

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00558

幽门螺杆菌毒力基因分型和宿主遗传多态性与胃病关系研究进展

张丽^{1,2}, 王芑¹, 魏莎莉², 刘纯杰¹

1. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071;
2. 重庆医科大学公共卫生学院, 重庆 400016

摘要: 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)感染能导致慢性胃炎、消化性溃疡、胃粘膜相关的淋巴样组织 (Mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤和胃腺癌等疾病的发生。1994年世界卫生组织国际癌症研究中心(IARC)将*H.pylori*列为胃癌第一级因子。*H.pylori*感染引起的不同临床结局主要与*H.pylori*致病因子和宿主遗传易感性有关,大部分重大疾病发生在特定的细菌毒力因子(如 *cagA*, *vacA*)与易感宿主遗传背景共同存在时。文章综述了*H.pylori*菌株的毒力基因的分型和宿主的遗传多态性对胃病发生的影响。

关键词: 幽门螺杆菌; 宿主; 基因型; 基因多态性; 胃炎; 胃癌; 溃疡

Advances in relationship between gastric disease and polymorphisms in both helicobacter pylori virulence factors and host genetics

ZHANG Li^{1,2}, WANG Peng¹, WEI Sha-Li², LIU Chun-Jie¹

1. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China;
2. Public Health of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: *Helicobacter pylori* infection may cause many gastric disease, such as peptic ulcers, chronic atrophic gastritis, gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, and gastric cancer. The different clinical outcomes of *Helicobacter pylori* infection are related to *H. pylori* virulence factors and host gene polymorphism. *H.pylori* had been confirmed to be the class I carcinogen by the World Health Organization and International Agency for Research on Cancer Consensus Group (IARC) in 1994. Most severe diseases always occur in the background that certain microbial virulence markers (e.g. *cagA*, *vacA*) and susceptible host genetic polymorphisms harboured together. Herein, we reviewed the association with *H. pylori*-related gastric diseases in relation to different *H. pylori* types and the host polymorphisms.

Keywords: *Helicobacter pylori*; host; genotype; gene polymorphism; gastritis; gastric cancer; ulcer

1983年, 澳大利亚科学家 Warren 和 Marshall 从胃病病人的胃粘膜中成功地分离到了 *Helicobacter pylori*, 并认为此菌与慢性胃炎、消化性溃疡的发生有着密

切的关系, 该发现为探索胃病的发病病因与机制开辟了一条新的途径。各国学者相继开展了大量的研究, 但是由于 *H.pylori* 感染的临床结局常常不同, 这

收稿日期: 2010-09-30; 修回日期: 2011-01-14

基金项目: “十一五”国家 863 “疫苗与抗体工程”重大项目基金(编号: 2006AA02A219), “十一五”国家“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”重大专项基金(编号: 2008ZX10004-015)和“十一五”国家科技支撑计划项目基金(编号: 2008BAI66B03)资助

作者简介: 张丽, 在读硕士研究生, 专业方向: 幽门螺杆菌致病机制。Tel: 010-66948837; E-mail: jingdie1984@126.com

通讯作者: 刘纯杰, 博士, 研究员, 研究方向: 病原微生物致病机制及免疫预防。E-mail: liucj@nic.bmi.ac.cn

表明宿主和病原菌关系的复杂性。有研究表明, *H.pylori* 感染的临床结局是由宿主遗传因素和细菌的毒力因子共同决定的^[1]。许多研究已证实 *H.pylori* 主要感染胃部, 且会在人类胃部聚集, 感染后主要导致慢性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、胃癌及胃粘膜相关淋巴瘤等疾病的发生^[2]。1994年世界卫生组织国际癌症研究中心(IARC)将 *H.pylori* 列为胃癌第一级因子。大部分 *H.pylori* 相关的重大疾病发生在特定的细菌毒力因子(如 *cagA*、*vacA*)与宿主易感遗传背景共同存在时。本文就 *H.pylori* 菌株的毒力基因分型和宿主的遗传多态性对胃病发生的影响做一综述。

1 *H.pylori* 毒力基因分型

H.pylori 染色体约有 1.65×10^6 个碱基对, 包含约 1 500 种蛋白, G+C 含量为 39%, 每个基因大小大约将近 1 kb, 其中约有 500 个基因为 *H.pylori* 所特有^[3]。由于基因组的突变、置换、插入或缺失, 造成 *H.pylori* 基因型的广泛多样, 并且认为癌症发生风险与 *H.pylori* 的菌株差异有关。*H.pylori* 的菌株差异可能使 *H.pylori* 适应特定的宿主胃部环境和适应特定的宿主介导的 *H.pylori* 免疫反应, 最终使不同的菌型导致不同的临床结果^[4]。有报道称宿主个体癌症风险的不同与 *H.pylori* 菌株的多样性有关^[4]。*H.pylori* 能否在人类胃部聚集并导致相关疾病与细菌的毒力基因型有重要的关系。下面将就已研究证实的 *H.pylori* 的主要毒力基因及其分型与疾病发生的关系进行详细的阐述。

1.1 *cagA* 基因分型及其临床和流行病学意义

细胞毒素相关基因 A(*cagA*)存在于大约 60%的 *H.pylori* 菌株中, 它编码的高分子量(120~140 kDa)蛋白能引发宿主强免疫反应^[5]。研究表明^[6], 由功能性的 *cagA* 致病岛编码蛋白形成的跨膜复合物具有 ATP 酶、NTP 酶活性及构成细菌 I 型分泌系统的相关功能。该 I 型分泌系统能将 *cagA* 自 *H.pylori* 菌株转运入宿主上皮细胞, 并在宿主细胞中发生磷酸化, 磷酸化的 *cagA* 专一性的与 SHP-2 磷酸酶结合, 导致宿主细胞出现蜂鸟表现型, 即细胞形态的扩展和伸长以及细胞的凋亡^[7]。

研究表明^[8~10], 在体外仅 *cagA*⁺的 *H.pylori* 菌株

能诱导胃上皮细胞产生趋化因子, 并且, 在体内感染 *cagA*⁺的菌株能诱发更强的免疫反应和导致更严重的胃炎^[11~13]。分子流行病学调查显示, 除了亚洲人群外, 感染 *cagA*⁺菌株的人群与消化性溃疡^[13, 14]、萎缩性胃炎^[11, 13]和胃癌有很高的相关性^[15~17]。但是在亚洲人群中 *cagA* 基因型与临床状态无相关性, 不管是在无症状的人群还是诊断为溃疡、胃癌的人群中 *cagA* 的不同基因型有相似的出现频率。造成这种差异的原因可能是: (1) *cagA* 基因在不同的 *H.pylori* 菌株中显示出一定的多态性, 根据 3'端区域编码的 3 个重复序列 R1、R2、R3 出现频率不同, 从而产生不同大小的 A、B、C、D 等 4 种 CagA 蛋白。有研究报道^[18], 在中国南方人群中分离到的具有 EPIYA-ABD 基因型的 *H.pylori* 与胃癌的发展相关。这说明 *cagA* 的多态性影响 *H.pylori* 与胃癌的相关性。(2) *H.pylori* 基于 *cagA* 的表达和 *vacA* 的分泌与否被分为 I 和 II 型, 即: I 型细菌含有 *cagA* 和 *vacA* 基因, 表达 CagA 和 VacA 蛋白, II 型细菌不含 *vacA* 基因, 不表达 CagA 和 VacA 蛋白。这种分类没有考虑 *cagPAI* 的存在与否, 但作者认为 *cagPAI* 与 *H.pylori* 的毒力有着重要的联系, 这表现在: ① 缺少 *cagPAI*, IV 型分泌系统是没有功能的, *cagA* 不能进入宿主细胞; ② *CagA* 缺少磷酸化将失去毒力; ③ *cagPAI* 的其他基因能诱导 IL-8 的分泌^[19]。因此虽然 I 型菌与更严重的疾病相关, 但是考虑到相关疾病时上述特征还是不能忽略的。

cagPAI 为 Covacci 等^[20]于 1996 年在 *cagA*⁺ *H.pylori* 菌株中发现的一种新的与致病相关的基因群集, 长约 40 kb, 由 *cagI* 和 *cagII* 两部分组成, 其编码蛋白为毒素及与毒素转运机能相关的分泌系统。这两部分基因可以连续, 也可以被一个插入序列所分隔。研究认为, 大部分 *H.pylori* 菌株中的 *cagPAI* 是连续状态存在, 少部分菌株中的 *cagPAI* 被分隔为 *cagI* 和 *cagII*, 极少部分则出现 *cagI* 或 *cagII* 缺失。被分隔或缺失的 *cagPAI*, 其毒力呈下降趋势, 从而在不同 *H.pylori* 菌株中形成毒性梯度。*cagPAI* 的其他致病基因如 *cagE*、*cagT*、*cagM* 与胃病关系也很密切。*cagE* 基因大小为 2 665 bp, 最初被称为 *picB*, 在诱导宿主细胞产生 IL-8 中发挥重要的作用^[19]。*cagE* 编码一个 101 kDa 的多肽, 被公认为有 ATP 酶的活性, 与根瘤土壤杆菌的 *VirB4* 蛋白

相似^[20]。*cagE* 基因与 *cagA* 基因相比,可能是完整 *cagPAI* 的更准确的标志,它的存在与消化性溃疡明显相关^[21]。

综上所述,*cagA* 通过 I 型分泌系统转运入宿主细胞体内,导致宿主细胞出现蜂鸟表现型。*cagA*⁺的 *H.pylori* 菌株能诱发炎症反应,与消化性溃疡、萎缩性胃炎和胃癌有很高的相关性。*cagA* 的多态性影响 *H.pylori* 感染的临床结局, EPIYA-ABD 基因型的 *H.pylori* 与胃癌的发展相关。*cagPAI* 的存在状态也是影响 *H.pylori* 毒力的重要因素,其状态与严重的胃部临床疾病的发生,如溃疡和胃癌相关。

1.2 *vacA* 基因分型及其临床和流行病学意义

vacA 基因普遍存在于 *H.pylori* 中,编码一个 88 kDa 的空泡形成细胞毒素。空泡形成细胞毒素 *vacA* 是 *H.pylori* 菌株的主要毒力因子,能够导致上皮细胞的空泡化,诱导线粒体细胞色素 c 的释放,导致凋亡,在小鼠模型中 *vacA* 能导致胃十二指肠损伤,在 *H.pylori* 感染的蒙古沙鼠模型中 VacA 的分泌能增加胃溃疡的发生风险。但是 *vacA* 等位基因的类型决定了 *H.pylori* 临床分离株的毒性水平,这是因为 *vacA* 基因具有多态性和核苷酸序列的可变性,导致了 *vacA* 等位基因具有不同的形成空泡的能力^[22]。信号传导区和中央区都有两个不同的等位基因(*s1/s2*, *m1/m2*),过渡区的 *i1* 和 *i2* 两型也已经被证实。因此,*vacA* 基因型可以由任意的 *s*、*i*、*m* 序列区类型决定,但是 *s2/m1* 的组合是非常少见的^[23]。一般来说,*vacA* 的 *s1m1* 型菌株产生大量的毒素并且具有很高的使胃上皮细胞形成空泡的活性。*s1m2* 的菌株产生中等量毒素,*s2m2* 产生很少的毒素或不产生毒素^[24]。临床资料显示 *vacA* 的 *s1/m1* 和 *s1/m2* 等位基因编码具有毒性的毒素,并且常见于有胃病患者中^[24]。Meta 分析显示在拉丁美洲人群中 *s1/m1* 基因型增加了胃癌和消化性溃疡的风险^[25],*H.pylori* 的 *s2/m2* 或 *s2/m1* 基因型编码低毒的蛋白,很少与消化性溃疡或胃癌相关^[26]。

在自然状态下,只有 *s1/m2* 型的菌株 *i* 型不同,*s1/m1* 和 *s2/m2* 型的菌株其 *i* 型分别只有 *i1* 或 *i2*。空泡形成分析显示在 *s1/m2* 型的菌株中 *i* 型决定空泡的活性,*i1* 型的 *vacA* 与胃腺癌的发生相关^[27]。

vacA 毒素对胃上皮细胞的影响是多效应的,这

些效应共同导致细胞的损伤,而不只是前炎症因子的释放。活化形式的 *vacA* 增加了癌症的风险,表明局部炎症刺激不是 *H.pylori* 诱发胃癌的唯一原因。Shirasaka^[28]提出 *vacA* 与它的受体 PTP zeta/beta 相连,通过异常信号导致胃上皮分离,最后导致胃溃疡的发生。基于他们的数据,Terebiznik 等^[29]提出了:*H.pylori* 在空泡的保护下,免受溶酶体对自身的伤害,有利于细菌的生存和持续感染。

综上所述,*vacA* 是 *H.pylori* 重要的毒力因子,能够导致上皮细胞的空泡化。*vacAs1m1* 菌株产生大量的空泡形成毒素并且具有很高的使胃上皮细胞空泡化的活性,而 *vacA* 的 *s2/m2* 或 *s2/m1* 基因型编码低毒的蛋白,很少与消化性溃疡或胃癌相关。

1.3 细菌粘附因子基因分型及其临床和流行病学意义

H.pylori 感染宿主的过程分为两步:(a) 定植在上皮细胞层;(b) 诱导致炎细胞因子的释放。炎症细胞因子与胃病的发生密切相关。细菌通过配体与宿主细胞连接,使 *H.pylori* 定植到胃上皮。细菌表面配体介导粘附,一些 *H.pylori* 的外膜蛋白(Hop proteins)被确认为粘附因子,它们包括 BabA、SabA、iceA、OipA、AlpA 和 AlpB,但是它们在 *H.pylori* 致病性方面的作用还不太清楚。

BabA 大小为 78 kDa,由 *babA2* 基因表达出完整的蛋白,当 *H.pylori* 与胃上皮细胞接触时,BabA 蛋白会与宿主细胞岩藻糖基化 Lewis B 血型抗原结合,而岩藻糖基化 Lewis B 血型抗原结构与 O 型血型的抗原结构相似。在流行病学调查中也证实 O 型血人群容易发生胃相关性疾病;*H.pylori* 在胃中聚集密度与宿主胃上皮细胞 Lewis b 抗原表达程度有关^[30]。Lewis b 抗原分子在胃腺癌、消化性溃疡、慢性胃炎的发展中发挥重要的作用。*babA* 有两个等位基因(*babA1* 和 *babA2*),*babA2* 编码 BabA 蛋白,与其他致病基因(*cagA* 和 *vacA* 的 *s1m1* 等位基因)有联合作用,共同导致肠化生的发生^[31]。据报道^[32],表达低水平 BabA 的 *H.pylori* 菌株能导致严重的粘膜损伤,并且与十二指肠溃疡、胃癌的关系密切,而表达高水平 BabA 的 *H.pylori* 菌株或 *babA* 缺失株却与十二指肠溃疡、胃癌的关系没有那么密切。其机制尚不清楚。SabA 蛋白是 2000 年由 Mahdavi 等^[33]发现的,利用

babA 突变株进行附着实验, 发现其仍可粘附到发炎的胃组织, 进一步找到 *H.pylori* 表面存在一大小约 70 kDa 的外膜蛋白 SabA, 该蛋白以 SLex 为受体。*H.pylori* 引起胃部发炎时, 会诱发 SLex 表达增加。日本一研究小组研究表明^[34], *sabA* 是慢性胃炎的一个重要的毒力因子。

诱导 *H.pylori* 与上皮细胞接触的基因是 *iceA*, 包含两个等位基因 *iceA1*、*iceA2*。*iceA1* 在 *H.pylori* 与上皮细胞接触时表达, *iceA2* 基因常见于非溃疡的不典型增生病例。研究表明 *iceA* 与消化性溃疡有关^[33], 但是也有其他研究表明 *iceA* 与消化性溃疡无关^[35-38]。

Dossumbekova 等^[39]报道, 在体外, *hopH* (*oipA*) 的突变导致 *H.pylori* 在胃粘膜的粘附降低, 但是没有改变上皮细胞 IL-8 的分泌。表达 *oipA* 阳性的状态与十二指肠溃疡和胃腺癌明显相关, 并且与高的 *H.pylori* 定植密度以及严重的中性粒细胞浸润明显相关^[40]。但是 *oipA* 经常在表达与不表达中转换, 这显示了其在胃内的状态在不断的改变。

总之, 细菌粘附因子与 *H.pylori* 在胃部的定植有关, 但在致病性方面的作用还不是太清楚, BabA 蛋白与宿主细胞岩藻糖基化 Lewis B 血型抗原结合, 表达低水平 BabA 的 *H.pylori* 菌株能导致严重的粘膜损伤。*SabA*、*iceA*、*oipA* 与临床疾病的关系有赖于进一步的研究。

1.4 其他致病基因分型及其临床和流行病学意义

*H.pylori*26695 和 *H.pylori*J99 菌株的基因组比较显示, 除了 *cag PAI* 外, 存在 G+C 含量不同的区域, 这些区域可能代表潜在的致病岛。26695 有 8 个, J99 有 9 个这样的区域。这些区域中有一个所谓的“可塑区”, 即 J99 菌株的一个 45 kb 的区域和 26695 的 68 kb 区, 此区 GC 含量与其他 *H.pylori* 基因组不同^[41, 42], 这表明此区域的获得可能是通过基因转移从其它种类的菌得到。*jhp0940*、*jhp0947* 是可塑区的潜在致病标志, 经常在胃癌病人的分离株中得到, 表明他们的基因产物可能与胃癌的发生有关^[43]。一项研究也证明了 *jhp0947* 与胃癌的关系, 并且表明了这个基因也与十二指肠溃疡的发展有关^[44]。Jonge 等^[45]报道了 *jhp0949* 与十二指肠溃疡相关。*dupA* 是 *VirB4* 的同系物, 此基因包含 J99 基因的 *jhp917* 和 *jhp918* 被认为是十二指肠溃疡的标志, 但是与萎缩性胃炎、肠化

生、胃癌呈负相关^[46]。但另外一些研究表明^[47-49], *dupA* 与十二指肠溃疡无关。这种分歧结果可能是因为在不同的人群和地区分离的 *H.pylori* 菌株存在遗传差别所造成的。

综上所述, *H.pylori* 具有广泛的遗传多态性, 其原因主要有: (1) 种属多态性广泛存在; (2) 大量的共生变异体(coexisting variants)的存在或(3)在宿主体内定植及适应的过程中 *H.pylori* 会通过自然转化、遗传重组或变异的方式使其遗传背景发生改变造成遗传多态性。*H.pylori* 的毒力基因及多态性影响其感染的临床结局, 但在不同的人群和地区分离的 *H.pylori* 菌株与临床疾病的相关性研究的结果不大一致, 这可能是因为相关的 *H.pylori* 菌株存在遗传差别造成的, 同时疾病的发生还受外部环境、宿主遗传因素等多方面的影响。纵观多年来对 *H.pylori* 毒力因子的研究结果表明在研究胃病的发生发展中 *H.pylori* 感染及其毒力基因是不容忽视的重要内容。

2 宿主的遗传多态性

胃癌是基因环境相互作用的疾病, 其发生受多种因素的影响, 民族地区差异是影响胃癌发生的一个重要的因素。即使在 *H.pylori* 感染率较高的地区, 最终也只是一小部分的人发展为胃癌。*H.pylori* 感染引发的胃癌其发展包括 3 步: (1) *H.pylori* 感染; (2) 萎缩性胃炎的发展; (3) 胃癌发生。遗传特征与生活方式相互作用影响疾病的进程。在 *H.pylori* 感染与致病的过程中, 人们对两类宿主遗传多态性做了大量的调查与评估: 一类是细胞因子, 其多态性影响炎症因子的产生; 另一类是免疫相关基因, 其多态性影响宿主对 *H.pylori* 感染产生的免疫反应的强弱。前者包括 *IL-1B*、*TNF-A* 等的功能多态性, 后者包括 *TLR4*、*TLR2*、*HLA* 等。在萎缩性胃炎的发展的过程中, 关于 *cagA* 信号转导的多态性(*PTPN11A/G* 内含子 3)也被学者所关注。

2.1 *IL-1* 基因多态性及其临床和流行病学意义

IL-1 基因簇位于染色体的 2q 的一个 430 kb 的区域, 包含 3 个相关基因 *IL-1A*、*IL-1B* 和 *IL-1RN*, 分别编码促炎细胞因子 IL-1 α 和 IL-1 β 和它们的内源性受体抗体 IL-1ra。在 *H.pylori* 存在时, IL-1 β 的表达上调并且在激发和增强炎症反应中发挥主要的角

色^[50]。一个至关重要的证据证明了 IL-1B 在 *H.pylori* 诱导的胃癌中的重要作用, 此证据来自一个转基因的小鼠模型, 通过 H+/K+ATPase β 启动子使小鼠胃中的 IL-1 β 过表达, 并且过表达的 IL-1 β 被限于胃中, 此种转基因小鼠有增厚的胃粘膜, 产生低水平的胃酸, 逐渐发展为严重的胃炎、萎缩性胃炎、肠化生、不典型增生和胃腺癌^[51]。关键的是, 这些 IL-1 β 转基因小鼠模拟人类胃部肿瘤的发生的多步骤过程, 这些变化在 *H.pylori* 感染时加速其产生。

IL-1B 基因的等位基因多态性已经被报道, 分别位于转录起始位点的 -511、-31 和密码子区的 +3954 bp。*IL-1RN* 基因在内含子 2 区有一个可变的串联重复区(VNTR), 因此形成了 5 个不同的等位基因。El-Omar 等^[52]发现, 当 *IL-1RN* 基因型为 allele2/2 时, 胃癌发生几率增加 5.6 倍。何彩云等^[53]综述了 *IL-1B-31C*、*-511T* 等位基因型的个体在 *H.pylori* 感染时 IL-1 的表达量显著增加, 并且胃酸分泌减少; *IL-1B-31C*、*-511T* 等位基因型增加了胃癌相关性, 但是也有研究发现此基因型与胃癌无相关性; 作者认为这些差异可能是研究分组、人群饮食差异等因素干扰造成的; 作者还认为 *IL-1* 基因型与 *H.pylori* 毒力因子(*cagA* 阳性, *vacA s1* 和 *vacA m1*)的联合作用增强了胃癌的风险。因为每一种细菌和宿主的基因型的联合分析与只考虑细菌或高风险的宿主基因型的分析相比, 患胃癌的优势比显著增高。这强调了细菌和宿主在胃癌发生机制上的相互作用。

2.2 其他细胞因子基因多态性及其临床和流行病学意义

H.pylori 感染的胃粘膜含有高水平的细胞因子, 除 *IL-1B* 外还有 *IL-8*、*IL-6*、*TNF-A*、*MIP 1 α* 和 *IL-2* 等。El-Omar 等^[54]报道, 随着宿主细胞因子基因多态位点的增加(包括 *IL-31*、*1B-511*、*IL-1RN*、*TNF-A-380* 及 *IL-10ATA/ATA*), 胃癌的发病风险也逐渐增高, 当这些基因多态位点达到 3~4 个时, 胃癌的危险性增加 27 倍。

2.3 TLR 免疫相关基因多态性及其临床和流行病学意义

Arbour 等^[55]描述了 *TLR4* 基因在外显子 4 的+896 位点的功能基因多态性(rs4986790), 这种 A > G 的转变导致了在氨基酸 299 的位点上天门冬氨酸被甘

氨酸所代替(Asp299Gly)和 *TLR4* 受体胞外域的变更。这些改变导致一系列的炎症和感染状态, 包括动脉粥样硬化、心肌梗死、炎症性肠病和脓毒症^[56-58]。最近研究证明, 通过 *TLR4* 受体的信号传导缺陷最终能导致放大的炎症反应和严重的组织损伤, 甚至能导致初始免疫反应减弱。Hold 等^[59]研究了此多态性对 *H.pylori* 导致的胃表现型的影响和发展为癌前病变和胃癌的风险, 作者评估了胃癌亲属的癌前病变包括胃酸过少和萎缩性胃炎与此多态性的相关性。*TLR4+896G* 的携带者胃酸过少的优势比为 7.7 (95% CI: 1.6-37.6), 并且有严重的萎缩性胃炎。60% 的胃癌患者有 1 或 2 个 *TLR4* 可变的等位基因, 而对照组只有 8%。

在 *TLR2-196* 到 -174 位存在 22 bp 的核苷酸缺失, 该缺失可以显著改变 *TLR2* 启动子的功能, 并因此影响它的活性, 在日本人群中的研究发现, *TLR2-196-174del/del* 基因多态性增加了非贲门性胃癌的风险(OR = 6.06; 95% CI = 1.86-19.72)^[60]。有报道对高加索人群研究发现 *TLR9-1237C* 与低胃酸症和萎缩性胃炎呈显著危险正相关性(OR=3.9; 95% CI=1.7-8.6), 并且该研究也在体外实验中证实-1237C 通过激活 NF- κ B 增强了 *TLR9* 的转录活性^[61]。

其他免疫基因如 *NOD2*、*NOD1*、*CD14* 等基因多态性也影响胃病的发生具有重要的临床意义。

2.4 HLA 基因多态性及其临床和流行病学意义

人类白细胞抗原(Human leukocyte antigen, HLA) 系统是目前所知人体最复杂的多态系统。*HLA* 基因是免疫系统重要基因, 与自身识别、抗原提呈、免疫应答及免疫调节等有关。在 *HLA* 等位基因多态性与 *H.pylori* 的易感性研究中发现^[62], *HLA* 类等位基因中, *CW*15* 可能是 *H.pylori* 感染的易感基因; *A*02*、*B*48* 和 *CW*08* 可能是保护性基因, 而 *HLA II* 类等位基因与 *H.pylori* 感染无关。但是 Azuma 等^[63]报道了在 *HLA II* 类等位基因 *DQA1*0102* 等位基因频率在 *H.pylori* 感染的胃萎缩性胃炎患者中与对照组相比明显偏低, 并且 *DQA1*0102* 的等位基因频率在 *H.pylori* 感染的肠型胃腺癌中也是明显的偏低, 因此 *HLA DQA1*0102* 等位基因是萎缩性胃炎的肠型胃腺癌的保护性因素。Magnusson 等^[64]研究了 *HLAII* 类等位基因在 *H.pylori* 感染的胃癌患者的风险,

证实了 Azuma 等发现的 *DQA1*0102* 等位基因降低了 *H.pylori* 感染的风险, 但没有发现其具有保护作用。他们还发现 *DRB1*1601* 等位基因明显的增强了胃癌风险, 其优势比为 8.7(95% CI: 2.7–28.0)。*DRB1*1601* 的效应在 *H.pylori* 阴性的患者中非常明显。

HLA 与 *H.pylori* 感染和临床疾病的易感性关系还需要更深入的研究。

2.5 其他基因多态性及其临床和流行病学意义

鼠双微体(MDM2)蛋白是 *p53* 的负调节器, 是连接 *p53* 的核磷蛋白, 能抑制 *p53* 依赖的转录。据报道^[65], *MDM2* 启动子区 SNP309 (T>G) (rs2279744)的 G 等位基因能够增强 Sp1 的转录活性, 导致 *MDM2* 的蛋白水平增高从而导致 *p53* 反应通路的衰减。并且有研究证实了 *GG* 基因型与胃癌的风险相关其 OR 值为 2.05(95%CI 1.31–3.20)^[66]。

胃蛋白酶原 C(*PGC*)基因在外显子 7 和 8 之间存在 100 bp 的插入/缺失片段, 因此存在 4 种基因型片段, 分别为 310 bp(等位基因 1)、400 bp(等位基因 2)、450 bp(等位基因 3)、480 bp(等位基因 4)。Sun 等^[67] 研究报道, *H.pylori* 感染者中 *PGC* 纯合子等位基因 1 基因型增加了消化性溃疡的风险(OR 8.69; 95% CI 1.01–74.69)、萎缩性胃炎的风险(OR 11.12; 95% CI 1.37–90.84)和胃癌的风险(OR 10.61; 95% CI 1.28–87.79)。

其他的基因多态性还有 *PTPN11*、*p53* 等。*PTPN11G/A* 强调了 *H.pylori* 的 *cagA* 毒力因子与宿主多态性关系的相互作用。*p53* 密码子 72 的遗传多态性与胃病的关系具有复杂性。

宿主遗传多态性与多种临床疾病相关并且影响 *H.pylori* 感染的临床结局, 但宿主遗传多态性与胃病相关性的报道不大一致。这可能是因为: (1) 与研究人群及遗传背景不同有关。(2) 研究样本足够大, 以及研究设计的科学性、严谨性对研究结果和结论有至关重要的影响。(3) 遗传多态性与胃癌的相关性研究应该考虑到胃癌的部位、分级和组织学分类。对 *H.pylori* 毒力基因分型和宿主遗传多态性的联合检测有利于发现更强的胃病风险性因素, 但这方面的报道较少, 需要增加这方面的研究。

总之, *H.pylori* 作为世界上最常见的慢性感染细菌, 虽然大部分感染者是无症状的, 但是它也能导

致部分人群发生严重的临床疾病。*H.pylori* 毒力致病因子和它们如何与不同遗传背景的宿主相互作用, 以及宿主遗传多态性与胃病相关性的研究领域的流行病学和分子生物学的深入研究会使我们更加全面准确地理解 *H.pylori* 的发病机理, 进而对该类疾病进行有效的预防和治疗。

参考文献(References):

- [1] Rudi J, Kuck D, Rudy A, Sieg A, Maiwald M, Stremmel W. *Helicobacter pylori vacA* genotypes and *cagA* gene in a series of 383 *H. pylori*-positive patients. *Z Gastroenterol*, 2000, 38(7): 559–564.
- [2] Ahmad A, Govil Y, Frank BB. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Gastroenterol*, 2003, 98(5): 975–986.
- [3] Olivares D, Gisbert JP. Factors involved in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Rev Esp Enferm Dig*, 2006, 98(5): 374–386.
- [4] Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM Jr. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res*, 2003, 63(5): 951–957.
- [5] Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N. Molecular characterization of the 128 kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(12): 5791–5795.
- [6] Peek RM Jr, Crabtree JE. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J Pathol*, 2006, 208(2): 233–248.
- [7] Ando T, Goto Y, Maeda O, Watanabe O, Ishiguro K, Goto H. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(2): 181–186.
- [8] Crabtree JE, Covacci A, Farmery SM, Xiang Z, Tompkins DS, Perry S, Lindley IJ, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J Clin Pathol*, 1995, 48(1): 41–45.
- [9] Crabtree JE, Farmery SM, Lindley IJ, Figura N, Peichl P, Tompkins DS. CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines. *J Clin Pathol*, 1994, 47(10): 945–950.
- [10] Sharma SA, Tummuru MK, Miller GG, Blaser MJ. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation *in vitro*. *Infect Immun*, 1995, 63(5): 1681–1687.
- [11] Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Imanishi J.

- Helicobacter pylori cagA* gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology*, 1996, 110(6): 1744–1752.
- [12] Peek RM, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao XM, Atherton JC, Blaser J. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest*, 1995, 73(6): 760–770.
- [13] Crabtree JE, Taylor JD, Wyatt JI, Heatley RV, Shallcross TM, Tompkins DS, Rathbone BJ. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet*, 1991, 338(8763): 332–335.
- [14] Weel JFL, van der Hulst RWM, Gerrits Y, Roorda P, Feller M, Dankert J, Tytgat GNJ, van der Ende A. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J Infect Dis*, 1996, 173(5): 1171–1175.
- [15] Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelmann H. Risk for gastric cancer in people with *CagA* positive or *CagA* negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 1997, 40(3): 297–301.
- [16] Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*, 1995, 55(10): 2111–2115.
- [17] Crabtree JE, Wyatt JI, Sobala GM, Miller G, Tompkins DS, Primrose JN, Morgan AG. Systemic and mucosal humoral responses to *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Gut*, 1993, 34(10): 1339–1343.
- [18] Li J, Ou ZY, Wang FJ, Guo Y, Zhang R, Zhang J, Li PQ, Xu WJ, He YS. Distinctiveness of the *cagA* genotype in children and adults with peptic symptoms in South China. *Helicobacter*, 2009, 14(4): 248–255.
- [19] Tummuru MK, Sharma SA, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol*, 1995, 18(5): 867–876.
- [20] Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, 1999, 284(5418): 1328–1333.
- [21] Módena JLP, Sales AIL, Acrani GO, Russo R, Ribeiro MAV, Fukuhara Y, da Silveira WD, Módena JLP, de Oliveira RB, Brocchi M. Association between *Helicobacter pylori* genotypes and gastric disorders in relation to the *cag* pathogenicity island. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007, 59(1): 7–16.
- [22] Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interaction in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 2008, 134(1): 306–323.
- [23] Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. 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.
- [24] Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*, 2004, 113(3): 321–333.
- [25] Sugimoto M, Yamaoka Y. The association of *vacA* genotype and *Helicobacter pylori*-related disease in Latin American and African populations. *Clin Microbiol Infect*, 2009, 15(9): 835–842.
- [26] Bindayna KM, Al Mahmeed A. *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with and without duodenal ulcer in Bahrain. *Indian J Gastroenterol*, 2009, 28(5): 179–175.
- [27] Douraghi M, Talebkhan Y, Zeraati H, Ebrahimzadeh F, Nahvijoo A, Morakabati A, Ghafarpour M, Esmaili M, Bababeik M, Oghalaie A, Rakhshani N, Hosseini ME, Mohagheghi MA, Mohammadi M. Multiple gene status in *Helicobacter pylori* strains and risk of gastric cancer development. *Digestion*, 2009, 80(3): 200–207.
- [28] Shirasaka D. *Helicobacter pylori* VacA and gastric ulcer. *Int J Hematol*, 2006, 84(4): 316–318.
- [29] Terebiznik MR, Vazquez CL, Torbicki K, Bans D, Wang T, Hong W, Blanke SR, Colombo MI, Jones NL. *Helicobacter pylori* VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells. *Infect Immun* 2006, 74(12): 6599–6614.
- [30] Sheu BC, Lien HC, Ho HN, Lin HH, Chow SN, Huang SC, Hsu SM. Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. *Cancer Res*, 2003, 63(19): 6537–6542.
- [31] Zamboni CF, Navaglia F, Basso D, Rugge M, Plebani M. *Helicobacter pylori* babA2, *cagA*, and *s1 vacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J Clin Pathol*, 2003, 56(4): 287–291.
- [32] Tsutsumi R, Takahashi A, Azuma T, Higashi H, Hatakeyama M. Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SH.PYLORI-2 complexed with *Helicobacter pylori CagA*. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(1): 261–276.
- [33] Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L,

- Roche N, Ångström J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadström T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois A, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarström L, Borén T. *Helicobacter pylori* SabA adhesion in persistent infection and chronic inflammation. *Science*, 2002, 297(5581): 537–578.
- [34] Yanai A, Maeda S, Hikiba Y, Shibata W, Ohmae T, Hirata Y, Ogura K, Yoshida H, Omata M. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *sabA* genotype in Japanese clinical isolates. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(12): 2228–2232.
- [35] Peek RM Jr, Thompson SA, Donahue JP, Tham KT, Atherton JC, Blaser MJ, Miller GG. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians*, 1998, 110(6): 531–544.
- [36] Nishiya D, Shimoyama T, Fukuda S, Yoshimura T, Tanaka M, Munakata A. Evaluation of the clinical relevance of the *iceA1* gene in patients with *Helicobacter pylori* infection in Japan. *Scand J Gastroenterol*, 2000, 35(1): 36–39.
- [37] Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(7): 2274–2279.
- [38] Ashour AAR, Collares GB, Mendes EN, de Gusmão VR, de Magalhães Queiroz DM, Magalhães PP, de Carvalho AS, de Oliveira CA, Nogueira AMMF, Rocha GA, Rocha AMC. *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(5): 1746–1750.
- [39] Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R, Kusters JG, van Vliet AHM, Reindl W, Backert S, Saur D, Schmid RM, Rad RL. *Helicobacter pylori* *HopH* (*OipA*) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of *HopH* gene polymorphisms. *J Infect Dis*, 2006, 194(10): 1346–1355.
- [40] Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S, Haas R, Gutierrez O, El-Zimaity HMT, Reddy R, Arnqvist A, Graham DY. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut*, 2006, 55(6): 775–781.
- [41] Israel DA, Salama N, Krishna U, Rieger UM, Atherton JC, Falkow S, Peek RM Jr. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(25): 14625–14630.
- [42] Kuipers EJ. Exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999, 13(Suppl. 1): 3–11.
- [43] Occhialini A, Marais A, Alm R, Garcia F, Sierra R, Mégraud F. Distribution of open reading frames of plasticity region of reading frames of plasticity region of strain J99 in *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric carcinoma and gastritis patients in Costa Rica. *Infect Immun*, 2000, 68(11): 6240–6249.
- [44] Santos A, Queiroz DMM, Ménard A, Marais A, Rocha GA, Oliveira CA, Nogueira AMF, Uzeda M, Mégraud F. New pathogenicity marker found in the Plasticity Region of the *Helicobacter pylori* genome. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4): 1651–1655.
- [45] de Jonge R, Kuipers EJ, Langeveld SCL, Loffeld RJLF, Stoof J, van Vliet AHM, Kusters JG. The *Helicobacter pylori* plasticity region locus *jhp0947-jhp0949* is associated with duodenal ulcer disease and interleukin-12 production in monocyte cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2004, 41(2): 161–167.
- [46] Lu H, Hsu PI, Graham DY, Yamaoka Y. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 2005, 128(4): 833–844.
- [47] Gomes LI, Rocha GA, Rocha AMC, Soares TF, Oliveira CA, Bittencourt PFS, Queiroz DMM. Lack of association between *Helicobacter pylori* infection with *dupA*-positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients. *Int J Med Microbiol*, 2008, 298(3–4): 223–230.
- [48] Douraghi M, Mohammadi M, Oghalaie A, Abdiraz A, Mohagheghi MA, Hosseini ME, Zeraati H, Ghasemi A, Esmaili M, Mohajerani N. *DupA* as a risk determinant in *Helicobacter pylori* infection. *J Med Microbiol*, 2008, 57(pt 5): 554–562.
- [49] Argent RH, Burette A, Miendje Deyi VY, Atherton JC. The presence of *dupA* in *Helicobacter pylori* is not significantly associated with duodenal ulceration in Belgium, South Africa, China, or North America. *Clin Infect Dis*, 2007, 45(9): 1204–1206.
- [50] El-Omar EM. The importance of interleukin 1 β in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut*, 2001, 48(6): 743–747.
- [51] Tu SP, Bhagat G, Cui GL, Takaishi S, Kurt-Jones EA, Rickman B, Betz KS, Penz-Oesterreicher M, Bjorkdahl O, Fox JG, Wang TC. Overexpression of interleukin-1 β induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell*, 2008, 14(5): 408–419.
- [52] El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KEL, Breamk JH, Youngk HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC,

- Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, 2000, 404(6776): 398-402.
- [53] 何彩云, 袁媛. 宿主基因单核苷酸多态性与幽门螺杆菌相关胃癌. *遗传*, 2011, 33(2): 109-116
- [54] El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, Stanford JL, Mayne ST, Goedert J, Blot WJ, Fraumeni JF Jr, Chow WH. Increased risk of Noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*, 2003, 124(5): 1193-1201.
- [55] Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. *TLR4* mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*, 2000, 25(2): 187-191.
- [56] Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, van Gossum A, Devière J, Rutgeerts P. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*, 2004, 53(7): 987-992.
- [57] Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the *TLR4* receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*, 2002, 162(9): 1028-1032.
- [58] Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberholzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*, 2002, 347(3): 185-192.
- [59] Hold GL, Rabkin CS, Chow WH, Smith MG, Gammon MD, Risch HA, Vaughan TL, McColl KE, Lissowska J, Zatonski W, Schoenberg JB, Blot WJ, Mowat NAG, Fraumeni JF Jr, El-Omar EM. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors. *Gastroenterology*, 2007, 132(3): 905-912.
- [60] Tahara T, Arisawa T, Wang FY, Shibata T, Nakamura M, Sakata M, Hirata I, Nakano H. Toll-like receptor 2 -196 to 174del polymorphism influences the susceptibility of Japanese people to gastric cancer. *Cancer Sci*, 2007, 98(11): 1790-1794.
- [61] Ng MTH, Van't Hof R, Crockett JC, Hope ME, Berry S, Thomson J, McLean MH, McColl KEL, El-Omar EM, Hold GL. Increase in NF- κ B binding affinity of the C allelic variant of the Toll-like receptor 9 -1237T/C polymorphism is associated with *Helicobacter pylori* induced gastric disease. *Infect Immun*, 2010, 78(3): 1345-1352.
- [62] 李昭辉, 王占民, 张联, 潘凯枫, 张春风, 宁涛, 柯杨. 山东临朐人群 HLA 等位基因多态性与幽门螺杆菌感染关系的研究. *遗传*, 2004, 26(2): 143-146.
- [63] Azuma T, Ito S, Sato F, Yamazaki Y, Miyaji H, Ito Y, Suto H, Kuriyama M, Kato T, Kohli Y. The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer*, 1998, 82(6): 1013-1018.
- [64] Magnusson PKE, Enroth H, Eriksson I, Held M, Nyrén O, Engstrand L, Hansson LE, Gyllenstein UB. Gastric cancer and human leukocyte antigen: distinct DQ and DR alleles are associated with development of gastric cancer and infection by *Helicobacter pylori*. *Cancer Res*, 2001, 61(6): 2684-2689.
- [65] Bond GL, Hu WW, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang SJ, Strong LC, Lozano G, Levine AJ. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*, 2004, 119(5): 591-602.
- [66] Wang XY, Yang Y, Ho B, Yang Y, Huang ZH, Zhang ZH, Zhang GX. Interaction of *Helicobacter pylori* with genetic variants in the MDM2 promoter, is associated with gastric cancer susceptibility in Chinese patients. *Helicobacter*, 2009, 14(5): 466-471.
- [67] Sun LP, Guo XL, Zhang Y, Chen W, Bai XL, Liu J, Yuan Y. Impact of pepsinogen C polymorphism on individual susceptibility to gastric cancer and its precancerous conditions in a Northeast Chinese population. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(8): 1033-1039.