

根除幽门螺杆菌对慢性萎缩性胃炎组织中生长抑素及其受体的蛋白和mRNA表达的影响

唐卓斌, 唐海燕, 刘为纹

唐卓斌, 中国人民解放军第二五四医院消化科 天津市 300142
唐海燕, 广东省东莞市厚街医院 广东省东莞市 523945
刘为纹, 第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038
项目负责人: 唐卓斌, 300142, 天津市河北区五马路160号, 中国人民解放军第二五四医院消化科. tzbin@163.com
电话: 022-84683114
收稿日期: 2004-12-17 接受日期: 2005-01-13

摘要

目的: 分析幽门螺杆菌(*H pylori*)感染及根除对慢性萎缩性胃炎(CAG)组织中的生长抑素及其受体蛋白和 mRNA 表达的影响, 探讨 *H pylori* 的致病机制及其在胃癌发生中的作用。

方法: 采用快速尿素酶试验、Giemsa 染色及 Warthin-Starry 银染色检测 *H pylori*; 应用免疫组织化学 SP 法和 RT-PCR 技术检测 56 例萎缩性胃炎组织中的生长抑素(somatostatin, SS)及其受体 hSSTR₂、hSSTR₅ 蛋白和 mRNA 表达情况, 以及 *H pylori* 根除前后慢性萎缩性胃炎组织中的生长抑素蛋白和 mRNA 表达的变化。

结果: *H pylori* 阳性组慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达均显著低于 *H pylori* 阴性组(16.00 ± 1.50 vs 21.38 ± 1.38 , 0.30 ± 0.05 vs 0.57 ± 0.13 , $P < 0.001$), 而 *H pylori* 阳性组萎缩性胃炎组织中的 hSSTR₂ mRNA 和 hSSTR₅ mRNA 表达与 *H pylori* 阴性组比较无明显变化。经三联治疗根除 *H pylori* 后, 慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达较治疗前显著增加(23.16 ± 2.74 vs 17.30 ± 1.67 , 0.54 ± 0.11 vs 0.31 ± 0.09 , $P < 0.001$), 而 *H pylori* 仍为阳性者, 慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达与治疗前比较则无明显变化。

结论: *H pylori* 感染可以抑制慢性萎缩性胃炎组织中的生长抑素蛋白和 mRNA 表达, 及早根除 *H pylori*, 可以纠正生长抑素基因的异常表达, 这可能是 *H pylori* 感染导致慢性胃炎的重要机制之一。

唐卓斌, 唐海燕, 刘为纹. 根除幽门螺杆菌对慢性萎缩性胃炎组织中生长抑素及其受体的蛋白和 mRNA 表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(5):675-677
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/675.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)是慢性胃炎的致病因素, 其机制尚不完全清楚。我们过去的研究发现慢性胃炎与生长抑素(somatostatin, SS)及其受体基因有关^[1-2]。因此, 从胃肠激素基因的角度探讨 *H pylori* 感染与胃癌发生的关系可能具有重要的理论和临床意义。我们通过给 *H pylori* 感

染阳性的慢性萎缩性胃炎患者口服丽珠胃三联药物 1 wk, 采用免疫组化染色及 RT-PCR 等技术研究 *H pylori* 感染对胃黏膜上皮生长抑素及其受体基因蛋白和 mRNA 表达的影响, 并分析其在胃癌发生中的生物学意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集以上消化道症状为主要表现而在第三军医大学附属西南医院、新桥医院和大坪医院进行胃镜检查的慢性萎缩性胃炎患者 56 例。胃镜活检均取自胃窦部, 所有病例在接受胃镜检查前均无服用大量糖皮质激素和非甾体消炎药史。所有病例均经 HE 染色病理诊断证实。*H pylori* 检测采用快速尿素酶试验、Giemsa 染色及 Warthin-Starry 银染色。尿素酶试验均阳性, Giemsa 染色和 Warthin-Starry 银染色两项中至少一项阳性者判为 *H pylori* 感染阳性; 三项检查均为阴性者判为 *H pylori* 感染阴性或 *H pylori* 根除。对 46 例 *H pylori* 阳性患者均给予丽珠胃三联片剂(枸橼酸铋钾 0.22 g bid, 克拉霉素 0.25 g bid, 替硝唑 0.5 g bid)治疗 1 wk, 治疗前及治疗结束后 1 mo 接受胃镜检查。兔抗人生长抑素多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品, 即用型免疫组化试剂盒(Kit 9709)为迈新公司产品。总 RNA 提取试剂盒(Tripure™ Isolation Reagent)为德国 Boehringer Mannheim(B. M)公司产品, RT-PCR 检测试剂盒(Access RT-PCR system, A1250)为美国 Promega 公司产品, DNA marker 为上海华美公司产品, SS 引物序列:F:5' GGCTGCGCTGCCATCGTC 3' R:5' CAGCCAGCTTTGCGTTCTCG 3' 产物长度 285 bp. hSSTR₂ 引物序列:F:5' ATCTGGGGCTTGGTACACAG 3' R:5' CTTCTTCCTCTTAGAGGAGC 3' 产物长度 148 bp. hSSTR₅ 引物序列:F:5' GCTCTTGGTGTTCCGGACGT 3' R:5' CAGGTTGACGATGTTGACGGTGAAG 3' 产物长度 298 bp. 看家基因(GAPDH)引物序列:F:5' CCACCCATGGCAAATTCATGGCA 3' R:5' TCTAGACGGCAGGTCAGG TCCAC 3' 产物长度 598 bp. 所有引物均由上海 Sangon 公司合成, PAGE 纯化。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色 采用 SP 法, 染色程序按 SP 法操作常规进行。抗体以 1:50 稀释。最后常规 DAB 显色, 苏木素复染、脱水、透明、封固。以 PBS 代替一抗为阴性对照, 用已知 SS 蛋白阳性的正常胃组织为阳性对照。光镜下观察 5 个以上高倍视野, 计数 500 个细胞中 SS 染色阳性细胞数。

1.2.2 RT-PCR 方法 胃组织总 RNA 抽提严格按照试剂盒说明书进行, 并行甲醛变性胶电泳, DU640 紫外分光光

度仪测 A 值, 以确定完整性及含量. 反应体系如下: $5\times$ Buffer $5\mu\text{L}$ 、 MgSO_4 $1\mu\text{L}$ 、dNTP $0.5\mu\text{L}$ 、Primer mix $1.5\mu\text{L}$ 、AMV $0.5\mu\text{L}$ 、Tf1 $0.5\mu\text{L}$ 、模板 RNA $1\mu\text{L}$, 加灭菌水至终体积 $25\mu\text{L}$. 在 PCR 扩增仪 (Perkin Elmer 480) 上 48°C 45min 将 RNA 逆转录成 cDNA, 然后 94°C 预变性 2min , 均扩增 35 个循环, 反应条件为 94°C 变性 30s , 58°C (SS 退火温度 $T_m = 55^\circ\text{C}$) 退火 40s , 68°C 延伸 1min , 最后 68°C 延伸 7min . 取 $5\mu\text{L}$ 目的基因和 $5\mu\text{L}$ 各自相应的 GAPDH 的 PCR 产物在 15g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳. 电泳结果经 Gel Doc 100 型成像仪输入电脑, 应用四星 SX-100 图像分析软件 (上海四星生物技术实业有限公司产品), 对条带进行吸光度峰值下面积积分, 各个目的基因与其相应的 GAPDH 积分之比, 即为该目的基因 mRNA 相对水平.

统计学处理 全部数据均以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 组间进行 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 *H pylori* 感染对慢性萎缩性胃炎组织中 SS、hSSTR₂ 和 hSSTR₅ 表达的影响 在 56 例慢性萎缩性胃炎中, *H pylori* 阳性者 46 例, *H pylori* 阴性者 10 例, *H pylori* 阳性组慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达均显著低于 *H pylori* 阴性组 ($P < 0.001$), 而 *H pylori* 阳性组慢性萎缩性胃炎组织中的 hSSTR₂ mRNA 和 hSSTR₅ mRNA 表达与 *H pylori* 阴性组比较无明显变化 (表 1).

2.2 根除 *H pylori* 感染对 SS 蛋白和 mRNA 表达的影响 46 例 *H pylori* 感染阳性的慢性萎缩性胃炎患者均给予丽珠胃三联片剂 (枸橼酸铋钾、克拉霉素、替硝唑) 治疗, 失访 5 例, 41 例完成试验, 其中 *H pylori* 根除者 33 例, *H pylori* 未被根除者 8 例. *H pylori* 根除组慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达较治疗前显著增加 ($P < 0.001$), 而 *H pylori* 未被根除组慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达与治疗前比较无明显变化 (表 2).

3 讨论

慢性萎缩性胃炎是一种发病率最高的胃癌前病变, 其在胃癌的发生、发展过程中起了重要作用. 大量研究表明幽门螺杆菌是慢性胃炎和胃癌的致病因素, 但是其确切的致病机制尚不完全清楚.

生长抑素是一种由胰岛、胃和小肠黏膜的 D 细胞分泌的多肽类激素, 对胃肠道有广谱的抑制作用. 我们以往的研究发现慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达明显低于正常胃黏膜组织, 而其受体 hSSTR₂ mRNA 在慢性萎缩性胃炎组织中的表达明显高于正常胃黏膜组织, 提示慢性萎缩性胃炎与 SS 及其受体 hSSTR₂ 有关 [1-2]. *H pylori* 感染是否通过影响 SS 及其受体基因的表达导致慢性萎缩性胃炎尚不清楚. 因此, 我们对慢性萎缩性胃炎中 *H pylori* 感染与 SS 及其受体基因的关系进行了研究. 结果发现, *H pylori* 阳性组萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达均显著低于 *H pylori* 阴性组, 而 *H pylori* 阳性组萎缩性胃炎组织中的 hSSTR₂ mRNA 和 hSSTR₅ mRNA 表达与 *H pylori* 阴性组比较无明显变化. *H pylori* 根除组慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达较治疗前显著增加, 而 *H pylori* 未被根除组慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达与治疗前比较无明显变化. 表明 *H pylori* 感染可以抑制生长抑素基因的表达, 及早根除 *H pylori*, 则可以纠正其异常表达. *H pylori* 有可能通过抑制生长抑素基因表达而参与慢性萎缩性胃炎的发生、发展.

我们以前的研究发现 *H pylori* 根除后, 慢性萎缩性胃炎患者的症状基本消失, 胃镜及病理均证实慢性炎症明显减轻或消失, 而 *H pylori* 未根除者, 其症状及炎症未减轻, 个别患者甚至病情加重 [3]. 其他研究结果也表明根除 *H pylori* 可以阻止或延缓萎缩及肠化生的发生和发展, 从而有利于减少胃癌的发生 [4-6].

总之, 我们的研究表明, *H pylori* 感染可以抑制

表 1 *H pylori* 感染对慢性萎缩性胃炎组织中 SS、hSSTR₂ 和 hSSTR₅ 表达的影响

<i>H pylori</i>	<i>n</i>	SS 蛋白	SS mRNA	hSSTR ₂ mRNA	hSSTR ₅ mRNA
阳性	46	16.00 ± 1.50^b	0.30 ± 0.05^b	0.28 ± 0.10	0.25 ± 0.08
阴性	10	21.38 ± 1.38	0.57 ± 0.13	0.23 ± 0.07	0.27 ± 0.06

^b $P < 0.001$ vs *H pylori* 阴性组.

表 2 *H pylori* 根除前后 SS 蛋白和 mRNA 表达

<i>H pylori</i>	<i>n</i>	SS 蛋白		SS mRNA	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
根除	33	17.30 ± 1.67	23.16 ± 2.74^b	0.31 ± 0.09	0.54 ± 0.11^b
未根除	8	15.50 ± 0.76	17.10 ± 1.30	0.34 ± 0.12	0.29 ± 0.04

^b $P < 0.001$ vs 治疗前.