维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0277-04

幽门螺杆菌致 BALB/c 小鼠胃粘膜内肥大细胞及其脱颗粒变化的研究

吕 静,李 惠,蔡 涛

(重庆医科大学附属第一医院皮肤科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨幽门螺杆菌(Helicobacter pylori,*Hp*)对小鼠胃粘膜内肥大细胞(Mast cells,MC)及其脱颗粒的影响,从而证明 *Hp* 在慢性荨麻疹(Chronic urticaria,CU)的发病过程中的重要作用。方法:50 只健康 BALB/c 小鼠随机分成 2 组,*Hp* 组 30 只,每间隔 3d 灌喂 1 次 *Hp* 菌液,共 7 次,牛血清白蛋白(Bovine albnmin serum,BAS)为对照组,灌胃 2%的 BAS,灌喂方式同上。用甲苯胺蓝染色法测定灌胃后老鼠胃粘膜内 MC 总数及脱颗粒的百分比,每片连续计数 10 个高倍视野的 MC,结果以个数/高倍视野表示,脱颗粒 MC 比值以脱颗粒 MC 总数/MC 总数表示,并与对照组比较。结果:2 组小鼠胃粘膜 MC 总数间的差异有统计学意义(100.0 比 30.7,$P<0.01$);脱颗粒 MC 总数间的差异有统计学意义(48.85 比 6.51,$P<0.01$);脱颗粒 MC 百分比之间的差别有统计学意义(50%比 23%,$P<0.01$)。结论:*Hp* 感染可导致小鼠胃粘膜 MC 总数增加,并且脱颗粒 MC 所占的比例亦显著增加,从而释放组胺和一系列血管活性介质到外周血,这可能与导致临床上的红斑、风团等荨麻疹的典型表现有关

【关键词】幽门螺杆菌;慢性荨麻疹;肥大细胞;脱颗粒

【中国图书分类法分类号】R75 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-02

Research on mast cells and degranulation changing in BALB/c mice gastric mucosal induced by helicobacter pylori

LV Jing,et al

(*Depatment of Dermatology,the First Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To search the impact of helicobacter pylori infection in changes of mice gastric mucosa mast cells and degranulation process,therefore to establish the important role of *Hp* in the pathogenesis of chronic urticaria. *Methods*:50 BALB/c healthy mice were randomized into two groups:*Hp* group,consist of 30 mice,were given *Hp* liquid every 3 days for total 7 times. Bovine albumin serum(BAS) as control group,was given BAS 2% with the same way as *Hp* group. Toluidine blue staining of the gastric mucosa was used to assess the total number of mast cells,the amount of degranulated mast cells and the percentage of degranulation after feeding. Each slide was consecutive count with 10 high-power fields for mast cells; results express with number of mast cells/ high power field,the ratio of degranulated mast cell was expressed by the amount of degranulated mast cells/ total of mast cells. At the same time compared with the control group. *Results*:There was significant statistical difference in the total number of mast cells between the tow groups(100.0vs0.7,$P<0.01$);total degranulated mass cells among two groups had a statistic significant different(48.85vs6.51,$P<0.01$);degranulated mast cell percentage among two groups had a statistic significant different(50%vs23%,$P<0.01$). *Conclusion*:*Hp* infection increases the number of gastric mucosa' mast cells,also significantly increases degranulated mass cells proportion,thus release histamine and a series of vascular activation transmitter to peripheral circulation that may cause a vascular mucosa dilation,wheal,etc. A typical urticaria sign.

【Key word】Helicobacter pylori;Chronic urticaria;Mast cells;Degranulation

CU 是严重影响患者生活质量的皮肤科常见的变态反应性疾病,主要表现为风团反复发作伴剧烈瘙痒,病程持续 6 周以上。症状的产生为 MC 和嗜碱性粒细胞活化后释放组胺,合成和分泌化学介质、细胞因子所引起。本病对患者生活、工作及情绪影响较大[1],且由于大多数病因不明而被认为是"特发性",一般抗组胺药效果差。因此寻找 CU 病因,研究其发病机制,是目前皮肤病学领域的热点和难点。

作者介绍:吕 静(1982-),女,硕士,
研究方向:皮肤变态反应性疾病。

通讯作者:李 惠,女,主任医师,E-mail:lihui131128@vip.163.com。

基金项目:重庆市卫生局科研项目(20042106)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

近年来研究发现，*Hp* 与众多皮肤病相关，其中引人关注的是其可能成为部分CU 反复发作的原因。但目前国内外的研究多停留于临床相关性阶段，而对 *Hp* 致 CU 发病机制的研究甚少。因此进一步深入研究其致病机制显得尤为重要。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级动物 BALB/c 小鼠 50 只，6～8 周龄，体重 17～20g，雌雄各半，无感染史。随机分为 2 组：试验组 30 只×1 组，对照组 20 只×1 组。饲养于重庆医科大学微生物教研室动物房，清洁喂养。

1.1.2 菌株 *Hp* 使用标准菌株 NC11637(VacA+ CagA+)，由重庆医科大学微生物教研室惠赠。*Hp* 培养：NC11637 用 280g/LBBL(Brucella broth)0.5ml 溶解，接种于含有 50ml/L 脱纤维绵羊血液及添加剂的基础琼脂培养基上，在微需氧，80ml/L CO_2 浓度，一定湿度下，36℃孵育 48～72h 后进行增菌培养。*Hp* 增菌后用接种环将培养 3d 的 *Hp* 菌落刮下，重悬于 *Hp* 保种液中。

1.1.3 感染剂量 活化后的 *Hp* 标准菌株用哥伦比亚血琼脂培养基平板培养 3d，0.5%的糖水洗下，据 Mcfarland 比浊管工作曲线配置 2×10^9CFU/ml 菌悬液。

1.2 方法

1.2.1 试验仪器 超低温冰箱(美国 Thermo 公司)；光学显微镜、光学显微镜照相系统(日本 Olympus 公司)；恒温振荡仪(德国 RosilooTM 公司)；RM2135 石蜡切片机(德国 LEICA 公司)；BMJ-Ⅲ病理包埋机(常州中威医疗器械有限公司)。

1.2.2 主要试剂 无菌绵羊血购自杭州新锐生物工程有限公司；*Hp* 测定仪专用试剂盒购自深圳伯劳特生物制品有限公司(内容物包括：浓缩洗涤液 25ml×2，成分为磷酸缓冲液，含 8%吞吐；酶联试剂 0.5ml×1，成分为过氧化物酶标记羊抗人 IgG，效价 1:50；显色剂 A 液 25ml×1，成分为 3,3-二氨基联苯胺，0.07%；显色剂 B 液 25ml×1，成分为 H_2O_2，1%；终止液 25ml×1，成分为 H_2SO_4，2mol/L；印剂薄膜 8 条/包×5 包，成分为 *Hp* 抗原印剂膜，2mm×100mm；标准带 1 张)；甲苯胺蓝由学校组胚教研室惠赠。

1.2.3 动物模型 灌胃前以三联疗法清除胃内杂菌，每只小鼠灌 1 次，药物为灭滴灵(2.6mg/只)，四环素(2.5mg/只)，丽珠得乐(1.2mg/只)。试验组动物 30 只，以 2×10^9CFU/ml 浓度的 *Hp* 菌液进行灌胃，每只每次 0.5ml，30min 以内用胃管注入 24h 绝食的 BALB/c 小鼠胃内，4h 后恢复食水供给。灌 *Hp* 之前先给予 45%酒精灌胃，以利于 *Hp* 的感染定值。每间隔 3 日灌胃一次 *Hp* 菌液，共 7 次，灌喂完成后用 *Hp* 测定仪－Autoblot System36 检测外周血中抗 *Hp* 抗体，剔除未感染成功的 9 只及死亡小鼠 1 只，试验组剩余 20 只，均为感染成功者。以 2%牛血清白蛋白灌胃对照组小鼠，共 20 只，灌喂方式同上。末次灌胃后第 10d 将 2 组小鼠全部处死，剖腹取出全胃，沿大弯切开，暴露胃粘膜，无菌生理盐水冲去胃内容物。肉眼观察胃粘膜改变，然后经 10%福尔马林固定，石蜡包埋，制成 3～4μm 的连续切片。

1.2.4 HE 染色 切片脱蜡，苏木素染色 5～15min；，1%盐酸酒精分化 30s，自来水洗 2min；0.1%～0.25%碳酸锂饱和溶液显兰 1min，自来水洗 2min，蒸馏水洗 15s；0.5%水溶性伊红染液 5min，自来水洗 2min；梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树脂封片。

1.2.5 甲苯胺兰染色 称取 0.1g 甲苯胺蓝，溶于 100ml 0.1mol/L 醋酸盐缓冲液中，置室温 5d 后即可使用。切片由二甲苯脱蜡至水，蒸馏水浸洗 3 次；0.1%甲苯胺兰液浸染 30min，水洗，洗去多余染液；直接入 95%酒精分色；1%伊红复染；梯度酒精脱水；二甲苯透明，中性树脂封片。

2 结 果

2.1 大体表本

Hp 组 胃粘膜充血、水肿，表面有灰白色或灰黄色分泌物，在幽门部及胃小弯处可见糜烂面及浅表溃疡形成

BAS 组 胃粘膜轻度充血，未见糜烂面及溃疡

2.2 HE 染色

Hp 组 粘膜浅层可见浸润的炎性细胞，主要有淋巴细胞和浆细胞。

BAS 组 粘膜浅层少量炎症细胞

2.3 肥大细胞总数及其脱颗粒情况

注：脱颗粒肥大细胞百分比＝10 个高倍镜下脱颗粒 MC 总数/MC 总数 (包括脱颗粒和未脱颗粒者)。

由表 1 可以看出，*Hp* 组在 MC 总数、脱颗粒 MC

表 1 肥大细胞总数及脱颗粒比较

	肥大细胞总数(个，$\bar{x}\pm s$)	脱颗粒肥大细胞数(个，$\bar{x}\pm s$)	※脱颗粒肥大细胞百分比(%，$\bar{x}\pm s$)
HP 组	100 ± 15.95	48.85 ± 8.20	0.50 ± 0.06
BAS 组	30.70 ± 7.88	6.51 ± 2.37	0.23 ± 0.06
	T=17.62，P<0.01	t'=22.16，P<0.01	t'=12.91，P<0.01

维普资讯 http://www.cqvip.com

总数以及脱颗粒 MC 百分比 3 个方面都较 BAS 组高,其差异均有统计学意义(注:未脱颗粒者—细胞完整,胞质均匀,胞膜清晰;脱颗粒者—胞膜破溃,颗粒涌出胞膜,细胞形状不规则)。

两组小鼠 MC 总数、脱颗粒 MC 总数及百分比比较的曲线图见下表(图 2~4)。

所有数据经正态性检验,呈正态分布的采取 T 检验,呈偏态分布的采取 t' 检验,P 取 0.01。2 组小鼠胃粘膜内 MC 总数间的差异有统计学意义(T=17.62,P<0.01);2 组小鼠脱颗粒 MC 总数间的差异有统计学意义(t'=22.16,P<0.01);2 组小鼠胃粘

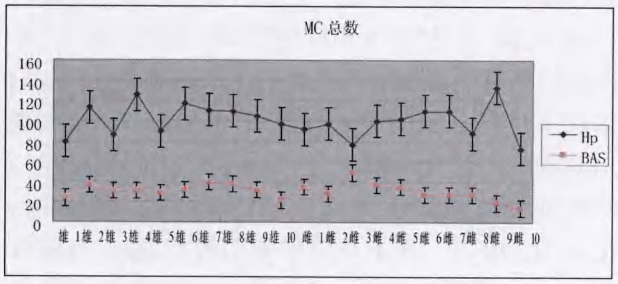


图 2 两组小鼠 MC 总数比较(个)

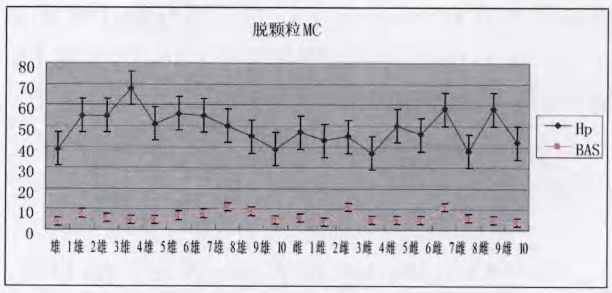


图 3 2 组小鼠脱颗粒 MC 总数比较(个)

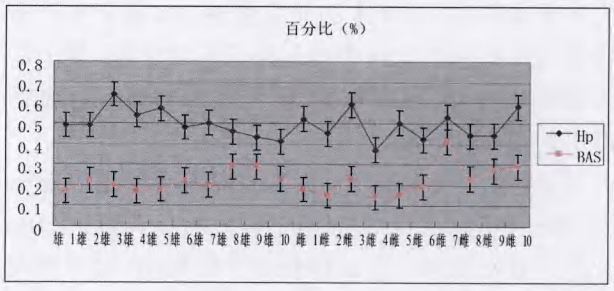


图 4 2 组小鼠脱颗粒 MC 百分比(%)

注:横坐标表示雌雄小鼠,纵坐标表示 MC 个数(图 2,图 3)或脱颗粒百分比(图 4)

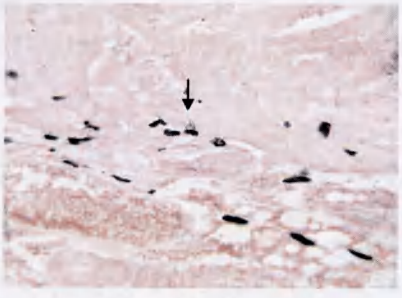


图 5

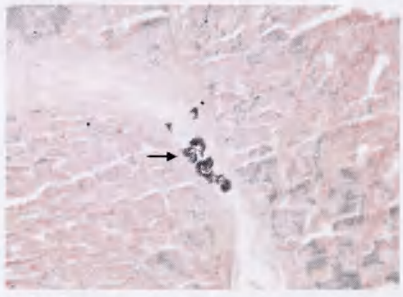


图 6

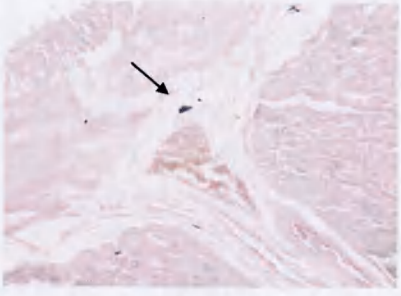


图 7

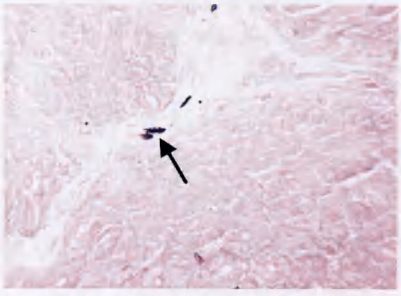


图 8

图 5 *Hp* 组雄性小鼠胃粘膜内可见 MC 主要沿小血管成群分布,细胞呈卵圆形,部分脱颗粒明显,成"火山口"样(箭头所示)(甲苯胺蓝染色 × 400)

图 6 *Hp* 组雌性小鼠胃粘膜内见 MC 成团分布,细胞成卵圆形、肾形、马蹄形,胞质内充满粗大而大小分布均匀的嗜碱性颗粒,被甲苯胺蓝染成紫红色,脱出胞外(箭头所示)(甲苯胺蓝染色 × 400)

图 7 BAS 组雄性小鼠胃粘膜内仅仅见到少量 MC,稀疏分布于小血管周围,未见明显脱颗粒。箭头所示为 MC。(甲苯胺蓝染色 × 400)

图 8 BAS 组雌性小鼠胃粘膜内亦只见到 3 个/每高倍镜视野,分布于结缔组织,呈椭圆形,脱颗粒偶见。箭头所示为 MC(甲苯胺蓝染色 × 400)

维普资讯 http://www.cqvip.com

膜中脱颗粒MC百分比之间的差别有统计学意义(t'=12.91,P<0.01),*Hp*组明显高于BAS组(见表1)。镜下亦可见到明显差别(图5~8)。

3 讨 论

自1983年Marshall和Warren发现了*Hp*以后,迅速在国际消化病学界引起了巨大轰动,它的发现对消化病学、特别是胃十二指肠病学的发展起了极大的推动作用。近年来的研究发现,*Hp*感染在许多胃肠道外疾病的发病中也起到了一定作用,其中许多皮肤病与*Hp*感染有关,研究较多的有CU、血管性水肿、酒渣鼻等。

支持CU发病与*Hp*有关的理由或证据包括[2]:(1)MC和嗜碱性粒细胞组胺释放受*Hp*调节;(2)*Hp*及其成分可引起微血管损伤和功能失调,这可诱发或(和)加重皮肤水肿或风团的形成;(3)*Hp*感染使胃肠粘膜屏障受到破坏,致进入肠道抗原或其他促炎症因子更易吸收并暴露于免疫系统而诱发或加重CU;(4)*Hp*局部的定植及由此引起的慢性炎症调节全身性免疫过程,通过产生各种介质和细胞因子扩大皮肤炎症反应的过程;(5)确有部分*Hp*抗体阳性的CU患者经抗*Hp*治疗后病情改善。

有文献报道,CU患者*Hp*感染率高,*Hp*根除后,部分患者的皮肤症状和体征可消退,国内王忠永等人[3]研究了110例CU患者的血清*Hp*-IgG浓度、消化道症状及抗*Hp*治疗的疗效,发现CU患者的血清抗体浓度明显高于正常组(P<0.01,差别有统计学意义),经抗*Hp*治疗后取得较好疗效。国外Hizal[4]检测了61例CU,结果患者的*Hp*感染率为41%,显著高于对照组(26%)。Shiotani等[5]对26例*Hp*阳性的CU患者进行*Hp*根除治疗后,73%的患者症状得到不同程度的缓解。我们曾对80例CU患者检测血清抗*Hp*-IgG,其阳性率高达68.75%,显著高于对照组(42%)。以上数据均说明*Hp*感染和CU之间确实存在联系。

在本试验中发现*Hp*感染的BALB/c小鼠其胃粘膜内MC总数、脱颗粒MC总数及脱颗粒MC百分比均明显高于阴性对照组。胃粘膜中组胺主要来源于MC,粘膜MC在胃肠道变态反应性疾病的发生发展中起着重要作用[6]。广西医科大学卢杰夫等[7]人通过动物实验发现*Hp*感染患者胃粘膜组胺含量较*Hp*阴性者降低,而外周血中其组胺含量则高于*Hp*阴性者,这可能是由于胃粘膜中组胺释放入血所致。徐克强等人[8]在研究Hp致胃炎、胃溃疡的发病机制中发现,*Hp*感染后胃粘膜中脱颗粒的MC较*Hp*阴性者明显增加(23%比3%,P<0.01),此与Hp感染的胃粘膜病理特征相符:即显著的中性粒细胞和单核细胞的侵润可能与脱颗粒MC的明显增加有关。国内相关动物实验也表明,*Hp*菌株粗提抗原注入SD大鼠胃壁后可显著刺激MC的脱颗粒数,从而释放组胺和一系列血管活性介质,引起粘膜血管的扩张及粘膜的疾病[8]。另有研究表明,*Hp*产生的VacA可以刺激MC的迁移及促炎症细胞因子的释放。国外Volaluck等人[9,10]在BALA/C小鼠身上进行VacA试验,发现VacA可以导致MC、单核细胞在24h内对胃粘膜上皮细胞的侵润。在体外的试验中他们采用了骨髓来源的肥大细胞(BMMCs),VacA表现出对MC的趋化活性。另外,VacA还诱导BMMCs产生致炎细胞因子、TNF-α、巨噬细胞炎症蛋白、IL-6、IL-10等。在本试验中采用的是*Hp*标准菌株NC11637,均表达VacA。感染成功的20只小鼠中抗VacA抗体均为阳性,其胃粘膜内MC总数及脱颗粒现象较明显。但对于*Hp*的不同亚型(如低毒力型,即不表达VacA)对MC总数及其脱颗粒影响的比较还有待于进一步试验证明。

在本试验中,成功建立了*Hp*感染的动物模型,并以BAS作为对照。分别计数其胃粘膜内MC总数和脱颗粒MC的百分比,得出差异有统计学意义的结论(P<0.01,P<0.01)。且镜下亦可见到明显差别。从发病机制的角度进一步说明了*Hp*感染确实和CU的发生有关,这和*Hp*刺激MC迁移、促炎症细胞因子释放以及促进MC脱颗粒的作用密切相关。然而并非所有感染了*Hp*的人都有CU的表现,部分病人经正规抗*Hp*治疗后荨麻疹仍无明显好转。发展中国家*Hp*感染率约为80%,发达国家为40%[11],而只有部分*Hp*感染者发生MC。造成这种反应的差异可能有以下几个原因,一个是*Hp*毒力的大小,二是人体的防御能力,三是胃粘膜通透性的改变,其中的机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 徐文严,主编.安德鲁斯临床皮肤病学[M]. 第9版.西安:科学出版社,2004.156-158.

(下转第284页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

药物治疗、物理治疗和手术治疗。药物治疗主要用于轻、中度宫颈糜烂;物理治疗适合用于各种糜烂及伴有宫颈上皮内瘤样病变(CIN)1 及 CIN2 的患者;手术治疗适用于 CIN3 及以上的患者。而已有大量的临床研究表明:聚焦超声治疗慢性宫颈炎有一定的临床优势[2,3],该技术是近年来发展起来的一种新的,无创的局部治疗手段。超声波具有良好的组织穿透性、定位性和能量沉积性,透过表层组织聚焦于特定深度的靶区组织,利用其产生的机械效应、热效应以及空化效应等生物学效应,可瞬间致病变组织损伤,使细胞膜失去连续性,在不损伤超声所经组织和临近脏器的前提下达到治疗目的[4]。因此认为:聚焦超声治疗慢性宫颈炎定位好,而且由于其采用"由里向外"的治疗方法,主要针对宫颈上皮深处的病灶,治疗后宫颈表面没有瘢痕形成。

现在临床上使用聚焦超声治疗慢性宫颈炎的停止指征,需要大量的临床操作经验;而且这些指征虽然直观、可视,但难以量化。所以对于初学者熟练掌握停止指征,有一定的难度。而观察宫颈局部变化的停止指征和组织内的超声能量的沉积是相关的。当停止指征把握不好时会产生:辐照时间过短会导致剂量过小,组织超声能量沉积不够,不能达到病变组织的有效破坏,从而就达不到有效的治疗效果;而延长辐照时间后会加大剂量,导致被辐照组织的过度破坏,从而产生过重的副反应。聚焦超声声束能够很好地在组织内聚焦成一很小的焦域,组织对声波的吸收会把声能转化成热能[5],而当辐照的其他参数一定,延长辐照时间可以升高辐照局部组织的温度。所以,可以通过测量聚焦超声辐照的局部组织的温度变化作为治疗停止的量化参考指标。这与聚焦超声生物学效应中的热效应的相关研究是一致的。综上所述:在临床操作中可以运用测温仪测量连续辐照后的宫颈表面温度作为一个量化指标与现在的停止指征联合应用,以提高聚焦超声治疗效果和减少副反应。

参 考 文 献

[1] 李 昭,张士伟,刘 静,等. 女性生殖道人乳头状瘤病毒感染与宫颈癌前病变和宫颈癌的关系[J]. 中国肿瘤临床,1999;26(2):109-112.

[2] 隋 龙,孙 红,李成志,等. 高能聚焦超声治疗宫颈糜烂的疗效[J]. 复旦大学学报(医学版),2005;32(1):95-97.

[3] 汪 炼,李成志,凌 玲. 聚焦超声治疗慢性宫颈炎的临床应用[J]. 中华超声医学杂志(电子版),2005;2(1):13-17.

[4] Wu F,Chen W Z,Bai J,et al. Tumor vessel destruction resulting from high-intensity focused ultrasound in patient with solid malignancies[J]. Ultrasound Med Biol,2002;28(4):535-542.

[5] 李发琪,张 檣,杜永洪,等.高强度聚焦超声治疗剂量对组织温升的影响[J].生物医学工程学杂志,2003;20(3):466-471.

(责任编辑:冉明会)

(上接第 280 页)

[2] 都 飞.慢性荨麻疹某些病因学问题的探讨[J]. 临床皮肤科杂志,2005;34(12):861-862.

[3] 王忠勇,邱会芬,张建明.幽门螺杆菌与慢性荨麻疹相关性研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志,2005;21(2):113-114.

[4] Hizal M,Tuzun B,wolf R,et al. The relationship between Helicobacter pylori IgG antibody and autologous serum test in chronic urticaria[J]. Int J Dematol,2000;39(6):443-445.

[5] Shiotani A,Okada K,Yanaoka K,et al. Beneficial effect of Helicobacter pylori eradication in dermatologic diseases[J]. Helicobacter,2001;6(1):60-65.

[6] Kurose I,Granger DN,Evans DJ,et al. Hp-induced microvascullar protein leakage in rates;Rols of neutrophils,mast cells and platest[J]. Gastroenterology,1994;107(1):70-79.

[7] 卢杰夫,洪瑞香.幽门螺杆菌感染患者血及胃粘膜组胺含量的变化[J]. 广西医科大学学报,2000;17(5):782-784.

[8] 徐克强,王继德.肥大细胞脱颗粒在幽门螺杆菌致病中的作用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2002;11(2):124-126,129.

[9] Volaluck S,Hiroko U. Cutting Edge:VacA,a vacuolating Cytotoxin of Hp,Directly Activates Mast cell for Migration and production of proinflammatory cytokines[J]. The Journal of immunology,2002;168(6):2603-2607.

[10] 邵世和,段秀杰,李 凡,等.幽门螺杆菌空泡毒素及其致病性[J]. 国外医学(流行病学传染病学分册),2003;30(4),236-239.

[11] Malaty HM. Epidemiolog of Helicobacter pylori infection [J]. Best pract Res Clin Gastroenterol,2007;21(2):205-214.

(责任编辑:谭乐勤)