

104 株幽门螺杆菌插入序列 IS605、IS606 的分布

张茂俊 张建中 何利华 郭浩岩 尹焱 周增芬

【摘要】 目的 筛查中国 5 地区幽门螺杆菌(*Hp*)插入序列 IS605、IS606 的分布。方法 选取来自北京、福建、云南、沈阳、香港等地共 104 株 *Hp*, 用 PCR 及染色体打点杂交的方法筛查 IS605、IS606 的分布, 并对其分布特点进行分析。结果 中国 5 地区 *Hp* 菌株 IS605 的阳性率为 40%, IS606 的阳性率为 18%。云南菌株 IS605 的阳性率有高于其他地区的趋势, 不同地区 IS606 的分布差异无显著性。不同临床诊断结果分离的菌株 IS605、IS606 的分布差异无显著性。IS605 的两个开码读框 ORFA、ORFB 共存。结论 中国 5 地区 *Hp* 菌株广泛存在 IS605、IS606, 且 IS605 的分布可能与菌株分离个体的地理位置有关。

【关键词】 幽门螺杆菌; 插入序列

Dissemination of insertion sequences IS605, IS606 among clinical isolates of *Helicobacter pylori* in China
ZHANG Maojun*, ZHANG Jianzhong, HE Lihua, GUO Haoyan, YIN Yan, ZHOU Zengfen. *Institute for Infectious Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Preventive, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective To study the distribution of IS605, IS606 among clinical isolates of *Helicobacter pylori* in China. **Methods** A total of 104 *H. pylori* strains isolated from 5 different geographic regions in China were analyzed by PCR and dot-blot. **Results** Forty-two strains out of the 104 isolates from 5 regions in China were found containing IS605 with 19 containing IS606. The frequency (66%) of IS605 positive strains from Yunnan province was higher than that from other areas. The different distribution of IS606 was neither associated with geographical regions nor with the presence of IS605 but IS606 were associated with the different clinical outcomes. However, the two reading frames ORFA and ORFB of IS605 were constantly coexisting. **Conclusion** In China, IS605 and IS606 of *H. pylori* were widely existing but the present of IS605 in *H. pylori* might be associated with geographic origin.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; Insertion sequences

插入序列(insertion sequence, IS)是染色体特殊的组成部分, 可从染色体基因组上的一个位置转移到另一个位置, 甚至可在不同的染色体之间跳跃。IS 可以调节耐药基因及毒力决定因子在菌种间及菌种内的传播。同时, 在分子流行病学研究工作中 IS 可作为一种基因标志, 用来追踪病原体的进化及其在宿主中的传播。为填补中国幽门螺杆菌(*Hp*) IS 研究的空白, 本研究选取来自北京、福建、云南、

沈阳、香港等地背景清楚的 104 株 *Hp*, 通过 PCR 及染色体打点杂交的方法, 以国际菌株 J99、26695 作对照, 筛查了 IS605、IS606 的分布, 并对不同地区, 不同临床症状的分离个体 IS 分布的差异进行分析, 以阐明中国菌株 *Hp* 的 IS 分布特征。

材料与方法

一、材料

1. 菌株: 所用 *Hp* 菌株由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所腹泻室(中国 *Hp* 全国科研协作组菌株库)分离保存, 国际菌株 26695、J99 由美国华盛顿大学 Douglas 教授赠送。

2. 主要生化试剂、工具酶、试剂盒: 酵母粉、胰蛋白酶为 Oxiod 公司产品, 其余生化试剂均为国产分析纯试剂。Taq DNA 聚合酶购自华美生物工程公

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870032); 国家高技术研究发展计划“863”计划资助项目(2001AA21516102)

作者单位: 102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所腹泻室(张茂俊、张建中、何利华、郭浩岩、尹焱); 昆明医学院第一附属医院消化科(周增芬)

通讯作者: 张建中, E-mail: helico@public.bta.net.cn

司。PCR Clean Up Kit 为美国 Promega 公司产品、地高辛(digoxigenin-dUTP)DNA 标记及检测试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品。

二、方法

1. Hp DNA 的提取 :将培养 3 d 的 Hp 菌刮入盛有 0.5 ml STE 的 1.5 ml 微量离心管中 ,10 000 r/min ,离心 30 s ,弃上清 ;加入 500 μl TE 将细菌重悬 ,加入 10% SDS 80 μl ,68℃ 水浴 10 min ;用等量酚、酚:氯仿、氯仿 ,各抽提 1 次 ;加入等体积冷异丙醇及 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠 , - 20℃ 沉淀 30 min ;用 75% 乙醇洗涤 2 次 ,室温晾干 ,溶于 500 μl TE (pH 8.0) 中 , - 20℃ 冻存。

2. PCR 引物合成 :参考国外已发表的 Hp 的 IS605 基因序列 ,比较其核苷酸序列的同源性 ,找到其结构基因(opening reading frame ,ORF)ORFA 内相对保守的序列 ,在其内部第 37 bp 和 384 bp 处 ,扩增 IS605 的 ORFA 上下游引物分别为 :上游 5' - CGCCTTGATCGTTTCAGGATTAGC-3' ;下游 :5' - CAACCAACCGAAGCAAGCATAATC -3' 。在 ORFB 内部第 68 bp 和 709 bp 处 ,扩增 IS605 的 ORFB。上游 5' - GGCTGTTCTAGGGTCGTGTATAAC-3' ;下游 :5' - CAAGCTAGATGCAATCTAGCTACC-3' 。由第一对引物上游与第二对引物的下游扩增 IS605 全基因。根据文献 [1] 合成引物 ,扩增 IS606 基因。

3. IS605 ORFA、ORFB 的 PCR 扩增 :50 μl PCR 反应体系 :dNTP (2.5 mmol/L) 4 μl ,引物 (10 pmol/μl) 4 μl ,DNA 模板 3 μl ,Taq DNA 聚合酶 (5 U/μl) 1 μl。混合后 ,94℃ 预变性 5 min ,94℃ 变性 1 min ,52℃ 退火 30 s ,72℃ 延伸 1 min ,进行 30 个循环 ;72℃ 延伸 5 min。

4. IS605、IS606 全基因的 PCR 扩增 :PCR 反应成分同上 ,混合后 ,94℃ 预变性 5 min ,94℃ 变性 1 min ,50℃ 退火 1 min ,72℃ 延伸 2 min ,进行 30 个循环 ;72℃ 延伸 5 min。

5. PCR 产物纯化 :采用 PCR 纯化试剂盒 ,按照试剂盒操作手册纯化 PCR 产物。

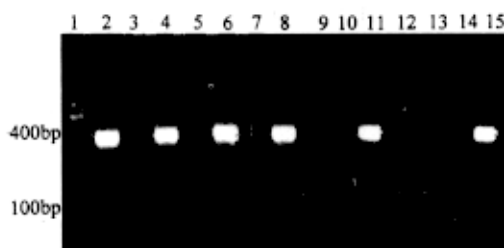
6. DNA 探针的标记 :参照地高辛标记检测试剂盒的操作手册 ,将纯化的 IS605、IS606 的全基因 PCR 产物定量后标记。

7. 染色体打点杂交过程参照文献 [2]。

结 果

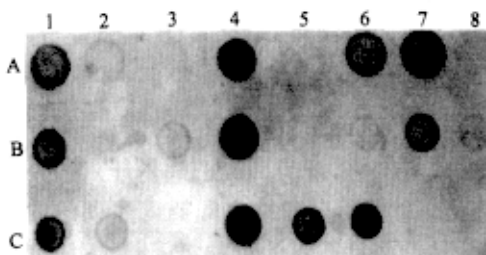
一、PCR 扩增及打点杂交结果

104 株 Hp ,IS605 阳性 42 株 ,IS606 阳性 19 株。部分菌株 IS605 的 ORFA 的 PCR 扩增产物见图 1。部分菌株 IS605 的打点杂交结果见图 2。



1. 100 bp DNA ladder 2. 26695 3. J99 4. G61B 5. C99A 6. C40A 7. C55A 8. E8A 9. A180A 10. G72A 11. G40B 12. G333B 13. E183A 14. E172B 15. E257A

图1 部分菌株 IS605 ORFA 的 PCR 扩增产物鉴定



A1 ~ A8 : * CAPMN124 CAPMN125 CAPMN126 CAPMN130 R71 CH1 CH4 CH5 ;B1 ~ B8 : YN1-6 YN4-6 YN4-2 YN4-11 YN1-1 YN1-2 YN1-17 YN1-18 ;C1 ~ C8 : DUQT28 DUQT35 DUQT36 GUTP61 PCM327 PCM416 PCM432 PCM587

图2 部分菌株 IS605 打点杂交结果

二、IS605、IS606 的分布差异分析

1. 胃镜不同的诊断结果分离菌株 IS605、IS606 分布分析见表 1。

2. 不同地区分离菌株 IS605、IS606 的分布见表 2。

表1 胃镜不同的诊断结果分离菌株 IS605、IS606 的分布

胃镜诊断结果	菌株数	IS605		IS606	
		阳性数	阳性率 (%)	阳性数	阳性率 (%)
胃炎 + 十二指肠炎 + 食管炎	39	20	51	7	18
胃溃疡 + 十二指肠溃疡	32	14	44	7	22
缺如	18	5	28	1	6
无症状携带者	12	3	25	2	17
合计	101	42	42	17	17

对 IS605 进行列联表 χ^2 检验 , $\chi^2 = 4.33$, $U = 3$, $P > 0.1$,四者阳性率之间差异无显著性 ,IS605 的分布与分离个体的胃镜诊断结果无关。

表2 不同地区 Hp 菌株 IS605、IS606 的分布

分离地区	菌株数	IS605		IS606	
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
北京	38	12	32	10	26
沈阳	6	2	33	1	17
福建	28	11	39	5	18
云南	18	12	67	2	11
香港	13	5	38	1	8
合计	103	42	41	19	18

对 IS606 进行列联表 χ^2 检验 $\chi^2 = 2.24, U = 3, P > 0.5$ 四者阳性率之间差异无显著性, IS606 的分布与分离个体的胃镜诊断结果无关。

对 IS605 进行列联表 χ^2 检验 $\chi^2 = 9.27, U = 4, 0.05 < P < 0.1$ 。云南省 IS605 的阳性率有大于其他地区的趋势(90% CI)。对 IS606 进行列联表 χ^2 检验 $\chi^2 = 1.03, U = 4, P > 0.25$, 各地区 IS606 阳性率之间差异无显著性。

讨 论

插入序列是造成细菌遗传异质性的主要原因之一,从进化角度上讲,许多同源的插入序列可存在于不同的细菌中,但不同菌株之间插入序列的内容及分布显著不同,而且不同的菌种之间,插入序列插入的位点及拷贝数是相对远古、相对稳定的。所以插入序列通常被用作分子流行病学研究的工具,用以探索分离个体的原始体系及追踪病原体在宿主群体中的传播。

IS605、IS606 是 Hp 中最早发现的 IS,其结构简单,属于插入序列 IS200 家族^[3,4]。近年来 Hp 的插入序列作为一种基因标志,国外不少研究证实,IS605、IS606 在 1/3 的菌株中存在^[1],IS605、IS606 的存在与 Hp 的毒力相关基因如 *cagA*、*vacA*、*flaA*、*ureA-ureB* 等的存在无关^[5,6];IS605、IS606 的分布与菌株分离的地区及菌株分离个体的临床症状无关^[7]。

本研究随机选取了北京、福建、香港、云南、沈阳及国际菌株共 104 株菌,通过 PCR 和染色体打点杂交两种方法筛选 IS605、IS606,初步分析了中国菌株 IS605、IS606 的分布特点,填补了中国 Hp 插入序列研究的空白。

中国菌株 IS605 的阳性率为 40%(42/104),IS606 的阳性率为 18%(19/104)。表明中国菌株同样存在插入序列但其分布具有与西方国家不同的特点。IS605 的阳性率(40%)比国外(33%)偏高,IS605

的阳性率显著大于 IS606,统计分析表明,IS605 的阳性率与菌株分离个体的临床诊断结果无关,而 5 个地区中云南省 IS605 的阳性率有高于其他地区的趋势($0.05 < P < 0.1$)。这说明 IS605 可能是 Hp 染色体中相对稳定远古的成分,IS605 可以作为 Hp 的遗传标志,云南菌株插入序列分布的差异可能与其具有的独特的地理位置有关。当然我们可以加大样本量进一步分析云南菌株 IS605 的分布特色。IS605 的阳性率与分离个体的胃镜诊断结果无关,可以推测 IS605 可能与 Hp 的致病因子无关,IS605 的存在不可以作为某种临床表现的标志。中国菌株的显著特点是 *cagA* 的阳性率为 98%,显然 IS605 的存在与 *cagA* 的存在无关,这与国外的许多研究结果一致。至于 IS605 与其他基因的关系有待于进一步研究。

中国菌株 IS606 的阳性率为 18%(19/104)显著低于国外菌株 IS606 的阳性率(33%)。不同地区,不同临床诊断结果 IS606 的阳性率差异无显著性。而且 IS606 的分布与 IS605 的存在无关,说明 Hp 获得两者的时间距离可能较远。

本次筛查结果发现 IS605 两个开码读框 ORFA, ORFB 共存,没有发现只含有 ORFA 或只含有 ORFB 的 IS605 阳性菌株,说明两者编码的蛋白可能对于 IS605 的移位功能缺一不可。

总之,中国菌株广泛存在 IS605、IS606,云南省 Hp IS605 的分布的不同可能与其独特的地理位置有关。IS605、IS606 在全球范围内广泛存在,说明两者是 Hp 基因组中相当远古的成分。中国菌株 IS605、IS606 的分布与国外菌株差异较大可能是由于其原始的体系不同。至于 IS605、IS606 是如何获得,其移位的机制如何有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Kersulyte D, Akopyants NS, Clifton SW, et al. Novel sequence organization and insertion specificity of IS605 and IS606: chimaeric transposable elements of *Helicobacter pylori*. *Gene*, 1998, 223:175-186.
- 2 卢圣栋,主编.现代分子生物学实验技术.北京:高等教育出版社,1993.198.
- 3 Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62:725-774.
- 4 Hook-Nikanne J, Berg DE, Peek RM, et al. DNA sequence conservation and diversity in transposable element IS605 of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 1998, 3:79-85.
- 5 Chalkauskas H, Kersulyte D, Cepulienė I, et al. Genotypes of *Helicobacter pylori* in Lithuanian families. *Helicobacter*, 1998, 3:296-302.
- 6 Jenks PJ, M Raud F, Labigne A, et al. Clinical outcome after infection

with *Helicobacter pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of the cag pathogenicity island. Gut, 1998, 43:752-758.

7 Salaun L, Audibert C, Le Lay G, et al. Panmictic structure of

Helicobacter pylori demonstrated by the comparative study of six genetic markers. FEMS Microbiol Lett, 1998, 161:231-239.

(收稿日期 2001-12-21)

(本文编辑:尹廉)

· 短篇报道 ·

吸烟与肺癌类型关系的探讨

李志忠 王乐强 庄洪洁

据 Loeb 等^[1]的资料,吸烟与肺癌尤其是与肺鳞癌密切相关,而与肺腺癌关系不大,非吸烟者肺癌患病率不到 10%,且主要为腺癌。本次总结肺癌患者 1 180 例,旨在探讨吸烟与肺癌类型的关系及其可能的机制。

1. 资料与方法 (1)资料来源:1989 年 1 月至 2000 年 7 月期间,经纤支镜取病理标本确诊的肺癌病人共 1 180 例作为研究对象,其中肺鳞癌病理组织类型 718 例,肺腺癌 305 例,其他(小细胞肺癌等)157 例。每例均收集家族史、详细的吸烟史等完整的流行病学资料(特殊职业接触史除外)。(2)统计方法:应用行×列表资料的 χ^2 检验和危险度分析,评价吸烟指数与肺癌类型的相关性。

2. 结果 (1)吸烟指数与肺癌类型分布见表 1。从表 1 可见,吸烟指数不同,其肺癌类型构成不同,非吸烟者肺腺癌比重比吸烟者大,吸烟者肺鳞癌类型比重较非吸烟者大,且吸烟指数越大,肺鳞癌类型比重越大($P = 0.005$)。(2)吸烟指数在肺鳞癌、肺腺癌患者中的区别:经统计吸烟指数 < 400 支/年的 421 例患者中,231 例(54.9%)为鳞癌,119 例(28.3%)为腺癌;在吸烟指数 ≥ 400 支/年的 508 例患者中,384 例(75.6%)为鳞癌,81 例(15.9%)为腺癌;肺鳞癌的发

表1 吸烟指数与肺癌类型分布

吸烟指数(支/年)	肺腺癌	小细胞肺癌	肺鳞癌	合计
0	105	43	103	251
< 400	119	71	231	421
≥ 400	81	43	384	508
合计	305	157	718	1 180

$$\chi^2 = 801, P = 0.005$$

生率在吸烟指数大的患者中显著高于肺腺癌($P = 0.037$)。

3. 讨论:香烟燃烧时其温度达 900℃,可产生苯丙芘、尼古丁等 3 000 多种化学物质,绝大部分具有致癌性^[1]。通过动物实验,向气管内滴注苯丙芘诱发肺癌证明:起源于支气管黏膜基底细胞、黏液细胞的肺鳞癌,可经过复层增生→鳞状化生→非典型增生→原位癌→鳞癌的模式进展。这一进展过程具有明显的剂量、时限效应。这与本次吸烟指数越大,肺鳞癌类型比重越大一致。而肺腺癌的发生,可起源于支气管、肺组织的各类细胞,具有更复杂的致病机制。

参 考 文 献

- 1 Loeb LA, Ernster VL, Warner KB, et al. Smoking and lung cancer: an overview. Cancer Res, 1984, 44:5940-5958.

(收稿日期 2001-06-28)

(本文编辑:杨莲芬)

作者单位 261041 山东省潍坊市人民医院呼吸科