论著

文章编号:1000-5404(2011)09-0892-04

胃癌及癌前病变患者幽门螺杆菌的 *sabA* 基因多态性的研究

任 莉,廖亚玲,郭 刚,邹全明 (400038 重庆,第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,国家免疫生物制品工程技术研究中心,重庆市生物制药工程技术研究中心)

【摘要】 **目的** 对癌症和癌前病变患者幽门螺杆菌进行 *sabA* 基因遗传信息多态性的研究。**方法** 采用特异引物聚合酶链反应(PCR)及测序和比较基因组方法分析42株国内癌症及癌前病变患者幽门螺杆菌的 *sabA* 基因CT双核苷酸重复序列调节区多态性。**结果** *sabA* 基因调节区的阳性检测率为85%,功能性 *sabA* 基因占所有测序菌株的55%。对随机挑选的18株检测阳性菌株进行测序分析,结果显示在碱基水平及氨基酸水平存在显著的遗传多态性。对 *sabA* 基因调节区的氨基酸序列聚类分析中发现,本研究菌株与国际已经完成测序的7株幽门螺杆菌可以明显的分为两个组,即中国组与西方组。**结论** *sabA* 基因CT双核苷酸重复序列调节区在中国菌株中普遍存在,且在翻译水平有很显著的多态性。聚类分析发现含有功能性 *sabA* 基因的幽门螺杆菌菌株多态性存在明显的地域性分布差异。

【关键词】 幽门螺杆菌;*sabA* 基因;CT重复片段;地域性分布

【中图法分类号】 R378.99;R394.3;R735.2 【文献标志码】 A

Helicobacter pylori sabA gene polymorphism in patients with gastric cancer and precancerous lesions

Ren Li, Liao Yaling, Guo Gang, Zou Quanming (Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 Objective To identify the sialic acid binding adhesin (*sabA*) gene polymorphism of *Helicobacter pylori* stains from patients with gastric cancer or precancerous lesions. Methods The *sabA* gene CT repeats regulatory domain polymorphism of 42 pylori strains sampled from 24 patients with gastric cancer and 18 with precancerous lesions (intestinal metaplasia) were analyzed by PCR-SSP, sequencing and comparative genomes. Results Positive detection rate were 85%, and 83.3% for gastric cancer (20/24) and 88.9% for precancerous lesions (16/18). Among the positive stains, 55% was identified with functional *sabA* in all sequenced strains. Sequencing on randomly picked 18 *sabA* regulatory domain positive strains indicated that gene polymorphism was observed in both base and amino acid levels. Clustering analysis demonstrated that these sequenced *sabA* regulatory domain, along with the internationally published 7 sequenced *Helicobacter pylori*, could be divided into two categories, a Chinese group and a Western group. Conclusion sabA gene CT repeats regulatory domain is generally presented in Chinese strains, with significant polymorphism at translational level. Clustering analysis indicates apparent geographical regional distribution of strains is seen for functional *sabA* gene.

【**Key words**】 *Helicobacter pylori*; *sabA* gene; CT repeats; geographical regional distribution

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2009CB522606). Corresponding author: Zou Quanming, Tel: 86-23-68752316, E-mail: qmzou2007@163.com

幽门螺杆菌是定植在胃黏膜的一种革兰阴性螺旋杆菌,被认为是造成慢性胃炎、胃溃疡,甚至胃癌的致病因素,而且是胃黏膜淋巴相关性淋巴瘤的主要危险因素[1]。幽门螺杆菌在发达国家和发展中国家的感染率和致病率有着很大的差别[2],而幽门螺杆菌各种毒力因子与宿主的免疫反应和宿主遗传多态性之间的密切关系可能与此有关。

sabA(sialic acid binding adhesin)基因是幽门螺杆菌外膜蛋白家族中非常重要的一类编码粘附素的基因。其编码的唾液酸结合黏附素,能特异性识别人类宿主细胞上的 sialyl-Lewis x/a 抗原 (sLe^x and sLe^a)。在正常胃黏膜中所能检测到存在的数量非常少,随着幽门螺杆菌菌株的长期定植和持续性感染,这类抗原会持续性增多[3],特别是 sLe^a 的表达量在癌症患者中

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划(973计划,2009CB522606)
【通信作者】 邹全明,电话:(023)68752316,E-mail:qmzou2007@163.com

显示有明显的提高[4]。这也提示 *sabA* 基因及其编码的蛋白可能在幽门螺杆菌感染的后期,甚至在致癌过程中发挥着重要的作用。

sabA 基因是通过5′端上游的 CT 双核苷酸重复序列调节区经移码突变所造成的相变异(phase variation),即基因的功能性与非功能性(on/off)来调节其编码蛋白的表达状态。Yamaoka 等[5]进一步研究发现,功能性 *sabA* 基因可能与肠化生、萎缩性胃炎及胃癌具有相关性。鉴于 *sabA* 基因的功能性表达存在多态性,在幽门螺杆菌的致病作用中非常重要,对于*sabA* 基因的研究也越来越多,但是对于中国地区幽门螺杆菌菌株的 *sabA* 基因还缺乏相应的研究。因此,本研究拟收集癌症和癌前病变患者的幽门螺杆菌菌株,进行 *sabA* 基因多态性的研究,为 *sabA* 基因在幽门螺杆菌致病机制,尤其是致癌过程中的作用研究提供一些新的线索。

1 材料与方法

1.1 幽门螺杆菌的临床采集株

本研究室2008-2010年期间保存的临床采集株42株,其中胃癌株24株,肠化生18株。按地区分:重庆地区30株,杭州地区10株,西藏、内蒙古各1株。标准株26695作为阳性对照,编号为1。

1.2 幽门螺杆菌的复苏、培养与鉴定

将冻存的幽门螺杆菌菌株复苏后,接种于含5%脱纤维羊血的哥伦比亚琼脂培养基上,于5% O_2、10% CO_2、85% N_2的微需氧条件下培养48~72 h,经尿素酶、氧化酶、过氧化氢酶实验及组织染色等证实为幽门螺杆菌。

1.3 幽门螺杆菌基因组的提取

采用细菌基因组提取试剂盒(上海天根公司)提取幽门螺杆菌基因组DNA,严格按照说明书进行操作。

1.4 PCR 扩增 *sabA* 基因的调节区片段

扩增 *sabA* 基因的调节区片段(即包含 CT 重复区域的片段)所用的引物序列为:正义链 5′-GTGGATCCCTTTAAGGAACATTTTATGAAAA-3′;反义链 5′-GGAATTCGGTTAGGATAAAAGCGCAAAGATTGT-3′[6]。所有引物均由上海英骏公司合成。PCR 扩增体系为25 μl,其中酶混合物(上海天根公司,2 × *Taq* Plus MasterMix)12.5 μl,模板4 μl,引物1 μl,ddH_2O 7.5 μl。引物循环参数:预变性94 ℃ 5 min后,94 ℃ 45 s,60 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s,30个循环,最后72 ℃ 10 min。4 ℃保存备用。取PCR产物2μl在2%琼脂糖凝胶中(含0.5 g/L溴化乙锭)电泳,以100 bp(上海天根公司)为Marker,凝胶分析仪成像。

1.5 PCR 产物的纯化、测序与序列分析

所有阳性的PCR扩增条带均由试剂盒(上海英骏公司)回收纯化。纯化后产物送由TaKaRa公司进行测序。序列分析由DNAssist 2.0完成。按照随机选取的原则,根据胃黏膜标本收取的时间按疾病分别编号(即分层抽样),各自选取疾病单数号的纯化条带标本送公司测序(即系统抽样)。

1.6 统计学分析

采用SPSS 12.0统计软件的Fisher精确检验方法对阳性率与疾病的关系进行统计分析,采用MEGA 5.0聚类软件的construct UPGMA tree功能聚类。

2 结果

2.1 *sabA* 基因 CT 双核苷酸重复序列调节区的检测

42例中国癌症及肠化生患者的幽门螺杆菌基因组中,有36株菌中检测到包含 *sabA* 基因调节区的片段(约600 bp),PCR扩增凝胶电泳图见图1,其阳性率为85.7%。其中,胃癌的阳性率为83.3%(20/24),肠化生的阳性率为88.9%(16/18)。阳性率与疾病没有明显相关性($P>0.05$)。



1~22:为菌株编号;M:标准

图1 *sabA* 基因 CT 双核苷酸重复序列调节区(约600 bp)的 PCR 扩增凝胶电泳结果

2.2 *sabA* 基因 CT 双核苷酸重复序列分析

对36例 *sabA* 阳性患者根据分层抽样和系统抽样的原则选取18株菌株进行测序,其中胃癌10株,肠化生8株。测序结果显示,核苷酸序列的点突变、丢失及替换非常普遍。菌株均含有CT双核苷酸重复序列,其中常规CT双核苷酸重复序列有7株,而非常规CT双核苷酸重复序列(CTTTCTCT)有11株。不同的CT重复序列导致不同的氨基酸表达状态(表1)。其中有5株菌株由于常规CT双核苷酸重复序列读码框移而成为非功能性。然而,CT重复片段的框移与 *sabA* 基因的功能性并不是完全相匹配的,CT重复序列也需伴随一定的碱基丢失或插入才能实现翻译水平的调控。而非常规CT双核苷酸重复序列均具有功能性。功能性 *sabA* 基因占所有测序菌株的72.2%。其中,胃癌的功能性基因占80.0%(8/10),肠化生的功能性基因占62.5%(5/8)。功能性基因的比率与疾病没有明显相关性($P>0.05$)。

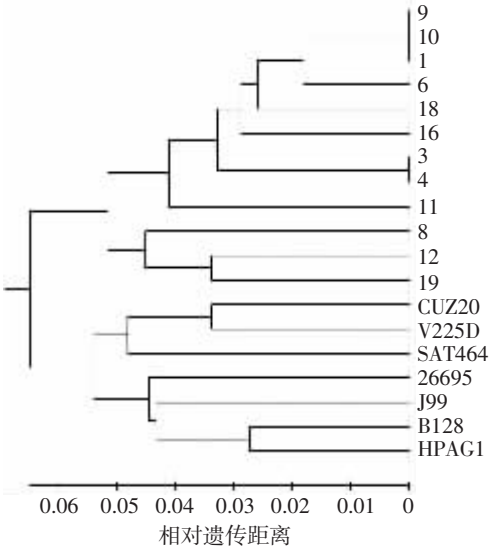
2.3 功能性 *sabA* 基因氨基酸水平序列同源性的比较

在氨基酸序列方面,非常规CT双核苷酸重复序列(CTTTCTCT)的11株菌株,虽然缺乏CT重复序列的调节作用,然而由于碱基的突变导致氨基酸水平也出现了较大的多态性。图2显示12株(11株非常规+1株常规)功能性基因与7株NCBI数据库中已全基因组测序菌株的树状聚类图。可见中国菌株与这7株幽门螺杆菌可以明显的分为两个组,即中国组与西方组。与西方国家的菌株相比,中国的菌株相互之间同源性更明显。

表1 常规CT双核苷酸重复序列表达情况

编号	重复数	CT双核苷酸重复序列	氨基酸表达序列	表达状态
11	5	ATG…[1]CTCTCTCTCTCG…[2]GCTGAAG…[3]TGTGAGCG…	MKK …LSLS -LAVSSL	ON
22	5	ATG…[1]CTCTCTCTCTCG…[2]GCTGAAG…[3]TGTGAGCG	MKK LSLS -LSLAVSSL	ON
17	5	ATG…[1]CTCTCTCTCTCG…[4]GCTGAAG…[3]TGTGAGCG	MKK LSLS -LHRSCTLKTMAFL[a]	OFF
2	6	ATG…[1]CTCTCTCTCTCTCG…[4]GCTGAAGTGTGAGCG	MKK LSLS -RFIALAR[a]	OFF
21	6	ATG…[1]CTCTCTCTCTCTCG…[2]GCTGAAG…[3]TGTGAGCG	MKK LSLS -RLRYHGSTLKTTAFL[a]	OFF
7	8	ATG…[1]CTCTCTCTCTCTCTCTCG…[4]GCTGAAG…[3]TGTGAGCG	MKR LSLSLS -LHLSCTLKTMAFL[a]	OFF
16	9	ATG…[1]CTCTCTCTCTCTCTCTCG…[4]GCTGAAG TGTGAGCG	MKK LSLSLS -RFITLAR[a]	OFF

下划线:碱基水平因移码突变产生终止密码子;a:翻译水平因终止密码子的出现而停止;…[1]:此处省略12个碱基;…[2]:此处省略21个碱基;…[3]:此处省略13个碱基;…[4]:此处省略17个碱基



1~19为菌株编号;国外菌株来源地:CUZ20(美国),V225D(美国印第安人),SAT464(秘鲁),26695(美国),J99(美国),B128(美国),HPAG1(美国)

图2 12株中国菌株与7株已全基因组测序菌株的*sabA*基因调节区氨基酸序列同源性比较

3 讨论

在幽门螺杆菌的致病机制研究中,对相关毒力因子的研究十分重要。幽门螺杆菌的黏附素可以特异性的结合宿主细胞相应的大分子受体,这类蛋白的编码基因包括*oipA*、*babA*、*sabA*等。然而,在长期的定植过程中,宿主持续的免疫反应会导致与*babA*发生特异性结合的Lewis抗原,逐渐被与*sabA*特异性结合的sialyl-Lewis x/a抗原所取代[3,7]。同时有研究[4]表明,这种sialyl-Lewis x/a抗原在健康的胃黏膜上非常少,而在胃癌患者的胃黏膜上,其表达量显著增加。因此可以推断,*sabA*基因可能在幽门螺杆菌致病的中后期,甚至是致癌机制中发挥了重要的作用,特别是功能性的*sabA*可能与严重的肠化生和萎缩性胃炎,以及胃癌有明显的关系[5]。因此,本实验选择了42例国内来源的癌前病变及胃癌患者,对其感染的幽门螺杆菌*sabA*基因进行多态性研究。目前对于中国国内幽门螺杆菌菌株*sabA*基因多态性的研究还少见报道。

研究[5,8]证实幽门螺杆菌的*sabA*基因都存在功能性(on)和非功能性(off)两种表达状态。而5′端上游的CT双核苷酸重复序列调节区在*sabA*蛋白表达上发挥关键性的调节作用。本实验特异性的针对*sabA*基因的CT重复序列片段(约600 bp)进行比较基因组分析。尽管还没有研究对不同菌株克隆之间的CT重复片段差异进行研究,却有研究者发现*sabA*在不同菌株克隆的表达状态存在差异[5]。然而,该研究同时也证明,在原代培养中挑取的单个菌落的表达状态通常代表了占优势的菌株克隆的表达状态。因此,本实验选择在原代培养中挑取单个菌落并传代培养后提取基因组作为测序对象。在目前的研究中,对于功能性*sabA*基因尚无统一的定义。传统的方法认为,(7±3)CT重复片段可以认为是有功能的基因。然而,近期研究表明,*sabA*的表达还受到其他因素的调节,可能并不完全依赖于CT重复序列[9]。因此,本实验中将具有完整的氨基酸翻译功能定义为基因有潜在的功能性[10]。结果表明,CT重复序列的调节也需伴随一定区域的碱基丢失和插入才能实现翻译水平的调控(表1)。常规的CT重复片段在18株*sabA*基因阳性菌株中所占的比率为38.9%(7/18),而其中仅2株有功能性(2/7)。这个实验结果略低于来自台湾的一项研究59.8%(55/92),而其中功能性*sabA*基因的菌株有18株(18/55)[11]。非常规CT重复片段均可以翻译完整的氨基酸序列,这与台湾的结果基本一致(1/37)。提示非常规的CT重复片段在基因表达调节中更易于适应胃部微环境。

42例中国癌前病变及癌症来源菌株的*sabA*功能性基因占55%,而哥伦比亚的癌症患者来源菌株*sabA*功能性基因占70%[5]。另外,日本和美国的胃疾病患者来源菌株*sabA*功能性基因分别为81%和56%[5-6]。中国菌株*sabA*功能性基因的多态性结果与其他国家存在差异,提示*sabA*基因的多态性可能存在地域差异[12]。对中国菌株与国外已全基因组测序的7株进行聚类分析后发现,中国的菌株与国外的菌

株可以明显的分为两个组,这个结果证实了这一点。从疾病的角度来说,功能性 *sabA* 基因在严重的胃部疾病(例如胃癌及癌前病变)中所占比例大大超过在非严重胃部疾病(如慢性胃炎)中的比例[6]。因此可以将 *sabA* 基因作为幽门螺杆菌基因分型的一个标志,结合 vacA, cagA 的结果综合分析菌株来源及致病性。然而,对中国菌株 *sabA* 基因与疾病的相关性分析还需进一步的流行病学分析。

参考文献:

[1] Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, *et al*. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer[J]. N Engl J Med, 2001, 345(11):784 - 789.

[2] Graham D Y, Lu H, Yamaoka Y. African, Asian or Indian enigma, the East Asian *Helicobacter pylori*: facts or medical myths [J]. J Dig Dis, 2009, 10(2):77 - 84.

[3] Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, *et al*. *Helicobacter pylori SabA* adhesin in persistent infection and chronic inflammation [J]. Science, 2002, 297(5581):573 - 578.

[4] Sakamoto S, Watanabe T, Tokumaru T, *et al*. Expression of Lewisa, Lewisb, Lewisx, Lewisy, siayl-Lewisa, and sialyl-Lewisx blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue [J]. Cancer Res, 1989, 49(3):745 - 752.

[5] Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, *et al*. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease [J]. Gut, 2006, 55(6): 775 - 781.

[6] Yanai A, Maeda S, Hikiba Y, *et al*. Clinical relevance of *Helicobacter pylori sabA* genotype in Japanese clinical isolates[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(12):2228 - 2232.

[7] Ota H, Nakayama J, Momose M, *et al*. *Helicobacter pylori* infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins [J]. Virchows Arch, 1998, 433(5):419 - 426.

[8] Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, *et al*. *Helicobacter pylori* infection in mice:Role of outer membrane proteins in colonization and inflammation [J]. Gastroenterology, 2002, 123(6):1992 - 2004.

[9] Yamaoka Y. Increasing evidence of the role of *Helicobacter pylori SabA* in the pathogenesis of gastroduodenal disease [J]. J Infect Dev Ctries, 2008, 2(3):174 - 181.

[10] Chiarini A, Cala C, Bonura C, *et al*. Prevalence of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and correlation with severity of gastric pathology in patients from western Sicily, Italy [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28(5):437 - 446.

[11] Sheu B S, Odenbreit S, Hung K H, *et al*. Interaction between host gastric Sialyl-Lewis X and H. pylori *SabA* enhances H. pylori density in patients lacking gastric Lewis B antigen[J]. Am J Gastroenterol, 2006, 101(1):36 - 44.

[12] Shao L, Takeda H, Fukui T, *et al*. Genetic diversity of the *Helicobacter pylori* sialic acid-binding adhesin (*sabA*) gene [J]. Biosci Trends, 2010, 4(5):249 - 253.

(收稿:2010-12-20 修回:2011-01-19)
(编辑 吴培红)

文章编号:1000-5404(2011)09-0895-01

个案与短篇

双子宫妊娠侧子宫脱垂伴宫颈感染嵌顿 1 例

周 丽[1,2],吴晓华[1],李 真[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院妇产科[1];441000 湖北 襄樊,解放军第 477 医院妇产科[2])

【关键词】 双子宫;妊娠;宫颈脱垂;宫颈感染
【中图法分类号】 R711.2 【文献标志码】 B

妊娠晚期子宫脱垂临床少见,并发感染致宫颈嵌顿者更少见,现将新桥医院成功诊治的 1 例双子宫妊娠侧子宫脱垂伴宫颈感染嵌顿病例报告如下。

1 临床资料

患者,32 岁,因"停经 32^{+3} 周,阴道脱出物 4 d"于 2010 年 3 月 25 日急诊入院。患者 4 d 前阴道有物脱出,约 4 cm × 3 cm × 3 cm,有异味,无疼痛,无阴道流血、流液,可还纳。在当地医院输液抗感染及坐浴治疗 3 d,脱出物迅速增大,表面分泌物增多,溃烂,恶臭,遂急诊转入我院。既往体健,6 年前以臀位分娩一足月女活婴,产中发现为完全性阴道纵隔。入院查体:体温 38.6 ℃,腹部增大如孕月,胎心 140 min^{-1},头位,有不规律宫缩。外阴见一约 10 cm × 9 cm × 6 cm 宫颈组织堵塞于阴道口,表面充血溃烂,恶臭,脓血性分泌物,其上方见水肿纵隔残端,尿道口清晰,无法还纳入阴道内(图 1A)。血常规:WBC 15.43 × 10^9/L,N 90%,其余正常,C-反应蛋白:20.1 mg/L。入院诊断:①妊娠 32^{+3} 周,G_5P_1,先兆早产;②子宫脱垂伴宫颈感染嵌顿;③完全性阴道纵隔。

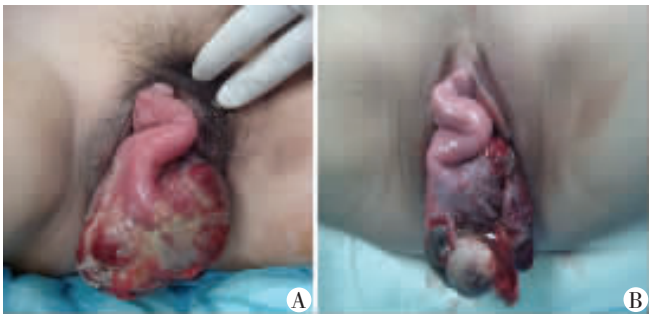


图 1 保守治疗前(A)、后(B)嵌顿的宫颈及阴道纵隔

【通信作者】 吴晓华,电话:(023)68774612,E-mail:nmand@sina.com

(下转 904 页)