

拌分散细胞并低速离心收集细胞过程; (3)percoll 非连续密度梯度离心富集壁细胞过程。即时分离纯化后壁细胞纯度为70% 活率90% 在0-4℃ 环境下保存22 h后活率仍可达到70-80%。

细胞分离过程往往较为烦琐需细致操作而结果也常因人因地有很大差异我室针对大鼠胃壁细胞的分离方法进行摸索在本实验室条件下已取得较为稳定的结果。壁细胞的纯化是影响细胞功能检测的关键步骤 目前国外报道应用JE-6B 淘洗系统可对狗或兔的胃黏膜细胞进行纯化获得70%纯度的壁细胞再进一步用percoll 梯度离心的方法可纯化至95-100%^[5]。Chew *et al*^[6]用Nycodens 梯度离心联合淘洗可获得95%纯度的兔壁细胞。Schepp *et al*^[7]报道应用淘洗和percoll 梯度离心的方法纯化大鼠壁细胞纯度可达到97%以上。本室在已有的实验条件下可获得大鼠壁细胞纯度70% 尚需进一步提高。

胃壁细胞分离及纯化方法的建立为泌酸相关疾病提

供了体外细胞研究模型为细胞表面受体的研究提供了基础 也使研究细胞内信息传递及药物调节成为可能 将推动我国胃酸相关疾病的研究。

4 参考文献

- 1 Chew CS. Parietal cell culture: new models and directions. *Annu Rev Physiol* 1994;56:445-461
- 2 李晓波, 钱家鸣, 陈元方. 壁细胞的淘洗分离与应用. *胃肠病学和肝病杂志* 1996;5:254-256
- 3 袁克, 王汝俊, 王建华. 大鼠胃壁细胞的分离方法. *世界华人消化杂志* 1999;7:994-995
- 4 陈蕾, 黄威权, 孙绪德, 吕宝真, 蒲若蕾. 大鼠胃壁细胞的分离及培养. *第四军医大学学报* 2002;23:769-771
- 5 Delvalle J, Tsunoda Y, Williams JA, Yamada T. Regulation of $[Ca^{2+}]_i$ by secretagogue stimulation of canine gastric parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1992;262:G420-G426
- 6 Chew CS, Brown MR. Release of intracellular Ca^{2+} and elevation of inositol trisphosphate by secretagogues in parietal and chief cells isolated from rabbit gastric mucosa. *Biochim Biophys Acta* 1986;888:116-125
- 7 Schepp W, Dehne K, Herrmuth H, Pfeffer K, Prinz C. Identification and functional importance of IL-1 receptors on rat parietal cells. *Am J Physiol* 1998;275:G1094-1105

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

幽门螺杆菌感染儿童 HLA-DQA1 的免疫遗传学特征

黄永坤, 戚勤, 郝萍, 李海林, 文革生, 周丽芳

黄永坤, 戚勤, 李海林, 文革生, 周丽芳, 昆明医学院第一附属医院儿科 云南昆明市 650032
郝萍, 昆明医学院第一附属医院临床医学实验中心 云南昆明市 650032
项目负责人: 黄永坤, 650032, 云南省昆明市西昌路 295 号, 昆明医学院第一附属医院. hykkmynncn@hotmail.com
电话: 0871-6415908
收稿日期: 2004-04-06 接受日期: 2004-04-20

摘要

目的: 了解昆明汉族儿童中幽门螺杆菌(*H pylori*)感染率及其 HLA-DQA1 免疫遗传学特征。

方法: 用胶体金标免疫渗滤法检测 153 名 6-14 岁的学生血 *H pylori*-IgG 抗体。并用聚合酶链反应-序列特异性引物 (PCR-SSP) 技术对以血清学试验及¹³C 尿素呼气试验确诊的 34 例 *H pylori* 感染儿童及 37 例无 *H pylori* 感染儿童进行 HLA-DQA1 基因分型。

结果: 昆明儿童 *H pylori* 感染率为 34.5% 其 HLA-DQA1*0103 等位基因频率明显高于无 *H pylori* 感染儿童 (29.41% vs 9.46% $P=0.002$ $P_c=0.028$ OR=3.988 95% CI: 1.562-10.180); 而无 *H pylori* 感染儿童 HLA-DQA1*0302 等位基因频率低于无 *H pylori* 感染儿童 (19.12% vs 33.78%

$P=0.049$ OR =0.463 95%CI: 0.214-1.003) 但经等位基因多项比较校正差异消失 ($P_c=0.686$)。

结论: 昆明汉族儿童 *H pylori* 感染率较高。他们在 HLA-DQA1 位点上与无 *H pylori* 感染儿童存在免疫遗传学差异 HLA-DQA1*0103 基因可能是 *H pylori* 感染的易感基因; 而 DQA1*0302 基因则是否具有免疫抵抗作用需要进一步研究。

黄永坤, 戚勤, 郝萍, 李海林, 文革生, 周丽芳. 幽门螺杆菌感染儿童 HLA-DQA1 的免疫遗传学特征. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1735-1737
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1735.asp>

0 引言

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori* *H pylori*) 与慢性活动性胃炎 消化性溃疡 胃黏膜相关淋巴组织 (MALT) 淋巴瘤及胃癌密切相关^[1]。世界上至少有半数以上的人口有幽门螺杆菌感染但其中仅很少的一部分表现出明显的临床疾病状态其原因仍不清楚^[2]。许多研究认为这除了与 *H pylori* 菌株的毒力高低环境因素有关外 还与宿主的免疫遗传因素有关^[3]。我们用聚合酶链

反应-序列特异性引物(polymerase chain reaction-sequence specific primers PCR-SSP)技术对云南昆明 *H pylori* 感染汉族儿童及健康汉族儿童进行了 HLA-DQA1 基因分型旨在探讨在 HLA-DQA1 位点上是否存在与儿童 *H pylori* 感染相关的易感基因和抵抗基因从而了解人类是否存在易感 *H pylori* 的免疫遗传因素。

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori* 感染的诊断参照中华医学会儿科学分会感染消化组制订的小儿慢性胃炎 消化性溃疡胃镜诊断标准^[4]。全部研究对象均来自于昆明市某中心小学三代内无血缘关系的153名汉族儿童。年龄6-14岁。三代均为汉族在昆明市出生并且生活4a以上 无慢性腹痛消化不良胃炎 消化性溃疡等 *H pylori* 感染相关疾病史及严重心肺 肾 肝 神经 营养 免疫缺陷病史近期无激素 抗生素 铋剂 质子泵阻滞剂使用史(>4 wk) 相互间无亲缘关系。整群抽样的方法取静脉血 2-3 mL 分离血浆行 *H pylori*-IgG 检测(试剂盒由福建省蓝波生物技术研究所提供) 并分别从58名血清学阳性和95名血清学阴性儿童中随机各抽出40例行¹³C 尿素呼气试验(¹³C-UBT 试剂盒由北京嘉汇彬医药技术有限公司提供)。两项皆为阳性者诊断为 *H pylori* 感染 列为实验组的有34例;二者均为阴性者则为非 *H pylori* 感染儿童列为对照组的有37例。实验组平均年龄9.6 2.1岁 健康对照组平均年龄9.7 2.3岁 男女1 1;两组年龄性别均无差异($P>0.05$)。血液基因组DNA提取试剂盒(美国 MO BIO Laboratories 公司提供) DQA SSP UNITRAY 试剂盒(包括 DQA1 23 对序列特异性引物和1个污染对照。试剂盒由美国 PEL-FREEZE SYSTEMS 公司提供) DL2000 Taq 聚合酶 琼脂糖(芬兰产)和溴乙锭均由大连宝生物公司提供。

1.2 方法 血 *H pylori*-IgG 抗体和¹³C-UBT 的检测分别按试剂盒的操作说明进行。基因组DNA制备采用血液基因组DNA提取试剂盒在常温下快速提取实验组34例和对照组37例的基因组DNA 提取方法按试剂盒所附说明进行。提取的DNA用分光光度仪测定浓度和纯度 $A_{260/280nm}$ 应在1.6-1.8;浓度在60 mg/L以上。提取的DNA于-20 保存备用。HLA-DQA1 基因分型采用 SSP UNITRAY 试剂盒扩增 HLA-DQA1 DNA 片段 PCR 反应体系 循环条件及操作方法均按所附说明。扩增产物进行20 g/L 含溴乙锭的琼脂糖凝胶电泳(130V 13 min) 结果判断借助其提供的专用读板纸在凝胶成像仪和紫外灯判读并成像。要求分子796 bp 必须存在各阳性条带必须与规定的相应分子对应。

统计学处理 用直接计算法统计 *H pylori* 感染率及实验组和对照组HLA-DQA1各等位基因的基因频率。男女儿童 *H pylori* 感染率比较及实验组和对照组间 HLA-DQA1 等位基因的比较均用 2 2 表作 χ^2 检验 等位基因比较的 P 值行等位基因多项比较校正(同一位点需

比较的等位基因数乘 P 值 即 P_c) 以 $P_c < 0.05$ 判定差异有显著性意义。

2 结果

昆明汉族儿童血 *H pylori*-IgG 阳性58人 阳性率34.5%;其中男生阳性率31.1% 女生阳性率37.8% 男女间比较无明显差异($\chi^2 = 0.748 P = 0.387$)。PCR-SSP 的 HLA-DQA1 等位基因图见图1。34例 *H pylori* 感染儿童(实验组)HLA-DQA1*0103 等位基因频率明显高于无 *H pylori* 感染儿童($P = 0.002 OR = 3.988 95\% CI = 1.562-10.180$)见表1。 P 值经等位基因多项比较校正后仍有统计学意义($P_c = 0.028$)。同时 *H pylori* 感染儿童 HLA-DQA1*0302 等位基因频率低于无 *H pylori* 感染儿童($P = 0.049 OR = 0.463 95\% CI = 0.214-1.003$)。但 P 值经等位基因多项比较校正后失去统计学意义($P_c = 0.686$)。

表1 *H pylori* 感染与无感染儿童 HLA-DQA1 等位基因频率比较

HLA-DQA1	<i>H pylori</i> (+) n = 68		<i>H pylori</i> (-) n = 74		P值	P _c 值
	n	AF	n	AF		
0101	2	0.0294	2	0.027	0.932	-
0102	5	0.0735	9	0.1216	0.337	-
0103	20	0.2941	7	0.0946	0.002	0.028
0104	2	0.0294	3	0.0405	0.719	-
0105	0	0	2	0.027	0.172	-
0201	4	0.0588	2	0.027	0.347	-
30101	4	0.0588	4	0.0541	0.902	-
0302	13	0.1912	25	0.3378	0.049	0.686
0303	4	0.0588	2	0.027	0.347	-
0501	1	0.0147	2	0.027	0.61	-
0502	2	0.0294	0	0	0.137	-
0503	1	0.0147	0	0	0.295	-
0505	1	0.0147	5	0.0676	0.118	-
0601	9	0.1324	11	0.1486	0.78	-

AF 为等位基因频率。

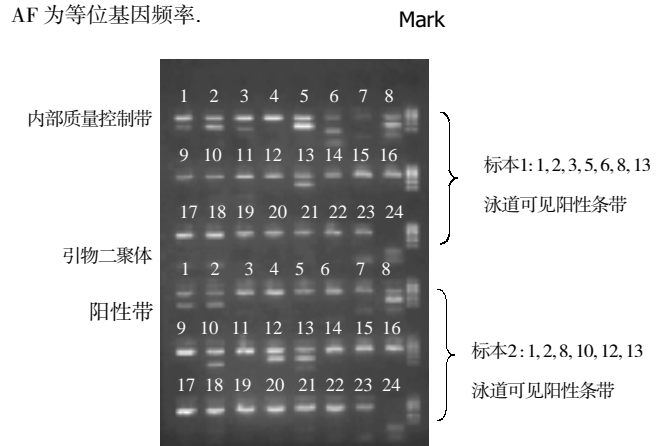


图1 昆明汉族 PCR-SSP 的 HLA-DQA1 等位基因分型图。(全图共48个泳道, 标本1和2的第24泳道为污染控制道。内控带分子为796 bp。Mark 由下向上的分子分别为100 bp 250 bp 500 bp 750 bp, 1 000 bp 和 2 000 bp)

3 讨论

我国 *H pylori* 感染流行模式为儿童易感型。我们选用目前较有发展前景的胶体金标免疫渗滤法调查昆明市某中心小学儿童 *H pylori* 感染状况。结果显示儿童的 *H pylori* 感染率为 34.5% 说明昆明汉族儿童 *H pylori* 感染率较高; 男女 *H pylori* 感染率比较无差异与文献[5-9]记载一致。近年来 *H pylori* 感染人群 HLA-II 类基因的免疫遗传学特征研究成为世界胃肠病学研究热点对 HLA-DQA1 位点的报道也较多见。许春娣 *et al* [10] 发现 *H pylori* 血清抗体阳性无症状儿童与血清抗体阴性无症状儿童的 HLA-DQA1 等位基因频率存在异常分布。在 *H pylori* 血清抗体阳性组中 DQA1*03 等位基因频率明显低于血清学阴性组而 DQA1*0501 频率则显著高于 *H pylori* 阴性组。因此认为 DQA1*03 基因对 *H pylori* 感染可能具有免疫抵抗作用而 DQA1*0501 则可能具有易感作用。Azuma *et al* [11] 发现 HLA-DQA1*0102 基因对 *H pylori* 感染具有抵抗保护作用尤其对 *H pylori* 感染相关性疾病如萎缩性胃炎肠化生的胃腺癌有意义; 而 DQA1*0301 可能对 *H pylori* 感染起易感作用。Magnusson *et al* [12] 发现 DQA1*0102 等位基因与 *H pylori* 抗体血清阳性呈负相关 DRB*0601 与胃癌呈正相关但是没有一个是 HLA 等位基因与 *H pylori* 感染和胃癌同时有相关。因此认为 HLA-DQA1*0102 等位基因可能对 *H pylori* 感染起抵抗保护作用而 HLA-DR-DQ 等位基因可能以其他方式影响胃腺癌的发生。Karhukorpi *et al* [13] 认为 HLA-DQA1 基因和血清抗 *H pylori* 抗体无关。Santolaria *et al* [14] 发现 HLA-DQA1*0102 和 *0103 不能改变 *H pylori* 感染的易感性以及消化性溃疡的发生。Perri *et al* [15] 研究也得出 HLA-DQA1 可能不是通过增加 *H pylori* 感染危险性而影响胃腺癌的发生。欧洲的研究结果与亚洲的结果明显不同的原因可能与种族有关。我们以科研诊断标准(血 *H pylori*-IgG 抗体加 ¹³C-尿素呼气试验)为基础对云南昆明 *H pylori* 感染汉族儿童及无 *H pylori* 感染汉族儿童行 HLA-DQA1 分型发现 *H pylori* 感染儿童 HLA-DQA1*0103 等位基因频率明显高于正常对照儿童(29.4% vs 9.5% $P=0.002$ OR=3.988 95% CI: 1.562-10.180) P 值经等位基因多项比较校正后仍有意义($P_c=0.028$), 而 *H pylori* 感染儿童 HLA-DQA1*0302 等位基因频率低于正常对照儿童(19.1% vs 33.8% $P=0.049$ OR=0.463 95% CI: 0.214-1.003) P 值经等位基因多项比较校正后失去统计学意义($P_c=0.686$)。结果表明 DQA1*0103 基因可能是 *H pylori* 感染的易感基因而 *0302 基因是否具有免疫抵抗作用需进一步证实。本研究结果与许春娣 *et al* [10] 的接近而与日本欧洲的研究有较大的差异 [11-15]。

H pylori 感染是一个多基因疾病其人群免疫遗传

学特征的研究易受其他因素影响。无症状人群身体相对健康而儿童生活相对单一不良嗜好少因此以 *H pylori* 感染儿童为对象的研究对揭示 *H pylori* 感染人群的免疫遗传学特征具有特殊的意义。同时也将为进一步探索 *H pylori* 感染相关性患者群的免疫遗传学特征提供良好的对照。由于本研究所选择的研究对象是 6-14 岁的儿童因此进一步随访并根据疾病结局重新评估也是本课题的重要组成部分。

4 参考文献

- 1 Bjorkholm B, Falk P, Engstrand L, Nyren O. *Helicobacter pylori*: resurrection of the cancer link. *J Intern Med* 2003;253:102-119
- 2 Sullivan T, Ashbury FD, Fallone CA, Naja F, Schabas R, Hebert PC, Hunt R, Jones N. *Helicobacter pylori* and the prevention of gastric cancer. *Can J Gastroenterol* 2004;18:295-302
- 3 Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002;2:28-37
- 4 中华儿科杂志 编辑委员会, 中华医学会儿科学分会感染消化学组. 小儿慢性胃炎消化性溃疡胃镜诊断标准. *中华儿科杂志* 2003;41:189
- 5 Miwa H, Go MF, Sato N. *H pylori* and gastric cancer: the Asian enigma. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1106-1112
- 6 Machado RS, Patricio FR, Kawakami E. ¹³C-urea breath test to diagnose *Helicobacter pylori* infection in children aged up to 6 years. *Helicobacter* 2004;9:39-45
- 7 Ng FH, Lai CK, Wong BC, Wong WM, Wong SY, Chow KC, Yuen ST, Leung SY, Lam SK. ¹³C-urea breath test without prior fasting and without test meal is accurate for the detection of *Helicobacter pylori* infection in Chinese. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:834-838
- 8 Sinha SK, Martin B, Gold BD, Song Q, Sargent M, Bernstein CN. The incidence of *Helicobacter pylori* acquisition in children of a Canadian First Nations community and the potential for parent-to-child transmission. *Helicobacter* 2004;9:59-68
- 9 Rodrigues MN, Queiroz DM, Bezerra Filho JG, Pontes LK, Rodrigues RT, Braga LL. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children from an urban community in north-east Brazil and risk factors for infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:201-205
- 10 许春娣, 奚容平, 陈舜年, 杨玉琴, 范丽安, 徐家裕. 幽门螺杆菌感染的患儿人类白细胞抗原 DQA1 的免疫遗传学分析. *中华儿科杂志* 2000;38:746-749
- 11 Azuma T, Ito S, Sato F, Yamazaki Y, Miyaji H, Ito Y, Suto H, Kuriyama M, Kato T, Kohli Y. The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer* 1998;82:1013-1018
- 12 Magnusson PKE, Enroth H, Eriksson I, Held M, Nyren O, Engstrand L, Hansson LE, Gyllenstein UB. Gastric cancer and human leukocyte antigen: distinct DQ and DR alleles are associated with development of gastric cancer and infection by *Helicobacter pylori*. *Cancer Res* 2001;61:2684-2689
- 13 Karhukorpi J, Ikaheimo I, Silvennoinen-Kassinen S, Tiilikainen AS, Karttunen R. HLA-DQA1 alleles and the presence of *Helicobacter pylori* antibodies. *Eur J Immunogenet* 1999;26:15-17
- 14 Santolaria S, Barrios Y, Benito R, Piazuelo E, Quintero E, Lanas A. *Helicobacter pylori* and immunogenetic factor of the host: relevance of the HLA-DQA1*0102 and *0301 alleles in peptic ulcer. *Gastroenterol Hepatol* 2001;24:117-121
- 15 Perri F, Piepoli A, Quitadamo M, Quarticelli M, Merla A, Bisceglia M. HLA-DQA1 and DQB1 genes and *Helicobacter pylori* infection in Italian patients with gastric adenocarcinoma. *Tissue Antigens* 2002;59:55-57