DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.022
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

文章编号:1000-5404(2001)09-1049-02

论著

幽门螺杆菌 CagA 抗原性多态性分析

周建嫦[1],张建中[2],徐采朴[1],何利华[2],张茂俊[2],盛 涛[2],郭浩岩[2] ([1]第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038;[2]中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所腹泻研究室,北京 102206)

提 要:目的 了解我国幽门螺杆菌 CagA 抗原性的多态性,为临床血清学诊断 CagA 阳性菌株感染提供实验依据,以及是否存在特定胃十二指肠疾病相关的 CagA 抗原性型提供线索。方法 采用 Western blots 方法,比较 38 株我国幽门螺杆菌分离株的 CagA 与 3 种不同胃肠疾病分离株兔免疫血清的反应强度。分析不同抗原性类型 CagA 与疾病的关系。结果 任何一种血清均不能识别所有 CagA,但任一 CagA 至少可被一种血清识别,多数菌株 CagA 的抗原性与 CAPM N62 接近;抗原性与 NCTC11637 接近的 CagA 可能与消化性溃疡相关,但不显著。结论 我国不同幽门螺杆菌菌株 CagA 抗原性存在明显多态性,血清学方法诊断 CagA 阳性菌株感染时应至少使用 3 种抗原或抗体,不同抗原性类型 CagA 与胃十二指肠疾病的关系有待进一步研究。

关键词:幽门螺杆菌;CagA;抗原多态性
中图法分类号:R377;R392.11;R446.6 文献标识码:A

Analysis of antigenic heterogeneity of CagA of *Helicobacter pylori* strains

ZHOU Jian-chang, ZHANG Jian-zhong, XU Cai-pu, HE Li-hua, ZHANG Mao-jun, SHENG Tao, GUO Hao-yan (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To examine the antigenic heterogeneity of CagA of *Helicobacter. pylori* for identification of CagA positive Hp infection serologically, and determine the existence of gastroduodenal diseases-specific CagA antigenic subsets. Methods The antigenic heterogeneity of CagA of different Hp strains was determined by comparing their reactivity to three different types of rabbit sera immunized with CAPM N62, NCTC11637, CAPM Z-2 respectively by Western blots, its' association with different gastroduodenal diseases was analyzed. Results None of the three immune sera could recognize CagA of all isolates, whereas each CagA could be recognized by at least one type of immune serum. The antigenity of CagA of most Chinese Hp strains was similar to that of CAPM N62, those reacted most strongly with serum immunized by NCTC11637 was more likely but not significantly correlated to peptic ulcer. Conclusion CagA of different Chinese Hp strains are in high antigenic heterogeneity, at least three types of CagA antigen or its antibody should be used for determining CagA positive Hp strain infection by serological method. The relationship between different antigenic subsets of CagA and gastroduodenal diseases need further investigation.

Key words: *Helicobacter pylori*; CagA; antigenic heterogeneity

CagA(Cytotoxin asociated protein A)是幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)的重要致病因子之一,其显著特点是其分子量大小和抗原性具有多态性[1,2],由此一方面可引起血清学诊断 CagA 阳性 Hp 感染率误差[3],另一方面则可导致不同 CagA 功能和致病性差异。越来越多的研究提示,胃癌或十二指肠溃疡相关 Hp 的 CagA 可能具有各自的特征;CagA 大小和抗原性与感染者胃粘膜萎缩程度及患胃癌危险性之间存在某种关联[4]。在本研究中,我们拟通过 Western blots 分析 38 株国内 Hp 菌株与 3 种不同疾病 Hp 分离株兔免疫血清(NCTC11637、CAPM N62、CAPM Z-2)的反应强度,以了解我国 Hp 菌株 CagA 抗原性多态性的分布情况,及其与胃肠疾病的关系。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 Hp 菌株及培养条件

38 株国内菌株分离自北京、福建、香港、云南等地感染者,其中胃癌分离株 2 株,消化性溃疡分离株 12 株,慢性胃炎分离株 15 株,无症状患者分离株 9 株。2 株国际标准株(SS1、NCTC11637)作为阳性对照,均由中国幽门螺杆菌协作组菌种保藏中心提供。细菌在含 10% 羊血的 Hp 选择性培养基上,37 ℃微需氧环境下培养 3~4 d。

1.2 抗 Hp 全菌蛋白抗血清

由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所制备并保存。其中 NCTC11637 为国际标准株,分离自十二指肠溃疡患者,CAPM N62 和 CAPM Z-2 分别分离自我国胃癌、慢性胃炎患者。

1.3 主要试剂

低分子量蛋白质标准为中国科学院上海生物化学研究所产品。羊抗兔 IgG-HRP 购自鼎国生物工程公司。

1.4 CagA 抗原性多态性的 Western blots 分析

收集培养 3~4 d 的 Hp,PBS 充分洗涤后,加入适量 1× 蛋白加样缓冲液,使菌浓度为 10^9 cfu/ml,100 ℃水浴 5 min,制备蛋白样品。由每株菌所制备的蛋白样品分成 20 μl 的 3 份,平行进行如下操作。采用 5% 浓缩胶,10% 分离胶,120 V 恒压电泳 2.5 h,分离菌体蛋白。电泳结束后,凝胶置硝酸纤维素膜(0.45 μmol/L 孔径)上,在 Trans-Blot SD Semi-Dry Trasnfer Cell 中恒压 24 V 转膜 80 min。NC 膜上的蛋白质标准用氨基黑 10B 染色;其余部分在 5% 脱脂牛奶中封闭过夜,TBS-Tween 20 充分洗涤

作者简介:周建嫦(1972-),女,湖南省道县人,博士,讲师,主要从事幽门螺杆菌分子生物学及其与胃肠疾病关系方面的研究,发表论文 5 篇。电话:(023)65423260

收稿日期:2001-05-30;修回日期:2001-08-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

后，同一 CagA 的 3 条抗原膜分别转入适当稀释[1∶(5～9)] 的 3 种 Hp 兔免疫血清中，室温下平缓摇动 2.5 h。TBS-Tween 20 充分洗涤后，1∶200 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 处理，4-氯-1-萘酚显色 10～15 min 后，将 NC 膜转入蒸馏水中终止显色反应。

2 结果

2.1 我国 Hp 菌株的 CagA 抗原性多态性及分型

CagA 抗原性多态性十分明显，仅 2 株菌的 CagA 与 3 种免疫血清的反应强度一致，而 90%以上菌株的 CagA 与 3 种血清的反应强度显著不同；其中任何一种血清都不能与所有菌株 CagA 反应，但任一 CagA 至少可被其中一种血清识别。我们将与 CAPM N62 免疫血清反应最强的抗原性类型定义为Ⅰ型，与抗 NCTC11637 血清反应最强的定义为Ⅱ型，与抗 CAPM Z-2 血清反应最强的定义为Ⅲ型，与 3 种抗血清反应强度基本一致的定义为Ⅳ型，其他反应类型定义为Ⅴ型，其中与抗 NCTC11637 血清反应最弱的为Ⅴa 型，与抗 CAPM N62 血清反应最弱的为Ⅴb 型，与抗 CAPM Z-2 血清反应最弱的为Ⅴc 型。

38 株国内 Hp 中，22 株 CagA 的抗原性为Ⅰ型，占所有菌株的 57.9%；其它型的菌株数分别为：Ⅱ型 3 株，Ⅲ型 5 株，Ⅳ型 2 株，Ⅴa 型 2 株，Ⅴb 型 3 株，Ⅴc 型 1 株。可见我国 Hp 菌株 CagA 的抗原性与 CAPM N62 交叉明显。2 株国际标准株 CagA 的抗原性类型分别为Ⅱ型、Ⅲ型，见表 1。

2.2 CagA 抗原性多态性与胃 十二指肠疾病的关系

各种胃十二指肠疾病分离 Hp 菌株的 CagA 抗原性类型分布情况见表 1。可见，2/3 Ⅱ型 CagA 为消化性溃疡分离株，另 1 株为慢性胃炎分离株，但同时伴十二指肠炎；消化性溃疡分离株中，7/14 株与抗 CAPM N62 血清的反应性较弱，显示出一定的疾病分布集中现象。

表 1 **CagA** 抗原性多态性在我国各种胃十二指肠疾病 **Hp** 分离株中的分布

Tab 1 Distribution of subsets of CagA antigen in different gastroduodenal diseases-associated Hp strains in China

Gastroduodenal diseases	Subtype Ⅰ	Subtype Ⅱ	Subtype Ⅲ	Subtype Ⅳ	Subtype Ⅴa	Subtype Ⅴb	Subtype Ⅴc
Normal	4		1		1		1
Chronic gastritis	9	1	1	1	1	2	
Peptic ulcer	8	2	3			1	
Gastric cancer	1			1			
Total	22	3	5	2	2	3	1

3 讨论

目前诊断 CagA 阳性 Hp 菌株感染的各种手段中，血清学方法最为常用。但 CagA 抗原性多态性可导致检测出的 CagA 抗体阳性率误差[3,5]。Vaucher 等[3]用 B225、B110、ATCC43579 的 CagA 作为抗原，检测出胃癌患者血清 CagA 抗体阳性率分别为 93.3%、40%、13.3%。Yamaoka[5]比较了 4 种检测血清抗 CagA 抗体的商品化试剂盒，发现其敏感性和特异性均不高。我们对国内 38 株 Hp 的 CagA 与 3 种 Hp 菌体蛋白兔免疫血清反应强弱的分析表明，CagA 抗原性多态性十分明显，90%以上菌株的 CagA 与 3 种血清的反应强度显著不同，其中任何一种血清都不能与所有菌株 CagA 起反应，但任一 CagA 至少可被其中一种血清识别。因此，在检测 CagA 抗原或 Hp 感染者血清 CagA 抗体时，如果使用单一菌株制备的抗体或 CagA 抗原，很容易导致假阴性结果，应联合使用至少 3 种抗体或抗原。

一般认为，CagA 抗原性多态性与其 3' 端可变区内重复序列数目有关，重复序列越多，CagA 分子量越大，抗原性越强[1,2,4]。但我们的结果显示，本研究所用菌株的 CagA 分子量较一致，但抗原性多态性明显，提示 CagA 抗原性多态性并非只由 3' 端可变区内重复序列多少及分子大小变异所致，CagA 内其它氨基酸插入、缺失、替换等变异可能是导致其空间构象和抗原性多态性的重要原因。我们对国内菌株 cagA 基因 3' 端可变区长度的分析也进一步证实了这一点(结果待发表)。

本研究结果还显示：国内 Hp 菌株 CagA 抗原性与 CAPM N62 株较为接近。胃癌高发区福建长乐菌株的 CagA 与抗 NCTC11637 血清反应较弱，2 株Ⅴa 型菌株均为该地区分离株，而与抗 CAPM N62 血清反应最弱的 3 株Ⅴb 型菌株，无 1 株源自该地区。2/3(66.7%) Ⅱ型 CagA 为消化性溃疡分离株，另 1 株虽然分离自慢性胃炎患者，但该患者同时伴有十二指肠炎；消化性溃疡分离株中，7/14 株与抗 CAPM N62 血清的反应性较弱，提示 CagA 与这两种抗血清反应强度的差异可能与致病性有一定关系，抗原性与 NCTC11637 接近的 CagA 可能与消化性溃疡关系较为密切。可进一步利用这两种血清进行 CagA 抗原性与胃癌和十二指肠溃疡关系研究，以明确是否存在与胃癌或十二指肠溃疡相关的 CagA 抗原类型。

参考文献：

[1] Covacci A, Censini S, Bugnoli M, *et al*. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(12): 5 791－5 795.

[2] Tummuru M K, Cover T L, Blaser M J. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production[J]. Infect Immun, 1993, 61(5): 1 799－1 809.

[3] Vaucher C, Janvier B, Nousbaum J B, *et al*. Antibody response of patients with *Helicobacter pylori*-related gastric adenocarcinoma: significance of anti-cagA antibodies[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(3): 463－467.

[4] Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, *et al*. Variants of the 3' region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different Hp-associated diseases[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(8): 2 258－2 263.

[5] Yamaoka Y, Kodama T, Graham D Y, *et al*. Comparison of four serological tests to determine the CagA or VacA status of *Helicobacter pylori* strains [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(11): 3 433－3 434.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net