

PHÁT HIỆN GENE ĐỘC LỰC CagA CỦA *HELICOBACTER PYLORI* TỪ DỊCH DẠ DÀY BẰNG KỸ THUẬT SEMI-NESTED PCR

Nguyễn Phú Hùng*

Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

CagA (Cytotoxin-associated gene A) là gene đầu tiên được chứng minh là gene độc lực của *H. pylori*. CagA mã hóa một protein có liên quan đến sự tăng cường độ viêm dạ dày, có thể gây tổn thương nghiêm trọng cho niêm mạc dạ dày và thúc đẩy quá trình phát triển thành ung thư dạ dày. Chẩn đoán chính xác các chủng *H. pylori* mang gene CagA có ý nghĩa quan trọng trong tầm soát nguy cơ ung thư dạ dày. Hiện nay, PCR vẫn là phương pháp được sử dụng nhiều nhất để xác định sự có mặt của các gene CagA. Tuy nhiên, phương pháp này vẫn gặp một số khó khăn đối với trường hợp các mẫu bệnh phẩm chứa một lượng nhỏ *H. pylori*, hoặc các mẫu có độ tinh sạch thấp. Trong nghiên cứu này, tác giả thực hiện phản ứng Semi-Nested PCR để phát hiện các chủng *H. pylori* mang gene CagA trực tiếp từ mẫu dịch dạ dày nhằm giảm tính xâm lấn so với các phương pháp phân tích từ mô dạ dày. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, phản ứng Semi-Nested PCR được thiết lập đã cho phép khuếch đại đặc hiệu gen CagA từ chủng đối chứng cũng như từ các mẫu bệnh phẩm. Phân tích trên 35 mẫu bệnh phẩm đã chỉ rằng, tỷ lệ các mẫu dương tính với chủng mang gene CagA chiếm tỷ lệ cao, lên tới 90%.

Từ khóa: Y- sinh; Semi-Nested PCR; gene CagA; *H. pylori*; mẫu dịch dạ dày; mô dạ dày.

Ngày nhận bài: 19/3/2020; Ngày hoàn thiện: 09/4/2020; Ngày đăng: 11/6/2020

DETECTION OF VIRULENCE GENE CagA OF *HELICOBACTER PYLORI* FROM GASTRIC JUICE BY SEMI-NESTED-PCR

Nguyen Phu Hung*

TNU - University of Sciences

ABSTRACT

CagA (Cytotoxin-associated gene A) was the first virulence gene characterized in *H. pylori*. CagA gene encodes a protein involved in increasing gastritis, which can cause serious damage to the lining of the stomach and promote the development of stomach cancer. Accurate diagnosis of *H. pylori* strains carrying gene CagA is important in screening for the risk of gastric cancer. Currently, PCR is still the most used method to determine the presence of CagA genes in *H. pylori* strains. However, this method still faces some difficulties in the case of specimens containing small amounts of *H. pylori*, or contaminant samples. In this study, we established a Semi-Nested-PCR reaction to detect directly *H. pylori* strains carrying the CagA gene from gastric juice samples to reduce invasiveness compared to analytical methods from gastric tissue. This study showed that the established Semi-Nested PCR reaction allowed for specific amplification of the CagA gene from the control strains as well as from patient samples. Analysis of 35 samples showed that the percentage of CagA gene positive strains accounted for a high rate, up to 90%.

Keywords: Biomedicine; Nested PCR; gene CagA; *H. pylori*; gastric juice sample; gastric tissue.

Received: 19/3/2020; Revised: 09/4/2020; Published: 11/6/2020

* Corresponding author. Email: hungnguyenphu@tnus.edu.vn

1. Giới thiệu

H. pylori được xác định là tác nhân sinh học chính gây ung thư dạ dày ở người. Hiện có các phương pháp xâm lấn và không xâm lấn khác nhau được sử dụng trong xác định nhiễm *H. pylori*. CagA là một yếu tố quan trọng trong sự phát triển của ung thư dạ dày ở những người nhiễm *H. pylori*. Các nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng, CagA ở các chủng Đông Á liên kết với SHP2 (một pro-oncogene) mạnh gấp 100 lần so với CagA ở các chủng *H. pylori* của phương Tây và cũng kích thích sự hoạt động mạnh mẽ của gene Ras/ERK của tế bào [1].

Trong mô hình của Gerbil, hầu hết các bệnh nhân có chủng CagA dương tính đều có xu hướng phát triển thành ung thư dạ dày ở phương Tây [2]. Các quan sát dịch tễ học chỉ ra rằng các bệnh nhân có đột biến CagA có mối liên hệ chặt chẽ hơn với teo niêm mạc dạ dày và tỷ lệ mắc ung thư dạ dày cao hơn [3].

H. pylori mang gen CagA có khả năng kích thích tiết IL-8, IL-10, IL-12 do hoạt hoá yếu tố NFkB (Nuclear factor kappa B), để tiết và vận chuyển protein CagA vào trong tế bào, đồng thời phosphoryl hoá CagA và hoạt hoá các con đường tín hiệu ung thư trong tế bào [4]. Theo Anthory, xấp xỉ 60% các chủng *H. pylori* phân lập được có gen CagA. Người ta thấy kháng thể CagA có ở 100% bệnh nhân loét dạ dày tá tràng và 76,5% ở bệnh nhân có biểu hiện bệnh lý dạ dày tá tràng nhưng không có loét [5]. Ở các nước phát triển, bệnh lý về dạ dày tá tràng có liên quan với chủng *H. pylori* có CagA (+) hơn các chủng CagA (-). Sau khi vào tế bào CagA được phosphoryl hóa và kết hợp với SHP-2 tyrosine phosphatase tạo nên yếu tố đáp ứng phát triển tế bào (growth factor – like cellular) và sản xuất cytokine của tế bào ký chủ [6].

Các phương pháp không xâm lấn hoặc ít xâm lấn bao gồm: nghiệm pháp thở C13 hoặc C14, test nhanh bằng huyết thanh, tìm kháng thể kháng *H. pylori* trong nước tiểu hoặc trong

phân [7]. Tuy nhiên, các phương pháp này không cho phép chẩn đoán phân biệt giữa chủng mang gene CagA với chủng không mang gene này. Thông thường, việc chẩn đoán bằng PCR phải trải qua việc sinh thiết một mẫu niêm mạc dạ dày, gây tổn thương nhất định cho dạ dày. Trong khi đó, PCR phát hiện từ mẫu phân và mẫu nước tiểu là những xét nghiệm không xâm lấn nhưng tỷ lệ âm tính giả cao do mật độ *H. pylori* thấp. Hiện nay có nhiều cải tiến của kỹ thuật PCR để tăng độ nhạy phát hiện các tác nhân có mật độ thấp trong các mẫu xét nghiệm.

Semi-Nested PCR có thể được sử dụng để giải quyết vấn đề về tính đặc hiệu, độ nhạy phát hiện gen Hsp60 trong các mẫu sinh thiết [8]. Tại Việt Nam, các kỹ thuật PCR đa mồi (Multiplex PCR) đã được nghiên cứu để phát hiện vi khuẩn *H.pylori* từ mẫu nước bọt và mẫu sinh thiết [9]. Tuy nhiên hiện chưa có một nghiên cứu nào đề cập tới việc áp dụng Semi-Nested PCR để phát hiện các chủng *H. pylori* mang gene CagA từ mẫu dịch dạ dày. Chính vì vậy, đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam tiến hành đánh giá khả năng phát hiện tác nhân *H.pylori* trực tiếp từ dịch dạ dày bằng việc sử dụng phản ứng Semi-Nested PCR.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *H. pylori* dùng làm chủng đối chứng mang gene CagA ký hiệu là H.p1091 do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp.

35 mẫu bệnh phẩm là dịch dạ dày được thu nhận từ các bệnh nhân có tổn thương viêm hoặc loét dạ dày đến khám tại một số bệnh viện C và bệnh viện Đại học Y Dược Thái Nguyên. Các bệnh nhân đều được biết thông tin, mục tiêu nghiên cứu và đồng ý tham gia vào nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu nhận mẫu bệnh phẩm dịch dạ dày

Mẫu bệnh phẩm là dịch dạ dày được thu nhận thông qua quá trình nội soi sử dụng một dây hút

dịch vô trùng luôn theo ống nội soi. Dịch được hút vào ống vô trùng, sau đó được chia ra các ống nhỏ thể tích 2 ml bảo quản ở 2 – 8°C trước khi tiến hành tách chiết DNA tổng số.

2.2.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ mẫu chủng vi khuẩn

Quy trình tách DNA vi khuẩn từ mẫu vi khuẩn nuôi cấy và từ dịch dạ dày đều sử dụng QIAMP DNA MINI KIT (Cat No./ID: 51304) của Qiagen. Đối với mẫu vi khuẩn nuôi cấy, các bước tiến hành được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đối với dịch dạ dày các bước tiến hành gồm: Chia dịch dạ dày thành các ống nhỏ (1 ml/ống). Thêm vào mỗi ống 1 ml Tris 0,67M, ly tâm 10.000 rpm trong 20 phút, loại bỏ dịch nổi. Thêm 200 µl nước khử ion vào ống số 1, mix đều, hút dịch sang ống eppendorf mới. Các bước từ 2 với enzyme protease K tiến hành như hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.3. Phương pháp đo DNA tổng số

Nồng độ DNA được đo ở bước sóng A260/A280 trên máy quang phổ Nano drop (Thermo Fisher).

2.2.4. Phương pháp Semi-Nested PCR phát hiện gen CagA

Phát hiện đoạn DNA đặc hiệu của gene CagA trong genome của *H. pylori* bằng cặp mồi thứ nhất CagAF1 và CagAR1 khuếch đại đoạn DNA vòng ngoài kích thước khoảng 430 nucleotide và cặp mồi thứ 2 CagAF1 và CagAR2 khuếch đại đoạn DNA vòng trong kích thước dự kiến 420 nucleotide (bảng 1). Phản ứng PCR vòng 1 và 2 đều được thực hiện trong một thể tích 50 µl gồm 25 µl master mix (2X), 2 µl (10 pmol/µl) mồi xuôi và mồi ngược, 8 µl DNA (nồng độ thay đổi) và 10 µl H₂O. Sản phẩm PCR lần 1 sẽ là khuôn cho PCR lần 2. Chu kỳ nhiệt cho mỗi vòng được thực hiện theo bảng 2.

2.2.5. Phương pháp phân tích thống kê sinh học Mann-Wishney

Số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm phân tích thống kê sinh học Mann – Whisney và tính tỷ lệ phần trăm.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi dùng để khuếch đại đoạn DNA đặc hiệu trong genome của vi khuẩn *H. pylori*

Tên	Trình tự mồi (5'----3')	Nồng độ (pmol/µl)	Sản phẩm	Nguồn gốc
CagAF1	GGAACCCTAGTCAGTAAT GGGTT	10 pmol/µl	430 bp	Hirai và cộng sự
CagAR1	GCTTTAGCTTCTGATACC GCTTGA	10 pmol/µl	(Vòng 1)	2009 [8]
CagAF1	GGAACCCTAGTCAGTAAT GGGTT	10 pmol/µl	420 bp	
CagAR2	AATTCTTGTTCCCTTGAA AGCCC	10 pmol/µl	(Vòng 2)	

Bảng 2. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
94°C	5 phút	1
94°C	1 phút 30 giây	
55°C	1 phút 30 giây	30
72°C	1 phút 30 giây	
72°C	5 phút	1
4°C	∞	

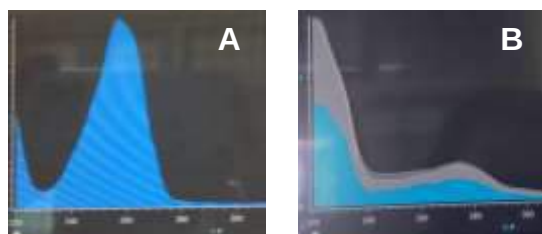
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả tách DNA từ chủng vi khuẩn *Helicobacter pylori* và dịch dạ dày

Để phục vụ mục tiêu cuối cùng là khuếch đại và phát hiện gene CagA thì việc tách chiết và tinh sạch DNA có ý nghĩa đặc biệt quan trọng vì nó ảnh hưởng đến chất lượng của các phản ứng PCR. Kết quả xác định tỷ số OD ở bước sóng A260/A280 ở các mẫu bệnh phẩm chỉ đạt từ 0,87-0,94; hàm lượng từ 5 – 12 ng/µl. Điều này chỉ ra rằng các mẫu bệnh phẩm là dịch dạ dày có độ tinh

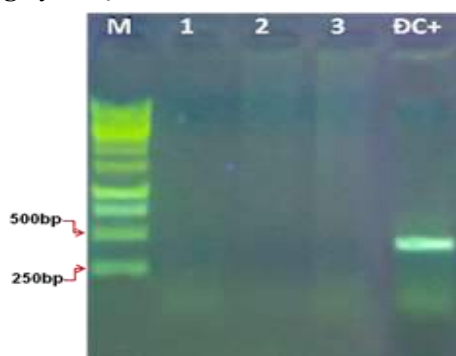
sạch thấp và hàm lượng DNA tổng số rất thấp. Trong khi đó các mẫu đối chứng là các chủng *H. pylori* đối chứng có độ tinh sạch cao hơn (A260/A280 xấp xỉ 1,6) và hàm lượng cao hơn (xấp xỉ 125 ng/μl).

Phổ hấp phụ huỳnh quang cũng chỉ ra mức độ tạp nhiễm rất cao của các mẫu bệnh phẩm so với đối chứng thông qua đỉnh hấp phụ cực đại không nằm ở bước sóng 260 nm (hình 1). Sự tạp nhiễm trong các mẫu DNA tổng số từ dịch dạ dày có thể được giải thích bởi dịch dạ dày chứa nhiều dịch vị và cả các tạp chất từ quá trình tiêu hóa thức ăn. Đây chính là thách thức để chẩn đoán *H. pylori* bằng các kỹ thuật PCR từ mẫu dịch dạ dày.



Hình 1. Hình ảnh phổ hấp phụ của mẫu DNA tổng số tách chiết từ chủng đối chứng (A) và từ mẫu bệnh phẩm (B)

3.2. Khuếch đại gene *CagA* của *H. pylori* bằng kỹ thuật Semi-Nested PCR



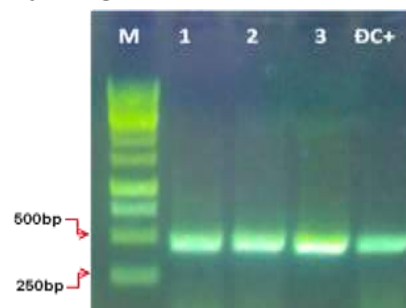
Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR gen *CagA* vòng 1. Các đường chạy từ 1 -3 tương ứng với 3 chủng 1,2,3. ĐC+: Đối chứng +

Để phát hiện có hay không có gene *CagA* trong các chủng *H. pylori* từ các chủng đối chứng, tác giả đã tiến hành phản ứng Semi-

Nested PCR để khuếch đại đoạn gen *CagA* với các cặp mồi như trong bảng 1.

Kết quả trình bày trong hình 2 cho thấy, với cặp mồi thứ nhất (PCR vòng 1), chỉ có mẫu đối chứng có một đoạn DNA được khuếch đại với kích thước xấp xỉ 430 bp theo như tính toán lý thuyết.

Từ kết quả PCR vòng 1, sản phẩm PCR của các mẫu bệnh phẩm 1, 2, 3 và đối chứng được pha loãng về nồng độ 1 ng/μl và tiến hành PCR vòng 2 với cặp mồi *CagAF2/CagAR2*. Kết quả điện di sản phẩm PCR vòng 2 được trình bày trong hình 3.



Hình 3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR gen *CagA* vòng 2. Trong đó, M là Marker 1 kb. Các giếng từ 1 -3 là các mẫu bệnh phẩm

Từ kết quả điện di trong hình 3 cho thấy, cả 3 mẫu bệnh phẩm cũng như đối chứng đều cho kết quả dương tính với gen *CagA*. Kết quả này đã cho thấy rằng, phản ứng Semi-Nested PCR đã khuếch đại một cách hiệu quả gen *CagA* ở các mẫu bệnh phẩm là dịch dạ dày. Báo cáo trước đó của Hirai đã sử dụng các cặp mồi này để phát hiện các chủng dương tính với gen *CagA* trong các mẫu phân [10].

3.3. Áp dụng kỹ thuật Semi-Nested PCR để đánh giá mức độ nhiễm *H. pylori* và chủng *H. pylori* mang gen *CagA* trong các mẫu bệnh phẩm

Để phát hiện gene *CagA* trên 35 mẫu bệnh phẩm dịch dạ dày thu nhận từ quá trình nội soi tại bệnh viện Đại học Y Dược Thái Nguyên bằng Semi-Nested PCR.

Bảng 3. Kết quả phân tích từ mẫu bệnh phẩm bệnh nhân

STT	Mã BN	Tuổi	Kết quả CagA		STT	Mã BN	Tuổi	Kết quả CagA	
			Dương tính	Âm tính				Dương tính	Âm tính
1	BN1	65	v		18	BN18	33	v	
2	BN2	29	v		19	BN19	72	v	
3	BN3	38	v		20	BN20	25	v	
4	BN4	52	v		21	BN21	56		v
5	BN5	56		v	22	BN22	45	v	
6	BN6	37		v	23	BN23	28	v	
7	BN7	42	v		24	BN24	38		v
8	BN8	67	v		25	BN25	33	v	
9	BN9	38	v		26	BN26	54	v	
10	BN10	40	v		27	BN27	63	v	
11	BN11	43	v		28	BN28	57	v	
12	BN12	61	v		29	BN29	51		v
13	BN13	52			30	BN30	54	v	
14	BN14	30	v		31	BN31	51	v	
15	BN15	26	v		32	BN32	29	v	
16	BN16	61	v		33	BN33	65	v	
17	BN17	13		v	34	BN34	70	v	
					35	BN35	61		v

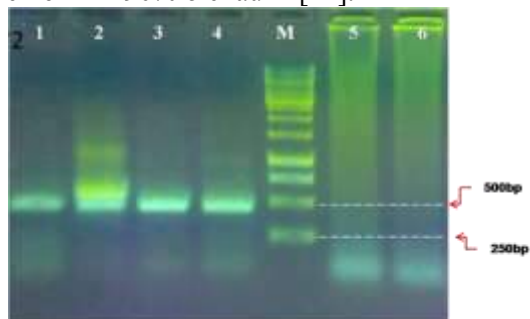
Tỷ lệ % dương tính với gene CagA: 90%, âm tính với gene CagA 10%.

v = xác định

Chúng tôi sử dụng các môi như trong bảng 1. Kết quả trình bày trong bảng 3 và hình 4.

Kết quả phân tích trên 35 bệnh nhân lấy mẫu dịch dạ dày qua nội soi đã cho thấy, tỷ lệ mang gen CagA chiếm 90%, tỷ lệ âm tính chiếm 10%.

Gần đây, một số nghiên cứu khác ở Việt Nam cho thấy gen CagA có tỷ lệ từ 71- 92% ở người bị nhiễm *H. pylori* [11]. Tỷ lệ CagA(+) ở bệnh nhân ung thư dạ dày. Tỷ lệ vi khuẩn mang gen CagA của *H. pylori* được báo cáo từ các vùng khác nhau trên thế giới từ 50 - 70% ở các nước châu Âu và có thể chiếm > 90% ở châu Á [12].



Hình 4. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại DNA đặc trưng của vi khuẩn *H. pylori* (vòng 2) từ một số mẫu bệnh phẩm. M: Marker; 23 – 29: số mẫu bệnh phẩm

4. Kết luận

Từ các mẫu bệnh phẩm và chủng đối chứng tác giả đã tách chiết được DNA, trong đó mẫu bệnh phẩm có độ tinh sạch và nồng độ thấp hơn rất nhiều so với chủng chuẩn, 260/280 từ 0,87-0,94. Đã thiết lập được phản ứng Semi-Nested PCR để khuếch đại thành công gene CagA trong các chủng *H. pylori* đối chứng và từ mẫu dịch dạ dày. Phân tích trên 35 mẫu bệnh phẩm đã chỉ ra tỷ lệ *H. pylori* dương tính với gene CagA là 90%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. L. Nagase, T. Hayashi, T. Senda, and M. Hatakeyama, "Dramatic increase in SHP2 binding activity of Helicobacter pylori Western CagA by EPIYA-C duplication: its implications in gastric carcinogenesis," *Sci Rep*, vol. 5, no. 1, p. 15749, Dec. 2015, doi: 10.1038/srep15749.
- [2]. A. M. Y. Nomura, J. Lee, G. N. Stemmermann, R. Y. Nomura, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blaser, "Helicobacter pylori CagA seropositivity and gastric carcinoma risk in a Japanese American population," *J. Infect. Dis*, vol. 186, no. 8, pp. 1138-1144, Oct. 2002, doi: 10.1086/343808.

- [3]. T. Abe *et al.*, "Impact of *Helicobacter pylori* CagA diversity on gastric mucosal damage: an immunohistochemical study of East-Asian-type CagA," *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 26, no. 4, pp. 688-693, Apr. 2011, doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06565.x.
- [4]. Z. Fazeli, M. Alebouyeh, M. Rezaei Tavirani, M. Azimirad, and A. Yadegar, "Helicobacter pylori CagA induced interleukin-8 secretion in gastric epithelial cells," *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, vol. 9, no. Suppl1, pp. S42-S46, Dec. 2016.
- [5]. A. O'Connor, J.-M. Liou, J. P. Gisbert, and C. O'Morain, "Review: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection 2019," *Helicobacter*, vol. 24, no. Suppl 1, p. e12640, Sep. 2019, doi: 10.1111/hel.12640.
- [6]. H. Higashi *et al.*, "SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein," *Science*, vol. 295, no. 5555, pp. 683-686, Jan. 2002, doi: 10.1126/science.1067147.
- [7]. C. Ricci, J. Holton, and D. Vaira, "Diagnosis of *Helicobacter pylori*: invasive and non-invasive tests," *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, vol. 21, no. 2, pp. 299-313, 2007, doi: 10.1016/j.bpg.2006.11.002.
- [8]. V. Singh *et al.*, "Evaluation of Nested PCR in Detection of *Helicobacter pylori* Targeting a Highly Conserved Gene: HSP60: Nested PCR in Detection of *H. pylori*," *Helicobacter*, vol. 13, no. 1, pp. 30-34, Jan. 2008, doi: 10.1111/j.1523-5378.2008.00573.x.
- [9]. T. S. Trieu, V. K. Tran, T. T. Nguyen, H. H. Nguyen, T. H. Nguyen, and T. T. Nguyen, "The development of PCR assay for diagnosis of *Helicobacter pylori* in saliva samples," *Journal of Sciences and technology*, vol. 61, no. 12, pp. 9-13, Dec. 2019.
- [10]. I. Hirai, T. Sasaki, S. Fujimoto, T. Moriyama, T. Azuma, and Y. Yamamoto, "A method for assessment of *Helicobacter pylori* genotype using stool specimens," *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, vol. 56, no. 1, pp. 63-66, Jun. 2009, doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00549.x.
- [11]. G. K. Nguyen, and V. B. Nguyen, *Helicobacter pylori in children, clinical and therapeutic*. Medical publishing House, 2009.
- [12]. A. Gilani, V. Razavilar, N. Rokni, and E. Rahimi, "VacA and cagA genotypes of *Helicobacter pylori* isolated from raw meat in Isfahan province," *Iran', Vet. Res. Forum*, vol. 8, no. 1, pp. 75-80, 2017.