

· 临床研究 ·

贵州省某院幽门螺杆菌致病性的优势基因型特征*

李大欢¹, 刘 苓^{1△}, 刘娅琳¹, 周 力¹, 车筑平², 谭庆华²

(贵阳医学院附属医院: 1. 消化内科; 2. 内镜科, 贵阳 550004)

摘要:目的 研究贵州省幽门螺杆菌(*H. pylori*)的 CagA、VacA、iceA 基因及其不同组合对 *H. pylori* 感染结局的影响, 明确 *H. pylori* 优势致病基因型的特征。方法 于该院门诊收集有上腹部不适症状患者 178 例, 筛选出 50 例临床菌株, 其中慢性非萎缩性胃炎(28 例), 消化性溃疡(22 例), 用聚合酶链反应(PCR)扩增 DNA 检测 CagA、VacAs1、VacAs2、VacAm、iceA1、iceA2, 经琼脂糖凝胶电泳及测序对以上产物进行检测, BLAST 分析与标准菌株的差异性, 用 χ^2 检验以及 Fisher 精确检验分析各基因及其不同组合与临床疾病的相关性。结果 50 例菌株 CagA、VacAs1、VacAs2、VacAm、iceA1、iceA2 基因阳性率分别为 92%、94%、0%、30%、36%、94%, 其基因同源性与标准菌株相比均大于 90%。CagA⁺ 与 VacA⁺ 存在正相关性。CagA⁺/VacAs1⁺/iceA2⁺ 的阳性率显著高于其他基因组合, 单一基因及其不同组合在各组疾病中分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 CagA⁺/VacAs1⁺/iceA2⁺ 为贵州地区 *H. pylori* 的优势致病基因型, CagA、VacAs1、VacAm、iceA1、iceA2 各单一基因及其他不同组合与临床结局的严重与否无关。

关键词: 螺杆菌, 幽门; CagA; VacA; iceA; 贵州

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.05.009

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)05-0504-04

The characteristics of dominant genotype of pathogenic *Helicobacter pylori* in a hospital of Guizhou province*Li Dahuan¹, Liu Ling^{1△}, Liu Yalin¹, Zhou Li¹, Che Zhuping², Tan Qinghua²

(1. Department of Gastroenterology; 2. Department of Endoscopy, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To explore the predominantly pathogenic genotypes of *H. pylori* in Guizhou Province and their association with clinical outcomes. Methods 50 clinical *H. pylori* strains were selected from 178 dyspeptic patients (28 strains from chronic non-atrophy gastritis patients, and 22 strains from peptic ulcer patients). Expressions of CagA, VacAs1, VacAm, iceA1 and iceA2 were examined by Polymerase Chain Reaction (PCR). The PCR amplified fragment was detected by gel electrophoresis and sequenced. BLAST was used to analyze the difference between clinical and standard strains. Chi-square test and Fisher exact test were used to analyze the correlation of the genotypes with clinical outcomes. Results The overall prevalence rates of CagA, VacAs1, VacAs2, VacAm, iceA1, and iceA2 were 92%, 94%, 0%, 30%, 36%, and 94%, respectively. The presence of VacA was associated with the presence of CagA. Prevalence of CagA⁺/VacAs1⁺/iceA2⁺ was significantly higher than other combination of genes in all patients. The presence of single genes and their different combinations was not associated with clinical outcomes. Conclusion CagA⁺/VacAs1⁺/iceA2⁺ of *H. pylori* is the dominant pathogenic genotype in the Guizhou population. Individual genes of CagA, iceA1, iceA2, VacAm, VacAs1 or their combinations may not influence the clinical outcomes.

Key words: helicobacter pylori; cytotoxin-associated gene A; vacuolating cytotoxin A; induced by contact with epithelium A; Guizhou

幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, *H. pylori*)是人类最常见的一种致病菌, 与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌和胃黏膜相关淋巴瘤(MALT)的发生有密切关系。全球范围内 *H. pylori* 的感染率为 20%~80%, 但仅有少部分人表现出不同的临床症状。WHO 已将 *H. pylori* 列为第 I 类致癌因子^[1]。

目前发现的 *H. pylori* 致病因子有 Cag 致病岛(cytotoxin-associated gene A pathogenicity island, Cag PAI), VacA 基因(vacuolating cytotoxin A, VacA), 接触诱导基因(induced by contact with epithelium A, iceA)及其他相关基因等, 不同的 *H. pylori* 基因型和致病性在一些地区, 特别是在相对发展落后的西部地区, 尤其是贵州地区, 其分布特征及其相互关系的临床结果仍不清楚。本次研究旨在探讨贵州地区人群 *H. pylori* 致病基因的疾病相关性, 为揭示 *H. pylori* 的致病机制及监测

H. pylori 相关性胃疾病的高危人群提供线索。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 10 月至 2010 年 7 月期间就诊于贵阳医学院门诊及住院患者, 有上消化道症状 178 例, 男 99 例, 女 79 例, 所有患者均无胃部手术史, 其中以 *H. pylori* 培养阳性筛选出 50 例菌株(28 例为慢性非萎缩性胃炎, 22 例为消化性溃疡)。 *H. pylori* 标准菌株(NCTC11637)由贵阳医学院微生物教研室陈峥红副教授馈赠。

1.2 主要器材及试剂盒 微需氧培养罐、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、大量 DNA 产物纯化试剂盒、一管便携式聚合酶链式反应(PCR)试剂盒、Marker I 均购自北京天根生物制品有限公司, 实验所用引物委托上海捷瑞生物技术有限责任公司合成。

表 1 H. pylori 目的基因引物序列、产物大小及扩增条件

基因	引物序列(5'~3')	产物大小(bp)	扩增条件
CagA	CCA CAA TAA CGC TCT GTC TTC TG	215	94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min(30 个循环)
	TCT CAC CAC CTG CTA TGA CTA AC		
VacAs	s1 ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC	259	94 °C 1 min, 57 °C 1 min, 72 °C 50 s(25 个循环)
	s2 CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	286	
VacAm	CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG	215	94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 50 s(28 个循环)
	GCG TCT AAA TAA TTC CAA GG		
iceA1	GTG TTT TTA ACC AAA GTA TC	246	94 °C 30s, 50 °C 45 s, 72 °C 45 s(25 个循环)
	CTA TAG CCA GTC TCT TTG CA		
iceA2	GTT GGG TAT ATC ACA ATT TAT	229 或 334	94 °C 30 s, 51 °C 45 s, 72 °C 45 s(28 个循环)
	TTG CCC TAT TTT CTA GTA GGT		

1.3 方法 标本采集、生化鉴定、标本转运、接种、H. pylori 培养及鉴定; 参见胡林等^[2]的研究。使用基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA, 具体操作步骤按说明书。检测 CagA、VacAs1、VacAs2、VacAm、iceA1、iceA2 引物^[3-5], 扩增长度及条件见表 1; PCR 反应体系为 25 μL, 包括引物各 1 μL、模板 2 μL、染料 12.5 μL、水 8.5 μL, 热循环结束后, 取 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳(1.5%, 90 mV, 30 min), 在凝胶成像系统下观察照相, 记录结果。随机选取每个基因型各 5 株使用大量 DNA 产物纯化试剂盒进行 PCR 产物纯化, 具体操作步骤按说明书。将纯化后的 PCR 产物送至北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。用 Chromas2 对 PCR 测序结果图形进行检测。以 NCBI 中 H. pylori 菌株的相关基因序列定位 PCR 产物中序列, 采用 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)分析基因片段。

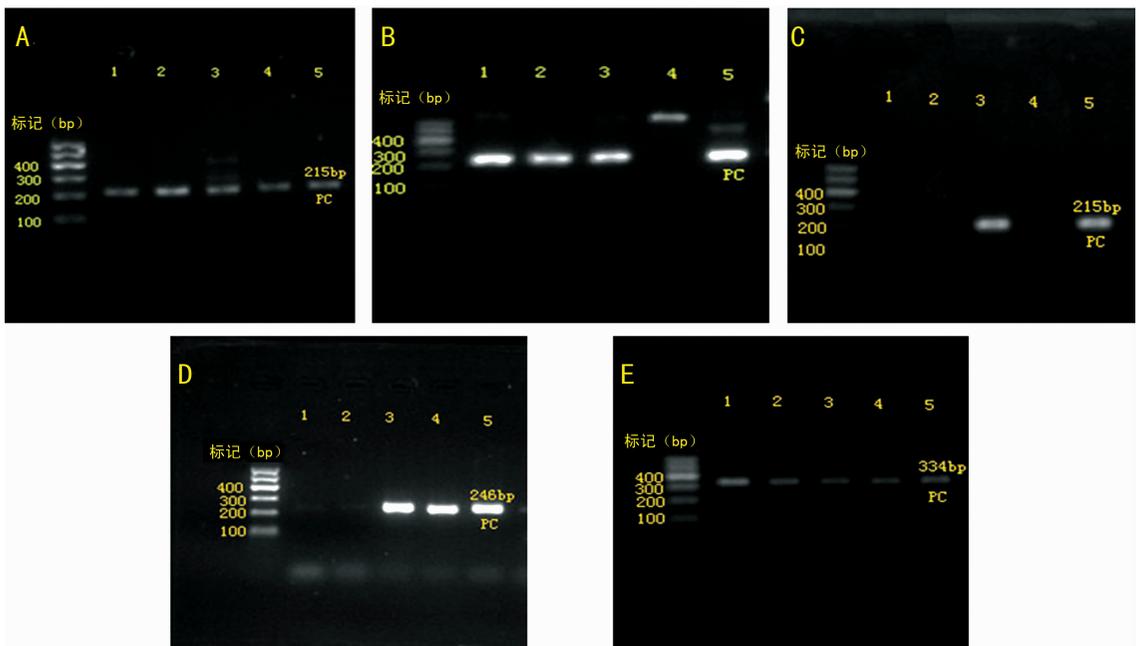
1.4 统计学处理 使用统计软件 SPSS17.0 对数据进行 χ^2 检验或者 Fisher 精确检验, 相关性分析用 Spearman 秩相关, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCR 扩增产物电泳结果及序列测序图 50 例菌株经 PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳见图 1, 并设标准菌株 NCTC11637 作为阳性对照。将纯化后扩增产物送至北京诺赛基因组研究中心有限公司进行序列测定, 之后将所测得序列通过 BLAST 分析, 与目的基因分别进行同源性比较示 CagA、VacAs1、VacAm、iceA1、iceA2 扩增序列的同源性标准菌株相比较分别达 94.40%、92.50%、95.00%、92.25%、93.70%, 其差异形成最主要为基因置换, 其次是缺失和插入, 见表 2。

表 2 H. pylori 各基因与标准菌株差异性比较($\bar{x} \pm s$)

基因型	同源性	置换	缺失	插入
CagA	94.40±2.54	8.70±3.97	0.40±0.70	0.30±0.48
VacAs1	92.50±0.57	10.00±0.82	2.00±0.82	0.00±0.00
VacAm	95.00±0.00	7.00±0.00	1.00±0.00	0.00±0.00
IceA1	92.25±1.50	11.50±3.70	2.50±1.00	1.00±0.00
IceA2	93.70±0.50	8.00±0.00	1.25±0.50	1.00±0.00



A: CagA 凝胶电泳图; B: VacAs1 凝胶电泳图; C: VacAm 凝胶电泳图; D: iceA1 凝胶电泳图; E: iceA2 凝胶电泳图。

图 1 H. pylori 各基因凝胶电泳图

2.2 CagA、VacA、iceA 在不同疾病中的检出情况 CagA 基因阳性率为 92% (46/50), VacAs1 基因阳性率为 94% (47/50), VacAm 基因阳性率为 30% (15/50), iceA1 基因阳性率为 36% (18/50), iceA2 基因阳性率为 94% (47/50), 在各种疾病中 CagA、iceA2、VacAs1 都占有优势,但在 H. pylori 所致的轻型疾病慢性非萎缩性胃炎 (chronic non-atrophy gastritis, CG) 和重型疾病消化性溃疡 (peptic ulcer, PU) 间,其分布及表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 3。

表 3 H. pylori 各基因在不同疾病中的阳性率 [$n(\%)$]

组别	CagA	VacAs1	VacAm	iceA1	iceA2
GC	26(52)	27(54)	8(16)	11(22)	25(50)
PU	20(40)	20(40)	7(14)	7(14)	22(44)
总计	46(92)	47(94)	15(30)	18(36)	47(94)
P	0.598	0.409	0.523	0.403	0.167

2.3 CagA⁺/iceA⁺ 及 CagA⁺/VacA⁺ 在不同疾病中的检出情况 在 50 例标本中同时表达 CagA 及 VacA 的有 44 例,其中 PU 19 例,CG 25 例,其检出率差异无统计学意义。而同时表达 CagA 及 iceA 的有 45 例,其中 PU 20 例,CG 25 例,其阳性率差异无统计学意义,见表 4。同时,本研究检测了 CagA 与 iceA 或 VacA 的相关性。(1)CagA 阳性的菌株中 iceA 的阳性亦较高,CagA 阳性 46 例,iceA 阳性 44 例,iceA 与 CagA 无相关性 ($r = -0.06, P > 0.05$);(2)CagA 阳性的菌株中 VacA 的阳性亦较高,CagA 阳性 46 例,VacA 阳性 45 例,VacA 与 CagA 存在正相关关系 ($r = 0.316$),其相关性差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 4 H. pylori CagA⁺/iceA⁺ 及 CagA⁺/VacA⁺ 在不同疾病中的阳性率 [$n(\%)$]

组别	CagA ⁺ /VacA ⁺	CagA ⁺ /iceA ⁺
GC	25(57)	25(56)
PU	19(43)	20(44)
总计	44(100)	45(100)
P	0.543	0.616

3 讨 论

H. pylori 基因的多态性与上消化道疾病的发生存在着密切关系,但并非所有 H. pylori 感染均随临床疾病。因此,科研及临床工作者均致力于确定地方性细菌致病基因型的研究,从而帮助临床确定当地治疗方案,以期达到有效控制临床疾病发生而保存其保护效应。同时,地方性 H. pylori 基因型的探讨也有助于人类学的研究。

作者首次报道在本地区 CagA、VacAs1、VacAm、iceA1、iceA2 扩增序列的同源性标准菌株相比较分别达 94.40%、92.50%、95.00%、92.25%、93.70%,其差异性形成最主要来源于基因置换,其次是缺失和插入。

CagA 是 H. pylori 主要的毒力因子之一,是该菌重要的致病因子,其编码的 CagA 蛋白能刺激胃上皮细胞分泌促炎因子,促进粒细胞在胃黏膜中聚集,从而发生严重的炎症反应^[6]。CagA 的表达有明显地域差异。在西方国家分离的 H. pylori 菌株中有 60%~70% 表现为 CagA 阳性,并认为其与萎缩性胃

炎、消化性溃疡和胃癌的发生密切相关^[7-8]。亚洲国家的研究结果显示 H. pylori 基因的阳性率大于 90%,但与宿主疾病严重程度相关性不明显^[9]。本研究对 H. pylori CagA 基因进行 PCR 检测,结果显示人群感染 H. pylori CagA 阳性率为 92%,但 CagA 的表达在 H. pylori 相关的 GC 和 PU 之间没有显著差异。同时,这一结果亦与本院前期研究相吻合,在该研究中,通过酶联免疫法检测因上消化道症状就诊于本院的患者,血清中 CagA 抗体的阳性率为 71.05%^[10]。

几乎所有 H. Pylori 均含有 VacA,但只有 50% 表达空泡毒素蛋白,VacA 基因是由不同的中间序列(m 区)和不同的信号序列(s 区)构成的镶嵌型结构,由 s 区及 m 区以不同的组合构成不同 H. pylori VacA 亚型,其基因多态性主要是 m 区和 s 区的差异^[5]。本研究显示,在 50 个菌株中其阳性率为 96% (48/50),其中 VacAm 阳性率为 30% (15/50),VacAs1 阳性率为 92% (47/50),两种亚型的阳性率在 H. pylori 相关的 GC 和 PU 之间差异无统计学意义,未见 VacAs2 的表达。既往研究显示 VacAs1 的表达多见于胃癌的低发区,如北美和澳大利亚^[5],这一结果体现了本地区致病 H. Pylori 的致癌特征。

iceA 是独立于 VacA 与 CagA 的一类毒力因子,包括 iceA1 及 iceA2 两个等位基因。在一项多中心研究发现,iceA1 在亚洲国家的阳性率为 64.6%,而西方国家为 42.1%;iceA2 在东西方国家的阳性率分别为 25.8% 和 45.1%^[11]。目前认为 iceA1⁺ 的 H. Pylori 影响胃黏膜上皮细胞的免疫应答,诱导炎症细胞因子分泌,从而参与消化性溃疡,尤其是十二指肠溃疡的发生,但该结论仍存在争议及地域差异^[12]。而 iceA2 功能尚不清楚,认为其与消化性溃疡的发生呈负相关,但有学者报道两种亚型在引起疾病严重程度上差异无统计学意义^[12]。本研究显示,iceA 阳性率为 96%,其中 iceA1 阳性率为 36%,iceA2 阳性率为 92%,两种亚型均感染为 34%,与 Tanih 等^[13] 发现南非 iceA2 阳性率高于 iceA1 一致,但两种亚型的表达在 H. pylori 相关的 GC 和 PU 之间差异均无统计学意义。

既往研究显示 H. pylori 毒力基因 CagA/VacA 基因的共同表达,可引起更为严重的临床结果如消化性溃疡、胃癌等,这可能是因为 VacA 作为免疫调节因子,可以影响 CagA 的免疫表达^[14],同时 VacA/CagA 可以协同破坏胃黏膜上皮细胞结构,从而增加了细菌的扩散和生长^[14],CagA/iceA 之间的协同性机制及其与胃十二指肠疾病之间的关系还不清楚,各地报道也有差异。本研究中,CagA 与 VacA 有正相关性,而 CagA 与 iceA 无相关,CagA⁺/VacA⁺ 及 CagA⁺/iceA⁺ 在 H. pylori 相关的 GC 和 PU 之间差异均无统计学意义。这与 Amjad 等^[15] 的研究结论一致。

综上所述,虽然本研究显示人群中 CagA、iceA1、iceA2、VacAm、VacAs 各单一基因以及其他不同组合与临床结局的轻重没有明显的相关性,但作者证实了 H. pylori 优势致病基因型为 CagA⁺/VacAs1⁺/iceA2⁺,有关本地区 H. pylori 与胃黏膜萎缩及胃癌的相关性尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Malferttheiner P, Sipponen P, Naumann M, et al. Helicobacter pylori eradication has the potential to prevent gastric cancer: a state-of-the-art critique[J]. Am J Gastroenterol, 2005, 100(9): 2100-2115.

- [2] 胡林,刘苓,谭庆华,等.贵州省幽门螺杆菌临床菌株的分离培养[J].世界华人消化杂志,2009,17(27):2830-2834.
- [3] Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(7):2274-2279.
- [4] Tham KT, Peek RM, Atherton JC, et al. *Helicobacter pylori* genotypes, host factors, and gastric mucosal histopathology in peptic ulcer disease [J]. *Hum Pathol*, 2001, 32(3):264-273.
- [5] Correa P, Piazuelo MB. Evolutionary history of the *Helicobacter pylori* genome: implications for gastric carcinogenesis [J]. *Gut Liver*, 2012, 6(1):21-28.
- [6] Perry S, de Jong BC, Solnick JV, et al. Infection with *Helicobacter pylori* is associated with protection against tuberculosis [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1):e8804.
- [7] Matsuda M, Shiota S, Matsunari O, et al. Prevalence of two homologous genes encoding glycosyltransferases of *Helicobacter pylori* in the United States and Japan [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(9):1451-1456.
- [8] Ben Mansour K, Fendri C, Zribi M, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, iceA and oipA genotypes in tunisian patients [J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2010, 9(1):10-15.
- [9] Watada M, Shiota S, Matsunari O, et al. Association between *Helicobacter pylori* cagA-related genes and clinical outcomes in Colombia and Japan [J]. *BMC Gastroenterol*, 2011, 11(2):141-145.
- [10] 韩然,周力,李丽滨.幽门螺杆菌 CagA 抗体与消化系统疾病的关系研究[J].贵州医药,2009,33(4):308-310.
- [11] Shiota S, Watada M, Matsunari O, et al. *Helicobacter pylori* iceA, clinical outcomes, and correlation with cagA: a meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1):e30354.
- [12] Ciftci IH, Uslan I, Dilek FH, et al. Investigation of *Helicobacter pylori* iceA1 and iceA2 genes in patients with chronic gastritis and gastric cancer [J]. *Mikrobiyol Bul*, 2011, 45(2):228-233.
- [13] Tanih NF, McMillan M, Naidoo N, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA and iceA genotypes in south african patients with upper gastrointestinal diseases [J]. *Acta Trop*, 2010, 116(1):68-73.
- [14] Marie MA. Relationship between *Helicobacter pylori* virulence genes and clinical outcomes in saudi patients [J]. *J Korean Med Sci*, 2012, 27(2):190-193.
- [15] Amjad N, Osman HA, Razak NA, et al. Clinical significance of *Helicobacter pylori* cagA and iceA genotype status [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(35):4443-4447.

(收稿日期:2012-09-29 修回日期:2012-11-01)

(上接第 503 页)

骨,逐层关闭肌肉和皮肤切口。该手术简单、创伤小、流血少、肋骨固定牢靠满意,可完整恢复胸廓形态,减轻患者疼痛,恢复胸腔容积和肺活量,有利于恢复患者的呼吸功能,减轻肺部感染^[13]。

参考文献:

- [1] 文毅,陈光春,廖小勇,等.镍钛记忆合金环抱器手术治疗多发性肋骨骨折及连枷胸的临床研究[J].创伤外科杂志,2009,11(3):203-205.
- [2] Yamamoto L, Schroeder C, Morley D, et al. Thoracic trauma: the deadly dozen [J]. *Crit Care Nurs Q*, 2005, 28(1):22-40.
- [3] 吴在德,吴肇汉.外科学[M].6版.北京:人民卫生出版社,2003:334-335.
- [4] Carbognani P, Cattelani L, Bellini G, et al. A technical proposal for the complex flail chest [J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 70(1):342-343.
- [5] Li Q, Xia YY, Tang JC, et al. In vitro and in vivo biocompatibility investigation of diamond-like carbon coated nickel-titanium shape memory alloy [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2011, 39(3):137-142.
- [6] 熊卜贵,王新,方楚权,等.记忆合金环抱器在四肢骨折中的应用 [J]. *临床骨科杂志*, 2005, 8(5):443-444.
- [7] 张世强,王鹏程,李衡,等.镍钛形状记忆合金环抱接骨板治疗桡骨近端 1/3 骨折 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2006, 20(3):272-275.
- [8] Athanassiadi K, Gerazounis M, Theakos N. Management of 150 flail chest injuries; analysis of risk factors affecting outcome [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004, 26(2):373-376.
- [9] Wanek S, Mayberry JC. Blunt thoracic trauma: flail chest, pulmonary contusion, and blast injury [J]. *Crit Care Clin*, 2004, 20(1):71-81.
- [10] Marasco S, Cooper J, Pick A, et al. Pilot study of operative fixation of fractured ribs in patients with flail chest [J]. *ANZ J Surg*, 2009, 79(11):804-808.
- [11] Nirula R, Diaz JJ, Trunkey DD, et al. Rib fracture repair: indications, technical issues, and future directions [J]. *World J Surg*, 2009, 33(1):14-22.
- [12] 郭孟.记忆合金环抱器治疗多发性肋骨骨折 47 例临床观察 [J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2009, 24(1):83-84.
- [13] Balci AE, Eren S, Cakir O, et al. Open fixation in flail chest: review of 64 patients [J]. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*, 2004, 12(1):11-15.

(收稿日期:2012-10-13 修回日期:2012-11-06)