文章编号:1000-5404(2008)11-1049-03

论著

对中国 4 个不同地区幽门螺杆菌菌株的多位点序列分析研究

廖亚玲,邹全明,张卫军,刘晓菲,钟 情 (第三军医大学医学检验系临床微生物与免疫学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 了解国内 4 个不同地区(北京、上海、重庆和广州)收集的幽门螺杆菌(H. pylori)临床株的遗传背景和可能的来源。方法 从胃肠疾病患者黏膜标本中分离培养幽门螺杆菌,应用多位点序列分析(multilocus sequence typing, MLST)对鉴定阳性的菌株进行 ST 分型比较,并且以 PCR 方法测定 vacA 基因型。结果 30 株临床分离的幽门螺杆菌菌株,vacAs1a 阳性 25 株(83.3 %),vacA s1b 阳性 5 株(16.7 %),vacA m2 阳性为 30 株(100 %),未发现 s2 型菌株,其中标准株 NCTC11637 为 vacAs1a/ m1 型。共确定了 28 种 ST 型。结论 MLST 作为幽门螺杆菌分型方法,分辨率高,结果准确,易于标准化。通过信息学分析可以将 MLST 分型、vacA 基因型和遗传背景、临床来源结合起来,适于进行分子进化学研究。

关键词:幽门螺杆菌;多位点序列分析;vacA 基因
中图法分类号:R318.04;R372;R378 文献标识码:A

Genetic diversity and vacA allele heterogeneity in *Helicobacter pylori* isolates from four cities of China

LIAO Ya-ling, ZOU Quan-ming, ZHANG Wei-jun, LIU Xiao-fei, ZHONG Qing (Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the genetic diversity of 30 *Helicobacter pylori* isolates from the patients in four cities of China (Beijing, Shanghai, Guangzhou, Chongqing) by the multilocus sequence typing (MLST), and to find the link between the vacA genotype and sequence type (ST). Methods Isolates were randomly recruited from consecutive endoscopy clinics in four cities. An average of 5 – 6 strains per patient were isolated and eight loci selected for the MLST scheme were amplified and sequenced with primers. The vacA genotype was analyzed by PCR and 3% agarose electrophoresis. Results There were totally 28 ST genotypes, most of which are new ST genotypes that have never been found among the database. The most prevalent vacA genotype was s1a/m2 (83.3%), followed by s1b/m2 (13.0%). In contrast, the s1a/m1 genotype was scarcely present (0%). Conclusion The vacA genotype varied for each ST. Our results showed no obvious link between STs and vacA genotypes. As there are little data on human isolates due to the absence of systematic epidemiological investigations of *H. pylori* in medical laboratories, our research will provide useful information in understanding the epidemiology of *H. pylori* in China.

Key words: *Helicobacter pylori*; MLST; vacA

人类对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)普遍易感,但感染后的症状各不相同,菌株致病性存在人种、地域差异性。目前对幽门螺杆菌进行分型主要依据几种与感染密切的蛋白质[1]。vacA 基因存在于所有幽门螺杆菌菌株中[2],不同地区、来源的幽门螺杆菌 vacA 基因型具有多态性[3,4]。幽门螺杆菌的种内多样性和等位基因的序列多态性远远高于其他细菌[5],传统分型方法由于分辨力不高,分型结果存在一定的局限性。

多位点序列分型(MLST)方法具有很高的分辨能力,适用于流行病学研究和分子进化学的研究[6]。MLST 是由多位点酶电泳(MLEE)衍生出来的一种分型方法[7]。与传统分子生物学分型方法相比,解决了不同实验室间结果不能进行比较的问题[8],具有更高的分辨力[9,10]。我们对各地分离的 30 株幽门螺杆菌进行 MLST 基因分型,探索不同地区感染的主要菌型,并与 vacA 基因型比较。了解它们的遗传背景和可能的来源,便于与国际流行株比较。

作者简介:廖亚玲,女,重庆市人,硕士研究生,助教,主要从事幽门螺杆菌分子生物学和致病机制方面的研究。电话:13594101718
通信作者:邹全明,电话:(023)68752316
收稿日期:2007-12-21;修回日期:2008-03-12

表1 针对筛选出的管家基因的核心片段,设计其特异的PCR扩增和测序引物

基因	片段长度(bp)	基因产物或功能	扩增引物	测序引物
ureI	585	尿素酶相关蛋白	F/AGGTTATTCGTAAGGTGCG	F/AGGTTATTCGTAAGGTGCG
			R/GTTTAAATCCCTTAGATTGCC	R/GTTTAAATCCCTTAGATTGCC
mutY	420	特殊的腺嘌呤葡萄糖转基酶	F/TGGTTGTAGYTGGAAACTTTACAC	F/TGGTTGTAGYTGGAAACTTTACAC
			R/TTAAGCGTGTGTYTTTCTAGG	R/TTAAGCGTGTGTYTTTCTAGG
efp	410	延伸因子	F/CAATTTGGATGAGCGAGCTC	F/CAATTTGGATGAGCGAGCTC
			R/TTCACCTTTTCAAGATACTC	R/TTCACCTTTTCAAGATACTC
ppa	398	无机焦磷酸酶	F/GGAGATTGCAATGAATTTAGA	F/GGAGATTGCAATGAATTTAGA
			R/GTGGGGTTAARATCGTTAAATTG	R/GTGGGGTTAARATCGTTAAATTG
yphC	510	GTPase	F/CACGCCTATTTTTTTGACTAAAAAC	F/CACGCCTATTTTTTTGACTAAAAAC
			R/CATTYACCCTCCCAATGATGC	R/CATTYACCCTCCCAATGATGC
vacA	444	空泡毒素	F/ACAACCGTGATCATTCCAGC	F/ACAACCGTGATCATTCCAGC
			R/ATACGCTCCCACGTATTGC	R/ATACGCTCCCACGTATTGC
atpA	627	ATP合成酶	F/GACTAGCGTTAAACGCACG	F/GACTAGCGTTAAACGCACG
			R/TTGAAACCGACAAGCCCAC	R/TTGAAACCGACAAGCCCAC
trpC	456	邻氨基苯甲酸异构酶	F/TAGAATGCAAAAAAGCATCGCCCTC	F/TAGAATGCAAAAAAGCATCGCCCTC
			R/TAAGCCCGCACACTTTATTTTCGCC	R/TAAGCCCGCACACTTTATTTTCGCC

1 材料与方法

1.1 菌株来源

收集4个地区(北京、重庆、广州、杭州)幽门螺杆菌临床分离株。患者年龄范围在20~85岁,男女各占50%,其中慢性胃炎患者19例,消化性溃疡11例,腹痛待查9例。细菌在含5%兔全血的布氏培养基,37 ℃微需氧环境培养3~4 d。NCTC11637作为标准对照株。

1.2 MLST分析

1.2.1 提取基因组DNA 复苏保存的菌液,从纯培养中提取细菌基因组,采用天成公司的细菌基因组DNA提取试剂盒进行操作。

1.2.2 PCR扩增 根据文献筛选8个看家基因,即atpA、efp、mutY、ppa、trpC、ureI、vacA、yphC合成8对引物[11](表1)。扩增产物进行纯化和DNA序列分析。引物合成和DNA分析由上海生工公司进行。

1.2.3 生物信息学分析 将8个看家基因对应序列与http://www.mlst.net/上相应等位基因进行比较,获得每株菌的等位基因图谱,通过MLST确定序列分型(ST),与国际菌株的资料进行比较。应用eBURST程序将STs归为谱系(clonal complex),构建系统进化树[12]。

1.3 传统vacA基因分型

针对vacA基因信号区及变异区设计引物[7],由上海生工公司合成。检测*vacAs*1*a*、*vacAs*1*b*、*vacAs*2、*vacAm*1、*vacAm*2基因,引物序列见表2。扩增条件为:94 ℃ 45 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,共35个循环,最后72 ℃延伸7 min。取10 μl PCR产物于3%的琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像仪上分析结果。

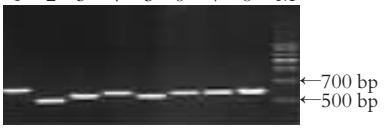
2 结果

2.1 MLST分析

扩增临床分离株8个看家基因的核酸片段,PCR结果的电泳图鉴定见图1。8个基因座位多态性位点从atpA的1.8%到mutY的3.9%不等。

表2 vacA基因扩增引物

扩增片段	引物序列	片段大小(bp)
*vacAs*1*a*	F/5′-GTCAGCATCACACCGCAAC-3′	190
	R/5′-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3′	
*vacAs*1*b*	F/5′-AGCGCCATACCGCAAGAG-3′	187
	R/5′-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3′	
*vacAs*2	F/5′-GCTAACACGCCAAATGATCC-3′	199
	R/5′-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3′	
*vacAm*1	F/5′-GGTCAAAATGCGGTCATGG-3′	299
	R/5′-CCATTGGTACCTGTAGAAAC-3′	
*vacAm*2	F/5′-GGAGCCCCAGGAAACATTG-3′	352
	R/5′-CATAACTAGCGCCTTGCAC-3′	



1~8:atpA,efp,mutY,ppa,trpC,ureI,vacA,yphC基因扩增片段;M标准分子量标记

图1 标准株NCTC11637的等位基因的核心片段核酸电泳结果

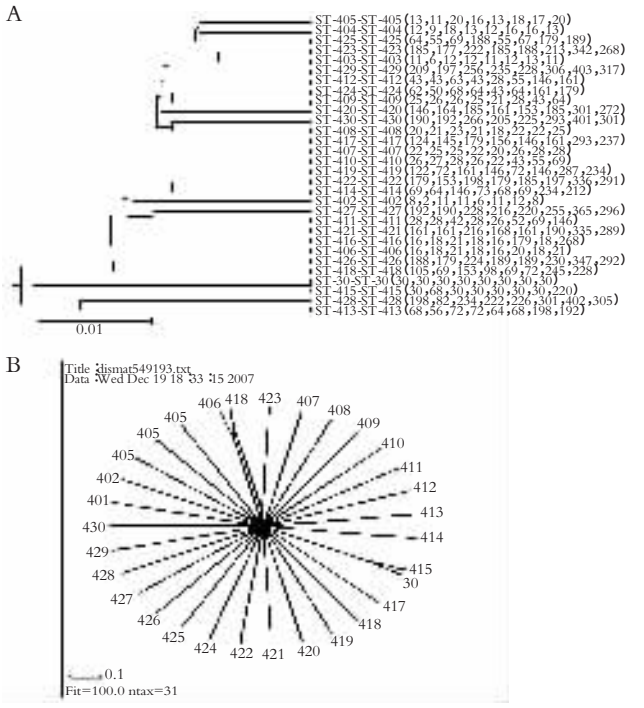
得到28个STs序列型,都是之前在幽门螺杆菌MLST database未被报道的,大部分菌株都是独特型(Singleton)。

UPGMA绘制进化树,显示幽门螺杆菌的亲缘关系(图2A)。可将菌株大致分为三大类,ST428和ST413,ST413,ST415和ST30,其他为余下序列型,其中ST30和ST415的表现完全相同,亲缘性十分的相近。

通过eBURST分析菌株相关性,ST30和ST415具有高度的亲缘性,分析两者可能是由同一菌株选择性突变所致。ST406和ST416是来自同一株祖先菌株,与ST423有着亲缘关系(图2B)。

2.2 *vacA*的基因型

*vacAs*1*a*阳性菌株为25株(83.3%),*vacAs*1*b*阳性菌株为5株(16.7%),未检出s2型;*vacAm*2阳性菌株为30株(100%),*vacAm*1阳性菌株为0株。慢性胃炎组*vacAs*1*a*/*m*2 14株,*vacAs*1*b*/*m*2 5株;消化性溃疡组*vacAs*1*a*/*m*2 7株;腹痛待查组4株也均为*vacAs*1*a*/*m*2。标准株NCTC11637为*vacAs*1*a*/*m*1型。



A 系统进化树分析图；B：eBURST 分析

图 2　菌株的 8 个等位基因的核心序列的聚类作图

比较 3 组中 vacAs1a 和 vacAm2 基因型的分布，消化性溃疡组与慢性胃炎组和腹痛待查组 s1a 型有显著性差异（$P < 0.05$），而其他两组 s1a 型无显著性差异，3 组之间 m2 型无显著差异（$P > 0.05$）。

3　讨论

对 4 个城市的幽门螺杆菌临床分离株进行 MLST 分析，等位基因的多样性与之前结果差异不大[13]。得到 28 个全新的 STs 序列型，均不属于原有的克隆谱系。Singleton 序列型在本实验中占了大部分（80.0%），与其他基因型相比代表了遗传距离较远的基因型。随着幽门螺杆菌 MLST 数据的增加，可以肯定在基因型之间会发现新的联系。

不同地区分离的幽门螺杆菌株，其 vacA 基因型的具有高度多态性。本实验中，vacA 基因型以 s1a/m2 型为主，消化性溃疡组与其他组间 s1a 型有显著性差异，而 m2 型差异无显著性。提示从消化性溃疡患者胃粘膜标本中分离出 vacAs1a 型的可能高于慢性胃炎和无症状患者，而 vacAm 型则与幽门螺杆菌相关疾病相关性不大。由于样本量的限制，ST 型与 vacA 基因型暂未见明显的相关性。

系统进化树的构建采用 UPGMA 法。与其他聚类方法相比，所产生的树状图失真最少[14]。从而将幽门螺杆菌株归为三大类，显示出菌株间存在着一定的遗传亲缘关系。

幽门螺杆菌有其独特的遗传变异性和种内多样性，尽管在本实验中样本量还不够大，但是我们仍可以发现两个同源谱系（clonal group）的存在，随着样本量的加大，我们相信可以找到更多的同源系。这对于下一步进行幽门螺杆菌菌的进化分析，及其伴随宿主—人类的迁徙活动，提供了数据。

参考文献：

[1] Sachs G, Weeks D L, Melchers K, *et al*. The gastric biology of *Helicobacter pylori*[J]. Annu Rev Physiol, 2003, 65: 349 – 369.

[2] Lee J H, Choe Y H, Jeon B H, *et al*. Genotypes of the *Helicobacter pylori* vacA signal sequence differ with age in Korea[J]. Helicobacter, 2004, 9(1): 54 – 58.

[3] Momenah A M, Tayeb M T. Relationship between *Helicobacter pylori* vacA genotypes status and risk of peptic ulcer in Saudi patients[J]. Saudi Med J, 2006, 27(6): 804 – 807.

[4] Erzzin Y, Koksal V, Altun S, *et al*. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia [J]. Helicobacter, 2006, 11(6): 574 – 580.

[5] Falush D, Wirth T, Linz B, *et al*. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations[J]. Science, 2003, 299(5612): 1582 – 1585.

[6] Maiden M C, Bygraves J A, Feil E, *et al*. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(6): 3140 – 3145.

[7] Selander R K, Caugant D A, Ochman H, *et al*. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics [J]. Appl Environ Microbiol, 1986, 51(5): 873 – 884.

[8] Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology[J]. Trends Microbiol, 2003, 11(10): 479 – 487.

[9] Revazishvili T, Kotetishvili M, Stine O C, *et al*. Comparative analysis of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for characterizing Listeria monocytogenes strains isolated from environmental and clinical sources[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(1): 276 – 285.

[10] Kotetishvili M, Stine O C, Chen Y, *et al*. Multilocus sequence typing has better discriminatory ability for typing Vibrio cholerae than does pulsed-field gel electrophoresis and provides a measure of phylogenetic relatedness[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(5): 2191 – 2196.

[11] Achtman M, Azuma T, Berg D E, *et al*. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions [J]. Mol Microbiol, 1999, 32(3): 459 – 470.

[12] Jolley K A, Feil E J, Chan M S, *et al*. Sequence type analysis and recombinational tests (START)[J]. Bioinformatics, 2001, 17(12): 1230 – 1231.

[13] Jolley K A, Chan M S, Maiden M C, *et al*. mlstdbNet- distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases[J]. BMC Bioinformatics, 2004, 5: 86.

[14] Maequez A L, Real R, Vargas J M, *et al*. On identifying common distribution patterns and their causal factors: a probabilistic method applied to pteridophytes in the Iberian Peninsula[J]. Journal of Biogeography, 1997, 24(5): 613 – 631.

（编辑　龙　亮）