

浙江地区幽门螺杆菌临床菌株 *vacA* 优势 基因型及其核苷酸序列分析

陈学军, 严 杰, 毛亚飞, 李立伟

(浙江大学医学院病原生物学教研室, 浙江 杭州 310031)

[摘要] 目的: 了解浙江地区消化性溃疡和慢性胃炎患者感染的幽门螺杆菌(*Hp*) *vacA* 优势基因型及其序列特点。方法: 分别从 29 例消化性溃疡和 34 例慢性胃炎患者的胃窦、胃体粘膜组织中分离出 126 株 *Hp*。采用聚合酶链反应检测 *vacA* 基因的信号区(s)和中间区(m)亚型。部分优势基因型的扩增产物 T-A 克隆后进行核苷酸序列测定。结果: 所有菌株均扩增出 *vacA* s 区和 m 区基因片段, 发现 s1a/m1, s1a/m2, s1a/mlb, s1a/mlb-m2 4 种基因型, 其比例分别为 7.1% (9/126)、61.9% (78/126)、29.4% (37/126)、1.6% (2/126)。17.5% 患者 (11/63) 存在不同 *vacA* 基因型 *Hp* 菌株混合感染, 但在胃炎组和溃疡组中的分布差异无显著性 ($P > 0.05$)。6 株 s1a 型 *Hp* 菌株的 s 区扩增产物与报道的 s1a 型 60190 株核苷酸序列同源性为 93.15%~94.86%, 4 株 m2 型 *Hp* 菌株的 m 区扩增产物与报道的 m2 型 87-203 株核苷酸序列之间同源性为 93.63%~97.61%。结论: s1a/m2 和 s1a/mlb 均是浙江地区消化性溃疡或慢性胃炎患者感染的 *Hp* 菌株的 *vacA* 优势基因型。部分优势 *vacA* 基因型菌株的核苷酸序列与国外报道的参考菌株有较高的同源性; 部分患者同时感染多株不同 *vacA* 基因型 *Hp*。

[关键词] 螺杆菌, 幽门; *vacA* 基因; 消化性溃疡; 胃炎

[中图分类号] R 377; R 392.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2003)01-0024-05

Analysis on the *vacA* dominant genotypes and their nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* isolates in Zhejiang area

CHEN Xue-jun, YAN Jie, MAO Ya-fei, et al (Department of Medical Microbiology and Parasitology, College of Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

[Abstract] **Objective:** To determine *vacA* dominant genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer (PU) or chronic gastritis (CG). **Methods:** *H. pylori* strains were isolated from mucosa samples of gastric antrum and corpus of patients suffering from PU ($n=29$) or CG ($n=34$), 126 strains of *H. pylori* were selected for PCR to detect s and m regions in *vacA* gene of the isolates. Parts of the amplification products were sequenced after T-A cloning. The correlation between infection or coinfection with different *vacA* genotypes of *H. pylori* and different gastroduodenal diseases was further analyzed. **Results:** The positive amplification products of *vacA* gene, s and m regions, were found in the DNA samples of all the isolates. In these products, s1a/m1, s1a/m2, s1a/mlb and s1a/mlb-m2 genotypes of *vacA* gene were detected and s1b and s2mla genotypes absent. Proportions of the s1a/m1, s1a/m2, s1a/mlb and s1a/mlb-m2 genotypes were 7.1% (9/126), 61.9% (78/126), 29.4% (37/126) and 1.6% (2/126), respectively. 17.5% (11/63) of the patients were confirmed to be coinfecting with different genotype *H. pylori* strains. No statistical differences were found in the distribution of different genotype *H. pylori* strain infection in the gastric diseases ($P > 0.05$). In comparison with the reported sequences of *H. pylori* strain 60190 with s1a genotype and strain 87-203 with m2 genotype, homologies of the nucleotide sequences of s1a PCR products from 6 strains of *H. pylori* isolates and m2 PCR products from 4 strains of *H. pylori* isolates were 93.15%~94.86% and 93.63%~97.61%, respectively. **Conclusion:** *H. pylori* with s1a/m2 or s1a/mlb are the dominant genotypes in the PU or GC patients in Zhejiang area. The nucleotide sequences of partial amplification products from the *vacA* dominant genotypes of *H. pylori* show high homology compared with the reported sequences. Part of the patients may be coinfecting with different *vacA* genotypes of *H. pylori*.

[Key words] *Helicobacter pylori*; *vacA* gene; Peptic ulcer; Gastritis

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2003, 32(1): 24-28.]

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *Hp*)是慢性胃炎、消化性溃疡的病原体, 也与胃癌发病密切相关。*Hp* 空泡毒素基因(vacuolating cyto-toxin gene A, *vacA*)的产物能使上皮细胞产生

收稿日期: 2002-10-22 修回日期: 2002-12-25

作者简介: 陈学军(1971—), 男, 硕士, 现在浙江大学医学院附属儿童医院工作, 主要从事实验诊断研究。

通讯作者: 严 杰(1956—), 男, 教授, 从事病原生物学的研究。

E-mail: yanchen@mail.hz.zj.cn

空泡变性,是该菌重要的致病因子之一。vacA 基因存在于所有 Hp 菌株中^[1],一般可分为 s1/m1、s1/m2 和 s2/m2 3 个亚型。不同 vacA 亚型的 Hp 菌株产生空泡毒毒素产量有明显差异,如 s1/m1 毒素产量高,s1/m2 中等,s2/m2 较低或不产生毒素^[2]。此外,近年国外文献屡有报道,同一患者可感染多株不同 vacA 基因型的 Hp^[3,4]。因此,探讨各地区 Hp vacA 优势基因型,根据 vacA 基因型的差异了解患者感染单一或不同 Hp 菌株,分析本地区分离的 Hp vacA 基因型序列特点,对于了解 Hp 的致病机制、流行特点、感染来源等均有一定意义。为此,本研究分别从患者胃窦和胃体粘膜活检标本中分离 Hp,用聚合酶链反应(PCR)检测所分离 Hp 菌株的 vacA 基因型,对部分菌株 vacA 基因型核苷酸序列进行了分析。

1 资料和方法

1.1 临床资料 2001 年 11 月至 2002 年 6 月收集浙江省中医院、浙江大学医学院附属邵逸夫医院和浙江大学医学院附属儿童医院接受胃镜检查的省内各地患者 117 例,每人均取胃窦和胃体粘膜组织各 1 块。选取胃窦、胃体组织均培养

出 Hp 的 63 例患者作为本研究对象,其中男性 43 例,女性 20 例,年龄 6~78 岁,平均(40±18)岁。其中慢性胃炎 34 例(慢性浅表性胃炎 24 例、慢性活动性胃炎 5 例和慢性萎缩性胃炎 5 例),消化性溃疡 29 例(胃溃疡 6 例、十二指肠球部溃疡 20 例和复合溃疡 3 例)。

1.2 Hp 的分离和鉴定 活检标本匀浆后接种于选择性哥伦比亚血琼脂平板上(含 5 mg/L TMP、10 mg/L 万古霉素、2 500 U/L 多粘菌素和 2 mg/L 两性霉素 B),37℃微需氧培养 3~5 d。挑取可疑菌落增菌,革兰染色镜检、尿素酶试验、氧化酶试验鉴定为 Hp 后,悬于 30%甘油布氏肉汤中,-70℃保存。

1.3 模板 DNA 制备 冻存菌株复苏后接种于上述培养基上,37℃微需氧培养 5 d。传代一次后用 0.01 mol/L、pH 7.4 的 PBS 收集 Hp,再用该缓冲液离心洗涤 3 次,细菌沉淀悬于适量 TE 缓冲液中。采用常规酚-氯仿法提取 DNA,溶于 TE 中,并用紫外分光光度法测定其浓度。

1.4 PCR 扩增 vacA 信号区(s)、中间区(m)的引物见表 1。PCR 反应总体积为 100 μl,内含 0.25 mmol/L 各 dNTP、250 nmol/L 各引物、2.0 mmol/L MgCl₂、2.5 U Taq 酶、1 000 ng

表 1 Hp vacA 基因 s、m 区分型和测序的引物

Table 1 Oligonucleotide primers used for vacA typing and sequencing			
Region	Primer	Nucleotide sequence	Product size(bp) ^a
S1a	SS1-F	5'-GTCAGCATCACACCGCAAC-3'	190
	VA1-R	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'	
S1b	SS3-F	5'-AGCGCCATACCGCAAGAG-3'	187
	VA1-R	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'	
S2	SS2-F	5'-GCTAACACGCCAAATGATCC-3'	199
	VA1-R	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'	
S region	SIG-F	5'-ATGGAATAACAACAAACACACCG-3'	338
	SIG-R	5'-CAACCTCCATCAATCTTACTGGA-3'	
m1	VA3-F	5'-GGTCAAAATGCGGTCATGG-3'	290
	VA3-R	5'-CCATTGGTACCTGTAGAAAC-3'	
m2	VA4-F	5'-GGAGCCCCAGGAAACATTG-3'	352
	VA4-R	5'-CATAACTAGCGCCTTGCAC-3'	
m1b	Vam-F3	5'-GGCCCCAATGCAGTCATGGAT-3'	291
	Vam-R3	5'-GCTGTTAGTGCCTAAAGAAGCAT-3'	
m1b-m2	Vam-F3	5'-GGCCCCAATGCAGTCATGGAT-3'	295
	VA4-R	5'-CATAACTAGCGCCTTGCAC-3'	
m1a	VA3-F	5'-GGTCAAAATGCGGTCATGG-3'	290
	VA3.1-R	5'-CTGTTAGTGCCCGCAGAAAC-3'	
m region	VA6-F	5'-TCAATATCAACAAGCTC-3'	787
	VA5-R	5'-CCGCATGCTTTAATGTC-3'	

a: size of PCR products is given for individual strains and can vary among strains

DNA 模板、1×PCR 缓冲液(pH 8.3)。PCR 反应参数: 94℃ 5 min, ×1; 94℃ 1 min, 52 或 55℃ 1 min(扩增、s1a、s1b、s2、m1、m1a、m2 时退火温度为 52℃, 扩增 m1b、m1b-m2 时退火温度为 55℃), 72℃ 1.5 min, ×35; 72℃ 7 min, ×1。引物由上海博亚生物技术有限公司(BioAsia)合成, 所有 PCR 试剂均为大连宝生物工程有限公司(TaKaRa)产品。1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.5 PCR 产物克隆和测序 采用上海博彩生物科技有限公司(BBST)T-A 克隆试剂盒将扩增的目的片段克隆至 pUCm-T 载体中。重组质粒转化于 *E. coli* DH 5α 株并扩增, 碱变性法提取质粒。委托 BBST 公司测定插入片段的核苷酸序列, 并与报道的核苷酸序列进行比较^[5]。

1.6 统计学方法 计数资料的比较采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果 采用 vacA s1a、m1、m2、m1b 和 m1b-m2 基因型的引物均可获得预期大小的 PCR 产物(图 1), 但所有菌株均未见 s1b、s2、m1a 的阳性扩增产物。

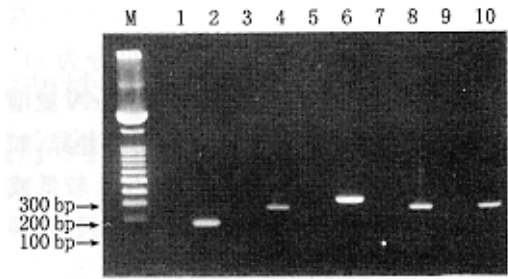


图 1 vacA 亚型 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Ethidium bromide-stained agarose gel (1.5%) of representative cagA and vacA gene-specific PCR products

M: 100 bp ladder; 2: s1a 190 bp; 4: m1 290 bp; 6: m2 352 bp; 8: m1b 291 bp; 10: m1b-m2 295 bp; 1,3,5, 7,9: corresponding negative controls

2.2 Hp 临床菌株 vacA 基因型分析 所有菌株均能扩增出 vacA s 区和 m 区基因片段, 其组合分别为 9 株 s1a/m1 (7.1%)、78 株 s1a/m2 (61.9%)、37 株 s1a/m1b (29.4%)、2 株 s1a/m1b-m2 (1.6%)。s1a/m2 ($\chi^2 = 83.58, P < 0.01$)和 s1a/m1b ($\chi^2 = 20.85, P < 0.01$)检出率明显高于其它基因型, 且 s1a/m2 检出率也较 s1a/m1b 为高($\chi^2 = 26.89, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各种胃病标本中分离的 Hp 菌株 vacA 基因型的分布

Table 2 Distribution of vacA genotypes in *H. pylori* isolated from gastric patients

Disease	Case (strain)	s1a/m1	s1a/m2	s1a/m1b	s1a/m1b-m2
Chronic gastritis					
chronic superficial gastritis	24(48)	3	32	13	0
chronic active gastritis	5(10)	0	6	6	0
chronic atrophy gastritis	5(10)	1	10	2	0
Peptic ulcer disease					
gastric ulcer	6(12)	1	5	1	1
duodenal ulcer	20(40)	3	22	13	1
gastric and duodenal ulcer	3(6)	1	3	2	0
Total	63(126)	9	78	37	2

2.3 不同基因型 Hp 的混合感染 17.5% (11/63)患者的胃窦、胃体标本中检出不同基因型的 Hp(表 3), 但此混合感染在慢性胃炎组和消化性溃疡组中的分布差异无显著性($\chi^2 = 1.66, P > 0.05$)。

2.4 核苷酸序列同源性比较 与报道的 s1a

型参考菌株 60190 和 m2 型参考菌株 87-203 相应核苷酸序列进行比较^[5], 上述 6 株 s1a 型 Hp 菌株 vacA 基因 s 区和 4 株 vacA m2 型菌株 m 区扩增产物的同源性分别为 93.15%~94.86%和 93.63%~97.61%。比较时不包括引物序列。

表 3 11 例患者不同基因型 Hp 混合感染的情况

Table 3 Mixture infection of multiple *H. pylori* in 11 patients

Subject No.	Disease	Site	vacA genotypes detected	
			s region	m region
1	CSG	A	s1a	m1b
		C	s1a	m1,m2
2	CSG	A	s1a	m2
		C	s1a	m1,m2
3	CSG	A	s1a	m1b
		C	s1a	m2
4	CSG	A	s1a	m1
		C	s1a	m1b
5	GU	A	s1a	m2
		C	s1a	m1,m2
6	GU	A	s1a	m2
		C	s1a	m1b-m2
7	DU	A	s1a	m1b
		C	s1a	m1b-m2
8	DU	A	s1a	m2
		C	s1a	m1b
9	DU	A	s1a	m2
		C	s1a	m1,m2
10	GU and DU	A	s1a	m1
		C	s1a	m2
11	GU and DU	A	s1a	m1
		C	s1a	m1b

CSG: chronic superficial gastritis; GU: gastric ulcer; DU: duodenal ulcer; A:antrum;C:corpus

3 讨 论

Atherton^[2]等发现不同 Hp 菌株 vacA 基因序列差异较大的区域主要位于信号肽区域(s 区)和中间长约 730 bp 的区域(m 区),并将 s 区分为 s1a、s1b 和 s2,M 区分为 m1 和 m2,如此 vacA 基因型可有 s1a/m1、s1a/m2、s1b/m1、s1b/m2、s2/m2 和 s2/m1。此后 Pan^[7]等和 Strobel^[8]等在不能按 m1 和 m2 分型的 Hp 菌株中发现了 m1a、m1b 和 m1b-m2 等 m 区变异体。采用 HeLa 细胞检测 Hp VacA 的细胞毒作用,发现 s1/m1 型毒力强于 s1/m2 型,s2/m2 型无毒力^[2],且 s1a/m1b 型、s1a/m1b-m2 型毒力也较 s1a/m2 为强^[7]。本实验发现,Hp 临床菌株 vacA 基因型所占比例依次为 s1a/m2 61.9%、s1a/m1b 29.4%、s1a/m1 7.1%、s1a/

m1b-m2 1.6%,表明 s1a/m2 是最主要的 Hp vacA 基因型。尽管有文献报道 s1/m2 型 Hp 菌株毒力较弱,但有实验证明 s1/m2 型 Hp 在 RK-13 细胞或原代培养胃上皮细胞中能检测出较高的细胞毒作用^[9]。

vacA 基因型的分布有明显的地域差异,东欧和北欧以 s1a 型为主,法国、意大利及北美地区 s1a 和 s1b 型常见,中南美地区以 s1b 为主,但 m1 和 m2 的分布却大致相同^[10]。日本分离的 Hp vacA 则以 s1a/m1 为主^[6]。我国上海和广东地区 Hp vacA 基因型均为 s1a/m2 或以 s1a/m2 为主^[11,12]。本实验发现,s1a/m1b (29.4%)也是浙江地区 Hp 菌株 vacA 的优势基因型,这表明在以后的 vacA m 区分型研究应重视 m1b 亚型。此外,浙江地区患者标本分离的 Hp 菌株 vacA 基因 s 区极为稳定,均为单一的 s1a,但 m 区变异较大,有 m1、m2、m1b 和 m1b-m2 4 个亚型。

为了更好地与国外参考序列比较,本实验选择部分 vacA 优势基因型菌株扩增了 s 区和 m 区的全长序列。核苷酸序列分析结果证实,vacA s1a 型和 m2 型 Hp 菌株的 s 区(338 bp)和 m 区(787 bp)扩增产物核苷酸序列与报道的 s1a 型参考株的 s 区、m2 型参考株的 m 区序列同源性分别为 93.15%~94.86%和 93.63%~97.61%,一方面证实了本实验所获得的 PCR 结果可靠;另一方面也表明优势分布的 vacA s1a 和 m2 型中国菌株与欧美国家报道的参考菌株(可能非优势菌株)在 vacA 基因区有较高的同源性。

由于不同的 vacA s 区或 m 区亚型不能共存于同一 Hp 菌株中,因而 Hp 菌株 vacA 亚型的不同可证明其为不同 Hp 菌株。本实验发现,63 例患者中有 11 例(17.5%)其胃窦、胃体标本中检出不同的 vacA 亚型组合,表明存在一定程度的不同 Hp 菌株的混合感染,提示 Hp 感染来源的多样性。国外学者^[3,4]报道不同基因型 Hp 菌株混合感染能促进消化性溃疡的发生,而本实验结果未能发现混合感染在慢性胃炎和消化性溃疡中的分布有差异($P>0.05$),故不同基因型 Hp 菌株混合感染的临床意义有待于进一步研究。

References:

[1] Cover T L . The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* [J]. Mol Microbiol, 1996,20(2):241—246.

[2] Atherton J C, Cao P, Richard M P J, et al .Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori* [J]. J Biol Chem, 1995,270(30):17771—17777.

[3] Figura N, Vindigni C, Covacci A, et al. cagA positive and negative *Helicobacter pylori* strain are simultaneously present in the stomach of most patients with non-ulcer dyspepsia relevance to histological damage [J]. Gut, 1998,42(6):772—778.

[4] Figueiredo C, van Doorn L J, 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. Scand J Gastroenterol [J], 2001,36(2):128—135.

[5] Cover T L, Tummurn M K R, Cao P, et al. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains [J]. J Biol Chem, 1994,269(14):10566—10573.

[6] Ito Y, Azuma T, Ito S, et al. Analysis and typing of the vacA gene from cagA-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan [J]. J Clin Microbiol, 1997,35(7):1710—1714.

[7] Pan Z J, Berg D E, van Hulst D, et al. Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of Dis-tint vaA alleles in *Helicobacter pylori* from China [J]. J

Infect Dis, 1998,178(1):220—226.

[8] 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(5):1285—1289.

[9] Pagliaccia c, de Bernard M, Lupetti P, et al. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998,95(17):10212—10217.

[10] Van Doorn L J, Figueiredo C, Megraud F, et al. Geo-graphic distribution of vacA allelic types of *Helicobac-ter pylori* [J]. Gastroenterology, 1999,116(4):823—830.

[11] HE Yao, HU Pin-jin, HE Xing-xiang, et al (何 瑶, 胡品津, 何兴祥, 等). Prevalence of cagA and vacA subtypes of *Helicobacter pylori* in Guangzhou [J]. Chi-nese Journal of Internal Medicine (中华内科杂志), 2000,39(12):818—820. (in Chinese)

[12] ZHANG You-li, LIU Hou-yu, ZHOU Kang, et al (张 尤历, 刘厚钰, 周 康, 等). A study on correlation be-tween vacA genotypes and its expression products of *H. pylori*, and gastroduodenal diseases [J]. Chinese Journal of Digestion (中华消化杂志), 2000,20(2):89—91. (in Chinese)

[责任编辑 黄晓花]

(上接第 23 页)

[6] Ikeno T, Ota H, Sugiyama A, et al. *Helicobacter py-lori*-induced chronic active gastritis intestinal metapla-sia, and gastric ulcer in Mongolian gerbils [J]. Am J Pathol, 1999,154(3):951—960.

[7] Takahashi S, Keto Y, Fujita H, et al. Pathological changes in the formation of *Helicobacter pylori*-induced gastric lesions in Mongolian gerbils [J]. Digest Dis Sci, 1998,43(4):754—765.

[8] Matsumoto S, Washizuka Y, Yatsumoto M, et al. In-duction of ulceration and severe gastritis in Mongolian

gerbil by *Helicobacter pylori* infection [J]. J Med Mi-crobiol, 1997,46(5):391—397.

[9] CHI Jing, FU Baoyu, Nakajima, et al (迟 晶, 傅宝玉, 九岛亮治等). Establishment of Mongolian gerbil ani-mal model infected with Hp infection and change of in-flammation and proliferation before and after Hp eradi-cation [J]. World Chinese Journal of Digestology(世界华人消化杂志), 1999,7(7):557—560. (in Chinese)

[责任编辑 黄晓花]