

# 不同人群幽门螺杆菌表型分型研究

陈晶晶<sup>1</sup> 张建中<sup>1</sup> 蒋秀高<sup>1</sup> 杨昭徐<sup>2</sup> 梁丕霞<sup>2</sup>

**摘要** 作者报道了从各型胃病患者胃粘膜中分离的 112 株幽门螺杆菌,用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及 Western blots 分析,可将 HP 菌分为 I-IV 型,而其中 IV 型又分为 IV-1 至 IV-5 五个亚型;不同 HP 间存在明显的蛋白抗原差异和 LPS/LOS 的表达差异;为今后开展 HP 疫苗研究提供了重要线索。

**关键词** 幽门螺杆菌 菌型 SDS-PAGE 分析

**Typing of H. pylori Strains Isolated from Patients with Gastric Diseases** Chen Jing-jing, Zhang Jian-zhong, Jiang Xiu-gao, et al. Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

**Abstract** Helicobacter pylori, an organism recently described in association with gastritis and peptic lesions. The degree of relationship between these micro-organisms was studied on molecular level using SDS-PAGE protein profiles and immunoblot patterns. Study on a total of 112 lysates of H. pylori showed some differences in protein patterns of different H. pylori strains. However, the difference became more apparent when studied by immunoblot analysis. According to SDS-PAGE protein, strains isolated from gastric mucous of the patients were identified as types I-IV, while type IV can be further classified as sub-type IV-1 to IV-5 analysis of SDS-PAGE protein patterns proved to be an excellent method of characterizing those H. pylori, different from traditional methods.

**Key words** Helicobacter pylori Typing SDS-PAGE

幽门螺杆菌 (Helicobacter Pylori, H. pylori) 是从胃组织中分离的一种致病菌,众所周知,胃炎和消化性溃疡是常见病、多发病,长期以来其病因不明,1983 年 Warren 和 Marshall<sup>[1]</sup> 首先从患胃炎和消化性溃疡的病人胃组织中发现并分离到 HP,经过研究他们认为胃炎或消化性溃疡的发生与 H. pylori 的感染密切相关,从而引起世界各国学者的重视。综合近年来国内外学者的大量研究资料主要有以下进展:①从患胃炎或消化性溃疡的病人胃粘膜中 HP 感染的阳性率甚高(70%~90%);②志愿者口服 HP 菌液后可

出现上腹部疼痛和消化不良等症状,胃镜检查胃粘膜有炎症糜烂;③胃病患者经过合适的治疗,将 HP 清除,症状就消失,若是复发,又可检出 HP;④动物感染获得成功。我们通过几年的工作,也获得了相同的结果(第②项未做)。

我们在工作中发现,从各种胃病患者胃粘膜中分离到的 HP,尽管其形态和某些生物学性状相同,但是它们的菌体蛋白做电泳分析发现,其图谱出现“大同”中存在“小异”的几种类型,我们注意到有人报道,同是 HP,其动力和毒力的强弱存在差异<sup>[2]</sup>,同时有些菌株能产生细胞毒素,有些菌株则不产生<sup>[3]</sup>,Prewet<sup>[4]</sup> 报道从不同病人分离的 HP,其 DNA 基因图谱并不一致。

基于以上事实,我们提出如下假说:HP 不是单一的菌型,而是通过某些方法可以区

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 北京 102206

2 首都医科大学附属天坛医院消化内科

\* 本课题受国家自然科学基金资助

别若干种不同的菌型,其毒力和致病力各不相同。通过我们的几年工作,得到如下结果,现报道如下。

### 材料与方 法

1. 菌株鉴定:自 1993~1995 年共采集临床各型胃病患者的胃粘膜标本 3 451 份,在微氧条件下进行了 HP 分离,阳性率为 13.7%。对 474 株 HP 进行了系统鉴定。氧化酶、过氧化氢酶、尿素酶均为阳性,葡萄糖发酵、硝酸盐还原及 3.5% NaCl 反应均为阴性。选取其中背景资料较为完整的 110 株、数株山东分离菌株及近 20 株国外菌株,接种于含 6% 脱脂绵羊血的布氏琼脂平皿,于混合气体(5% CO<sub>2</sub>、10% O<sub>2</sub> 和 85% N<sub>2</sub>)环境中,37℃ 培养 72 小时后收菌,比浊为 10<sup>10</sup>cfu/ml 浓度的菌液,加等量 2X 样品缓冲液,100℃ 水浴 5 分钟后,进行 SDS-PAGE 分析。

2. SDS-PAGE 分析<sup>[5]</sup>:采用 5% 浓缩胶,11% 分离胶,电泳采用 50V 恒压 16 小时,电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸系统,凝胶经考马斯亮兰染色满意后,在 EAGLE EYE II 读胶仪上照相。

3. 免疫印迹分析<sup>[5]</sup>(Western blots):将各 HP 菌株样品,经 SDS-PAGE 后,采用 80mA,恒压 6 小时将抗原转移至硝酸纤维膜(NC 膜)上,将转膜后的 NC 膜放入 5% 的脱脂奶粉中封闭过夜;用 TBS-T 洗涤 NC 膜

三次,每次 10 分钟;每株菌 NC 膜分别加适当稀释的免疫血清,室温下震荡 2 小时,以 SPA-HRP 处理,4-氯-1-萘酚显色,然后将 NC 膜置蒸馏水中终止反应,用 EAGLE EYE II 读胶仪照相。

### 结 果

1. HP 的 SDS-PAGE 类型表型:从 112 株分析用 HP 的 SDS-PAGE 图谱中,各菌间均可找到明显的蛋白条带差异,其中除 30kd 和 66kd 等数条 HP 特征条带外,HP 蛋白表型菌株间变化较大。综合 112 株菌的共同条带特征,按 HP 的 11 种主要蛋白成分存在与否,将 HP 分为 I-IV 型,而其中 IV 型又分为 IV-1 至 IV-5 五个亚型(附表)。虽然各型间不同疾病来源细菌比例有一定差异,但尚未发现明显规律性存在。

2. HP 的 Western blots 分析:通过对 112 株 HP 的 Western blots 分析,初步观察到以下有重要意义的结果:①不同 HP 间存在明显的蛋白抗原差异。②多数 HP 菌株含有脂寡糖(LOS)成分,且其抗原性至少可分为两个类型。③HP 的 LOS 成分与脂多糖(LPS)成分间可存在明显抗原交叉性。④LPS 的表达在国内外 HP 菌株间差异明显,英国爱尔兰分离菌株近半数表达丰富的 LPS,而国内 HP 只有少数表达 LPS,为今后开展 HP 疫苗研究提供了重要线索。

附表 112 株幽门螺杆菌 SDS-PAGE 分型分析

型	亚型	分 型 标 志																	菌株数量(%)
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	
I		0	0	0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	7 (6.25)
II		0	1	0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	19 (16.96)
III		1	0	0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	2 (1.78)
IV	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37 (33.03)
	2	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	11 (9.82)
	3	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	9 (8.03)
	4	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	8 (7.14)
	5	1	0	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	19 (16.96)

### 讨 论

从不同人群中分离的 HP 菌表型分型研

究结果表明,不同 HP 菌株之间存在着差异,我国人群感染的 HP 菌主要可分为 I-IV 型,其中多数为 IV-1 型,文献中报道,产空泡细

胞毒素的菌株(VacA, 87KD 蛋白)和细胞毒素相关蛋白(CagA 蛋白是一种 120-128KD 蛋白),它能使哺乳类的细胞系产生空泡,这一类的 HP 毒性较高,在临床上可造成严重的胃十二指肠溃疡<sup>[6,7]</sup>、胃癌<sup>[8]</sup>,因此,根据菌型的不同,可以表现为某种菌型可能与胃癌的发生密切相关,另一种菌型的感染则可导致溃疡病的发生和发展,甚至引起胃癌的发生,但是有的菌型其致病力则较低,可不引发病变。所以在少数健康人胃粘膜中可分离出幽门螺杆菌。至于各型菌株与疾病的关系,还需进一步研究。

参 考 文 献

1 J Robin Warren, Barry Marshall. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet, 1983, 1:1273.  
 2 Kathryn A Eaton, donna R. Morgan. Campylobacter pylori virulence Factors in Gnotobiotic Piglets. Infect Immun, 1989, 57:1119.  
 3 RD Leunk, PT J Johnson, BC David, et al. Cytotoxic activity

in broth-culture filtrates of Campylobacter pylori. J Med Microbial, 1988, 26:93.  
 4 EJ Prewett, J bickley, RJ Owen, et al. Helicobacter pylori DNA Patterns in bacteria isolated from Gastric Antrum, Body and duodenum. Gastenterology, 1991, 100(5), part 2 A608.  
 5 金灵, 苏新. Biotin-avidin 免疫转移技术. 生物化学与生物物理学进展, 1989, 16:148.  
 6 Xiang ZY, Censini S, Bayeli PF, et al. Analysis of expression of CagA and VacA Virulence factors in 43 strains of Helicobacter pylori reveals that clinical isalates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacualating cytotoxin. Infect Immun, 1995, 63:94.  
 7 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. Proc Natl Acad Sci. USA, 1993 Jun 15; 90: 5791.  
 8 Crabtree J, Wyatt J, Sobala G, et al. Systemic and mucosal humoral responses to Helicobacter pylori in gastric cancer. Gut, 1993, 34:1339.

(收稿:1997-07-09)

北方农村 11 436 名儿童龋蚀状况分析

刘文珠<sup>1</sup> 刘英群<sup>2</sup> 孙领娣<sup>2</sup>

我们于 1994 年至 1996 年初对黑龙江省巴彦等县的农村幼儿园儿童和散居儿童共 11 436 名进行了牙齿龋蚀状况的调查,并将资料与日本、前苏联及上海的儿童资料作以比较,报告如下。

调查人数 11 436 人,男 6 023 人,女 5 413 人,年龄 1~6 岁,平均 3.867 ± 1.633 岁。由固定人员作口腔检查并记录,按国际标准分为釉质龋、牙本质浅龋、牙本质深龋、残冠、残根。本调查 11 436 名学龄前儿童患龋率为 72.82%,男 73.40%,女 72.23%,

两者间差异无显著性( $u = 1.199, P > 0.05$ )。男女儿童龋均情况以受检者计算  $dft = 4.24 \pm 4.30$ ,其中男  $4.34 \pm 4.37$ ,女  $4.11 \pm 4.22$ ,两者差异有显著性( $t = 2.785, P < 0.01$ )。以患龋者计算  $dft = 4.03 \pm 3.78$ ,男  $5.92 \pm 4.09$ ,女  $5.68 \pm 3.96$ ,两者间差异有显著性( $t = 2.583, P < 0.01$ )。本组儿童的发病率为 57.80%,低于日本儿童(62.04%),高于前苏联儿童(25.73%),与上海儿童(58.06%)相近。本组发病率和龋均数高于中国卫生部 1982~1984 年全国抽样调查结果(58.48%,  $dft$  为 2.16)。说明近十年农村部分地区儿童龋病的发病呈上升趋势。

(收稿:1997-05-21 修回:1997-06-11)

1 黑龙江省哈尔滨医科大学 150001  
 2 黑龙江省哈尔滨医科大学第一附属医院