

# 幽门螺杆菌基因组特征及研究进展

杨贵珍<sup>1,2\*</sup>, 刘钟滨<sup>1</sup>, 郭晓奎<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 同济大学医学院微生物教研室, 上海 200331; <sup>2</sup> 上海第二医科大学微生物教研室, 上海 200025)

**摘要:** 幽门螺杆菌是胃相关疾病: 慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌和 MALT 淋巴瘤的一个重要的病原体。其毒力因子包括: 尿素酶、鞭毛蛋白、粘附素、细胞毒素相关蛋白和空泡毒素等, 通过对全基因序列分析研究, 对幽门螺杆菌的致病机制有了进一步的了解。

**关键词:** 幽门螺杆菌; 基因组

**中图分类号:** R378.2    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-9977(2004)01-15-04

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是1983年由 Warshall 和 Warren 首次分离得到的一种螺旋状、微需氧、主要定植于人胃黏膜的革兰阴性菌<sup>[1]</sup>。越来越多的研究证据表明, *H. pylori* 感染与慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃癌和 MALT 淋巴瘤等密切相关, 被 WHO 确定为第 I 类致癌因子。1997 年, Tomb 等人<sup>[2]</sup>在世界上首次完成第一个 *H. pylori* 菌株: 26695 全基因序列的测定分析工作, 大大促进了 *H. pylori* 基因组的研究进展, 对其毒力因子: 尿素酶、鞭毛、细胞毒素相关因子 A、黏附素和细胞空泡毒素的功能有了进一步的认识, 为全面了解 *H. pylori* 的致病机制提供了理论基础, 为临床诊断和治疗 *H. pylori* 相关疾病提供了理论依据。本文从 *H. pylori* 基因组结构特征和功能基因组等方面来阐述近几年 *H. pylori* 基因组的研究进展。

## 1 *H. pylori* 基因组结构

不同 *H. pylori* 菌株间基因组差异很大, 用同一种限制性内切酶很难有效地切割多种 *H. pylori* 基因组 DNA。用多种内切酶同时切割同一 *H. pylori* 菌株基因组 DNA, 从得到的限制性片段长度多态性(RFLP)酶切图谱中, 可以看到几乎每一菌株都有独特的酶切图谱, 但同一菌株基因组 DNA 在培养过程中却相对稳定。以下以标准菌株 26695 来说明 *H. pylori* 基因组的结构特征。

*H. pylori* 26695 菌株染色体为双股环状 DNA, 全基因大小为 1667 867bp, 与流感嗜血杆菌相似, 仅为大肠杆菌的 1/3, 这可能与其定居于胃黏膜下层, 不能有效利用复杂有机物有关。目前已确定了 1590 个编码蛋白质的开放阅读框(ORFs), 其平均大小为

945bp, 编码区占全基因组的 91%, 与其它原核生物相似。基因组中存在两套严格的插入序列(IS): IS605(长 605bp)和 IS606(长 606bp)元件, 包括 5 个 IS605 和 2 个 IS606 全基因拷贝; 8 个 IS605 和 2 个 IS606 部分拷贝。这两个元件分别由 *tnpA* 和 *tnpB* 基因组成, 编码转座酶 TnpA 和 TnpB。另外, IS605 还与 *H. pylori* *cagA* 毒力岛的基因重组有关<sup>[3]</sup>。用限制性内切酶进行酶切分析发现, 基因组中有 5 个 G+C 含量不同的区域, 平均 G+C 含量为 39%<sup>[4]</sup>。其中 1 区和 3 区含有一个或多个 IS605 拷贝, 两侧分别为 5S rRNA 和 521bp 的重复序列; 2 区为 *cagA*-PAI 区, 两侧为 31bp 的重复序列; 4 区为编码  $\beta$  和  $\beta'$  rRNA 聚合酶区; 5 区包含了 DNA 加工、修饰有关的基因。

从 *H. pylori* 26695 菌株基因组中已克隆到了 50 多个看家基因。tRNA 基因有 36 种, 由 7 个基因簇和 12 个单拷贝基因组成; rRNA 基因由两套独立的 23S-5S rRNA 基因、16S rRNA 基因、一个 5S rRNA 单拷贝基因和一个结构 RNA 基因组成。在 *H. pylori* 基因组中, 23S rRNA 和 5S rRNA 基因通常连接在一起, 而 16S rRNA 基因与 23S/5S rRNA 基因簇间常间隔有其他基因。与 23S/5S rRNA 基因簇相连的是一段 6kb 的重复序列, 此重复序列包含约有 5 个开放阅读框的操纵子, 但其编码的 5 种蛋白质与现有的蛋白质数据库间无同源性。在 *H. pylori* 染色体中, 还发现 38 个重复序列家族, 其同源性约为 97%, 长度从 0.47kb 到 3.8kb 不等, 其功能有待进一步研究。

收稿日期: 2003-05-28; 修回日期: 2003-08-22

基金项目: 国家教委留学归国基金

\* 通讯作者, E-mail: yanggz2003@etang.com

*H. pylori* 基因组中含有特定的基因片段, 其编码的蛋白与细菌在局部种植和固定有关, 是致病菌株所特有的, 被认为是 *H. pylori* 的毒力岛(PAI), 因为该基因位点包含 *cagA* 基因, 称为 *cagA*-PAI。在 I 型 *H. pylori* 菌株中, *cag A* 被插入序列 IS605 分裂成右侧片段 *cagI* 和左侧片段 *cagII*。*cag* 区的基因组成高度变异, 有部分或全部丢失等不稳定性表现, 从而使 *H. pylori cagA*-PAI 表现出不同的基因型, 其致病性也发生相应的改变<sup>[5]</sup>。

大约有 50% 的 *H. pylori* 含有质粒, 大小约为 1.5~40kb, 目前完整核苷酸序列已经确定的 *H. pylori* 质粒有两种, 分别是 1.5kb 的 pHPK255 和 3.5kb 的 pHPMI 80, 初步认为 pHPK255 以滚环复制方式进行复制, 而 pHPMI 80 以  $\theta$  型机制进行复制。

## 2 *H. pylori* 基因组独特性

2.1 基因组中约有 1% 的基因编码一个由 32 个外膜蛋白组成的蛋白质家族, 其中的一些蛋白质称为细胞外膜孔道蛋白(porins), 可影响 *H. pylori* 与宿主相互作用, 从而影响 *H. pylori* 的致病性。

2.2 *H. pylori* 含有 20 个以上与 DNA 限制/修饰系统有关的同系物, 在各菌株中, 这些系统微有差异, 可分为 I、II、III 型, 可能与 DNA 胞内外降解有关。

2.3 46% - 48% *H. pylori* 菌株中存在由特异序列组成的可塑区, 可塑区在 J99 中是连续区域, 在 26695 中被 600bp 的插入序列分成两个部分。

2.4 在 *H. pylori* 基因组编码的与氨甲酰基磷酸合成酶(CPS)生物合成有关, 与 DNA 限制/修饰有关的细胞表面相关蛋白和酶中, 基因出现的同源多聚体和二核苷重复区的频率较高。

## 3 *H. pylori* 26695 菌株与 J99 菌株基因组比较研究

1987 年, *H. pylori* 26695 菌株分离于英国一个慢性胃炎患者。1994 年, *H. pylori* J99 菌株分离于美国一位十二指肠溃疡患者, 现对两株全 *H. pylori* 基因组序列测定分析工作已完成。对比显示见下表 1<sup>[6]</sup>。

## 4 *H. pylori* 毒力基因及其致病机制

*H. pylori* 毒力因子包括运动力、黏附力、尿素酶活性、磷脂多糖内毒素样活性、蛋白水解酶、磷脂酶 A 等, 这些普遍毒力因子为 *H. pylori* 共有, 而另外两种毒力因子只存在 50%~60% 的 *H. pylori*, 它们是 90kDa 的细胞空泡毒素(VacA)和 120kDa 的细胞

表 1 26695 与 J99 菌株基因组比较

基因特征	J99 株	26695 株
大小	1643831bp	1667867bp
(G+C)%	39%	39%
可预测功能的	875	895
未知功能的 ORFs	275	290
幽门螺杆菌特有的 ORFs	345	367
特有的 ORFs	1406	1406
共有的 ORFs	89	117

毒素相关蛋白(CagA), 根据这两种毒力因子的基因型和表型, 将 *H. pylori* 分为两大类: 同时含有 *vacA* 基因和 *cagA* 基因, 同时表达有活性的 VacA 和 CagA 蛋白的为 I 类 *H. pylori*, 只含有 *vacA* 基因, 不含 *cagA* 基因, 不表达有活性的 VacA 和 CagA 蛋白的为 II 类 *H. pylori*。

### 4.1 尿素酶基因

Labign<sup>[7]</sup>等采用克隆技术发现尿素酶基因位于一个 4.2kb 的片段上, 以单拷贝形式存在。利用双脱氧法测序, 发现其中有 4 个开放阅读框, 分别称其为 *ureC*、*ureD*、*ureA*、*ureB*, 它们都位于一条 DNA 链上。其中 *ureA* 和 *ureB* 为结构基因, 编码尿素酶的两个结构亚单位 *UreA* 和 *UreB*, *UreC* 和 *UreD* 位于结构基因之前, 编码调节亚单位 *UreC* 和 *UreD*。在结构基因下段还存在另外 5 个 ORFs, 分别为 *ureI*、*ureE*、*ureF*、*ureG* 和 *ureH*。其中 *ureI* 是 *H. pylori* 尿素酶基因所特有的, 其编码的 *UreI* 参与 *H. pylori* 的快速和慢性耐酸机制。一方面, *UreI* 可以增强细胞内膜对尿素的通透性, 尿素酶很快分解尿素, 产生氨气而改变局部 pH 值, 达到快速耐酸的目的; 另一方面, 当 *UreI* 存在时, 可促进镍离子与脱辅基蛋白酶结合, 进一步促进尿素酶的活性, 为其慢性耐酸机制<sup>[8]</sup>。*UreD*、*UreF* 和 *UreG* 可形成 *UreD-UreF-UreG*(DFG)复合物, 使尿素酶对镍离子处于一种感觉状态, 促使镍离子有效地结合在活性部位, 是尿素酶的功能单位<sup>[9]</sup>。*UreE* 主要通过其多聚组氨酸尾巴结合细胞中的镍离子, 而在尿素酶激活过程中作为镍离子的供体。

### 4.2 鞭毛基因

编码 *H. pylori* 鞭毛蛋白的基因有 *flaA* 和 *flaB* 基因, 分别编码鞭毛蛋白的两个亚单位 *FlaA*、*FlaB*, 两者在表达时互不影响, 当 *flaA* 基因缺陷时, *H. pylori* 运动性完全丧失; 而 *flaB* 缺陷时, *H. pylori* 运动性仅部分丧失。与其他有鞭毛的肠道细菌相比, 在相同的黏稠度条件下, *H. pylori* 的游动速度



是有周鞭毛的大肠杆菌的10倍,甚至在200厘泊的黏稠溶液中,*H.pylori*还能游动,这就使得*H.pylori*在胃内容物排空之前,很快穿透胃壁黏膜表面厚厚的黏液层,达到胃黏膜上皮细胞表面定居下来,所以鞭毛蛋白是*H.pylori*定居胃黏膜并致病的一个重要的因素<sup>[10]</sup>。

#### 4.3 细胞空泡毒素基因(vacA)

Cover等人<sup>[11]</sup>克隆的vacA基因全长3846bp,由信号区(s)、中间区(m)组成的嵌合体。其中s区有s1a、s1b、s1c和s2四种等位基因;m区有m1a、m1b和m2三种等位基因。不同的*H.pylori* vacA基因其重组方式不同,其中s1/m1型菌株空泡毒活性最强,s2/m2型菌株检测不到空泡毒活性,而s1/m2型菌株介于两者之间<sup>[12]</sup>。所有的*H.pylori*菌株均含有vacA基因,但只有50%的*H.pylori*表达有空泡毒活性的VacA蛋白<sup>[13]</sup>。vacA基因编码分子量为140KDa的前体蛋白,经过氨基端和羧基端的加工修饰,形成95KDa的成熟毒素VacA。在酸性条件下,毒素可进一步蛋白水解为37KDa的激活亚单位P37和58KDa的结合亚单位P58<sup>[14]</sup>。VacA可引起胃上皮细胞等真核细胞空泡样变<sup>[15]</sup>,最终导致细胞死亡,损伤胃黏膜,是胃炎、胃溃疡的重要致病因子,与胃癌密切相关。VacA致细胞空泡化的机制目前还不是很清楚,通过间接免疫荧光技术和流式细胞分析技术发现,VacA可与与之有高亲合性的细胞表面受体: $\alpha$ 和 $\beta$ 酪氨酸磷酸酶结合,使酪氨酸去磷酸化,膜通透性增加,细胞外离子内流,细胞膨胀甚至互相融合,发生空泡样变<sup>[16]</sup>。同时,VacA+*H.pylori*培养上清(BCS)作用于胃腺癌上皮细胞SGC7901后,可使SGC7901细胞出现典型的凋亡形态学改变。RT-PCR分析发现,经VacA+*H.pylori* BCS作用的细胞,bcl-2、bax和c-myc等凋亡相关基因mRNA水平上调<sup>[17]</sup>。研究还发现,VacA或其N末端P37可转移至线粒体,诱导细胞色素C从线粒体中释放,并活化凋亡相关因子Procaspase3,使其切割底物:聚ADP核糖聚合酶(PARP),最终导致细胞凋亡<sup>[18]</sup>。

#### 4.4 细胞毒素相关蛋白基因(cag)

细胞毒素相关蛋白基因全长4821bp,编码120KDa的细胞毒素相关蛋白(Cag)<sup>[19]</sup>。由于开始人们推测Cag功能与VacA的转录及转录后折叠、胞外运输有关,认为Cag是VacA的标记物,遂命名为细胞毒素蛋白相关基因蛋白<sup>[19]</sup>。cag基因只存在于60%的*H.pylori*中,为单拷贝基因。从死亡细

胞的DNA中发现*H.pylori* cag基因在自然状态下不断发生重排,不同*H.pylori*菌株cag基因存在某些差异。从不同患者胃活组织标本中,利用PCR技术,已克隆到cagA、cagD、cagE和virB11几种基因型,且多数菌株为cagA型<sup>[20]</sup>。目前,Dattas等<sup>[21]</sup>利用cagA特异性DNA探针作菌落杂交,利用cagA特异性引物作PCR,从不同国家的水样标本中分离出一种新的cag基因型,此基因核苷酸序列与cagA有97%~98%的同源性,但这些cagA类似基因在实验室条件下有不稳定、在传代培养时会丢失的特点<sup>[22]</sup>。部分含cagA基因的*H.pylori*菌株,其cagA基因被插入序列IS605分隔成右侧的cagI段和左侧的cagII段,而使该种*H.pylori*的致病性明显增强。进一步研究发现,该种*H.pylori*的cagA基因侧面含有一段40kb的DNA序列,其两侧与31bp的重复序列相连,具有毒力岛(PAI)的典型特征,cagA-PAI是CagA毒力增强的原因之一,也是*H.pylori*进化的重要结果。感染cagA-PAI型*H.pylori*的患者,因cagA-PAI基因不同,临床结果也不一样,但Hua J等<sup>[22]</sup>的研究结果表明两者并不存在这种必然的联系。CagA可增加VacA的毒性外,还可增加胃黏膜细胞分泌IL-8,使*H.pylori*感染者胃黏膜局部多核细胞浸润及表皮退变<sup>[23]</sup>。

目前,对*H.pylori*全基因组序列分析使人们对其致病性有了进一步的了解,通过对基因组研究还能确定许多新的毒力因子,但幽门螺杆菌的研究工作已进入了后基因组时期,在酵母双杂交、质谱技术和生物信息学等方面都有了新的突破,这将是今后几年幽门螺杆菌研究的重点,由此可发现*H.pylori*感染引起胃十二指肠疾病新的机制。

#### 参 考 文 献

- [1] WARREN J R, MARSHALL B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis[J]. *Lancet*, 1983, 2: 1273.
- [2] TOMB J F, WHITE O, Kerlavage A R, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* [J]. *Nature*, 1997, 388: 539 - 547.
- [3] GE Z, TAYLOR D E. *Helicobacter pylori* molecular genetics and diagnostic typing [J]. *Bri Med Bull*, 1988, 54(1): 31 - 38.
- [4] AKOPYANTS N S, CLIFTON S W, Kersulyte D, et al. Protein analysis of the Cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* [J]. *Mol Microbiol*, 1998, 28(1): 37.
- [5] TOMASINI M L, ZANUSSI S, Sozzi M, et al. Heterogeneity of cag genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens [J]. *Clin Microbiol*, 2003, 41(3):

- 976 — 980.
- [6] R.A.Alm. Genomic-Sequence Comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* [J]. *Nature*, 1999, **397**: 176 — 180.
- [7] LABIGNE A, CUSSAC V, Courcoux P. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* gene for urease activity[J]. *Bacteriol*, 1991, **173**(6): 1920 — 1931.
- [8] SCOTT D R, MARCUS E A, WEEKS D L, *et al.* Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*[J]. *Gastroenterology*, 2002, **123**(1): 187 — 95.
- [9] MONCRIEF M B, HAUSINGER R P. Characterization of UreG, identification of a UreD-UreF-UreG complex, and evidence suggesting that a nucleotide-binding site in UreG is required for in vivo metallocenter assembly of *Klebsiella aerogenes* urease[J]. *Bacteriol*, 1997, **179**(13): 4081 — 4086.
- [10] HAZELL S L. Campylobacter and Gastritis: Association with Intercellular Spaces and Adaptation to an Environment of Mucus as Important Factors in Colonization of the Gastric Epithelium[J]. *Infect Dis*, 1996, **153**(4): 658
- [11] COVER T L, TUMMURU M K R, CAO P, *et al.* Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains[J]. *Biol Chem*, 1994, **269**(14): 10566 — 10573.
- [12] ATHERTON J C, CAO P, PEEK R M, *et al.* Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*-Association of specific VacA types with cytotoxin production and peptic ulceration [J]. *Biol Chem*, 1995, **270**(30): 17771 — 17777.
- [13] LEUNK R D, JOHNSON P T, David B C, *et al.* Cytotoxic activity in broth culture filtrates of campylobacter pylori[J]. *Med Microbiol*, 1988, **26**(2): 93 — 99.
- [14] DE BERNARD, M MOSCHIONI, M NAPOLITANI, *et al.* The Vac A toxin of *Helicobacter pylori* identifies a new intermediate filament-interacting protein[J]. *EMBO J*, 2001, **19**: 48 — 56.
- [15] HARRIS P R, COVER T L, CROWE D R, *et al.* *Helicobacter pylori* cytotoxin induces vacuolation of primary human mucosal epithelial cells [J]. *Infect Immun*, 1996, **64**: 4867 — 4871.
- [16] HIRAYAMA T. Protein tyrosine phosphatase beta,  $\alpha$  receptor for *Helicobacter pylori* vacA toxin[J]. *Keio J Med*, 2002, **51**,suppl 2: 20 — 23.
- [17] YANG Y, DENG C S, PENG J Z, *et al.* Effect of *Helicobacter pylori* on apoptosis and apoptosis related genes in gastric cancer cells[J]. *Mol Pathol*, 2003, **56**(1): 19 — 24.
- [18] ANTOINE GALMICHE, JOACHEM RASSOW, ANNE DOYE, *et al.* The N-terminal 34KDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome C release[J]. *EMBO J*, 2000, **19**(23): 6361 — 6370.
- [19] TUMMURU M K R, COVER T L, BLASER M J. Cloning and expression of a high molecular mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production[J]. *Infect Immun*, 1993, **61**(5): 1799 — 1809.
- [20] TOMASINI ML, ZANUSSI S, SOZZI M, *et al.* Heterogeneity of cag genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, **41**(3): 976 — 980.
- [21] DATTA S, KHAN A, NANDY R K, *et al.* Environmental isolates of aeromonas spp harboring the cagA-like gene of *Helicobacter pylori*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(7): 4291 — 4295.
- [22] HUA J, ZHENG P Y, YEOH K G, *et al.* The status of the cagA gene does not predict *Helicobacter pylori* -associated peptic ulcer disease in Singapore[J]. *Microbios*, 2000, **102**(402): 113 — 120.
- [23] GRABTREE J E, COVACCI A, FARMERY S M, *et al.* *Helicobacter pylori* induced interleukin 8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype[J]. *Clin Pathol*, 1995, **48**(5): 41 — 45.

## Research Progress on Genomics and Genomic Character of *Helicobacter pylori*

YANG Gui Zhen<sup>1,2\*</sup>, LIU Zhong Bin<sup>1</sup>, GUO Xiao Kui<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Medical College, Tongji University, Shanghai 200031, China;

<sup>2</sup>Department of Medical Microbiology and Parasitology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China )

**Abstract:** *Helicobacter pylori* is a pathogen associated with chronic gastritis, peptic ulcer disease, adenocarcinoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Pathogenic factors includes: Urease, Flagellin, Adhesin, CagA and VacA. We can have a better comprehend on pathogenic mechanisms of *Helicobacter pylori* through analysis of genomic sequence.

**Key words:** *Helicobacter pylori*; Genome