝的fecA、exbB、exbD；第2套是类似于*E. coli*的厌氧feo系统，此系统没有feoA，但含有feoB样基因，提示Hp可以利用$Fe^{2+}$；第3套是由3个frpB基因组成的能编码合成类似血红素或乳铁蛋白的铁结合蛋白的系统；第4套是合成细菌铁蛋白和非血红素胞浆含铁铁蛋白的系统，用于铁的贮存。Hp具有多条铁清除途径，说明铁对Hp在胃中生存起着一个关键的作用。这可能是Hp适应宿主生存而不断进化的一种表现。

## 5 其它

Hp通过其膜上的极性开关及形成带正电的内环境创建一个正外膜电位，阻止$H^+$进入。带正电的内环境形成由$H^+$移位P型-ATP酶产生质子扩散电位与阴离子转运体将负电离子外逸共同完成[11]。

虽然Hp缺乏像在*E. coli*，*S. tryphimurium*等菌中能被酸诱导表达的一些同源性基因如氨基酸脱羧酶、甲酸脱氢酶等，但当细胞外pH从7.5下降到3.0时，观察到Hp的某些蛋白成分发生了改变，如一些毒因子、外膜蛋白、传感器调节子等，这些蛋白可能就是酸诱导的，它们在保护Hp在酸性环境中生存可能也起到一定作用[12]。

对Hp编码的蛋白质分析发现70%的蛋白pI>7.0，而在*E. coli*，*H. influenza*中仅为40%，且其碱性氨基酸在Hp的蛋白中出现的频率为*E. coli*，*H. influenza*的2倍，这或许也是Hp适应胃酸性环境的一种表现[1]。

总之，Hp具有多种毒力因子。随着分子生物学技术的发展，对Hp毒力的研究将会越来越深入。这将有助于阐明Hp的致病机制，为Hp的预防和治疗提供理论基础。

**关键词** 幽门螺杆菌；毒力

**中图法分类号** R378.2 **文献标识码**：A

## 参考文献

1 Tomb J F, White O, Kerlavage A R, *et al*. The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature, 1997, 388(7): 539

2 Luprtti P, Heuser J E, Manetti R, *et al*. Oligomeric and subunit structure of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin. J Cell Biol, 1996, 133(4): 801

3 Censini S, Lange C, Xiang Z Y, *et al*. Cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(25): 14648

4 Kersulyte D, Chalkauskas H, Berg D E. Emergence of recombinant strains of Helicobacter pylori during human infection. Mol Microbio, 1999, 31(1): 31

5 Hacker J, Blum-Oehler G, Muhldorfer I. Pathogenicity islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbiol evolution. Mol Microbiol, 1997, 23(8): 1089

6 Sharma S A, Tumuru M K, Blaser M J, *et al*. Activation of IL-8 gene expression by Helicobacter pylori is regulated by transcription factor-Kappa B in gastric epithelial cell. J Immunol, 1998, 160(5): 2401

7 Glocker E, Lange C, Covacci A, *et al*. Proteins encoded by the Cag pathogenicity island of Helicobacter pylori are required for NF-Kappa B activation. Infect Immun, 1998, 66(5): 2346

8 Atherton J C. CagA, the Cag pathogenicity island and Helicobacter pylori virulence. Gut, 1999, 44(3): 307

9 Atherton J C. Helicobacter pylori virulence factors. Br med Bull, 1998, 54(1): 105

10 Zhang Q B, Nakshabendi I M, Mokhashi M S, *et al*. Association of cytotoxin production and neutrophil activation by strains of Helicobacter pylori isolated from patients with peptic ulceration and chronic gastritis. Gut, 1996, 38(6): 841

11 Labigne A, de Reuse H. Determinants of Helicobacter pylori pathogenicity. Infect Agents Dis, 1996, (5): 191

12 Mcgowan C C, Cover, T L, Blaser M J. Helicobacter pylori and gastric acid: Biological and therapeutic implications. Gastroenterology, 1996, 110(3): 926

(收稿：1999-05-04；修回：1999-09-22)

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net