

· 论 著 ·

幽门螺杆菌 VacA 基因型与耐药性分析

田一玲, 蒋任举, 李华平, 杨致邦
(重庆医科大学病原生物学教研室 400016)

摘要:目的 探讨幽门螺杆菌(*H. pylori*) VacA 基因型在各种胃肠疾病中的分布及其对常用抗生素的敏感性。方法 从胃十二指肠疾病患者胃黏膜标本中分离培养 *H. pylori*, 用 PCR 测定 VacA 基因型, 并采用琼脂稀释法进行对阿莫西林、克拉霉素、甲硝唑 3 种抗生素的药物敏感性试验。结果 108 株 *H. pylori* 菌株, VacA s1a 阳性 85 株(78.7%), VacA s1b 阳性 22 株(20.4%), VacA m1 阳性 29 株(26.9%), VacA m2 阳性 77 株(71.3%), VacA s1a/m2 阳性 66 株(61.1%), 未发现 s2 型菌株。其中, 慢性胃炎患者 VacA s1a 阳性率为 65.4%(34/52), 消化性溃疡患者 VacA s1a 阳性率为 90.0%(36/40), 胃癌患者 VacA s1a 阳性率为 93.8%(15/16)。对阿莫西林、克拉霉素、甲硝唑的耐药率分别为 18.5%、5.6%、65.7%, 对阿莫西林耐药的 20 株菌株中, 19 株为 VacA s1a 型。结论 *H. pylori* 菌株 VacA 基因型绝大多数为 s1a/m2 型, 该型菌株存在于各种胃肠疾病中。本地区幽门螺杆菌对克拉霉素的耐药率较低, 对甲硝唑的耐药率较高, 而对阿莫西林耐药的菌株多数为 VacA s1a 型。

关键词: 幽门螺杆菌; 细胞空泡毒素基因; 聚合酶链反应; 耐药性

中图分类号: R378; R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)13-1649-03

VacA genotypes of *Helicobacter pylori* and its drug resistance

TIAN Yi-ling, JIANG Ren-ju, LI Hua-ping, et al.

(Department of Pathobiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) VacA genotypes in different gastrointestinal diseases and its resistance to common drugs. **Methods** VacA genotypes of 108 *H. pylori* strains isolated from patients with chronic gastritis, peptic ulcer and gastric cancer were tested by polymerase chain reaction (PCR), the susceptibility test of *H. pylori* to amoxicillin, clarithromycin, metronidazole were performed by means of the agar dilution method of assay. **Results** The frequencies of the signal allele s1a, s1b and the middle-region allele m1, m2 were 85(78.7%), 22(20.4%), 29(26.9%), 77(71.3%) respectively. The numbers of *H. pylori* strains of VacA s1a/m2 positive were 66(61.1%). The s2 form was not found. The positive rates of VacA s1a of *H. pylori* strains isolated from patients with chronic gastritis, peptic ulcer and gastric cancer were 65.4% (34/52), 90.0% (36/40) and 93.8% (15/16) respectively. Resistance rates of *H. pylori* strains were as follows: 18.5% to amoxicillin, 5.6% to clarithromycin and 65.7% to metronidazole. Nineteen out of 20 *H. pylori* strains resistant to amoxicillin were VacA s1a form. **Conclusion** The majority of *H. pylori* strains isolated from Chongqing patients express s1a/m2. The s1a/m2 genotype is dispersed in all of the gastrointestinal diseases associated with *H. pylori*. For the isolated *H. pylori* strains in Chongqing area, the drug-resistance to clarithromycin is lower, to metronidazole is higher. The most of *H. pylori* strains resistant to amoxicillin were VacA s1a form.

Key words: helicobacter pylori; vacuolating cytotoxin gene; PCR; resistance

幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染与多种胃肠疾病密切相关,但其确切的致病机制尚未完全明了。随着抗菌药物的广泛应用,针对各种抗 *H. pylori* 抗菌药物的耐药菌株逐渐出现, *H. pylori* 耐药性问题也日益突出,使得 *H. pylori* 的根除率下降,严重影响了临床治疗效果。由于 *H. pylori* 感染存在地域差异,其耐药性也因地区不同而有所不同,因此研究 *H. pylori* 对抗菌药物的耐药性及耐药机制,寻求更有效的药物和治疗方法非常重要。作者对本校附属医院临床分离的 *H. pylori* 菌株进行 VacA 基因型的检测以及对常用的 3 种抗 *H. pylori* 抗菌药物进行药物敏感性试验,探讨本地区 *H. pylori* VacA 基因型的分布以及与各种胃肠疾病的关系和耐药性,为临床诊断 *H. pylori* 感染,深入研究 *H. pylori* 的致病机制奠定基础,并为抗菌药物的选择提供一定的依据。

1 材料与方

1.1 菌株 108 株 *H. pylori* 临床分离株来自临床收集的胃十二指肠疾病患者胃黏膜活检组织标本分离培养获得,本室保存。其中 52 株来自慢性胃炎患者,40 株来自消化性溃疡患

者,16 株来自胃癌患者。本组患者中男 60 例,女 48 例,年龄 23~68 岁。标准菌株 NCTC11637 由本室保存。黏膜中 *H. pylori* 的分离培养和鉴定:将临床所取胃窦黏膜标本,接种于含 7% 羊血的 *H. pylori* 琼脂平板(本室自制)上,微需氧条件下 37 °C 培养 3~4 d,并作常规革兰染色油镜检查,经菌落形态、涂片观察形态及染色性、快速尿素酶试验等进行 *H. pylori* 鉴定。

1.2 *H. pylori* DNA 的提取 采用酚-氯仿抽提法提取 *H. pylori* 基因组 DNA,置 -20 °C 冰箱保存。

1.3 引物的设计与合成 根据相关文献设计引物,上海 Sangon 公司合成。序列见表 1。

1.4 PCR 检测 将提取的 *H. pylori* DNA 作为模板进行 PCR 扩增,检测 *H. pylori* VacA s1a、VacA s1b、VacA s2、VacA m1、VacA m2 基因。反应总体积为 50 μ L,包括 dNTP、引物各 1 μ L,模板 DNA 10 μ L,Tag DNA 聚合酶 2 μ L(2 u/ μ L),余为 10 \times PCR 缓冲液和双蒸水。扩增条件为:94 °C 变性 45 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,共 35 个循环,第 1 个循环前 94 °C 预

表 1 H. pylori VacA 基因寡核苷酸引物

扩增片段	引物名称	引物序列	PCR 产物大小(bp)
VacA s1a	SS1-F	5'GTCAGCATCACACCGCAAC3'	190
	VA1-R	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	
VacA s1b	SS3-F	5'AGCGCCATACCGCAAGAG3'	187
	VA1-R	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	
VacA s2	SS2-F	5'GCTAACACGCCAAATGATCC3'	199
	VA1-R	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	
VacA m1	VA3-F	5'GGTCAAAAATGCGGTCATGG3'	290
	VA3-R	5'CCATTGGTACCTGTAGAAAC3'	
VacA m2	VA4-F	5'GGAGCCCCAGGAAACATTG3'	352
	VA4-R	5'CATAACTAGCGCCTTGCAC3'	

变性 5 min,最后 1 个循环后 72 °C 再延伸 7 min。取 10 μL PCR 产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像仪上分析结果。

1.5 琼脂稀释法药敏试验 制备含不同浓度抗菌药物的平板,各在其上划 6 个扇区,每个扇区接种 1 株细菌(调整浓度为 5×10^8 cfu/mL)。置 37 °C、微需氧条件下培养 3 d 观察结果。以无细菌生长的抗菌药物最高稀释度作为最低抑菌浓度(MIC),阿莫西林 MIC > 8 mg/L、克拉霉素 MIC > 2 mg/L、甲硝唑 MIC > 32 mg/L 定为耐药菌株。药敏质控采用标准菌株 NCTC11637 与实验同步进行,作质量控制。

2 结 果

2.1 VacA 基因检测结果 108 株 H. pylori 临床分离株中,信号序列检测结果为:VacA s1a 阳性菌株 85 株(78.7%),VacA s1b 阳性菌株为 22 株(20.4%),未检出 s2 型,另有 1 株上述 PCR 结果阴性,无法确定其型别。中间序列检测结果为:VacA m1 阳性菌株为 29 株(26.9%),VacA m2 阳性菌株为 77 株(71.3%),另有 2 株无法确定型别。其中 VacA s1a/m1 型 18 株(16.7%),s1a/m2 型 66 株(61.1%),s1b/m1 型 11 株(10.2%),s1b/m2 型 11 株(10.2%),有 1 株不能按 s1a、s1b、s2 分型,有 2 株不能按 m1、m2 分型。

2.2 不同胃肠疾病中 H. pylori VacA s1a、VacA m2 型的分布 见表 2。

表 2 H. pylori VacA s1a、VacA m2 型在各种胃肠疾病中的分布[n(%)]

组别	n	VacA s1a	VacA m2
慢性胃炎组	52	34(65.4)	34(65.4)
消化性溃疡组	40	36(90.0)*	31(77.5)
胃癌组	16	15(93.8)*	12(5.0)

与慢性胃炎组比较,* : $P < 0.05$ 。

消化性溃疡组与慢性胃炎组 s1a 型差异有统计学意义($P < 0.05$),胃癌组与慢性胃炎组 s1a 型差异有统计学意义($P < 0.05$),而胃癌组与消化性溃疡组 s1a 型差异无统计学意义($P > 0.05$),3 组之间 m2 型差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 H. pylori 对常用抗生素的耐药情况 108 株 H. pylori 临床分离株对阿莫西林、克拉霉素和甲硝唑的耐药率分别为 18.5%(20/108)、5.6%(6/108)、65.7%(71/108),甲硝唑的耐

药率明显高于阿莫西林和克拉霉素,而对甲硝唑耐药的 71 株 H. pylori 菌株中,女性为 45 株(63.4%),男性为 26 株(36.6%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 VacA 基因型与耐药的关系 20 株耐阿莫西林的 H. pylori 菌株中,检测到 VacA s1a 阳性菌株 19 株(95.0%),88 株对阿莫西林敏感的菌株中,检测到 VacA s1a 阳性菌株 66 株(75.0%),差异有统计学意义($P < 0.05$);而 71 株耐甲硝唑的菌株中,检测到 VacA s1a 阳性菌株 56 株(78.9%),37 株对甲硝唑敏感的菌株中,检测到 VacA s1a 阳性菌株 29 株(78.3%),差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

VacA 基因存在于所有 H. pylori 菌株中,但不同的菌株表达不同的 VacA 表型。3 个不同信号区(s1a、s1b、s2)和 2 个不同中间区(m1、m2)组成了 H. pylori VacA 基因的 6 种重组体:s1a/m1、s1a/m2、s1b/m1、s1b/m2 和 s2/m2、s2/m1 型。不同国家、不同地区分离的 H. pylori 菌株,其 VacA 基因型的分布各不相同,具有高度多态性,但各地区均未发现 s2/m1 型。美国 s1/m1、s2/m2 各占一半,东欧和北欧以 s1a 型为主,日本的研究则显示绝大多数为 s1a/m1 型。国内不同地区 VacA 基因型的分布也有差异^[1],上海和广州以 s1a/m2 型为主,西安地区则以 s1a/m1 型为主,本组感染的 H. pylori 菌株主要为 s1a/m2 型(61.1%),而且有部分菌株无法通过现有的序列类型分型,同样的结果也见于其他研究中。

H. pylori VacA 基因型与临床疾病的关系一直受到众多学者重视。很多研究表明,H. pylori 菌株特定的 VacA 基因型与其体外细胞毒性及临床疾病相关,其中 VacA s1a 与细菌毒力、细胞毒素以及相关疾病的转归有密切关系,特别是与消化性溃疡的发生高度相关。Figueiredo 等^[2]用 PCR 和原位杂交的方法检测 109 例 H. pylori 感染者胃黏膜标本 VacA 基因型,结果发现胃溃疡和胃癌与 s1、m1 型 VacA 基因型显著相关,十二指肠溃疡与 s1 型显著相关,而与 m 型不相关,Atherton 等也报道 s1a 型感染者较 s1b 型感染者和无 H. pylori 感染者更有可能发生消化性溃疡。Miehlke 等报道 70.6% 的胃癌患者 H. pylori 菌株的 VacA 基因型为 s1 型,认为 VacA s1、m1 与胃癌的发生密切相关,可以用于鉴别 H. pylori 感染的胃癌高危人群,同样的结果也见于 Ashour 等^[3]的报道中。作者研究了临床分离的 H. pylori 菌株 VacA 基因型在慢性胃炎及消化性溃疡和胃癌中的分布情况,这 3 组疾病分离的 H. pylori 菌株

VacA 基因型均以 s1a 和 m2 型为主,慢性胃炎组 s1a 型为 65.4%,m2 型为 65.4%,消化性溃疡组 s1a 型为 90.0%,m2 型为 77.5%,胃癌组 s1a 型为 93.8%,m2 型为 75.0%,消化性溃疡组和胃癌组与慢性胃炎组之间 s1a 型有显著性差异,而 m2 型差异无显著性,也就是说从消化性溃疡和胃癌患者胃黏膜标本中分离出 VacA s1a 型的可能性高于其他基因型 H. pylori 菌株,而 VacA m1、m2 型则与 H. pylori 相关疾病无明显关系,表明感染 VacA s1a 阳性 H. pylori 菌株者更易发生消化性溃疡和胃癌等较严重的胃肠疾病。

目前,临床上用于治疗幽门螺杆菌感染的抗菌药物主要有硝基咪唑类(甲硝唑、替硝唑)、大环内酯类(克拉霉素、阿奇霉素)、 β -内酰胺类(阿莫西林)、四环素及呋喃唑酮等。随着抗菌药物的广泛使用,其耐药菌株也日益增多^[4-6]。H. pylori 耐药率在不同国家和地区不尽相同^[7-8],对某些抗菌药物的耐药程度与过去使用该药的情况有关。因此,地区性 H. pylori 耐药率监测和按地区耐药性选择治疗方案已受到普遍重视。本实验结果表明 H. pylori 对甲硝唑有较高的耐药性,可能与硝基咪唑类药物在人群中广泛使用有关,当然也不能排除 H. pylori 对甲硝唑存在较高的原发性耐药。很多资料表明,H. pylori 针对阿莫西林和克拉霉素的耐药率是较低的,然而本研究中阿莫西林的耐药率也比较高,可能与本地区抗菌药物的不合理使用有关,应予以重视。

关于 H. pylori 不同 VacA 基因型与耐药性的关系,在针对阿莫西林和甲硝唑所做的药敏试验中,发现从阿莫西林敏感组和耐药组中分离到 VacA s1a 阳性 H. pylori 菌株的频率是有差异的,提示 H. pylori VacA 基因与其耐药性之间存在着某种联系,是否有可能决定 H. pylori 耐药的基因与 VacA 基因在 H. pylori 染色体上存在某种关联,或者还与其他毒力基因的表达有关,还需进一步研究和探索。

参考文献:

- [1] 叶桂安,张万岱,刘利民,等. 幽门螺杆菌 vacA 基因多态性与慢性胃病[J]. 世界华人消化杂志,2001,9(5):593.
 - [2] Figueiredo C, Van Doorn LJ, Nogueira C, et al. Helicobacter pylori genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains[J]. Scand J Gastroenterol,2001,36(2):128.
 - [3] Ashour AA, Magalhaes PP, Mendes EN, et al. Distribution of vacA genotypes in Helicobacter pylori strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma[J]. FEMS Immunol Med Microbiol,2002,33(3):173.
 - [4] Cheng H, Hu FL. The epidemiology of helicobacter pylori resistance to antibiotics in Beijing[J]. ZhongHua YiXue ZaZhi,2005,85(39):2754.
 - [5] Datta S, Chattopadhyay S, Patra R, et al. Most Helicobacter pylori strains of Kolkata in India are resistant to metronidazole but susceptible to other drugs commonly used for eradication and ulcer therapy[J]. Aliment Pharmacol Ther,2005,22(1):51.
 - [6] Rimbara E, Noguchi N. Susceptibilities to clarithromycin, amoxicillin and metronidazole of Helicobacter pylori isolates from the antrum and corpus in Tokyo, Japan, 1995—2001[J]. Clin Microbiol Infect,2005,11(4):307.
 - [7] 黄频,楼望林,杨更发,等. 2 357 例幽门螺杆菌感染及抗菌药物耐药分析[J]. 中国新药杂志,2007,42(6):512.
 - [8] Lesbros-Pantoflickova D, Corthesy-Theulaz I, Blum AL. Helicobacter pylori and probiotics[J]. J Nutr,2007,137:812.
- (收稿日期:2009-09-28 修回日期:2009-11-20)
-
- (上接第 1648 页)
- [4] 中华医学会呼吸病学分会睡眠呼吸疾病学组. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指南[J]. 中华内科杂志,2003,43(8):594.
 - [5] Berger KI, Goldring RM, Rapoport DM. Obesity hypoventilation syndrome[J]. Semin Respir Crit Care Med,2009,30(3):253.
 - [6] 包海荣,余勤,刘晓菊. 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征患者血清白细胞介素 8 和单核细胞趋化蛋白 1 水平的变化及意义[J]. 临床荟萃,2004,19(20):1156.
 - [7] Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, et al. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive air way pressure [J]. Circulation,2003,107(8):1129.
 - [8] 王智刚,张希龙,李翀,等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气患者血浆 TNF- α 水平的变化[J]. 江苏医药,2009,35(9):1005.
 - [9] Ohga E, Tomita T, Wada H, et al. Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1[J]. J Appl Physiol,2003,94(1):179.
 - [10] Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Predictors of elevated nuclear factor kappaB dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome[J]. Am J Respir Crit Care Med,2006,174:824.
 - [11] Arter JL, Chi DS. Obstructive sleep apnea, inflammation, and cardiopulmonary disease [J]. Front Biosci,2004,9(9):2892.
- (收稿日期:2010-01-25 修回日期:2009-02-09)