

幽门螺杆菌 VacA 基因型与耐药性相关性研究

林定赛 夏 莲 方 蕾 林昌平 李陈宣 林 朗 张建中

摘 要 **目的** 通过对临床分离的幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 进行培养和药敏试验, 结合基因检测的方法, 探讨 Hp 的毒力基因 VacA 多态性与其耐药性之间的关联。**方法** 采集 120 例消化道疾病患者的胃黏膜组织, 进行 Hp 分离培养和药敏试验, 同时对 Hp 阳性且有抗生素耐药结果的菌株进行核酸提取, PCR 检测 Hp 毒力基因 VacA s 区和 m 区的基因型。采用 χ^2 检验对 Hp 毒力基因的类型与其抗生素耐药性间相关性进行评价。**结果** 56 例患者经 Hp 培养阳性, 阳性率 46.7%。其中克拉霉素耐药率达到了 28.6%。s1/m2 型的菌株中, 克拉霉素耐药率为 43.5%, 而 s1/m1 型的菌株中, 克拉霉素耐药率为 18.2%, 两者之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** s1/m2 型菌株比 s1/m1 型菌株更容易产生克拉霉素耐药性, VacA 基因可能与 Hp 对克拉霉素产生耐药性相关。

关键词 幽门螺杆菌 VacA 基因型 耐药性 克拉霉素耐药

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.02.029

Relevance Analysis of VacA Virulence Gene of Helicobacter pylori and Its Drug Resistance. Lin Dingsai, Xia Lian, Fang Lei. The Second People's Hospital of Cangnan County, Zhejiang 325800, China

Abstract **Objective** To investigate the relationship between the virulence gene polymorphism of *Helicobacter pylori* (Hp) and its drug resistance by culturing Hp isolated from clinical and drug susceptibility test and combining with gene detection methods. **Methods** Gastric mucosa specimens were collected from 120 patients with digestive tract diseases. Hp was cultured and tested for antibiotic susceptibility. The nucleic acid was extracted from Hp positive strains with antibiotic resistance results and the Hp virulence gene VacA s region and m region were detected by PCR. The correlation between the polymorphism of virulence genes and its drug resistance was evaluated by the χ^2 test. **Results** The positive rate was 46.7% in 56 patients with Hp culture. Clarithromycin resistance rate reached 28.6%. Clarithromycin resistance rate was 43.5% in s1/m2 type strains, while in s1/m1 type strains, clarithromycin resistance rate was 18.2%, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** s1/m2 type strains are more prone to clarithromycin resistance than s1/m1 strains, and the gene polymorphism may be related to Hp resistance to clarithromycin.

Key words *Helicobacter pylori*; VacA Gene polymorphism; Drug resistance; Clarithromycin resistance

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是引起胃炎、消化性溃疡、胃黏膜淋巴瘤组织相关性淋巴瘤和胃癌的重要病原体。全球约有一半以上人口感染 Hp, 毒力基因 VacA 是 Hp 致病的重要因素之一。研究表明, VacA 基因存在于所有 Hp 菌株中, 其中 s 和 m 区基因变异较大, 不同亚型组成的嵌合体构成不同的基因菌株, 不同的菌株表达不同的 VacA 表型。Hp 感染的特点, 主要表现在菌株的基因多态性和地区分布差异性上。本研究旨在研究 Hp 毒力基因 VacA 的毒

性状态, 了解 Hp 的 VacA 不同基因型与其抗生素耐药性之间的关系, 以便对 Hp 的致病机制和耐药机制有更加深入的了解和认识。

资料与方法

1. 研究对象: 收集 2015 年 8 月至 12 月苍南县第二人民医院 120 例消化道疾病患者的胃黏膜组织标本。患者或患者监护人同意进行胃镜检查、Hp 分离培养及药敏试验、毒力基因检测, 并签署知情同意书。

2. 样本采集与运输: 胃镜下采集患者的胃黏膜组织。采集部位为胃窦小弯距幽门 3.5cm 及胃体大弯。每个部位平行采取两份标本, 其中一份标本采集后置于含脑心浸液的 Hp 分离培养保存管中用于 Hp 分离培养。另一份标本采集后置于含 TE 的冻存管中, 用于核酸提取和基因检测。标本采用干冰运输, 送至杭州致远医学检验所进行 Hp 分离培养、鉴定及药敏试验。

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2015DTA020, 2015KYB371); 浙江省科技厅公益技术应用研究项目 (2017C33183)

作者单位: 325800 苍南县第二人民医院 (林定赛、夏莲、方蕾、林昌平、李陈宣); 325800 苍南县人民医院 (林朗); 100000 北京, 中国疾病预防控制中心传染病研究所 (张建中)

通讯作者: 张建中, 教授, 博士生导师, 电子邮箱: zhangjianzhong@icdc.cn

3. 菌株分离培养与鉴定:采用巴氏吸管将带有胃黏膜组织吸到研磨器中,充分研磨后,分别等量接种于含 5% 脱纤维绵羊血平板上并均匀涂开。将接种好的平皿置于 37℃ 三气培养箱中(5% 氧气、10% 二氧化碳、85% 氮气),培养 3 ~ 11 天,观察生长情况。可疑菌落经涂片镜检观察,细菌形态符合且尿素酶、氧化酶、过氧化氢酶试验均为阳性的菌株,判定为 Hp 阳性菌株。

4. 抗生素耐药检测:采用琼脂稀释法,对培养阳性的 Hp 菌株进行抗生素耐药性检测。检测的抗生素包括克拉霉素、阿莫西林、呋喃唑酮、甲硝唑、左氧氟沙星及盐酸四环素。本研究所选抗生素的耐药临界点判定标准为:克拉霉素 1μg/ml,阿莫西林 2μg/ml,呋喃唑酮 2μg/ml,甲硝唑 8μg/ml,左氧氟沙星 2μg/ml,盐酸四环素 2μg/ml。

5. VacA 基因扩增与分析:(1) 阳性胃黏膜标本 DNA 提取:依据 Hp 分离培养结果,将保存在 TE 缓冲液中的 Hp 阳性标本采用 PureLink 组织提取试剂盒进行 DNA 提取。(2) Hp 毒力基因检测:根据 NCBI 收录的 Hp 参考序列及文献资料,针对 VacA s 区和 m 区的保守区域设计引物,引物序列见表 1。(3) PCR 体系为 25 μl:其中 10 × PCR Buffer 2. 5μl, dNTPs 2μl,模板 DNA 2μl,上下游引物各 1μl,Taq 酶 0. 5μl, ddH₂O 16μl。扩增程序采用 95℃ 4min;95℃ 30s、60℃ 30s、72℃ 30s,30 个循环;72℃ 5min。(4) VacA 基因分型:所有的 PCR 产物经 1. 5% 琼脂糖凝胶电泳检测条带是否符合预期大小。采用 Sanger 测序的方法对 PCR 产物进行测序。使用软件 DNAMAN6. 0,并对目的序列与参考序列进行比对,确定序列正确无误并依据目的基因的片段大小进行 VacA 基因的分型。

表 1 毒力基因的引物序列

引物名称	序列(5'→3')
VacA - sF	ATGGAAATACAACAAACACAC
VacA - sR	CTGCTTGAATGCGCCAAAC
VacA - mF	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG
VacA - mR	GCGTCTAAATAATTCCAAGG

6. 统计学方法:应用 SPSS 19. 0 统计学软件对数据进行统计分析处理,计数资料组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0. 05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 样本 Hp 阳性率比较:在 120 例入选患者的样本中,有 56 例标本呈现 Hp 阳性,阳性率为 46. 7%。

其中胃体部位有 29 例 Hp 阳性,阳性率为 48. 3%,胃窦部位有 27 例 Hp 阳性,阳性率为 45%,差异无统计学意义($\chi^2 = 0. 134, P > 0. 05$)。

2. Hp 阳性患者抗生素耐药率统计:对 56 例 Hp 阳性样本进行细菌抗生素耐药性检测,其中,克拉霉素耐药菌株 16 例,耐药率为 28. 6%;左氧氟沙星耐药菌株 17 例,耐药率为 30. 4%。甲硝唑耐药菌株达到 38 例,耐药率为 67. 9%;阿莫西林、痢特灵和盐酸四环素总的耐药率均为 0%。不同部位抗生素耐药率比较,差异无统计学意义(克拉霉素: $\chi^2 = 0. 029$,左氧氟沙星: $\chi^2 = 0. 484$,甲硝唑: $\chi^2 = 1. 767, P > 0. 05$)。具体耐药例数见表 2。

表 2 阳性 Hp 标本中抗生素耐药例数

阳性 Hp 样本	克拉霉素	阿莫西林	痢特灵	灭滴灵	左氧	四环素
胃体大弯	8	0	0	22	10	0
胃窦小弯	8	0	0	16	7	0
总计	16	0	0	38	17	0

3. VacA 基因分型:所有菌株的 VacA 基因 s 区均为 s1 型,目的基因片段大小为 259bp。所有菌株的 VacA 基因 m 区分为 m1 型和 m2 型。序列测定结果显示,m1 型的序列长度为 567bp,m2 型的序列长度为 642bp。

4. VacA 基因与抗生素耐药性关系:本研究中,所有 Hp 菌株毒力基因 VacA * s 的基因型均为 s1,因此只有 s1/m1,s1/m2 型两种基因型。分析 VacA 基因型与各抗生素耐药之间的相关性,发现 m 区不同的基因型与克拉霉素耐药之间存在显著相关性($P < 0. 05$)。s1/m2 型的菌株中,克拉霉素耐药菌株占的比例为 43. 5%,而 s1/m1 型的菌株中,克拉霉素耐药率为 18. 2%,差异具有统计学意义($\chi^2 = 4. 25, P < 0. 05$)。因此,s1/m2 型菌株比 s1/m1 型菌株更容易产生克拉霉素耐药性。

讨 论

本研究利用 Hp 分离培养鉴定、PCR 扩增及 Sanger 测序技术调查了苍南地区幽门螺杆菌菌株的 VacA 基因类型与抗生素耐药性之间的关系。本研究结果显示,Hp 阳性菌株占总入选病例的 46. 7%,与国内相关文献报道的结果相似。我国流行病学调查研究显示,自然人群中 Hp 感染率广东省最低 42%,西藏最高 84%,而北京和上海地区分别约为 57% 和 59%^[1]。西方一些国家的感染率较低,在 20% ~ 40% 之间,这种结果的差异可能是由于 Hp 的地区差

异性造成^[2]。本研究中不同部位感染阳性率比较差异无统计学意义,与李彦玮等^[3]的研究结果不一致,这可能是不同地区差异造成。不同部位菌株耐药率也不具有差异,说明菌株耐药性与部位无关,而可能与患者用药史有关^[4]。

一般认为, Hp 对克拉霉素耐药性的产生与 Hp 23S rRNA V 区点突变有关^[5]。最常见的突变为 A2142G 和 A2143G, 突变体导致克拉霉素与核糖体亲和力和降低, 导致克拉霉素无法有效抑制蛋白合成, 造成细菌产生耐药性。温晋锋等^[6] 研究显示, 在克拉霉素耐药组中, 有 71.43% 的菌株存在 A2143G 位点突变, 34.29% 的菌株存在 A2142G 位点突变, 这表明虽然耐药基因位点与克拉霉素耐药存在相关性, 但并不是 100% 相关, 还有另外的机制也可能导致克拉霉素耐药。本研究从毒力基因方面入手, 分析其与克拉霉素耐药之间的相关性。结果显示, 所有的 Hp 菌株其 VacA 基因 s 区均为 s1 型, 而 m 区中, m1、m2 型检出率分别为 58.9%、34.8%。在克拉霉素耐药的 Hp 菌株中, m1 型占 37.5%, 而 m2 型占 62.5%。克拉霉素耐药性更偏向于 m2 型菌株。笔者推测 Hp 毒力基因 VacA 的 m2 型有可能参与对克拉霉素的耐药性。张双红等^[7] 研究也显示, Hp 耐药性的产生可能与 VacA 的基因型有关。

研究表明, VacA 基因存在于所有的菌株中, 但仅在 50% ~ 60% 的菌株表达^[8]。VacA 的 s 区及 m 区是研究较多的两个区域。Atherton 等^[9] 发现 Hp 的 VacA 为一种嵌合体, 任意信号序列 s1a、s1b、s2 和中间区 m1、m2 等位基因组合构成不同亚型, 且 VacA 基因亚型的这种多样性与 VacA 基因功能有关。s1a 引起胃窦黏膜炎性细胞浸润较 s1b 或 s2 更显著 ($P < 0.05$), m1 较 m2 更显著导致胃黏膜损伤 ($P < 0.05$)。田一玲等^[10] 研究表明, 阿莫西林耐药与 VacA s1a 型有关 ($P < 0.05$)。然而, 黄衍强等^[11] 及秦丹等^[12] 研究都认为毒力基因分型与耐药性无关。这种原因可能是因为 VacA 几乎存在于所有菌株, 因此笔者认为不能单纯用基因的检出率来分析耐药性的关系, 而应该根据基因分型来进行判断。

体外实验研究表明, 根据细菌 VacA 基因分型的不同, 其细胞毒性的大小顺序如下 s1/m1 > s1/m2 > s2/m1 > s2/m2。s2/m2 菌株没有细胞毒性。本研究表明, VacA s1/m2 的基因型虽然毒性相对较低, 但更容易获得克拉霉素耐药性; 或者是菌株获得克拉霉素耐药性的毒力更低。塔拉^[13] 的研究显示, 鲍曼不动

杆菌耐药性强的菌株, 其体外侵袭力呈逐渐降低趋势, 耐药性的增加可能与其侵袭力大小呈负相关。这说明在革兰阴性细菌中, 菌株的耐药性与毒力存在一定的关系。据报道, 细菌获得耐药性对其毒力的改变也有重要的影响^[14]。细菌耐药性的产生可能会使其致病力更强。耿健等研究发现, 细菌对 β -内酰胺类抗生素耐药性和毒力之间的关系主要表现在金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌及鲍曼不动杆菌中, 细菌的耐药会使细菌的毒力降低。这种结果进一步说明了细菌的毒性与耐药性之间存在一定的相关性。但是就目前而言, 对 Hp 毒力基因与耐药性之间关系的研究还很少, 还没有相关研究报道。本研究发现苍南地区毒性较低的基因型 Hp 更容易获得克拉霉素耐药性, 但还有待于开展更多研究去证实。

参考文献

- 1 张万岱, 胡伏莲, 萧树东, 等. 中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J]. 现代消化及介入诊疗, 2010, 15(5):265-270
- 2 Souod N, Kargar M, Doosti A, et al. Genetic analysis of cagA and vacA genes in Helicobacter Pylori isolates and their relationship with gastroduodenal diseases in the west of Iran[J]. Iran Red Crescent Med J, 2013, 15(5):371-375
- 3 李彦玮, 于玮, 滕飞, 等. 北京地区 2131 例胃镜活检人群幽门螺杆菌感染分析[J]. 中国临床医学, 2016, 23(1):44-47
- 4 吕凤臣, 赵月霞. 抗幽门螺杆菌用药史与耐药率的相关性分析[J]. 临床内科杂志, 2006, 23(2):124-125
- 5 Kim JM, Kim JS, Kim N, et al. Gene mutations of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance in Helicobacter pylori strains isolated from Korean patients[J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(9):1584-1589
- 6 温晋锋, 陈韶华, 陈春晓. 幽门螺杆菌对克拉霉素的耐药性与 23S rRNA 基因突变相关性分析[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2014, 22(1):69-73
- 7 张双红, 谢勇, 李弼民, 等. 儿童幽门螺杆菌毒力基因与抗生素耐药相关性研究[J]. 临床儿科杂志, 2017, 35(1):59-62
- 8 张亚琼, 章月桃. 幽门螺杆菌的毒力因子分型及与胃肿瘤的相关性分析[J]. 黑龙江医学, 2013, 37(6):501-506
- 9 Atherton J C, Jr P R, Tham K T, et al. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of Helicobacter pylori[J]. Gastroenterology, 1997, 112(1):92-99
- 10 田一玲, 蒋任举, 李华平, 等. 幽门螺杆菌 VacA 基因型与耐药性分析[J]. 重庆医学, 2010, 39(13):1649-1651
- 11 黄衍强, 欧平, 黄赞松, 等. 不同基因型的幽门螺杆菌耐药性分析[J]. 广东医学, 2010, 31(18):2378-2379
- 12 秦丹, 朱莉, 龙梅, 等. 贵阳地区儿童幽门螺杆菌临床分离菌株毒力基因 cagA 和 vacA 的表达情况以及与抗生素耐药之间的关系[J]. 贵州医药, 2015, 39(6):485-488
- 13 塔拉. 不同耐药表型鲍曼不动杆菌毒力及蛋白质组学差异性研究[J]. 内蒙古医科大学, 2015
- 14 Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? [J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(2):185-230

(收稿日期:2017-06-06)

(修回日期:2017-06-21)