

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

幽門桿菌附著基因在幽門螺旋桿菌感染之研究(3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-006-047-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立成功大學醫事技術學系

計畫主持人：吳俊忠

計畫參與人員：許淑美、劉家賓、吳秀梅

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

幽門桿菌附著基因在幽門螺旋桿菌感染之研究(3/3)

Study of Adhesion genes in *Helicobacter pylori* infection

計畫編號：NSC 91 - 2314 - B - 006 - 047

執行期限：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

主持人：吳俊忠 (jjwu@mail.ncku.edu.tw)

執行機構及單位名稱：國立成功大學醫事技術學系

一、中文摘要

幽門螺旋桿菌為人類胃腸道常見之病原菌，而細菌之附著是感染胃腸道之第一步。目前有關菌體之附著除鞭毛及尿素酶為必要因子外，也需要有多種附著因子之參與如 heat shock protein, BabA2, AlpAB, HopZ 及 Lewis^x。僅管有多種幽門螺旋桿菌之胃細胞接合因子(receptor)被發現，但目前以 BabA2 與宿主細胞的 Lewis b (Le^b) 抗原相互連結的關係有較具體之研究。為探討這些基因在本地幽門螺旋桿菌之附著角色，分別構築附著基因 *babA2*、*hsp60* 及 *hopZ* 之突變株，在細胞株(*in vitro*)及小鼠動物模式(C57BL/6)上觀察其附著能力之變化與刺激細胞分泌 cytokines 能力的差異。此外，進而分析細菌與宿主胃組織所表現之 Le 抗原的相關性，以了解 Le 抗原對於細菌感染的重要性。本計劃於三年中完成的結果如下：1) 南台灣臨床菌株皆具有 *babA2* 基因；2) 藉由 FACS 所觀察 *babA2* 與 *hsp60* 單基因與雙基因的突變株於 AGS 細胞株之附著能力相似；3) *hsp60* 單基因的突變株主要影響 AGS 細胞株 IL-6 之分泌；4) 胃組織表之 Le^b 為主要影響幽門螺旋桿菌附著的抗原而 Le^x 也具有相似的角色；5) 在胃組織表現 Le^b 的病人，胃上皮細胞或所感染細菌兩者表現 Le^x 的強弱主要影響 AIS (3.625 vs. 1.583, $P < 0.05$)；而在胃組織不表現 Le^b 的病人，胃上皮細胞或所感染的細菌 Le^x 表現的強弱，則主要影響 HPD (7.833 vs. 4.778, $p < 0.05$)；6) 藉由針對 Le^x 的單株抗體，證實細菌 Le^x 可能不具附著角色；7) 構築之

Hsp60 表現載體已於大腸桿菌成功表現。

Abstract :

Helicobacter pylori is the most important human gastric pathogen. Adhesion is a prerequisite for colonizing the gastric mucosal surfaces. Flagella and urease are two bacterial factors essential for colonizing the viscous intestinal surfaces especially for spiral-shaped organisms. However, many possible adhesin molecules such as heat shock protein, BabA2, AlpAB, HopZ and Lewis^x (Le^x) are also involved in the initial colonization. Although there are many gastric receptors for *H. pylori*, the binding relation between BabA2 and Lewis b (Le^b) antigen has been explored recently. In order to understand the roles of different adhesin in Taiwanese strains of *H. pylori*, the *babA2*, *hsp60* and *hopZ* mutant strains were constructed to investigate the differences of adhesion ability and cytokines induction on cell lines (*in vitro*) and animal model (C57BL/6). In addition, the association of Le antigens expressed between the bacteria and host gastric tissue was also analyzed to know the importance role of Le antigens for *H. pylori* infection. In this program, we have achieved some progress, including: 1) the positive-*babA2* genotype in all of clinical strains from Southern Taiwan; 2) the similar adhesion ability of mutant strains of *babA2*, *hsp60*, and double gene mutants by

using FACS with AGS cell line; 3) the decreased secretion of IL-6 of *hsp60* mutants in AGS cell as compared with that of wild-type strain; 4) Le^b , a major determinant to the adhesion of *H. pylori*, as well as Le^x in the Le immunohistochemistry staining on the gastric epithelium; 5) in patients with Le^b expression, the intensity of Le^x antigens expressed by the gastric epithelium and the infected bacteria related to acute inflammation score (AIS) (3.36 vs. 1.583, $p < 0.05$), but in the patients without gastric Le^b expression, the intensity of Le^x antigens on the bacteria and host related to HPD (7.83 vs. 4.78, $p < 0.05$); 6) the demonstration of non-adhesion role of Le^x on bacteria by using anti- Le^x monoclonal Ab; 7) the successful expression of vector including Hsp60 in *E. coli* strain.

二、緣由與目的

細菌的附著能力 (colonisation) 為感染形成的第一步驟。對幽門螺旋桿菌而言，其能逃離胃中極酸 (pH 2-3) 的環境且抵抗胃正常的蠕動與排空而附著於黏膜下的胃組織 (pH 4-5)，主要受鞭毛、尿素酶與附著因子等因素的影響。附著因子(adhesin)與胃上皮細胞間的接合機制目前並不清楚，有關文獻顯示幽門螺旋桿菌附著因子有 Heat-shock protein 60 (Hsp60) (Yamaguchi et al., 1997)，Heat-shock protein 70 (Hsp70) (Huesca et al., 1998)，BabA2 (Ilver et al., 1998)，AlpA 與 AlpB (Odenbreit et al., 1999) 及 HopZ (Peck et al., 1999)等，附著因子亦會影響胃上皮細胞分泌早期免疫反應 cytokines。此外，幽門螺旋桿菌細胞膜上的 lipopolysaccharide (LPS)含有與人類的 Le 抗原具有很高的相似性的 fucosylated oligosaccharides (Aspinall et al., 1997; Monteiro et al., 1998)，除 Taylor 提出幽門桿菌所表現的 Lewis^x (Le^x)可能的附著功能外 (Taylor et al., 1998)，針對幽門桿菌所具有的 Lewis (Le)抗原於感染過程中所扮演的角色目前尚未清楚。因此，深入了解

各附著因子於幽門螺旋桿菌附著過程所具之重要性，有助於取得一細菌的標的物作為預防性疫苗的目標。本計劃的目的在於幽門螺旋桿菌附著因子的研究，期有助於未來幽門螺旋桿菌的預防與治療。由於幽門螺旋桿菌基因的相關研究，常隨地域性而出現不同的結果。因此，計劃初步在於確定 Ilver et al (1998)所發表的 BabA2 與 Le^b 接合作用於臺灣菌株中所扮演的角色，再觀察其它附著因子參與的角色及其所影響胃上皮細胞分泌之 cytokines 且擬測定細菌與胃上皮細胞 Le 的表現，以了解兩者表現相似的 Le 抗原是否影響胃組織的病理變化。

三、結果與討論

於成大醫院所收集胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃癌、非潰瘍性胃發炎等不同疾病之幽門螺旋桿菌菌株，配合完整的病理資料，有利於研究了解細菌與宿主間的相互的致病關係。計劃於第一年初步在於確定 Ilver et al.,1998 所發表的 BabA2 與 Le^b 接合作用於臺灣菌株中所扮演的角色，根據 Ilver 設計的 *babA2* 引子，西方國家的盛行率為 78%，反之在臺灣地區菌株所得的 PCR 產物經基因定序後發現並不是 *babA2* 的序列，因此重新針對 *babA1* 與 *babA2* 兩基因區別之處設定新的引子，利用此新引子進行 *babA2* PCR 反應，於一百八十八株臨床菌株皆成陽性，隨意選取八株菌株的 PCR 產物經基因定序分析，確認了菌株具有 *babA2* 基因的正确性。於第二年度，成功構築 *babA2* 與 *hsp60* 單基因與雙基因的突變株，並藉由 FACS 的方式觀察發現 *babA2* 與 *hsp60* 單基因與雙基因的突變株於 AGS 細胞株之附著能力相似，只達野生株附著之 60-70%。而 *hsp60* 單基因的突變株降低 AGS 細胞株 IL-6 之分泌但並不影響 IL-8 的表現；*babA2* 單基因的突變株延遲 AGS 表現 IL-6 而同樣的不影響 IL-8 之分泌，至於雙基因的突變株附著能力為何無進一步下降則尚待釐清。此外，胃上皮細胞 Le 抗原的免疫組織化學染色結果顯示，胃上皮細胞表現之 Le^b 為主要影響幽門螺旋桿菌

附著的抗原而 Le^x 也具有相似的角色，針對胃上皮表現之 Le^x 與幽門螺旋桿菌附著之關係提供了一個更為直接的證據，於第三年度，測得幽門螺旋桿菌 Lewis 抗原於 42 株菌株中的表現比例分別： Le^a 為 16.7%、 Le^b 為 38.1%、 Le^x 為 71.4%、 Le^y 為 90.5%。在胃組織表現 Le^b 的病人，胃上皮細胞或所感染細菌兩者表現 Le^x 的強弱主要影響 AIS (3.625 vs. 1.583, $P < 0.05$)；而在胃組織不表現 Le^b 的病人，胃上皮細胞或所感染的細菌 Le^x 表現的強弱，則主要影響 HPD (7.833 vs. 4.778, $p < 0.05$)。再以 Le^x 的單株抗體證實細菌 Le^x 的附著角色，FACS 結果顯示細菌對於 AGS 細胞株之附著能力並無下降，意謂細菌 Le^x 的附著角色可能較低，欲以 MKN-45 細胞株再次證實此事。此外，藉由 *hsp60* 基因的突變株與野生株感染小鼠的動物模式正於進行中，期於未來能有進一步的結果顯示 Hsp60 附著因子於動物體內 (*in vivo*) 所具的影響。

四、計劃結果自評

由本計畫得知 *babA2* 基因的盛行率明顯的高於西方國家、*babA2* 與 *hsp60* 兩基因對菌株之附著能力及 cytokines 之影響，更對於胃上皮表現之 Le^x 與幽門螺旋桿菌附著之關係提供了一個更為有力的證據。同時觀察到細菌與宿主所表現之抗原與菌落量及急性發炎反應的關係，及 Le^x 與幽門螺旋桿菌附著關係的確立，進而未來希望藉由已表現的 Hsp60 蛋白質與其突變株的感染模式，對於此蛋白質於細菌感染過程中所影響的免疫變化有所了解。

五、參考文獻

Aspinall GO, Monteiro MA, Shaver RT, Kurjanczyk LA, and Penner JL. 1997. Lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* serogroups O:3 and O:6 structures of a class of lipopolysaccharides with reference to the location of oligomeric units of *D-glycero- α -D-manno-heptose* residues. Eur J

Biochem 248:592-601.

Huesca M, Goodwin A, Bhagwansingh A, Hoffman P, and Lingwood CA. 1998. Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (hsp70), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. Infect Immun 66:4061-4067.

Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L and Boren T. 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. Science 279:373-377.

Monteiro MA, Rasko D, Taylor DE, and Perry MB. 1998. Glucosylated N-acetyllactosamine O-antigen chain in the lipopolysaccharide from *Helicobacter pylori* strain UA861. Glycobiology 8:107-112.

Odenbreit S, Till M, Hofreuter D, Faller G, and Haas R. 1999. Genetic and functional characterization of the *AlpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. Mol Microbiol 31:1537-1548.

Peck B, Ortkamp M, Diehi KD, Hundt E, and Knapp B. 1999. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. Nucleic Acids Res 27:3325-3333.

Taylor DE., Rasko DA., Sherburne R, Ho C, and Jewell LD. 1998. Lack of correlation between Lewis antigen expression by *Helicobacter pylori* and gastric epithelial cells in infected patients. Gastroenterology 115:1113-1122.

Yamaguchi H, Osaki T, Kurihara N, Taguchi H, Hanawa T, Yamamoto T, and Kamiya S. 1997. Heat-shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori* is associated with adhesion of *H. pylori* to human gastric epithelial cells. J Med Microbiol 46:825-831.