

# 实时荧光 PCR 检测胆囊结石患者胆囊壁华支睾吸虫 DNA 的研究

郑培明 乔铁\* 马瑞红 蔡洪英 罗小兵 罗振亮 杨柳青

**【摘要】目的** 运用实时荧光 PCR 技术检测胆囊结石患者胆囊壁中的华支睾吸虫 DNA,并评估其检测效价。**方法** 随机选取 60 例胆囊结石患者的胆囊壁、胆汁及胆石标本,运用实时荧光 PCR 技术对 3 种标本分别进行华支睾吸虫 DNA 检测,另取部分胆囊壁标本进行常规病理检查。**结果** 60 例胆囊结石患者的胆囊壁、胆汁及胆石标本中,实时荧光 PCR 检测华支睾吸虫 DNA 阳性率分别为 51.67%(31/60)、56.67%(34/60)和 60.00%(36/60),3 组标本相比差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.857, P > 0.05$ )。胆囊壁病理切片检查虫卵阳性率为 8.33%(5/60),与以上 3 种方法相比,差异有统计学意义( $\chi^2 = 42.512, P < 0.01$ )。**结论** 在胆囊结石患者胆囊壁组织中发现华支睾吸虫卵,实时荧光 PCR 能检测到华支睾吸虫 DNA。

**【关键词】** 胆囊结石;胆囊壁;华支睾吸虫;基因检测;实时荧光 PCR

**Detection on *Clonorchis sinensis* DNA in gallbladder wall of patients with cholecystolithiasis by real-time PCR** ZHENG Pei-ming, QIAO Tie\*, MA Rui-hong, CAI Hong-ying, LUO Xiao-bing, LUO Zhen-liang, YANG Liu-qing. The Second People's Hospital of Panyu, Guangzhou 511470, China

\*Corresponding author: QIAO Tie, Email: fqj1958@163.com

**【Abstract】Objective** To detect *Clonorchis sinensis* DNA in the gallbladder wall of patients with cholecystolithiasis by a TaqMan based real-time PCR and to evaluation its value for detection. **Methods** Sixty patients with cholecystolithiasis were randomly selected from those who had accepted endoscopic gallbladder-preserving cholelithotomy from March to May 2012. Three types of samples (i.e. gallbladder wall, bile and gallstones) were obtained from the operation and used for DNA extraction, then a real-time PCR assay was developed for the detection of *C. sinensis* DNA. The gallbladder walls were also used for pathological examination. **Results** The positive rates of PCR amplification of *C. sinensis* DNA in the three samples were 51.67% (31/60), 56.67% (34/60) and 60.00% (36/60), respectively, and there was no significant difference among three groups ( $\chi^2 = 0.857, P > 0.05$ ). The *C. sinensis* eggs were found in five gallbladder wall samples with the positive rate 8.33%(5/60), which was significant lower than the results of above three methods ( $\chi^2 = 42.512, P < 0.01$ ). **Conclusion** *C. sinensis* DNA was detected in gallbladder wall through real-time PCR and *C. sinensis* eggs were found in the pathological sections of gallbladder wall.

**【Key words】** Cholecystolithiasis; Gallbladder wall; *Clonorchis sinensis*; Gene detection; Real-time PCR

在华支睾吸虫病流行区,华支睾吸虫感染是胆结石形成的重要诱因之一<sup>[1]</sup>。目前,华支睾吸虫成虫寄生胆道诱发肝胆管结石已有诸多报道<sup>[2]</sup>。研究显示,在胆囊结石患者的胆汁及胆结石中均发现大量华支睾吸虫卵<sup>[3-5]</sup>,提示华支睾吸虫感染尤其是华支睾吸虫卵与胆囊结石的形成有关。然而,华支睾吸虫卵诱发胆囊结石的具体作用机制尚需进一步研究。因此,笔者随机选取 60 例在广州市番禺区第二人民医院进行取石保胆手术的胆囊结石患者为研究

对象,对其胆囊壁组织分别进行病理及基因检测。本研究所有实验均经医院伦理委员会同意批准,患者知情同意。现将研究结果报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象及标本采集

2012 年 3—5 月,随机选取 60 例在广州市番禺区第二人民医院实施内镜取石保胆手术的胆囊结石患者作为研究对象,患者平均年龄(47.6 ± 11.9)岁,男性 37 人,女性 23 人。患者胆囊壁、胆汁和胆结石标本均于取石保胆术中无菌获取,胆汁 4 ℃保存,胆结石及胆囊壁标本置液氮中低温保存。

## 1.2 试剂与仪器

病理切片染色相关试剂购自珠海贝索生物技术有限公司, DNA 提取试剂盒 (DNeasy Blood and Tissue Kit) 购自凯杰企业管理(上海)有限公司, 引物、探针由上海生物工程有限公司合成, 实时荧光 PCR 反应试剂购自大连 TaKaRa 生物有限公司, 实时荧光 PCR 仪为 ABI7300(USA)。

## 1.3 胆囊壁病理检查

手术中于胆囊底部获取 4 mm × 6 mm 胆囊壁, 置于 10% 甲醛中。常规固定、石蜡包埋、切片(厚度为 2 μm), 尹红-苏木素(HE)染色后镜检。

## 1.4 胆囊壁组织 DNA 的提取

将手术中所取胆囊壁组织(4 mm × 6 mm)预先放入液氮中冷冻, 然后置研钵内加液氮研磨至粉末, 称重后置 2.0 ml 的离心管中, 向其中加 200 μl 组织裂解液(ATL), 20 μl 蛋白酶 K, 58 °C 水浴 4 h, 其余操作按试剂盒说明书进行。最后用 100 μl DNA 溶解液(AE)溶解 DNA, -20 °C 保存。

## 1.5 胆囊胆汁及胆囊结石 DNA 的提取

胆囊胆汁及胆结石 DNA 提取过程均参照文献[6]的操作进行。

## 1.6 实时荧光 PCR 检测华支睾吸虫 DNA

应用本实验室构建的华支睾吸虫 DNA 实时荧光 PCR 检测方法<sup>[6]</sup>分别对胆囊壁、胆汁及胆结石 DNA 进行基因检测。靶基因为华支睾吸虫线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 1 基因 (GenBank 登录号为 FJ965388.1), 引物、探针序列如下: 正向引物序列: 5'-GGT TTG GTA TGA TTA GTC ACA TTT G-3', 反向引物序列: 5'-ACC ACC CTA CCC AGA CAA AC-3', 探针序列: 5'-(JOE)-AGC AAA CAT AGC CAA CAC CAA GCC C-(BHQ-1)-3'。

实时荧光 PCR 反应体系: 正反向引物各 1 μl, 探针 1 μl, PCR Premix 25 μl, 模板 DNA 5 μl, ROX 液 1 μl, 加灭菌超纯水至总体积为 50 μl。PCR 反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 15 s, 60 °C 31 s, 共 45 个循环。

## 1.7 统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件对实验结果进行统计学分

析, 计量资料用均数±标准差, 率的比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  则差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胆囊壁病理切片检查

60 例胆囊壁病理切片中有 5 例发现虫卵, HE 染色镜检可见不同切面形状的虫卵, 有的虫卵可深入胆囊壁肌层, 周围可见部分胆红素颗粒, 有的虫卵被黏液包裹黏附于胆囊壁上(图 1)。

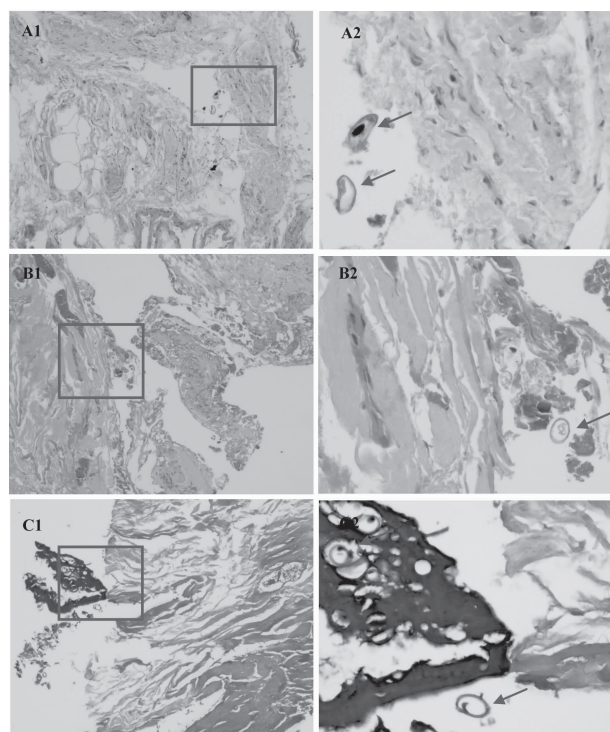


图 1 胆囊壁病理切片中的华支睾吸虫卵  
箭头示华支睾吸虫卵; A1、B1、C1: ×100; A2、B2、C2: ×400

Fig. 1 *C. sinensis* eggs in the pathological sections of gallbladder wall

Arrows showing *C. sinensis* eggs; A1, B1, C1: ×100; A2, B2, C2: ×400

### 2.2 实时荧光 PCR 检测结果

60 例胆囊结石患者的胆囊壁、胆汁及胆结石标本中, 实时荧光 PCR 检测华支睾吸虫 DNA 阳性率分别为 51.67%(31/60)、56.67%(34/60)、60.00%(36/60), 三组标本相比差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.857$ ,  $P > 0.05$ ), 但均显著高于胆囊壁病理切片镜检 ( $\chi^2=42.512$ ,  $P < 0.01$ )。其中胆囊壁病理切片镜检虫卵阳性患者对应的胆囊壁、胆汁及胆结石 PCR 结果均为阳性, 胆囊壁 PCR 结果为阳性的患者, 其对应的胆汁及胆结石 PCR 结果亦为阳性。实时荧光 PCR 阳性结果如图 2 所示, 3 组标本 PCR 检测结果见表 1。

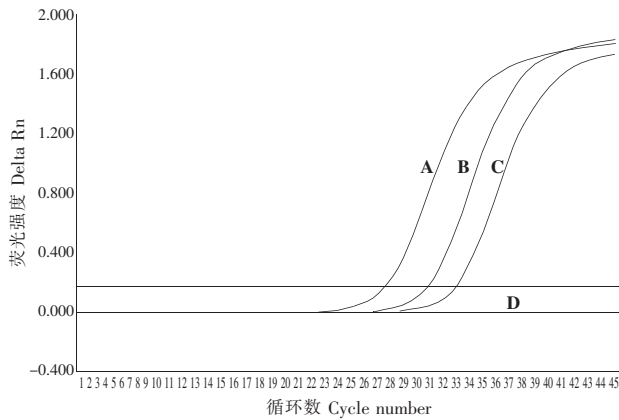


图 2 实时荧光 PCR 检测胆囊壁、胆汁及胆结石中华支睾吸虫 DNA  
A:PCR 阳性胆汁,B:PCR 阳性胆囊壁,  
C:PCR 阳性胆囊结石,D:阴性对照

Fig. 2 Detection of *Clonorchis sinensis* DNA in the samples of gallbladder wall, bile and gallstone by rea-time PCR

A:Positive bile,B:Positive gallbladder wall,  
C:Positive gallstone,D:Negative control

表 1 胆囊壁、胆汁及胆结石标本实时荧光 PCR 检测结果

Table 1 The results of the real-time PCR detection on the samples of gallbladder wall, bile and gallstone

标本类型 Samples	样本数 Samples	阳性数 No. positive	阴性数 No. negative	阳性率(%) Positive rate(%)
胆囊壁 Gallbladder wall	60	31	29	51.67
胆汁 Bile	60	34	26	56.67
胆囊结石 Gallstone	60	36	24	60.00

### 3 讨论

华支睾吸虫病是一种严重危害人类健康的食源性寄生虫病。我国是华支睾吸虫病的重要流行区,据估算我国华支睾吸虫感染者可达 1 500 万,占全球华支睾吸虫感染者中的多数<sup>[7-8]</sup>。华支睾吸虫寄生于人体肝胆道系统可以引发肝胆管炎、胆道梗阻、胆结石症、肝硬化、肝胆管癌等一系列严重病症<sup>[9]</sup>。世界卫生组织(WHO)已于 2009 年将其归为 I 类致癌物<sup>[10]</sup>。华支睾吸虫感染的病理机制主要有以下几点<sup>[11-12]</sup>:(1)成虫或虫卵堆积在肝胆管导致胆道梗阻、胆汁淤积;(2)成虫虫体、虫卵及其分泌代谢产物的机械、化学刺激引起炎症、增生、坏死等一系列病理改变;(3)改变胆汁成分,促进黏蛋白分泌以及作为成核因子导致胆结石的形成;(4)继发细菌感染。胆结石作

为华支睾吸虫感染引发的一类重要并发症一直未引起足够的重视,而笔者之前的研究表明,在华支睾吸虫病流行区胆囊结石患者的胆汁及结石标本中均发现大量华支睾吸虫卵,虫卵检出率高达 66.7%<sup>[4]</sup>,成虫则较少见到,因此研究华支睾吸虫卵与胆囊的相互作用关系对于胆囊结石的病理机制研究具有重要意义。

通过对 60 例胆囊结石患者胆囊壁组织的研究发现,实时荧光 PCR 检测华支睾吸虫 DNA 阳性率为 51.67%(31/60),而胆囊壁标本的病理切片中华支睾吸虫卵检出率仅为 8.33%(5/60)。由于胆囊壁 PCR 结果为阳性的患者其对应的胆汁及胆结石 PCR 结果亦为阳性,因此可排除假阳性结果。胆囊壁实时荧光 PCR 检测阳性率高于病理切片虫卵检出率,主要原因为:(1)制片过程中由于虫卵脱落或虫卵量少导致漏检;(2)死亡的虫体碎片也有可能进入胆囊壁,因而未查见虫卵但是可检测到华支睾吸虫 DNA。胆囊壁病理切片镜检可见部分虫卵被胆红素、黏液样物质包裹,虫卵既可黏附于胆囊黏膜表面也可随胆囊收缩进入胆囊肌层。胆囊壁中华支睾吸虫卵及其 DNA 的存在为华支睾吸虫感染诱发胆囊结石的病理机制研究提供了最直接的证据。进入胆囊壁的虫卵及虫体碎片可刺激胆囊黏膜上皮细胞,引起胆囊慢性炎症。此外虫卵刺激还可以引发黏膜上皮杯状化生及黏液分泌增加,从而黏附于虫卵表面并以其为核心,继而黏附胆红素颗粒、胆固醇结晶、碳酸钙结晶等物质形成大分子复合物,最终导致胆囊结石的形成。

研究表明,采用实时荧光 PCR 技术检测华支睾吸虫 DNA 是诊断华支睾吸虫感染的有效手段,其检测灵敏度及特异性均已得到验证并用于胆汁及胆结石标本的检测<sup>[6]</sup>。本研究运用同样的方法对胆囊结石患者的胆囊壁标本进行基因检测,并与胆汁及胆结石标本检测进行对比分析,结果表明胆囊壁组织中华支睾吸虫 DNA 检出率高,与胆汁及胆结石标本检出率相比较差异无统计学意义,但显著高于胆囊壁病理检测,因此是一种诊断华支睾吸虫感染的有效手段。同时,由于胆汁及胆结石标本成分复杂,从中提取华支睾吸虫 DNA 的过程相对繁琐,而胆囊壁组织取材较少且成分较单一,其基因操作过程简便易行,因此更适用于华支睾吸虫感染的基因检测。由于本检测技术属有创性检查,因此不利于华支睾吸虫病的早期筛查,但其对于胆囊结石、胆囊癌等患者的病因诊断、治疗及预防等方面均具有重要意义。

综上所述,本研究在胆囊壁中发现华支睾吸虫卵,并通过实时荧光 PCR 方法在胆囊壁中检测到华支睾吸虫 DNA。华支睾吸虫卵或虫体碎片进入胆囊壁内并对胆囊黏膜上皮细胞产生的机械、化学刺激是华支睾吸虫感染诱发胆囊结石等胆囊疾病的病理基础。

#### 参 考 文 献

- [1] Choi D, Lim JH, Lee KT, et al. Gallstones and *Clonorchis sinensis* infection: a hospital-based case-control study in Korea [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(8):399-404.
- [2] 黄嘉殷,方小衡. 华支睾吸虫感染与肝胆疾病的关系[J]. 热带医学杂志,2010,10(2): 226-228.
- [3] 乔铁,马瑞红,张阳德,等. 华支睾吸虫感染与胆囊结石研究报告[J].中国现代医学杂志,2009,19(14):2094-2096.
- [4] Qiao T, Ma RH, Luo XB, et al. Cholecystolithiasis is associated with *Clonorchis sinensis* infection [J]. PLoS One, 2012, 7 (8): e42471.
- [5] 乔铁,马瑞红,罗小兵,等.华支睾吸虫卵参与胆囊结石形成[J]. 中华肝胆外科学杂志,2012,18(9):671-675.
- [6] Qiao T, Zheng PM, Ma RH, et al. Development of a real-time PCR assay for the detection of *Clonorchis sinensis* DNA in gallbladder bile and stone samples from patients with cholecystolithiasis[J]. Parasitol Res, 2012, 111(4): 1497-1503.
- [7] Lun ZR, Gasser RB, Lai DH, et al. Clonorchiasis: a key foodborne zoonosis in China[J]. Lancet Infect Dis, 2005, 5(1): 31-41.
- [8] 钱门宝,周晓农,方悦怡,等. 加强中国华支睾吸虫病研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2011,29(3): 211-214.
- [9] 杨六成,黄宝裕,薛桂芳,等. 华支睾吸虫感染与肝胆胰外科疾病的关系 (附 650 例临床分析)[J]. 中华肝胆外科学杂志, 2004,10(3):165-166.
- [10] Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens-part B: biological agents[J]. Lancet Oncol, 2009, 10 (4):321-322.
- [11] 李国清,谢明权. 高级寄生虫学[M]. 北京:高等教育出版社, 2007:275-284.
- [12] 程艳洁,姚丽君. 华支睾吸虫与肝/胆癌发病机制[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(3): 275-278.

(收稿日期:2012-10-18)

(本文编辑:高石)