

幽门螺杆菌感染的分子机制

顾青^{1,2*} 朱睦元²¹浙江工商大学生物工程系, 杭州 310035; ²浙江大学生命科学学院, 杭州 310012)

摘要 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)是居留于人胃上皮组织并引起胃炎、消化性胃溃疡和胃癌的病原菌。近年来,随着幽门螺杆菌全基因组序列的报道和功能基因的研究深入,对幽门螺杆菌的感染的分子、免疫等机制逐渐阐明。现对幽门螺杆菌基因组特点和幽门螺杆菌黏附、毒性因子等对人体感染的分子机制等方面的研究进展做一综述。

关键词 幽门螺杆菌; 基因组; 感染; 分子机制

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是专性居留于人胃的一种微需氧的、呈螺旋状的革兰氏阴性细菌^[1],它是慢性胃炎、十二指肠溃疡和胃溃疡的主要致病因子,并且与胃癌的发生密切相关。发达国家大约有40%~50%的普通人群感染幽门螺杆菌,我国普通人群中感染率更高^[2,3]。多数受感染者是无症状的,只有通过活组织检查才能发现中度的炎症。大概有15%~20%的感染者发展成为严重的胃、十二指肠疾病,包括胃和十二指肠溃疡、腺癌和胃淋巴瘤。1994年世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)正式将幽门螺杆菌列为一类生物致癌因子。

幽门螺杆菌的高感染率及严重的致病性,使之成为医学微生物领域的研究热点之一。在幽门螺杆菌的致病过程中有多种致病因子参与,如何预防和根除幽门螺杆菌感染是目前临床治疗的重点。近年来,随着幽门螺杆菌全基因组序列的报道和功能基因研究的深入,对人胃幽门螺杆菌的感染的分子、免疫等机制逐渐阐明,本文就幽门螺杆菌基因组特点和幽门螺杆菌黏附、毒力因子对人体感染的分子机制以及感染过程中引起机体免疫应答的机制的研究进展做一综述。

1 幽门螺杆菌基因组概况

幽门螺杆菌有一条环状染色体,大小为1 667 876 bp,它包含一套更小的代谢基因^[4]。幽门螺杆菌26695菌株基因组的G+C含量为39%,有5个明显的富含G+C区域,其中区域1和3内包含一个或多个拷贝的插入序列IS605及5S rRNA。另外,在区域1内,还含有*VirB4*基因,该基因与编码农杆菌(*Agrobacterium*)的T-DNA的转移相关蛋

白的基因同源,也与百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)分泌百日咳毒素所必需的基因高度同源;另一个区域是Cag致病岛(Cag pathogenicity island, cag-PAI),侧翼有31 bp的重复单位结构。在幽门螺杆菌染色体上还发现8个长度在0.47~3.8 kb的重复序列家族,除重复序列7存在于间隔区外,其他都分布于编码序列之中,重复序列1、2、3及6和编码外膜蛋白(OMP)的基因密切相关。到目前为止,有5个插入序列IS605、IS606、IS607、IS608、IS609已被发现并作功能研究^[5,6]。

幽门螺杆菌J99菌株经预测有1 495个开放阅读框架(ORF),占基因组的91%,幽门螺杆菌26695菌株有1 552个ORF,有1 406个基因在J99菌株和26695菌株中都存在。比较这两个独立分离的临床菌株,显示了高度的保守性,只有7%蛋白质是有差异的^[7]。基因的平均长度为945 bp,和其他原核生物相似,大约有70%预测蛋白质的等电点(pI)大于7.0。在幽门螺杆菌中,大量的细胞包膜蛋白有着其特殊的生物学功能,可能是幽门螺杆菌适应胃酸环境所必需的。

幽门螺杆菌26695菌株和J99菌株两个基因组均包含两个16S和两个23S-5S rRNA拷贝在相同的相关位点,但幽门螺杆菌26695菌株包含了一个较远的5S rRNA。和其他的一些细菌相比,幽门螺杆菌rRNA的位置并不接近,预示了它们可能是以一个复杂的方式被调控的。两个基因组编码36种tRNA,但它们均不包含转运Asn和Glu的tRNA。

收稿日期: 2005-11-18 接受日期: 2006-04-18

国家自然科学基金资助项目(No.30300017)

* 通讯作者。Tel: 0571-88071024-8599, Fax: 0571-88053079, E-mail: guqing2002@hotmail.com

幽门螺杆菌有一套细菌的伴侣蛋白(DnaK、DnaJ、CbpA、GrpE、GroEL、GroES和HtpG),其伴侣基因转录的调节与*E. coli*不同,它没有 σ 因子,而*E. coli*有热休克 $\sigma 2$ 和 σS 上调伴侣蛋白合成。

2 幽门螺杆菌感染的分子机制

幽门螺杆菌通过许多因子的协同作用完成对胃的长期居留。幽门螺杆菌合成的尿素酶(urease)水解尿素产生的 NH_3 能中和它在胃内和胃直接接触的环境的pH;其鞭毛的运动使它能通过胃内黏液层。而当幽门螺杆菌与宿主胃细胞的LEWIS抗原接触时,能分泌致炎因子,如空泡毒素VacA等,另外,幽门螺杆菌Cag致病岛编码毒素蛋白CagA基因约40 kb的上游序列,形成type IV分泌系统,是幽门螺杆菌的一个重要致病特征。

2.1 pH的缓冲机制及黏附因子的作用

幽门螺杆菌要在人胃肠道居留,必须能适应高酸性的环境。幽门螺杆菌含有几个尿素酶基因,所表达的尿素酶是自然界为数不多的含Ni离子的金属酶,该酶能水解尿素产生 NH_3 和 CO_2 。尿素酶的生物合成由7个基因组成的基因簇所调控,其中包括尿素酶的UreA(29.5 kDa)和UreB(66.0 kDa)亚单位,以及能将 Ni^{2+} 插入到酶的活性位点的辅助蛋白等^[8]。尿素酶由6个UreA和6个UreB组成直径为13 nm的双环结构的六聚体,尿素酶产生的数量随着培养条件的变化而变化,一般可以达到总菌体蛋白的10%。幽门螺杆菌通过质子通道获得环境中的尿素^[9],尿素在尿素酶的作用下水解产生氨,中和菌体周围的酸环境,在菌的周围形成一个中性层,并且幽门螺杆菌尿素酶通过氨的产生对宿主细胞引起毒害^[10]。在幽门螺杆菌引起的发病机制中尿素酶的作用不仅仅是居留,尿素酶能进入幽门螺杆菌的氮代谢,对中性粒细胞和单核细胞均有趋化作用,使炎症反应细胞对胃上皮形成损伤,而这种趋化又能被机体尿素酶特异性抗体所抑制。另外,尿素酶被认为是引起人对幽门螺杆菌感染的免疫应答的主要抗原,尽管其免疫应答的范围和种类还不十分清楚^[11]。

幽门螺杆菌的鞭毛能使它通过胃内腔的黏液层,其向黏膜的运动受趋化因子的引导,幽门螺杆菌的*flaAI*和*wbpB*这两个基因与脂多糖的生物合成、鞭毛的装配和蛋白质糖基化有关,它们在幽门螺杆菌的发病机制上起着重要的作用,上述两个基因缺失的突变体能阻止脂多糖生物合成。*wbpB*突变体仍能产生鞭毛,而*flaAI*突变体能产生鞭毛蛋白,但无鞭毛,两个突变体都是不运动的^[12]。*flaAI*和

*wbpB*生物合成糖衍生物,使蛋白质糖基化,这些蛋白质的活性和脂多糖、鞭毛的产生及糖基调节密切相关。

幽门螺杆菌黏附于胃细胞并可能与几个蛋白质和糖脂结合。BabA是幽门螺杆菌的一个外膜蛋白,它完成人细胞的Lewis b血型组抗原的黏附过程^[13]。SabA和膜糖脂上的二聚唾液酸Lewis x(sialyl-dimeric-Lewisx, sLex)抗原相结合完成sLex媒介的黏附^[14]。另外,幽门螺杆菌的HpaA和外源凝集素也是重要的黏附因子。

幽门螺杆菌的脂多糖的O-特异性链的结构和在胃黏膜表面表达的岩藻糖基化的Lewis X和Lewis Y血型组抗原结构相似,这种抗原的拟态可能是宿主对病原体抗原的免疫耐受,诱导产生宿主自身抗体,并具有一定的黏附功能^[15]。

2.2 幽门螺杆菌感染的炎症反应机制

嗜中性粒细胞和单核炎症细胞渗透到受幽门螺杆菌感染的胃黏膜并使胃黏膜损伤^[16]。幽门螺杆菌的感染为非侵入性感染,菌体无法侵入到胃的上皮细胞内,而它的组成物和代谢物能透过上皮的屏障来诱导趋化和激活炎症细胞。胃上皮细胞经Nod1识别幽门螺杆菌,Nod1是一个专一针对革兰氏阴性细菌肽聚糖的细胞内病原识别分子,Nod1的识别对宿主受感染应答反应非常重要,在宿主的防御体系中,Nod1缺失的小鼠更易受感染^[17]。幽门螺杆菌通过type IV分泌系统向宿主递送肽聚糖而识别Nod1。一般来说,炎症活性是由幽门螺杆菌诱导胃上皮细胞所产生的IL-8等一系列细胞因子引起的^[18,19]。幽门螺杆菌嗜中性粒细胞活化蛋白是由完全相同的一个15 kDa单体组成的150 kDa的蛋白质多聚体HP-NAP,它通过氧化反应的产物所发生的细胞内的一连串激活反应而促进人嗜中性粒细胞对胃上皮的黏附。它能引起细胞质 Ca^{2+} 浓度的增加和蛋白质的磷酸化而使中性粒细胞膜功能性的NADPH酶活性增加,导致反应性氧自由基的产生。HP-NAP同时也通过组织因子和纤维蛋白溶解PAI-II抑制剂的表达,改变单核细胞凝固性纤维蛋白的溶解平衡^[20]。编码HP-NAP基因的核苷序列在不同的幽门螺杆菌中具有很大的保守性,该蛋白质属细菌铁蛋白家族,蛋白质中心有一个亚铁氧化酶结构,可作为白细胞活化的催化剂。

2.3 毒性因子

空泡毒素A(vacuolating cytotoxin A, VacA)是由*vacA*基因编码的95 kDa蛋白质,可使细胞发生空泡变性^[21]。VacA不仅是幽门螺杆菌的一个非常

重要的毒性因子, 而且它也是人感染幽门螺杆菌而激发免疫应答的重要抗原。

VacA 的分泌需要一个氨基端 33 个氨基酸组成的信号肽的作用, 这个信号肽可以直接引导蛋白质从细胞质到细胞周质的分泌。分泌的蛋白质由两个截然不同的部分构成, 该蛋白质的氨基端为 37 kDa, β 折叠, 这个区域含一个 32 个残基的疏水片段, 具有插入到细胞膜的功能^[22]; 另外的 58 kDa 部分由两个结构域组成, 一个是非常保守, 另一个是可变的^[23]。VacA 主要在胃的上皮层顶端和黏膜层之间的有限空间释放, 所以它不需要 VacA 高亲和性受体的存在。事实上, 在 HeLa 细胞上存在着与 VacA 结合的不饱和的低亲和受体, 并且不同的群体有不同的受体^[24]。不管是什么结合模式, VacA 进入到细胞质膜是以低电导率的特异的阴离子通道来完成的^[25]。这些通道的电生理学特性和 VacA 在低 pH 活化下所形成的平面双脂分子层的六聚体通道极为相似。低 pH 环境能使 VacA 低聚物形成单体, 暴露其疏水部分插入胃上皮细胞膜, 并通过细胞分裂素 D 使其内化。VacA 在胞浆内所诱导的空泡是酸性的, 因为其膜上包含了空泡 ATP 酶质子泵, 这也是空泡形成的要素^[26]。在晚期的内含体, 空泡 ATP 酶质子泵建立了一个电化学质子梯度, 选择性的离子通道活性的增强和空泡 ATP 酶的作用, 导致泡内质子的积聚。另外, 超高表达的 VacA 氨基端部分和线粒体内生蛋白联合, 使细胞色素 c 释放而导致胃上皮细胞程序性死亡。不过 VacA 引起空泡形成和诱导细胞色素 c 释放是两个独立的过程^[27]。VacA 诱导的空泡对细胞生理的影响是导致发病和使幽门螺杆菌存活的主要因素。在内吞过程中, 它引起蛋白质水解的显著减少, 包括抗原水解过程中所需要的抗原决定簇的产生。由于在幽门螺杆菌感染的胃黏膜中 VacA 特异性 CD4⁺ T 细胞低频出现及持续的感染下调特异性 CD8⁺ T 细胞应答, VacA 抑制了 T 细胞克隆和抗原决定簇的产生, 从而延长了毒性感染^[28]。VacA 通过对 IL-2 转录的下调引起 T 淋巴细胞活性的抑制是幽门螺杆菌引起人胃慢性感染重要原因之一^[29]。

幽门螺杆菌通常是以 *cag*⁺ 和 *cag*⁻ 来分类的, 其染色体中致病岛有 40 kb, 包含了大约 30 个基因, 称为 Cag-PAI^[30]。所谓致病岛(PIA)是指一些细菌能通过交换或水平转移把自己不同的 DNA 片段提供给宿主基因组, 这种转移的 DNA 片段在受体中可象质粒一样独立存在, 也可以整合到受体的染色体中去, 如果它能编码特征性的毒性因子, 则把这段

DNA 结构称为致病岛。Cag-PAI 使幽门螺杆菌增强转移能力并引发宿主细胞释放前炎性细胞因子而引起致病。Cag-PAI 的一个显著特点是该致病岛上的一些基因区块编码了一个 type IV 分泌系统, 具有直接输送菌蛋白到宿主细胞的细胞质的功能^[31]。幽门螺杆菌的 Cag-PAI 上的 5 个 ORF 编码 type IV 分泌系统, type IV 分泌系统在运输蛋白低聚体和蛋白-DNA 复合物时, 比 type III 分泌系统有更大的范围, 这与根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) Ti 质粒 T-DNA 作用机制类似。因此, 通过该系统, 幽门螺杆菌可以将调控 DNA、蛋白质因子等通过该通道传递到宿主细胞的靶位点而引起致病生理反应。Cag 基因中有 6 个是和 *Bordetella pertussis*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Escherichia coli*、*Legionella pneumophila*、*Rickettsia prowazekii*、*Brucella suis* 编码 type IV 分泌系统的蛋白质同源。Type IV 分泌系统的核心为 VirB4、VirB7、VirB9、VirB10、VirB11 和 VirD4 蛋白组装成的一个复合物。研究发现, Cag-PAI 能引起人单核细胞的凋亡, 它在幽门螺杆菌逃逸免疫应答而对宿主持久感染中起着重要作用^[32]。

毒素相关基因 A (cytotoxin-associated gene A, *cagA*) 编码 128~145 kDa 的蛋白质, CagA 能在宿主的细胞质中磷酸化, 对核转录因子 NF- κ B、AP1、胞质磷脂酶 A₂ 和分裂素蛋白激酶、p21 激酶的激活作用已有相应报道^[33]。CagA 通过幽门螺杆菌注入到宿主细胞后使酪氨酸磷酸化, 一旦磷酸化, CagA 可与酪氨酸磷酸化酶(SHP2)结合并使其激活, 从而改组胃上皮细胞皮层反应^[34,35]。虽然通过酪氨酸磷酸化的 CagA 所触发的信号传递过程还不清楚, 但是在细菌黏附后短时间内所发生的肌动蛋白的聚合和细胞骨架的形成都是由于 CagA 注入的结果。通过对 CagA 特异性 T 细胞的研究, 已明确 CagA 作为胞浆毒蛋白被宿主细胞获得并进入 MHC I 类抗原传递途径。

上述幽门螺杆菌毒性因子是引起胃病的主要因素, 除此之外, 还有一些因子也越来越引起研究人员的重视, 如热休克蛋白、脂多糖、Lewis 抗原、幽门螺杆菌相关的中性粒活化蛋白、*iceA* 基因、脂酶和蛋白酶、生长抑制因子等都是幽门螺杆菌的重要毒性因子。

3 展望

尿素酶、CagA、VacA 和 HP-NAP 等都是幽门螺杆菌感染人胃的重要居留和致病因子, 同时又

是人幽门螺杆菌感染所产生的免疫应答的主要抗原^[1]。在过去的10年中,这些抗原已经被用来进行动物试验并证明能产生免疫应答,通过预防性疫苗来保护动物和治疗性疫苗来根除感染。对人的免疫研究,已将在上述的一个或几个抗原在 *Escherichia coli* 中表达并进行机体免疫试验,也能获得一定的免疫保护。另外,一些黏膜佐剂如霍乱毒素和大肠杆菌热不稳定性内毒素等的使用能使呈递疫苗更加有效,但其毒性测试还仅限于动物模型。近来,无毒的衍生物已经被用来进行人体的免疫研究,其中 LTK63 和 LTR72 是最有前途的免疫佐剂^[36]。但诸多的研究表明,这些佐剂只优先诱导 Th2 型免疫应答。而 CpG 寡核苷酸用作佐剂可以促进抗原激发 Th1 的免疫应答,并能为克服幽门螺杆菌感染的慢性感染提供一个较好的免疫途径^[37]。

目前,幽门螺杆菌 26695 菌株和 J99 菌株的全基因组序列均已报道,通过对全基因组信息的分析比较和功能基因的研究,有助于阐明幽门螺杆菌适应胃微环境生长的特殊生理机制、生化代谢途径、基因调控机制、与宿主相互作用等,进而全面深入地预测一些编码毒性因子和免疫原基因,明晰一些新的蛋白质的功能和结构,这样,更利于筛选新药的靶标和新的疫苗候选目标,为进一步的研究及防治幽门螺杆菌的感染奠定基础。

参考文献 (References)

- [1] Warren JR et al. *Lancet*, 1983, **1**: 1273
 [2] Cover TL et al. *Adv Intern Med*, 1996, **41**: 85
 [3] Wong BC et al. *JAMA*, 2004, **291**: 187
 [4] Tomb JF et al. *Nature*, 1997, **388**: 539
 [5] Kalia A et al. *J Bacteriol*, 2004, **186**: 7508
 [6] Kersulyte D et al. *J Bacteriol*, 2004, **186**: 7521
 [7] Alm RA et al. *Nature*, 1999, **397**: 176
 [8] Mehta N et al. *J Bacteriol*, 2003, **185**: 726
 [9] Weeks DL et al. *Science*, 2000, **287**: 482
 [10] Eaton KA et al. *Infect Immun*, 1991, **59**: 2470
 [11] Del Giudice G et al. *Annu Rev Immunol*, 2001, **19**: 523
 [12] Merckx-Jacques A et al. *J Bacteriol*, 2004, **186**: 2253
 [13] Backstrom A et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 16923
 [14] Mahdavi J et al. *Science*, 2002, **297**: 573
 [15] Mahdavi J et al. *Infect Immun*, 2003, **71**: 2876
 [16] Fiocca R et al. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1994, **205**: 11
 [17] Viala J et al. *Nat Immunol*, 2004, **5**: 1166
 [18] Crabtree JE et al. *J Clin Pathol*, 1995, **48**: 967
 [19] Beswick EJ et al. *Infect Immun*, 2005, **73**: 2736
 [20] Montemurro P et al. *J Infect Dis*, 2001, **183**: 1055
 [21] Cover TL et al. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 10570
 [22] McClain MS et al. *Infect Immun*, 2001, **69**: 1181
 [23] Atherton JC et al. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 17771
 [24] McClain MS et al. *Mol Microbiol*, 2000, **37**: 433
 [25] Kim S et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 5988
 [26] Papini E et al. *J Med Microbiol*, 1996, **45**: 84
 [27] Willhite DC et al. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 48204
 [28] Shirai M et al. *J Infect Dis*, 1998, **177**: 72
 [29] Sundrud MS et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 7727
 [30] Censini S et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 14648
 [31] Christie PJ et al. *Trends Microbiol*, 2000, **8**: 354
 [32] Galgani M et al. *Infect Immun*, 2004, **72**: 4480
 [33] Montecucco C et al. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, **2**: 457
 [34] Higashi H et al. *Science*, 2002, **295**: 683
 [35] Enarsson K et al. *Infect Immun*, 2005, **73**: 761
 [36] Rappuoli R et al. *Immunol Today*, 1999, **20**: 493
 [37] Raghavan S et al. *Infect Immun*, 2003, **71**: 7014

Molecular Mechanism of *Helicobacter pylori* Infection

Qing Gu^{1,2*}, Mu-Yuan Zhu²

¹Department of Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China;

²College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract *Helicobacter pylori* colonizes the human gastric epithelium and is responsible for gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. In recent years, with publish of the complete genome sequence of *H. pylori* and deep research of functional genes of this organism, the molecular mechanism of *H. pylori* infection and the immune response are more in depth understanding. In the paper, We summarize the characteristic of *H. pylori* genome and molecular mechanism which *H. pylori* infect human by adhere to the gastric cells and a unique set of virulence factors.

Key words *Helicobacter pylori*; genome; infection; molecular mechanism

Received: November 18, 2005 Accepted: April 18, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30300017)

*Corresponding author. Tel: 86-571-88071024-8599, Fax: 86-571-88053079, E-mail: guqing2002@hotmail.com