

幽门螺杆菌临床分离株尿素酶基因及活性多样性

谭昌成 施 理

【摘要】目的 研究幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)临床分离株的尿素酶基因及活性的多样性。**方法** 应用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)结合快速尿素酶实验,对 *H.pylori* 临床分离株进行分型。**结果** 按照 *H.pylori* 尿素酶基因 PCR-RFLP 及尿素酶活性结果,大致可将 *H.pylori* 临床株分为 4 型: I 型,PCR-RFLP 只产生一条 1.7 kb 带,尿素酶活性较高,*H.pylori* 多分离自胃溃疡患者; II 型,PCR-RFLP 产生 1.3、0.4 kb 二条带,尿素酶活性最弱,*H.pylori* 多分离自十二指肠球部溃疡患者; III 型,PCR-RFLP 产生 0.4、0.17 kb 二条带,伴有或不伴有(0.23 或 0.37 kb)一条带,*H.pylori* 多分离自胃炎患者,尿素酶活性最强; IV 型,PCR-RFLP 产生 1.5、0.2 kb 二条带,尿素酶活性较弱,*H.pylori* 多分离自胃溃疡及十二指肠球部溃疡患者。**结论** *H.pylori* 临床分离株尿素酶基因的差异决定其尿素酶活性不同,与 *H.pylori* 相关性疾病的关系也不同。

【关键词】 幽门螺杆菌;尿素酶;聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)

Diversity of *Helicobacter pylori* clinical isolates by the method of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism TAN Chang-cheng, SHI Li. 458 Hospital of PLA, Guangzhou 510602

【Abstract】 Aims The diversity of the urease gene and biological activity of the *Helicobacter pylori*(*H.pylori*) clinical isolators were investigated. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of urease gene and rapid urease activity test were used to differential the different clinical isolates. **Results** In accordance with the PCR-RFLP of urease gene and urease activity, the *H.pylori* clinical isolates were divided into 4 types. There was only one fragment (1.7 kb) by PCR-RFLP for the type I isolates with stronger urease activity in the patients with gastric ulcer. There were two fragments(1.3, 0.4 kb) by PCR-RFLP for the type II isolates with the weakest urease activity in the patients with duodenal ulcer. Two fragments (0.4, 0.17 kb) with or without one fragment(0.23 or 0.37 kb) were got by PCR-RFLP for the type III isolates with strongest urease activity in the patients with gastritis. Two fragments (1.5, 0.2 kb) were got by PCR-RFLP for the type IV isolates with the weaker urease activity in the patients with gastric and duodenal ulcer. **Conclusion** The diversity of urease activity and relationship to different disease was due to the difference of urease gene for the *H.pylori* clinical isolators.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; Urease; Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)是胃炎的病因、消化性溃疡的重要致病因素,而且与胃癌有关。然而为何有些 *H.pylori* 感染者最终发展成为消化性溃疡,而另一些仅仅是胃炎?人们猜测 *H.pylori* 不同菌株的致病力存在差异;*H.pylori* 尿素酶在其致病机制中起着非常重要的作用。我们应用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(Polymerase

chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)及快速尿素酶实验,研究 *H.pylori* 尿素酶基因多样性,并对 *H.pylori* 临床分离菌株进行分型、研究不同临床分离菌株尿素酶活性差异及其与疾病的关系^[1-5]。

材料与方法

一、材料

1. *H.pylori* 菌株

作者单位:510602 解放军第四五八医院医剂科

52株 *H.pylori* 临床分离菌株,均经菌落形态、生化鉴定、涂片 Grams 染色镜下观察证实。

2. 材料

布氏肉汤及其琼脂固体培养基(上海腹泻病研究所);引物、Tag DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶 HaeIII(上海生工生物公司)。

3. 仪器

PCR 仪、电泳仪、紫外灯、高速离心机、旋涡振荡器、紫外分光光度计。

二、方法

1. *H.pylori* 基因组 DNA 制备

参照《分子克隆实验指南》制备 *H.pylori* 及铜绿假单胞菌 DNA: 用 TE 溶液将 *H.pylori* 从固体培养基上冲洗下来,加 10% SDS 溶液、蛋白酶 K 溶液至终浓度分别为 1%、20 $\mu\text{g/ml}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴过夜;离心 (10 000 rpm/min), 上清用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1) 抽提数次,直至不再出现蛋白膜。上清用氯仿:异戊醇(24:1)抽提数次,上清加入 0.1 体积 3 M 醋酸钠溶液及 2 体积乙醇沉淀 DNA, 70% 乙醇洗涤、双蒸水溶解 DNA, 紫外分光光度计测定其浓度、纯度。

2. *H.pylori* 尿素酶基因 PCR 扩增

引物 1: 5'-AGCAATAGCAGCCATAGTGT-3'

引物 2: 5'-GGTCCTACTACAGGCGATAA-3'

在 25 μl PCR 反应体系中含 dNTP、引物、*H.pylori* DNA, 终浓度分别为 200 μM 、0.4 μM 、0.1 μg ; 以双蒸水、铜绿假单胞菌 DNA 代替 *H.pylori* DNA 作为对照;PCR 反应条件:35 个以下循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 sec,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 sec,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min。

3. *H.pylori* 尿素酶基因 PCR-RFLP

(1)纯化 *H.pylori* 尿素酶基因 PCR 扩增产物

将 *H.pylori* 尿素酶基因 PCR 扩增产物用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提数次,上清用氯仿:异戊醇(24:1)抽提数次,上清加入 0.1 体积 3 M 醋酸钠溶液及 2 体积无水乙醇沉淀 DNA, 70% 乙醇洗涤沉淀,双蒸水溶解沉淀,紫外分光光度计测定 DNA 浓度、纯度。

(2)限制性内切酶 Hae III 消化 *H.pylori* 尿素酶基因 PCR 扩增产物

反应体系:18 μl PCR 产物,2 μl Buffer, Hae III 1 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 h。

(3) *H.pylori* 尿素酶基因 PCR-RFLP

不同 *H.pylori* 的酶切产物进行 0.5 $\mu\text{g/ml}$ EB 的 1% 琼脂糖电泳,紫外灯下观察电泳结果。

4. *H.pylori* 尿素酶活性测定

参照 Rokita E 介绍的方法检测 *H.pylori* 菌株尿素酶活性,将在羊血培养基上微需氧培养 4 天的 *H.pylori* 菌落,用 20 μl TE 洗下,取 10 μl 加入 100 μl 尿素酶反应液(含 20% 尿素,0.01% 酚红),37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 分钟,加 2N 硫酸溶液终止反应;读取光密度值 OD600(以 TE 为空白对照);用 Lowry 定氮法测定 *H.pylori* TE 悬液的蛋白质含量;以光密度值/毫克蛋白表示 *H.pylori* 尿素酶活性。

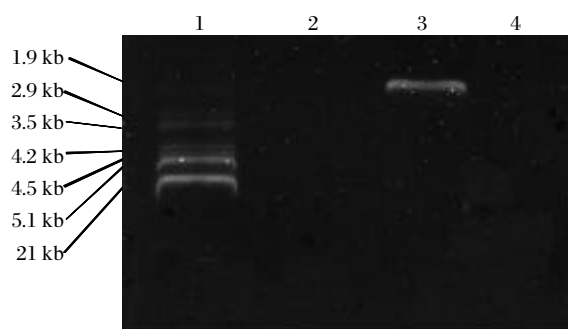
5. 统计学方法

H.pylori 尿素酶基因 PCR-RFLP 与疾病的关系用 χ^2 检验;*H.pylori* 菌株尿素酶活性比较用 *t* 检验。

结果

一、*H.pylori* 尿素酶基因 PCR 扩增结果

52 株临床分离的 *H.pylori* 均能扩增出 1.7 kb 左右的尿素酶基因(见图 1)。



1: 分子量标准; 2: 双蒸水(阴性对照);
3: *H.pylori*; 4: 铜绿假单胞菌(对照)

图 1 *H.pylori* 尿素酶基因 PCR 扩增结果

二、*H.pylori* 尿素酶基因 PCR-RFLP 结果(图 2)

52 株临床分离的 *H.pylori* 扩增出的 1.7 kb 尿素酶基因,经 Hae III 消化、1% 琼脂糖电泳,产生数条 DNA 片段,按照电泳图谱,大致可将这 52 株 *H.pylori* 分为 4 型:

I 型:产生一条 1.7 kb 的 DNA 片段,即不能被 Hae III 消化。

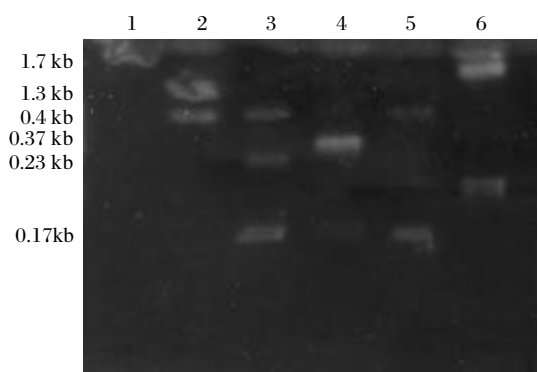
II 型:产生 1.3、0.4 kb 的二条 DNA 片段。

III 型:PCR-RFLP 产生 0.4、0.17 kb 二条带,伴有或不伴有(0.23 或 0.37 kb)一条带; III a 型:产生 0.4、0.37、0.17 kb 的三条 DNA 片段; III b 型:产生 0.4、0.23、0.17 kb 的三条 DNA 片段; III c 型:产生 0.4、0.17 kb 的二条 DNA 片段。

IV 型:产生 1.5、0.2 kb 的二条 DNA 片段。

三、*H.pylori* 尿素酶基因 PCR-RFLP 的稳定性

52 株临床分离的 *H.pylori* 菌株,在固体培养基上传代 5 次后与原代 *H.pylori* 相比较,尿素酶基因



1: I型 *H.pylori*; 2: II型 *H.pylori*; 3: IIIa型 *H.pylori*; 4: IIIb型 *H.pylori*; 5: IIIc型 *H.pylori*; 6: IV型 *H.pylori*

图2 *H.pylori* 尿素酶基因 PCR-RFLP

PCR扩增产物及其 Hae III 消化产物均相同,表明这种方法是稳定的。

四、*H.pylori* 尿素酶活性测定

52株 *H.pylori* 临床分离菌株,尿素酶活性范围 0.07 ~ 0.12/mg,其活性与 PCR-RFLP 的分型关系见表 1。

其余型间尿素酶活性差异,没有统计学意义 ($P > 0.05$); I 型 *H.pylori* 尿素酶活性较高, II 型 *H.pylori* 尿素酶活性最弱, III 型 *H.pylori* 尿素酶活性最强, IV 型 *H.pylori* 尿素酶活性较弱。

五、*H.pylori* 尿素酶的基因及活性分型与疾病的关系,见表 2。

表 1 52 株 *H.pylori* 尿素酶活性与 PCR-RFLP 的分型的比较

型	尿素酶活性($\bar{x} \pm SD$)	型间互相比
I 型	0.11 ± 0.06	I 型与 II 型相比 $P < 0.05$
II 型	0.07 ± 0.003	
III 型	0.12 ± 0.07	III 型与 II 型相比 $P < 0.05$
IV 型	0.09 ± 0.004	

表 2 52 株 *H.pylori* 尿素酶的基因及活性分型与疾病的关系

型	例数	胃溃疡	分离自胃炎患者	分离自十二指肠球部溃疡患者
I	10	6*	1	3
II	16	2	2	12*
III	13	3	8*	2
IV	13	6*	2	5

注:* 为 χ^2 检验,与其他型比较 $P > 0.05$ 。

胃溃疡主要感染 I 型 *H.pylori* ($\chi^2 = 0.024, P > 0.05$),十二指肠球部溃疡主要感染 II 型 *H.pylori* ($\chi^2 = 0.034, P > 0.05$),而胃炎主要与 III 型 *H.pylori* 感染有关 ($\chi^2 = 0.045, P > 0.05$), IV 型 *H.pylori* 感染与 *H.pylori* 相关胃溃疡及十二指肠球部溃疡均有关 ($\chi^2 = 0.008, P > 0.05$)。

讨论

体外实验发现 *H.pylori* 对酸敏感,但 *H.pylori* 却能在胃内酸性环境中长期存在,这主要与其产生尿素酶有关。尿素酶分解尿素产生碱性的氨,中和胃酸,创造局部中性环境,使 *H.pylori* 能定植在胃内酸性环境中。尿素酶在 *H.pylori* 致病机制中也发挥着重要作用,尿素酶分解尿素,使胃黏膜表面 pH 值增高,阻止氢离子由胃壁细胞向胃腔主动分泌,并使氢离子反向扩散,损伤胃黏膜。另外,高浓度的氨改变胃黏膜的通透性。氨对细胞的生命活动也有直接毒性作用,阻止携带有遗传信息的核酸(DNA、RNA)的合成;通过干扰酶的活性,引起线粒体肿胀、核碎裂,发挥急性毒性作用;生物体内氨浓度即使轻微升高,也可以导致细胞生命周期缩短^[1-5]。

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种在体外由 2 个特异性寡核苷酸引物介导的特定 DNA 序列的酶促扩增反应:目的 DNA 94 °C 加热变性成单链;55 °C 退火,使引物与互补的目的 DNA 单链片段结合;72 °C 酶促延伸反应产生二条新的目的 DNA 单链,并作为下一循环的模板。理论上,每次循环使目的 DNA 片段的含量加倍;循环 30 ~ 35 次后,目的 DNA 扩增可达 $10^5 \sim 10^9$ 倍;故 PCR 具有极高的敏感性、特异性,可检测到至少 100 个细菌的标本。限制性内切酶能识别双链 DNA 中特定碱基序列并切割,具有极高的特异性,被誉为“分子生物学特异的手术刀”。PCR-RFLP 既有 PCR 的高度敏感性,又有限制性内切酶的高度特异性,广泛应用于基因诊断,微生物分型,血型分型等方面。

在我们的研究中,不同的 *H.pylori* 临床分离菌株用 PCR 方法,均扩增出 1.7 kb 的 *H.pylori* 尿素酶基因;用限制性内切酶 Hae III 消化,*H.pylori* 可分为 4 型;*H.pylori* 体外培养传代 5 ~ 6 次后,与原代 *H.pylori* 相比,其尿素酶基因 PCR 扩增产物及其 Hae III 消化产物均相同,说明 PCR-RFLP 方法稳定,重复性、可靠性较好,适合 *H.pylori* 临床菌株的分型。还说明,*H.pylori* 尿素酶基因 PCR-RFLP 的多样性是由 *H.pylori* 尿素酶基因本身的多样性引起的。各型 *H.pylori* 菌株的尿素酶活性不同,与疾病的关系也不同,提示不同 *H.pylori* 菌株之间,尿素酶基因差异决定其尿素酶活性不同,尿素酶活性不同的 *H.pylori* 菌株与疾病的密切程度也不同:十二指肠球部溃疡患者较多感染尿素酶活性较低的 II 型 *H.pylori*,而胃溃疡患者,感染高尿素酶活性的 I 型 *H.pylori*。

lori占优势,胃炎患者主要感染尿素酶活性较高的Ⅲ型 *H.pylori*。十二指肠球部溃疡患者与胃溃疡患者还较多感染Ⅳ型 *H.pylori*。以上研究表明,不同 *H.pylori* 菌株致病力差异与其尿素酶活性及其基因差异有关。另外,我们也发现同一型的 *H.pylori* 菌株并非引起同一种疾病,提示 *H.pylori* 相关性疾病不但与 *H.pylori* 感染有关,而且也与患者的免疫反应等因素有关,是多因素引起的疾病^[6-10]。

参考文献

- Rokita E, Makristathis A. Genetic complementation of the urease-negative *Helicobacter pylori* mutant N6ureB: TnKm. FEMS Immunol Med Microbiol 2001;30:95-102.
- Chu C, Yu YJ, Kong MS, et al. Rate of *Helicobacter pylori* infection in children and clonality of Taiwan strains. Microbiol Immunol 2003;47:813-821.
- 施理,侯晓华,易粹琼,等.幽门螺杆菌空泡毒致病作用.中华微生物与免疫学杂志 1998;18:346.
- Shi L, Hou X, Yi C, et al. The expression of VacA in BCF of *Helicobacter pylori* and its relationship to vacuolated effect. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2002;22:100-102.
- Montecucco C, de Bernard M. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. Microbes Infect. 2003;5:715-721.
- Di Bonaventura G, Neri M, Angelucci D, et al. Detection of *Helicobacter pylori* by PCR on gastric biopsy specimens taken for CP test: comparison with histopathological analysis. Int J Immunopathol Pharmacol 2004;17:77-82.
- Perng CL, Lin HJ, Lo WC, et al. Genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer bleeding. World J Gastroenterol 2004; 10:602-605.
- Rizos K, Lattemann CT, Bumann D, et al. Autodisplay: efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from *Helicobacter pylori* in Salmonella vaccine strains. Infect Immun 2003;71:6320-6328.
- Wang SW, Yu FJ, Lo YC, et al. The clinical utility of string-PCR test in diagnosing *Helicobacter pylori* infection. Hepatogastroenterology 2003;50:1208-1213.
- Mehta N, Benoit S, Maier RJ, et al. Roles of conserved nucleotide-binding domains in accessory proteins, HypB and UreG, in the maturation of nickel-enzymes required for efficient *Helicobacter pylori* colonization. Microb Pathog 2003;35:229-334.

(收稿日期:2007-10-08)

(本文编辑:徐智民)

·简讯·

第二十届全国中西医结合消化系统疾病学术会议征文通知

中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2008年11月在上海召开第二十届全国中西医结合消化系统疾病学术会议,并同时举办全国中西医结合消化系统疾病(重点为肝病、内镜与胃癌)的新技术新理论继续教育学习班。

此次会议及学习班的目的在于提高对慢性肝病及早期消化道肿瘤的诊疗技术水平和科研能力,了解常见消化疾病的国内外最新研究动态,演示消化内镜介入治疗新技术,并邀请国内著名消化病专家做专题学术报告。欢迎从事中西医结合、中医或西医消化方面的医务人员踊跃参会,并积极投稿,现将会议征文事宜通知如下:

征稿内容:①消化内镜技术及其中西医结合临床应用;②脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究;③消化道肿瘤中西医结合诊疗;④脾胃学说及其临床应用;⑤其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等。

学习班招收对象:中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等(授课内容另发)。

征稿要求:请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编。稿件请附800字论文摘要,尽可能以电子信件的形式将稿件传送到 shxhhy2008@yahoo.cn 或 czs.xiaohua@163.com。

征文或报名联系人:①上海市浦东新区张衡路528号上海中医药大学附属曙光医院肝病所(邮编:201203)刘成海,传真21-51324445或51328500;②哈尔滨市南岗区学府路45号解放军211医院中医科(邮编:150080)李春雷,电话0451-57752440或86632450;传真0451-86603878。

截稿日期:2008年9月30日(以邮戳为准)。

中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会
2008年1月