

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.03.002

幽门螺杆菌感染小鼠胃黏膜组织细胞因子变化的实验研究*

韩岩智, 刘浩, 阮开学

(新疆石河子大学医学院第一附属医院消化内科 832008)

摘要:目的 研究幽门螺杆菌(简称幽门螺杆菌)感染小鼠胃黏膜组织细胞因子变化,初步探讨幽门螺杆菌感染的免疫机制。方法 选取 8~10 周龄 BALB/c 小鼠 24 只,雌雄各半,分为观察组和对照组,两组造模前均禁食 12 h,观察组以 2×10^9 CFU/mL 浓度的幽门螺杆菌菌液 0.5 mL/d 灌胃,连续 7 d。对照组灌胃给生理盐水,0.5 mL/d,连续 7 d,进行幽门螺杆菌感染小鼠胃黏膜造模。采用实时定量荧光 PCR(Real-time PCR)检测检测感染 2、4 周后,小鼠血浆中 γ 干扰素(IFN- γ)、重组建构人肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-8(IL-8)以及 IL-10 mRNA 的表达量,并于感染 4 周后,处死小鼠,无菌取各组小鼠的胃组织,采用酶联免疫吸附试验夹心法检测胃黏膜组织中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 及 IL-10 蛋白的水平。结果 两组小鼠感染 2 周后,观察组 IL-8 高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。感染 4 周后,IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 的 mRNA 及蛋白表达量均明显上升,但观察组上升幅度明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 TH2 细胞在幽门螺杆菌感染中的作用表现不明显,能促进 TH1 型细胞细胞因子的表达,引发 TH1 为主的免疫反应。

关键词:螺杆菌,幽门;胃黏膜;细胞因子类;感染

中图分类号:R332

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)03-0293-02

Experimental study of cytokines in gastric mucosa of mice with *Helicobacter pylori* infection*

Han Yanzhi, Liu Hao, Ruan Kai-xue

(Department of Internal Medicine, the First Affiliated Hospital of Shihezi Medical University, Shihezi, Xinjiang 832008, China)

Abstract: Objective To study the change of cytokines in gastric mucosa of mice with *Helicobacter pylori* infection and explore the immune mechanism. Methods Twenty-four 8-10 weeks-old BALB/c mice were randomly divided into observation group and control group. After first 12 hours of fasting, observation group was given 0.5 mL/d *Helicobacter pylori* bacterial liquid with concentration of 2×10^9 CFU/mL for 7 consecutive days. The control group was fed with 0.5 mL/d saline for 7 consecutive days. Then the mice were infected with *Helicobacter pylori* gast model was established. Using Real-time PCR to detect the expressions of IFN- γ , TNF- α , IL-8 and IL-10 in murine plasma within 2, 4 weeks after infection. And after 4 weeks of infection, mice were sacrificed, and their stomach tissue sterile were separated. ELISA was used to detect the levels of IFN- γ , TNF- α , IL-8, and IL-10 mRNA in gastric mucosa. Results There was significantly difference between groups 2 weeks after infection ($P < 0.05$). With lastingness of infection, the expression and the mRNA of IFN- γ , TNF- α , IL-8 were significantly increased, and the rate of increase of observation group was higher ($P < 0.05$). Conclusion TH2 cells may have no effect on *Helicobacter pylori* infection in mice gastric mucosa and promote the expression of TH1-type cytokines, triggering immune response of TH1.

Key words: *Helicobacter pylori*; gastric mucosa; cytokines; infection

近年来研究发现,幽门螺杆菌(下文简称为幽门螺杆菌)与胃溃疡、胃癌的发生密切相关^[1-2]。细胞因子是指主要由免疫细胞分泌的、能调节细胞功能的小分子多肽,他们有调节机体多种细胞的生理功能,在胃肠道黏膜免疫系统中起着至关重要的调控作用^[3-4]。本研究采用 8~10 周龄 BALB/c 小鼠 12 只,灌胃给幽门螺杆菌菌液,连续 7 d,进行造模。之后采用实时定量荧光 PCR(Real-time PCR)检测感染 2、4 周后各小鼠部分细胞因子 mRNA 的变化及酶联免疫吸附试验夹心法检测感染 4 周后小鼠胃黏膜组织中部分细胞因子蛋白的表达量。本文初步探讨了幽门螺杆菌感染的免疫机理,旨在为幽门螺杆菌的预防及治疗提供部分理论依据和重要参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取 8~10 周龄 BALB/c 小鼠 24 只,雌雄各 12 只,体质量 18~22 g。分为观察组和对照组,每组 12 只。各组小鼠在周龄、体质量、性别构成比以及灌胃给药操作等方面差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),说明两组小鼠具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 造模方法 两组造模前均禁食 12 h,观察组 BALB/c 小鼠灌胃给 2×10^9 CFU/mL 浓度的幽门螺杆菌菌液,0.5 mL/d,连续 7 d;对照组灌胃给生理盐水,0.5 mL/d,连续 7 d^[3]。之后正常饲养,自由饮食饮水。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(49201065)。 作者简介:韩岩智(1981-),主治医师,硕士,主要从事消化内科及消化疾病内镜诊疗方向研究。

1.2.2 检测血浆中 γ 干扰素 (IFN- γ)、重组改构人肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-8 (IL-8) 以及 IL-10 的表达量 感染 2 周后, 从各组小鼠眼眶静脉丛采集小鼠的血液, 感染 4 周后, 采集小鼠的血液, 并处死小鼠, 无菌条件下取各组小鼠的胃黏膜组织。将血液样本进行离心 3 500 r/min。采用 Real-time PCR 检测感染 2、4 周后, 小鼠血浆中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 以及 IL-10 mRNA 表达量。操作方法: 首先, 血浆总 RNA 的提取, 进行逆转录; 其次, 将得到的 cDNA 后进行荧光 PCR 扩增。采用酶联免疫吸附试验夹心法检测胃黏膜组织中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 以及 IL-10 蛋白的水平。取胃黏膜组织, 匀浆, 取上清液。仪器使用酶标仪, 实验操作步骤严格按照试剂盒上的说明进行。

1.2.3 观察指标 幽门螺杆菌感染小鼠胃黏膜的造模后, 分别检测感染 2、4 周后小鼠血浆中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 以及 IL-10 mRNA 的表达量, 以及感染 4 周后, 检测胃黏膜组织中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 以及 IL-10 蛋白的水平。

1.3 统计学处理 采用软件 SPSS15.0 进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 感染 2 周后, 两组小鼠血浆中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 以及 IL-10 的 mRNA 表达量 感染 2 周后, 将两组小鼠血浆中的 IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 以及 IL-10 mRNA 表达量进行比较, 观察组 IL-8 mRNA 的表达量, 明显高于对照组, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 感染 2 周后血浆中各指标表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL, $n = 12$)

组别	IFN- γ	TNF- α	IL-8	IL-10
观察组	95.2 \pm 23.9	87.2 \pm 38.1	781.6 \pm 52.3	823.5 \pm 67.2
对照组	94.1 \pm 17.6	91.9 \pm 27.6	231.1 \pm 21.0	798.1 \pm 87.2
t	1.012	1.317	12.671	0.275
P	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05

2.2 感染 4 周后, 两组小鼠血浆中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 以及 IL-10 的 mRNA 表达量 感染 4 周后, 将两组小鼠血浆中的 IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 以及 IL-10 mRNA 表达量进行比较, IFN- γ 、TNF- α 以及 IL-8 的表达量, 观察组明显高于对照组, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 感染 4 周后血浆中各指标表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL, $n = 12$)

组别	IFN- γ	TNF- α	IL-8	IL-10
观察组	432.1 \pm 81.2	587.2 \pm 38.2	3 204.0 \pm 78.9	819.4 \pm 98.1
对照组	101.2 \pm 34.2	101.9 \pm 27.6	239.6 \pm 21.9	781.9 \pm 96.3
t	7.174	9.157	10.457	11.093
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.3 感染 4 周后, 两组小鼠胃黏膜组织中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 以及 IL-10 蛋白水平 感染 4 周后, 将两组小鼠胃黏膜组织中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 以及 IL-10 蛋白的水平进行比较, 观察组 IFN- γ 、TNF- α 以及 IL-8 蛋白的水平明显高于对照组, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 感染 4 周后胃黏膜组织中各指标蛋白水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL, $n = 12$)

组别	IFN- γ	TNF- α	IL-8	IL-10
观察组	1.3 \pm 0.7	1.2 \pm 0.2	2.1 \pm 0.3	1.3 \pm 0.1
对照组	0.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2	0.4 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2
t	3.234	2.872	4.891	0.678
P	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

3 讨论

幽门螺杆菌是一种呈 S 形或弧形弯曲状的微需氧细菌, 呈革兰染色阴性^[5-6], 寄生于胃黏膜上皮表面及胃内黏膜层腹腔中。有研究发现, 幽门螺杆菌是慢性胃炎和消化性溃疡的重要致病因素之一^[7-9]。本文分析了幽门螺杆菌感染小鼠胃黏膜组织细胞因子变化, 初步探讨了幽门螺杆菌感染的免疫机制。

本组资料首先进行幽门螺杆菌感染小鼠胃黏膜组织造模, 结果显示, 各组小鼠感染 2 周后, 观察组小鼠血浆中 IFN- γ 、TNF- α 以及 IL-10 mRNA 表达量和对照组小鼠血浆比较差异无统计学意义, 仅 IL-8 明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。感染 4 周后, 观察组小鼠血浆中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 以及 IL-10 的 mRNA 表达量明显高于对照组。观察组胃黏膜组织中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 以及 IL-10 mRNA 的表达量明显高于对照组。感染 4 周后, 观察组胃黏膜组织中 IFN- γ 、TNF- α 、以及 IL-8 蛋白水平明显高于对照组。

由于 IFN- γ 能够增强各种炎症细胞如巨噬细胞、中性粒细胞的活性。TNF- α 、IL-8 均有很强的抗炎活性^[10-11]。同时 TNF- α 能够正向调节 IL-8 的产生。IL-8 具有强大的多形核细胞趋化性及激活的功能^[12-13]。但感染 4 周后, 无论是血浆中的 IL-10 mRNA 表达量还是胃黏膜组织中 IL-10 蛋白的水平与对照组相比较, 均无明显变化。表明 IL-10 在幽门螺杆菌感染小鼠胃黏膜中上升不明显, 说明幽门螺杆菌感染对 TH2 型细胞因子表达无明显作用^[14-15]。综上所述, 幽门螺杆菌感染小鼠胃黏膜组织, 对 TH2 细胞作用表现不明显, 但能促进 TH1 型细胞因子的表达, 引发 TH1 为主的免疫反应。

参考文献:

- [1] Gray BM, Fontaine CA, Poe SA, et al. Complex T cell interactions contribute to Helicobacter pylori gastritis in mice[J]. Infect Immun, 2013, 81(3): 740-52.
- [2] 陈秀英, 沈洲立, 鲁厚胜, 等. 幽门螺杆菌感染与胃食管反流病病程相关性研究[J]. 重庆医学, 2014, 43(8): 913-914.
- [3] 戚红霞, 李晓虹, 袁亚, 等. 胃癌组织 cagA 阳性幽门螺杆菌感染与环氧化酶-2 的关系[J]. 重庆医学, 2013, 42(26): 3087-3088.
- [4] Sintara K, Thong-Ngam D, Patumraj S, et al. Curcumin suppresses gastric NF- κ B activation and macromolecular leakage in Helicobacter pylori-infected rats[J]. World J Gastroenterol, 2011, 16(32): 4039-4046.
- [5] 熊瑛, 陈嘉熠, 吴丽虹等. 幽门螺杆菌感染与非甾体抗炎药对消化性溃疡发病的影响[J]. 重庆医学, 2012, 41(26): 2744-2745, 2754.
- [6] Shibata W, Hirata Y, Yoshida H, et al. (下转第 298 页)

2013,(8):3270-3272.

- [2] 刘大风,冉兴无,王林,等.病毒性肝炎合并糖尿病的流行病学特征分析[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6(2):121-124.
- [3] Qiu NC, Zhang Q, Song X, et al. Impact of the hepatic branch of the vagus and Roux-en-Y gastric bypass on the hypoglycemic effect and glucagon-like peptide-1 in rats with type 2 diabetes mellitus[J]. *J Surg Res*, 2014, 191(1):123-129.
- [4] Kalra S, Vithalani M, Gulati G, et al. Study of prevalence of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in type 2 diabetes patients in india (SPRINT)[J]. *J Assoc Physicians India*, 2013, 61(7):448-453.
- [5] 吴娟,胡乃中.肝硬化合并糖尿病临床、预后和糖代谢指标的观察研究[J].中华消化杂志,2013,33(9):601-605.
- [6] Hu N, Hu M, Duan R, et al. Increased levels of fatty acids contributed to induction of hepatic CYP3A4 activity induced by diabetes-in vitro evidence from HepG2 cell and Fa2N-4 cell lines[J]. *J Pharmacologic Sci*, 2014, 124(4):433-444.
- [7] Holstein A, Hinze S, Thiessen E, et al. Clinical implications of hepatogenous diabetes in liver cirrhosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17(6):677-681.
- [8] Bhattacharya S, Bank S, Maiti S, et al. The control of Hyperglycemia by estriol and progesterone in alloxan induced type I diabetes mellitus mice model through hepatic insu-

lin synthesis[J]. *Int J Biomed Sci*, 2014, 10(1):8-15.

- [9] 李冰昱,周少雄,谢伟贤,等.慢性乙型肝炎与肝硬化所致肝源性糖尿病患者肝纤四项与胰岛素抵抗的相关性分析[J].实用医学杂志,2013,29(17):2803-2805.
- [10] Jenks SJ, Conway BR, Hor TJ, et al. Hepatic steatosis and non-alcoholic fatty liver disease are not associated with decline in renal function in people with type 2 diabetes[J]. *Diabet Med*, 2014, 31(9):1039-1046.
- [11] Winhofer Y, Krššák M, Wolf P, et al. Hepatic rather than cardiac steatosis relates to glucose intolerance in women with prior gestational diabetes[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e91607.
- [12] 涂盛,邵安文,叶真,等.肝源性糖尿病发病机制研究进展[J].中华肝脏病杂志,2014,22(1):78-80.
- [13] Liang J, Wang Y, Li H, et al. Combination of diabetes risk factors and hepatic steatosis in Chinese; the Cardiometabolic Risk in Chinese (CRC) Study[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e91011.
- [14] Sheldon RD, Laughlin MH, Rector RS. Reduced hepatic eNOS phosphorylation is associated with NAFLD and type 2 diabetes progression and is prevented by daily exercise in hyperphagic OLETF rats[J]. *J Appl Physiol*, 2014, 16(9):1156-1164.

(收稿日期:2014-09-25 修回日期:2014-11-01)

(上接第 294 页)

NF- κ B and ERK-signaling pathways contribute to the gene expression induced by cag PAI-positive-Helicobacter pylori infection[J]. *World J Gastroenterology*, 2005, 11(39):6134-6143.

- [7] Conteduca V, Sansonno D, Lauletta G, et al. H. pylori infection and gastric cancer; state of the art (review)[J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(1):5-18.
- [8] Kirikoshi H, Sekihara H, Katoh M, et al. Up-regulation of WNT10A by tumor necrosis factor alpha and Helicobacter pylori in gastric cancer. [J]. *Int J Onco*, 2001, 19(3):533-536.
- [9] Adler I, Muiño A, Aguas S, et al. Helicobacter pylori and oral pathology; relationship with the gastric infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(29):9922-9935.
- [10] Mehmet K, Ozan B, Muhammed A, et al. Helicobacter pylori in primary gastric lymphoma and gastric cancer: a clinicopathologic and prognostic assessment[J]. *J Micr Infect Dis*, 2013, 3(2):45-47.
- [11] Wen S, So Y, Singh K, et al. Promotion of cytoplasmic mi-

slocalization of p27 by Helicobacter pylori in gastric cancer[J]. *Oncogene*, 2012, 31(14):1771-1780.

- [12] Otani K, Tanigawa T, Watanabe T, et al. Toll-like receptor 9 signaling has anti-inflammatory effects on the early phase of Helicobacter pylori-induced gastritis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 426(3):342-349.
- [13] Noto JM, Khizanishvili T, Chaturvedi R, et al. Helicobacter pylori promotes the expression of Krüppel-like factor 5, a mediator of carcinogenesis, in vitro and in vivo[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e54344.
- [14] Peterson RA. Regulatory T-cells; diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression[J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40(2):186-204.
- [15] Ruiz VE, Sachdev M, Zhang S, et al. Isolating, immunophenotyping and ex-vivo stimulation of CD4⁺ and CD8⁺ gastric lymphocytes during murine Helicobacter pylori infection[J]. *J Immunol Methods*, 2012, 384(1/2):157-163.

(收稿日期:2014-09-08 修回日期:2014-11-21)