维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)02-0253-03

幽门螺杆菌 VacA 基因型与胃疾病

田一玲[1], 杨致邦[1], 余歌军[2]

(1. 重庆医科大学基础医学院微生物学教研室;2. 卫生科,重庆 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关系。方法:从胃十二指肠疾病患者胃粘膜标本中分离培养 H. pylori,PCR 测定 VacA 基因型。结果:108 株 H. pylori 菌株,VacA s1a 阳性为 85 株(79%),VacA s1b 阳性 22 株(20%),VacA m1 阳性 29 株(27%),VacA m2 阳性 77 株(71%),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%(36/40),胃癌患者 VacA s1a 阳性率为 94%(15/16)。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,无 s2 型。

【关键词】幽门螺杆菌;细胞空泡毒素基因;聚合酶链反应;胃肠疾病

【中国图书分类法分类号】R573 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-07-13

Relationship between VacA genotypes of Helicobacter pylori and gastric diseases

TIAN Yiling, et al

(*Department of Microbiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the distribution of Helicobacter pylori (H. pylori) VacA genotypes in different gastrointestinal diseases and the relationship among each other. *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). *Results*: The frequencies of the signal allele sla, slb and the middle-region allele m1, m2 were 85 (79%), 22 (20%), 29 (27%), 77 (71%) 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 s la of H. pylori strains isolated from patients with chronic gastritis, peptic ulcer and gastric cancer were 65.4% (34/52), 90% (36/40) and 94% (15/16) respectively. *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. However the s2 form is not found.

【Key words】Helicobacter pylori; Vacuolating cytotoxin gene; PCR; Gastrointestinal diseases

幽门螺杆菌(Helicobacter pylori,H. pylori)感染是慢性胃炎、消化性溃疡的重要致病因素之一,同时也是胃癌发生的高危因素[1],但其确切的致病机制尚未明了。大量研究表明,毒素相关蛋白(CagA)和细胞空泡毒素(VacA)在 H. pylori 的致病过程中起到重要作用,尤其是 VacA 与 H. pylori 感染者是否发病有着密切关系。VacA 基因几乎存在于所有 H. pylori 菌株中,但不同地区、不同来源的 H. pylori 菌株 VacA 基因序列及分布存在差异,VacA 基因型具有极高的多态性。H. pylori 的 VacA 基因是由三种不同的信号序列(s1a、s1b、s2)以及两种不同的中间序列(m1、m2)构成的镶嵌型基因结构,三种信号序列和两种中间序列以不同组合构成不同 H. pylori 菌株的 VacA 基因型[2~4]。本研究对我校附属医院临床分离的 H. pylori 菌株进行 VacA 基因型的检测,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,为深入研究 H. pylori 的致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

108 株 H. pylori 临床分离株,2000~2003 年从临床收集的胃十二指肠疾病患者胃粘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

作者介绍:田一玲(1964-),女,讲师,
主要研究方向:幽门螺杆菌的致病机制。

维普资讯 http://www.cqvip.com

溃疡患者,16 株来自胃癌患者。

1.2 引物的设计与合成

根据文献设计引物,上海 Sangon 公司合成。序列如下:

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
VacAs1a	SS1-F	5'GTCAGCATCACACCGCAAC3'	190bp
	VA1-R	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	
VacAs1b	SS3-F	5'AGCGCCATACCGCAAGAG3'	187bp
	VA1-R	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	
VacAs2	SS2-F	5'GCTAACACGCCAAATGATCC3'	199bp
	VA1-R	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	
VacAm1	VA3-F	5'GGTCAAAATGCGGTCATGG3'	290bp
	VA3-R	5'CCATTGGTACCTGTAGAAAC3'	
VacAm2	VA4-F	5'GGAGCCCCAGGAAACATTG3'	352bp
	VA4-R	5'CATAACTAGCGCCTTGCAC3'	

1.3 H. pylori 菌株的分离培养和鉴定

将临床所取胃窦粘膜标本,接种于含 7% 羊血的 H. pylori 琼脂(本室自制)平板上,微需氧条件下 37℃ 培养 3～4 天,挑取可疑菌落按常规方法鉴定[5]。

1.4 H. pylori DNA 的提取

参照文献,采用酚-氯仿抽提法提取 H. pylori 基因组 DNA,置 -20℃ 冰箱保存。

1.5 PCR 检测

将提取的 H. pylori DNA 作为模板进行 PCR 扩增,检测 H. pylori VacAs1a、VacAs1b、VacAs2、VacAm1、VacAm2 基因。反应总体积为 50μl,包括 dNTP、引物各 1μl,模板 DNA10μl,Tag DNA 聚合酶 2μl(2u/μl),余为 10×PCR 缓冲液和双蒸水。扩增条件为:94℃ 变性 45s,55℃ 退火 45s,72℃ 延伸 45s,共 35 个循环,第一个循环前 94℃ 预变性 5min,最后一个循环后 72℃ 再延伸 7min。取 10μlPCR 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。

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 阳性菌株为 85 株(79%),VacA s1b 阳性菌株为 22 株(20%),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(27%),VacA m2 阳性菌株为 77 株(71%),另有 2 株无法确定型别。其中 VacA s1a/m1 型 18 株(16.7%),sla/m2 型 66 株(61.6%),s1b/ml 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

结果见表 2。

表 2 H. pylori VacA s1a、VacA m2 型在各种胃肠疾病中的分布

分组	例数	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(94.0%)	12(75.0%)

比较慢性胃炎组和消化性溃疡组以及胃癌组 VacA s1a 和 VacA m2 型的分布,消化性溃疡组与慢性胃炎组 s1a 型有显著性差异($P<0.05$),胃癌组与慢性胃炎组 s1a 型有显著性差异($P<0.05$),而胃癌组与消化性溃疡组 s1a 型无显著性差异($P>0.05$),三组之间 m2 型无显著差异($P>0.05$)。

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。1995 年 Atherton 等研究发现 H. pyloriVacA 基因存在 3 个不同信号区(s1a,s1b,s2)和两个不同中间区(m1,m2)组成的不同基因表型。理论上应有 6 种重组体:s1a/ml、s1a/m2、s1b/ml、s1b/m2、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 sla 型为主,日本的研究则显示绝大多数为 s1a/m1 型[6]。国内不同地区 VacA 基因型的分布也有差异[7],上海和广州以 s1a/m2 型为主,西安地区则以 s1a/ml 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报告中。说明 H. pylori VacA 基因序列类型并不局限于 Atherton 所确定的信号序列和中间序列类型,可能还存在其他型别。

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 VacAsla 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。Figueired 等用 PCR 和原位杂交的方法检测 109 例 H. pylori 感染者胃粘膜标本 VacA 基因型,结果发现胃溃疡和胃癌与 s1 型、m1 型 VacA

维普资讯 http://www.cqvip.com

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[8],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 VacAs1,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[9],同样的结果也见于 Ashour 的报道中[10]。我们研究了临床分离的 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,这三组疾病分离的 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%,m2 型为 77.5%,胃癌组 s1a 型为 94%,m2 型为 75%,消化性溃疡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粘膜标本中分离出 VacAs1a 型的可能性高于其他基因型 H. pylori 菌株,而 VacAm1、m2 型则与 H. pylori 相关疾病无明显相关,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。VacA 是 H. pylori 的重要致病因子,其致病机制主要是通过受体介导的内吞作用进入细胞内,引起晚期溶酶体与胞内体的融合与积累,导致细胞内空泡样变性,同时还可使细胞间的紧密连接松弛,增强极化上皮单层细胞的渗透性,导致细胞死亡,另外还可抑制细胞增殖。不同基因型 H. pylori 致病的差异性可能与其分泌的 VacA 的空泡活性相关,也有人认为可能与 VacA 分泌的量和进入细胞内的水平不同有关。

不同地区分离的 H. pylori 菌株,其 VacA 基因型具有很高的多态性,与地区及人种有关。通过 H. pylori 菌株 VacA 基因多态性以及临床相关疾病的深入研究,对进一步探索 H. pylori 的传播、流行、致病机制等将会提供有益的线索。

参 考 文 献

[1] 汪志群,黄爱龙,蒲 丹,等. 人幽门螺杆菌 VacA 与 HspA 双价疫苗载体的构建[J]. 重庆医科大学学报,2003;28(6):692-696.

[2] Atherton JC, Cao P, Peek RM, et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori[J]. J Biol Chem, 1995;270(30):17771-17777.

[3] Strobel S, Bereswill S, Balig P, et al. Identification and analysis of a new vacA genotype variant of Helicobacter pylori in different patient groups in Germany[J]. J Clin Microbiol, 1998;36:1285-1289.

[4] Atherton JC, Peek RM Jr, Tham KT, et al. Clinical and pathological importance of heterogenecity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of Helicobacter pylori[J]. Gastroenterology, 1997;112:92-99.

[5] 刘 淼,杨致邦,林珊珊,等. 幽门螺杆菌细胞空泡毒素基因毒性片段的克隆与表达[J]. 重庆医科大学学报,2003;28(6):720-723.

[6] Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, et al. Relationship between Helicobacter pylori iceA, cagA, vacA status and clinical outcome: studies in four different countries[J]. J Clin Microbiol, 1999;37(7):2274-2279.

[7] 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):593-595.

[8] 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):128-135.

[9] Miehlke S, Kirsch C, Agha-Amiri K, et al. The Helicobacter pylori vacAs1, m1genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany[J]. Int J Cancer, 2000;87(3):322-327.

[10] 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):173-178.