

## 幽门螺杆菌功能性 oipA 基因的检测及意义\*

李 妮<sup>1</sup>, 余菲菲<sup>2</sup> (1. 西安医学院医学技术系, 西安 710021;  
2. 福建医科大学病原生物学系, 福州 350004)

**摘要:**目的 评价幽门螺杆菌(Hp) oipA 与消化系统疾病的关系。方法 收集活检胃组织标本 360 份, 对组织快速尿素酶实验阳性和部分阴性的活检标本进行 Hp 分离培养, 分离菌株革兰氏染色镜检、尿素酶实验和 16SrRNA PCR 鉴定后, PCR 扩增其 oipA 和 cagA 基因, 测序分析 oipA 信号区的开关状态, 分析功能性 oipA 与临床疾病之间的关联性。结果 组织标本分离培养获得 106 株 Hp, 其中 72 株 cagA 基因阳性, 87 株 oipA 信号区基因阳性, 经测序分析 80 株 oipA 基因信号区呈开放状态, 1 株 oipA 基因信号区呈关闭状态, 6 株开关状态不能确定; 在溃疡和萎缩性胃炎中, 功能性 oipA 的检出率均显著高于 cagA。结论 功能性 oipA 与严重消化系统疾病关系密切。

**关键词:** 幽门螺杆菌; 功能性 oipA; cagA; 消化性疾病

**中图分类号:** R378. 2; Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2015)01-042-04

**doi:** 10. 3969/j. issn. 1671-7414. 2015. 01. 012

## Detection of *Helicobacter Pylori* Functional OipA Gene and Its Significance

LI Ni<sup>1</sup>, SHE Fei-fei<sup>2</sup>

(1. Department of Engineery, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China;  
2. Department of Pathogenic Biology, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

**Abstract:** **Objective** To evaluate the relationship between functional oipA gene of *Helicobacter pylori* and digestive disease. **Methods** Biopsy gastric mucosa were obtained from 360 patients who would get gastroscopy. Hp were isolated from urease positive samples and partly urease negative samples, and improved by microscope, urease experiment and 16SrRNA PCR. OipA and cagA of the isolates were obtained by PCR and the status of oipA signal region were analysed after sequencing. Analyze the relevance between functional oipA gene of *Helicobacter pylori* and digestive disease. **Results** 106 isolated Hp were obtained, in which 72 strains with cagA gene positive, 87 with oipA signal region gene positive (80 the status of signal region was on and 1 was off; 6 could not be decided). The frequency of functional oipA were both significantly higher than cagA in ulcer and atrophic gastritis. **Conclusion** The relationship between functional oipA gene and digestive disease was more closer than that of cagA.

**Keyword:** *Helicobacter pylori*; functional oipA gene; cagA; digestive disease

人群中 Hp 的感染率较高, 西方国家为 50%, 发展中国家可高达 90%, 但只有 10% 的感染者发展为消化性疾病<sup>[1,2]</sup>。Hp 感染的不同结局除与宿主和环境因素有关外, 还与 Hp 菌株的异质性, 即基因组的高度多态性有关, 尤其是毒力基因的异质性, 决定 Hp 感染后是否导致炎症以及溃疡的发生<sup>[3~5]</sup>。目前, 对于毒力株的鉴定都是以 cagA 基因为标准的, 然而, 越来越多的研究发现, CagA 阳性菌的感染率极高<sup>[6~8]</sup>, 在西方国家约占 60%~80%, 国内感染率更高, 有些地区甚至达到 90% 以上, 很难确定 cagA + Hp 与疾病的关系<sup>[9]</sup>。oipA 是近年来发现的 Hp 重要的毒力基因, 根据是否表达蛋白, 将其分为功能性和非功能性。功能性 oipA 与 cagA 究竟何者更能作为高毒力 Hp 的标志, 本研究通过 PCR 方法检测临床分离 Hp 中功

能性 oipA 与 cagA 基因, 以探讨两者与相应消化系统疾病之间的关联性。

### 1 材料和方法

1.1 菌株及临床标本 Hp 国际标准株 NCTC11637 购自中国疾病预防控制中心传染病研究所; 360 例活检胃组织标本(男性 192 例、女性 168 例, 平均年龄 44.4 岁)由福建医科大学附属第一医院和附属协和医院胃镜室提供。活检标本取胃窦部黏膜组织, 一份作快速尿素酶实验; 一份置 0.5 ml 布氏培养液中用于分离培养 Hp; 另一份送病理检验。

1.2 引物 根据 Genbank 公布的 Hp cagA, oipA 和 16SrRNA 序列, 经同源性分析, 用 VectorNTI6.0 软件在 cagA 和 oipA 开放读码框架内设计引物 CF/CR, SF/SR 以及 16SrRNA 引物

\* 作者简介: 李 妮(1979—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 微生物学检验, Tel: 13659217384, E-mail: 274835616@qq.com。

16F/16R,用于检测 *cagA* 基因、分析 *oipA* 信号区序列以及鉴定 Hp。引物由上海博亚生物技术有限公司合成,序列见表1。

基因	引物	序列
oipA	SF	5'TCTTAAAACCAAAGAAAAACC 3'
	SR	5'ACAGAACCAACGCCACCAA 3'
cagA	CF	5'ATAATGCTAAATTAGACAACCTGAGCGA 3'
	CR	5'TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT 3'
16SrRNA	16F	5'GTCATGACGGGTATCC 3'
	16R	5'ACTTCACCCAGTCGCTG 3'

1.3 细菌分离培养及鉴定 取尿素酶实验阳性以及部分尿素酶实验阴性的活检组织,用匀浆器磨碎后于布氏血平板上培养3~5天,培养物经快速尿素酶实验(试剂盒购自福建省三明市三强公司产品)和革兰染色镜检,初步判断为 Hp 者,刮取菌落置50 μl 双蒸水中,100℃水浴10 min,8 000 g 离心5 min,取上清为 Hp DNA 模板,用 Hp16SrRNA 引物16F/16R进行PCR,设 Hp NCTC11637 的DNA为阳性对照的模版,反应条件:94℃ 5 min, (94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min) × 40, 72℃ 5 min, PCR产物经1.0 g/dl 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4 *oipA* 基因信号区检测 以 Hp DNA 为模板,用 *oipA* 信号区引物 SF/SR 进行 PCR,反应条件:94℃ 5 min, (94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min) × 30, 72℃ 5 min。PCR产物经纯化试剂盒(上海中科开瑞工程有限公司)纯化后送上海博亚生物技术有限公司测序,结果用 Clustalx 和 Bioedit 软件分析 *oipA* 基因的功能状态:当 *oipA* 基因信号肽编码区的5'末端有5个或者7个CT双核苷酸时,信号肽位于基因读码框架之外,为“关闭”(“off”)状态,即非功能性 *oipA* 基因(nonfunctional *oipA*);当5'末端有6,9, (1+3), (2+3), (1+2), (1+1+1), (1+1+2)个CT双核苷酸时,信号肽位于基因读码框架之内,为“开放”(“on”)状态,即功能性 *oipA* 基因(functional *oipA*)<sup>[3,5]</sup>。

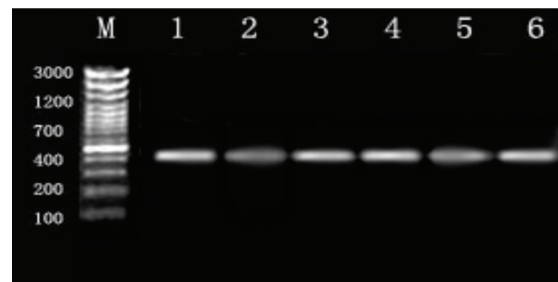
1.5 *cagA* 基因的检测 以 Hp DNA 为模板,用 *cagA* 引物 CF/CR 进行 PCR,反应条件:94℃ 5 min, (94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1.5 min) × 30, 72℃ 5 min;取5 μl PCR产物经1.0 g/dl 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 统计学分析 用 SPSS for window 11.5 软件,采用 2×2 表  $\chi^2$  检验比较样本率之间的差异,以 P<0.05 为差异有统计学意义, P<0.01 为差异有统计学显著性意义。

## 2 结果

2.1 胃活检标本 Hp 的分离培养及鉴定 360 例胃黏膜组织标本中,尿素酶实验阳性 187 例、阴性 173 例;对其中 262 例(尿素酶实验阳性 187 例、阴性 75 例)标本进行 Hp 分离培养,培养物同时具备快速尿素酶实验阳性、染色镜检呈革兰阴性海鸥展翅状螺旋菌、16SrRNA PCR 产物电泳位置与 Hp NCTC11637 条带位置一致者鉴定为 Hp,共 106 株,其中 95 株分离自组织尿素酶实验阳性者(95/187 例),11 株分离自阴性者(11/75 例)。

2.2 *oipA* 基因信号区序列分析 106 株 Hp 其中 87 株通过 PCR 获取了 *oipA* 信号区序列,产物经 1 g/dl 琼脂糖凝胶电泳,证实与预期 424 bp 大小一致。见图1(随机显示6株细菌PCR结果)。序列分析显示在87株Hp中,有80株 *oipA* 基因处于开放状态(即功能性 *oipA*),AG(CT)重复数目分别有6,9, (1+3), (1+1+1), (2+3), (1+1+2), (1+2)个,其中重复数目为(1+3)个的最为普遍(46/80 = 57.50%);为9个的最少(1/80 = 1.25%);1株 *oipA* 基因处于关闭状态(即非功能性 *oipA*);无法判断开关状态的有6株。相应信号区的CT(AG)重复数目、序列、基因的开关状态见表2。*oipA* 基因及功能性 *oipA* 基因的检出状况见表3。



M: Marker; 1~6: 临床标本

图1 *oipA* 基因信号区 PCR 扩增产物

表2 87 株 Hp 信号区 AG(CT)重复序列分析结果

重复数目	AG(CT)重复区序列	基因状态	合计
6	AACG(AA)AGAGAGAGAGAGTTAG	on	7
9	AACGAGAGAGAGAGAGAGAGTTAG	on	1
1+3	AACGAGAAAAAGAGAGCTAG	on	46
1+1+1	AACGAGAAAGACAGAAAGAG	on	13
2+3	AACGAGAGAAAGAGAGTTAG	on	7
1+1+2	AACGAGAAAGACAGAGTGAG	on	2
1+2	AACGAGAAAAACAGAGTTAG	on	4
7	AAAGAGAGAGAGAGAGTTAG	off	1
2+2	AACGAGAGAAAGAGAAAGAG	?	2
1/(1+1)	AACGAAAAAAGAAAGTTAG	?	3
4+1	AACGAGAGAGAGAAAGTTAG	?	1
合计			87

2.3 *cagA* 基因检测结果 经凝胶电泳与 Hp NCTC11637 的 *cagA* 基因条带位置比较,106 株临床分离 Hp,其中 *oipA* 基因阳性 87 株,阴性 19 株,阳性率 82.08%;功能性 *oipA* 基因阳性 80 株,阴性 20 株,阳性率 80%;*cagA* 基因阳性 72 株,阴性 34 株,阳性率为 67.92%。

#### 2.4 *cagA* 基因、功能性 *oipA* 基因与疾病的关系

106 株临床分离的 Hp,除去 6 株 *oipA* 开关状态不能确定者,余下 100 株 Hp(包括功能性 *oipA* 阳性者 80 株和功能性 *oipA* 阴性者 20 株)感染者,经胃组织标本的病理诊断,获知:47 例为浅表性胃炎、16 例为糜烂性胃炎、23 例为萎缩性胃炎、12 例为胃溃疡、2 例为胃癌,他们的功能性 *oipA* 和 *cagA* 的检出情况见表 3,用卡方检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。可见在萎缩性胃炎和溃疡中,功能性 *oipA* 的阳性率均高于 *cagA* 的阳性率,差异有统计学意义。功能性 *oipA* 在溃疡患者中的检出率为 100%。

表 3 功能性 *oipA* 基因、*cagA* 基因与病理诊断结果

疾病	n	功能性 <i>oipA</i>		<i>cagA</i>		P 值
		检出例数	检出率(%)	检出例数	检出率(%)	
浅表性胃炎	47	33	70.21	34	72.34	0.405
糜烂性胃炎	16	15	93.75	15	93.75	0.500
萎缩性胃炎	23	18	78.26	9	39.13	0.020
胃溃疡	12	12	100	7	58.33	0.019
胃癌	2	2	/	2	/	/

3 讨论 360 例胃黏膜组织标本经培养获得 106 株 Hp,培养阳性率为 29.44%,Hp 培养率低可能与病人曾经接受过治疗、或样本采集的部位较局限、或与细菌发生球形变异有关。各种检查方法都有各自的适用范围和局限性,本研究中,组织尿素酶试验阳性的 187 例培养出了 95 株,阴性的 75 例也培养出了 11 株,其假阳性和假阴性都很高。

*oipA* 基因有两种状态:功能性和非功能性<sup>[10,11]</sup>。这两种功能状态受 *oipA* 基因 5' 末端 CT 双核苷酸数目的调节;功能性 *oipA* 基因表达 OipA 蛋白,在 Hp 导致疾病的发生过程中起重要作用;非功能性 *oipA* 基因不表达 OipA 蛋白,血清中也检测不到相应抗体。本研究中,*oipA* 基因的总检出率是 82.08%;具有 *oipA* 基因的 87 株 Hp 有 80 株 *oipA* 基因信号区处于开放状态,是功能性的,其中 CT 重复数目为(1+3)个的最为普遍、CT 重复数目为 9 个的最少,与 Kauser 等<sup>[12]</sup>报道的 *oipA* 信号区的开关状态与 Hp 的地域分布有关一致;1 株 *oipA* 基因处于关闭状态,病理结果显示标本来

源是浅表性胃炎患者;无法判断开关状态的有 6 株,在分析时将其划归功能性 *oipA* 阴性之列。

Yamaoka 等<sup>[13]</sup>的研究显示,尽管引发炎症的关键因素 IL-8 的表达与 *cagA* 和 *oipA* 都有关系,但是敲除了 *oipA* 的 Hp 诱发 IL-8 表达的水平下降了近 50%,而且在 *cagA* 阴性菌中,IL-8 的表达主要是 *oipA* 在发挥作用。因此,在炎症反应中,*oipA* 与 IL-8 的关系更为密切,扮演着比 *cagA* 更重要的角色<sup>[10]</sup>。*oipA* 和 *cagA* 均为 Hp 重要的毒力因子,本研究 2 例胃癌中,两者均是阳性;虽然在浅表性胃炎和糜烂性胃炎中,功能性 *oipA* 和 *cagA* 的检出率没有差异;但是,在萎缩性胃炎和溃疡中功能性 *oipA* 的检出率分别为 78.26% 和 100%,均显著高于 *cagA* 的 39.13% 和 58.33%,特别是在溃疡中,*oipA* 的检出率(100%)远远高于 *cagA* (58.33%),说明与 *cagA* 相比,功能性 *oipA* 与严重消化系统疾病的关系更为密切,更容易导致严重的消化性疾病。

总之,本研究用 PCR 的方法检测临床分离 Hp 中功能性 *oipA* 基因和 *cagA* 基因,结果显示,与 *cagA* 相比,功能性 *oipA* 与严重消化性疾病的关系更为密切,可望用功能性 *oipA* 代替 *cagA* 来检测高毒力 Hp 感染。

#### 参考文献:

- [1] Petersen AM, Blom J, Andersen LP, et al. Role of strain type, AGS cells and fetal calf serum in *Helicobacter pylori* adhesion and invasion assays[J]. FEMS Im Med, 2000, 29(1): 59-67.
- [2] Kraft C, Suerbaum S. Mutation and recombination in *Helicobacter pylori*: Mechanisms and role in generating strain diversity[J]. Inter J Med Micro, 2005, 295(5): 299-305.
- [3] Blaser MJ. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease[J]. J Infect Dis, 1999, 179(6): 1523-1530.
- [4] Nardone G, Ataibano S, Rocco A, et al. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis[J]. Gut, 1999, 44(6): 789-799.
- [5] Peterson WL. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease[J]. J Med Micro, 1991, 324(15): 1043-1048.
- [6] Lerro P, Perrucci V, Morra I, et al. CagA seropositivity and the severity of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic children[J]. Acta Paediatr, 2000, 89(11): 1312-1315.
- [7] Yang H, Wu SV, Pichuanes S, et al. High prevalence of *cagA*-positive strains in *Helicobacter pylori*-infected, healthy, young Chinese adults[J]. J Gastro & Hepat, 1999, 14(5): 476-480.
- [8] 陈思玮, 张德中, 吴叔明, 等. 胃十二指肠疾病患者中 *cagA* 阳性幽门螺杆菌的普遍易感性[J]. 胃肠病学, 2001, 6(1): 20-23.

- Chen SW, Zhang DZ, Wu SM, et al. Generalized infection of *cagA*-positive *Helicobacter pylori* in patients with gastroduodenal diseases [J]. *Chin J Gastroenterol*, 2001, 6(1): 20-23.
- [9] Lazebnik LB, Tsaregorodtseva TM, Serova TI, et al. Antibodies to *Helicobacter pylori* in gastric diseases [J]. *Ter Arkh*, 2006, 78(2): 15-19.
- [10] Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34 000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori* [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2000, 97(13): 7533-7538.
- [11] Kudo T, Nurgalieva ZZ, Conner ME, et al. Correlation between *Helicobacter pylori* OipA protein expression and oipA gene switch status [J]. *J Clin Micro*, 2004, 42(5): 2279-2281.
- [12] Kauser F, Hussain MA, Ahmed I, et al. Comparing genomes of *Helicobacter pylori* strains from the high-altitude desert of Ladakh, India [J]. *J Clin Micro*, 2005, 43(4): 1538-1545.
- [13] Yamaoka Y, Kikuchi S, El-Zimaity HM, et al. Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production [J]. *Gastroenterology*, 2002, 123(2): 414-424.

收稿日期: 2014-12-19 修回日期: 2015-01-06

(上接 41 页)导致酶-DNA 复合物与药物的亲和力降低导致耐药, 已知突变热点是 *gyrA* 第 83 位苏氨酸和第 87 位门冬氨酸<sup>[8]</sup>。质粒介导(质粒型) AmpC 酶在持续高水平表达时, 其基因可通过转化、接合等方式转移给其他菌种, 使耐药性迅速传播<sup>[9]</sup>。2007 年日本学者 Yamane<sup>[10]</sup> 发现大肠埃希菌有一种质粒介导的外排泵基因 *qepA*, 将克隆有 *qepA* 的质粒转化到大肠埃希菌能把结合子对多种抗菌药物的 MIC 值增加。蒋岗<sup>[11]</sup> 在曹开源指导下研究了 PA 菌获得耐药质粒的过程, 质粒基因的突变以及把突变的基因稳定地遗传给下一代。不同细菌之间能够通过质粒互换获得耐药性, 同种细菌能够把获得的耐药质粒稳定遗传。因此合理使用抗生素很重要, 不能长时间使用一种抗生素, 一次使用抗生素要敏感足量, 不要在抑菌浓度附近使用, 细菌容易获得突变耐药的质粒。受耐药阳性 PA 菌株量偏少的影响, 并不能开展阻止耐药质粒在细菌之间传递的实验, 需要进一步研究揭开质粒在不同细菌之间如何传递, 只有人类了解传递规律才能有效减少耐药想象。

#### 参考文献:

- [1] 夏昆华, 周鲁, 郝丽芬. 喹诺酮类抗生药的研究进展 [J]. 国外医学抗生素分册, 2004, 8(3): 138-141.
- Xia KH, Zhou L, Hao LF. Progress quinolone antibiotics [J]. *Foreign Medical: The Archives of Antibiotics*, 2004, 25(3): 138-141.
- [2] 尚丽霞, 史颖, 王栋, 等. 新疆乌苏地区常见病原菌的监测及耐药性分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(4): 135-138.
- Shang LX, Shi Y, Wang D. Clinical Monitoring of common pathogens and drug resistance in Wusu of Xinjiang [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2014, 29(4): 135-138.
- [3] 郑晓林, 廖致红. 铜绿假单胞菌耐药率与抗菌药使用量相关性分析 [J]. 中国药师, 2009, 12(4): 457-459.
- Zheng XL, Liao ZH. Correlation between amount of consumption of anti-bacterials and drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *China Pharmacist*, 2009, 12(4): 457-459.
- [4] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short protocols in molecular biology [M]. 4th Ed. Current Protocols, 1999: 17-19.
- [5] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜, 等. 全国临床检验操作规程 [S]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 715-920.
- Ye YW, Wang YS, Shen ZY, et al. National guide to clinical laboratory procedures [S]. 3th Ed. Nanjing: Southeast University Press, 2006: 715-920.
- [6] 李云峰, 邵国, 苏燕, 等. 一种简捷的质粒 DNA 提取及纯化方法 [J]. 包头医学院学报, 2000, 16(2): 144-146.
- Li YF, Shao G, Su Y, et al. A rapid and easy way of extracting and purification plasmid DNA [J]. *J Baotou Medical College*, 2000, 16(2): 144-146.
- [7] Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, et al. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, 34(6): 1271-1272.
- [8] Willmott CJ, Maxwell A. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37(1): 126-127.
- [9] 李智山, 邓三季, 杨燕, 等. 铜绿假单胞菌质粒型 AmpC 酶 DHA 基因的发现 [J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(3): 253-255.
- Li ZS, Deng SJ, Yang Y, et al. Detection of plasmid type AmpC  $\beta$ -lactamase DNA gene in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2005, 15(3): 253-255.
- [10] Yamane K, Wachino J, Suzuki S, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(9): 3354-3360.
- [11] 蒋岗. PMQR 基因及 *gyrA*, *parC* 基因突变与铜绿假单胞菌对喹诺酮类耐药之间关系的研究 [D]. 中山大学硕士学位论文, 2010: 12-13, 22-29.
- Jiang G. Study on the relationship between quinolone resistance and PMQR genes, mutations in *gyrA* and *parC* genes among *Pseudomonas aeruginosa* [D]. *Zhongshan University Master's Degree Thesis*, 2010: 12-13, 22-29.

收稿日期: 2014-10-16 修回日期: 2014-12-06