DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.004
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
6 2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)01-0006-03

胃粘膜Hp感染与细胞凋亡和Fas抗原表达的关系

刘海峰,刘为纹,房殿春,杨仕明,赵 丽 (第三军医大学附属西南医院消化内科,重庆 400038)

提 要:目的 通过观察幽门螺杆菌(Hp)感染诱导胃粘膜上皮细胞凋亡与Fas抗原表达的关系,探讨Hp诱导胃粘膜上皮细胞凋亡的机制。方法 采用脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)技术原位观察和比较Hp根除前后胃粘膜上皮细胞凋亡的变化,采用免疫组织化学染色检测Fas抗原表达变化。结果 Hp阳性患者胃粘膜上皮细胞凋亡指数为12.78%,明显高于Hp阴性者(3.63%,$P<0.01$);Hp根除后胃粘膜上皮细胞凋亡指数(4.37%)较治疗前明显降低(12.46%,$P<0.01$),而持续阳性者凋亡指数无明显降低。Hp阳性患者胃粘膜上皮细胞Fas抗原表达率为67.92%,高于Hp阴性者(45.00%);Fas抗原表达阳性的Hp阳性患者在Hp根除后Fas抗原细胞密度显著减少($P<0.01$),而Hp未被根除者Fas抗原表达阳性细胞密度无明显变化。结论 Hp感染可诱导胃粘膜上皮细胞凋亡,这可能是Hp参与胃癌发生的重要机制之一;Hp感染可促进Fas抗原表达增加,这可能是Hp感染诱导胃粘膜上皮细胞凋亡的机制之一。

关键词:螺杆菌,幽门;胃疾病;细胞凋亡;Fas抗原
中图法分类号:R329.25;R377 文献标识码:A

Gastric epithelial apoptosis induced by *Helicobacter pylori* and its relationship with Fas antigen expression

LIU Hai-feng, LIU Wei-wen, FANG Dian-chun, YANG Shi-ming, ZHAO Li (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the relationship between gastric epithelial apoptosis induced by *Helicobacter pylori* and Fas antigen expression and explore the mechanisms of *H. Pylori* infection that induce gastric epithelial cell apoptosis. Methods The apoptotic cells and FAS antigen expression *in situ* in *H. pylori* negative gastric mucosa, *H. pylori* positive gastric mucosa before and after *H. pylori* eradication were observed with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) technique and immunohistochemical staining. Results The apoptotic index of gastric epithelial in the patients infected with *H. pylori* (12.78%) was significantly higher than that of *H. pylori* negative gastric epithelia (apoptotic index 3.63%, $P<0.01$). After eradication of *H. pylori* with triple therapy, the apoptotic index fell from 12.37% to 4.46% ($P<0.01$). In the persisting *H. pylori* infected patients, the apoptotic index was not statistically decreased. The positive rate of Fas antigen of gastric epithelia in the patients infected with *H. Pylori* (67.92%) was higher than that of *H. pylori* negative gastric epithelia (45.0%). After eradication of *H. Pylori* with triple therapy, the Fas antigen positive cell density was significantly decreased ($P<0.01$). In the persisting *H. pylori* infected patients, the positive cell density was not significantly decreased. Conclusion These results suggest that *H. pylori* could induce gastrc epithelial apoptosis *in vivo*. *H. pylori* increases the expression of Fas antigen, which might be one of the mechanisms by which *H. pylori* promotes gastric epithelial apoptosis.

Key words: *Helicobacter pylori*; stomach diseases; apoptosis; Fas antigen

一系列的流行病学及临床病理研究资料证实幽门螺杆菌(Hp)感染在胃粘膜癌变过程中是一致病因素或促进因素,长期感染可导致胃粘膜的萎缩、肠上皮化生及异型增生,但其致病机制尚不清楚[1~3]。本研究采用脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)技术对Hp阴性患者、Hp阳性患者Hp根除前后胃粘膜上皮细胞中凋亡细胞的分布和密度及Fas抗原表达情况进行原位观察和比较,旨在探讨Hp感染对胃粘膜上皮细胞凋亡细胞的影响及其机制,并分析其在胃癌发生中的意义。

基金项目:全军"九五"医药卫生重点课题资助项目(96Z047)及重庆市应用基础研究基金资助项目
作者简介:刘海峰(1965-),男,河北省景县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事胃癌及胃癌前病变的基础与临床方面的研究,发表论文40篇。电话:(023)65318301-73055
收稿日期:2000-04-23;修回日期:2000-07-21

1 材料和方法

1.1 研究对象

研究对象为以上消化道症状在我院行胃镜检查的近期未服用抗生素的慢性胃炎患者,其中Hp阴性者20例,Hp阳性患者53例。Hp阳性患者给予得诺(120 mg,4次/d)、呋喃唑酮(10 mg,4次/d)、羟氨苄青霉素(250 mg,3次/d)三联治疗2周,治疗结束后1月接受胃镜复查。胃镜检查时用活检钳采取胃窦部的胃粘膜组织标本。胃粘膜组织标本分别进行Hp检测、组织学检查、细胞凋亡检测和Fas抗原检测。

1.2 Hp感染的诊断

采用尿素酶试验、Warthin-Starry银染色两种方法检测胃粘膜组织Hp,两种方法均阳性者判为Hp感染。治疗后复查两项检查均阴性者判断为Hp根除。

1.3 TUNEL染色

细胞凋亡原位检测试剂盒(*In situ* cell death detection kit,

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

POD)为德国 Boehringer Mannheim 公司产品, 染色步骤: ①切片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化; ② 3 ml/L H_2O_2 封闭 30 min; ③20 mg/L 蛋白酶 K 消化液作用 20 min; ④TUNEL 反应液, 37 ℃孵育 60 min; ⑤过氧化物酶连接的抗荧光素抗体, 37 ℃孵育 30 min; ②~⑤步后均以 10 mmol/L PBS(pH7.4)振洗 3 次, 每次 5 min; ⑥DAB 显色, 苏木素复染, 脱水透明, 封片。以 PBS 替代 TUNEL 反应液作阴性对照, 阳性对照切片经 DNaseⅠ预处理 10 min, 再接 TUNEL 染色步骤。

1.4　Fas 抗原免疫组织化学染色

采用 SP 法。兔抗人 Fas 多克隆抗体及免疫组化试剂盒(Immunostain SP Kit)均为美国 Santa Cruz 公司产品。染色程序按 SP 法操作常规进行。以 PBS 代替一抗为阴性对照, 以已知 Fas 抗原阳性的胃癌为阳性对照。

1.5　结果判定

光镜下观察 TUNEL 染色及免疫组化染色切片的显色反应, 数 5 个以上高倍视野, 不少于 1 000 个胃粘膜上皮细胞, 记数阳性细胞数并以百分数表示, 分别作为 TUNEL 阳性细胞(凋亡细胞)指数及 Fas 抗原阳性细胞密度, Fas 抗原表达阳性细胞数≥10%为阳性,< 10%判为阴性。

1.6　统计学处理

所得数据分别采用 t 检验和 χ^2 检验。

2　结果

2.1　Hp 感染对胃粘膜上皮细胞凋亡的影响

Hp 阴性患者胃粘膜上皮细胞凋亡指数为 3.63%, 凋亡细胞主要位于胃粘膜表层上皮中, 呈单个散在分布或呈簇状分布; Hp 阳性患者胃粘膜上皮细胞凋亡指数为 12.78%, 显著高于 Hp 阴性患者($P<0.01$), 凋亡细胞在胃粘膜全层均可见到, 呈弥漫性分布。

2.2　Hp 根除前后胃粘膜上皮细胞凋亡的变化

53 例 Hp 阳性患者经"三联"疗法治疗后, 随访 46 例, 其中 39 例 Hp 根除, 7 例仍为阳性。Hp 根除后, 胃粘膜上皮细胞凋亡指数降至 4.37%, 较治疗前(12.46%)明显减少($P<0.01$); 而 Hp 仍为阳性者胃粘膜细胞凋亡指数亦有减少, 但与治疗前相差无统计学意义, 见表 1。

表 1　Hp 根除前后细胞凋亡指数的变化

Tab 1　Changes of apoptotic index of gastric epithelium befor and after Hp eradication

Group	n	Apoptotic index(%)	
		Before treatment	After treatment
Hp eradicated	39	12.46±9.12	4.37±2.20 *
Hp persisted	7	13.56±9.71	9.83±4.46

*: $P<0.01$ *vs* before treatment

2.3　Hp 感染对 Fas 抗原表达的影响

Hp 阳性患者胃粘膜上皮细胞 Fas 抗原表达率高于 Hp 阴性者, 但相差无统计学意义, 见表 2。36 例 Fas 抗原表达阳性的 Hp 阳性患者经"三联"疗法治疗后, 32 例 Hp 根除, 4 例仍为阳性。Hp 根除后, 胃粘膜上皮细胞 Fas 抗原表达阳性细胞密度显著减少($P<0.01$), 而 Hp 未被根除者 Fas 抗原表达阳性细胞密度无明显变, 见表 3。

表 2　Hp 阳性和 Hp 阴性患者胃粘膜 Fas 抗原表达率(%)

Tab 2　Expression of Fas antigen in Hp-positive and Hp-negative patients(%)

Group	n	Fas antigen expression		Expression rate(%)
		−	+	
Hp negative	20	11	9	45.00
Hp positive	53	17	36	67.92

表 3　Hp 根除前后 Fas 抗原阳性细胞密度的变化

Tab 3　Fas positive cell density of gastric epithelium before and after Hp eradication

Group	n	Fas positive cell density(%)	
		Before treatment	After treatment
Hp eradicated	32	39.73±11.45	30.41±9.96 *
Hp persisted	4	39.68± 7.57	36.19±6.41

*: $P<0.01$ *vs* before treatment

3　讨论

细胞凋亡是一种生理性/非生理性的具有特定形态特征的细胞死亡现象。在正常情况下, 为了清除衰老、异常细胞及控制细胞数量和体积, 总有部分细胞在机体的总调控下发生凋亡, 以维持机体的生理稳定, 不能允许某种细胞过度增殖、分化。但非生理条件下出现的细胞凋亡, 不能不引起我们的重视。近年来, 随着胃肠道粘膜上皮细胞凋亡研究的深入, 人们发现细胞凋亡是胃肠道上皮细胞丢失的主要途径, 胃肠道上皮细胞凋亡异常便会导致胃肠疾病的发生[4,5]。Hp 感染与多种胃病的发生有关, 了解 Hp 感染与胃粘膜上皮细胞凋亡之间的关系有助于揭示 Hp 的致病机制。本研究发现, Hp 阳性患者胃粘膜上皮细胞凋亡指数明显高于 Hp 阴性者, 伴随 Hp 的根除细胞凋亡指数明显下降, 表明 Hp 感染可以诱导胃粘膜上皮细胞凋亡, Hp 有可能通过诱导胃粘膜上皮细胞凋亡参与胃病的发生。Hp 感染与胃癌发生的关系密切, 因此, Hp 诱导胃粘膜上皮细胞凋亡可能是 Hp 参与胃癌发生的重要机制之一。虽然胃癌细胞凋亡减少, 但大多数致癌因素如化学致癌剂、放射线等在实验性胃癌发生的早期阶段都能引起凋亡增加, 同时也刺激细胞增殖[6]。致癌剂诱导细胞凋亡继而出现凋亡抑制的机制尚不清楚, Hp 有可能以同样的形式参与胃癌的发生, 具体机制有待进一步研究。

Hp 感染诱导胃粘膜上皮细胞凋亡的机制尚不清楚, 目前认为可能与 Hp 分泌的细胞毒素如 cagA 和 vacA 等、Hp 尿素酶分解尿素产生的氨、Hp 感染后炎症反应中释放的细胞因子和氧自由基、胃腔中维生素 C 含量减少有关[7]。本研究发现, Hp 感染与 Fas 抗原表达之间有一定的关系, Hp 感染阳性患者胃粘膜上皮细胞 Fas 抗原表达率高于 Hp 阴性者, 经"三联"治疗 Hp 根除后 Fas 阳性细胞密度明显减少, 提示 Hp 感染可促进 Fas 抗原的表达, 这可能是 Hp 感染诱导胃粘膜上皮细胞凋亡的重要机制之一。

综上所述, Hp 感染可诱导胃粘膜上皮细胞凋亡,

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

Hp感染又可促进Fas抗原表达增加，Fas抗原具有促进胃粘膜上皮细胞凋亡的作用[8]，因此推测Hp通过增加细胞凋亡调控基因Fas的表达诱导胃粘膜上皮细胞凋亡可能是Hp参与胃病发生的重要机制之一。所以，从细胞凋亡的角度探讨Hp感染与胃癌发生的关系将有助于揭示Hp的致病机制及胃癌的发生机制，为胃癌及胃癌前病变的防治研究提供新的思路。

参考文献：

[1] Hirayama F, Takagi S, Kusuhara M. Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in mongolian gerbils infected with Helicobacter pylori[J]. J Gastroenterology, 1996, 31(5): 755—757.

[2] Watanabe T, Tada M, Nagai H, *et al*. Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils[J]. Gastroenterology, 1998, 115(2): 642—648.

[3] Fan X G, Kelleher D, Fan X J, *et al*. Helicobacter pylori increases proliferation of gastric epithelial cells[J]. Gut, 1996, 38(1): 19—22.

[4] Que F G, Gores G J. Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist[J]. Gastroenterology, 1996, 110(4): 1 238—1 243.

[5] 刘海峰，刘为纹，房殿春. 胃癌及其癌前病变中细胞凋亡与细胞增殖间关系的研究[J]. 世界华人消化杂志，1999，7(8)：649—651.

[6] Kerr J F R, Winterford C M, Harmon B V. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy[J]. Cancer, 1994, 73(8): 2 013—2 026.

[7] Peek R M Jr, Moss S F, Tham K T, *et al*. Helicobacter pylori cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis[J]. J Natl Cancer Inst, 1997, 89(12): 863—868.

[8] 刘海峰，刘为纹，房殿春 等. 幽门螺杆菌感染者胃粘膜癌前病变与Fas抗原表达的关系[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，1999，19(6)：454.

（编辑 王 红）

（上接5页）

2 结果

2.1 患者脑脊液钙含量及神经功能的变化见表1

表1 西比灵对脑缺血患者脑脊液钙及神经功能(**BI**指数)的影响

		治疗组	对照组
第1次	Ca^{2+}	2.03±0.17	2.09±0.20
	BI	31.25±6.71	32.07±8.01
第2次	Ca^{2+}	2.41±0.31☆	2.11±0.42
	BI	38.67±7.10	36.27±5.84
第3次	Ca^{2+}	2.44±0.52☆	2.22±0.41
	BI	68.92±8.71☆	39.44±9.02

☆：$P<0.001$ 与第1次测定结果比较；★：$P<0.001$ 与对照组比较

2.2 患者脑梗塞体积的变化见表2

表2 西比灵对脑缺血患者脑梗塞体积的影响(cm^3)

	治疗前	治疗后
对照组	26.4±11.6	24.4±12.3
治疗组	29.6±14.3	18.6±11.2★

★：$P<0.001$ 与对照组比较

3 讨论

3.1 大鼠脑缺血/再灌流神经元游离钙的变化及其机制

我们以往的研究发现，脑缺血时神经元内游离钙浓度明显增高[1]；再灌流以后，神经元内游离钙浓度进一步升高，到再灌流6 h，神经元内游离钙浓度达到最高峰，以后钙浓度虽有下降，但仍高于缺血前水平。脑缺血/再灌注时，细胞内钙明显增高可能与细胞能量代谢受阻，大量自由基生成，谷氨酸大量释放及蛋白激酶C(Protein kinase C, PKC)的激活[2,3]等因素有关。脑缺血/再灌流时，神经元内增加的钙主要来于细胞外液，如细胞间液、血液及脑脊液。所以，脑缺血/再灌流时这些部位的钙含量降低。

3.2 脑缺血/再灌注钙超载引起神经元损伤的可能机制

钙超载参与神经元损伤的机制目前尚不清楚，可能为通过多种途径综合作用的结果。1994年Morley等[2]综述了这些可能的途径：①钙超载破坏了线粒体的结构和功能，ATP生成减少；②钙超载可以激活多种蛋白酶、蛋白激酶，参与了神经元的缺血性损伤；③钙超载激活 Ca^{2+}-Mg^{2+} 依赖的内源性核酸内切酶，诱导神经元凋亡；④钙超载可以促进自由基的生成从而导致神经元的凋亡；⑤钙超载可以激活PKC，PKC可以通过多种途径[4]来引起神经元的凋亡，如激活磷脂酶促进自由基生成、磷酸化核转录因子(NF-κB)使其活化、使血管收缩加重缺血缺氧等。值得一提的是钙超载可以激活PKC，PKC的激活又可以促进钙超载，形成恶性循环，导致神经元的损伤。⑥钙超载可以加重缺血条件下其他离子的紊乱参与了神经元的损伤；⑦钙超载可以引起血管收缩，加重了缺血缺氧；⑧钙超载通过某种途径激活钙依赖的中性蛋白酶，从而降解细胞骨架成分MAP2，参与了脑缺血/再灌注诱导的神经元损伤。

3.3 西比灵的保护作用

西比灵系一种脂溶性的钙通道阻滞剂。它具有抑制病理性过量钙离子内流而不影响正常钙离子流动的钙通道阻滞剂，很容易通过血脑屏障，作用于神经元及血管的L-型的钙通道，从而阻滞脑缺血/再灌注条件的钙内流，防止钙内流引起的神经元损伤。

我们的研究发现西比灵可以防止脑缺血/再灌注诱导脑脊液钙浓度的降低，同时较传统的治疗方法明显地改善患者的神经功能，减小梗塞体积。西比灵能防止脑缺血/再灌注诱导脑脊液钙浓度的降低，其的可能原因是西比灵防止了脑缺血/再灌注诱导的钙内液，从而防止钙内流诱导的神经元损伤及血管痉挛，减小梗塞面积。因此，西比灵不失为治疗缺血性脑血管病的一种好药。在临床中，起病后尽早的应用西比灵能取得更好的临床疗效。

关键词：脑缺血；再灌注损伤；脑血管病

中图法分类号：R743.05 文献标识码：B

参考文献：

[1] 陈康宁，董为伟. 灯盏花注射液对脑缺血损伤的防治作用研究[J]. 中国中西医结合杂志，1998，18(11)：684—686.

[2] Morley P, Hogan M J, Hakim A M. Calcium-mediated mechanisms of ischemic injury and protection[J]. Brain Pathol, 1994, 4(1): 24—47.

[3] 陈康宁，董为伟. PKC与脑缺血损伤[J]. 国外医学：内科学分册，1996，23(4)：164—167.

[4] Hall K E, Browning M D, Dudek E, *et al*. Enhancement of high threshold calcium currents in rat primary afferent neuron by constitutively active protein kinase C[J]. J Neurosci, 1995, 15(9): 6 069—6 076.

（编辑 冯崇英）

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