

贵州省幽门螺杆菌 CagA 基因表达与甲硝唑耐药性^{*}

李大欢¹, 刘娅琳¹, 周 力¹, 车筑平¹, 谭庆华¹, 陈峥宏², 刘 苓^{1**}

(1. 贵阳医学院附院 消化内科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院 微生物学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 探讨贵州地区上消化道疾病患者幽门螺杆菌(*H. pylori*) 细胞毒素相关蛋白(CagA) 基因的表达及其与甲硝唑(MTZ) 耐药的相关性。方法: 从上消化道疾病患者胃黏膜分离 50 株 *H. pylori*, 经聚合酶链反应(PCR) 检测 CagA 基因, E-test 法检测 MTZ 耐药情况, 测序并应用 BLAST 分析 MTZ 敏感株(MTZS) 与耐药株(MTZR) CagA 基因的分子差异。结果: 50 株 *H. pylori* 中有 92% 的菌株表达 CagA, 其阳性表达率在消化性溃疡患者与慢性胃炎患者无差异; 50 株 *H. pylori* 对 MTZ 总耐药率为 54%, CagA 阳性及阴性菌株耐药率分别为 54.3% 及 50.0% ($P > 0.05$); 基因测序结果显示 MTZS 及 MTZR 两组间 CagA 基因突变无统计学差异。结论: 贵州地区 CagA 阳性菌株与上消化道疾病密切相关, 但与疾病的严重程度无明显关系, CagA 基因表达及基因变异与 MTZ 耐药性之间无明显关系。

[关键词] 螺杆菌, 幽门; 基因; 甲硝唑; 药物耐受; 细菌

[中图分类号] R517.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)03-0255-04

CagA Gene Expression in *Helicobacter pylori* and Its Relationship with Metronidazole Resistance in Guizhou Province

LI Dahuan¹, LIU Yalin¹, ZHOU Li¹, CHE Zhuping¹, TAN Qinghua¹, CHEN Zhenghong², LIU Ling¹

(1. Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Department of Microbiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression of cytotoxin associated protein (CagA) gene in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) in patients with upper gastrointestinal diseases, and to observe the relationship of CagA gene with metronidazole resistance in Guizhou province. **Methods:** Fifty *H. pylori* strains were isolated from gastric mucosa of patients with upper gastrointestinal diseases. CagA gene expression in *H. pylori* was detected with PCR, and metronidazole resistance was determined by E-test. Differences in CagA gene sequences between metronidazole-sensitive (MTZS) strains and metronidazole-resistance (MTZR) strains were analyzed. **Results:** 92% *H. pylori* strains expressed CagA gene. There was no significant difference in positive expression rate of CagA gene between patients with peptic ulcer and chronic gastritis. MTZR rate of 50 *H. pylori* strains was 54%. MTZR rates of CagA⁺ strains and CagA⁻ strains were 54.3% and 50.0% respectively ($P > 0.05$). Gene sequencing and analysis results showed that there was no significant difference in CagA gene mutation between MTZR and MTZR strains. **Conclusions:** CagA positive expression strain is closely related to upper gastrointestinal disease in Guizhou province, but not related to severity of disease. CagA gene expression or gene mutation is not related with metronidazole resistance.

[Key words] *Helicobacter pylori*; gene; metronidazole; drug resistance, bacterial

^{*} [基金项目] 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金(2008-94)。

^{**} 通讯作者 E-mail: lingzipurple@163.com

CagA (Cytotoxin-associated antigen, CagA) 是 *H. pylori* 主要的毒力因子之一, 编码毒素相关蛋白与 *H. pylori* 毒力及致病密切相关, CagA 基因表达存在明显的地域差异^[1]。我国 *H. pylori* 学组于 2005 年 3 月~2006 年 5 月完成了一项涉及全国 16 个省市、包括 20 多个中心的大规模 *H. pylori* 与甲硝唑 (Metronidazole, MTZ) 耐药流行病学调查和耐药原因分析, 结果显示 *H. pylori* 对甲硝唑的耐药率为 50%~100% (平均 73.3%), 提示 *H. pylori* 对抗生素的耐药率存在地区差异^[2]。本研究从贵州省上消化道疾病患者胃黏膜成功分离并保存 50 个 *H. pylori* 菌株进行 CagA 基因检测与 MTZ 耐药性测定, 首次在贵州地区探讨 *H. pylori* CagA 基因表达、MTZ 耐药及两者的相关性, 并为制定本地区幽门螺杆菌根除方案提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株 参见胡林^[3]等人的《贵州省幽门螺杆菌临床菌株的分离培养》方法获得 50 株 *H. pylori* 临床分离株, 其中 28 株来自慢性胃炎 (CG) 患者, 22 株来自消化性溃疡 (PU) 患者。男性 22 例, 女性 28 例, 平均 46.42 岁。幽门螺杆菌标准菌株 (NCTC11637) 由贵阳医学院微生物教研室陈峥宏副教授馈赠。

1.2 主要器材与试剂盒 奥林巴斯 GIF-XQ-260 胃镜 (日本)、快速尿素酶试纸 (珠海)、幽门螺杆菌选择添加剂 (9.5 mg 添加剂中万古霉素 2.5 mg, 三甲氧苄氨嘧啶乳酸盐 3.0 mg, 两性霉素 2.0 mg, 多黏菌素 B 2.0 mg) (Sigma, USA); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、大量 DNA 产物纯化试剂盒、MICE 试验条 甲硝唑 (OXOID, UK) 及 2 × Taq PCR Master-Mix 均为天根生化科技产品。

1.3 E-test 用接种环挑取经革兰染色及生化鉴定已证实的 *H. pylori* 良好菌落, 接种在培养基上, 将甲硝唑药敏试纸条放置于培养基正中, 培养 3 d, 观察抑菌情况, 并直接读取 MIC 值, 以 MIC > 8 μg/L 为甲硝唑耐药。

1.4 *H. pylori* 细菌 DNA 提取 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 严格按说明书操作, 冻存于 -20℃ 备用。

1.5 RT-PCR 检测 上游序列 CCACAATA-ACGCTCTGTCTTCTG, 下游序列 TCTCAC CACCTGC TATGA CTAAC, 扩增产物 215 bp, 由上海捷瑞

生物工程有限公司设计并合成。热循环条件: 94℃ 5 min (预变性), 94℃ 1 min (变性), 60℃ 1 min (退火), 72℃ 1 min (延伸), 72℃ 10 min (延伸), 总循环 30 次。PCR 反应体系为 25 μl, 包括上下游引物各 1 μl、模板 2 μl、PCR MasterMix 12.5 μl、水 8.5 μl, 热循环结束后, 取 PCR 扩增产物 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳 (1.5%, 90 mV, 30 min), 在凝胶成像系统下观察照相, 记录结果。余 20 μl PCR 反应产物于 4℃ 保存备用。

1.6 *H. pylori* CagA 基因片段 PCR 产物纯化 随机选取 MTZR 和 MTZS 各 5 株, 使用大量 DNA 产物纯化试剂盒进行纯化, 具体操作步骤严格按说明书执行。将纯化后产物送至北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。

1.7 统计学方法 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS17.0 进行统计分析, 资料符合正态分布及方差齐应用 *t* 检验; 计数资料以率表示, 率的比较采用 χ^2 检验, 检验水准为 0.05; 采用 BLAST 分析基因片段。

2 结果

2.1 CagA 基因表达 CagA 在上消化道疾病的表达率为 92% (46/50), 其中消化性溃疡患者感染的菌株 CagA 表达阳性率为 90.9% (20/22), 慢性胃炎患者感染的菌株 CagA 表达阳性率为 92.9% (26/28), 两者差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.07, P > 0.05$), 见表 1。

表 1 *H. pylori* 菌株 CagA 基因型在不同疾病中的表达比较

Tab. 1 Comparison of CagA gene expression in *H. pylori* strains between different diseases

指标	CG	PU	合计	检出率 (%)
CagA ⁺	26	20	46	92
CagA ⁻	2	2	4	8
合计	28	22	50	100

注: CG 为慢性胃炎, PU 为消化性溃疡。

2.2 CagA 基因型与甲硝唑耐药的关系 50 例患者中甲硝唑的耐药率为 54% (27/50), 其中 CagA 阳性菌株中耐药率为 54.3% (25/46), CagA 阴性菌株的耐药率为 50% (2/4), 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.13, P > 0.05$), 见表 2。

表 2 H pylori 菌株 CagA 基因型与甲硝唑耐药率的关系
Tab. 2 The relationship between H pylori strains CagA genotype and metronidazole resistance

指标	甲硝唑		合计	耐药率(%)
	敏感	耐药		
CagA ⁺	21	25	46	54.3
CagA ⁻	2	2	4	50.0
合计	23	27	50	

2.3 CagA 基因甲硝唑耐药菌株及敏感菌株的比较 50 株临床菌株与标准菌株 NCTC11637 经特征性基因片段扩增出 CagA 基因,扩增产物电泳比较显示,CagA 基因阳性患者无论是 MTZ 耐药或敏感,其电泳结果与对照组一致,见图 1。将 5 株 MTZS 及 5 株 MTZR 菌株测序后,通过 BLAST 分别与标准菌株 J99 CagA 进行同源性比较,分别为 (94.40±3.21)%, (94.40±2.07)%,经 t 检验分析两者间差异无统计学意义 (t=0.00, P>0.05)。5 株 MTZS 与标准株 J99 比较,点突变引起的共 43 次碱基置换中 C—T 20 次、T—C16 次、G—A 2 次、A—G 5 次,插入 1 次,缺失 1 次;5 株 MTZR 与标准株 J99 比较,点突变引起的共 44 处碱基置换中 C—T 18 次、T—C13 次、G—A 3 次、A—G 9 次,插入 2 次,缺失 3 次;两者点突变形式进行比较,差异无统计学意义 ($\chi^2=1.193, P>0.05$)。点突变中以置换突变为主,将置换突变形式进行比较,差异也无统计学意义 ($\chi^2=1.807, P>0.05$)。



注:泳道 1 为阴性对照,泳道 2 为标准菌株 NCTC11637 阳性对照 (Positive control);泳道 3~5 显示 CagA 基因的 PCR 产物 (215 bp),其中泳道 3、4 为甲硝唑耐药菌株 (MTZR),泳道 5 为甲硝唑敏感菌株 (MTZS)。

图 1 H pylori 菌株 CagA 基因凝胶电泳结果
Fig. 1 Gel electrophoresis results of H pylori strains CagA gene

3 讨论

CagA 的表达有明显地域差异,CagA 表达与疾病的相关性研究将有助于临床根除策略的制定。在西方国家分离的 H pylori 菌株中 60%~70% 表现为 CagA 阳性,并认为其与萎缩性胃炎、消化性溃疡和胃癌的发生密切相关^[1]。亚洲国家的研究结果显示 H pylori CagA 基因表达阳性率高于 90%,部分近期文献报道 CagA 基因与宿主疾病严重程度不相关^[4]。东西方国家研究结果的差异可能是因为 H pylori CagA 基因在不同地区呈现高度多态性,从而影响 CagA 功能的发挥。H pylori 菌株 CagA 基因的地域差异性决定了 H pylori 地区性研究的必要性。贵州省是高 H pylori 感染区,因上消化道症状就诊患者的 H pylori 感染率高达 82.5%^[5],但对胃黏膜 H pylori CagA 的表达既往未见报道。本研究对 H pylori CagA 基因进行 PCR 检测,结果显示 50 例 H pylori 菌株的 CagA 阳性率为 92%,进一步的临床相关性分析显示 CagA 基因表达在消化性溃疡和慢性胃炎之间没有显著差异,与国内学者报道一致^[6]。

MTZ 属硝基咪唑类药物,因其杀菌活性不受胃内低 pH 值的影响,在胃腔内浓度高,具有较强的抗 H pylori 活性,而且价格低廉,成为抗 H pylori 常用药物之一。但随着 MTZ 的广泛应用,使 H pylori 菌株对 MTZ 耐药逐年增加。H pylori 对 MTZ 的耐药是全球性的,不同国家和地区的耐药率也存在明显差异^[2],本实验用 E-test 法测得贵州地区 H pylori 对 MTZ 耐药率为 54%。目前认为 H pylori 基本上可分成两类:一类是 CagA 阳性株 (CagA I),为高毒力株,有 CagA 蛋白表达;另一类是 CagA 阴性株 (CagA II),为低毒力株,无 CagA 蛋白表达。CagA I 型常被认为含有更多毒性,能促进胃炎症因子如 IL-1、IL-8 的分泌,从而引起更为严重的炎症反应^[7]。Taneike 等^[8]研究发现 CagA II 型菌株的 MTZ 耐药率大大高于 CagA I 型,并认为无 CagA 蛋白的表达可能是 MTZ 耐药的一个危险因素。本实验中 CagA I 型菌株耐药率为 54.3% (25/46),CagA II 型耐药率为 50% (2/4),两者差异无显著性,认为不同的 CagA 基因型表达与 MTZ 耐药性无明显关系,这与国内李素艳^[9]等的报道一致。

国内外目前很少有文献报道 CagA 基因变异与 MTZ 耐药性的关系。本实验通过对 MTZS 及

MTZR CagA 基因扩增片段凝胶电泳结果显示,无论是 MTZR 或 MTZS 都呈一条均一大小的片段,未能明显区分两者的差异性,说明其耐药机制并非大片段的插入、置换或缺失,而是只存在小片段点突变、置换等可能。进一步随机选取 MTZS、MTZR 各 5 株与标准菌株 J99 CagA 基因序列进行同源性比较,并且就其同源性比较结果再进一步做突变形式的比较,发现不同株的 MTZS、MTZR 在 CagA 基因片段均存在 6% 左右的突变,且均以点突变形式为主,其中以置换突变为甚,两组间无统计学差异。就置换突变的类型进行比较,虽然两组间亦无明显差异,但发现在 CagA 基因位点 963、1034 上出现 C—T 的置换在 MTZR 5/5 次,MTZS 5/5 次;1039 位点上 C—T 的置换在 MTZR 5/5 次,MTZS3/5 次;972—973 位点上出现 T—C 的置换在 MTZR 4/5 次,MTZS 4/5 次,这可能是本地区 CagA 基因型的特点。

本研究首次报告在贵州地区 CagA 与上消化道疾病有密切关系,但其与疾病的严重程度并无明显关系,H pylori 对甲硝唑耐药率为 54%,CagA 基因表达及其基因变异与 MTZ 耐药性之间无明显的关系。

4 参考文献

- [1] Watada M, Shiota S, Matsunari O, et al. Association between *Helicobacter pylori* cagA - related genes and clinical outcomes in Colombia and Japan[J]. BMC Gastroenterol, 2011(1):141.
- [2] 中华医学会消化病学分会,幽门螺杆菌学组/幽门螺杆菌科研协作组. 第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识报告[J]. 现代消化及介入诊疗,2008(1):42—46.
- [3] 胡林,刘苓,谭庆华,等. 贵州省幽门螺杆菌临床菌株的分离培养[J]. 世界华人消化杂志,2009(27):2830—2834.
- [4] Talebi Bezmin Abadi A, Rafiei A, Ajami A, et al. *Helicobacter pylori* homB, but not cagA, is associated with gastric cancer in Iran[J]. J Clin Microbiol, 2011(9):3191—3197.
- [5] 刘娅琳,李大欢,胡林,等. 幽门螺杆菌细菌培养与尿素酶试验对幽门螺杆菌检测敏感性比较[J]. 贵阳医学院学报,2011(2):147—150.
- [6] 官月华,柳云恩,孙丽萍,等. 中国辽宁地区人群幽门螺杆菌感染菌株与相关性胃疾病的关系[J]. 世界华人消化杂志,2007(33):3462—3467.
- [7] Suqimoto M, Yamaoka Y. Virulence factor genotypes of *Helicobacter pylori* affect cure rates of eradication therapy [J]. Arch Immunol Ther Exp, 2009(1):45—56.
- [8] Taneike I, Nami A, O'Connor A, et al. Analysis of drug resistance and virulence - factor genotypes of Irish *Helicobacter pylori* strains: is there any relationship between resistance to metronidazole and CagA status[J]. Pharmacol Ther, 2009(7):784—790.
- [9] 李素艳,唐国都,黄杰安,等. 广西地区幽门螺杆菌 CagA 基因表达及其耐药性[J]. 世界华人消化杂志,2008(18):2072—2075.
- (2012—03—10 收稿,2012—05—12 修回)
- 编辑:周 凌
-
- (上接第 237 页)
- [2] 杨秉辉,丛文铭,周晓军,等. 原发性肝癌规范化诊治专家共识[J]. 临床肿瘤学杂志, 2009(3):259—269.
- [3] S Sell. Mouse models to study the interaction of risk factors for human liver cancer[J]. Cancer Research, 2003(22):7553—7562.
- [4] Ma S, Chan KW, Hu L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells [J]. Gastroenterology, 2007(7):2542—2556.
- [5] Reya T, Morrison SJ, Clarke M F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001(6859):105—111.
- [6] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance [J]. Nat Rev Cancer, 2005(4):275—284.
- [7] Yoshida M, Suzuki T, Komiya T, et al. Induction of MRP5 and SMRP mRNA by adriamycin exposure and its overexpression in human lung cancer cells resistant to adriamycin [J]. Int J Cancer, 2001(3):432—437.
- [8] Livingston D M, Silver D P. Cancer: crossing over to drug resistance [J]. Nature 2008(7182):1066—1067.
- [9] Chamber I, Silva J, Colby D, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development [J]. Nature, 2007(450):1230—1235.
- [10] Kuphal F, Behrens J. E-cadherin modulates Wnt-dependent transcription in colorectal cancer cells but does not alter Wnt-independent gene expression in fibroblasts [J]. Exp Cell Res, 2006(4):457.
- [11] 周文波,邹灿,张有顺,等. Oct4 及 Wnt/ β -Catenin 在肝癌中的表达及相互作用[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2010(4):501—505.
- (2012—02—28 收稿,2012—04—11 修回)
- 编辑:潘 娅