

广西地区幽门螺杆菌CagA基因表达及其耐药性

李素艳, 唐国都, 黄杰安, 朱莲娜, 覃锦耀

■背景资料

研究发现, 胰腺腺泡细胞凋亡或坏死的不同死亡方式对急性胰腺炎(AP)病情轻重起着重要作用, 腺泡细胞的凋亡可能是AP时机体的自我保护性机制而有助于减轻重症程度。与坏死不同, 细胞凋亡的发生受凋亡调控基因控制, 细胞裂解成凋亡小体并保持膜的完整性, 不释放溶酶体酶等细胞内容物, 不引起炎症反应。因此, 深入研究AP腺泡细胞凋亡机制, 对于明确AP病理生理过程及阻止重症化进展具有重要意义。

李素艳, 唐国都, 黄杰安, 朱莲娜, 覃锦耀, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021

作者贡献分布: 李素艳与唐国都对此文所作的贡献均等; 此课题由李素艳, 唐国都及黄杰安设计; 实验过程由李素艳, 黄杰安, 朱莲娜及覃锦耀操作完成; 数据分析和论文写作由李素艳与唐国都完成。

通讯作者: 李素艳, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学一附院干部门诊。lsyhao662008@sina.com

电话: 0771-5356590

收稿日期: 2008-01-22 修回日期: 2008-03-16

Expression of CagA gene in *Helicobacter pylori* among patients of Guangxi Zhuang Autonomous Region and its drug resistance

Su-Yan Li, Guo-Du Tang, Jie-An Huang, Lian-Na Zhu, Jin-Yao Qin

Su-Yan Li, Guo-Du Tang, Jie-An Huang, Lian-Na Zhu, Jin-Yao Qin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Su-Yan Li, Department of Cadre Clinic, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. lsyhao662008@sina.com

Received: 2008-01-22 Revised: 2008-03-16

Abstract

AIM: To determine the expression of CagA gene of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) strains and its resistance to common drugs in Guangxi Zhuang Autonomous Region, and thereby to provide a theoretical basis for clinical diagnosis and treatment.

METHODS: Fifty *H. pylori* strains were isolated and CagA gene of *H. pylori* was amplified using specific primers into 297 bp. *H. pylori* was determined using PCR for CagA gene and E-test was performed to estimate *H. pylori*'s susceptibility.

RESULTS: The expression of CagA in *H. pylori* strains was 76.0% (38/50). There were no significant CagA gene expressional differences between peptic ulcer and chronic gastritis or between female and male. Resistance rates of *H. pylori* strains were as follows: 86.0% (43/50)

to metronidazole, 6.0% (3/50) to clarithromycin and 4.0% (2/50) to tetracycline. There were no *H. pylori* strains resistant to amoxicillin. Resistance to metronidazole was significantly higher than that to other drugs ($P < 0.01$). The percentage of CagA-positive resistant strains was 89.5% (34/38) and that of CagA-negative resistant strains was 75% (9/12). There was no significant difference between CagA-negative and CagA-positive strains.

CONCLUSION: CagA-positive *H. pylori* strains are mainly responsible for gastroenteric diseases. In Guangxi Zhuang Autonomous Region, high susceptibility of *H. pylori* to amoxicillin, clarithromycin and tetracycline indicate that they are drugs of first choice for *H. pylori* eradication therapy. However, as resistance to metronidazole is high, metronidazole should be avoided where possible.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Cytotoxin-associated antigen; Resistance; Polymerase chain reaction; E-test

Li SY, Tang GD, Huang JA, Zhu LN, Qin JY. Expression of CagA gene in *Helicobacter pylori* among patients of Guangxi Zhuang Autonomous Region and its drug resistance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(18): 2072-2075

摘要

目的: 了解广西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)基因的表达情况及其对常用抗生素的敏感性, 为临床诊疗*H. pylori*感染提供理论依据。

方法: 从上消化道疾病患者胃黏膜中分离出50株*H. pylori*, 用特异性引物扩增*H. pylori* CagA基因到297 bp片段, 经聚合酶链反应(PCR)检测, 同时采用E-test法对这50株*H. pylori*进行抗生素敏感试验。

结果: 50株*H. pylori*中有76%(38/50)的菌株有CagA基因, 其表达在消化性溃疡患者与慢性胃炎患者以及男性与女性患者间差异无显著性。50株*H. pylori*对甲硝唑的耐药

■同行评议者

邵先玉, 主任医师, 泰山医学院附属医院消化内科

率为86.0%(43/50), 克拉霉素的耐药率为6.0%(3/50), 四环素的耐药率为4.0%(2/50), 未发现对阿莫西林耐药的菌株. 甲硝唑的耐药率明显高于四环素和克拉霉素的耐药性($P<0.01$). CagA阳性菌株耐药率为89.5%(34/38), CagA阴性菌株的耐药率为75.0%(9/12), 两者比较差异无显著性.

结论: 广西地区CagA阳性菌株是上消化道疾病发生的主要因素. *H pylori*对阿莫西林、克拉霉素和四环素的敏感性较高, 可作为抗*H pylori*的首选药物, 甲硝唑的耐药率高, 临床上治疗*H pylori*感染时应尽量避免使用甲硝唑.

关键词: 幽门螺杆菌; 细胞毒素相关基因蛋白; 耐药率; 聚合酶链反应; E-test药敏试验

李素艳, 唐国都, 黄杰安, 朱莲娜, 覃锦耀. 广西地区幽门螺杆菌CagA基因表达及其耐药性. 世界华人消化杂志 2008; 16(18): 2072-2075

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2072.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)是慢性胃炎、消化性溃疡的重要致病因素, 是胃癌和胃黏膜相关淋巴瘤(MALT)的重要因素之一, WHO已将*H pylori*列为第I类致癌因子. *H pylori*有许多致病因子, 其中鞭毛、尿素酶、细胞毒素相关蛋白(cytotoxin-associated antigen, CagA)、细胞空泡毒素(vacuolating cytotoxin antigen, VacA)、热休克蛋白(heat-shock protein, HSP)、中性粒细胞活性蛋白(neutrophil-acting protein, NAP)等均与致病有关. *H pylori*在人群中感染的广泛性和他的强致病性, 均使人们对他的致病机制和治疗格外关注. 由于*H pylori*感染存在地域差异, 其耐药性也因地域不同而有差异. 本研究从广西籍上消化道疾病患者胃黏膜分离出50个*H pylori*菌株进行CagA基因检测和耐药性测定, 探讨广西地区*H pylori*的毒力状况和耐药情况, 以及两者的关系, 为临床诊断和治疗*H pylori*感染提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-11/2005-07在广西医科大学一附院、广西区人民医院、中国人民解放军301医院、南宁市第二人民医院和广西武警总队医院因上消化道疾病行胃镜检查的广西籍患者, 取其胃黏膜进行*H pylori*分离培养, 随机抽取50个菌株, 男患者27例, 女患者23例, 年龄

20-82(平均 45.9 ± 2.3)岁. 经胃镜和病理证实消化性溃疡26例, 慢性胃炎24例. *H pylori*标准菌株NCTC11637CagA阳性由中国预防医学科学院流行病学研究所惠赠. PCR仪为美国PE Biosystems公司生产的5700型基因合成仪, 电泳仪为北京六一仪器厂生产的DYY-III-8B型电泳仪, 显影仪为上海生产的MODEL ZF-3型紫外光检测仪; 引物D008、引物R008、dNTP、 $MgCl_2$ 、 $10\times PCR$ Buffer, 均购于上海生工生物工程技术服务有限公司. 空肠弯曲菌基础培养基43 g由中国腹泻病控制上海试剂供应研究中心提供, 4种常用抗生素的E-test药敏试条(Amoxicilline, AC; Clarithromycin, CH; Metronidazole, MZ; Tetracycline, TC. 浓度范围均为0.016-256 $\mu g/L$)由瑞典AB. Biodisk公司提供, 麦氏比浊仪是法国梅里埃公司生产.

1.2 方法

1.2.1 模板DNA的制备: 取少许*H pylori*菌落置于200 μL 冻存液中制成*H pylori*混悬液, 取1 μL *H pylori*混悬液加入裂解液200 μL (含有蛋白酶K, 浓度200 mg/L), 经55℃水浴10 min, 煮沸10 min后, 以 1×10^4 r/min离心5 min, 取上清液5 μL 用于PCR扩增.

1.2.2 PCR检测CagA基因: PCR引物针对CagA基因保守区设计, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成: D008 5-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTCAGCGA-3(nt 1751-1778), R008 5-TTAGAATAATCAA-CAAACATCACGCCAT-3(nt 2021-2048), 扩增靶位片断长度为297 bp. PCR反应液体积20 μL , 内含有1 μmol D008/R008引物, 2.0 U Taq DNA聚合酶, 0.4 mmol dNTP, 2.0 mmol $MgCl_2$. 反应条件: 94℃变性5 min, 35个循环(94℃变性5 min, 55℃退火1 min, 72℃延伸1.5 min), 终止延伸72℃ 5 min. PCR产物经18 g/L琼脂糖凝胶电泳, 0.5 $\mu g/L$ 溴化乙锭染色, 于紫外光灯下显影. 以菌株NCTC11637CagA阳性作阳性对照, 去离子水作空白对照.

1.2.3 E-test药敏试验: 按随机数字表随机抽取50株菌株用无菌棉拭子分别刮取数个经72 h传代纯培养的*H pylori*菌落置于5 mL无菌生理盐水中, 在麦氏比浊仪以1.0麦氏单位为标准调整菌液浓度. 在无菌操作室分别用无菌棉拭子蘸取已制备好的菌悬液, 均匀涂布于*H pylori*非选择性培养基平板上, 放置2-3 min, 待平板表面凉干后用无菌眼科镊将4种E-test药敏试条AC、CH、MZ和TC呈同心等距离放射状置于平板

■ 研发前沿

*H pylori*的致病性与其亚型有关, 但是其机制尚未明确, 需进一步研究. 而*H pylori*根除过程中抗生素的大量运用, 使得耐药问题日趋严重, 而且在不同的地域其表现不同, 分布不同的机制亦需进一步研究.

■应用要点

本文对广西地区 *H pylori* 的 CagA 基因表达及其耐药情况作探讨, 希望能对本地区消化临床工作有所帮助。

上, 贴完 E-test 药敏试条后马上将平板置于 37℃ 微需氧环境培养 72 h 后判读结果。培养后围绕药敏试条可形成一个椭圆形的抑菌圈, 抑菌圈和试条的横向相交处的刻度读数即是抗菌药物对 *H pylori* 的最低抑菌浓度 (MIC)。甲硝唑 MIC > 32 μg/L, 四环素 MIC > 16 μg/L, 阿莫西林 MIC > 8 μg/L, 克拉霉素 MIC > 2 μg/L 定为耐药, 参照国外 Gu 和国内史彤 *et al* 研究结果^[7-8]。药敏质控采用 NCTC11637 质控菌株与实验同步进行, 对 E-test 药敏试条及所配培养基等实验条件进行全面质控。

2 结果

2.1 CagA 与上消化道疾病的关系 CagA 在上消化道疾病的表达率为 76.0% (38/50), 其中消化性溃疡 (PU) 患者感染的菌株 CagA 表达率为 73.1% (19/26), 慢性胃炎 (CG) 患者感染的菌株 CagA 表达率为 79.2% (19/24), 两者差异无显著性 ($\chi^2 = 0.254$, $P = 0.614 > 0.05$)。说明 CagA 在不同上消化道疾病中的表达无差别。CagA 在男性患者中的表达率为 74.1% (20/27), 在女性患者的表达率是 78.3% (18/23), 两者比较 $\chi^2 = 0.117$, $P = 0.730 > 0.05$, 差异无显著性。

2.2 *H pylori* 对常用抗生素的耐药情况 阿莫西林 (AC) 没有耐药菌株, 耐药率 0.0%; 其他三种药物的耐药率分别为: 甲硝唑 (MZ) 86.0% (43/50)、四环素 (TC) 4.0% (2/50)、克拉霉素 (CH) 6.0% (3/50)。AC 耐药率为 0.0%, 不参与统计分析, 其他三种药物耐药率之间比较 $\chi^2 = 100.5515$, $P = 0.0001$ 。说明三种药物耐药率之间存在差异; 两两比较, MZ 与 CH 比较 $\chi^2 = 64.4122$, $P = 0.0001$; MZ 与 TC 比较 $\chi^2 = 67.9192$, $P = 0.0001$; CH 与 TC 比较 $P = 1.0000$; 说明 MZ 的耐药率明显高于 CH 和 TC。

2.3 CagA 与耐药的关系 38 例 CagA 阳性菌株中有 34 例耐药, 耐药率为 89.5% (34/38); CagA 阴性菌株的耐药率为 75.0% (9/12), 两者比较 $\chi^2 = 0.612$, $P = 0.434 > 0.05$, 差异无显著性。

3 讨论

H pylori 是人类最常见的一种致病菌, 是 PU 和 CG 的重要致病因素之一, 与胃癌的发生有密切关系。人群中 *H pylori* 的感染率约为 50% 左右, 仅有少部分人表现出不同程度的症状。据研究, *H pylori* 菌株不同亚型对临床结局有相当大的影响^[1]。这与 *H pylori* 的毒力相关。CagA 是 *H pylori* 主要的毒力因素之一, 是该菌重要的致病因子, 可以作为评价 *H pylori* 毒力的指标。CagA 基因

的表达具有明显的地域差异。西方国家分离的 *H pylori* 菌株中约 60% 具有 CagA 基因, 并且发现 CagA 阳性与疾病严重程度呈正相关^[2]。陈学军 *et al*^[3] 研究我国浙江人群的 *H pylori* CagA 阳性率高达 96%, 但 CagA 阳性与疾病类型和疾病严重程度无关。宫月华 *et al*^[4] 研究中国庄河胃癌高发区 *H pylori* CagA 的阳性率为 94.4%, 其与低发区没有差别。而于金龙 *et al*^[5] 研究发现胃癌组织 *H pylori* CagA 阳性率显著高于萎缩性胃炎组织和正常组织。我们采用针对 *H pylori* CagA 基因保守区的特异性引物进行 PCR 检测, 结果显示广西地区人群感染 *H pylori* CagA 阳性菌株为 76.0%, CagA 的表达在 *H pylori* 相关的 PU 和 CG 之间没有显著差异, 其在不同性别人群中的表达亦无显著差异。广西地区胃十二指肠疾病患者 *H pylori* CagA 阳性菌株感染率介于西方发达国家和我国的浙江等发达地区之间, 远高于广西巴马老年人 CagA 阳性菌株感染率 14.6%^[6]。目前临床上使用抗生素和制酸剂清除 *H pylori* 感染, 由于 *H pylori* 根除中抗生素的广泛使用, 致使 *H pylori* 对常用抗生素的耐药性日趋严重, 在很大程度上增加了药物治疗的困难^[7-9], 而细菌耐药的产生与该药的使用频率和剂量有关。成虹 *et al*^[10] 用 E-test 法对我国北京地区 *H pylori* 的耐药性进行研究, 结果显示甲硝唑的耐药率为 40.9%, 克拉霉素的耐药率为 15.7%, 159 例阿莫西林耐药试验中仅发现 1 例耐药。史彤 *et al*^[8] 用 E-test 法测得上海地区克拉霉素耐药率为 10.0%。黄频 *et al*^[11] 用琼脂扩散法测得杭州地区人群甲硝唑的耐药率为 98.1%, 阿莫西林耐药率是 70.48%, 克拉霉素的耐药率为 18.1%。郑云鹏 *et al*^[12] 研究发现河南地区阿莫西林耐药率为 9.3%, 甲硝唑耐药率为 53.5%, 且出现多重耐药菌株。在发达国家甲硝唑的耐药率为 10.0%-50.0%, 克拉霉素的耐药率为 2.0%-15.0%, 而这一数字有上升的趋势。在发展中国家甲硝唑的耐药率为 70.0%-90.0%^[13-14]。吕凤臣、单蕴 *et al* 研究发现 *H pylori* 的耐药性与用药史有关, 随着抗生素的滥用其耐药率逐年上升, 但阿莫西林耐药率低且与用药史无关^[15-16]。本实验用 E-test 法测得广西地区 *H pylori* 对甲硝唑的耐药率为 86.0%, 远高于我国北京地区。克拉霉素的耐药率为 6.0%, 四环素的耐药率为 4.0%, 低于以上文献报道。可能是由于本地区甲硝唑为临床常用药品, 其使用频率较高, 所以致 *H pylori* 耐药率高; 而使用克拉霉素尚不普遍。本实验未发现对阿莫西林耐药

的菌株. CagA基因的表达与*H pylori*的耐药率关系国内外文献报道较少, 本实验结果显示CagA基因的表达和*H pylori*的耐药性无明确关系. 尽管CagA基因已明确为评价*H pylori*毒力的指标之一, 且与其他Cag族基因共同构成*H pylori*的“致病岛”, 但其确切的致病作用目前尚不清楚, 其与*H pylori*耐药性的关系更有待进一步研究. 本研究显示CagA基因与上消化道疾病有密切关系, 在广西地区*H pylori*对甲硝唑有很高的耐药性, 而对克拉霉素和四环素的耐药性较低, 未发现对阿莫西林耐药的菌株. 因此, 在本地区临床上抗*H pylori*治疗时有条件的单位应进行*H pylori*的药敏试验, 以指导用药. 无药敏试验时, 应该首选阿莫西林、克拉霉素和四环素, 尽量避免使用甲硝唑.

4 参考文献

- 1 萧树东, 郑青. 幽门螺杆菌cagA基因多态性对临床结局的影响: 东亚菌株和西方菌株. 医学与哲学(临床决策论坛版) 2007; 28: 28-31
- 2 Ladeira MS, Bueno RC, Dos Santos BF, Pinto CL, Prado RP, Silveira MG, Rodrigues MA, Bartchewsky W Jr, Pedrazzoli J Jr, Ribeiro ML, Salvadori DM. Relationship among oxidative DNA damage, gastric mucosal density and the relevance of cagA, vacA and iceA genotypes of *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 248-255
- 3 陈学军, 严杰, 毛亚飞, 李立伟. 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 官月华, 袁媛. 中国庄河胃癌高发区幽门螺杆菌毒力基因型菌株感染分布特征. *中华医学杂志* 2006; 86: 419-421
- 5 于金龙, 张颖, 常坤. 胃癌癌变中幽门螺杆菌及其CagA~+基因株感染研究. *现代医药卫生* 2003; 19: 1230-1231
- 6 唐国都, 唐星火, 陈振依, 韩萍, 韦宗萍, 陈进超. 广西巴马长寿地区壮族老人幽门螺杆菌感染状况. *广西医科大学学报* 1999; 16: 888-882
- 7 Gu Q, Xia HH, Wang JD, Wong WM, Chan AO, Lai KC, Chan CK, Yuen MF, Fung FM, Wong KW, Lam SK, Wong BC. Update on clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* in Hong Kong and its effect on clarithromycin-based triple therapy. *Digestion* 2006; 73: 101-106
- 8 史彤, 刘文忠, 萧树东, 徐蔚文. 幽门螺杆菌对克拉霉素耐药的分子机制研究. *中华消化杂志* 2001; 21: 25-27
- 9 Yahav J, Samra Z, Niv Y, Evans CT, Passaro DJ, Dinari G, Shmueli H. Susceptibility-guided vs. empiric retreatment of *Helicobacter pylori* infection after treatment failure. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 2316-2321
- 10 成虹, 胡伏莲. 北京地区幽门螺杆菌耐药情况及其变化趋势. *中华医学杂志* 2005; 85: 2754-2757
- 11 黄频, 楼望林, 杨更发, 杨宁敏. 2357例幽门螺杆菌感染及抗菌素耐药分析. *中国新药杂志* 2007; 16: 1057-1064
- 12 郑云鹏, 郑鹏远, 刘志强. 幽门螺杆菌的耐药性分析. *郑州大学学报(医学版)* 2007; 42: 512-514
- 13 Lesbros-Pantoflickova D, Corthésy-Theulaz I, Blum AL. *Helicobacter pylori* and probiotics. *J Nutr* 2007; 137: 812S-818S
- 14 Kumala W, Rani A. Patterns of *Helicobacter pylori* isolate resistance to fluoroquinolones, amoxicillin, clarithromycin and metronidazoles. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37: 970-974
- 15 吕凤臣, 赵月霞. 抗幽门螺杆菌用药史与耐药率的相关性分析. *临床内科杂志* 2006; 23: 124-125
- 16 单蕴, 许树长, 叶元康. 幽门螺杆菌抗生素耐药率分析. *同济大学学报(医学版)* 2004; 25: 30-32

■同行评价

本文具有一定的创新性和可读性, 能较好地反映我国胃肠病学临床和基础研究的先进水平, 对广西地区幽门螺杆菌的研究和消化临床工作有指导意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail, 印刷版. 在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com/>在线提交未成功, 请通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d. 来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审. 接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬). (常务副总编辑: 张海宁 2008-06-28)