

幽门螺杆菌致人淋巴细胞胃粘膜上皮细胞微核作用

马泓¹ 宁涛¹ 邓大君¹ 周静¹ 袁媛² 柯杨¹

北京肿瘤研究所暨北京医科大学临床肿瘤学院 北京 100034 ² 中国医科大学肿瘤所 沈阳 110001

摘要 幽门螺杆菌感染与胃癌流行有关。本研究利用微核试验,观察了幽门螺杆菌对人外周血淋巴细胞、人胃粘膜上皮细胞微核形成率的影响。结果表明:2株幽门螺杆菌碎片的蛋白浓度在0.6—3.9 μ g/ml范围内均可使人外周血淋巴细胞及人胃粘膜细胞微核率增高2倍以上,存在剂效关系($P<0.05$);大肠杆菌对照则无此作用。为研究幽门螺杆菌感染与胃癌发生的关系提供了较直接的线索。

关键词 幽门螺杆菌;微核;人淋巴细胞;人胃粘膜上皮细胞

MICRONUCLEUS INDUCTION WITH PROTEINEOUS EXTRACT FROM HELICOBACTER PYLORI IN HUMAN LYMPHOCYTE AND GES—1

Ma Hong, Ning Tao, Deng Dajun, et al

Beijing Institute for Cancer Research & School of Oncology, Beijing Medical University, Beijing, 100034

Abstract Infection of *Helicobacter pylori* (HP) was considered as a risk factor for stomach cancer. Study on the genotoxicity of HP would be useful to understand HP's role played in carcinogenesis. Micronucleus assay in human peripheral blood lymphocytes with HP extract was conducted. Induction of micronucleus in cultured human lymphocytes and GES—1 with extract of HP in dosage of 0.6—3.9 μ g protein/ml was observed. However, *E. coli* did not show such effect. Result indicated the clastogenicity of HP may account for the gastric carcinogenesis.

Key words *Helicobacter Pylori*; Micronucleus; Cultured human lymphocyte; Human gastric epithelia cell (GES—1)

自1983年Warren等首次从人胃粘膜活检组织中培养出幽门螺杆菌(*Helicobacter Pylori*, HP)并发现它与慢性胃炎关系密切后,该菌引起了广泛的关注。目前已知该菌是一种罕见的含内毒素的革兰氏阴性厌氧菌,它产生的内毒素是一种可溶性细胞表面蛋

白,有活化人类单核/巨噬细胞,使之产生氧自由基的作用⁽¹⁾,这种毒素可使包括人胃细胞在内的多种离体培养细胞发生空泡化变性⁽²⁾。

国外前瞻性和回顾性流行病学资料提示胃癌患者中HP的感染率高于正常人群⁽³⁾;

国内报道胃癌高发区 HP 感染率(60—62%)是胃癌低发区该菌感染率(12.6%)的 5 倍⁽⁴⁾。该菌已成为继 N—亚硝酸盐和高盐饮食等因素之后的又一个人胃癌可疑病因。然而,人们至今仅掌握流行病学相关性证据,而无病因学因果关系证据。作者使用微核试验研究了 HP 的致突变作用,以期为 HP 致胃癌这一假说提供理论依据。

材料和方法

1. 全血 取自本实验室健康工作人员空腹静脉血,加肝素钠 2500u/10ml 抗凝备用。
2. HP 分离培养 HP(HP_A) 为北京医科大学第一附属医院传染科赠送;HP(HP_B)为北京中医研究院陈飞松大夫赠送。上述两株 HP 参照文献⁽⁵⁾鉴定合格。HP 培养按文献⁽⁵⁾进行,并加脑心浸液粉(英国 OXOID 公司赠送)3.7g/100ml 培养基。
3. 大肠杆菌分离培养 从人空腹胃液中分离鉴定,保存于 4℃ 冰箱,鉴定、培养方法按《临床细菌学》⁽⁶⁾。
4. 细菌定量与破碎 用无菌生理盐水分别将 HP 和大肠杆菌以半固体的培养基中洗脱下来,将菌液分别用生理盐水稀释、混后,用 follin—酚方法测定菌体蛋白含量。用匀浆器将菌液中细菌在冰浴中超声破碎 60sec, 20sec/次,强度 24,破碎后的菌液从原液开始用无菌生理盐水依次进行稀释到使用浓度。
5. 淋巴细胞微核试验 按胡国刚等所用方法

进行⁽⁷⁾,并加入不同浓度菌液 300ul 培养 72h 后收获制片。试验以生理盐水和大肠杆菌碎片为阴性对照。以丝裂霉素 C(10ng/ml)为阳性对照。至少重复一次。

6. 人胃粘膜细胞(GES—1)微核试验

GES—1 培养方法见文献⁽⁸⁾。将消化后的细胞接种于 6 孔板(8 万/孔),CO₂ 温箱培养 24h 后加入不同浓度 HP_B 的破碎菌液,培养 72h 收获。以生理盐水为阴性对照。至少重复一次。

7. 微核计数及判定结果 每次计数结果均采用双盲法观察。每一组在油镜(10×100)下计数 1000 个淋巴细胞的微核率。以存在剂效关系微核细胞率大于阴性对照 2 倍以上,并有重复性者为阳性。相关系数用 *t* 检验检测其显著性⁽⁹⁾。

结果

HP_A 和 HP_B 在 0.6—3.9μg 蛋白/ml 剂量范围内有诱导微核作用,存在剂效关系,A 菌 $r=0.9658, P<0.05$, B 菌 $r=0.981 P<0.02$ 。在 1.6 和 3.9μg 蛋白/ml 剂量组微核细胞率是阴性对照组 2.5 和 3.5 倍。在经不同浓度大肠杆菌处理过的细胞中,微核率无明显变化(见表 1)。用 HP_B 按相同方法诱导 GES—1 微核,其细胞微核率是阴性对照的 3—5 倍, $P<0.01$ (表 2)。重复试验结果相同。

表 1 HP_A、HP_B 和大肠杆菌对人外周血淋巴细胞微核影响

剂量 (μg 蛋白/ml)	微核细胞率(‰)			
	试验(1)		试验(2)	
	大肠杆菌对照	HP _A	大肠杆菌对照	HP _B
0.0	2	2	3	3
0.6	3	4	2	5
1.6	3	5	3	7
3.9	4	7	1	10

阳性对照 用 MMC(10ng/ml)诱导淋巴细胞微核,试验(1)中微核细胞率为 6‰,试验(2)中微核细胞率 8‰,均大于阴性对照 2 倍。

表 2 经 HP_B 处理人胃粘膜上皮细胞微核形成情况

剂量 (μg 蛋白/ml)	微核细胞率(‰)	
	实验(1)	实验(2)
0.0	5	6
0.3	16	20
0.7	18	24
1.7	25	26

讨 论

本研究检测两株 HP 均能使人外周血淋巴细胞和人胃粘膜上皮细胞微核形成率升高,说明 HP 有致突变作用。

流行病学资料表明胃淋巴瘤患者 HP 感染率是正常人群的近 1 倍⁽¹⁰⁾,经抗菌治疗后的淋巴瘤患者,其肉瘤样组织可减小甚至消退⁽³⁾。提示 HP 感染与胃淋巴瘤可能存在因果关系。有文报道中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞,在 HP 刺激下释放出的游离基可能损伤 DNA⁽¹⁰⁾,故本研究使用了含中性粒细胞的全血为实验材料观察 HP 对淋巴细胞致突作用。同时使用人体内的正常细菌大肠杆菌碎片进行对照试验未发现其有诱导微核作用。HP 为胃癌高危因素,为探求 HP 与胃上皮性癌发生的关系,我们进一步观察了 HP_B 对人胃粘膜细胞系 GES—1 的致突作用,发现经 HP_B 处理后其微核率提高了 3—5 倍。说明 HP 在没有中性粒细胞等炎症细胞存在的情况下也可直接诱导人体细胞微核。该细胞系对 HP 的致突作用较正常淋巴细胞更敏感,可能胃粘膜是 HP 作用的靶部位,也

可能由于 GES—1 是经 SV₄₀转化的人胎儿胃粘膜上皮非致瘤性永生细胞系⁽⁸⁾,这有待进一步研究,但无论如何本实验为 HP 感染与人胃癌发生的关系提供了较直接的线索。

参考文献

1. Uwe EH MAI, Perez—Perez GI, Wahl LM, et al. Soluble surface proteins from *Helicobacter pylori* activate monocytes/macrophages by lipopolysaccharide— independent mechanism. *J Clin Invest*, 1991; 87: 894.
2. Leunk RD, Johnson PT, David BC, et al. Cytotoxic activity in broth culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol*, 1988; 26: 93.
3. The IARC Working Group, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1994; 61: 177—240.
4. Lin HZ, Yuan Y. *Campylobacter—pyloridis* infection of gastric mucosa in the high and low risk areas of stomach cancer in China. *Chin J Cancer Res*, 1993; 5(2): 101.
5. 沈宝铃, 曲平, 高慧珍等. 幽门弯曲菌的检测及其与胃炎、溃疡的关系. *北京医学*, 1987; 9: 338.
6. 李仲兴等主编. 临床细菌学. 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 177.
7. 胡国刚, 罗贤慈, 刘军, 等. 云锡矿工外周血淋巴细胞 SCE 频率、染色体畸变和微核率观察. *中华肿瘤杂志*, 1987; 9(1): 29.
8. 柯杨, 等. 人胃粘膜上皮细胞系 GES—1 的建立及其生物学特性. *中华肿瘤杂志*, 1994; 1: 7.
9. Lasne C, Gu ZW, Venegas W, et al. The in vitro micronucleus assay for detection of cytogenetic effects induced by mutagen—carcinogens comparison with the in vitro sister—chromatid exchange assay. *Mutat Res*, 1984; (130): 273—282.
10. Stemmer GN. The role of *Helicobacter pylori* in the etiology of gastric cancer. *Cancer Prev*, 1991; October: 1.

关于举办全国抗突变和致突变同步快速试验方法的学习班的通知

该试验方法是河北省肿瘤研究所赵泽贞教授等人建立的一种筛选抗诱变及诱变物的一种新方法,其特点是将抗诱变及诱变两种试验在同一试验程序中一次完成,显示出致突变及抗突变性的双向结果,有事半功倍之效,一次试验可检测出多种检品的多种浓度,缩短了试验周期,有快速,简便,可靠,省时,省力等特点。经国家科委认定的一级查新机构国际联机检索查新报告证明国内外尚无相同研究。该技术已于今年五月通过成果鉴定。本学会认为有必要向全国推广,拟于今年在石家庄分批举办学习班,有兴趣者请报名,请与石家庄健康路 5 号河北省肿瘤研究所赵泽贞联系,邮编: 050011, 电话: 0311—6033941 转 337。

中国环境诱变剂学会抗诱变剂抗癌剂专业委员会