

· 论 著 ·

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

刘丽娜, 陈庆明
(武威市人民医院检验科, 甘肃武威 733000)

摘要:目的 分析用不同消化性疾病来源的幽门螺杆菌(Hp)毒力基因的检测结果及其意义。方法 收集该院胃镜室于 2015 年 1 月至 2016 年 7 月采集的 628 例患者胃活检标本, 分离培养 Hp, 检测其携带的毒力基因, 并探讨 Hp 与慢性萎缩性胃炎(CAG)、慢性浅表性胃炎(CSG)、消化性溃疡(PUD)的相关性。结果 628 份胃活检标本中成功分离出 214 株 Hp, 选取其中 172 株提取 DNA, 发现 Hp 携带 cagA、vacA、dupA、iceA、oipA、luxS 多种毒力基因, 其中 vacA s1m1 是 CSG 的危险因素, vacA s1m2 与 iceA1+/iceA2+ 提高 PUD 的发生率, dupA+ 提高十二指肠溃疡危险度。结论 不同消化性疾病与 Hp 感染密切相关, dupA 可考虑作为 Hp 致十二指肠溃疡的标记基因, vacA s1m2 与 iceA1+/iceA2+ 增加了发生 PUD 的危险性。

关键词: 消化性疾病; 幽门螺杆菌; 毒力基因
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 15. 025 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2017)15-2085-03

Study on the types and clinical value of virulence genes of *Helicobacter pylori* from different digestive diseases patients
LIU Lina, CHEN Qingming
(Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Wuwei City, Wuwei, Gansu 733000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical value and pathogenic mechanism of virulence genes of *Helicobacter pylori* from different sources of digestive diseases patients. **Methods** From January 2015 to July 2016, 628 cases of gastric biopsy samples were collected from gastroscopy room of People's Hospital of Wuwei City, through separating and culturing of *Helicobacter pylori*, detecting of viral virulence genes, to explore the relationship between *Helicobacter pylori* and chronic atrophic gastritis (CAG), chronic superficial gastritis (CSG), peptic ulcer (PUD). **Results** Among the 628 gastric biopsy specimens, 214 cases of *Helicobacter pylori* were successfully isolated, and 172 strains were selected to extracting DNA, which contained various virulence genes of cagA, vacA, dupA, iceA, oipA and luxS. VacA s1m1 was a risk factor for CSG, VacA s1m2 and iceA1+/iceA2+ increased the incidence of PUD, DupA + increased the risk of duodenal ulcer. **Conclusion** Different digestive diseases and Hp infection were related closely, dupA was considered as Hp induced duodenal ulcer marker gene, vacA s1m2 and iceA1+/iceA2+ increased the risk of PUD.

Key words: digestive diseases; helicobacter pylori; virulence genes

幽门螺杆菌(Hp)是临床感染较高的细菌之一,也是诱发消化性溃疡(PUD)、胃炎、胃癌等的重要致病因子^[1-3]。全球约超过 50% 人口感染 Hp, 而其中发生消化性疾病的比例约 20%。Hp 其发病机制尚未明确, 但有研究认为 Hp 与细菌基因高度多态性, 环境, 以及宿主生活方式等因素密切相关^[4]。基于此, 本研究探讨了 Hp 与慢性萎缩性胃炎(CAG)、慢性浅表性胃炎(CSG)、PUD 的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院胃镜室于 2015 年 1 月至 2016 年 7 月采集的 628 例患者胃活检标本, 其中男 301 例, 年龄 39~72 岁, 平均(52.87±12.39)岁; 女 327 例, 年龄 41~73 岁, 平均(53.93±12.07)岁。本研究经本院伦理委员会批准。

1.2 纳入及排除标准 (1) 纳入标准: 未实施胃大部分切除术, 经胃黏膜活检或胃镜检查显示胃黏膜组织完整者^[5]; 存在消化性症状者, 如消化不良、上腹部灼烧感或疼痛感、早饱感、餐后上腹胀饱感等临床表现, 可伴有嗝气、呕吐、恶心、食欲不振等症^[6]。(2) 排除标准: 已接受 Hp 根除治疗者; 内镜检查显示存在活动性出血、胃穿孔者; 哺乳期或孕期患者; 近 1 个月接受抗菌药物、质子泵抑制剂、铋剂、H₂ 受体拮抗剂者; 存在严重心脏、肝脏、肾脏、呼吸系统等疾病, 或其他影响本研究结果因素者^[7]; 同时服用非甾体抗炎药物、酗酒者; 因神经系统疾病

导致不能正常交流或存在意识障碍者^[8]。

1.3 方法

1.3.1 获取胃黏膜组织 于内镜直视下, 距幽门前 3 cm 处采用灭菌活检钳取 1 块胃黏膜组织, 0.5 cm×0.5 cm, 放入 0.9% 生理盐水中, 在 4 h 内送至实验室。

1.3.2 培养、鉴定细菌及其 DNA 提取 充分研磨胃黏膜组织, 采用无菌滴管将组织混悬液进行接种, 并置于 Hp 选择性培养基, 放于湿度大于 95%、35℃ 环境下, 培养 7 d^[9-10]。选取疑似 Hp 菌落进行镜检及革兰染色, Hp 呈革兰阴性钩状、海鸥状, 触酶、氧化酶等试验结果为阳性^[11]。标本中分离出 214 株 Hp, 选取其中 172 株提取 DNA。

1.3.3 Hp 毒力基因型引物 共检测出 6 种重要毒力基因(cagA、vacA、dupA、iceA、oipA、luxS), 基因型见表 1。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行数据处理及统计分析, 计数资料用例数或百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 采用二元 Logistic 回归分析对 Hp 毒力基因与消化道疾病的相关性进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 毒力基因检出情况 172 株 Hp 临床分离菌株均检测出 vacA、oipA 及 luxS, 未发现 vacA s2 基因型, 而 vacA s1 阳性率为 100.00%; vacA m2 阳性率为 69.19% (119/172), vacA m1

阳性率为 30.81%(53/172),故 vacA m1 与 vacA m2 呈互补关系;iceA 基因阳性率为 97.67%(168/172),iceA1+基因型 129 例(75.00%),iceA2+基因型 80 例,检出率为 46.50%;dupA 阳性率为 33.14%(57/172)。见表 2。

表 1 Hp 毒力基因型及引物序列

基因	引物序列(5'→3')	片段大小(bp)
cagA	R TTG TTG CCG CTT TTG CTC TC	400
	F AAT ACA CCA ACG CCT CCA AG	
vacA s1	R CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	258
	F ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC	
vacA s2	R CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	286
	F ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC	
vacA m1	R GCG TCA AAA TAA TTC CAA GG	567
	F CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG	
vacA m2	R GCG TCA AAA TAA TTC CAA GG	642
	F CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG	
dupA	R TTA AAT ACT CTT CCT TAT AAG	1 839
	F ATG AGT TCT ATT AAC AG	
iceA1	R CTA TAG CCA STY TCT TTG CA	247
	F GTG TTT TTA ACC AAA GTA TC	
iceA2	R TTR CCC TAT TTT CTA GTA GGT	229/334
	F GTT GGG TAT ATC ACA ATT TAT	
luxS	R CAC ATG GAC ATG CCT AGC CT	261
	F CTG TGC GCC CTC TAA AGT GT	
oipA	R TTA GCG TCT AGC GTT CTG CC	519
	F CGC GGA AAG GAA CGG GTT TT	

表 2 Hp 临床分离菌株的毒力基因检出情况分析

毒力基因	检出的例数(n)	检出率(%)
cagA		
cagA—	3	1.74
cagA+	169	98.26
vacA		
s1+	172	100.00
s2+	0	0.00
s1s2	0	0.00
m1+	53	30.81
m2+	119	69.19
m1m2	0	0.00
s1m1	53	30.81
s1m2	119	69.19
s2m1	0	0.00
s2m2	0	0.00
dupA		
dupA—	115	66.86
dupA+	57	33.14
iceA		
iceA1+	129	75.00
iceA2+	80	46.50
iceA1+/iceA2—	86	50.0

续表 2 Hp 临床分离菌株的毒力基因检出情况分析

毒力基因	检出的例数(n)	检出率(%)
iceA1—/iceA2+	39	22.67
iceA1+/iceA2+	41	23.84
iceA1—/iceA2—	7	4.07
luxS		
luxS—	0	0.00
luxS+	172	100.00
oipA		
oipA—	0	0.00
oipA+	172	100.00

2.2 临床特征与 Hp 毒力基因型相关性 通过二元 Logistic 回归分析结果显示,比较 CAG 与 CSG 发生时,iceA1+/iceA2+为 CSG 的危险因素(OR=0.108,95%CI 为 0.020~0.598);在对比 PUD、CSG 发生时,vacA s1m1/iceA2 为 CSG 的危险因素(OR=0.097,95%CI 为 0.011~0.915),vacA s1m1 为 CSG 的危险因素(OR=0.089,95%CI 为 0.016~0.497),随 vacA s1m2 的出现 PUD 危险度上升(OR=11.424,95%CI 为 2.013~21.676);比较 PUD 与 CAG 发生时,vacA s1m2 是 PUD 的危险因素(OR=3.621,95%CI 为 1.059~12.452),vacA s1m1 与之相反;vacA s1m2 与 iceA2 同时存在明显提高了 PUD 的发生率(OR=3.841,95%CI 为 1.327~11.028);iceA1 与 iceA2 同时出现,增加了 PUD 的危险度(OR=4.478,95%CI 为 1.216~16.439);比较 PUD 不同类型(十二指肠溃疡、胃溃疡、胃十二指肠复合溃疡)发生时,dupA+的感染提高十二指肠溃疡危险度(OR=2.799,95%CI 为 1.016~6.511)。

3 讨 论

据世界卫生组织(WHO)统计数据显示,自然人群 Hp 的感染率处于比较高的水平。全世界约有超过 30 亿以上的人口感染 Hp,其中感染后出现不同程度消化性疾病的人群比例约占 20%。Hp 致病机制复杂,针对其研究尚处于初级阶段,目前临床中仍未有确切的结论。感染 Hp 后是否出现临床症状不仅同感染人群的遗传基因、生活习惯和环境密切相关,还与 Hp 病毒基因毒力多态性所导致的不同菌株差异性关系密切。Hp 属于微厌氧革兰阴性菌,形状呈螺旋形、S 形及弧形等,能够在人体胃黏膜中定植和生存,是目前证实唯一在人体胃部器官中生存的微生物种类。Hp 对于生长条件的要求非常苛刻,需要寄生在胃黏膜表面的黏液膜上皮这样相对中性的环境中才能生存。研究发现,Hp 会通过人体胃黏膜内释放蛋白酶、细胞毒素及磷脂酶等物质造成人体胃部组织的病理变化,从而增加淋巴增生性胃淋巴瘤、GAG、GSG、PUD 等的发病风险,最终导致胃癌,危及生命。

近些年来,Hp 感染后临床表现多样化,且具有较高的致病性已得到临床高度重视^[12]。大量临床实践显示,环境、宿主等因素在一定程度上影响着 PUD、慢性活动性胃炎等疾病的发生及严重程度,且与 Hp 各种毒力因子的遗传多样性有关^[13-14]。故对 Hp 毒力基因进行合理检测,并对不同消化性疾病与基因组合或基因型的相关性实施分析,有助于预测临床疾病的风险及判定预后^[15]。

研究显示,不同致病性 Hp 的毒力及结构也存在较大差异。本研究从胃活检标本中分离出 214 株 Hp,携带 cagA、va-

cA, dupA, iceA, oipA, luxS 多种毒力基因^[16-17]。其中 cagA 基因可作为影响 Hp 感染结局的标记因子,其编码的 cagA 蛋白属于致癌蛋白之一,在 Hp 致病机制中发挥着重要作用^[18]。vacA 可延缓胃上皮修复,导致胃黏膜受损,且对胃上皮细胞可产生直接毒性作用,在所有 Hp 中均存在其编码基因 vacA,而只有一半的菌株存在 vacA 蛋白表达^[19]。oipA 与细菌定植密度、Hp 感染后临床症状、高含量白细胞介素-8(IL-8)水平、严重中性粒细胞浸润等有关^[20]。iceA 编码基因分为 2 个等位基因,包括 iceA1、iceA2,在胃黏膜上皮细胞与 Hp 接触后 iceA1 基因会出现上调表达^[21]。luxS 与形成 Hp 特异性生物膜有高度相关性。本研究结果发现,97.67% 的 Hp 分离株携带了 cagA 基因,得出 Hp 的致病性及毒力差异可能不是携带毒力基因的累加而导致。vacA s1m1 是 CSG 的危险因素, vacA s1m2 与 iceA1+/iceA2+ 会增高 PUD 的发生率, dupA+ 会提高十二指肠溃疡危险度。与樊艳华等^[22]研究结果相似,充分证实检测 Hp 毒力基因型有利于为诊断相关疾病、判定幽门杆菌分型提供依据。

综上所述,不同消化性疾病与 Hp 感染呈密切相关, dupA 可考虑作为 Hp 致十二指肠溃疡的标记基因, vacA s1m2 与 iceA1+/iceA2+ 增加了 PUD 的危险性。

参考文献

- [1] 邱新萍,王洪,邹济源,等. 清利化浊方联合铋剂四联治疗幽门螺杆菌相关慢性非萎缩性胃炎脾胃湿热证 40 例临床观察[J]. 中医杂志, 2016, 57(5): 405-408.
- [2] Costa DM, Pereira RS, Rabenhorst SH. What exists beyond cagA and vacAP Helicobacter pylori genes in gastric diseases [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(37): 10563-10572.
- [3] Sound N, Kargar M, Doosti A, et al. Genetic analysis of caga and vac a genes in Helicobacter pylori isolates and their relationship with gastroduodenal diseases in the west of iran[J]. Iran Red Crescent Med J, 2013, 15(5): 371-375.
- [4] 汪望月,陈光兰,任玲玲,等. 浙江省丽水地区幽门螺杆菌临床分离株耐药性分析[J]. 浙江临床医学, 2016, 18(10): 1903-1905.
- [5] Almeida N, Donato MM, Romaozinho JM, et al. Correlation of Helicobacter pylorigenotypes with gastric histopathology in the central region of a South-European country [J]. Dig Dis Sci, 2015, 60(1): 74-85.
- [6] Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T, et al. Distinct diversity of vacA, cagA and cagE genes of Helicobacter pylori associated with peptic ulcer in Japan [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 3906-3916.
- [7] 高仕霖,张连峰,时永全. 幽门螺杆菌感染相关胃外疾病研究进展[J]. 中华消化杂志, 2016, 36(1): 65-67.
- [8] 张颖,江勇. 幽门螺杆菌与代谢疾病相关性的研究进展[J]. 中华全科医师杂志, 2016, 15(4): 310-313.
- [9] Ferreira RM, Machado JC, Leite M, et al. The number of Helicobacter pylori CagA EPIYA C tyrosine phosphorylation motifs influences the pattern of gastritis and the development of gastric carcinoma[J]. Histopathology, 2012,

60(6): 992-998.

- [10] 袁芳,李春鸣,王利锋,等. 胃癌中人端粒保护蛋白 1 的表达及其与幽门螺杆菌感染的相关性研究[J]. 肿瘤研究与临床, 2016, 28(3): 165-168.
- [11] Alikhani MY, Arebestani MR, Sayedin KM, et al. Evaluation of helicobacter pylori vaca and caga genotypes and correlation with clinical outcome in patients with dyspepsia in Hamadan Province Iran[J]. Iran Red Crescent Med J, 2014, 16(11): 19-27.
- [12] Eng NF, Ybazeta G, Chapman K, et al. Antimicrobial susceptibility of canadian isolates of Helicobacter pylori in Northeastern Ontario[J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2015, 26(3): 137-144.
- [13] Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, et al. Mutations in penicillin-binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in Helicobacter pylori [J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61(5): 995-998.
- [14] Zhang XS, Tegtmeyer N, Traube L, et al. A specific A/T polymorphism in Western tyrosine phosphorylation B-motifs regulates Helicobacter pylori CagA epithelial cell interactions[J]. PLoS Pathlog, 2015, 11(2): 100-110.
- [15] 孙新超,秦旭,张德洋,等. 老年患者胃黏膜不同病理形态幽门螺杆菌感染相关性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(17): 3881-3882.
- [16] Vaziri F, Najar Peerayeh S, Alebouyeh M, et al. Determination of Helicobacter pylori CagA EPIYA types in Iranian isolates with different gastroduodenal disorders[J]. Infect Genet Evol, 2013, 17(10): 101-105.
- [17] Mierny K, Morris J, Bruden D, et al. Characterization of Helicobacter pylori cagA and vacA genotypes among Alaskans and their correlation with clinical disease[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(9): 3114-3121.
- [18] Vannarath S, Vilaichone RK, Rasachak B, et al. Virulence Genes of Helicobacter pylori in gastritis, peptic ulcer and gastric cancer in laos[J]. Asian Pac J Cancer P, 2014, 15(20): 9027-9031.
- [19] Breurec S, Michel R, Seck A, et al. Clinical relevance of caga and vaca gene polymorphisms in helicobacter pylori isolates from senegalase patients[J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(2): 153-159.
- [20] 骆泉,赵洁,徐关根,等. 幽门螺杆菌感染与不同胃炎及病理之间的关系[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(11): 2476-2478.
- [21] Naguyev T, Yula E, Abayli B, et al. Prevalence and genotypes of helicobacter pylori in gastric biopsy specimens from patients with gastroduodenal pathologies in the cukurova region of turkey[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(12): 4150-4153.
- [22] 樊艳华,刘积庆,刘继喜,等. 内镜下根据胃黏膜形态判断幽门螺杆菌感染的临床价值[J]. 中日友好医院学报, 2016, 30(5): 267-269.