

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.29.004

## 幽门螺杆菌感染的慢性胃炎与凋亡基因的相关性研究\*

兰春慧<sup>1</sup>,黎博胜<sup>2</sup>,常 辉<sup>1</sup>,左钱飞<sup>2</sup>,廖盛涛<sup>3</sup>,邹全明<sup>2</sup>,陈东风<sup>1△</sup>

(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科,重庆 400042;2. 第三军医大学药理学微生物与生化药学教研室,重庆 400038;3. 第三军医大学学员旅五营,重庆 400038)

**摘要:**目的 探讨幽门螺杆菌(HP)感染相关胃炎程度与胃黏膜细胞凋亡基因表达的相关性。方法 将 2013 年 11~12 月大坪医院消化内镜中心 45 例慢性胃炎患者纳入研究,快速尿素酶实验和<sup>13</sup>C-呼气实验检测 HP 感染情况,病理分析 HP 感染部位胃炎严重程度,实时定量 PCR(qRT-PCR)法检测 HP 感染部位胃黏膜组织和无 HP 感染的胃黏膜组织中凋亡相关基因 Bax、Bak、Bcl-2 的表达,Person 相关分析 HP 感染的慢性胃炎程度与凋亡基因表达的相关性。结果 45 例患者<sup>13</sup>C-呼气实验和胃黏膜快速尿素酶实验均阳性,提示 HP 感染。病理结果显示 45 例(100%)患者均为慢性胃炎,其中 28 例(62.2%)为轻度,16 例(35.6%)为中度,1 例(2.0%)为重度;9 例(20.0%)肠化生,5 例(11.1%)低级别上皮内瘤变。45 例患者胃体黏膜尿素酶实验阴性,提示无 HP 感染,其中 6 例胃体组织显示轻度慢性炎症(13.3%),39 例无炎症(86.7%);无肠化生及上皮内瘤变。qRT-PCR 结果显示 HP 感染胃黏膜中 Bax mRNA 的表达明显高于 HP 未感染胃黏膜患者( $P < 0.01$ )且与胃炎程度呈明显正相关( $P < 0.01$ ),而 Bak 和 Bcl-2 的表达在两组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 HP 感染的慢性胃炎程度与胃黏膜细胞凋亡呈正相关,提示 HP 感染可能导致胃上皮细胞中 Bax 基因的表达从而促进细胞凋亡。

**关键词:**螺杆菌,幽门;胃炎;细胞凋亡;基因

中图分类号:R573.3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)29-3858-03

### Study on correlation between helicobacter pylori infection-associated gastritis and the apoptotic genes in gastric mucosa\*

Lan Chunhui<sup>1</sup>, Ni Bosheng<sup>2</sup>, Chang Hui<sup>1</sup>, Zuo Qianfei<sup>2</sup>, Liao Shengtao<sup>3</sup>, Zou Quanming<sup>2</sup>, Chen Dongfeng<sup>1△</sup>

(1. Department of Gastroenterology, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Department of Microbiology and Biochemical Pharmacy, College of Pharmacy, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 3. Cadet Brigade, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** Objective To investigate the correlation between Helicobacter pylori (HP) infection-associated gastritis and the apoptotic genes in gastric mucosa. **Methods** Forty-five patients with chronic gastritis were registered in our study from November 2013 to December 2014. HP infection status in the patients was detected by using urease test and <sup>13</sup>C-urea breath test. The degree of gastritis in the gastric mucosa with HP infection was confirmed via histopathology. qRT-PCR was used to measure the mRNA expressions of Bax, Bak and Bcl-2 in the gastric mucosa with HP infection and matched normal gastric mucosa. Person analysis was used to assess the correlation between the HP infection-associated gastritis and the mRNA expressions of Bax, Bak and Bcl-2 in the gastric mucosa. **Results** Forty-five patients with HP infection in antrum and 45 patients (100%) with chronic antrum gastritis were identified, including 28 patients (62.2%) with light gastritis, 16 patients (35.6%) with moderate gastritis, 1 patient (2.0%) with severe gastritis, 9 patients (20.0%) with metaplasia, 5 patients (11.1%) with low grade intraepithelial neoplasms. The urease tests were negative in the gastric body of 45 patients, 6 patients (13.3%) were mild chronic gastritis in the body; Patient with metaplasia and intraepithelial gastritis was not found. The Bax expression in the HP-infected gastric mucosa was markedly increased when compared with the normal gastric mucosa ( $P < 0.01$ ), and positively correlated with the degree of gastritis ( $P < 0.01$ ), whereas the expressions of Bak and Bcl-2 have no significantly differences between two groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** HP infection-associated gastritis positively correlated with the expressions of apoptotic genes in gastric mucosa, suggesting that HP infection might result in increasing the Bax expression and further enhancing the cell apoptosis.

**Key words:** Helicobacter pylori; gastritis; apoptotic; gene

幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, HP)是人类重要的致病菌之一,是慢性胃炎和消化性溃疡的主要致病因子,与胃黏膜相关性淋巴瘤和胃腺癌的发病关系密切<sup>[1]</sup>。全世界约 50% 的人群感染 HP,其中我国的感染人数平均为 59%<sup>[2-3]</sup>。HP 发挥其致病效应主要通过两种毒力蛋白,即空泡毒素蛋白 A (VacA)<sup>[4]</sup>和细胞毒素相关基因(CagA),前者为分泌性蛋白,后者通过 IV 型分泌系统注入宿主细胞内<sup>[5]</sup>。最近研究表明

VacA 主要通过线粒体通路致胃上皮细胞凋亡<sup>[6]</sup>,CagA 通过激活 NF- $\kappa$ B 通路抑制胃上皮细胞凋亡<sup>[7]</sup>。在胃上皮细胞中注入 CagA 蛋白可以抵抗 VacA 蛋白介导的细胞凋亡效应<sup>[8]</sup>。这些研究表明 HP 的这两种蛋白分别具有促细胞凋亡和抗细胞凋亡的作用。本研究通过评估 HP 感染的慢性胃炎程度及检测 HP 感染的胃黏膜中凋亡相关基因 Bax、Bak、Bcl-2 表达,拟阐明胃炎程度与凋亡相关基因表达的相关性,以进一步明确

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171526);重庆市自然科学基金资助项目(CSTC 2011 jjA10061)。作者简介:兰春慧(1973-),副教授,博士,主要从事幽门螺杆菌致胃癌研究。△ 通讯作者,E-mail:chendf1981@126.com。

HP 感染的致病机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 11~12 月第三军医大学大坪医院消化内科内镜中心经胃镜取材的标本,男 19 例,女 26 例,年龄 18~60 岁,平均(45.42±10.05)岁。每个患者胃窦和近端胃体大弯分别取 3 块标本,用于快速尿素酶试验、组织病理学诊断、RNA 提取(置于液氮保存)。本研究得到第三军医大学大坪医院伦理委员会批准(医研伦审 2013 第 024 号),以病历记录方法收集所有研究对象的年龄、性别及相关临床资料。入选标准:(1)胃镜检查确诊的慢性胃炎患者;(2)胃窦黏膜尿素酶试验阳性(2+或以上),胃体黏膜尿素酶试验阴性;(3)<sup>13</sup>C-呼气试验阳性;(4)年龄 18~60 岁,男女不限;(5)签署知情同意书。排除标准:(1)消化性溃疡、胃癌、胃切除术后的患者;(2)妊娠或哺乳期妇女;(3)严重的肝病、心脏病、肾脏病、恶性肿瘤等患者;(4)近 3 个月内参加过其他药物研究者。

1.2 HP 感染情况检测 采用快速尿素酶试验和<sup>13</sup>C-呼气实验。

1.3 病理学诊断 组织标本经 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,4 μm 连续切片,苏木素-伊红(HE)染色。所有组织切片由一位病理医生进行病变诊断及病变程度鉴定,后由专人采取盲法阅片。胃黏膜病理组织学判定标准参照中国慢性胃炎共识意见<sup>[9]</sup>。将胃炎程度从无、轻度、中度到重度以 1~4 级表示。

1.4 实时定量 PCR(qRT-PCR)

1.4.1 总 RNA 提取 胃黏膜组织从液氮取出后置于经 DEPC 水处理过的匀浆器中,以 50 mg/mL 的比例加入 Trizol 试剂,按照 Trizol 试剂操作说明提取总 RNA,溶于 35 μL DEPC 水,分装冻存于-70 ℃。

1.4.2 DNA 扩增 按照 PrimeScript RTase 试剂盒说明书操作。逆转录条件:37 ℃,30 min;85 ℃,5 min。对合成的 cDNA 进行 qPCR 扩增,按照 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 使用说明加入所需试剂及引物,Bak 上游引物序列为 5'-TCT CTG GGA CCT CCT TAG CC-3',下游引物序列为 5'-GTG GGA ATG GGC TCT CAC AA-3';Bax 上游引物序列为 5'-AGG ATG CGT CCA CCA AGA AG-3',下游引物序列为 5'-TGT CCA GCC CAT GAT GGT TC-3';Bcl-2 上游引物序列为 5'-GGT GAA CTG GGG GAG GAT TG-3',下游引物序列为 5'-GGC AGG CAT GTT GAC TTC AC-3';GAPDH 为内对照,上游引物序列为 5'-CAT CAC CAT CTT CCA GGA GC-3',下游引物序列为 5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC-3'。扩增条件:95 ℃,2 min;95 ℃,10 s,60 ℃,10 s,72 ℃,20 s 40 个循环;溶解曲线条件:65 ℃升至 95 ℃,每 5 秒增加 0.5 ℃。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,Mann-Whitney test 用于比较正常胃黏膜及不同炎症胃黏膜之间 Bak、Bax 和 Bcl-2 基因表达差异。Person 相关性分析用于分析胃黏膜炎症程度与 Bak、Bax 和 Bcl-2 基因表达的相关性,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HP 感染情况及组织学改变 45 例胃窦黏膜快速尿素酶试验均为阳性,提示 HP 感染,胃体快速尿素酶试验阴性,提示胃体无 HP 感染,作为对照组。病理学诊断提示 45 例胃窦均显示慢性炎症,其中 28 例为轻度(62.2%),16 例为中度

(35.6%),1 例为重度(2.0%);肠化生 9 例(20.0%),低级别上皮内瘤变 5 例(11.1%)。45 例中有 6 例胃体显示轻度慢性炎症(13.3%),39 例无炎症(86.7%),胃体无肠化生及上皮内瘤变。

2.2 HP 感染相关胃炎胃黏膜细胞凋亡检测 qRT-PCR 法检测了 HP 感染的胃窦黏膜和未感染的胃体黏膜中凋亡相关基因 Bak、Bax 和 Bcl-2 的表达显示:胃窦黏膜 Bax 的表达明显高于胃体黏膜,且随着胃窦炎症程度的加重,Bax 的表达也随之增高(P<0.01)。在重度胃窦胃炎中,胃窦 Bcl-2 的表达明显低于胃体黏膜(P<0.01)。Bak 的表达在胃窦和胃体中无明显改变,见图 1。

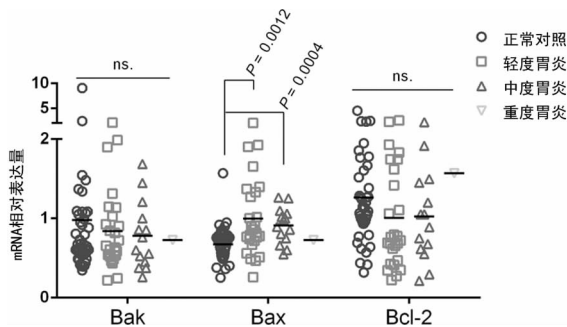


图 1 qRT-PCR 检测 HP 感染阳性和阴性的胃黏膜中 Bax、Bcl-2 和 Bak mRNA 的表达

2.3 HP 感染的慢性胃炎与凋亡基因的相关性 Bax 的表达与胃炎严重程度呈正相关(P<0.01),见图 2。而 Bak 和 Bcl-2 的表达与胃炎严重程度无明显相关性(P>0.05),见图 2~4。

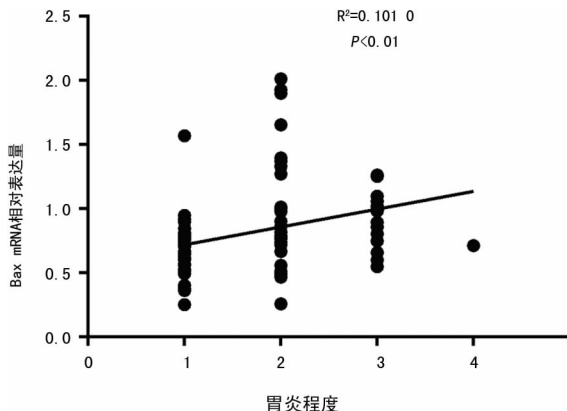


图 2 Person 相关分析 HP 感染的慢性胃炎程度与 Bax 表达的相关性

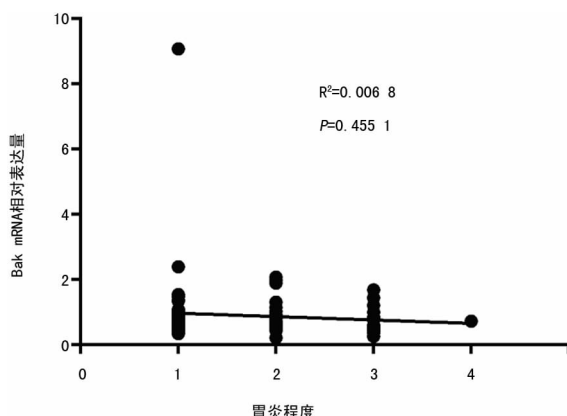


图 3 Person 相关分析 HP 感染的慢性胃炎程度与 Bak 表达的相关性

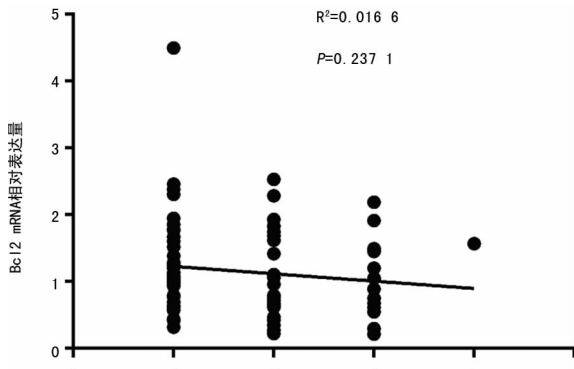


图4 Person 相关分析 HP 感染的慢性胃炎程度与 Bcl-2 表达的相关性

### 3 讨论

1994 年 WHO 把 HP 列为第 I 类致癌因子<sup>[10]</sup>。在 Correa 提出的经典的 HP 感染与肠型胃癌发生模式“慢性活动性胃炎-慢性萎缩性胃炎→肠化生→异型增生→胃癌”中<sup>[11]</sup>, HP 引起的慢性活动性胃炎是胃癌发生的最主要病因,也是胃癌发生的启动因素。但 HP 感染导致慢性活动性胃炎的机制仍不清楚,加强其致病机制的研究,对胃癌的防治具有重要意义。

新近的研究表明凋亡在多种感染性疾病的病理过程中起着十分重要的作用,尽管凋亡是一种正常的机体代谢更新的生理作用,但是过度的凋亡将导致机体组织的病理损伤。体内外研究表明,不仅 HP 全菌接触细胞可诱导凋亡,而且 HP 的多种毒力因子可以诱导不同类型细胞的凋亡发生<sup>[12]</sup>,其中包括胃上皮细胞、多核白细胞、T 淋巴细胞及巨噬细胞。这些研究提示凋亡在 HP 感染的致病过程中发挥着重要的作用。

凋亡的发生作用机制包括多种效应分子,Bcl-2 家族蛋白是其中一类最为相关的调节分子。Bcl-2 家族蛋白包括两个最主要的亚家族蛋白,一类是抗凋亡的相关蛋白,主要包括 Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-w、Bfl-1、Brag-1 和 Mcl-1;另一类为促凋亡的相关蛋白,主要包括 Bax、Bak、Bcl-XS、Bad、Bid、Bik 和 Hrk<sup>[13]</sup>。本研究结果表明了在 HP 感染阳性胃黏膜中 Bax 的表达明显高于 HP 感染阴性胃黏膜,且 Person 相关分析 HP 感染相关胃炎程度与凋亡相关基因 Bax 表达呈明显的正相关性。Bax 是一种可溶的单体蛋白,在凋亡信号的刺激下,它将发生构象的改变而转位到线粒体的外膜上,进一步诱导凋亡的发生、发展<sup>[14]</sup>。本研究也发现 Bcl-2 的表达在 HP 感染和非感染的组织中无明显差异,提示 HP 引起胃黏膜组织细胞凋亡的分子机制主要是通过 Bax 高表达实现。有研究提示胃黏膜在癌变的不同时期,凋亡相关基因的表达也不相同<sup>[15]</sup>。在慢性胃炎时,HP 上调促凋亡基因如 Bax、Bid 等,使胃黏膜表现出凋亡增多,从而代偿性刺激细胞增殖,如果凋亡和增殖之间失去平衡,则胃黏膜就会出现萎缩、肠化生、异型增生直至癌变。通过本研究提示促凋亡基因 Bax 在 HP 感染致胃炎的病理过程中发挥着重要的致病作用,为深入研究 HP 的致病机制提供了的理论基础。

### 参考文献:

[1] Molinari M, Galli C, Norais N, et al. Vacuoles induced by

*Helicobacter pylori* toxin contain both late endosomal and lysosomal markers[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(40): 25339-25344.

- [2] Jones K, Whitmire J, Merrell D. A tale of two toxins: *Helicobacter pylori* CagA and VacA modulate host pathways that impact disease[J]. *Front Microbiol*, 2010, 23(1): 1151-1517.
- [3] 张万岱, 胡伏莲, 萧树东, 等. 中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2010, 15(5): 265-270.
- [4] Cover TL. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* [J]. *Mol Microbiol*, 1996, 20(2): 241-246.
- [5] Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis[J]. *Cell Microbiol*, 2008, 10(8): 1573-1581.
- [6] Rassow J, Meinecke M. *Helicobacter pylori* VacA: a new perspective on an invasive chloride Channel[J]. *Microbes Infect*, 2012, 14(12): 1026-1033.
- [7] Mimuro H, Suzuki T, Nagai S, et al. *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach [J]. *Cell Host Microbe*, 2007, 2(4): 250-263.
- [8] Oldani A, Cormont M, Hofman V, et al. *Helicobacter pylori* Counteracts the Apoptotic Action of Its VacA Toxin by Injecting the CagA Protein into Gastric Epithelial Cells [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(10): e1000603.
- [9] 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2013, 18(2): 119-128.
- [10] Romano M, Ricci V, Zarrilli R. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* related gastric carcinogenesis-implications for chemoprevention[J]. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2006, 3(11): 622-632.
- [11] Correa P. A human model of gastric carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 1988, 48(13): 3554-3560.
- [12] Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2012, 2(92): 92.
- [13] Rassow J. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin A and apoptosis[J]. *Cell Commun Signal*, 2011, 9: 26.
- [14] Bartchewsky J, Martini MR, Squassoni AC, et al. Effects of *Helicobacter pylori* infection on the expressions of Bax and Bcl-2 in patients with chronic gastritis and gastric cancer[J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(1): 111-116.
- [15] Matsumoto A, Isomoto H, Nakayama M, et al. *Helicobacter pylori* VacA reduces the cellular expression of STAT3 and pro-survival Bcl-2 family proteins, Bcl-2 and Bcl-XL, leading to apoptosis in gastric epithelial cells[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 4(56): 999-1006.

(收稿日期: 2014-08-08 修回日期: 2014-08-22)