

幽门螺杆菌毒力基因与克拉霉素耐药基因突变相关性

章月桃 陈伟燕 朱临江 刘云惠 孟 飞

摘要 目的 分析浙江省台州地区幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, Hp) *cagA* 和 *VacA* 为主的毒力基因型分布,探讨其与克拉霉素耐药基因突变类型的关系。**方法** 招募存在上消化道症状患者,并行胃镜检查活检患者胃黏膜组织。通过 Hp 分离培养方法,培养出 216 株 Hp。采用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测并分析 *cagA* 和 *VacA* 的分型情况。采用 PCR 扩增和 Sanger 测序技术检测克拉霉素耐药基因(23S rRNA)2142 和 2143 位碱基点突变情况。**结果** *CagA* 基因的阳性检出率为 99.54% (215/216),其中 *CagA* - D 为 95.83% (207/216)、*CagA* - C 为 3.70% (8/216)。*VacA* 基因阳性检出率为 97.22% (210/216), *s1*、*s2*、*m1*、*m2* 亚型分别为 97.22% (210/216)、0、35.19% (76/216)、60.65% (131/216)。本研究发现,浙江省台州地区毒力基因以 *CagA* - D 和 *VacAs1m2* 型为优势基因型。此外,23S rRNA 基因 2142 和 2143 位点均未突变的有 93 株。突变的有 123 株,其中 A2142G 位点突变 4 株、A2143G 位点突变 119 株。毒力基因型与 23S rRNA 基因 2142 和 2143 位点突变类型无相关性($P > 0.05$)。**结论** 台州地区为 HP 高毒力地区,且以 *CagA* - D 和 *VacAs1m2* 型为主,其分布与克拉霉素耐药基因突变无密切相关性。

关键词 幽门螺杆菌 毒力基因 克拉霉素耐药基因

中图分类号 R4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.06.019

Relationship between Virulence Genes of Helicobacter Pylori and Gene Mutation Associated with Clarithromycin Resistance. Zhang Yuetao, Chen Weiyang, Zhu Linjiang, et al. Taizhou Central Hospital, Zhejiang 318000, China

Abstract Objective To analyze the distributions of virulence genes *cagA* and *VacA* from *helicobacter pylori* (Hp) and to study the relationship between virulence genotype and gene mutation associated with clarithromycin resistance. **Methods** A total of 216 Hp were isolated from gastric mucosal tissue in patients with upper gastrointestinal symptoms. The *cagA* and *VacA* genotypes were detected and analyzed by polymerase chain reaction (PCR). The mutations at positions 2142 and 2143 of clarithromycin resistance gene (23S rRNA) were detected by PCR and Sanger sequencing. **Results** The positive rate of *CagA* gene was 99.54% (215/216), of which *CagA* - D was 95.83% (207/216) and *CagA* - C was 3.70% (8/216). The positive rate of *VacA* gene was 97.22% (210/216), and the *s1*, *s2*, *m1*, and *m2* subtypes were 97.22% (210/216), 0, 35.19% (76/216) and 60.65% (131/216), respectively. In this study, *CagA* - D and *VacAs1m2* were dominant genotypes in Taizhou region. Additionally, there were 93 Hp strains which were not mutated in 2142 and 2143 gene loci of 23S rRNA. There were 123 Hp mutants, of which 4 strains were A2142G mutations and 119 strains were A2143G mutations. There were no relationship between virulence genotype and 2142 and 2143 gene loci of 23S rRNA mutation types ($P > 0.05$). **Conclusion** Taizhou is a region with high Hp toxicity and is mainly in *CagA* - D and *VacAs1m2*. The distribution of the Hp toxicity is not closely related to the clarithromycin - resistance gene mutation.

Key words *Helicobacter pylori*; Virulence genes; Clarithromycin resistance gene

幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, Hp)是引发多种胃肠道疾病的重要危险因素^[1]。目前,全球约一半自然人群存在 Hp 感染,我国流行病学调查显示 Hp 感染率高达 40% ~ 60%^[2,3]。近年来, Hp 根除率逐年

下降,即使经验四联疗法,在某些高耐药地区也低于 80%。Hp 菌株毒力因子和 Hp 抗生素耐药性是导致根除治疗失败的两个重要原因,尤其是对克拉霉素产生耐药^[4-7]。目前, Hp 毒力因子研究的热点主要集中在细胞毒相关蛋白 A (cytotoxin associated gene A, *CagA*) 和空泡毒素 A (vacuolating toxin gene A, *VacA*)。23S rRNA 基因 V 区域的点突变是导致克拉霉素耐药的主要原因,点突变主要集中在 2142、2143 腺嘌呤(A)到鸟嘌呤(G)突变和 2142 腺嘌呤(A)到胞

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2018KY908);浙江省科技厅公益技术应用研究项目(2016C33232、2017C33192)

作者单位:318000 台州中心医院(章月桃、陈伟燕、朱临江); 310030 杭州致远医学检验所有限公司(刘云惠、孟飞)

通讯作者:孟飞,电子信箱:jz0428@126.com

嘧啶(C)^[8-10]。有关Hp毒性与耐药基因突变的关联分析并不多见。本研究通过采用PCR法检测Hp cagA和VacA基因和23S rRNA基因突变情况,探究Hp毒力基因与克拉霉素耐药性和23S rRNA基因突变类型的关系。

对象与方法

1. 研究对象:选取2016年11月~2017年11月因上消化道症状来笔者医院就诊并且行胃镜检查的患者。每位患者取一块胃窦黏膜组织进行Hp分离培养,选取Hp分离培养后216例菌株作为研究对象。

2. 研究方法:(1)Hp的分离培养鉴定:将胃黏膜组织充分研磨均匀后接种于含哥伦比亚血琼脂培养基上,置于含37℃三气培养箱(5% O₂、10% CO₂和85% N₂)中培养3天。可疑菌落通过涂片镜检初步判断,尿素酶、氧化酶和过氧化氢酶生化反应均为阳性的判定为Hp阳性。刮取长势较好的Hp阳性菌株于90%的生理盐水中,震荡混匀,调节菌液浓度至0.5麦氏,用于Hp基因组提取;(2)Hp基因组提取:采用PureLink™ Pro 96 Genomic DNA Purification Kit(美国Invitrogen公司),按照说明书步骤进行Hp基因组提取。(3)毒力基因和克拉霉素耐药基因检测:根据相关文献设计CagA、VacA和23S rRNA基因片段引物[生工生物工程(上海)股份有限公司],具体序列见表1。以提取的Hp基因组DNA为模板分别PCR扩增CagA、VacA和23S rRNA基因片段。具体PCR扩增体积为25μl,具体为:Hp基因组DNA 2μl,上下游引物各0.5μl,2×PCR Mix 12.5μl[天根生化科技(北京)有限公司],ddH₂O 10.5μl。PCR扩增条件为:94℃预变性5min;94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸30s,(35个循环);72℃延伸10min。PCR产物经1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测后进行Sanger

测序[生工生物工程(上海)股份有限公司]。毒力基因分型通过琼脂糖凝胶电泳后各产物片段大小进行区分。克拉霉素耐药基因判定通过Sanger测序后2142和2143位碱基突变进行判定。

3. 统计学方法:采用SPSS 19.0统计学软件进行统计分析,分析方法为χ²检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. 克拉霉素耐药情况统计:216株Hp均成功扩增出23S rRNA基因片段,使用DNAMAN软件与NCBI上标准序列比对。23S rRNA基因2142和2143位点均未突变的有93株。突变的有123株,其中A2142G突变的有4株、A2143G突变的有119株(图1)。

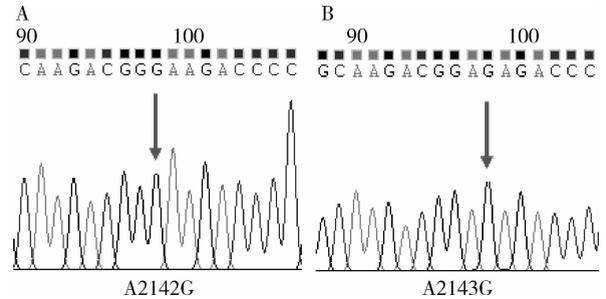


图1 克拉霉素耐药基因23S rRNA 2142和2143位碱基突变
A. A2142G; B. A2143G

2. 毒力基因分型情况:216株Hp成功扩增CagA基因215株,阳性检出率为99.54%,其中东亚型(CagA-D)207株、西亚型(CagA-C)8株,CagA-D为优势基因型。另外,成功扩增VacA基因210株,阳性检出率为97.22%,其中s1、s2、m1、m2亚型分别有210、0、76、131株。VacAs1m1 76株和VacAs1m2 131株,VacAs1m2为优势基因型,各亚型及其组合的检出率具体见表2。

表1 Hp毒力基因和克拉霉素耐药基因引物

引物名称	引物序列(5'→3')	片段大小(kb)
23S rRNA - F	ATGAATGGCGTAACGAGATG	360
23S rRNA - R	ACACTCAACTTCCGATTTC	
cagA - CR	CCGAGATCATCAATCGTAG	380
cagA - F	CCTAGTCGGTAATGGGTTAT	
cagA - DR	TGCTTGATTTGCCTCATC	396
VacA - sF	ATGGAAATACAACAACACAC	s1;259/s2;286
VacA - sR	CTGCTGAATGCGCCAAAC	
VacA - mF	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	m1;567/m2;642
VacA - mR	GCGTCTAAATAATTCCAAGG	

表2 毒力基因分型及阳性检出率统计

基因	株数	阳性率(%)
CagA - C	8	3.70
CagA - D	207	95.83
VacAs1	210	97.22
VacAm1	76	35.19
VacAm2	131	60.65
VacAs1m1	76	35.19
VacAs1m2	131	60.65

3. 毒力基因型与克拉霉素耐药基因突变相关

性:使用轭相关比较毒力基因型与 23S rRNA 基因 2142 和 2143 位点不同突变类型差异,差异无统计学意义($P < 0.05$)。其中毒力基因 CagA 基因型分布与 23S rRNA 基因突变的呈正相关,但差异无统计学意义($r = 0.053, P = 0.441$)。毒力基因 VacA 基因型分布也与 23S rRNA 基因突变呈正相关,但差异无统计学意义($r = 0.024, P = 0.729$)。这表明毒力基因型与克拉霉素耐药基因突变类型无关。

讨 论

Hp 在胃肠道定植后的感染致病机制十分复杂,其中由毒力基因编码产生的毒素是主要的影响因素之一,其可以破坏胃肠道黏膜屏障^[11-13]。同时,毒力基因也是影响临床 Hp 根除治疗效果的重要影响因素之一。研究发现, Hp 毒力基因型与感染后的疾病类型及转归、Hp 耐药性密切相关,毒力因子的不同组合的致病性也大不相同^[14]。CagA 和 VacA 是当前研究最热的毒力因子^[15]。CagA 基因编码 CagA 蛋白,可作为 Hp 毒力强弱的标志。CagA 有东亚型(CagA-D)和西亚型(CagA-C)两个亚型。CagA-D 主要分布在亚洲,与胃萎缩和胃癌强烈相关,CagA-C 主要分布在美国和欧洲^[16]。本研究中台州地区分离培养的 216 株 Hp 中 CagA 检出率为 99.54%,其中东亚型占 95.83%,西亚型只占 3.70%,提示台州地区 Hp 毒力较强, Hp 感染患者胃萎缩和胃炎的发生率较高。VacA 基因编码的 VacA 蛋白能通过诱导膜通道形成和线粒体中细胞色素 C 释放,从而引发细胞凋亡和炎症因子释放。VacA 基因主要有 s 和 m 两个可变区,每个可变区有两个等位基因。前人研究发现, VacAs1m1 菌株细胞毒性最强, VacAs1m2 的中等毒性,而 VacAs2m2 菌株无细胞毒性, VacAs2m1 菌株极为少见^[17]。本研究中 VacA 的检出率为 97.22%,未检出 VacAs2 型,各亚型组合中 VacAs1m2 占 60.65% 高于其他组(VacAs1m1 35.19%),本研究结果与林朗等^[18]在浙江地区的研究一致。

抗生素耐药性不断增加是 Hp 根除治疗失败的主要原因。目前耐药产生的研究多集中于抗生素耐药性与毒力基因的相关性,但国内外尚未有定论。多项研究表明, Hp 毒力基因型与克拉霉素耐药性不相关,但巴西的一项研究发现两者具有相关性^[19,20]。本研究中 216 株 Hp 中克拉霉素耐药基因 23S rRNA 基因突变的有 123 例,其中 A2143G 突变的占 96.75%, A2142G 突变的占 3.25%,但 CagA 和 VacA 不同分型均与 23S rRNA 突变类型无关。

综上所述,浙江省台州地区 Hp 菌株毒力基因的优势型为 CagA-D 和 VacAs1m2,毒力基因 CagA 和 VacA 与克拉霉素耐药基因 23S rRNA 突变无相关性。但考虑到毒力基因的区域和人群等差异性,还需大量不同样本研究两者的关系,为 Hp 防治提供理论依据。

参考文献

- 1 Diaconu S, Predescu A, Moldoveanu A, *et al.* Helicobacter pylori infection: old and new[J]. J Med Life, 2017,10(2):112-117
- 2 Herrera AG. Helicobacter pylori and food products: a public health problem[J]. Methods Mol Biol, 2004,268:297-301
- 3 刘文忠, 谢勇, 陆红等. 第五次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告[J]. 胃肠病学, 2017, 22(6):346-360
- 4 BAA Talebi, MA Mohabbati. High prevalence of helicobacter pylori hopQ II genotype isolated from Iranian patients with gastroduodenal disorders[J]. J Pathogens, 2016, 2014(2014):842469
- 5 Kim SY, Choi DJ, Chung JW. Antibiotic treatment for Helicobacter pylori: is the end coming? [J]. World J Gastrointest Pharmacol Ther, 2015, 6(4):183-198
- 6 Malfertheiner P, Megraud F, O'morain CA, *et al.* Management of helicobacter pylori infection—the Maastricht IV/florence consensus report[J]. Gut,2012,61(5):646-664
- 7 杨宁敏, 孟飞, 徐书华, 等. 基于浙江省幽门螺杆菌耐药监测大数据下的根除治疗对策研究[J]. 中华消化内镜杂志, 2016,33(11):738-742
- 8 Eghbali Z, Mojtahedi A, Moien A M, *et al.* Detection of 23SrRNA mutations strongly related to clarithromycin resistance in helicobacter pylori strains isolated from patients in the North of Iran[J]. Jundishapur J Microbiol, 2016,9(2):e29694
- 9 Suzuki RB, Lopes RA, Da CLG, *et al.* Low Helicobacter pylori primary resistance to clarithromycin in gastric biopsy specimens from dyspeptic patients of a city in the interior of Sao Paulo, Brazil[J]. BMC Gastroenterology,2013,13(1):164
- 10 Boyanova L, Markovska R, Yordanov D, *et al.* Clarithromycin resistance mutations in helicobacter pylori in association with virulence factors and antibiotic susceptibility of the strains [J]. Microb Drug Resist, 2016,22(3):227-232
- 11 林定赛, 夏莲, 方蕾, 等. 幽门螺杆菌 VacA 基因型与耐药性相关性研究[J]. 医学研究杂志, 2018, 47(2):124-126
- 12 刘丽娜, 陈庆明. 不同消化性疾病患者幽门螺杆菌毒力基因类型及意义研究[J] 国际检验医学杂志, 2017, 38(15):2085-2087
- 13 范聪聪, 王丽波, 江海洋, 等. 长春地区幽门螺杆菌 cagA 基因及 EPIYA 基序多态性分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, 37(6):431-437
- 14 Shiota S, Suzuki R, Yamaoka Y. The significance of virulence factors in Helicobacter pylori[J]. J Dig Dis, 2013,14(7):341-349
- 15 江海洋, 王丽波, 范聪聪, 等. 幽门螺杆菌毒力基因 cagA, vacA 和 iceA 与胃十二指肠疾病的关系[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(3):256-260

(下转第 143 页)

率高于 50% ,但在亚洲人种中则低于 5%^[15,16]。最近有研究显示,梅毒螺旋体菌株的感染有可能导致神经梅毒的产生^[17]。尽管本研究无法评估梅毒螺旋体的菌株类型,但笔者希望接下来会有进一步研究解决 IL-10 的 SNP、梅毒螺旋体的菌株类型和神经梅毒之间的相关性的问题。目前,CSF-VDRL 阳性检测结果诊断神经梅毒是特异性的。然而,临床诊断患者的 CSF-VDRL 检测敏感度为 30%~70%。因此,根据最近的 STD 病例定义,我们将脑脊液细胞增多症(≥ 5 cells/ μ l)和 CSF 蛋白质浓度增加(≥ 45 mg/dl)也纳入了神经梅毒组。

综上所述,通过本研究可以看出,抗炎免疫反应在神经梅毒发病机制中可能具有重要作用。与宿主有关的因子,如免疫调节基因的 SNPs 可能影响神经梅毒的易感性。IL-10 基因启动子区的多态性与神经梅毒发病风险相关,携带 -592C 和 -1082G 等位基因的患神经梅毒的风险更高,脑脊液中 IL-10 水平也更高。然而,为了证实笔者的结论并进一步评估 IL-10 在神经梅毒发病机制中的作用,需要进一步扩大样本量并开展深入的研究。

参考文献

- 1 孙洪清,肖宏,沈芳,等. 重视艾滋病合并梅毒疾病[J]. 医学研究杂志,2014,43(5):1-3
- 2 Pastuszcak M, Jakiela B, Wielowieyska-Szybinska D, et al. Elevated cerebrospinal fluid interleukin-17A and interferon- γ levels in early asymptomatic neurosyphilis[J]. Sexually Transmitted Dis, 2013, 40(10):808-812
- 3 Kelly H, Adriana C, Jorge C, et al. Human macrophage polarization enhances opsonophagocytosis and inflammatory response of the stealth pathogen, *Treponema pallidum* [J]. Front in Immunol, 2015, 6(15):214-219
- 4 Matsumoto M, Baba A, Yokota T, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation [J]. Immunity, 2014, 41(6):1040-1051
- 5 林丽萍,陈丽娜,徐超,等. 匹多莫德口服液对二期梅毒外周血调节性 T 淋巴细胞和 Th1/Th2 细胞因子的影响[J]. 现代实用医学, 2016, 28(5):671-672

- 6 Li K, Wang C, Lu H, et al. Regulatory T cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid of syphilis patients with and without neurological involvement[J]. PLoS Neglect Tropic Dis, 2013, 7(11):e2528
- 7 Alasmay SM, Kadasah S, Arfin M, et al. Genetic variants of interleukin-10 gene promoter are associated with schizophrenia in Saudi patients: a case-control study [J]. North Am J Med Sciences, 2014, 6(11):558-565
- 8 Meenakshi P, Ramya S, Shruthi T, et al. Association of IL-1 β +3954 C/T and IL-10 -1082 G/A cytokine gene polymorphisms with susceptibility to tuberculosis. [J]. Scandinavian J Immunol, 2013, 78(1):92-97
- 9 Workowski K A, Berman S. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. [J]. Curr Opin Pediatr, 2011, 58(1):67-68
- 10 Pastuszcak M, Jakiela B, Jaworek AK, et al. Association of Interleukin-10 promoter polymorphisms with neurosyphilis [J]. Human Immunol, 2015, 76(7):469-472
- 11 He WQ, Wang HL, Zhong DQ, et al. Treponemal antibody in CSF and cellular immunity in peripheral blood of syphilitic patients with persisting positive rapid plasma regain [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5):5775-5780
- 12 Meenakshi P, Ramya S, Shruthi T, et al. Association of IL-1 +3954 C/T and IL-10 -1082 G/A cytokine gene polymorphisms with susceptibility to tuberculosis [J]. Scandinavian J Immunol, 2013, 78(1):92-97
- 13 Ramasari SS, Hanumanth SR, Nagaraju RT, et al. IL-10 high producing genotype predisposes HIV infected individuals to TB infection [J]. Human Immunol, 2012, 73(6):605-611
- 14 Yang H, Wang F, Dong Z, et al. Balance between regulatory T cells and T helper 17 cells in peripheral blood of patients with serofast syphilis [J]. Chongqing Med, 2013, 42(27):3209-3210
- 15 Crena J, Subramanian S, Victor D J, et al. Single nucleotide polymorphism at ? 1087 locus of interleukin-10 gene promoter is associated with severe chronic periodontitis in nonsmoking patients [J]. Eur J Dentist, 2015, 9(3):387-393
- 16 Ma DH, Xu QY, Liu Y, et al. Association between interleukin-10 gene polymorphisms and susceptibility to diabetic nephropathy in a Chinese population [J]. Genet Mol Res GMR, 2016, 15(2):294-301
- 17 Saladorasmussen K, Cowan S, Gerstoft J, et al. Molecular typing of *treponema pallidum* in Denmark: a nationwide study of syphilis [J]. Acta Dermato-venereol, 2016, 96(2):202-206

(收稿日期:2017-08-07)
(修回日期:2017-08-31)

(上接第 84 页)

- 16 Li Q, Liu J, Gong Y, et al. Association of CagA EPIYA-D or EPIYA-C phosphorylation sites with peptic ulcer and gastric cancer risks: a meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(17):e6620
- 17 Fahimi F, Tohidkia MR, Fouladi M, et al. Pleiotropic cytotoxicity of VacA toxin in host cells and its impact on immunotherapy [J]. Bioimpacts Bi, 2017, 7(1):59-71
- 18 林朗,杨恩,张红河,等. 浙江省幽门螺杆菌 cagA、vacA 基因型的流行病学研究 [J]. 医学研究杂志, 2008, 39(6):94-96

- 19 Kyrillos A, Arora G, Murray B, et al. The presence of phage orthologous genes in *helicobacter pylori* correlates with the presence of the virulence factors CagA and VacA [J]. Helicobacter, 2016, 21(3):226-233
- 20 Garcia GT, Aranda KR, Gonçalves ME, et al. High prevalence of clarithromycin resistance and cagA, vacA, iceA2, and babA2 genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian children [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11):4266-4268

(收稿日期:2018-04-14)
(修回日期:2018-04-24)