

幽门螺杆菌感染对胃癌及其癌前病变组织中胃泌素和CCK-B receptor表达的影响

唐卓斌, 唐海燕, 刘为纹

唐卓斌, 中国人民解放军254医院消化科 天津市 300142
唐海燕, 广东省东莞市厚街医院中医科 广东省东莞市 523945
刘为纹, 中国人民解放军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254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*)感染对胃黏膜癌变过程中胃泌素及受体CCK-BR基因转录和蛋白表达的影响, 探讨*H pylori*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*, 应用免疫组织化学和RT-PCR技术检测萎缩性胃炎51例, 18例肠上皮化生18例, 异型增生15例和胃癌组织37例中的胃泌素及受体CCK-BR蛋白和mRNA表达情况。

结果: 胃泌素mRNA和蛋白在*H pylori*阳性的萎缩性胃炎中的表达显著低于*H pylori*阴性的萎缩性胃炎(0.32 ± 0.09 vs 0.51 ± 0.12 , 26.79 ± 3.61 vs 32.80 ± 2.24 , $P < 0.01$), CCK-BR mRNA在*H pylori*阳性的萎缩性胃炎、肠化生、异型增生及胃癌中的表达与*H pylori*阴性组比较无明显变化。

结论: *H pylori*感染可以抑制萎缩性胃炎组织中的胃泌素mRNA和蛋白表达, 这可能是*H pylori*感染导致慢性胃炎的重要机制之一。*H pylori*感染在胃癌发生过程中, 主要作用于胃癌发生的早期阶段—萎缩性胃炎, 可能起着启动因子的作用。

唐卓斌, 唐海燕, 刘为纹. 幽门螺杆菌感染对胃癌及其癌前病变组织中胃泌素和CCK-B receptor表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(4):551-552
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/551.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)已被列为I类致癌因子^[1], 是慢性胃炎、胃癌的主要病因, 但其确切的致病机制尚不完全清楚. 胃癌的发生与胃泌素(gastrin)和cholecystokinin-B receptor(CCK-BR)基因有关^[2-3]. *H pylori*感染对胃黏膜癌变过程中胃泌素及CCK-BR表达影响的研究少见^[4]. 为此, 我们采用免疫组织化学染色及RT-PCR方法研究*H pylori*感染对胃黏膜癌变过程中胃泌素及其受体CCK-BR基因转录和蛋白表达的影响, 并分析其在胃癌发生过程中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 1998/1999年胃镜活检标本及胃癌手术切除新鲜标本共121例, 含慢性萎缩性胃炎51例, 肠上皮化生18例, 异型增生15例, 胃癌37例. 胃镜活检标本均取自胃窦部, 手术标本取自于行胃大部切除根治术的胃癌患者. 胃癌患者在手术前均未接受化疗或免疫治疗. 所有标本均经HE染色病理诊断证实. 兔抗人胃泌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, 胃泌素引物序列: F:5' CAGCGACTATGTGTGTATGT 3' R:5' TTCTTGGACGGGTCTGCCAC 3' 产物长度221 bp. CCK-BR引物序列: F:5' CTCTCGCGAGCTCTACTTAG 3' R:5' ACGATCACCAGCAACATTCG 3' 产物长度294 bp. 看家基因(GAPDH)引物序列: F:5' CCACCATGGCAAATTCATGGCA 3' R:5' TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCAC 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 所有病例均进行快速尿素酶试验、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. 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gastrin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gastrin染色阳性细胞数, 结果以均数±标准差(mean ± SD)表示. 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, 以确定完整性及其含量. 反应体系如下: 5 × Buffer 5 μL, MgSO₄ 1 μL, dNTP 0.5 μL, Primer mix 1.5 μL, AMV 0.5 μL, Tf1 0.5 μL, 模板RNA 1 μL, 加灭菌水至终体积25 μL. 在PCR扩增仪(Perkin Elmer 480)上48℃ 45 min将RNA逆转录成cDNA, 然后94℃预变性2 min, 均扩增35个循环, 反应条件为94℃变性30 s, 58℃退火40 s, 68℃延伸1 min, 最后68℃延伸7 min. 取目的基因5 μL和各自相应的GAPDH的PCR产物5 μL在15 g/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

表1 *H pylori*感染对胃癌前病变及胃癌组织中 gastrin 和 CCK-BR 表达的影响

分组	<i>H pylori</i> (-)		<i>H pylori</i> (+)		<i>H pylori</i> (-)		<i>H pylori</i> (+)		<i>H pylori</i> (-)		<i>H pylori</i> (+)	
	n	Gastrin 蛋白	n	Gastrin 蛋白	n	Gastrin mRNA	n	Gastrin mRNA	n	CCK-BR mRNA	n	CCK-BR mRNA
萎缩性胃炎	10	32.80 ± 2.24	41	26.79 ± 3.61 ^b	10	32.80 ± 2.24	41	26.79 ± 3.61 ^b	10	32.80 ± 2.24	41	26.79 ± 3.61
肠化生	7	24.00 ± 2.50	11	25.20 ± 2.20	7	24.00 ± 2.50	11	25.20 ± 2.20	7	24.00 ± 2.50	11	25.20 ± 2.20
异型增生	6	21.50 ± 2.00	9	20.22 ± 2.47	6	21.50 ± 2.00	9	20.22 ± 2.47	6	21.50 ± 2.00	9	20.22 ± 2.47
胃癌	14	39.21 ± 2.96	23	40.90 ± 3.05	14	39.21 ± 2.96	23	40.90 ± 3.05	14	39.21 ± 2.96	23	40.90 ± 3.05

^b $P < 0.01$ vs *H pylori* (-).

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 所有数据均采用 SPSS10.0 统计软件进行 *t* 检验. $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

在 51 例萎缩性胃炎组织中, *H pylori* 阳性 41 例, *H pylori* 阴性 10 例, *H pylori* 感染率为 80.4%。18 例肠化生组织中, *H pylori* 阳性 11 例, *H pylori* 阴性 7 例, *H pylori* 感染率为 61.1%。15 例异型增生组织中, *H pylori* 阳性 9 例, *H pylori* 阴性 6 例, *H pylori* 感染率为 60.0%。37 例胃癌组织中, *H pylori* 阳性 23 例, *H pylori* 阴性 14 例, *H pylori* 感染率为 62.2%。萎缩性胃炎、肠化生、异型增生和胃癌组织中 *H pylori* 感染率均无显著性差异。胃泌素蛋白阳性反应物质呈棕黄色, 位于细胞内。胃泌素基因在不同胃黏膜病变中有不同程度的表达。*H pylori* 阳性组萎缩性胃炎组织中的 gastrin mRNA 和蛋白表达显著低于 *H pylori* 阴性组 ($P < 0.01$), *H pylori* 阳性组肠化生、异型增生和胃癌组织中的 gastrin mRNA 和蛋白表达与 *H pylori* 阴性组比较均无显著性差异(表 1)。CCK-BR mRNA 在 *H pylori* 阳性的萎缩性胃炎、肠化生、异型增生及胃癌组织中的表达与 *H pylori* 阴性组比较无明显变化(表 1)。

3 讨论

在胃黏膜癌变过程中, *H pylori* 的毒素和有损作用的酶以及 *H pylori* 诱导的黏膜炎症反应均能造成胃黏膜屏障的损伤, 使胃上皮细胞的不稳定性增加, 从而增加患胃癌的危险性^[5-6]。但 *H pylori* 致胃癌的确切发病机制尚不完全清楚。胃癌的发生与 gastrin 和 CCK-BR 基因有关^[2-3]。*H pylori* 感染是否通过影响 gastrin 及其受体 CCK-BR 基因的表达参与胃癌的发生和发展尚不清楚。因此, 我们对胃癌前病变及胃癌组织中 *H pylori* 感染与 gastrin 及其受体 CCK-BR 基因的关系进行了研究。研究发现 gastrin mRNA 和蛋白在 *H pylori* 阳性的萎缩性胃炎中的

表达显著低于 *H pylori* 阴性组。而 gastrin mRNA 和蛋白在 *H pylori* 阳性的肠化生、异型增生和胃癌中的表达与 *H pylori* 阴性组比较无明显变化。CCK-BR mRNA 在 *H pylori* 阳性的胃癌前病变和胃癌组织中的表达与 *H pylori* 阴性组比较无明显变化。这种变化规律表明, *H pylori* 只在胃黏膜癌变的早期阶段 - 萎缩性胃炎, 抑制 gastrin mRNA 和蛋白表达, 而对胃黏膜癌变过程中的胃泌素受体 CCK-BR mRNA 表达无明显作用。*H pylori* 感染可能通过抑制 gastrin mRNA 和蛋白表达, 使 gastrin 对胃黏膜和壁细胞的营养作用减弱, 从而导致腺体萎缩加重, 泌酸功能下降, 形成恶性循环, 从而增加胃癌发生的危险性。Kuipers *et al*^[7] 发现长期的 *H pylori* 感染会导致萎缩和肠化生的发生, 即肠化生和黏膜萎缩病变以在 *H pylori* 阳性者多见, 提示 *H pylori* 感染在胃癌发生的早、中期起着促使黏膜固有腺体萎缩、上皮肠化, 继而发生上皮异型增生的启动作用。这与我们的研究结果基本一致。

我们的研究表明 *H pylori* 感染可以抑制萎缩性胃炎组织中的胃泌素 mRNA 和蛋白表达, 这可能是 *H pylori* 感染导致慢性胃炎的重要机制之一。*H pylori* 感染在胃癌发生过程中, 主要作用于胃癌发生的早期阶段 - 萎缩性胃炎, 可能起着启动因子的作用。

4 参考文献

- 1 Kuipers EJ, Meuwissen SG. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996;218:103-105
- 2 Okada N, Kubota A, Imamura T, Suwa H, Kawaguchi Y, Ohshio G, Seino Y, Imamura M. Evaluation of cholecystokinin, gastrin, CCK-A receptor, and CCK-B/gastrin receptor gene expressions in gastric cancer. *Cancer Lett* 1996;106:257-262
- 3 唐卓斌, 刘为纹. 胃黏膜癌变过程中胃泌素、生长抑素蛋白表达及其意义. *中华消化杂志* 2001;21:693-694
- 4 Konturek PC, Hartwich A, Zuchowicz M, Labza H, Pierzchalski P, Karczewska E, Bielanski W, Hahn EG, Konturek SJ. *Helicobacter pylori*, gastrin and cyclooxygenases in gastric cancer. *J Physiol Pharmacol* 2000;51(4 Pt 1):737-749
- 5 胡伏莲, 周殿元, 贾博琦. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 第 1 版. 北京: 中国科学技术出版社, 1997:48-51
- 6 刘海峰, 刘为纹, 房殿春. 胃癌及其胃癌前病变中细胞凋亡与细胞增生间关系的研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:649-651
- 7 Kuipers EJ, Uytendaele AM, Pena AS, Roosendaal R, Pals G, Nelis GF, Festen HP, Meuwissen SG. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet* 1995;345:1525-1528