

# 幽门螺杆菌及其 vacA 基因亚型和 cagA 基因与胃上皮 HLA-DR 抗原表达的关系

何 瑶, 胡品津, 何兴祥, 曾志荣, 陈 为, 彭晓忠

(中山医科大学附属第一医院消化内科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨幽门螺杆菌及其空泡毒素基因(vacA)亚型、细胞毒素相关基因(cagA)与胃上皮 HLA-DR 抗原表达间的关系。【方法】①自 39 例幽门螺杆菌阳性患者中分离培养出 39 株幽门螺杆菌菌株, 采用 PCR 方法鉴定 39 株菌株的 cagA 及 vacA 亚型; ②采用 HLA-DR 小鼠抗人单克隆抗体, 对上述已行 cagA 及 vacA 亚型鉴定的幽门螺杆菌阳性患者及 22 例阴性患者的胃窦活检标本行免疫组化染色。【结果】①幽门螺杆菌阳性患者胃上皮 HLA-DR 表达较阴性患者更显著; ②幽门螺杆菌定植密度与胃上皮 HLA-DR 抗原表达程度间存在正相关; ③感染 cagA<sup>+</sup> 菌株患者较感染 cagA<sup>-</sup> 株者胃上皮 HLA-DR 抗原表达更明显; ④本研究中 vacA s1a/m2 亚型占 90%, 故未对不同 vacA 亚型与胃上皮 HLA-DR 表达间的关系进行统计分析。【结论】①幽门螺杆菌感染可诱导胃上皮 HLA-DR 抗原异常表达; ②cagA<sup>+</sup> 菌株可能通过胃上皮 HLA-II 类分子介导而与宿主发生更为密切的相互作用, 从而较 cagA<sup>-</sup> 菌株引起更为显著的胃上皮损伤。

关键词: 螺杆菌, 幽门; vacA; cagA; HLA-DR

中图分类号: R37 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)01-0056-03

**The Relationship Between Helicobacter Pylori Its vacA Gene Subtypes cagA Gene and HLA-DR Antigen Expression in Gastric Epithelia** HE Yao, HU Pin-jin, HE Xing-xiang, ZENG Zhi-rong, CHEN Wei, PENG Xiao-zhong.  
(Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:**【Objective】To investigate the relationship between Helicobacter pylori (*H. pylori*), its vacA subtypes cagA and HLA-DR antigen expression in gastric epithelia.【Methods】①Isolating 39 *H. pylori* strains from 39 *H. pylori*-positive patients, and identifying the cagA and vacA subtypes using PCR method. ②39 and 22 pathologic samples biopsied from *H. pylori* positive patients whose *H. pylori* gene types had already been identified and *H. pylori* negative patients respectively were sectioned, then processed by immuno-histochemistry stain using monoclonal antibody aim for HLA-DR antigen. Analyze the link between *H. pylori* infection, its vacA subtypes, cagA and the degree of HLA-DR antigen expression in gastric antral epithelia.【Results】①There was significantly more extensive HLA-DR antigen expression in gastric epithelia in *H. pylori* positive patients than that existed in *H. pylori* negative patients. ②There was positive correlation between the degree of HLA-DR antigen expression in gastric epithelia and the degree of bacterial density. ③There was significantly more extensive HLA-DR antigen expression in gastric epithelia in cagA<sup>+</sup> patients than that existed in cagA<sup>-</sup> patients. ④In this study, vacA s1a/m2 subtype is predominant(90%), then the relationship between vacA subtypes and HLA-DR antigen expression in gastric epithelia was not analyzed.【Conclusions】Mediated by HLA-II molecules expressed in gastric epithelia, cagA<sup>+</sup> strains might have closer interaction with hosts, and induce more severe injury of gastric epithelia than cagA<sup>-</sup> strains.

**Key words:** *Helicobacter pylori*; cagA; vacA; HLA-DR

许多研究提示幽门螺杆菌感染与机体免疫变化间存在密切关系<sup>[1]</sup>。但在幽门螺杆菌引起的宿主免疫反应中, 究竟是何种因素起着较为关键的作用仍不清楚。cagA、vacA 作为幽门螺杆菌主要的致病因子, 前者与胃黏膜多种炎症因子产生有关, 而后者编码的 VacA 蛋白可引起胃上皮细胞空泡样变。本课题对幽门螺杆菌及其主要毒力的因子 ca-

gA、vacA 与胃上皮 HLA-DR 表达的关系进行研究, 为幽门螺杆菌感染与宿主免疫变化间的关系提供一定的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

收稿日期: 2001-09-25

基金项目: 广东省科委自然科学基金资助项目(97046); 广东省医学科研基金资助项目(2000026)

作者简介: 何 瑶(1967-), 女, 广东广州人, 博士, 讲师。

1999年6月至8月经本院胃镜和/或病理检查确诊的61例患者。其中39例自胃窦黏膜分离出幽门螺杆菌后,行菌株 vacA 基因亚型<sup>[2]</sup>及 cagA 基因鉴定,男24例,女15例,年龄20~67岁,平均(43±10.4)岁,其中慢性胃炎18例,十二指肠球部溃疡21例;22例为与之年龄、性别相匹配的幽门螺杆菌阴性病例,男14例,女8例,年龄22~65岁,平均(43±11.1)岁,其中慢性胃炎10例,十二指肠球部溃疡12例。

### 1.2 PCR检测菌株 cagA

扩增 cagA 3'端,引物:5' ACCCTAGTCG-GTAATGGGTTA3'和5' GTAATTGTCTAGTTT-CGC3'(上海生物工程公司合成)。反应总体积50 μL, dNTP 0.20 mol/L, 每条引物浓度0.20 mol/L, Taq 酶1.0 U(dNTP、Taq 酶为Sangon产品)。反应条件:95℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 1 min, 40个循环(95℃预变性5 min, 72℃终延伸7 min)。取反应产物5~10 μL经20 g/L琼脂糖凝胶电泳。

### 1.3 标本制备及 HLA-DR 抗原的检测

对每一病例在取活检分离幽门螺杆菌的同时再于胃窦大、小弯各取活检组织一块,中性福尔马林固定,石蜡包埋、切片。采用小鼠抗人单克隆抗体(Maxim Biotech, Inc. Cat. No: MAB-0093)做免疫组化染色(ABC法),检测胃上皮 HLA-DR 抗原表达的情况(操作方法参照说明书)。

### 1.4 胃上皮 HLA-DR 抗原表达的判断标准<sup>[3]</sup>

于高倍镜下观察整块切片的胃表面/小凹上皮及腺上皮,依相应部位阳性染色的上皮细胞所占百分比进行分级。0:无阳性染色细胞;+:阳性染色细胞<10%;++:阳性染色细胞10%~50%;+++ :阳性染色细胞>50%;阳性对照:固有层中阳性染色的组织细胞或淋巴细胞;阴性对照:正常胃黏膜的活检标本。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 9.0 for Windows 软件包处理数据。对双变量等级数据采用 Spearman 等级相关分析;对不符合参数检验条件的资料采用秩和检验。

## 2 结果

### 2.1 幽门螺杆菌与胃上皮 HLA-DR 表达的关系

幽门螺杆菌阳性患者胃窦表面/小凹上皮 HLA-DR(HLA-1)及腺上皮的 HLA-DR(HLA-2)表达均较阴性患者更明显(表1)。

表1 幽门螺杆菌与 HLA-1 及 HLA-2 表达的关系

	HLA-1 <sup>1),2)</sup>				HLA-2 <sup>1),3)</sup>			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
<i>H. pylori</i> <sup>+</sup>	2	14	10	13	1	5	9	24
<i>H. pylori</i> <sup>-</sup>	13	7	2	0	9	9	4	0

1) -: no positive-stained cell; +: positive-stained cell < 10%; ++: positive-stained cell 10% ~ 50%; +++: positive-stained cell > 50% (observe the whole section under microscope and grade according to the percentage of positive-stained cells). 2) rank sum test,  $U_c=4.844$ ,  $P=0.000$ . 3) rank sum test,  $U_c=5.509$ ,  $P=0.000$

### 2.2 幽门螺杆菌定植密度与胃上皮 HLA-DR 表达的关系

幽门螺杆菌定植密度与胃窦表面/小凹上皮 HLA-DR(HLA-1)表达存在正相关(表2)。

表2 幽门螺杆菌定植密度与 HLA-1 表达的关系

Number	Cases (n)	<i>H. pylori</i> colonizing density	HLA-1 expression
1~13	13	-	-
14~20	7	-	+
21~22	2	-	++
23~29	7	+	+
30~34	5	+	++
35~41	7	+	+++
42~43	2	++	+
44	1	++	++
45~48	4	++	+++
49~50	2	+++	-
51~55	5	+++	+
56~59	4	+++	++
60~61	2	+++	+++
Total	61		

Note: using Spearman rank correlation,  $r_s=0.998$ ,  $P=0.000$

幽门螺杆菌定植密度与胃窦腺上皮 HLA-DR (HLA-2)表达存在正相关(表3)。

### 2.3 幽门螺杆菌 cagA 基因与胃上皮 HLA-DR 表达的关系

感染 cagA<sup>+</sup> 株患者胃窦黏膜表面/小凹上皮 HLA(HLA-1)及腺上皮 HLA-DR(HLA-2)表达均较感染 cagA<sup>-</sup> 株者更明显(表4)。

表3 幽门螺杆菌定植密度与 HLA-2 表达的关系

Table 3 Relationship between *H. pylori* colonizing density and HLA-2 expression

Number	Cases (n)	<i>H. pylori</i> colonizing density	HLA-2 expression
1~9	9	—	—
10~18	9	—	+
19~22	4	—	++
23	1	+	—
24	1	+	+
25~28	4	+	++
29~41	13	+	+++
42	1	++	+
43~44	2	++	++
45~48	4	++	+++
49~51	3	+++	+
52~54	3	+++	++
55~61	7	+++	+++
Total	61		

Note: using Spearman rank correlation,  $r_s=0.997$ ,  $P=0.000$

表4 幽门螺杆菌 *cagA* 基因与 HLA-1 及 HLA-2 表达的关系Table 4 Relationship between *H. pylori cagA* and HLA-2 expression (n)

	HLA-1 <sup>1)</sup>				HLA-2 <sup>2)</sup>			
	—	+	++	+++	—	+	++	+++
<i>cagA</i> <sup>+</sup>	2	8	8	13	0	3	5	23
<i>cagA</i> <sup>-</sup>	0	6	2	0	1	2	4	1

1) rank sum test,  $U_c=2.181$ ,  $P=0.014$ ; 2) rank sum test,  $U_c=3.126$ ,  $P=0.001$

## 2.4 幽门螺杆菌 *vacA* 基因亚型与胃上皮 HLA-DR 表达的关系

在本研究 39 株幽门螺杆菌的 *vacA* 基因亚型中, s1a/m2 亚型占了 35 例(90%), 故未能对不同 *vacA* 基因亚型与胃上皮 HLA-DR 表达间的关系进行统计分析。

## 3 讨论

HLA-DR 抗原主要存在于参与免疫反应细胞中<sup>[4]</sup>, 通常认为在组织学完全正常的胃黏膜中该抗原是无表达的<sup>[5]</sup>, 因此, 胃上皮 HLA-DR 抗原表达可能与机体免疫异常间存在密切的关系。1986 年, Engstrand<sup>[6]</sup> 即报道了幽门弯曲菌感染与胃上皮 HLA-II 类抗原表达存在显著相关性, 随后 Wee 等<sup>[5]</sup> 的研究进一步证实了两者间的密切关系。

1998 年, Fan 等<sup>[7]</sup> 发现, 胃上皮细胞上 HLA-II 类分子表达可做为受体, 幽门螺杆菌与之结合后通过它传递信息, 诱导胃上皮细胞凋亡发生。因此, HLA-DR 抗原在宿主与幽门螺杆菌相互作用导致疾病发生中可能起着重要作用。

我们的研究发现幽门螺杆菌阳性患者胃窦黏膜表面/小凹上皮及腺上皮中该抗原表达程度均显著高于阴性患者, 并随着幽门螺杆菌感染程度加重, HLA-DR 抗原表达程度亦增加, 两者呈正相关。这强烈提示, 幽门螺杆菌感染是胃上皮细胞中出现 HLA-II 类抗原异常表达的原因之一, 在诱导宿主产生异常免疫反应中可能起着一定的作用。

幽门螺杆菌引起的宿主免疫应答及免疫耐受的反应中, 究竟是何种因素起较关键的作用目前仍未明确。 *cagA*、*vacA* 作为幽门螺杆菌的主要致病因子, 前者与可引起胃黏膜炎症反应的炎性因子/细胞因子<sup>[8]</sup> 的分泌密切相关, 而后者编码的 *VacA* 蛋白可引起胃上皮细胞发生空泡样变, 它们在幽门螺杆菌引起的宿主炎症免疫反应中可能起着不容忽视的作用。根据 Fan 等<sup>[7]</sup> 的观点, 胃上皮细胞上的 HLA-II 类分子可能做为一个受体, 幽门螺杆菌与之结合后通过它传递信息, 诱导胃上皮细胞凋亡。而我们发现, 感染 *cagA*<sup>+</sup> 菌株患者较感染 *cagA*<sup>-</sup> 菌株者胃窦上皮的 HLA-DR 表达更明显, 从“幽门螺杆菌 *cagA* 基因→胃上皮 HLA-II 类抗原表达→介导幽门螺杆菌与宿主相互作用→胃黏膜损伤”这一可能的假设过程中可看出 *cagA* 在幽门螺杆菌致病中的重要地位, 推测其可能通过胃上皮 HLA-II 类分子的介导而与宿主发生更密切的相互作用, 从而较 *cagA*<sup>-</sup> 菌株引起胃上皮更显著的损伤, 这与 *cagA*<sup>+</sup> 菌株往往较 *cagA*<sup>-</sup> 菌株引起更严重的慢性炎症相符<sup>[8]</sup>。广东地区幽门螺杆菌 *vacA* 基因亚型以 s1a/m2 占绝大部分(88%), 本研究所包括的 39 例标本中 *vacA* 亚型亦较单一, 以 s1a/m2 亚型占了 35 例(90%)。国外有报道 *vacA* 的某些亚型与较严重胃黏膜炎症间存在密切关系<sup>[9]</sup>, 因此, 不同 *vacA* 亚型的菌株在诱导胃上皮 HLA-II 类抗原表达能力上究竟是否存在差别? 值得进一步研究证实。

### 参考文献:

- [1] Fan XG, Yakcoob J, Fan XJ, et al. Enhanced TH2 responses: immune mechanism of Helicobacter pylori infection[J]. In J Med Sci. 1996, 106(1): 37.

- [2] 何瑶, 胡品津, 何兴祥, 等. 广东地区幽门螺杆菌空泡毒素基因亚型及其与胃肠疾病的关系[J]. 胃肠病学, 2000, 5(2): 72.
- [3] Wee A, The M, Raju G C. Expression of HLA-DR antigen in different histological types of gastric polyp[J]. J Clin Pathol. 1992, 45(6): 509.
- [4] Bodmer W F. The HLA system: structure and function[J]. J Clin Pathol. 1987, 40: 948.
- [5] Wee A, Teh M, Kang J Y. Association of Helicobacter pylori with HLA-DR antigen expression in gastritis[J]. J Clin Pathol. 1992, 45(1): 30.
- [6] Engstrand L, Scheynius A, Pahlson C, et al. Association of cam pylobacter pylori with induced expression of class II transplantation antigens on gastric epithelial cells[J]. Infect Immun. 1989, 57(3): 827.
- [7] Fan X, Crowe S E, Behar S, et al. The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of Helicobacter pylori and induction of apoptosis in gastric epithelial cells; a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage[J]. J Exp Med. 1998, 187(10): 1659.
- [8] Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, et al. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive Helicobacter pylori strains[J]. Gut. 1997, 41(4): 442.
- [9] Gunn M C, Stephens J C, Stewart J A D, et al. The significance of cagA and vacA subtypes of Helicobacter pylori in the pathogenesis of inflammation and peptic ulceration[J]. J Clin Pathol. 1998, 51(10): 761.

(编辑 黄小延)

(上接第 55 页 from page 55)

差异的原因可能是使用的细胞株具有 DNA 修复系统效率的差异以及细胞周期循环关卡的功能状态不同。本研究也发现 HSV-TK/GCV 系统治疗 Tca 8113 细胞后, S 期比率显著升高, G<sub>2</sub> + M 期比率下降为 0, G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期的改变不明显, 因此该系统的杀伤作用具有细胞周期(S 期)特异性。

许多研究认为<sup>[8]</sup> HSV-TK/GCV 治疗系统引起的细胞毒与 DNA 损伤诱发的凋亡有关。Li 等<sup>[9]</sup> 对乳腺癌的研究发现 HSV-TK/GCV 可激发 p53 非依赖性凋亡。Craperi 等<sup>[5]</sup> 研究也显示 HSV-TK/GCV 诱导细胞凋亡不依赖于 p53 和 Bcl-XL 的表达, 但与 BAX 诱导有关, GCV 治疗后可迅速激活 BAX 基因。但本研究对 HSV-TK/GCV 治疗后 Tca 8113 细胞的凋亡进行定性和定量研究均发现该系统并无明显体外诱导细胞凋亡的作用。由于细胞凋亡在旁观者效应中起重要作用<sup>[10]</sup>, 这可能导致了该系统旁观者效应差。

综上所述, 腺病毒介导的 HSV-TK/GCV 自杀基因系统对口腔鳞癌细胞具有一定的杀伤作用, 该杀伤作用可能与抑制 DNA 合成, 阻滞细胞周期于 S 期有关, 但与细胞凋亡无关。

## 参考文献:

- [1] Herman J R, Adler H L, Aguilar-Cordova E, et al. In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial[J]. Hum Gen Ther. 1999, 10(7): 1239.

- [2] 许道松, 伍新尧, 钟女奇, 等. 用融合自杀基因“靶向治疗”CEA 阳性肿瘤[J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(1): 79.
- [3] Haberkorn U, Khazaie K, Morr I, et al. Ganciclovir uptake in human mammary carcinoma cells expressing herpes simplex virus thymidine kinase[J]. Nucl Med Biol. 1998, 25(4): 367.
- [4] Rosolen A, Frascelta E, Di-Frascesco C, et al. In vitro and in vivo antitumor effects of retrovirus-mediated herpes simplex thymidine kinase gene transfer in human medulloblastoma[J]. Gene Ther. 1998, 5(1): 113.
- [5] Craperi D, Vicat J M, Nissou M F, et al. Increased bax expression is associated with cell death induced by ganciclovir in a herpes thymidine kinase gene-expressing glioma cell line[J]. Hum Gen Ther. 1999, 10(4): 679.
- [6] Fick J, Barker F G, Dazing P, et al. The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity in vitro[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1995, 92(24): 11071.
- [7] Kaneko Y, Tsukamoto A. Gene therapy of hepatoma: bystander effects and non-apoptotic cell death induced by thymidine kinase and ganciclovir[J]. Cancer Lett. 1995, 96(1): 105.
- [8] Colombo B M, Benedetti S, Ottolenghi S, et al. The “bystander effect”: association of U-87 cell death with ganciclovir-mediated apoptosis of nearby cells and lack of effect in athymic mice[J]. Hum Gen Ther. 1995, 6(6): 763.
- [9] Li P X, Ngo D, Brade A M, et al. Differential chemosensitivity of breast cancer cells to ganciclovir treatment following adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer[J]. Cancer Gene Ther. 1999, 6(2): 179.
- [10] Andrade Rozental AF, Rozental R, Hopperstad MG, et al. Gap junctions: the “kiss of death” and “kiss of life”[J]. Brain Res Brain Res Rev. 2000, 32(1): 308.

(编辑 刘清海)