

幽门螺杆菌毒力基因型与胃癌的相关性研究

黄敬敬¹ 魏良洲² 战淑慧¹ 董开芯¹ 王传芳¹ 苏艳华¹ 董全江^{1△}

(1 青岛大学医学院附属青岛市立医院消化内科及中心实验室 山东 青岛 266071 2 青岛大学医学院附属医院 山东 青岛 266071)

摘要 目的 研究中国东部地区幽门螺杆菌(*H. pylori*) *cagA*、*vacA* 和 *iceA1* 毒力基因型的分布状况及其与胃癌的相关性。方法 从 52 例病人胃黏膜活检组织(31 例慢性浅表性胃炎 21 例胃癌)中分离培养 *H. pylori* ,用 PCR 方法扩增分离菌株的 *cagA*、*iceA1*、*vacAs*、*i*、*m* 区毒力基因片段,统计并分析上述毒力因素与胃癌发生的相关性。结果:在 52 例菌株中,*cagA*、*vacAs1/i1/m1*、*vacAs1/i1/m2* 和 *iceA1* 的阳性率分别是 92.3%(48/52) 48.1%(25/52) 48.1%(25/52) 90.4%(47/52);所有的胃癌分离株中均为 *cagA*(+) *vacAs1/i1*(+)型,*vacAm1*、*vacAm2* 和 *iceA1* 在胃癌组中的阳性率分别是 47.6%(10/21) 52.4%(11/21) 95.2%(20/21) ,与胃炎组相比,上述基因型的阳性率差异均无显著统计学意义($P>0.05$)。结论 *cagA*、*vacAs1/i1/m1*、*vacAs1/i1/m2* 和 *iceA1* 是中国东部地区 *H. pylori* 的优势基因型;*cagA*、*vacAs1*、*vacAi1* 和 *iceA1* 毒力基因型的存在与胃癌的发生无相关性。

关键词 幽门螺杆菌 *cagA* ;*vacA* ;*iceA1* ;毒力

中图分类号 R735.2 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)18-3525-04

The Correlation between Virulence Genotypes of Helicobacter Pylori and Gastric Cancer

HUANG Jing-jing¹, WEI Liang-zhou², ZHAN Shu-hui¹, DONG Kai-xin¹, WANG Chuan-fang¹, SU Yan-hua¹, DONG Quan-jiang^{1△}

(1 Qingdao Municipal Hospital, The Medical College of Qingdao University, Qingdao, 266071, China;

2 Affiliated Hospital of the Medical College of Qingdao University, Qingdao, 266071, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the prevalence of virulent genotypes of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and the relationship between virulence factors and gastric cancer. **Methods:** *H. pylori* were cultured from gastric biopsies obtained from 31 patients with chronic gastritis and 21 with gastric cancer. The virulence genes, *cagA*, *iceA1*, *vacA* s, *i* and *m* regions were amplified by using PCR and the relationship between virulence factors and gastric cancer was analyzed. **Results:** The prevalence of *cagA*, *vacAs1/i1/m1*, *vacAs1/i1/m2* and *iceA1* in 52 isolates were 92.3% (48/52), 48.1% (25/52), 48.1% (25/52), 90.4% (47/52), respectively. All the gastric cancer isolates were *cagA* (+) *vacAs1/i1* (+), and the positive rates of *vacAm1*, *vacAm2* and *iceA1* in group of gastric cancer were 47.6% (10/21), 52.4%(11/21), 95.2%(20/21), respectively. There were no statistically significant differences in the positive rates of all the genotypes above compared with the positive rates in gastritis isolates ($P>0.05$). **Conclusions:** The majority of *H. pylori* isolated from East China possess virulent genotypes are *cagA*, *vacAs1/i1/m1*, *vacAs1/i1/m2* and *iceA1* positive. It appeared that the virulence factors of *H. pylori* had no significant association with gastric cancer.

Key words: *Helicobacter pylori*; *cagA*; *vacA*; *iceA1*; Virulence

Chinese Library Classification(CLC): R735.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)18-3525-04

前言

幽门螺杆菌(*H. pylori*)是一种微需氧、螺旋状革兰氏阴性杆菌,主要感染胃黏膜上皮细胞层,世界有超过一半人口感染 *H. pylori* ,与慢性胃炎、消化性溃疡病及胃癌的发生关系密切^[1,2]。*H. pylori* 导致病变发生是通过独特的毒力因素完成的,如 *cagA*、*vacA* 和 *iceA1* 毒力基因^[3]。人们对 *cagA* 基因的致病作用已进行了较为深入的研究,其编码产物 CagA3' 可变区

EPIYA 序列的数量和类型均可影响毒力因子 CagA 的产量,与宿主胃黏膜病变程度密切相关^[4]。*vacA* 基因编码产物 VacA 有不同水平的空泡毒性,能够引发上皮细胞级联反应,最终导致细胞凋亡。*iceA* 基因是近年来新发现的 *H. pylori* 新型毒力相关基因,对其具体致病机制尚不明确。目前,在国内外尚未有对较大样本量 *H. pylori* 胃癌分离株毒力基因分布状况进行研究的报道。本文主要研究中国东部地区 *H. pylori* *cagA*、*vacA* 和 *iceA1* 毒力基因分布状况及其与胃癌的相关性。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养方法

收集 52 例于 2010 年至 2011 年到青岛市立医院行胃镜检查的患者胃黏膜活检标本(其中男性 28 例,女性 24 例,平均年龄 46.3 岁),经病理诊断为慢性浅表性胃炎者 31 例,胃癌者 2

作者简介 黄敬敬(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向:幽门螺杆菌与胃癌的相关性研究,电话:13156366011, E-mail: xueshan-100@163.com
△通讯作者 董全江,教授,电话:13964238382, E-mail: jiangacer@126.com
(收稿日期:2012-01-15 接受日期:2012-02-10)

例。胃炎标本取自于胃窦小弯侧,胃癌标本取自于距胃癌组织2-5厘米外部位。将胃黏膜活检标本接种于脑心浸出液固体培养基上,加入7%去纤维绵羊血和抗生素,在微需氧条件下(85%N₂ 5%O₂ ,10%CO₂)培养3-5天,经菌落形态、G-染色及触酶试验、尿素酶试验等证实为幽门螺杆菌后,将菌株收集于冻存管中于-80℃下保存。使用细菌DNA提取试剂盒提取菌株基因组DNA并保存于-80℃^[5]。幽门螺杆菌培养所需试剂来源于英国Oxoid公司,DNA提取试剂盒来源于北京天根生化科技有限公司。

1.2 PCR 反应

PCR 引物设计如下(表1)^[6,7],反应总体积为25μl(DNA模板10 ng,上下游引物各10μM,2× Taq PCR MasterMix12.5μl,其余用ddH₂O补齐),反应条件如下:iceA1基因94℃预变性5 min,94℃变性30s,54℃退火45 s,72℃延伸45 s,共35个循环;cagA及vacAi基因95℃预变性5 min,95℃变性1 min,52℃退火1 min (vacAm为54℃),1 min,72℃延伸1 min,共35个循环,最后72℃延伸10 min。经过1.6%琼脂糖凝胶电泳及电脑图像处理系统,保存并分析图像结果(图1-3)。

PCR 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,PCR所需试剂来源于北京天根生化科技有限公司。

1.3 统计学分析

应用SPSS17.1软件进行数据处理,采用Fisher's精确检验方法,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

PCR 结果显示,在分离培养的52例临床分离株中,cagA、vacAs1/i1/m1、vacAs1/i1/m2和iceA1的阳性率分别是92.3%(48/52),48.1%(25/52),48.1%(25/52),90.4%(47/52),分离标本中无混合感染现象(表2);在大多数菌株中含有vacAs1和i1型(51/52,50/52),而vacAm1和m2亚型分布较为均匀(25/52,26/52),cagA阴性菌株及vacAs2或i2型菌株均分离自胃炎标本;cagA、vacAs1和vacAi1在胃癌分离株中的阳性率均为100%(21/21),iceA1、vacAm1和vacAm2在胃癌组中的阳性率分别是95.2%(20/21),47.6%(10/21),52.4%(11/21),上述基因型在胃炎组和胃癌组中的分布差异均无统计学意义(P>0.05)。

表1 PCR 扩增 iceA1、cagA、vacA、cagA5' 区片段引物
Table 1 The primer pairs for amplifying the iceA1, cagA, vacA

Gene	Primer designation	Primer sequence5'→3'	PCR product size (bp)
cagA	CAGAF	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG	349
	CAGAR	CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA	
iceA1	iceA1 F	GTGTTTTTAACCAAAGTATC	247
	iceA1 R	CTATAGCCASTYTCTTTGCA	
vacA s1/s2	VA1-F	ATGGAAATACAACAAACAC	259(s1)
	VA1-R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	286(s2)
vacA i1/i2	VacF1	GTTGGGATTGGGGGAATGCC	410(i1)
	C1R	TTAATTTTAACGCTGTTTGAA	
	C2R	GATCAACGCTCTGATTGA	410(i2)
vacAm1/m2	VAG-F	CAATCTGTCCAATCAAGCGA	570(m1)
	VAG-R	CAATCTGTCCAATCAAGCGA	645(m2)

Note: S=C/G, Y=C/T

表2 各基因型在不同疾病中的检出情况
Table 2 The number of strains with different genotypes in different diseases

Genotype	Number of isolates		Total (n=52)
	Gastritis (n=31)	Gastric cancer (n=21)	
cagA(+)			
iceA1(+)/vacAs1/i1/m1	13	10	23
iceA1(+)/vacAs1/i1/m2	11	10	21
iceA1(+)/vacAs1/i2/m2	1	0	1
iceA1(-)/vacAs1/i1/m2	2	1	3
cagA(-)			
iceA1(+)/vacAs1/i1/m2	1	0	1
iceA1(+)/vacAs2/i2/m2	1	0	1
iceA1(-)/vacAs1/i1/m1	2	0	2

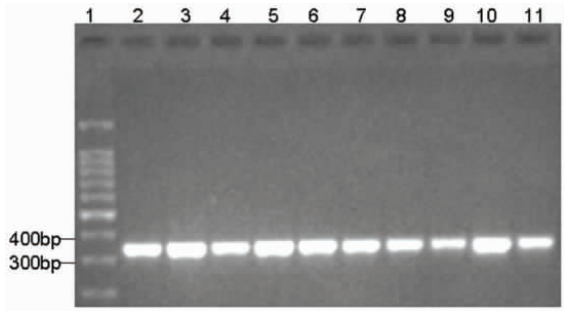


图 1 *cagA* 片段扩增结果

Fig.1 The result of amplifying *cagA*

注 2-11 为 *cagA* 阳性(349bp); 1 为 100bp Marker.

Note: 2-11 reveal *cagA* positive (349bp); 1 reveals Marker of 100bp.

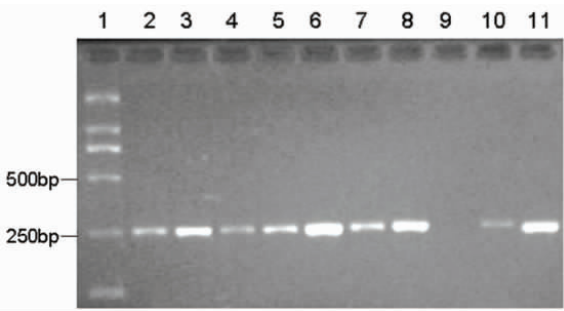


图 2 *iceA1* 片段扩增结果

Fig.2 The result of amplifying *iceA1*

注 2-8、10、11 为 *iceA1* 阳性(247bp) 9 为 *iceA1* 阴性; 1 为 250bp Marker.

Note: 2-8,10,11, reveal *iceA1* positive (247bp); 9 reveals *iceA1* negative; 1 reveals Marker of 250bp

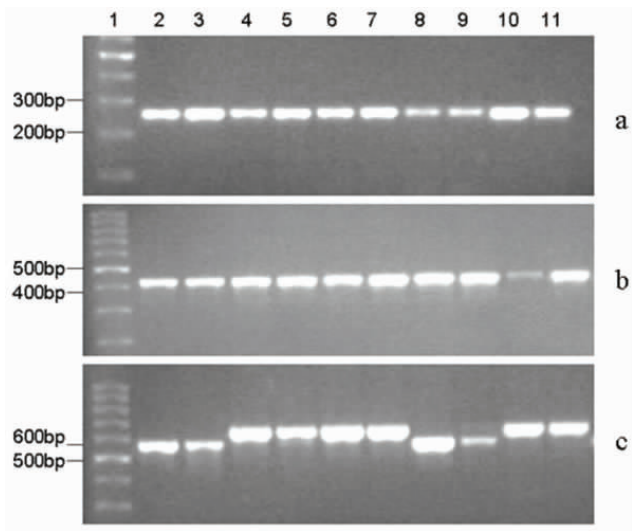


图 3 *vacA* 片段扩增结果

Fig.3 The result of amplifying *vacA*

注 a 为 *vacAs* 片段扩增结果 2-11 为 s1 型(259bp) b 为 *vacAi* 片段扩增结果 2-11 均为 i1 型(410bp) c 为 *vacAm* 片段扩增结果 2、3、8、9 为 *vacAm*1 型(570bp) 4-7、10、11 为 *vacAm*2 型(645bp) 1 为 100bp Marker

Note: a shows the result of amplifying *vacAs*: 2-11 are *vacAs*1 positive (259 bp); b shows the result of amplifying *vacAi*: 2-11 are *vacAi*1 positive (410 bp); c shows the result of amplifying *vacAm*: 2, 3, 8, 9 are *vacAm*1 positive (570 bp), 4-7, 10, 11 are *vacAm*2 negative (645 bp), 1 reveals Marker of 100 bp

3 讨论

世界有超过一半人口感染 *H. pylori* ,并可终生携带 ,只有少部分感染者发生严重临床病理变化 ,这是由细菌毒力因素 ,宿主易感性及环境因素共同决定的^[8,9]。*H. pylori* 有特殊的毒力因素能够导致宿主消化性疾病的发生。

cagA 基因是 *H. pylori* 最重要的毒力因素之一 ,其编码产物 CagA 蛋白对胃上皮细胞的损伤作用较为明确 ,CagA 经由 *cagPAI* 编码的 T4SS 输送到宿主上皮细胞内 ,在其重复的 EPIYA 基序酪氨酸残基上发生磷酸化作用 ,导致宿主细胞发生损伤^[10]。不同 *H. pylori* 菌株编码产物的 EPIYA 序列数量和类型不同 ,对宿主细胞的毒性损伤程度不同^[11]。除了 *cagA* 基因外 ,*vacA*、*iceA* 也是 *H. pylori* 导致宿主病变发生的毒力因素。*vacA* 基因编码产物 VacA 蛋白是一种空泡毒素 ,能在宿主细胞膜上形成小孔 ,诱导宿主细胞内形成空泡 ,导致细胞凋亡^[12,13]。*vacA* 主要包含 3 个多态性区域(s 区 i 区 m 区) ,每个多态性区域又进一步分成 1 2 亚型 ,不同亚型 VacA 基因编码产物的致空泡作用各不相同。研究表明 ,*vacAi* 型与胃癌的发生密切相关 ,认为 *VacAi*1 型比 s 或 m 型能更好的预测 *H. pylori* 相关肿瘤的发生^[14]。*iceA* 基因是近年来新发现的 *H. pylori* 毒力相关基因 ,*iceA*1 阳性菌株最终可引起胃黏膜上皮内中性粒细胞浸润 ,产生的 IL-8 浓度增高 ,导致黏膜炎症程度加重及消化性溃疡病的发生 ,其具体致病机制尚未知。*iceA*2 阳性菌株与临床疾病的发生无相关性^[15,16] ,之前研究表明 ,东亚菌株多表达 *iceA*1 型 ,而欧洲菌株则以 *iceA*2 为主导^[17]。

本研究调查了中国东部地区 *H. pylori* 毒力基因在胃癌标本分离株中的分布状况。结果显示 52 例菌株中 ,*cagA*、*vacAs*1/i1/m1、*vacAs*1/i1/m2 和 *iceA*1 的阳性率分别是 92.3% (48/52) ,48.1%(25/52) ,48.1%(25/52) ,90.4%(47/52) ,上述基因型在中国东部地区 *H. pylori* 分离株中占主导地位。*cagA* 阳性率明显高于欧洲和非洲源性菌株 ,符合东亚地区 *cagA* 基因的分布规律^[18] ,胃癌组菌株全部是 *cagA* 阳性 ,但与胃炎组相比 ,其阳性率差异无统计学意义。大多数菌株中含有 *cagAs*1 和 i1 型 (51/52 ,50/52) ,而 *cagAm*1 和 m2 亚型分布较为均匀 (25/52 ,26/52) ,*vacAs*2 或 i2 型菌株均分离自胃炎标本。欧洲文献报道中指出 ,根据 *vacA* 基因型的不同 ,*H. pylori* 菌株的空泡活性可进一步分为高毒性、低毒性、无毒性 3 类^[12] ,*cagAs*1/i1/m1 和 *cagAs*1/i1/m2 型 *H. pylori* 分别属于高毒性和低毒性株 ,而含有 *cagAs*2 或 i2 型菌株无毒性。我国 *H. pylori* 菌株大多表达 *cagAs*1/i1/m1 或 *cagAs*1/i1/m2 基因型 ,*cagAs*1 和 *cagAi*1 在胃癌分离株中的阳性率均为 100%(21/21) ,*cagAm*1 和 *cagAm*2 在胃癌组中的阳性率分别 47.6%(10/21) 和 52.4% (11/21) ,但与胃炎组相比 ,*cagA* 基因亚型的分布差异无统计学意义($P>0.05$) ,表明东亚菌株毒性强弱的分类并不适用于此种方法 ,*cagAs*1/i1/m1 或 *cagAs*1/i1/m2 基因型与胃癌的发生无显著相关性。*iceA* 基因以 1 型为主 ,与日本等国的报道一致^[19,20] ,符合东亚菌株 *iceA* 基因的分布规律。*iceA*1 在胃癌分离株中的阳性率是 95.2%(20/21) ,与胃炎组相比 ,阳性率差异无统计学意义($P>0.05$) ,*iceA*1 与胃癌的发生无相关性 ,该基因不能作为预测临床预后的生物标记 ,但 *iceA* 基因的高度多变性可作为

分析 *H. pylori* 菌群遗传学的有利工具。

总之, *cagA*、*cagAs1/i1/m1*、*cagAs1/i1/m2* 和 *iceA1* 是中国东部 *H. pylori* 菌株的优势基因型, *cagA*、*cagAAs1*、*cagAi1* 和 *iceA1* 毒力基因型的存在与胃癌的发生无相关性。东亚菌株中可能存在其他影响致病力强弱的基因片段,有待进一步探究。

参考文献(References)

- [1] Covacci A, Telford JL, Giudice GD, et al. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography[J]. Science, 1999, 284(5418): 1328-1333
- [2] Nilsson C, Sillen A, Eriksson L, et al. Correlation between *cag* pathogenicity island composition and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease[J]. Infect Immun, 2003, 71(11): 6573-6581
- [3] Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002[J]. Int J Cancer, 2006, 118(12): 3030-3044
- [4] Jones KR, Joo YM, Jang S, et al. Polymorphism in the *CagA* EPIYA motif impacts development of gastric cancer [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(4): 959-968
- [5] Carpenter BM, McDaniel TK, Whitmire JM, et al. Expanding the *Helicobacter pylori* genetic toolbox: modification of an endogenous plasmid for use as a transcriptional reporter and complementation vector [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73: 7506-7514
- [6] Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37: 2274-2279
- [7] Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, et al. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer[J]. Gastroenterology, 2007, 133: 926-936
- [8] Sachs G, Wen Y, Scott DR. Gastric infection by *Helicobacter pylori* [J]. Curr Gastroenterol Rep, 2009, 11(6): 455-461
- [9] Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis [J]. J Gastroenterol, 2009, 44: 239-248
- [10] Argent RH, Hale JL, El-Omar EM, et al. Differences in *Helicobacter pylori* *CagA* tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion [J]. J Med Microbiol, 2008, 57: 1062-1066
- [11] Azuma T, Yamazaki S, Yamakawa A, et al. Association between diversity in the Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* *CagA* protein and gastric atrophy and cancer[J]. J Infect Dis, 2004, 189(5): 820-827
- [12] Manente L, Perna A, Buommino E, et al. The *Helicobacter pylori*'s protein *VacA* has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells [J]. J Cell Physiol, 2008, 214: 582-587
- [13] Wen S, Moss SF. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis[J]. Cancer Lett, 2009, 282: 1-8
- [14] Basso D, Zambon CF, Letley DP, et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* gene polymorphisms [J]. Gastroenterology, 2008, 135: 91-99
- [15] Erziny Y, Koksall 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
- [16] Amjad N, Osman HA, Razak NA, et al. Clinical significance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *iceA* genotype status [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(35): 4443-4437
- [17] Ashour AA, Collares GB, Mendes EN, et al. *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(5): 1746-1750
- [18] Jang S, Jones KR, Olsen CH, et al. Epidemiological link between gastric disease and polymorphisms in *VacA* and *CagA* [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48: 559-567
- [19] Nishiya D, Shimoyama T, Fukuda S, et al. Evaluation of the clinical relevance of the *iceA1* gene in patients with *Helicobacter pylori* infection in Japan[J]. Scand J Gastroenterol, 2000, 35(1): 36-39
- [20] Ito Y, Azuma T, Ito S, et al. Sequence analysis and clinical significance of the *iceA* gene from *Helicobacter pylori* strains in Japan [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(2): 483-488