

浙江地区幽门螺杆菌临床菌株空泡毒素基因的变异及其表达活性分析

陈学军 沈月芳 严杰

【摘要】 目的 了解浙江地区消化性溃疡(PU)和慢性胃炎(CG)患者感染幽门螺杆菌(Hp) *vacA* 基因的变异及其空泡毒素表达情况。方法 从 70 株 Hp 中选择部分菌株测定其 *vacA* 基因的 s 区和 m 区核苷酸序列。用细胞培养的方法检测 Hp 菌株的空泡毒性。结果 6 株 s1a 型 Hp 菌株的 s 区扩增产物与报道的 s1a 型 60190 株核苷酸序列相似性为 93.2%~98.3%, 4 株 m2 型 Hp 菌株的 m 区扩增产物与报道的 m2 型 87-203 株核苷酸序列之间相似性为 93.8%~97.6%。1 株 m1b 型 Hp 菌株的 m 区扩增产物与报道的 m1 型 60190 株相应序列相似性为 87.3%, 与 m2 型 87-203 株相应序列之间相似性为 71.7%。所有 5 株 s1a/m1 型 Hp 对 HeLa、RK-13 和 SGC-7901 三种细胞均有明显的空泡毒作用; 仅 27.9% (12/43) 的 s1a/m2 型菌株对 HeLa 细胞表现为空泡毒作用, 但分别有 65.1% (28/43) 和 62.8% (27/43) 的菌株对 RK-13 细胞和 SGC-7901 细胞有空泡毒作用。所有 s1a/m1b 和 s1a/m1b-m2 型 Hp 菌株对三种细胞均有明显的空泡毒作用, 以 RK-13 细胞计, 81.0% (17/21) 的 s1a/m1b 型 Hp 菌株和 1 株 s1a/m1b-m2 型有空泡毒性。PU 组感染的 Hp 菌株空泡毒性(84.4%) 强于 CG 组(60.5%), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 浙江地区患者感染的 Hp 菌株 *vacA* 基因变异主要在于 m 区。*vacA* 基因空泡毒性的表达在 HeLa 细胞中低毒性的 s1a/m2 型菌株在 RK-13 和 SGC-7901 细胞中仍有较高的空泡毒性。m1b 型 Hp 空泡毒性强度介于 m1 和 m2 型之间。PU 患者感染的 Hp 菌株其空泡毒性明显强于 CG 组。

【关键词】 螺杆菌, 幽门; 空泡毒素; 胃十二指肠疾病

Analysis on the variance of *vacA* genotypes and their vacuolating toxin activity of *Helicobacter pylori* isolates in Zhejiang area CHEN Xue-jun*, SHEN Yue-fang, YAN Jie. *Affiliated Children's Hospital, College of Medical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China

【Abstract】 Objective To analyze the variance of *vacA* genotypes and their vacuolating toxin activity of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) isolates from patients with peptic ulcer (PU) or chronic gastritis (CG) in Zhejiang area. **Methods** Signal and middle regions of parts of seventy *H. pylori* strains were sequenced after T-A cloning. Vacuolating toxin activity was detected with cell culture method. **Results** Compared with the reported sequences of *H. pylori* strain 60190 with s1a/m1 genotype, similarities of the signal-region sequences from 6 s1a-type *H. pylori* isolates were found to be 93.2%-98.3%, and from 1 m1b-type strain was 87.3%. When compared with the corresponding sequences of *H. pylori* strain 87-203 with m2 genotype, similarities of the mid-region from 4 m2-type isolates and 1 m1b-type isolates were 93.8%-97.6% and 71.7%, respectively. All 5 strains with s1a/m1 type produced vacuolating toxin activity detected by HeLa, RK-13, and SGC-7901 cell lines. Only 12 strains with s1a/m2 type produced cytotoxin in HeLa cells but 65.1% (28/43) and 62.8% (27/43) strains had cytotoxin in RK-13 and SGC-7901 cells. In RK-13 cells, 81.0% (17/21) strains with s1a/m1b produced vacuolating toxin activity. **Conclusion** Variance of *vacA* genotypes of local *H. pylori* isolates mainly lied in mid-region. *H. pylori* isolates with m2 type produced high cytotoxin in RK-13 and SGC-7901 cells, and low cytotoxin in HeLa cells. Cytotoxin strength of m1b-type strains was between strains with m1 and m2 types. Vacuolating toxin activity of strains from PU group seemed obviously higher than that from CG group.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; Vacuolating toxin; Gastrointestinal diseases

幽门螺杆菌(Hp)空泡毒素基因(*vacA*)表达的空泡毒素能使胃上皮细胞产生空泡变,是该菌极其重要的致病因子。不同 Hp *vacA* 基因序列差异较大的区域主要位于信号肽区域(s区)和中间区域(m区)。*vacA* 存在于所有 Hp 中^[1],但只有部分菌株有空泡毒性,其表达差异与 *vacA* 基因型的不同有关(主要是 m 区)^[2]。我们的研究已经发现^[3],浙江地区患者标本分离的 Hp *vacA* 基因 s 区极为稳定,均为单一的 s1a,但 m 区变异较大,除了 m1、m2 外,还有 m1b 和 m1b-m2 两个极少报道的变异体;s1a/m2 和 s1a/m1b 均是浙江地区消化性溃疡或慢性胃炎患者感染的 Hp 的 *vacA* 优势基因型,不同于有关报道^[4-7]。本文的目的是调查分析 Hp 临床菌株 *vacA* 基因的变异、表达活性及其与不同胃肠疾病的相互关系。

材料与方 法

1. Hp 的分离和鉴定、模板 DNA 的制备和 *vacA* 信号区(s)、中间区(m)的聚合酶链反应(PCR)检测:70 株 Hp 分离自浙江地区消化性溃疡(PU)和慢性胃炎(CG)患者胃窦黏膜,其中 CG 38 例、PU 32 例。Hp 模板 DNA 的制备和 *vacA* 基因型的 PCR 检测参照文献^[3]的方法。

2. PCR 产物克隆和测序:扩增 338 bp 长度的 s 区序列上下游引物为:5'-ATGGAAATACAA CAAACACACCG-3',5'-CAACCTCCATCAATCTT ACTGGA-3';扩增 787 bp 长度的 m 区序列上下游引物为:5'-TCAATATCAACAAGCTC-3',5'-CCG CATGCTTTAATGTC-3'。采用上海博彩生物科技有限公司(BBST)T-A 克隆试剂盒将扩增的目的片段克隆至 pUCm-T 载体中。重组质粒转化于 *E. coli* DH 5 α 株并扩增,碱变性法提取质粒。委托 BBST 公司测定插入片段的核苷酸序列,并与报道的核苷酸序列进行比较^[8]。

3. VacA 的制备、细胞培养及空泡毒测定:参照文献^[9]的方法,即取 70 株 Hp 临床菌株及标准菌株 NCTC11637(s1a/m1,表达 VacA)和 G50(s1b/m2,不表达 VacA)培养于改良的布氏肉汤,37℃ 微需氧条件下震荡培养 48 h。室温下涡漩、离心,上清再经超滤膜离心浓缩,用滤膜过滤除菌。调节浓缩上清为 3×10^9 细胞的培养上清成 0.1 ml。HeLa 细胞、RK-13 细胞(兔肾上皮细胞株)、SGC-7901 细胞(人胃腺癌细胞系)种植于含 10% 小牛血清的 RPMI

1640 培养液中,37℃、5% CO₂ 培养。以每孔 1×10^4 细胞数分别接种于 96 孔板上。培养 24 h 后,每孔加入含 VacA 的培养上清浓缩液 10 μ l 继续培养 24 h。在倒置显微镜下观察空泡变性的细胞数。每份标本测 3 次取均值,遇极端值剔除后再取均值。以 NCTC11637 为阳性对照、G50 为阴性对照,培养液为空白对照。空泡毒性判断标准:<5% 的细胞发生空泡变性为 VacA 阴性;5%~25% 的细胞空泡变性为 +;25%~50% 的细胞空泡变性为 ++;50%~75% 的细胞空泡变性为 +++; $\geq 75\%$ 的细胞空泡变性为 ++++。统计学处理以发生空泡变性 $\geq 25\%$ 为阳性界限。

4. 统计学方法:率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

1. Hp 临床菌株检测:70 株 Hp 分离自浙江地区 PU 和 CG 患者胃窦黏膜。不同 *vacA* 基因型 Hp 菌株的分布:5 株为 s1a/m1(CG 3 株、PU 2 株),43 株 s1a/m2(CG 24 株、PU 19 株),21 株 s1a/m1b(CG 11 株、PU 10 株),1 株 s1a/m1b-m2(PU)。

2. 核苷酸序列比较:利用 DNAMAN 软件分析(比较时不包括引物序列):6 株 s1a 型 Hp 菌株的 s 区扩增产物(338 bp)与报道的 s1a 型 60190 株相应核苷酸序列相似性为 93.2%~98.3%,相似性最高为 83c 株与 53a 株,最低为 60190 株与 23a 株;4 株 m2 型 Hp 菌株的 m 区扩增产物(787 bp)与报道的 m2 型 87-203 株相应序列之间相似性为 93.8%~97.6%,相似性最高为 87-203 株与 24a 株,最低为 120a 株与 64c 株;相应序列均未发现有碱基缺失和插入,具体分布见图 1~4。另外,1 株 m1b 型 Hp 菌株的 m 区扩增产物与报道的 m1 型 60190 株相应序列比较,也无碱基插入或缺失现象,相似性为 87.3%;而与 m2 型 87-203 株相比,m1b 型在 m 区的下游分别有 15 bp 和 6 bp 两个碱基片段的缺失,相应序列之间相似性仅为 71.7%。

3. 不同 *vacA* 基因型的 Hp 空泡毒素活性比较:用 HeLa、RK-13、SGC-7901 三种细胞检测 70 株 Hp 临床菌株和 2 株质控菌株的空泡毒性, NCTC11637 对三种细胞株均有明显的空泡毒作用;G50 及空白对照对三种细胞均无空泡毒作用。100% (5/5) 的 s1a/m1 型 Hp 菌株对三种细胞均有明显的空泡毒作用;仅 27.9% (12/43) 的 s1a/m2 型菌株对 HeLa 细胞表现为空泡毒作用,但有 65.1% (28/43) 和 62.8%

(27/43)的菌株对RK-13细胞和SGC-7901细胞有空泡毒作用。所有 21 株 s1a/m1b 型和 1 株 s1a/m1b-m2 型 Hp 对三种细胞均有明显的空泡毒作用,以 RK-13 细胞检测,81.0% (17/21) s1a/m1b 型 Hp 菌株和 1 株 s1a/m1b-m2 型有空泡毒性,强度介于 m1 和 m2 型之间。结果见表 1。

Table with 7 columns (1) to (7) and 12 rows (1) to (7) showing DNA sequence alignments for s1a type Hp strains. Each row contains a strain identifier and its corresponding nucleotide sequence, with gaps indicating mismatches from the reference.

(1):典型 s1a 型 Hp 菌株 60190 的 vacA 基因 s 区序列(GenBank 登录号 U05676); (2)~(7):6 株 s1a 型 Hp 临床菌株的 vacA 基因 s 区序列(编号:46c、8c、53a、23a、83c 和 84c); 下划线表示引物序列

图1 s1a 型 Hp 菌株的 s 区核苷酸序列的相似性比较

4. 空泡毒性与胃肠疾病的关系:不同空泡毒性的 Hp 菌株在各种胃病标本中的分布见表 2。以 RK-13 细胞检测,PU 组中有 84.4% (27/32) Hp 菌株产生空泡毒性,高于 CG 组(60.5%, 23/38), 差异有统计学意义(P>0.05)。

讨 论

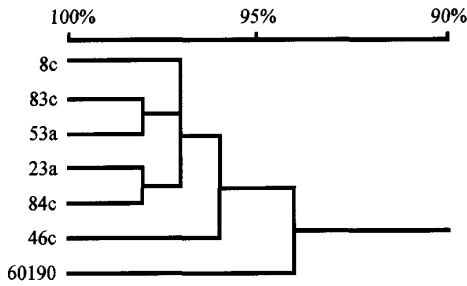
vacA 基因表达的空泡毒素能使上皮细胞产生空泡变性,是该菌极其重要的致病因子。vacA 为全

长约 3864~3888 bp 的单拷贝基因。Atherton 等^[2]研究发现不同 Hp 菌株 vacA 基因序列差异较大的区域主要位于信号肽区域(s 区)和中间长约 730 bp 的区域(m 区),并将 S 区分为 s1a、s1b 和 s2, m 区分

Table with 5 columns (1) to (5) and 12 rows (1) to (5) showing DNA sequence alignments for m2 type Hp strains. Each row contains a strain identifier and its corresponding nucleotide sequence, with gaps indicating mismatches from the reference.

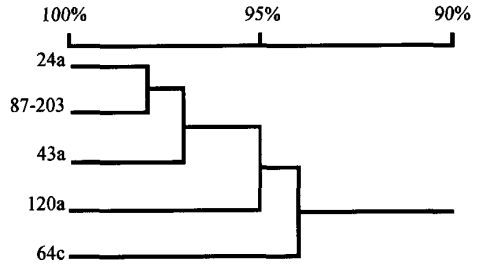
(1):典型 m2 型 Hp 菌株 87-203 的 vacA 基因 m 区序列(GenBank 登录号 U05677); (2)~(5):4 株 m2 型 Hp 临床菌株的 vacA 基因 m 区序列(编号:43a、120a、24a 和 64c); 下划线表示引物序列

图2 m2 型 Hp 菌株的 m 区核苷酸序列的相似性比较



60190:典型 s1a 型 Hp 菌株(GenBank 登录号 U05676); 46c、8c、53a、23a、83c 和 84c:6 株 s1a 型 Hp 临床菌株

图3 s1a 型 Hp 菌株的 s 区核苷酸序列的进化树比较



87-203:典型的 m2 型 Hp 菌株(GenBank 登录号 U05677); 24a、43a、120a 和 64c:4 株 m2 型 Hp 临床菌株

图4 m2 型 Hp 菌株的 m 区核苷酸序列的进化树比较

表1 不同 vacA 基因型的 Hp 对不同细胞系的空泡毒素活性比较

基因型	菌株数	HeLa					RK-13					SGC-7901				
		4+	3+	2+	+	-	4+	3+	2+	+	-	4+	3+	2+	+	-
s1a/m2	43	0	2	10	15	16	4	11	13	8	7	4	11	12	9	7
s1a/m1	5	2	2	1	0	0	2	2	1	0	0	1	3	1	0	0
s1a/m1b	21	3	7	6	2	3	3	9	4	3	2	3	9	5	2	2
s1a/m1b-m2	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0

为 m1 和 m2, 如此 vacA 可有 s1a/m1、s1a/m2、s1b/m1、s1b/m2、s2/m2 和 s2/m1 多个基因型。此后 Pan 等^[10]和 Strobel 等^[11]在不能按 m1 和 m2 分型的 Hp 菌株中发现了 m1a、m1b 和 m1b-m2 等 m 区变异体。

表2 不同空泡毒的 Hp 菌株在各种胃病标本中的分布

疾病	菌株数	空泡毒性					阳性率 (%)
		4+	3+	2+	+	-	
CG	38	3	11	9	8	7	60.5(23/38) ^a
PU	32	6	12	9	3	2	84.4(27/32) ^b
合计	70	9	23	18	11	9	71.4(50/70)

注: $\chi^2 = 4.84128, P < 0.05(a \text{ vs. } b)$

研究发现^[4,6], vacA 基因型的分布有明显的地域差异, 如东欧和北欧以 s1a 型为主, 法国、意大利及北美地区 s1a 和 s1b 型常见, 中南美地区以 s1b 为主, 但 m1 和 m2 的分布却大致相同; 日本分离的 Hp vacA 则以 s1a/m1 为主。我国上海和广东地区 vacA 基因型均为 s1a/m2 或以 s1a/m2 为主。我们的前期研究发现^[3]: 浙江地区患者标本中分离的 vacA 基因 s 区极为稳定, 均为单一的 s1a, 但 m 区变异较大, 有 m1、m2、m1b 和 m1b-m2 4 个亚型; s1a/m2 和 s1a/m1b 均是浙江地区 PU 或 CG 患者感染的 Hp 菌株的 vacA 优势基因型, 特别是 m1b 和 m1b-m2 变异体的检出和 m1 很少见, 不同于别的报道; 同时也发现, vacA 基因型不同的 Hp 的在 PU 或 CG 患者中的检出差异均无统计学意义, 与所致疾病类型和严重程度无关。浙江人群 vacA 基因

(尤其 m 区) 的多态性, 提示在以后的 vacA 分型研究中应高度重视 m1b 变异体。我们认为, 国内几乎没有报道 m1b, 主要原因是研究中未曾选用该对引物, 其实许多 m 区不能以 m1、m2 分型的国内菌株多为 m1b 亚型。

核苷酸序列分析表明, vacA s1a 型 s 区和 m2 型 m 区扩增产物核苷酸序列与已报道的同型参考菌株的相应序列有较高的相似性, 分别为 93.2% ~ 98.3% 和 93.8% ~ 97.6%, 但结合进化树可发现 6 株 s1a 型 Hp 菌株的 s 区扩增序列间相似性更高, 表明浙江地区 s1a 型菌株仍有一定的独特性。m 区检出多个亚型, 且 m1b 型 Hp 菌株的 m 区与 m1、m2 型参考菌株相似性仅为 87.3% 和 71.7%, 表明了 m 区的变异性。

vacA 基因存在于所有 Hp 中^[1], 但只有部分菌株有空泡毒性, 其表达差异与 vacA 基因型的不同有关, 采用 HeLa 细胞检测 Hp VacA 的细胞毒作用, 发现 s1/m1 型毒力强, s1/m2 型毒力较低或无^[2], 但用 RK-13 细胞或原代培养胃上皮细胞检测, s1/m2 型 Hp 仍表现出较高的细胞毒作用^[12]。在本研究中, 我们用 HeLa、RK-13、SGC-7901 三种细胞检测浙江人群不同 vacA 基因型 Hp 菌株的空泡毒性, 发现所有 5 株 s1a/m1 型、21 株 s1a/m1b 型和 1 株 s1a/m1b-m2 型 Hp 对三种细胞均有明显的空泡毒作用; 仅 27.9% (12/43) 的 s1a/m2 型菌株对 HeLa 细胞表

现为空泡毒作用,但有 65.1% (28/43)和 62.8% (27/43)的菌株对 RK-13 细胞和 SGC-7901 细胞有空泡毒作用。s1a/m1b 型和 s1a/m1b-m2 型 Hp 菌株其空泡毒性强度介于 m1 和 m2 型之间。同一 vacA 基因型对不同细胞系其产生的空泡毒作用不相同,对同一细胞产生空泡毒作用的强度也有差异。这种差异可能与不同菌株毒素分泌量不同有关,也可能与不同菌株的 VacA 结构差异,与不同细胞的受体结合能力不同以致进入细胞内的毒素水平不同有关。RK-13 和人胃上皮细胞表达 m1 和 m2 受体,而 HeLa 细胞仅表达 m1 受体,故仅用 HeLa 细胞检测 Hp 菌株的细胞毒作用有局限性,RK-13 和 SGC-7901 更适于检测本地区 Hp 菌株的细胞毒性。m2 型菌株在 RK-13 和人胃上皮细胞中也显示有较高的空泡毒性,表明了 m2 型 Hp 菌株的致病性,可部分解释 m2 型 Hp 在中国 PU 患者中的高检出率。尽管浙江地区分离的 Hp 菌株 vacA 基因型与疾病的严重程度无显著相关^[3],但分析相应菌株的空泡毒性却发现:PU 组感染的 Hp 空泡毒性总体强于 CG 组,感染高毒力株可能更易导致 PU 的发生。

参 考 文 献

- 1 Cover TL. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol, 1996, 20: 241-246.
- 2 Atherton JC, Cao P, Richard MPJ, et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. J Biol Chem, 1995, 270:

- 17771-17777.
- 3 陈学军,严杰,毛亚飞,等. 浙江人群幽门螺杆菌 *cagA/vacA* 优势基因型和不同基因型混合感染的调查. 中华流行病学杂志, 2003, 24: 1031-1035.
- 4 Ito Y, Azuma T, Ito S, et al. Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. J Clin Microbiol, 1997, 35: 1710-1714.
- 5 Van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, et al. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology, 1999, 116: 823-830.
- 6 何瑶,胡品津,何兴祥,等. 幽门螺杆菌 *cagA*、*vacA* 基因的调查及其临床意义. 中华内科杂志, 2000, 39: 818-820.
- 7 张允历,刘厚钰,周康. 幽门螺杆菌 *vacA* 基因型及其表达产物与胃十二指肠疾病关系的研究. 中华消化杂志, 2000, 20: 89-91.
- 8 Cover TL, Tummurn MKR, Cao P, et al. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. J Biol Chem, 1994, 269: 10566-10573.
- 9 侯鹏,许国铭,李兆申,等. 幽门螺杆菌空泡毒素活性与相关胃肠疾病的研究. 中华消化杂志, 2001, 21: 571-572.
- 10 Pan ZJ, Berg DE, van Hulst D, 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.
- 11 Strobel S, Bereswill S, Balig P, et al. Identification and analysis of a new *vacA* genotype variant of *Helicobacter pylori* in different patient groups in Germany. J Clin Microbiol, 1998, 36: 1285-1289.
- 12 Pagliaccia C, de Bernard M, Lupetti P, et al. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 10212-10217.

(收稿日期:2004-06-10)

(本文编辑:尹廉)

· 征 稿 通 知 ·

“中国 SARS 流行病学研究国际研讨会”征文

由欧盟专项资助军事医学科学院微生物流行病学研究所与荷兰伊拉兹马斯大学医学院联合举办的“中国 SARS 流行病学研究国际研讨会”拟于 2005 年 9 月 18-20 日在北京举行。诚邀从事 SARS 流行病学调查、数据库建立、传播模型构建、危害及控制措施社会经济学评价等相关领域的研究人员出席会议,并欢迎赐稿。稿件格式为全英文摘要(2 页左右),Word 文档、Arial 11 号字体。内容包括:(1)题目、作者、工作单位、研究目标,约 1/2 页;(2)材料和方法,约 1/2 页;(3)结果(可包括表格一张或图形一个),约 3/4 页;(4)结论,约 1/4 页。稿件经大会组委会审核后,收集成册,并颁发证书。稿件投至:anni_yang@yahoo.com,截稿日期为 2005 年 8 月 15 日。如有疑问可电话联系:010-66948578 或 010-66948534,联系人:方立群,或访问网址:www.bmi.ac.cn