



## 幽门螺旋菌的分子生物学研究现状

王正祥

(扬州大学医学院微生物学教研室, 江苏扬州 225001)

自从 Warren 和 Marshall<sup>[1]</sup>于 1982 年成功分离出幽门螺旋菌 (*Helicobacter pylori*) 以来, 国内外大量的研究结果<sup>[2~4]</sup>已确定 *H. pylori* 是慢性胃炎及消化性溃疡的致病因素并且是肠型胃癌的诱发因素之一。近年来, 世界范围内对 *H. pylori* 的研究重心已逐渐转移向对 *H. pylori* 遗传本质的认识, 包括对 *H. pylori* 多种有意义抗原, 及其代谢产物相关基因的克隆与表达, 以及 *H. pylori* 基因组多样性等研究并取得重大进展。为此, 本文将侧重对运用分子生物学手段进行 *H. pylori* 重要基因研究的进展作一综述。

### 1 已克隆化的 *H. pylori* 基因

#### 1.1 尿素酶基因

*H. pylori* 最为重要的特征是含有极丰富的尿素酶, 此酶可迅速将尿素分解成氨和二氧化碳, 临床上已运用这一特征进行 *H. pylori* 感染快速诊断<sup>[5]</sup>。现有的研究已确认, 尿素酶在 *H. pylori* 定植及引起胃粘膜损伤中起重要作用<sup>[6]</sup>。因此, *H. pylori* 的基因克隆研究主要集中在尿素酶编码基因上。

Clayton 等<sup>[7]</sup>首先报道克隆出 *H. pylori* 尿素酶基因。他们将经 Sau3A 酶解 *H. pylori* DNA 片段克隆入噬菌体  $\lambda$ EMBL3, 阳性克隆进一步次克隆入  $\rho$ UC18, 表达出可与抗 *H. pylori* 尿素酶特异性抗体起反应的表达抗原, 经免疫印迹 (Western blot) 分析表明, 此克隆产物的分子量分别为 31ku 和 66ku。接着, 该作者对这两个基因组进行了序列分析<sup>[8]</sup>, 克隆化尿素酶基因分别命名为 ure A 和 ure B, 相应编码产物为 Ure A (26.7ku) 和 Ure B (60.5ku), 但 ure A 及 ure B 在大肠杆菌 K-12 中不表达任何可检出尿素酶活性。为了表达有活力的尿素酶基因,

Labigne 等<sup>[9]</sup>运用粘性质粒及细菌接合途径将一段长达 44kb 的 *H. pylori* 染色体 DNA 克隆化并在 *Campylobacter jejuni* 中暂时性表达了尿素酶活性。次克隆化后确定编码尿素酶的一组基因位于一个 4.2kb DNA 片段中, 并确定这组基因中有四个开放阅读框架 (ORF), 排列顺序为 ure C、ure D、ure A 和 ure B, 编码相应多肽的预测分子量分别为 49.2ku、15ku、26.5ku 和 61.6ku, 同时确定 *H. pylori* 的尿素酶基因组为单拷贝基因; 组成尿素酶两结构亚单位 Ure A 和 Ure B 多肽, 其氨基酸组成与其它细菌的尿素酶不同, 而与大豆尿素酶较为近似。在大约 ure A 和 ure D 基因的上游 310bp 处存在一个  $\delta^{54}$  启动子, 控制 ure A、ure B 及 ure D 基因的表达, 此调控可能受氮调控<sup>[10]</sup>; 而 ure C 基因上游则为 *Escherichia coli* 同义启动子 ( $\delta^{70}$ )。ure C 和 ure D 基因的功能尚不清楚, 但发现为 ure A 及 ure B 基因在 *C. jejuni* 中表达较弱而不稳定的尿素酶所必需<sup>[9]</sup>。Cussac 等<sup>[11]</sup>报道了在 ure A 和 ure B 结构基因的下游还存在另外四个 ORF, 分别为 ure E、ure F、ure G 和 ure H, 此四个基因为 *E. coli* 表达活性 *H. pylori* 尿素酶所必需。Mobley 等<sup>[12]</sup>在克隆化 *H. pylori* 尿素酶基因的基础上通过优化 *E. coli* 的培养基组成, 获得了尿素酶基因的高效表达<sup>[6]</sup>。

#### 1.2 细胞毒素产生相关蛋白编码基因

大约 80% 的 *H. pylori* 分离菌株表达 120~128ku 蛋白<sup>[13]</sup>, 此组份具有极好的抗原性和抗体反应特异性, 已被用于 *H. pylori* 感染血清学诊断中。120~128ku 抗原组份的存在常常

与该菌产生细胞毒素高度相关<sup>[14]</sup>。为此,Blaser等<sup>[15]</sup>将经超声波破碎获得的40kb大小的*H. pylori* DNA片段克隆入 $\lambda$ Zap II载体中并经进一步亚克隆获得分子量为96ku的表达蛋白,经核酸杂交等分析确认,此克隆DNA片段为不完整的*H. pylori*细胞毒素产生相关基因(cag A),该作者运用PCR、核酸合成等技术进一步将cag A下游基因克隆成功,获得一个编码1181氨基酸残基、表达产物分子量在131.517ku大小的完整基因,并发现此基因组与*H. pylori*的毒力及细胞毒素的产生高度相关,故将此基因编码产物称为细胞毒素产生相关蛋白(Cag A)。进一步研究<sup>[16]</sup>发现,通过诱变使cag A发生突变,可使*H. pylori*不表达Cag A,但对该菌株产生并分泌细胞毒素的能力无任何影响,由此认为cag A基因及细胞毒素编码基因在*H. pylori*中为独立存在的两组基因,其表达互为独立并认为cag A编码产物可单独发挥致病作用。Xiang等<sup>[17]</sup>在对临床43株*H. pylori*分离株的cag A及细胞毒素编码基因及其表达产物的详细分析表明,大多数*H. pylori*菌株具有cag A,并表达Cag A和细胞毒素;16%的*H. pylori*菌株不具有cag A也不表达Cag A及细胞毒素,而另有28%的菌株仅表达Cag A或细胞毒素,从而进一步证实了cag A与细胞毒素编码基因在表达时的互相独立性。Bukanov及Berg<sup>[18]</sup>对*H. pylori* NCTC 11638的染色体物理图谱分析时发现两基因相距大约300kb。

### 1.3 空泡化细胞毒素基因

在研究*H. pylori*致病物质时发现<sup>[14, 19]</sup>,大约60%的*H. pylori*分离菌株能够产生使多种人上皮细胞空泡化的细胞毒素,故将此细胞毒素称为空泡化细胞毒素(Vac A),相应的编码基因为vac A。体内外进一步研究发现,Vac A在胃炎、胃溃疡形成中发挥重要作用<sup>[20]</sup>。Vac A分子量为87ku,其氨基末端23个氨基酸残基序列已搞清楚<sup>[21]</sup>。Telford等<sup>[22]</sup>与Tummura等<sup>[15]</sup>相继报道了对vac A基因的克隆,发现经克隆的*H. pylori* vac A基因编码一分子量为140 ku的前体蛋白,

经加工后形成分子量为94ku的有活性的细胞毒素。经小鼠体内试验发现,该毒素可引起小鼠胃溃疡和胃炎<sup>[22]</sup>,从而确定了*H. pylori*合成及释放的空泡化细胞毒素在*H. pylori*致病过程中的巨大作用。

### 1.4 鞭毛基因

*H. pylori*鞭毛位于菌体一端,具有独特的鞘膜,保护鞭毛免受胃酸性环境的破坏。*H. pylori*鞭毛在*H. pylori*定植时发挥重要作用<sup>[23]</sup>,因此,自从*H. pylori*分离成功后,各国科学家就一直在努力探索*H. pylori*鞭毛的本质,但直到1989年,Geis等<sup>[24]</sup>方在世界上第一次提纯*H. pylori*鞭毛蛋白,并确定*H. pylori*鞭毛蛋白为分子量51ku的单一蛋白分子。Kostrzynska等<sup>[25]</sup>进一步研究发现,*H. pylori*鞭毛蛋白有两种,一种为主要鞭毛蛋白与Geis等报道一致;另一种为次要鞭毛蛋白,并对两种鞭毛蛋白N-末端氨基酸序列进行了详细分析。在此基础上,Leying等<sup>[26]</sup>运用以N-末端氨基酸序列设计的寡核苷酸探针对*H. pylori*主要鞭毛蛋白编码基因进行了克隆化,并将此基因定名为fla A,此基因常有 $\delta^{28}$ 启动子。运用相似的方法,Suerbaum等<sup>[27]</sup>对*H. pylori*次要鞭毛蛋白编码基因实现了克隆化,定名为fla B,此基因带有 $\delta^{54}$ 启动子,与fla A间存在58%的同源性。

### 1.5 其它基因

O'Toole等<sup>[28]</sup>在试图克隆化*H. pylori*鞭毛蛋白编码基因时克隆化出一编码分子量为26ku的多肽的基因,此多肽位于菌体表面,具有种属特异性,功能不清。Kostrzynska等<sup>[29]</sup>克隆化了一分子量为20ku的*H. pylori*膜相关性脂蛋白基因并进行了序列分析,此抗原组份位于菌体外层,为*H. pylori*优势抗原,可能与*H. pylori*粘附有关。Spiegelhalter等<sup>[30]</sup>对*H. pylori*超氧化物歧化酶基因进行了克隆化和序列分析。此外,过氧化物酶基因<sup>[31]</sup>、粘附素亚单位编码基因<sup>[32]</sup>、铁蛋白基因<sup>[33]</sup>、rec A基因<sup>[34]</sup>、富含组氨酸金属结合多肽的hpn基因<sup>[35]</sup>等也已克隆成功。

## 2 *H. pylori* 遗传特征

*H. pylori* 的基因组大约为 1.60~1.73Mb, 多半呈单环状, 但不同分离菌株可能不同。运用场脉冲凝胶电泳 (PFGE) 技术对 *H. pylori* 分离菌株的基因组进行分析表明, *H. pylori* 基因为组成具有高度多样性而同一菌株的 PFGE 及限制性酶切图谱相对恒定。除了基因组外, 大约 58% 的 *H. pylori* 临床分离株含有一个或多个质粒, 质粒的大小从 1.8kb 到 40kb 不等, 甚至大到 148kb 以上<sup>[36]</sup>。对其中一个大小为 1.5kb 的质粒进行的核酸序列分析表明, 此质粒与行滚环式复制的质粒十分相似<sup>[37]</sup>, 推断这一质粒可能来自  $G^+$  球菌, 但至今尚未确定 *H. pylori* 质粒的遗传表型, 也未发现 *H. pylori* 质粒含有常见耐药基因<sup>[38]</sup>。有报道<sup>[39]</sup> *H. pylori* 中有噬菌体存在, 噬菌体大小: 头  $70 \times 60\text{nm}$ , 尾  $120\text{nm}$ , 表现为溶原性噬菌体。 *H. pylori* 噬菌体是否参与噬菌体介导的转导, 及在 *H. pylori* 遗传与变异中的意义尚需进一步研究。

*H. pylori* 的自然转化现象也已被发现<sup>[40]</sup>。 *H. pylori* NCTC 11637 对  $\text{Str}^r$  基因的转化率高达  $5 \times 10^{-4}$ 。此现象在 *H. pylori* 耐药性基因扩散中可能起重要作用。

## 3 结束语

现代分子生物学中的 PCR 技术、核酸探针技术、限制性片长多样性分析、限制性酶切图谱等技术已广泛用于 *H. pylori* 感染的基础与临床研究中, 并已显示出重要的应用价值<sup>[41]</sup>。

对 *H. pylori* 基因组的组成及功能研究应属起步阶段, 由此获得的各种新的发现可以加深对此菌的认识。因此, 对 *H. pylori* 遗传背景的深入研究是十分必要的。

## 参 考 文 献

- [1] Warren JR, BJ Marshall. Lancet. 1983, 1: 1273.
- [2] Peterson WL. N Engl J Med. 1991, 324: 1043.
- [3] Hsuell T, PG Isaacson, JE Crabtree, et al. Lancet. 1993, 2: 571.
- [4] Eurogast Study Group. Lancet. 1993, 1: 1359.
- [5] 王正祥, 王晓玲, 吴岩. 微生物学通报, 1992, 19: 217.
- [6] Xu JK, CS Goodwin, M Cooper, et al. J Infect. Dis.. 1990 161: 1302.
- [7] Clayton CL, BW Wren, P Mullany, et al. Infect Immun. 1989, 57: 623.
- [8] Clayton CL, MJ Pallen, H Kleanthous, et al. Nucleic Acids Res., 1989, 18: 362.
- [9] Labigne A, V Cussac, P Courcoux. J Bacteriol. 1991, 173: 1920.
- [10] Cussac V, RL Ferrero, A Labigne. Microb Ecol. Health Dis. 1991, 4: 5139.
- [11] Cussac V, RL Ferrero, A Labigne. J Bacteriol. 1992, 174: 2466.
- [12] Hu L, LTH Mobley. Infect Immun. 1993, 61: 2563.
- [13] Grabtree JE. J Clin Pathol. 1992, 45: 733.
- [14] Cover TL, PD Cornelius, MJ Blaser. Infect Immun. 1990, 58: 603.
- [15] Tummura KRM, TL Cover, MJ Blaser. Infect Immun. 1993, 61: 1799.
- [16] Tummura KRM, TL Cover, MJ Blaser. Infect Immun. 1994, 62: 2609.
- [17] Xiang Z, S Censini, PF Bayeli, et al. Infect Immun. 1995, 63: 94.
- [18] BUKanov NO, DE Berg. Mol Microbiol. 1994, 11: 509.
- [19] Leunk RD, PT Johnson, BC David, et al. J Med Microbiol. 1988, 26: 93.
- [20] Phadnis SH, D Ilver, L Janzon, et al. Infect Immun. 1994, 62: 2609.
- [21] Cover TL, MJ Blaser. J Biol Chem. 1992, 267: 10570.
- [22] Telford JL, P Ghiara, M Dell'Orco, et al. J Exp Med. 1994, 179: 1653.
- [23] Eaton KA, DR Morgan, S Krakowka. J Med Microbiol. 1992, 37: 123.
- [24] Geis G, H Leying, S Suerbaum, et al. J Clin Microbiol. 1989, 27: 436.
- [25] Kostrzynska M, JD Betts, JW Anstin, et al. J Bacteriol. 1991, 173: 937.
- [26] Leying H, S Suerbaum, G Geis, et al. Mol Microbiol. 1992, 6: 2863.
- [27] Suerbaum S, C Josenhans, A Labigne. J Bacteriol. 1993, 175: 3278.
- [28] O'Toole PW, SM Logan, M Kostrzynska, et al. J Bacteriol. 1991, 173: 5005.
- [29] Kostrzynska M, SM Logan, TJ Trust. J Bacteriol. 1994, 176: 5938.
- [30] Spiegelhalter C, B Gerstenecker, A Kersten, et al. Infect Immun. 1993, 61: 5315.
- [31] Newell DG, P Nuijten, AR Stacey. Ital J Gastroenterol. 1991, 23, (Suppl.2): 7.
- [32] Evans DG, TK Karjalainen, DJ Evans, et al. J Bacteriol. 1993, 175: 674.
- [33] Frazier BA, JD Pfeifer, DG Russell, et al. J Bacteriol. 1993, 175: 966.
- [34] Thompson SA, MJ Blaser. Infect Immun. 1995, 63: 2185.
- [35] Gilbert JV, JR Amakriska, FW Sunderman, et al. In-

- fect Immun, 1995, **63**: 2682.
- [36] Tjia TN, WES Harper, CS Goodwin, *et al.* Microbios Lett, 1987, **36**: 7.
- [37] Kleanthous K, CL Clayton, S Toboqchali. Mol Microbiol, 1991, **5**: 2377.
- [38] Taylor DE, JA Hargreaves, LK Ng, *et al.* Am J Clin Pathol, 1987, **87**: 49.
- [39] Schmid EN, G von Rechlinghausen, R Ansorg. J Med Microbiol, 1990, **32**: 101.
- [40] Nedenskov-Sorensen P, G Bukholm, K Bovre. J Infect Dis, 1990, **161**: 365.
- [41] 胡伏莲. 中华消化杂志, 1994, **14**: 313.