

· 实验研究 ·

中国香港地区幽门螺杆菌毒力基因型与十二指肠溃疡关系的研究

尹焱 张建中 王振宇 夏华向 林兆鑫

【摘要】 目的 研究幽门螺杆菌(*Hp*)的重要毒力因子 *vacA*, *cagA*, *iceA* 及插入序列 IS 在中国香港地区分离菌株中的分布特征及其与十二指肠溃疡的关系。方法 采用聚合酶链反应(PCR)和 Southern blot 方法,对 72 例证实为 *Hp* 感染的胃十二指肠疾病患者的胃黏膜标本直接进行检测。结果 72 例患者中,69 例(95.8%)感染的 *Hp* 菌株为 *vacA* s1c 型,3 例(4.2%)为 s1a 型;23 例(31.9%)为 *vacA* m1b 型,46 例(63.9%)为 *vacA* m2 型,6 例(8.3%)为混合型。63.9%(46/72)的患者感染菌株为 *iceA*1 型,29.2%(21/72)为 *iceA*2 型。*cagA* 的阳性率为 88.9%(64/72)。结论 *Hp* 毒力因子 *vacA*, *cagA* 和 *iceA* 在香港菌株中的分布有自己的特点,未发现特定 *cagA*, *vacA* 和 *iceA* 基因型别与 DU 相关。

【关键词】 螺杆菌 幽门;毒力因子;十二指肠溃疡

Association between *Helicobacter pylori* virulence and duodenal ulcer disease in patients from Hong Kong in China YIN Yan*, ZHANG Jian-zhong, WANG Zhen-yu, XIA Hua-xiang, LIN Zhao-xin.
*Institute Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective A number of putative virulence factors have been postulated to be relevant to the clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection based on strains identified in the western countries. The aim of this study was to investigate the association between genotypes of *vacA*, *cagA* and *iceA* and duodenal ulcer disease in patients from Hong Kong. **Methods** Seventy-two dyspeptic patients with or without duodenal ulcer disease, with proven *H. pylori* infection, were studied. Gastric biopsy specimens were analyzed by specific polymerase chain reaction and Southern blot to determine the genotypes of these virulence factors. **Results** Except (8.3%) cases with evidence of multiple infections, all of the remaining 66 cases had *vacA* signal sequence s1 type strains. Twenty-seven (90%) of the 30 cases with duodenal ulcers were infected with *cagA*-positive strains, compared with 3(8.9%) of 36 with non-ulcer dyspepsia ($P > 0.05$). Similarly, *vacA* middle region sequences were detected with no significant difference in the two groups, 9(30.0%) versus 13(36.1%) for m1b and 21(70.0%) versus 23(63.9%) for m2 type. *IceA*1 subtype was detected in the same frequency in 42(63.6%) of the 66 cases. Neither *cagA* nor *vacA* and *iceA* were associated with duodenal ulcer disease. **Conclusion** No clear differences were found in the distribution of *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes among patients with duodenal ulcer or non-ulcer dyspepsia. The association of these virulence genes and duodenal ulcer disease needs reappraisal, particularly under geographic considerations.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; Virulence gene; Duodenal ulcer

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *Hp*)感染导致慢性胃炎和消化性溃疡,并且被认为是导致胃癌的早期危险因子。虽然组织学上的胃炎在 *Hp* 感染者中普遍存在,但是只有一小部分感染者发展为溃

疡甚至胃癌。*Hp* 的基因组具有高度的变异性,不同菌株之间基因型的差别可能导致了感染后的不同结果。近来有许多研究对 *Hp* 基因组中的一些毒力基因进行了分析,尽管许多研究提示 *vacA* s1 型, *cagA* 阳性和 *iceA*1 型 *Hp* 感染同消化性溃疡的发生相关^[1-4],也有一些研究结果不支持这种关联^[5],造成这些研究结果差异的主要原因可能是不同地区的 *Hp* 菌株之间存在较大差别。消化性溃疡的发病率在中国香港地区比较高,不仅高于西方国家,甚至比

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(2001AA215161)

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(尹焱、张建中),香港大学玛丽医院(王振宇、夏华向、林兆鑫)

中国北方地区也要高^[6],这可能与香港地区流行的 Hp 菌株的基因型特点有关。因而,本研究调查了 Hp 的主要毒力基因 *vacA*, *cagA* 和 *iceA* 以及插入序列 IS605 和 IS606 在香港菌株中的分布,同时对于这些基因的不同型别与十二指肠溃疡(DU)的关系进行了分析。

材料与方法

1. 患者标本:共选取 72 例到香港玛丽医院就诊的胃十二指肠疾病患者(均为香港本地居民),其中诊断为 DU 患者 34 例,非溃疡性消化不良(NUD)患者 38 例,平均年龄 46.6 岁。通过细菌培养, C¹³呼气试验以及组织学检验证实 Hp 感染(其中任何一项阳性即认为 Hp 阳性)。通过胃镜检查在胃窦和胃体部各采取一块黏膜,置保存液中 -80℃ 保存待检。

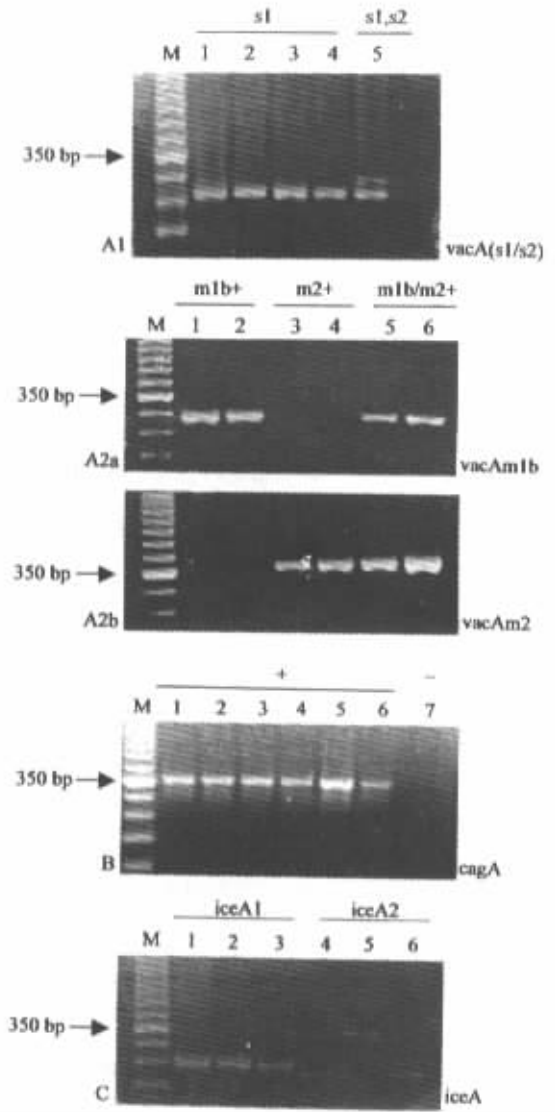
2. Hp 基因组 DNA 的制备及特异性聚合酶链反应(PCR):采用 QIAamp Tissue Kit (Qiagen, 德国)直接从胃黏膜提取 Hp 的基因组 DNA, -20℃ 保存备用。*vacA*, *cagA* 和 *iceA* 基因的分型引物以及检测插入序列 IS605 和 IS606 的引物参照文献[3, 5, 7, 8]。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 180 s, 94℃ 变性 60 s, 52℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 30 个循环。对于 PCR 结果为 *cagA* 阴性的标本参照 Pan 等^[9]进行了 Southern blot 检测。

3. 统计分析:对各个基因的分型结果以及不同基因型与消化性溃疡的关系进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

结 果

1. *vacA*, *cagA* 和 *iceA* 基因分布:所有 72 例患者感染的 Hp 经 PCR 检测均为 *vacA* s1 型,其中 69 例(95.8%)为 *vacA* 基因亚型 s1c, 3 例(4.2%)为亚型 s1a。*vacA* s2 型仅见于 3 例(4.2%)同时还感染有 *vacA* s1c 型 Hp 的患者(图 1-A1)。对 *vacA* 基因的 m 区进行检测发现 23 例(31.9%)为 *vacA* m1b, 46 例(63.9%)为 *vacA* m2。另外有 3 例(4.3%)既检测出 m1b 又检测出 m2 特异性片段(图 1-A2a, A2b)。这些香港菌株中未发现 *vacA* 亚型 s1b 或 m1a。在这些患者中共有 6 例(8.3%)表现为多种 *vacA* 基因型,提示可能为混合感染(表 1)。同 NUD (2/38, 5.3%)相比,多种基因型 Hp 菌株混合感染似乎在 DU 患者(4/34, 11.8%)中更常见,但是这种

差别无显著性($\chi^2 = 0.32, P > 0.05$)。特异性 PCR 检测结果显示 *cagA* 基因阳性率为 88.9%(图 1-B), PCR 结果为阴性的标本经 Southern blot 证实确实为 *cagA* 阴性。46 例(63.9%)为 *iceA*1 型, 21 例(29.2%)为 *iceA*2 型(图 1-C),另外有 2 例表现为 *iceA*1 和 *iceA*2 混合型, 3 例 *iceA* 阴性。插入序列 IS605 和 IS606 在这些菌株中均未检出。



A1. 使用引物 VA1-F 和 VA1-R 检测 *vacA* s1、*vacA* s2 亚型; A2a. 使用引物 VAm-F 和 VAm-R 检测 *vacA* m1b 亚型; A2b. 使用引物 VA4-F 和 VA4-R 检测 *vacA* m2 亚型; B. 使用引物 F1 和 B1 检测 *cagA* 基因; C. 使用引物 *iceA*1F 和 *iceA*1R 检测 *iceA*1、*iceA* 2F 和 *iceA* 2R 检测 *iceA*2 型; M. 50 bp DNA 分子量标准(箭头所指为 350 bp 片段)

图1 幽门螺杆菌毒力基因特异性 PCR 反应结果

2. 不同基因型之间的关系:*cagA* 基因是否阳性与 *iceA* 基因型别无关,在 46 例 *iceA*1 型中 *cagA* 的

阳性率为 87.0% ,而在 21 例 iceA2 型中为 95.2% ($\chi^2 = 0.36, P = 0.55$)。由于在这 72 例患者中没有发现 vacA s2 型,因而不能确定 cagA 存在状态及 iceA 类型与 vacA 基因类型的关联。

表 1 幽门螺杆菌毒力因子 vacA、iceA 和 cagA 基因分型检测结果

基因型	临床分型结果		合计 (n = 72)
	DU (n = 34)	NUD (n = 38)	
vacA			
s1a/m1b	0(0)	1(2.6)	1(1.4)
s1a/m2	0(0)	2(5.3)	2(2.8)
s1c/m1b	9(26.5)	12(31.6)	21(29.2)
s1c/m2	21(61.8)	21(55.3)	42(58.3)
Multiple	4(11.7)	2(5.2)	6(8.3)
iceA			
iceA1	23(67.6)	23(60.5)	46(63.9)
iceA2	7(20.6)	14(36.8)	21(29.2)
iceA ⁻	2(5.9)	1(2.7)	3(4.1)
iceA1 + iceA2	2(5.9)	0(0)	2(2.8)
cagA			
cagA ⁺	30(88.2)	34(89.5)	64(88.9)
cagA ⁻	4(11.8)	4(10.5)	8(11.1)

注:括号内数据为基因分型百分率

3. 不同基因型别与 DU 的关系:由于在这 72 例患者感染的 Hp 中没有发现单一的 vacA s2 型(有 3 例感染了此类型的患者同时还带有其他类型的 Hp),因而不能确定 vacA s1 型与 DU 的关联。vacAm 基因型别与 DU 没有显著的关联($P > 0.05$)。cagA 基因的阳性率在 DU 和 NUD 患者中差异无显著性(分别为 88.2% 和 89.5% $\chi^2 = 0, P = 1$)。同样,DU 的发病率在 iceA1 型和 iceA2 型患者之间差异无显著性(分别为 50.0% 和 33.3% $\chi^2 = 1.62, P = 0.20$) (表 1)。

讨 论

本研究结果表明,所有这些患者感染的 Hp 菌株均为 vacA s1 型,而其中绝大部分(96%)菌株为 s1c 亚型(图 2-A)。VacA s1c 型是一种新的独特的 vacAs 基因亚型,只存在于亚洲东部分离的菌株当中^[1,5,10]。vacA s1b 亚型存在于几乎所有中美洲和南美洲菌株当中^[11],而在这些香港菌株中未发现 s1b 亚型,进一步证实了 Hp 基因型的地理分布差异。有趣的是,本研究发现 67% 的香港菌株为 vacA m2 亚型,显著高于日本和韩国(< 5%)而稍低于中国台湾和大陆(均为 85%)^[5,12,13],提示这些中国菌株之间具有更紧密的关系。

本研究首次根据毒力因子 cagA、vacA 及 iceA

的分布不同对我国香港地区分离的 Hp 进行了比较全面的基因分型,并考察了不同基因型与 DU 的关联。研究结果表明 Hp 毒力因子 vacA、cagA 和 iceA 在香港菌株中的分布有自己的特点;未发现特定 cagA、vacA 和 iceA 基因型别与 DU 相关。

本研究采用胃黏膜标本直接进行特异性 PCR 反应检测 Hp 的毒力基因,这样可以不经过冗长的细菌分离培养过程而确定所感染 Hp 的基因型别,并且结果同检测分离培养的 Hp 菌株一样可靠^[3]。这种方法由于具有简便易行的特点,特别适合在不能进行细菌培养的条件下使用。

西方国家的研究显示 vacA s1/cagA⁺ 基因型与 DU 有显著的相关关系^[11],而本研究中各毒力基因类型在 DU 和 NUD 病人中的分布差异没有显著性,没有发现 Hp 的特定基因类型与 DU 具有相关性,在其他亚洲国家进行的研究也得到了相似的结果^[5,7,12]。考虑到 Hp 基因组的高度变异性及在不同地理位置菌株的差别,Hp 的特定毒力基因类型与 DU 的相关关系还需要进一步的研究。以西方国家菌株为基础的研究结果在香港以及亚洲东部等地并不适用,不能作为这些地区 Hp 相关疾病的防治依据,而以本地区菌株为基础开展相关研究,对于幽门螺杆菌病的预防控制则很有必要。

参 考 文 献

- 1 Atherton JC, Cao P, Peek RMJ, et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*, 1995; 270: 17771-17777.
- 2 Censini S, Lange C, Xiang Z, et al. cagA, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93: 14648-14653.
- 3 van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 1998; 115: 58-66.
- 4 Atherton JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut*, 1997; 40: 701-703.
- 5 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 Clin Microbiol*, 1999; 37: 2274-2279.
- 6 Wong BCY, Ching CK, Lam SK, et al. Differential north to south gastric cancer-duodenal ulcer gradient in China. *J Gastroenterol Hepatol*, 1998; 13: 1050-1057.
- 7 Mukhopadhyay AK, Kersulyte D, Jeong JY, et al. Distinctiveness of

genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. J Bacteriol, 2000, 182:3219-3227.

8 Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. Infect Immun, 1993, 61: 1799-1809.

9 Pan ZJ, van der Hulst RWN, Feller M, et al. Equally high prevalence of infection with cagA-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia. J Clin Microbiol, 1997, 35: 1344-1347.

10 van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA. J Clin Microbiol, 1998, 36: 2597-2603.

11 van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, et al. Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology, 1999, 116:823-830.

12 Pan ZJ, Berg DE, van der Hulst RWN, et al. Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct vacA alleles in *Helicobacter pylori* from China. J Infect Dis, 1998, 178: 220-226.

13 Lin CW, Wu SC, Lee SC, et al. Genetic analysis and clinical evaluation of vacuolating cytotoxin gene A and cytotoxin-associated gene A in Taiwanese *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer patients. Scand J Infect Dis 2000, 32:51-57.

(收稿日期 2002-02-10)

(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

徐州市 1995~2001 年艾滋病病毒高危人群血清学监测分析

杨晋川 杨喜玲

现将对徐州市 32 例艾滋病病毒(HIV)感染者的血清学监测结果报道如下。

1. 材料与方 法: ①血清标本来自我市 1995~2001 年 HIV 高危人群(输血/献血员、戒毒人员、涉外宾馆服务员、因卖淫嫖娼被劳教人员、性病门诊和医院就诊患者、HIV 感染者家属、自愿匿名检测等)监测, 共计 2 622 份血清标本。②尿液标本来自 2001 年本市某些 HIV 感染者的乡镇 5~60 岁健康人群, 共计 3 324 份。③检测方法: 用 HIV1+2 抗体检测 ELISA 试剂盒进行初筛, 初筛阳性标本, 送江苏省 HIV 抗体检测确认中心实验室, 再用蛋白免疫印迹方法(WB)进行确认。血清标本初筛用的 HIV1+2 抗体试剂盒为阿克苏(AKZO-NOBEL)公司生产; 尿液标本初筛用的 HIV-1 抗体试剂盒为卡里普特生物医学(Calypte Biomedical Corporation)公司生产。均在有效期内使用, 并按试剂盒说明书操作。

2. 结果: ①32 例 HIV 感染者的分布情况: 人群和年度分布见表 1。地域分布: 32 例 HIV 感染者中, 本地人占 20 例(62.50%), 与本地接壤周边地区(河南、安徽省)10 例(31.25%), 2 例为外来人口, 占 6.25%。②感染方式: 输血/献血人员 28 例(87.5%), 吸毒人员 2 例(6.25%), HIV 感染者家属 2 例(6.25%)。③确认结果: 32 例 HIV-1 型抗体阳性, 用 WB 方法确认, 带型结果均为 gP160、gP120、P66、P55、P51、gP41、P39、P31、P24、P17。

表1 徐州市 1995~2001 年 32 例 HIV 感染者分布特征

年份	检测对象	抗-HIV		
		检测份数	阳性份数	阳性率 (%)
1995	献血、吸毒等	300	2	6.66
1996	献血、涉外宾馆服务员等	300	0	0.00
1997	献血、卖淫嫖娼等	392	3	0.76
1998	献血、吸毒、HIV 感染者家属等	266	7	2.63
1999	输血/献血、吸毒、HIV 感染者家属等	369	9	2.43
2000	献血等	426	5	1.17
2001	输血/献血、医院就诊、HIV 感染者的乡镇人群等	3 893	6	0.15
合计		5 946	32	0.54

3. 讨论: ①分析结果显示, 32 例 HIV 感染者中, 男性 27 例, 占 84.28%; 女性 5 例, 占 15.62%。以 20~40 岁的青壮年居多, 属于 HIV 传播的重要时期——“性活跃期”。因此, 除加强艾滋病知识的普及宣传外, 应针对性的采取预防措施。在性活跃人群中推广使用安全套, 对 HIV 感染者及其配偶、亲属等提供必要的指导和帮助。②通过对我市 HIV 感染状况分析, 经血液途径传播扩散 HIV 是徐州市的主要特点。在 32 例 HIV 感染者中, 有 24 例曾有献血史、4 例曾有输血史, 输血史均在 5 年以上。这表明职业献血引起 HIV 血源性播散后果十分严重, 因而严把输血/献血关是切断 HIV 传播的主要手段之一。

(收稿日期 2002-02-10)

(本文编辑:尹廉)