DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.019
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

文章编号:1000-5404(2001)09-1043-03

论著

胃粘膜细胞线粒体DNA核内整合及其与幽门螺杆菌感染的关系

凌贤龙,房殿春,周晓东,罗元辉,鲁 荣 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038)

提要:目的 探讨胃粘膜细胞核内mtDNA整合与幽门螺杆菌(Hp)感染的关系。方法 采用PCR、免疫组化和Giemsa染色法检测Hp;采用原位杂交方法对胃粘膜细胞核内mtDNA序列进行检测。结果 胃癌细胞核内mtDNA序列的检出率为20%、癌旁粘膜为16.7%、异性增生为20%、肠上皮化生粘膜为10%、萎缩性胃炎为10%,浅表性胃炎未发现有mtDNA序列整合。胃粘膜细胞核内mtDNA序列的检出率在Hp^+组为21.1%显著高于Hp^-组(5.3%);在$cagA^+$ Hp感染组(24.4%)显著高于$cagA^-$ Hp感染组(7.4%)。结论 ①胃粘膜细胞mtDNA序列核内整合可能参与了胃癌的发生;②胃粘膜mtDNA序列整合可能与Hp感染有关。

关键词:癌前病变;幽门螺杆菌;线粒体DNA整合;原位杂交
中图法分类号:R329.23;R377 文献标识码:A

Relationship between integration of mtDNA fragments in the nuclei of gastric mucosal cells and *Helicobacter pylori* infection

LING Xian-long, FANG Dian-chun, ZHOU Xiao-dong, LUO Yuan-hui, LU Rong (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the integration of mtDNA in the nuclei of gastric mucosal cells and *Helicobacter pylori* infection. Methods Hp was detected by PCR, immunohistochemical method and modified Giemsa stain; the sequences of mtDNA in the nuclei was detected by *in situ* hybridization. Results The integration rate of mtDNA in the nuclei was 20% in gastric cancer, 16.7% in mucosa adjacent to gastric cancer lesion, 20% in dysplasia, 10% in intestinal metaplasia, 10% in chronic atrophic gastritis and none in superficial chronic gastritis. The integration rate in Hp^+ group(21.10%)was significantly higher than that in Hp^- group(5.3%); $cagA^+$ Hp group(24.4%) was significantely higher than that in $cagA^-$ Hp group(7.4%). Conclusion Integration of mtDNA into nuclei of gastric mucosal cells may be involved in the carcinogenesis of gastric mucosal cells and Hp infection may contribute to the integration of mtDNA into nuclei of gastric mucosal cells.

Key words: shomach carcinogenesis; precancerous lesion, gastric; Hp infection; mtDNA; *In situ* hybridization.

日益增多的资料提示,幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,Hp)感染与胃癌的发生关系密切,世界卫生组织(WHO)1994年将Hp列为胃癌的首要致病因子[1]。最近,动物实验研究亦发现,Hp不仅可以增强甲基硝基亚硝基胍的诱癌作用,长期Hp感染本身即可诱发出胃窦腺癌[2]。另有研究提示,Hp相关性胃癌与Hp非相关性胃癌在染色体结构的改变上并无明显差别[3]。我们过去研究表明,Hp感染患者胃粘膜组织脂质过氧化产物显著增加[4]。线粒体是细胞内特殊的细胞器,它含有自身的遗传物质。人类细胞线粒体DNA(Mitochondrial DNA,mtDNA)为16 569 bp的双链闭环分子。由于线粒体和mtDNA所特有的结构和功能特点,更易遭受氧自由基的损伤,而成为Hp相关胃炎中氧自由基的重要靶点。本研究旨在检测mtDNA片段在胃粘膜细胞核内的整合情况并探讨其与Hp感染的关系。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870345);全军"十五"重点基金资助项目(01Z075)
作者简介:凌贤龙(1982—),男,安徽省合肥市人,博士,主治医师,讲师,主要从事线粒体DNA突变整合研究。电话:(023)68755497
收稿日期:2001-03-06;修回日期:2001-05-20

1 材料与方法

1.1 病例资料

慢性浅表性胃炎10例,萎缩性胃炎10例,胃粘膜肠上皮化生10例,异型增生5例,胃癌及癌旁组织各30例。所有标本均为手术切除标本,取材后置于-70℃保存备用。所有患者术前未行抗Hp治疗;胃癌患者术前均未行化疗和放疗。

1.2 病理切片与染色

取部分胃粘膜组织,10%甲醛固定,石蜡包埋,切片后HE染色,用于胃粘膜的组织学检查。另取部分组织行冰冻切片,切片厚5μm,4%多聚甲醛固定,用于原位杂交。

1.3 Hp UreA和cagA基因PCR扩增

Hp检测采用改良的Giemsa染色、免疫组化和PCR方法;cagA基因检测采用PCR方法。Hp UreA和cagA基因扩增采用上海复星科技公司之PCR扩增试剂盒。

1.4 mtDNA原位杂交

MtDNA探针系由日本广岛大学医学院病理系Hirano博士馈赠,探针序列见文献[5]。探针标记采用Boster公司随机引物地高辛探针标记与检测试剂盒,参照Hirano等[5]的方法和试剂盒指南进行操作。探针稀释浓度为1.5 ng/μl。原位杂交液组成:50%去离子甲酰胺+0.1% N-Lauroylsarcosine+0.02% SDS

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

+2% Blocking reagent+ 5× SSC。以不加探针之杂交液为阴性对照。原位杂交步骤如下:①切片处理:0.01 mol/L HCl 和蛋白酶 K,37℃,30 min→0.1 mol/L 甘氨酸,5 min→4%多聚甲醛固定,5 min;②预杂交:每张切片加预杂交液 30 μl,37℃,30 min;③杂交:每张切片平均加含探针杂交液 30 μl,37℃,16 h;④碱性磷酸酶标记的地高辛抗体 30 μl,42℃,0.5 h;⑤显色:NBT/BCIP 显色 30~60 min 显微镜下观察并照相,细胞核有紫蓝色染色,细胞间质和对照者无此着色者为阳性。

1.5 统计学分析

采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 mtDNA 序列核内整合情况

采用原位杂交方法于胃粘膜细胞核内检出 mtDNA 序列 14 例,见图 1,其中萎缩性胃炎、肠上皮化生和异性增生组各 1 例,胃癌组 6 例,癌旁组 5 例,见表 1。

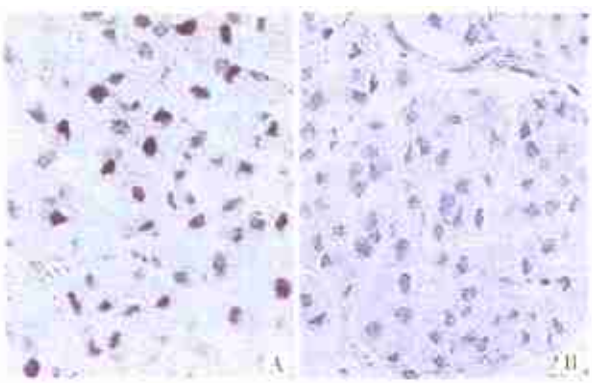


图 1 应用原位杂交检测胃粘膜细胞 **mtDNA** 核内整合情况,细胞核紫蓝色染色为阳性

Fig 1 Integration of mtDNA in the nuclei of gastric mucosal cells deteached by *in situ* hybridization

A: Integrated; B: Detached

表 1 **mtDNA** 片段在胃粘膜细胞核内整合

Tab 1 Integration of mtDNA in nuclei of gastric mucosa cells

Lesion	*n*	Positive
Superficial chronic gastritis	10	0
Chronic atrophic gastritis	10	1
Intestinal metaplasia	10	1
Dysplasia	5	1
Gastric cancer	30	6
Adjacent to gastric cancer	30	5

2.2 mtDNA 核内整合与 Hp 感染的关系

95 例标本属 Hp^+ 者 57 例,mtDNA 原位杂交细胞核染色阳性 12 例,属 Hp^- 者 38 例,mtDNA 原位杂交细胞核染色阳性 2 例,经统计学处理,差异显著($P<0.05$)。将 95 例标本分为 Hp $cagA^+$ 和 Hp $cagA^-$ 两组,经统计学处理,Hp $cagA^+$ 组 mtDNA 原位杂交细胞核染色阳性亦显著高于 Hp $cagA^-$ 组($P<0.05$),见表 2。

表 2 **mtDNA** 核内整合与 **Hp** 感染的关系

Tab 2 Relationship between integration of mtDNA in nucleus and Hp infection

	Hp^+	Hp^-	$cagA^+$	$cagA^-$
Chronic superficial gastritis	0/5	0/5	0/2	0/8
Chronic atrophic gastritis	1/6	0/4	1/3	0/7
Intestinal metaplasia	1/6	0/4	1/4	0/6
Dysplasia	0/3	1/2	0/2	1/3
Gastric cancer	5/16	1/14	4/13	2/17
Adjacent to gastric cancer	5/21	0/9	4/17	1/13
Total	12/57 *	2/38	10/41 *	4/54

*: $P<0.05$ Hp^+ *vs* Hp^- and $cagA^+$ *vs* $cagA^-$

3 讨论

研究表明,mtDNA 可以稳定地整合到核基因组中[6~8]。本研究显示,由浅表性胃炎→萎缩性胃炎→胃癌前病变→胃癌的过程中,mtDNA 序列整合入nDNA 的机率似乎有增加的趋势,提示 mtDNA 整合到核基因组中有可能与胃癌的发生有关。本研究还发现,mtDNA 的核基因组整合主要发生于 Hp 感染的胃粘膜,特别是 $cagA^+$ Hp^+ 胃粘膜,提示 mtDNA 的核基因组整合可能与胃粘膜 Hp 感染,特别是 $cagA^+$ 的 Hp 感染有关。本研究发现,除 Hp^+ 胃粘膜检出 mtDNA 序列外,亦有 2 例 Hp^- 胃粘膜发现 mtDNA 序列,其原因考虑胃粘膜病变形成以后,造成胃粘膜结构和微环境改变,不适宜 Hp 生存,使其发生"丢失"所致[9]。

胃粘膜 Hp 感染引起 mtDNA 的核基因组整合的机制尚不清楚。已知胃粘膜内多形核白细胞和单核吞噬细胞浸润是 Hp,尤其是 $cagA^+$ Hp 相关性胃炎重要特征之一。这些细胞一方面作为一种保护机制吞噬和杀灭细菌,另一方面也可释放大量氧自由基损伤胃粘膜细胞。我们过去研究表明,Hp 感染患者胃粘膜组织脂质过氧化产物显著增加[4],由于线粒体和 mtDNA 所特有的结构和生物学功能特点,更易遭受氧自由基的损伤,而成为 Hp 相关胃炎中氧自由基的重要靶点。在细胞内游离的 mtDNA 及其片段产生过多,核酸降解酶活性下降情况下,mtDNA 便获得了整合入核基因组的机会,它会像其它致瘤病毒那样,通过核孔,随机整合到核 DNA 中,引起核基因组结构和功能的改变。

这种 mtDNA 的核基因组整合的意义尚不完全清楚。Shay 等[8]在 Hela TG 细胞中发现了 mtDNA 的细胞色素氧化酶亚单位 III(CoIII)基因整合于细胞核的 C-myc 基因组内,整合的结果,使细胞产生了融合的 mRNA,此 mRNA 不仅含有来自 C-myc 的遗传信息,而且含有 CoIII 的遗传信息。胡义德等[10]采用基因转导技术将扩增的 mtDNA 片段转染小鼠胚胎成纤维细胞(NIH3T3),可使细胞发生恶性转化,提示 mtDNA 片段

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在核内的整合是促发细胞癌变的重要因素。我们推测这种整合至少可通过两条途径引起细胞癌变:①通过引起核基因组的不稳定性发生癌变,已有研究发现胃粘膜 Hp 感染与微卫星不稳定性有关[11];②通过改变细胞能量产生,提高线粒体氧化压力,引起线粒体酶表达异常和/或调控凋亡等途径来影响细胞的生物学行为,使其发生恶变[11,12]。以上推论尚需进一步研究来证实。

现已明确,Hp 感染是引起胃癌的重要致病因子,但其导致胃癌的分子途径仍不清楚。以往认为 Hp 致癌可能与其对胃粘膜核基因组的损伤有关,但仍缺乏实验依据。本研究报道,胃粘膜细胞核基因组有 mtDNA 片段的整合,且这种整合与 Hp 感染有关。我们对 mtDNA 片段在核内整合的分析为进一步揭示 Hp 导致胃癌的分子机制提供了新的线索。

参考文献:

[1] Covacci A, Telford J L, Del Giudice G, *et al*. Helicobacter pylori virulence and genetic geography[J]. Science, 1999, 284(5 418): 1 328—1 333.

[2] Shimizu N, Inada K, Nakanishi H, *et al*. Helicobacter pylori infection enhances glandular stomach carcinogenesis in mongolian gerbils treated with chemical carcinogens[J]. Carcinogenesis, 1999, 20(4): 669—676.

[3] van Grieken N C, Weiss M M, Meijer G A, *et al*. Helicobacter pylori—related and -non-related gastric cancers do not differ with respect to chromosomal aberrations[J]. J Pathol, 2000, 192(3): 301—306.

[4] 梁后杰, 刘为纹, 房殿春 等. 幽门螺杆菌培养滤液诱癌和促癌作用的实验研究[J]. 中华医学杂志, 1998, 20(6): 485—487.

[5] Hirano T, Shiraishi K, Adachi K, *et al*. Co-localization of mitochondrial and double minute DNA in the nuclei of HL—60 cells but not normal cells [J]. Mutat Res, 1999, 425(2): 195—204.

[6] Wright R M, Cummings D J. Integration of mitochondrial gene sequences within the nuclear genome during senescence in a fungus[J]. Nature, 1983, 302(5 903): 86—88.

[7] Gellissen G, Bradfied J Y, White B N, *et al*. Mitochondrial DNA sequences in the nuclear genome of a locust[J]. Nature, 1983, 301(5 901): 631—634.

[8] Shay J W, Baba T, Zhan Q, *et al*. HeLa TG cells have mitochondrial DNA inserted into the c-myc oncogene[J]. Oncogene, 1991, 6(10): 1 869—1 874.

[9] Karnes W E, Samloff I M, Siurala M, *et al*. Positive serum antibody and negative tissue staining for Hp in subjects with atrophic body gastritis[J]. Gastroenterology, 1991, 101(1): 167—174.

[10] 胡义德 钱桂生, 毛宝龄, 等. 线粒体 DNA 片段诱导小鼠胚胎成纤维细胞恶性转化[J]. 中华病理学杂志, 2000, 29(1): 39—42.

[11] Wallace D C. Mitochondrial diseases in man and mouse[J]. Science, 1999, 283(5 407): 1 482—1 488.

[12] Green D R, Reed J C. Mitochrondria and apoptosis[J]. Science, 1998, 281(5 381): 1 309—1 312.

(编辑　薛国文)

(上接 1042 页)

CT 诊断确诊率为 89.1%, B 超确诊率为 89.8%, 针对怀疑有胰腺肿瘤的患者, 首选仍是 B 超, 与文献[1~3]报道基本一致。而 CT+B 超的确诊率可达 94.2%, 优于任何一项单项检查。

分析本组中 CT 和 B 超在诊断中互补的方面有如下几点:①随年龄增长胰腺会缩小且内部结构也随之变化, 出现斑片状结构、密度增高或降低等; CT 是测量胰头是否大于同切面锥体的 2/3, 故不够准确。本组中有 3 例误诊属于此类; ②CT 采用间隔 10 mm 扫描, 影响了胰腺肿块不明显又伴有胆管或胰管扩张患者的检出率; 本组中 B 超显示胆管扩张者占 59.4%, 胰腺管扩张者占 61.6%, 优于 CT; ③由于胰腺解剖位置深, 易受前方气体、腹水等因素的影响, 造成 B 超胰腺未显示的假阴性, 本组患者中出现 2 例; ④由于慢性炎症局限性肿胀组织在超声下显示的低回声实质性肿块与原发性胰头癌或继发梗阻等征象极为相似, 故 B 超易将胰腺癌与慢性胰腺炎、胰腺囊肿混淆(33%)。⑤小于 4 cm 的肿瘤常不易被发现。影像学中肿瘤直径大于 4 cm 者占 55%, 小于 2 cm 者占 5%, 术中扪及包块直径大于 5 cm 者占 57%, 二者相近。而且, B 超诊断胰体尾癌较胰头癌更易漏诊, 而 CT 和 X 线起着重要作用; 当怀疑胰腺肿瘤而 CT 为阴性时, 应选用 MRI(核磁共振), 因为 MRI 不同序列分别对肿块的直接征象及腹膜后淋巴结、肝内转移等间接征象的判断有很大价值[4]。ERCP 能观察胰头病变有无浸润乳头区, 能显示胰管和胆总管的形态变化, 由于 90%的胰腺癌发源于胰管, 其灵敏度和特异性均达到 90%。

2.3　胰腺癌缺乏血清学特异性指标

胰腺的内、外分泌功能, 造成了早期症状模糊, 缺乏特异性。我院 167 例中有 12.6%的患者在就诊前 2~3 年发现有糖尿病, 就诊时血糖(空腹)或/和血淀粉酶异常者占 32.9%, 其它的血清学指标如碱性磷酸酶、胆红素、转氨酶等也可出现异常, 但是这些异常也可见于慢性胰腺炎, 故给诊断带来困难。血清肿瘤标志 CEA(癌胚抗原)的阳性率约为 42.5%, 有报道, CA19-9 及 CA242 为较好的诊断胰腺癌的肿瘤标志, 优于 CEA, 但仍然有特异性欠强的问题[5]。

胰腺癌预后极差, 为达到早期诊断的目的, 需加强宣传, 临床医师应随访观察, 提高早期诊断率。

关键词: 胰腺癌; CT 诊断; B 超诊断

中图法分类号: R735.9　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 栾宝庆, 靳二虎, 张立珍, 等. 胰腺癌与慢性胰腺炎的 CT 诊断[J]. 中华放射学杂志, 1997, 31(2): 114—115.

[2] 魏　敏. B 超与 CT 对胰腺癌诊断价值的探讨[J]. 中国超声医学杂志, 1995, 11(4): 306—307.

[3] Karlson B M, Ekbom A, Lindgren P G. Abdominal US for diagnosis of pancreatic tumor: prospective cohort analysis[J]. Radiology, 1999, 213(1): 107—111.

[4] 萧树东 主编. 江绍基胃肠病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001. 258—259

[5] Nagahama H, Okada S, Okusaka T, *et al*. Clinicopathological features in misdiagnosed pancreatic carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 1999, 46(29): 2 983—2 985.

(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net