

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00863

幽门螺杆菌 *vacA* 和 *cagA* 基因全长分子系统发育分析

杨泽民^{1,2}, 陈蔚文^{2,3}

1. 广东药学院基础学院, 广州 510006;
2. 广州中医药大学脾胃研究所, 广州 510405;
3. 上海市高校中医内科学 E-研究院, 上海中医药大学, 上海 201203

摘要: 文章从 GenBank 中下载所有含有 *vacA* 和 *cagA* 基因的 *H. pylori* 菌株的 *VacA* 和 *CagA* 全长氨基酸序列, 利用 ClustalX 2.0 和 MEGA 5.05 软件构建 *VacA* 和 *CagA* 分子系统发育树, 探讨两基因之间的分子系统发育关系和不同聚类群的临床感染结果与基因型特征。结果显示, *VacA* 和 *CagA* 具有高度相似的分子系统发育树, 并且所有 *H. pylori* 菌株在系统发育树中具有相同的分布特点, 分别聚类为东亚株群 1、2 和西方株群 3 个聚类群。其中东亚株群 1 患萎缩性胃炎比例较高, *vacA* 基因型以 s1c/m1b 和 s1a/m1b 为主, *cagA* 基因型以 EPIYA-ABD 为主; 东亚株群 2 患十二指肠溃疡的比例较高, *vacA* 基因型以 s1c/m2 和 s1a/m2 为主, *cagA* 基因型以 EPIYA-AB'C 为主; 西方株群患十二指肠溃疡和胃炎的比例相当, 萎缩性胃炎比例较低, *vacA* 基因型以 s1a/m1a 和 s1b/m1a 为主, *cagA* 基因型以 EPIYA-AB/B'CC 为主。这些结果说明, *vacA* 和 *cagA* 基因可能具有共进化的遗传关系; 东亚株群 1、2 和西方株群分别具有不同的 *vacA* 和 *cagA* 基因亚型, 这可能与临床感染结果密切相关, 因此, 在进行 *H. pylori* 相关性疾病分析时, 有必要结合 *vacA* 和 *cagA* 基因型的亚型做深入分析。

关键词: 幽门螺杆菌; *vacA*; *cagA*; 系统发育树; 基因型; 临床结果

Molecular phylogeny analysis of full-length *vacA* and *cagA* genes from *Helicobacter pylori*

YANG Ze-Min^{1,2}, CHEN Wei-Wen^{2,3}

1. School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
2. Pi-Wei Institute, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
3. E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: All amino acid full-length sequences of *VacA* and *CagA* proteins from *Helicobacter pylori* strains including *vacA* and *cagA* genes were downloaded from GenBank. Molecular phylogenetic trees of *VacA* and *CagA* were constructed by ClustalX 2.0 and MEGA 5.05 software to understand phylogenetic relationships of *vacA* and *cagA* genes, clinical infection effects, and genotype characteristics of different clustering groups. The results showed that the phylogenetic trees of *VacA*

收稿日期: 2011-11-21; 修回日期: 2011-12-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号:81102703), 国家自然科学基金重大研究计划重点资助项目(编号: 90209004), 广东省自然科学基金重点资助项目(编号: 05102323)和上海市教育委员会 E-研究院建设计划资助项目(编号: E03008)资助

作者简介: 杨泽民, 在读博士研究生, 实验师, 研究方向: 胃肠道疾病机理和生物信息学。E-mail: yzm3102001@yahoo.com.cn

通讯作者: 陈蔚文, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 胃肠道疾病机理研究和药物研发。E-mail: chenww@gzhtcm.edu.cn

网络出版时间: 2012-5-22 02:47:21

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120522.1447.003.html>

and CagA recapitulated the same three-clustering groups, i.e., East Asia group 1 and 2 and Western group, and all *H. pylori* strains had similar distribution. The strains of East Asia group 1 were significantly higher in patients with atrophic gastritis. Genotype *vacA* contained mainly s1c/m1b and s1a/m1b, while genotype *cagA* was mostly EPIYA-ABD. The strains of East Asia group 2 were higher in patients with duodenal ulcer. Genotype *vacA* was mainly s1c/m2 and s1a/m2, while genotype *cagA* was mostly EPIYA-AB'C. The strains of Western group were higher in patients with duodenal ulcer and chronic gastritis than with atrophic gastritis. Genotype *vacA* was mainly s1a/m1a and s1b/m1a, while genotype *cagA* was mostly EPIYA-AB/B'CC. All of these results illustrated that there might be inheritant relationship of coevolution between *vacA* and *cagA* genes; East Asia group 1 and 2 and Western group had different *vacA* and *cagA* sub-genotypes, which had close relationship to its clinical infection effects. It might be necessary to deeply analyze *vacA* and *cagA* sub-genotypes in the research of *H. pylori*-related diseases.

Keywords: *Helicobacter pylori*; *vacA*; *cagA*; phylogenetic tree; gene type; clinical effect

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)是一种能够长期定居在人类胃肠道的常见致病菌,它是导致慢性胃炎和消化性溃疡的主要因子,也是导致胃癌、胰腺癌的重要危险因子。*H. pylori*诱导胃黏膜炎症和癌变的发生,与其产生的致病因子密切相关。*vacA*和*cagA*基因是*H. pylori*最重要的两个致病基因。根据*vacA*和*cagA*基因存在与否,*H. pylori*菌株能够被分为I型和II型两大类^[1],其中I型菌株能够产生VacA和CagA蛋白,具有更强的致病性。同时,*vacA*和*cagA*基因具有明显的遗传多态性和地理多态性,不同的基因型和地理分布群与其临床感染结果也存在明显的相关性。

*vacA*编码的VacA蛋白可诱导上皮细胞的空泡变性^[2]。根据VacA蛋白信号肽s区和p55结构域的m区是否存在特征性插入序列,*H. pylori*可以分为s1、s2和m1、m2型菌株^[3],同时根据其序列差异又可分为不同的亚型。*H. pylori*菌株产生的VacA及其活性是由s1、s2和m1、m2组合产生。目前研究发现s1/m1和s1/m2型菌株能够产生更高水平的毒素,而s2/m2菌株只能产生低水平或无毒性的VacA^[3]。

*cagA*基因编码的CagA蛋白通过cagPAI的IV分泌系统进入上皮细胞,经过磷酸化后与SHP-2结合形成复合物,抑制SHP-2活性,从而诱导胃上皮细胞的异常迁移和增值^[4]。因此,CagA被认为是加速萎缩性胃炎发展和癌变的重要因子^[5]。基于CagA与SHP-2结合的C-端氨基酸序列Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala(EPIYA)基序存在情况,可以分为不同的EPIYA型。此外,*cagA*基因序列存在明显的地理差异,可以

分为西方株和东亚株型。研究发现,东亚株型的CagA具有更强的SHP-2结合和转化活性^[6]。

*vacA*和*cagA*基因与*H. pylori*感染的临床结果有着复杂的关系。一方面,同时表达VacA和CagA蛋白的I型*H. pylori*菌株具有更强的致病性;另一方面,VacA和CagA蛋白之间存在明显的拮抗作用,即VacA能够下调CagA对上皮细胞的作用,反之亦然^[7,8]。对此,本研究对含有*vacA*和*cagA*基因的45个不同地理来源和不同基因型的*H. pylori*菌株VacA和CagA全长氨基酸序列进行分子系统发育分析,分别构建它们的分子系统发育树,探讨*vacA*和*cagA*基因之间的分子系统发育关系,以及不同聚类群与*H. pylori*菌株的基因型和临床结果之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 *H. pylori* 菌株选择

本研究以“含有*vacA*和*cagA*基因全长的*H. pylori*菌株”作为菌株选择目标。通过GenBank数据库检索,共获得47个符合要求的*H. pylori*菌株,其中来源于蒙古沙鼠的B8菌株和与F80菌株具有相同VacA序列的F92菌株被排除在本研究之外。因此,文章的研究对象是来源于人的45个含有*vacA*和*cagA*基因的*H. pylori*菌株。它们来自于世界各地,涉及的疾病包括萎缩性胃炎(Atrophic gastritis, AG),胃炎(Gastritis, G),胃溃疡(Gastric ulcer, GU),十二指肠溃疡(Duodenal ulcer, DU),胃癌(Gastric cancer, GCA)等,详细信息见表1^[9~16]。

表 1 *H. pylori* 菌株来源及其 *vacA* 和 *cagA* 基因 GenBank 登录号和基因型

菌株 ^a	<i>vacA</i> 基因登录号	<i>cagA</i> 基因登录号	疾病 ^b	<i>vacA</i> 基因型	<i>cagA</i> 基因 EPIYA 型	地理来源
F13	BAD51768	BAC10419	AG	<i>s1c/m1b</i>	ABD	Fukui, Japan
F15	BAD51769	BAC10420	AG	<i>s1c/m1b</i>	ABD	Fukui, Japan
F16	BAJ55469	BAJ55408	AG	<i>s1c/m1b</i>	ABD	Fukui, Japan
F17	BAD51771	BAC10422	AG	<i>s1c/m1b</i>	AABD	Fukui, Japan
F18	BAD51772	BAC10423	AG	<i>s1c/m1b</i>	ABABD	Fukui, Japan
F26	BAD51773	BAC10424	AG	<i>s1c/m1b</i>	ABAB"D	Fukui, Japan
F30	BAJ56545	BAJ56876	DU	<i>s1a/m1b</i>	ABD	Fukui, Japan
F32	BAJ58044	BAJ58105	GCA	<i>s1c/m1b</i>	ABD	Fukui, Japan
F36	AAD04277	BAC10426	AG	<i>s1c/m1b</i>	ABD	Fukui, Japan
F37	AAC77450	BAD51744	AG	<i>s1a/m1a</i>	A'BD	Fukui, Japan
F55	AAD04270	BAC10427	AG	<i>s1c/m1b</i>	AB"B"D	Fukui, Japan
F57	BAJ59976	BAJ59648	GCA	<i>s1a/m1b</i>	ABD	Fukui, Japan
F79	AAC77452	BAC10428	GU	<i>s1a/m1a</i>	AB'CC	Fukui, Japan
F80	BAD51775	BAC10429	DU	<i>s1b/m1a</i>	AB'DD ^c	Fukui, Japan
OK101	BAD51777	BAC10431	AG	<i>s1c/m1b</i>	ABD	Okinawa, Japan
OK107	BAD51778	BAC10432	AG	<i>s1a/m2</i>	AB'CCC	Okinawa, Japan
OK109	BAD51779	BAC10433	AG	<i>s1a/m1b</i>	ABD	Okinawa, Japan
OK111	BAD51747	BAD51747	AG	<i>s1b/m1b</i>	AB'CC	Okinawa, Japan
OK118	BAD51781	BAD51749	AG	<i>s1a/m1b</i>	ABD	Okinawa, Japan
OK129	BAD51782	BAC10435	AG	<i>s1c/m2</i>	ABD	Okinawa, Japan
OK130	BAD51783	BAD51750	DU	<i>s1c/m2</i>	AB'C	Okinawa, Japan
OK139	BAD51784	BAD51751	AG	<i>s1a/m2</i>	AB'C	Okinawa, Japan
OK144	BAD51785	BAD51752	DU	<i>s1a/m2</i>	AB'C	Okinawa, Japan
OK155	BAD51786	BAD51753	AG	<i>s2/m2</i>	AB"C	Okinawa, Japan
OK158	BAD51787	BAD51754	DU	<i>s1a/m1b</i>	ABD	Okinawa, Japan
OK159	BAD51788	BAD51755	AG	<i>s1a/m1b</i>	AB"D	Okinawa, Japan
OK160	BAD51789	BAD51756	AG	<i>s1a/m2</i>	AB""C	Okinawa, Japan
OK180	BAD51791	BAD51758	DU	<i>s1c/m2</i>	AB'C	Okinawa, Japan
OK181	BAD51792	BAD51759	AG	<i>s1c/m2</i>	AB'	Okinawa, Japan
OK185	BAD51793	BAD51760	DU	<i>s1a/m2</i>	AB'C	Okinawa, Japan
OK187	BAD51794	BAD51761	DU	<i>s1c/m2</i>	AB'C	Okinawa, Japan
OK194	BAD51795	BAD51762	AG	<i>s1a/m1b</i>	ABD	Okinawa, Japan
OK204	BAD51796	BAD51764	DU	<i>s1a/m2</i>	AB"D ^c	Okinawa, Japan
OK210	BAD51798	BAD51766	DU	<i>s1a/m2</i>	AB'C	Okinawa, Japan
11637	AAD04290	AAF17598	G	<i>s1a/m1a</i>	ABCC	Australian
11638	AAA18867	AAC44706	G	<i>s1a/m1a</i>	AB	Australian
43526	AAB53868	AAB58747	NA	<i>s1b/m1a</i>	ABCC	Australian
26695	NP_207680	NP_207343	G	<i>s1a/m1a</i>	ABC	British
P12	YP_002301516	YP_002301189	DU	<i>s1a/m1a</i>	ABCC	Germany
G27	YP_002266461	YP_002266135	NA	<i>s1b/m1a</i>	ABCC	Italy
HPAG1	YP_627608	YP_627265	AG	<i>s1b/m1a</i>	AB'BC	Swedish
J99	NP_223537	NP_223213	DU	<i>s1b/m1a</i>	B'C	American
Shi470	YP_001910400	YP_001910294	G	<i>s1b/m1b</i>	AB""C ^c	Amazon
35A	ADU41215	ADU41149	NA	<i>s1c/m1b</i>	ABD	Norway
51	ACX98036	ACX97976	DU	<i>s1a/m1b</i>	AB"D	Korea

注: ^a菌株文献来源: F和OK字母标记菌株^[9,10], 51^[10], Shi470^[11], 11637、11638 和 43526^[9], 26695^[12], P12^[13], G27^[14], HPAG1^[15], J99^[16]。

^bAG: 萎缩性胃炎; DU: 十二指肠溃疡; GCA: 胃癌; GU: 胃溃疡; G: 胃炎; NA: 未知。

^c为*cagA*基因ESS和WSS杂交型。

1.1.2 *vacA* 和 *cagA* 基因氨基酸序列来源

本研究所用的 *H. pylori* 菌株 *vacA* 和 *cagA* 基因全长氨基酸序列数据全部来源于 NCBI 的 GenBank 数据库, 其序列登录号见表 1。

1.2 方法

1.2.1 *vacA* 和 *cagA* 基因分型标准

vacA 基因可根据 s 区和 m 区是否存在标签序列分为 s1、s2 和 m1、m2 两个等位基因^[3], 同时根据 s 区和 m 区的序列多样性每一个等位基因再分为不同的亚型, 如 s1a、s1b、s1c、m1a、m1b 等。两个等位基因的组合形成每一个特定 *H. pylori* 菌株的基因型(表 1)。*cagA* 基因根据其酪氨酸磷酸化相关的 C-端序列特征和 EPIYA 基序序列差异以及重复次数分为不同的 EPIYA 型^[9], 简单说, *cagA* 基因氨基酸序列 C-端第一个和第二个 EPIYA 基序分别命名为 EPIYA-A 和 EPIYA-B, 西方和东亚 *cagA* 基因特异性 SHP-2 结合序列, 即 WSS 和 ESS 分别命名为 EPIYA-C 和 EPIYA-D, 根据 EPIYA 序列的差异性又分为 A' (NPIYA)、B' (EPIYT)、B'' (ESIYA) 和 B''' (ESIYT) (表 1)。

1.2.2 *vacA* 和 *cagA* 基因系统发育分析

利用 ClustalX 2.0 软件对氨基酸序列进行全序列比对, 利用 MEGA 5.05 软件通过邻接法(Neighbor-joining), p-distance 模型和全删除空格的方法构建系统发育树, 并用 Bootstrap 的方法重复 1 000 次进行检验。

2 结果与分析

2.1 *vacA* 基因系统发育分析

为了研究 *vacA* 基因系统发育特征, 本研究分析了从 GenBank 下载的 45 个 *H. pylori* 菌株 *vacA* 基因全长氨基酸序列。构建的 *vacA* 基因无根系统发育树显示所有的 *H. pylori* 菌株 *vacA* 基因序列聚类为东亚株群 1、2 和西方株群 3 个聚类群: 东亚株群 1 主要来自于东亚国家(日本、韩国), 其中一株来自美洲印第安; 西方株群除 F37、F79 和 F80 来自日本 Fukui 之外, 所有菌株都来自西方国家, 包括澳大利亚、英国、德国、意大利、瑞典、美国和挪威; 东亚株群 2 则全部来自于日本 Okinawa 地区(图 1A)。从 *vacA* 基因型分析, 东亚株群 1(m1b)和西方株群(m1a)同

为 m1 型 *H. pylori* 菌株, 而东亚株群 2 则为 m2 型 *H. pylori* 菌株。其中东亚株群 1 有 s1c/m1b、s1a/m1b 和 s1b/m1b 三种基因型, 前两种为其主要基因型; 西方株群有 s1a/m1a、s1b/m1a 和 s1b/m1b 三种基因型, 前两种也为其主要基因型; 东亚株群 2 的基因型也有 3 种, 分别为 s1c/m2、s1a/m2 和 s2/m2, 前两种也为其主要基因型(表 1, 2)。

2.2 *cagA* 基因系统发育分析

对 45 个 *H. pylori* 菌株 *cagA* 基因全长氨基酸序列进行分析, 构建 *cagA* 基因无根系统发育树。结果显示 *cagA* 基因系统发育树与 *vacA* 基因系统发育树非常相似, 所有的 *H. pylori* 菌株也具有类似的分布, 同样聚类为东亚株群 1、2 和西方株群 3 个聚类群(图 1B)。根据 EPIYA 基序的分型方法, 除 OK181 和 11638 菌株不含有 EPIYA-C 和 -D 外, 所有的菌株都能够被分为 EPIYA-C 和 -D 型, 其中东亚株群 1 除 Shi470 和 F80 菌株含有 ESS 和 WSS 杂合型之外, 所有菌株都含有 EPIYA-D, 西方株群和东亚株群 2 除 OK204 菌株含有杂合型之外, 所有菌株都含有 EPIYA-C。此外, 除了 J99 菌株不含 EPIYA-A 基序和 F37 含有 EPIYA-A' 基序之外, 所有的菌株都含有 EPIYA-A 和 EPIYA-B 基序。在含有 23 个菌株的东亚株群 1 内有 18 个存在 EPIYA-B 基序, 而在含有 12 个菌株的东亚株群 2 内有 9 个存在 EPIYA-B' 基序, 西方株群的大部分菌株存在 EPIYA-C 重复(10 个菌株有 6 个存在重复)(表 1)。可见 EPIYA-B、-B' 和 -C 重复可能是这 3 个聚类群的另一重要特征。

2.3 不同聚类群 *H. pylori* 菌株与临床感染结果的关系

CagA 和 VacA 分子系统树都聚类为 3 个聚类群, 从临床感染结果来看, 东亚株群 1 分别来自于 AG、DU、GCA 和 G 病人, 以 AG 最多, 其次为 DU; 西方株群分别来自于 AG、DU、GU 和 G 病人, 其中以 G 最多, 其次为 DU; 东亚株群 2 分离于 AG 和 DU 病人, 以 DU 占多数(表 3)。

3 讨论

胃肠道疾病的发生是多种因素共同作用的结果, 其中 *H. pylori* 是导致胃肠道疾病的重要病原菌。*H. pylori* 诱导胃肠道炎症和癌变的发生与其产生的致

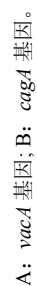


表 2 不同聚类群 *H. pylori* 菌株 *vacA* 基因型

	基因型								合计
	<i>s1c/m1b</i>	<i>s1a/m1b</i>	<i>s1a/m1a</i>	<i>s1b/m1a</i>	<i>s1b/m1b</i>	<i>s1c/m2</i>	<i>s1a/m2</i>	<i>s2/m2</i>	
东亚株群 1	11	8			2				21
西方株群			5	5	1				11
东亚株群 2						5	7	1	13
合计	11	8	5	5	3	5	7	1	45

表 3 不同聚类群 *H. pylori* 菌株临床感染结果

	临床感染结果						合计
	AG	GU	DU	GCA	G	NA	
东亚株群 1	13		3	2	1	1	20
西方株群	1	1	2		3	2	9
东亚株群 2	5		7				12
合计	19	1	12	2	4	3	41

注：去掉 4 个聚类不稳定的 *H. pylori* 菌株：F37、F80、OK111 和 OK129。AG：萎缩性胃炎；GU：胃溃疡；DU：十二指肠溃疡；GCA：胃癌；G：胃炎；NA：未知。

病因子密切相关，CagA和VacA是*H. pylori*产生的两个最重要致病因子。作为编码VacA和CagA蛋白的*vacA*和*cagA*基因具有明显的遗传多态性和地理多态性，不同的基因型和地理分类群已经被广泛报道^[9,10,17]。

*vacA*基因可以根据其s区和m区的特征序列的存在与否可以分为s1、s2和m1、m2型。本研究通过对45株不同来源的*H. pylori*菌株s区序列的分子系统发育分析显示，研究菌株存在s1a、s1b、s1c和s2四种类型，其中主要以s1a和s1c两种类型为主，这与文献报道的*vacA*基因型检测结果基本一致^[9,10,18]，但是对于F16菌株，文献报道的检测结果存在不一致，我们对s区氨基酸序列的分析支持s1c型的结果(图略)。另外，我们的结果显示43526菌株为s1a型。对于m区的分型，通过对*vacA*基因序列的分子系统学分析结果显示，*H. pylori*菌株能够被分为m1和m2型两个聚类群，其中m1型聚类群又可分为亚洲株和西方株两个地理分类亚群，对于m2型聚类群的细分还存有异议。Gangwer等^[17]对*vacA*基因氨基酸序列的分析，发现*H. pylori*菌株能够被分为m1型亚洲株、m1型非亚洲株和m2型亚洲和非亚洲株3个聚类群。纪徐淮等^[19]研究发现*H. pylori*菌株能够分为m1型和m2型两个聚类群，每一个聚类群又可再分为中国株和西方株两个地理分类亚群。作者^[20]之前对中国*H. pylori*强细胞毒株和弱细胞毒株的*vacA*

基因序列的分析时，也获得了与纪徐淮等^[19]相同的结果。本研究通过对*vacA*基因全长氨基酸序列的分子系统发育分析，发现45个*H. pylori*菌株聚类为m1和m2型聚类群，其中m1型又分为m1a和m1b两个亚型，m2型聚类群全部来自日本的Okinawa地区，因此没有进一步细分。该结果与临床检测结果吻合，同时也与Yamazaki等^[9]的研究结果一致。然而在对聚类群的命名上，Yamazaki等把m1a和m2型聚类群归为西方株群，m1b型聚类群命名为东亚株群。本研究基于*vacA*基因m区聚类分析的结果和*H. pylori*菌株的来源，考虑到*cagA*阳性的m2型西方*H. pylori*菌株没有被收集到用于研究，故将m1b型聚类群命名为东亚株群1，m1a型聚类群命名为西方株群，m2型聚类群定为东亚株群2，对于m2型菌株的细分还需要更进一步的研究。

*cagA*阳性株能够加速萎缩性胃炎发展和癌变的发生，其中磷酸化的CagA与SHP-2结合形成复合物，抑制SHP-2的活性是发挥其致病作用的关键。因此，CagA与SHP-2结合的C-端氨基酸序列差异与其致病性密切相关。大量*cagA*基因序列的分析结果显示CagA具有明显的地理分布特点，可以分为不同的地理分类群^[9,17,21]。本研究通过对45个*H. pylori*菌株CagA全长氨基酸序列分析，获得了与*vacA*基因分子系统发育树类似的结果，所有菌株聚类为东亚株群1、2和西方株群3个聚类群，其中东亚株群2和西

方株群聚类为一个大群, 都含有WSS的EPIYA-C, 而东亚株群1则含有ESS的EPIYA-D。此外, 3个聚类群还具有各自的特征, 如东亚株群1大部分菌株存在EPIYA-B, 而东亚株群2的菌株存在EPIYA-B', 西方株群则存在EPIYA-C重复。

VacA和CagA分子系统发育树分析不仅能够反映*H. pylori*菌株的地理来源和基因型特征, 还能说明两基因在进化上的遗传相关性。目前, 已有多个研究显示基于VacA和CagA氨基酸序列构建的分子系统发育树具有类似的拓扑结构^[9,17]。Gangwer等^[17]还发现, 利用VacA和CagA氨基酸序列构建的这种相似的分子系统发育树与基于看家基因构建的分子系统发育树明显不同, 他们认为VacA和CagA具有与核心基因组完全不同的进化方式, *vacA*和*cagA*基因之间可能具有共进化的遗传关系。本研究通过对VacA和CagA氨基酸序列的分析也获得了相同的结果, 两个系统发育树都聚类成3个聚类群, 即东亚株群1、2和西方株群, 并且在VacA和CagA的分子系统发育树中所有*H. pylori*菌株的分布都是一样的。这说明*H. pylori*菌株*vacA*和*cagA*基因的进化不依赖于*H. pylori*菌株的进化, 是独立进化的, 并且两基因的进化可能是一种共进化的遗传关系。对于形成这种共进化遗传关系的原因, 可能是*H. pylori*菌株*vacA*和*cagA*基因受宿主胃黏膜环境选择压力的影响, 产生的一种对宿主促炎症和抗炎症反应的平衡方式, 以达到其长期定居胃黏膜的目的^[17]。大量研究显示, VacA和CagA都能促进上皮细胞的炎症反应^[22-25]。然而, VacA和CagA之间又存在明显的拮抗作用, 即VacA和CagA都能下调彼此对上皮细胞的作用^[7,8]。这说明能够产生VacA和CagA的I型*H. pylori*菌株既能对宿主产生更强的毒性, 同时又不至于对宿主造成过大的损伤, 以便于其在宿主体内的长期定居。因此, *vacA*和*cagA*基因这种共进化的遗传关系不仅不会损害*H. pylori*进化, 而且是一种适应性进化, 有利于*H. pylori*在宿主体内的寄生。此外, 在VacA和CagA的分子系统发育树中F37、F80、OK111和OK129具有不一样的分布, 这4个菌株都分别处于每一个聚类的边沿, 如F37和F80处于*cagA*系统发育树东亚株群1的边沿, 而OK111和OK129则分别处于*vacA*系统发育树东亚株群1和东亚株群2的边沿, 可见其在系统发育树上的位置不够稳定。另外, F79

菌株在VacA和CagA系统发育树上的位置都处于西方株群, 因此它可能来自西方, 而不是日本。F80和OK204都是ESS和WSS杂交型, 该区域序列的前半部分与WSS相同, 后半部分与ESS相同, 由于F80存在一个ESS重复, 所以在CagA系统发育树中F80属于含有EYIPA-D的东亚株群1, 而OK204属于含有EYIPA-C的东亚株群2。Shi470也是一个ESS和WSS杂交型, 但它在该区域序列的前半部分与ESS相同, 后半部分与WSS相同, 同时由于该菌株CagA全长氨基酸序列与东亚株群1相似性较高, 故Shi470属于东亚株群1。

从VacA和CagA分子系统发育树与*H. pylori*临床感染结果来看, 东亚株群1的AG发生率相对其他疾病明显要高, 2个GCA病例全部处于该群; 西方株群以G和DU发生率较高, AG较少; 东亚株群2疾病种类较少, 只有AG和DU, 以DU发生率相对较高。这些结果显示3个聚类群都存在不同的*H. pylori*临床感染结果。对于东亚株群1和2存在不一样的临床结果, 可能与其地理特征密切相关。东亚株群1的菌株大部分来自Fukui, 而东亚株群2的菌株则全部来自Okinawa。Okinawa地处日本的西南部, 与中国台湾省和东南沿海临近, 二战后被美国占领, 与西方国家交流比较活跃。而Fukui则与之相反, 是一个地处日本本洲中央的典型农村。有文献报道, Fukui地区萎缩性胃炎的发病率和胃癌的死亡率都比Okinawa高, 而Okinawa地区十二指肠溃疡的发病率更为普遍^[9]。此外, 从基因型来看, 东亚株群1的*vacA*基因型以s1c/m1b和s1a/m1b为主, *cagA*基因型以EPIYA-ABD为主; 而东亚株群2的*vacA*基因型以s1c/m2和s1a/m2为主, *cagA*基因型以EPIYA-AB'C为主。可见, 东亚株群1和2在*vacA*基因s区的分型上相似, 在m区的分型上存在明显不同, 但与我国东南沿海*vacA*基因型以s1/m2为主的报道结果一致^[26,27]; 在*cagA*基因分型上两者EPIYA-C和EPIYA-D基序也存在明显的差别, 东亚株群2更接近于西方株群以EPIYA-AB/B'CC为主的*cagA*基因型。综合以上分析, 大部分来自于日本的东亚株群1和2既有相同的地方, 又存在明显的差异, 同时与西方株群也有明显的不同, 因此, 东亚株群2应作为一个独立的聚类群存在。同时, 这也说明在进行*H. pylori*基因型与其临床感染结果相关性分析时, 有必要结合

*vacA*和*cagA*基因型的亚型做深入分析,这样更有助于发现*H. pylori*菌株与其临床感染结果的相关性。

综合以上的分析, *VacA* 和 *CagA* 的分子系统发育树都聚类为东亚株群 1、2 和西方株群 3 个聚类群,并且所有 *H. pylori* 菌株在系统发育树中都具有相同的分布特点,这些结果说明 *vacA* 和 *cagA* 基因之间可能具有共进化的遗传关系,并且 *H. pylori* 菌株 *vacA* 和 *cagA* 基因的共进化遗传关系可能有其内在的功能基础,即平衡菌株对宿主的促炎症和抗炎特性,以便达到长期定居胃黏膜目的。从临床结果来看,东亚株群 1 的 AG 较高,东亚株群 2 引起 DU 的比例较高,而西方株群患 DU 和 G 的比例较高,AG 比例较低。从基因型来看,东亚株群 1 的 *vacA* 基因型以 s1c/m1b 和 s1a/m1b 为主, *cagA* 基因型以 EPIYA-ABD 为主;东亚株群 2 的 *vacA* 基因型以 s1c/m2 和 s1a/m2 为主, *cagA* 基因型以 EPIYA-AB'C 为主;西方株群 *vacA* 基因型以 s1a/m1a 和 s1b/m1a 为主, *cagA* 基因型以 EPIYA-AB/B'CC 为主。这些结果说明东亚株群 1、2 和西方株群分别具有不同的基因亚型和临床感染结果,同时,在进行 *H. pylori* 基因型与其临床感染结果相关性分析时,有必要结合 *vacA* 和 *cagA* 基因型的亚型做深入分析。此外,由于本研究中可得到的原始数据有限,数据来源的地理位置分布也相对集中不够广泛,因此,有必要获得更多的数据做进一步补充与完善。

参考文献(References):

- [1] Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, Covacci A. Analysis of expression of *cagA* and *vacA* virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that *cagA* is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun*, 1995, 63(1): 94–98. DOI
- [2] Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*, 1992, 267(15): 10570–10575. DOI
- [3] Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*, 1995, 270(30): 17771–17777. DOI
- [4] Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*, 2002, 295(5555): 683–686. DOI
- [5] Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between *cagA* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology*, 2003, 125(6): 1636–1644. DOI
- [6] Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, Hatakeyama M. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(22): 14428–14433. DOI
- [7] Tegtmeyer N, Zabler D, Schmidt D, Hartig R, Brandt S, Backert S. Importance of EGF receptor, HER2/Neu and Erk1/2 kinase signalling for host cell elongation and scattering induced by the *Helicobacter pylori* CagA protein: antagonistic effects of the vacuolating cytotoxin VacA. *Cell Microbiol*, 2009, 11(3): 488–505. DOI
- [8] Argent RH, Thomas RJ, Letley DP, Rittig MG, Hardie KR, Atherton JC. Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors VacA and CagA. *J Med Microbiol*, 2008, 57(Pt 2): 145–150. DOI
- [9] Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T, Ohtani M, Suto H, Ito Y, Yamazaki Y, Keida Y, Higashi H, Hatakeyama M, Azuma T. Distinct diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(8): 3906–3916. DOI
- [10] Kawai M, Furuta Y, Yahara K, Tsuru T, Oshima K, Handa N, Takahashi N, Yoshida M, Azuma T, Hattori M, Uchiyama I, Kobayashi I. Evolution in an oncogenic bacterial species with extreme genome plasticity: *Helicobacter pylori* East Asian genomes. *BMC Microbiol*, 2011, 11: 104. DOI
- [11] Kersulyte D, Kalia A, Gilman RH, Mendez M, Herrera P, Cabrera L, Velapatiño B, Balqui J, Paredes Puente de la Vega F, Rodriguez Ulloa CA, Cok J, Hooper CC, Dailide G, Tamma S, Berg DE. *Helicobacter pylori* from Peruvian amerindians: traces of human migrations in strains from remote Amazon, and genome sequence of an Amerind strain. *PLoS One*, 2010, 5(11): e15076. DOI
- [12] Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou LX, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS,

- Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 1997, 388(6642): 539–547. [DOI](#)
- [13] Fischer W, Windhager L, Rohrer S, Zeiller M, Karnholz A, Hoffmann R, Zimmer R, Haas R. Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(18): 6089–6101. [DOI](#)
- [14] Baltrus DA, Amieva MR, Covacci A, Lowe TM, Merrell DS, Ottemann KM, Stein M, Salama NR, Guillemin K. The complete genome sequence of *Helicobacter pylori* strain G27. *J Bacteriol*, 2009, 191(1): 447–448. [DOI](#)
- [15] Oh JD, Kling-Bäckhed H, Giannakis M, Xu J, Fulton RS, Fulton LA, Cordum HS, Wang CY, Elliott G, Edwards J, Mardis ER, Engstrand LG, Gordon JI. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(26): 9999–10004. [DOI](#)
- [16] Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Guild BC, deJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M, Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 1999, 397(6715): 176–180. [DOI](#)
- [17] Gangwer KA, Shaffer CL, Suerbaum S, Lacy DB, Cover TL, Bordenstein SR. Molecular evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin gene *vacA*. *J Bacteriol*, 2010, 192(23): 6126–6135. [DOI](#)
- [18] Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S, Ohtani M, Ito Y, Muramatsu A, Suto H, Yamazaki Y, Keida Y, Higashi H, Hatakeyama M. Distinct diversity of the *cag* pathogenicity island among *Helicobacter pylori* strains in Japan. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(6): 2508–2517. [DOI](#)
- [19] Ji XH, Frati F, Barone S, Pagliaccia C, Burrone D, Xu GM, Rappuoli R, Reytrat JM, Telford JL. Evolution of functional polymorphism in the gene coding for the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 206(2): 253–258. [DOI](#)
- [20] 杨泽民. 中国幽门螺杆菌强细胞毒株和弱细胞毒株 *vacA* 基因全长序列特征与 VacA 活性的关系. 世界华人消化杂志, 2011, 19(33): 3446–3451. [DOI](#)
- [21] Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Mégraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang XY, Achtman M, Suerbaum S. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, 2003, 299(5612): 1582–1585. [DOI](#)
- [22] Stein M, Rappuoli R, Covacci A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after *cag*-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(3): 1263–1268. [DOI](#)
- [23] Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*, 2000, 287(5457): 1497–1500. [DOI](#)
- [24] Lai CH, Chang YC, Du SY, Wang HJ, Kuo CH, Fang SH, Fu HW, Lin HH, Chiang AS, Wang WC. Cholesterol depletion reduces *Helicobacter pylori* CagA translocation and CagA-induced responses in AGS cells. *Infect Immun*, 2008, 76(7): 3293–3303. [DOI](#)
- [25] Suzuki M, Mimuro H, Kiga K, Fukumatsu M, Ishijima N, Morikawa H, Nagai S, Koyasu S, Gilman RH, Kersulyte D, Berg DE, Sasakawa C. *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host Microbe*, 2009, 5(1): 23–34. [DOI](#)
- [26] 王晶桐, 刘玉兰. 87 株幽门螺旋杆菌 VacA 等位基因的分析. 中国消化内镜, 2008, (11): 37–42. [DOI](#)
- [27] 陈学军, 严杰, 毛亚飞, 李立伟. 浙江地区幽门螺杆菌临床菌株 *vacA* 优势基因型及其核苷酸序列分析. 浙江大学学报(医学版), 2003, 32(1): 24–28. [DOI](#)