

· 论 著 ·

幽门螺杆菌感染、端粒酶活性与胃癌、癌前病变关系的研究

伍冬梅¹, 李春鸣^{2△}, 张 贇³

(1. 遵义医学院组胚教研室, 贵州遵义 563003; 2. 遵义医学院病理教研室, 贵州遵义 563003; 3. 贵州省人民医院病理科, 贵阳 550002)

摘要:目的 探讨幽门螺杆菌(Hp)、端粒酶在胃癌及癌前病变中的作用及相互关系。方法 应用 Warthin-Starry 银染法、免疫组织化学 SP 法及核酸原位杂交技术分别检测 66 例胃黏膜肠化生、36 例异型增生、50 例胃癌及 10 例正常胃黏膜 Hp 感染情况、hTERT 蛋白及 hTERT mRNA 的表达情况。结果 胃黏膜肠化生、异型增生及胃癌中 Hp 感染率、hTERT 蛋白及 hTERT mRNA 阳性表达率均显著高于正常胃黏膜。93 例 Hp 感染阳性组 hTERT 蛋白表达阳性率为 88.17%, 59 例 Hp 感染阴性组 hTERT 蛋白表达阳性率为 47.46%, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。hTERT 蛋白表达阳性组 hTERT mRNA 表达阳性率显著高于 hTERT 蛋白表达阴性组($P < 0.01$)。结论 Hp、hTERT 蛋白及 hTERT mRNA 与癌前病变及胃癌发生有关, Hp 感染可引起胃癌中 hTERT 蛋白表达水平的上升, 从而激活端粒酶, 这可能是 Hp 感染致胃癌的另一分子机制。

关键词: 胃肿瘤; 癌前状态; 螺杆菌, 幽门; 端粒, 末端转移酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.14.013

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)14-1386-02

Relationship between infection of *Helicobacter pylori* and telomerase activity in gastric cancer and precancerous lesionsWu Dongmei¹, Li Chunming^{2△}, Zhang Yun³

(1. Department of Histology and Embryology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 2. Department of Pathology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 3. Department of Pathology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China)

Abstract: Objective To study the effect and correlation of infection of *Helicobacter pylori* and telomerase activity in gastric cancer, precancerous lesions. Methods Hp infection was detected by Warthin-Starry method, hTERT protein expression was examined by immunohistochemical technique SP, hTERT mRNA expression was examined by situ hybridization. Results Hp infection, the positive expression rate of hTERT protein and hTERT mRNA in intestinal metaplasia, epithelial dysplasia of stomach and gastric carcinomas were significantly higher than normal gastritis mucosa. The positive expression rate of hTERT protein in 93 cases of gastric mucosa lesion of positive Hp infection was 88.17%, which was significantly higher than 47.46% in 59 cases of negative Hp infection ($P < 0.01$). The positive expression rate of hTERT mRNA with positive hTERT protein was significantly higher than that with negative hTERT protein ($P < 0.01$). Conclusion Hp infection, hTERT protein and hTERT mRNA are associated with gastric carcinomas, Hp infection can result in increased expression of hTERT protein and then activate telomerase, which may be one of molecular mechanism by which Hp infection leads to gastric carcinoma.

Key words: stomach neoplasms; precancerous conditions; helicobacter pylori; telomerase

胃癌是最常见严重危害人类健康的恶性肿瘤之一, 在癌变之前多数经历一段相当长的演变过程。幽门螺杆菌 (*helicobacter pylori*, Hp) 是发生胃癌及癌前病变的重要危险因素之一^[1-2], 国际癌症研究中心将 Hp 列为第一致癌因子^[3]。端粒酶是一种与细胞永生化的核糖核蛋白酶, 许多肿瘤中都有端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 的表达^[4-5]。本课题通过对 Hp 感染、hTERT 蛋白及 hTERT mRNA 在胃癌及癌前病变中的表达进行研究, 进一步探讨胃癌发生的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 选取 2004 年 1 月至 2008 年 1 月本院病理科诊断的胃黏膜活检及手术切除病理标本共 162 例, 正常胃黏膜 10 例, 胃黏膜肠化生 66 例, 异型增生 36 例, 胃癌 50 例。所有患者在手术前均未经放化疗及免疫疗法。

1.2 方法

1.2.1 Hp 检查 采用 Warthin-Starry 银染法染色: 常规脱蜡

至水, 1% 硝酸银液 55℃ 孵育 50 min。5% 明胶、3% 对苯二酚和 2% 硝酸银混合液染色, 55℃ 温水洗, 醋酸盐缓冲液洗, 脱水、透明、封片。Hp 为棕色或棕黑色, 呈短杆状、弧形或 S 形。

1.2.2 hTERT 免疫组织化学检测 hTERT 兔抗人抗体为美国 Santa Cruz 公司产品, SP 试剂盒购于北京中杉金桥生物有限公司, hTERT mRNA 原位杂交试剂盒购于武汉博士德生物工程技术有限公司。操作步骤严格按照 SP 试剂盒说明进行, 一抗工作浓度为 1:50。以磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作为阴性对照, 已知阳性片作为阳性对照。hTERT 蛋白阳性染色为细胞质呈棕色或棕褐色。判定标准: 随机观察 5 个高倍视野, 按阳性细胞百分比及其染色强度两方面进行结果判断: 阳性细胞小于或等于 10% 为 0 分, 10%~45% 为 1 分, 46%~70% 为 2 分, >70% 为 3 分; 细胞不着色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 深黄色为 2 分, 棕黄褐色为 3 分。上述两项相加, 0~2 分为阴性, ≥3 分为阳性。

1.2.3 hTERT mRNA 核酸原位杂交检测 整个过程在超净

工作台下进行,以预杂交液代替探针作为阴性对照,按试剂盒步骤进行操作。hTERT mRNA 阳性染色为细胞质呈棕色或棕褐色,判定标准同 hTERT 蛋白。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,各组间比较采用 χ^2 检验,采用 Spearman 等级相关性分析比较相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 胃癌及癌前病变中 Hp 感染及 hTERT 蛋白、hTERT mRNA 表达情况 经 Warthin-Starry 染色可见 Hp 为棕黑色,短杆状、弧形或 S 形,见插 II 图 1。在胃黏膜肠化生、异型增生及胃癌中 Hp 感染率分别为 60.61% (40/66)、66.67% (24/36)、58.00% (29/50),均高于正常胃黏膜的 20.00% (2/10),差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。胃黏膜肠化生、异型增生及胃癌中 hTERT 蛋白阳性表达率分别为 68.18% (45/66)、72.22% (26/36)、78.00% (39/50),均高于正常胃黏膜的 10.00% ($P < 0.01$),见插 II 图 2。胃黏膜肠化生、异型增生及胃癌中 hTERT mRNA 阳性表达率分别为 54.55% (36/66)、58.33% (21/36) 及 58.00% (29/50),均显著高于正常胃黏膜的 0.00% ($P < 0.05$),见插 II 图 3~5。

2.2 胃癌及癌前病变中 hTERT 蛋白表达与 Hp 感染的关系 胃黏膜肠化生、异型增生及胃癌中 Hp 感染阳性组 hTERT 蛋白表达阳性率均显著高于 Hp 感染阴性组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 胃癌及癌前病变中 hTERT 蛋白表达与 Hp 感染的关系

组别	Hp	n	hTERT(+)	hTERT 阳性率(%)	P
肠化生	+	40	35	87.50	<0.01
	-	26	10	38.46	
异型增生	+	24	21	87.50	<0.05
	-	12	5	41.67	
胃癌	+	29	26	89.66	<0.05
	-	21	13	61.90	
合计	+	93	82	88.17	<0.01
	-	59	28	47.46	

3 讨 论

胃黏膜上皮细胞癌变并非是由正常细胞一跃而成为癌细胞,而是一个长期感染和炎症反应渐进的过程。目前较为认可的人胃癌发生模式是 1988 年 Correa 提出的:“正常胃黏膜—浅表性胃炎—萎缩性胃炎—肠化生—异型增生—胃癌”。其中,胃黏膜肠化生和异型增生被认为是胃癌前病变^[6]。

Hp 是 Warren 和 Mashall 于 1983 年首次从人体胃窦黏膜活检标本中分离培养成功的革兰阴性微需氧菌,是诱发胃癌的危险因素之一^[7]。它主要作用于癌变的起始阶段,即它可能只是慢性胃炎向肠化生、异型增生及胃癌发展的启动因子,在异型增生形成后是否还具有促进作用尚不清楚。樊薇等^[8]对 Hp 与胃黏膜疾病的研究中发现 Hp 感染与肠化生、异型增生和胃癌显著相关。本实验结果表明, Hp 存在于胃黏膜表面黏液层、表面上皮下、小凹内,胃黏膜肠化生、异型增生及胃癌中的 Hp 感染率显著高于正常胃黏膜,且呈先升高后下降趋势。在异型增生时感染率达到高峰,当胃黏膜发生癌变后,感染率有所下降,说明 Hp 感染参与了胃癌及癌前病变的发生,且主要作用于癌变的开始阶段。癌组织内少见 Hp,可能原因是癌

组织中的微环境不利于细菌生长,或受损上皮细胞的大量凋亡不利于 Hp 的繁衍和吸附。

端粒酶是一种具有逆转录酶活性的核酸蛋白,可以催化染色体末端端粒的合成,保持染色体的稳定性,导致细胞无限增殖。近年研究发现,端粒酶在恶性肿瘤中都有较高的表达,胃癌组织的表达率在 85% 以上^[9]。人端粒酶主要由端粒酶 RNA、端粒酶相关蛋白和端粒酶逆转录酶三部分组成^[10-11],其中 hTERT 对端粒酶活性表达起调控、限速作用,其变化可比较准确地反映细胞中端粒酶活性的变化^[12-13]。贡明才等^[14]研究发现端粒酶在胃癌及胃癌前病变中均有表达,且胃黏膜病变越重,hTERT 蛋白表达阳性率越高,亦即端粒酶活性越高,端粒酶在癌变过程中发挥的作用也越来越重要。本研究结果表明,在肠化生、异型增生和胃癌组织中 hTERT 蛋白表达的阳性率分别为 68.18%、72.22%、78.00%,呈递增趋势,均显著高于正常胃黏膜的 10%。说明 hTERT 蛋白的表达与胃癌的发生有密切的关系,且在胃癌前病变阶段已经发挥作用,参与了正常胃黏膜细胞恶性转化的过程。本研究还采用原位杂交法检测胃癌及癌前病变中 hTERT mRNA 的表达,在肠化生、异型增生和胃癌中表达率分别为 54.55%、58.33% 及 58.00%,而在正常组织中无表达。正常胃黏膜 hTERT mRNA 无表达,而相应蛋白 10% 阳性表达,可能是检测石蜡组织端粒酶基因的表达时 hTERT mRNA 由于时间原因有一定程度的降解所致。

Hp 感染、端粒酶均与胃癌的发生相关, Hp 感染与端粒酶之间的关系报道较少^[15]。本实验结果发现, Hp 感染阳性组和 Hp 感染阴性组中 hTERT 蛋白表达阳性率分别为 88.17% 和 47.46%,两组比较有统计学意义。其中肠化生、异型增生及胃癌组织中 Hp 感染阳性组 hTERT 蛋白表达阳性率均明显高于 Hp 感染阴性组,提示胃癌及癌前病变中 Hp 感染与 hTERT 蛋白表达密切相关。

综上所述, Hp 感染在胃癌的演变过程中起重要作用,另外, Hp 可能是胃黏膜上皮细胞端粒酶激活的主要机制之一, Hp 感染可引起 hTERT 蛋白及基因表达水平上升,从而激活端粒酶导致细胞无限增殖,这可能是 Hp 感染致胃癌的另一分子机制,但 Hp 感染诱导端粒酶活化的确切机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 齐洁敏,刘绍晨,杜春风,等. Hp、p53 在胃癌和癌前病变中的表达及相关性研究[J]. 承德医学院学报,2006,23(1):6-8.
- [2] Alexander GA. Association of helicobacter pylori infection with gastric cancer[J]. Mil Med,2000,165(2):21-27.
- [3] 兰春慧,陈东风,房殿春,等. H. pylori 对胃癌细胞线粒体膜蛋白 ANT1 表达的影响[J]. 重庆医学,2008,37(24):2790-2792.
- [4] Okusa Y, Ichikura T, Mochizuki H, et al. Clinical significance of telomerase activity in biopsy specimens of gastric cancer[J]. J Clin Gastroenterol,2000,30(1):61-63.
- [5] 钱晓彬,曹友清,陈森. 端粒酶与食管癌[J]. 肿瘤防治杂志,2002,9(1):108-110.
- [6] 梁增文. 胃癌前病变的研究进展[J]. 广西医学,2005,27(8):1127-1130.

射点的多少、镜身压迫止血的时间及出血的观察,以及通知麻醉后复苏的护士是否存在误吸及出血的情况,以便及时吸出分泌物及血液。

无痛胃镜下进行食管胃静脉曲张的硬化和组织胶注射的治疗也存在与麻醉相关的并发症,本组有 3 例(1.9%)出现吸入性肺炎,表现为血氧饱和度下降、呼吸急促、咳嗽、咳痰、发热,血氧饱和度最低降至 63%,术后立即给予清理气道、面罩吸氧、使用激素及抗生素等,患者 3~5 d 即恢复正常。为尽可能避免这类并发症的发生,建议对于正在出血或预计有可能大出血的患者,能在术前行气管内插管,提高治疗的安全性;此外在操作中,应尽可能吸净咽喉部的分泌物及血液,操作结束后,也应吸净食管内的血液;保持一定的麻醉深度,避免操作中的体动、呕吐及呛咳,减少误吸和操作的风险。

本组资料显示,无痛胃镜下行食管胃静脉曲张的硬化和组织胶注射治疗安全、有效,患者耐受性和依从性好,医生的操作满意度较高;麻醉药品的联合使用减少了药物的不良反应,起效快,苏醒快;麻醉医生和操作医生密切配合也减少了吸入性肺炎等并发症,提高了该项治疗的安全性。

参考文献:

[1] Garcia-Tsao G, Sanyal AJ, Grace ND et al. Prevention and management of gastroesophageal varices and variceal hemorrhage in cirrhosis[J]. *Am J Gastroenterol*, 2007, 102(9):2086-2102.

[2] Helmy PC. Current endoscopic therapeutic options in the management of variceal bleeding[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2001, 15:575-594.

[3] Yoshida H, Tajiri T, Mamada Y, et al. Comparison of characteristics of recurrent esophageal varices after endoscopic ligation versus endoscopic ligation plus sclerotherapy[J]. *Hepatogastroenterology*, 2004, 51:457-461.

[4] 程留芳, 令狐恩强, 王志强, 等. 食管静脉曲张硬化与结扎硬化治疗食管静脉曲张的对照研究[J]. *中华消化内镜杂志*, 2001, 18:213-215.

[5] 范铁艳, 程留芳. 结扎和硬化治疗肝硬化食管静脉曲张出血疗效比较的荟萃分析[J]. *世界华人消化杂志*, 2006(14):1704-1709.

[6] 祝斌, 王锦辉, 陈洁, 等. 肝硬化食管胃底静脉曲张破裂出血 140 例[J]. *广东医学*, 2008, 29(7):1104-1106.

[7] 王彩艳, 徐红, 王丽波. 静脉麻醉在食管胃底静脉曲张内镜诊疗术中的临床应用(附 80 例报告)[J]. *吉林医学*, 2006, 27(9):1004-1005.

[8] Lawrence B, Charles D, Hightower BA, et al. Moderate level sedation during endoscopy: a prospective study using low-dose propofol, meperidine/fentanyl, and midazolam[J]. *Gastrointest Endosc*, 2004, 59(7):795-803.

[9] 陈扬, 杨丽莎, 陈忠华. 急诊硬化剂注射食管静脉曲张破裂出血 54 例分析[J]. *重庆医学*, 2005, 34(2):316

[10] Hart R, Classen M. Complications of diagnostic gastrointestinal endoscopy[J]. *Endoscopy*, 1990, 22(5):229-233.

[11] Vargo JJ, Zuccaro G, Dumot JA, et al. Gastroenterologist-administered propofol versus meperidine and midazolam for advanced upper endoscopy: a prospective, randomized trial[J]. *Gastroenterology*, 2002, 123:8-16.

[12] 江先明. 丙泊酚复合舒芬太尼用于老年患者胃镜检查的效果[J]. *海南医学*, 2010, 21(17):42-43.

[13] Koshy G, Nair S, Norkus EP, et al. Propofol versus midazolam and meperidine for conscious sedation in GI endoscopy[J]. *Am J Gastroenterol*, 2000, 95(6):1476-1479.

[14] Runder R, Jalowiecki P, Kawecki P, et al. Conscious analgesia/sedation with remifentanyl and propofol versus total intravenous with fentanyl, midazolam, and propofol for outpatient colonoscopy[J]. *Gastrointest Endosc*, 2003, 57(6):657-663.

[15] 徐莉, 顾华群, 叶永裕, 等. 肝硬化患者行无痛胃镜术的探讨[J]. *海南医学*, 2008, 19(4):111-112.

[16] Heuss A, Schnieper P, Drewe J, et al. Risk stratification and safe administration of propofol by registered nurses supervised by the gastroenterologist: a prospective observational study of more than 2000 cases[J]. *Gastrointest Endosc*, 2003, 57:664-671.

(收稿日期:2011-01-08)

(上接第 1387 页)

[7] Majid MA, Faruq TI, Hossain AB. Association of helicobacter pylori infection with gastric carcinoma[J]. *Bangladesh Med Res Counc Bull*, 2009, 35(1):7-10.

[8] 樊薇, 嵯静, 周涛, 等. Hp 感染及 COX-2 的表达与胃癌及癌前病变关系的研究[J]. *山东大学学报*, 2006, 44(7):703-705.

[9] Suzuki K, Kashimura H, Ohkawa J, et al. Expression of human telomerase catalytic subunit gene in cancerous and precancerous gastric conditions[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000, 15(7):744-751.

[10] 贺晓慧, 王润田, 张波, 等. 人端粒酶逆转录酶在胃癌及其癌前病变中的表达[J]. *北京大学学报*, 2002, 34(6):672-675.

[11] 赵冬雨, 张瑞奎, 唐贺文, 等. 端粒酶在胃癌诊治中的作用[J]. *武警医学院学报*, 2004, 13(2):151-154.

[12] Chen F, Hu L, Li Y, Wang L. Expression of telomerase subunits in gastric cancer. [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2005, 25(6):741-743.

[13] Fujimoto R, Kamata N, Taki M, et al. Gene expression of telomerase related proteins in human normal oral and ectocervical epithelial cells[J]. *Oral Oncol*, 2003, 39(5):445-452.

[14] 贡明才, 王锁荣, 王跃进, 等. 胃癌组织端粒酶逆转录酶和 Rb 基因表达及其临床意义[J]. *肿瘤防治杂志*, 2003, 10(4):373-376.

[15] 何兴祥, 吴捷莉, 袁顺玉. 胃黏膜癌变过程中幽门螺杆菌感染与端粒酶活性的表达[J]. *世界华人消化杂志*, 2000, 8(5):505-508.

(收稿日期:2010-08-04 修回日期:2010-11-13)