维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)05－0694－03

幽门螺杆菌感染与胆囊结石形成的相关性分析

朱玉娟[1]，谢　健[1]，周卫东[1]，肖思洁[1]，杨　华[1]，李石沙[1]，李　燕[2]，陶传敏[3]

(1.成都三六三医院消化内科;2.四川省卫生干部管理学院;3.四川大学华西医院,成都　610041)

【摘　要】目的:研究和探讨幽门螺杆菌(Helicobacter pylori,Hp)与胆囊结石形成关系,寻找 Hp 在胆道中存在的证据,同时对胆道中 HpDNA 的检测方法进行研究和分析。方法:参照文献对 120 例胆囊结石患者胆汁、粘膜和胆石进行 Hp 培养,并以 Ure A 和 cagA 作引物进行扩增,对扩增产物进行分析。结果:120 例样本检测均为阴性结果,培养无 Hp 生长,使用 PCR 方法未检测到 Hp DNA 及 Hp CagA 抗体　结论:(1)运用 PCR 方法在胆汁和胆石中检测 HpDNA 尚受到多种因素制约。(2)Hp 可能经 Oddi's 括约肌逆行的进入胆道但与胆囊结石并无明确相关性。

【关键词】幽门螺杆菌;胆囊结石;PCR;Hp CagA

【中国图书分类法分类号】R573.6　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2005－07－30

Analyze the associativity between Helicobacter pylori infection and cholecystolithiasis

ZHU Yujuan

(*Department of Gastroenterology, 363 Hospital of Chengdu*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the relationship of H pylori with cholecystolithiasis, to collect the evidence of Hp existing in biliary tract, and to study the detective method of Hp DNA in billiary tract. *Methods*: Hp which existing in bile, mucosa and gallstone of 120 cholecystolithiasis patients were cultured according to the literature. Then they were amplified by the primer of Ure A and cagA. Amplified products were analyzed. *Results*: All of the 120 samples were negative. No Hp grew in the medium. No Hp DNA and Hp Cag A antibody were found with PCR method. *Conclusion*: (1) It was restricted by many factors that Hp DNA in bile and gallstone wereexamined with PCR. (2) Hp maybe entered biliary tract regressively through Oddi's sphincter andhad no relationship with cholecystolithiasis.

【Key words】Helicobacter pylori; Cholecystolithiasis; PCR; Hp Cag A

随着人们对幽门螺杆菌的生物特性及致病机理认识逐渐深入,有学者怀疑 Hp 可能由十二指肠逆行进入胆道并影响胆囊结石形成。因此,在胆结石患者胆汁、粘膜或胆石中培养 Hp 菌体或检测出相关产物,是表明其与胆石的形成相关的重要依据。近年来国内外均有文献报道在胆结石患者的胆汁、粘膜和胆石中通过聚合酶链反应(PCR)扩增到幽门螺杆菌 DNA 物质,但扩增后阳性率有较大差异。本研究拟通过胆汁 Hp 分离、培养、胆汁中氨肽酶活性测定以及 PCR 检测胆囊粘膜、胆汁和胆石中幽门螺杆菌特异性的 16SrRNA、urea、vagA 和 cagA 的基因,旨在进一步证实胆石患者胆囊中幽门螺杆菌存在的可能性,并探讨幽门螺杆菌感染与胆石形成的关系。

作者介绍:朱玉娟(1970－　),女,主治医师,

主要研究方向:消化系统疾病及消化内镜。

1　材料与方法

1.1　标本采集

实验标本来源为我院 2004 年 6 月～2005 年 4 月我院行腹腔镜胆囊切除术的胆囊结石病患者 120 例。其中男性 68 例,女性 52 例,年龄 20～70 岁。于手术室无菌穿刺抽取胆汁 1.5ml,同时采集胆囊结石及胆囊粘膜标本,并于无菌环境中将胆汁、胆囊结石及胆囊粘膜行细菌微需氧培养接种。

1.2　实验设备及试剂

1.2.1　Hp 标准菌株 ATCC 11639 由中国幽门螺杆菌菌株管理与保藏中心,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所提供。

1.2.2　培养基本器材　①2.5 升厌氧罐(Anaero Jar AG25)

维普资讯 http://www.cqvip.com

②微需氧产气袋(Campylobacter System)批号 350198⑧哥伦比亚琼脂基础(Columbia Agar Base)批号 347412④幽门螺杆菌选择添加剂(Helicobacter pulori Selective Supplement)批号 347443. 以上均由英国 OXOID 公司提供。

1.3 PCR 检测

1.3.1 引物序列 采用两对 Hp 引物同时检测:①Ure A 基因引物,序列如下 5' - CTCCTTAATTGTTTTTTAC - 3' 和 5' - GCCAATGGTAAATTAGTT - 3,;②cagA 基因引物,序列如下:5' - AGACAACTTGAGCGAGAAAG - 3' 和 5' - TATTGGGATTCTTGGAGGCG - 3'。引物由上海生物工程公司合成。预期扩增片段为 411bp 及 294bp。

1.3.2 模板 DNA 制备 胆囊粘膜及胆囊结石用酚 - 氯仿法提取 DNA,冷无水乙醇沉淀,②自然干燥后,加 20Ll 重的双蒸水溶解,取 5μl 作 PCR;胆汁用裂解液(含 0.1% NP40)一煮沸法提取,离心后取上清 5μl 作 PCR。

1.3.3 PCR 扩增 25μl 重反应体系含有引物各 200pmol/L,4 种 dNTP4mmol/L,DNA 模板 5μl,Taq DNA 聚合酶 1U 及 PCR 反应缓冲液。反应在 PCR Express 扩增仪(Thermo Hybaid)上进行。94℃ 预变性 5min 后,94℃ 变性 1min,55℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min,循环 35 次,72℃ 继续延伸 5min。以 Hp 标准株 ATCC 11639 DNA 提取液作为阳性对照,PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后,在紫外光下观察电泳条带并照相。

1.4 培养

1.4.1 培养基的制备 按 500g 哥伦比亚琼脂基础加入 12.8L 蒸馏水比例配制所需哥伦比亚琼脂,高压灭菌。以 1:10 比例加入无菌羊血(25ml 羊血/250ml 琼脂液)。将幽门螺杆菌选择添加剂 1 瓶加入 2ml 无菌蒸馏水,彻底溶解,将其以 1:250 比例加入含羊血琼脂中。倾注平板,制作含 Hp 选择添加剂的血平板,冷却。

1.4.2 接种及培养 于手术室无菌采集胆囊结石、胆汁及胆囊粘膜标本分别接种于血平板,将接种后的血平板放入 2.5L 厌氧罐中,按要求加入微需氧产气袋 2 袋,密封厌氧罐,37℃ 培养 4~5 天,观察血平板生长情况。

1.4.3 对照 ①以 Hp 标准株 ATCC 11639 同上方法接种培养,血平板见菌落为无明显色素、半透明,呈针尖状细小菌落。镜下为螺旋形、弯曲或直的不分枝杆菌,革兰氏阴性。经梅里埃 ATB 系统鉴定为幽门螺杆菌。②取 12 例经胃镜证实为活动性十二指肠球部溃疡患者胃窦标本,同上方法接种培养阳性 8 例。

2 结 果

120 例样本均未培养出 Hp,同时经 PCR 方法未检测出 HpDNA,120 例均为阴性。

3 讨 论

3.1 胆汁中 HpDNA 阳性率有较大差异

文献表明,国内外学者相继报道使用 PCR 检测出胆石患者胆汁中存在 HpDNA 物质[2-8,11]。

Figura 等[4]对 30 例胆囊手术患者采用 ELISA 法,检测到 23 例的血清抗 HPIgG 抗体阳性(76.7%)。对 23 例阳性标本再采用 Westemblot 进行检测,在 16 例血清抗 HP Cag A 阳性病例中,15 例胆汁也含抗 HP CagA 抗体及抗 HP IgG、A 抗体,87kD 的 VacA。同时 5 例胆汁中存在 60kD 的 CagA。

郭吕等[8]采用四对引物(Ure A, Cag A, Hp C97、C98, 16sRNA)同时进行检测,结果显示四对螺杆菌 16sRNA 基因引物中,C97、C98 及 Hp 16sRNA 检出率最高,ure A 次之,Cag A 检出率最低,分析认为不同的螺杆菌 16sRNA 基因引物可以出现不同的检测结果,可能是螺杆菌属间或不同的组织间存在差异。

但 Rudi 等[9]重复了 Fox[3]的实验,报告 50 例标本通过培养及多种螺杆菌 16srRNA 基因引物经 PCR 和 Southem 印迹法检测均无阳性,并认为两者间无明显相关性,抑或由地域差异引起。黄成等[10]也报告 111 例标本均未检出 HpDNA,并分析可能与标本 DNA 受到破坏或由于 DNA 浓度过低产生。

3.2 胆道细菌感染与结石形成的关系

胆囊结石的发生与多种因素有关,包括胆固醇浓度增高、促成石因子和抗成石因子作用失衡以及胆囊动力因素等。其中,色素性结石与胆道细菌感染关系最为密切[1]。目前认为,胆囊结石形成是由于胆汁中的胆固醇从溶液中沉淀析出,聚积形成结石。细菌感染后,胆囊粘膜和胆汁发生炎性改变,细菌产生有损害粘膜上皮的酶和有害物质,粘膜上皮增生,粘液物质增加并形成网状结构,在结石形成各个阶段都起作用[12]。此外,如大肠杆菌等细菌产生 β- 葡萄糖醛酸酶,将卵磷酯、结合胆汁酸降解为脂肪酸和游离脂肪酸,从而消耗了胆汁的胆盐和卵磷脂,使得胆固醇沉积[11]。

1982 年 Warren 和 Marshall 等首先在人体胃粘膜活检组织中分离出幽门螺杆菌。其空泡细胞毒素(Vacuolating cytotoxion, VacA)可使胃粘膜细胞发生空泡变性,使胃粘膜上皮细胞排列紊乱,腺腔结构破坏,从而诱导和引发胃粘膜疾病,并可能与胃癌有关。而细胞毒素相关蛋白(Cytotoxin - associated

维普资讯 http://www.cqvip.com

protein, CagA)是 Hp 产生空泡毒素的标志。随着国内外相继报道在胆汁中检测出 HpDNA,有关学者开始研究和证实 Hp 在胆结石发病机制中的作用,但由于检测差异较大,且无证据表明 Hp 可直接或通过复杂的机制间接促进胆结石的形成,因此仍尚无明确结论。

3.3 HP 与胆囊结石形成相关性探讨

众多学者报道在胆汁和胆囊组织中检测到 HpDNA,但在门静脉血中未检测出,说明该菌是经 Oddi 氏括约肌逆流进入胆道。迄今为止尚无学者在胆汁中培养出 Hp。

胆结石的形成与细菌感染及促成核糖蛋白有关。成核活性糖蛋白含量增加,胆固醇结晶的形成加速。有众多学者认为高分子量糖蛋白更具有促成核活性,同时报道 130kD 及 200kD 糖蛋白具有更强的促成核活性。有研究[5]发现胆石症患者胆汁中含有分子量为 13 万的蛋白质,它具有氨肽酶的活性,能促使胆固醇结晶形成胆结石,而幽门螺杆菌也存在氨肽酶,因此有学者认为 Hp 的代谢产物可能是促进胆石形成的危险因素[13]。

综上所述,对 HpDNA 的阳性检测结果可证明胆囊结石、胆汁或粘膜中有 HpDNA 存在,但其在众多学者多次检测结果中表现出的较大差异除由检测设备及样本因素影响外,可能也和 Hp 与胆囊结石两者之间并无直接相关性有关。因此认为,幽门螺杆菌感染与胆囊结石的产生和形成并无明确关联,但该菌及其代谢产物是否可以通过其他途径影响体内各种酶类和激素,间接导致包括胆固醇改变和胆道动力学改变等途径促进结石产生,还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Lee DK, Tarr PI, Haigh WG, et al. Bectenisl DNA in mixed cholesterol gallstones[J]. Am J Gastroenterol, 1999;94:3502-3506.

[2] Lin TT, Yeh CT, Wu CS, et al. Detection and partial sequence analysis of Helicobacter pylori DNA in the bile samples [J]. Dig Dis Sci, 1995;40:2214-2219.

[3] Fox JG, Dewhirst FE, Sheng Z, et al. Hepativ Helicobacter species identified in bile and gallbladder tissues from Chileans with chronic cholecystitis[J]. Gastrenterology, 1998;144:755-763.

[4] Figura N, Cetta F, Angelico M, et al. Most Helicobacter pylori infected patients have specific antibodies, and some also have H. pylori antigens and genomic material in bile, is it a risk fector for gallstone formation[J]? Dig Dis Sci, 1998;43:854-862.

[5] Nilsson HO, Taneera J, Castedal M, et al. Identification of Helicobacter pylori and other Helicobacter species by PCR, hybridization, and partial DNA sequencing in human liver sanmples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary sclerosing cholangetis or primary biliary cimhosis[J]. I Clin Microbiol, 2000;38:1072-1076.

[6] 方驰华,杨继震,康惠广,等.胆囊结石胆汁、结石幽门螺杆菌与结石核心形成的关系[J].世界华人消化杂志,1999;(7):233-235.

[7] 李智涛,邵大晓,冯艳铭,等.胆结石患者胆囊粘膜及胆汁和胆石中幽门螺杆菌 DNA 的检测[J].洛阳医专学报,2001;19(2):100-101.

[8] 郭 吕,唐 俐,朱景元,等.聚合酶链反应检测胆囊粘膜、胆石、胆汁中幽门螺杆菌 DNA 结果分析[J].中华消化杂志,2002;22:113-114.

[9] Rudi J, Rudy A, Maiwald M, et al. Helicobacter sp. are not detectable in bile from German patients with biliary diseases [J]. Gastroenterology, 1999;116:1016.

[10] 黄 成,吴志棉,余俊峰,等.幽门螺杆菌与胆石成因关系的探讨[J].中华肝胆外科杂志,2004;10(5):357.

[11] 高 鹏,方驰华.聚合酶链式反应检测胆囊结石患者胆汁细菌 DNA 及意义[J].宁夏医学杂志,1999;21(6):331.

[12] 吴阶平,裘法祖,主编.黄家驷外科学[M].第 4 版,北京:人民卫生出版社,1986;1250-1260.

[13] 祁义军,孟翔凌.幽门螺杆菌与胆囊结石形成关系的研究近况[J].消化外科,2004;3(3):218-220.