

幽门螺杆菌致细胞空泡变性作用

杨 艺¹ 邓长生¹ 彭俊忠²

(¹ 武汉大学中南医院消化内科 武汉 430071)

(² 武汉科技大学医学院 武汉 430080)

关键词: 幽门螺杆菌, 致细胞病变效应, 空泡毒作用

中图分类号: R573.102 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2001) 05-0646-04

自从 1982 年 Marshall 和 Warren 从慢性活动性胃炎患者的胃粘膜中, 分离出幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 以来^[1], *H. pylori* 与上消化道疾病之间的关系受到消化学界及微生物学界的极大关注。*H. pylori* 与上消化道疾病之间的关系受到消化学界及微生物界的极大关注。*H. pylori* 感染是普遍的, 但其感染所造成的结果却有很大的不同, 一些感染者只表现为无症状的带菌, 而另一些则表现为慢性胃炎、消化性溃疡甚至胃癌^[2,3]。对于这些不同感染结果产生的原因, 一种解释可能是不同人群所感染的 *H. pylori* 菌株不同, 不同菌株造成不同的感染后果。1988 年 Leunk 发现部分 *H. pylori* 菌株能产生一种使体外培养的哺乳动物细胞发生空泡样变的毒素, 并据此将 *H. pylori* 分为空泡毒作用阳性的 *H. pylori* (Tox⁺) 与空泡毒作用阴性的 *H. pylori* (Tox⁻)^[4]。现已明确, 介导 *H. pylori* 空泡毒活性的这种物质是分子量为 90kD 的空泡细胞毒素 (vacuolating cytotoxin A, VacA), 在体内外的实验中, 均证实 VacA 可直接引起胃粘膜细胞的损伤。本研究用 *H. pylori* 活菌直接感染体外培养的 SGC-7901 细胞, 观察了不同来源的 *H. pylori* 活菌致细胞空泡变性作用的异同。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例选择: 选择近期末服用过抗生素、H₂ 受体拮抗剂和质子泵抑制剂等药物、因有上消化道症状而在本院接受胃镜检查的 105 例患者, 其中男 61 例, 平均年龄 45.2 + 7.2 (15 ~ 65) 岁, 女 44 例, 平均年龄 41.5 + 7.8 (18 ~ 62 岁)。105 例患者中, 消化性溃疡 (peptic ulcer, PU) 68 例, 慢性胃炎 (chronic gastritis, CA) 29 例, 胃癌 (gastric carcinoma, GC) 8 例, 诊断以胃镜结合病理检查为标准。

1.1.2 标准菌株: 国际标准菌株 NCTC 11637 引自中国预防科学院流行病学研究所, 它是空泡毒作用阳性株 (Tox⁺), 作为 *H. pylori* 临床分离株分离与鉴定的标准对照。

1.1.3 临床分离株: 自行分离于上述病例的胃粘膜活检标本。

1.1.4 细胞系: 胃腺癌细胞系 SGC-7901 细胞引自中国科学院细胞生物学研究所。

1.2 方法

1.2.1 *H. pylori* 的培养: 将 *H. pylori* 标准菌株与临床分离株均接种于营养琼脂平板上, 放入 37℃ 厌氧培养箱 (含 5% O₂、5% H₂、10% CO₂ 和 80% N₂) 中培养; 3d 后收集细菌, 用 PBS 制成细菌悬液, 在分光光度计上确定 *H. pylori* 的浓度 (1 OD₆₆₀ = 10⁸ CFU/mL); 用含 2% 胎牛血清的 RPMI 1640 (无抗生素) 作稀释液, 将 *H. pylori* 作连续 5 倍稀释 (1 × 10⁸ ~ 3.2 × 10⁴ CFU/mL)。

1.2.2 人胃腺癌细胞系 SGC-7901 的培养: SGC-7901 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 中, 置于

作者简介: 杨艺 (1973 -), 女, 湖北武汉人, 武汉大学中南医院主治医师, 博士, 主要从事幽门螺杆菌致病机制的相关研究。

收稿日期: 2000-11-13, 修回日期: 2001-03-23

37℃含 5% CO₂ 的培养箱内培养,按贴壁细胞传代培养法,胰酶消化每两天传代一次。

1.2.3 *H. pylori* 致细胞空泡变性作用的观察:参照杜平介绍的病毒致细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)实行进行^[5]。于 *H. pylori* 与细胞共同孵育后的不同时间,在倒置显微镜下观察细胞空泡变性的情况。每孔中有 ≥50% 的细胞出现空泡病变时,记为空泡变性作用阳性。在任一浓度下能使任一孔细胞产生阳性空泡变性作用的临床分离株记为该分离株空泡毒作用阳性 [*H. pylori*(tox⁺)]。*H. pylori* 引起细胞空泡变性的浓度用 50% 感染百分数(50 percent tissue culture infection dose, TCID₅₀)表示,意即使 50% 细胞培养孔出现空泡变性作用阳性的细菌浓度。按 Reed-Muench^[23] 公式计算 TCID₅₀ 值。

1.3 统计学处理

计数资料采用四格表的精确概率法(Exact probabilities in 2 × 2 table),成组设计的两样本均数比较采用 t 检验(t test),均用 SAS 6.11 软件分析。显著水准(significance level)α 为 0.05。

2 结果

2.1 *H. pylori* 的形态观察

H. pylori 在普通平板上表现为针尖大、水滴状、透明的菌落,一般在 72~96h 出现。*H. pylori* 经革兰染色后,在显微镜下观察到革兰染色阴性的弯曲杆菌,呈逗点状、海鸥状或 S 状;*H. pylori* 负染标本显示其一端或两端带有 2~6 条鞭毛,长度长于菌体,鞭毛外周均有明显的鞘被复。

2.2 *H. pylori* 致细胞空泡变性作用的形态观察

在倒置显微镜下连续观察接种 *H. pylori* 后 SGC-7901 细胞的形态变化,发现在较低浓度活菌作用下,细胞形态与对照组相比无明显异常,核分裂相多见;但当 *H. pylori* 浓度较高时,培养细胞的胞浆内出现空泡病变,随着 *H. pylori* 浓度的加大和作用时间的延长,空泡细胞越来越多,细胞内空泡也逐渐融合、扩大。共培养 48h 后,高浓度 *H. pylori* 作用下的细胞病变已十分明显,而对照组细胞形态仍保持完好(图 1)。

2.3 *H. pylori*(Tox⁺) 株在各种 *H. pylori* 相关性胃肠疾病中的比例

在 40 株临床分离的 *H. pylori* 中,有 28 株为 *H. pylori*(Tox⁺),总阳性率为 70%。*H. pylori*(Tox⁺) 株在各种 *H. pylori* 相关性胃肠疾病中的比例如表 1 所示,用四格表的精确概率法进行统计分析,显示上述各疾病组之间 *H. pylori*(Tox⁺) 所占比例均无显著差异。

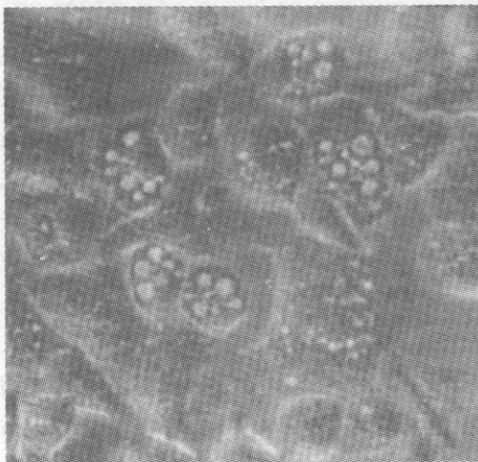


图 1 相差显微镜下 SGC-7901 细胞在与幽门螺杆菌共培养 48h 后的空泡变性(×400)

表 1 *H. pylori*(Tox⁺) 株在各种 *H. pylori* 相关性胃肠疾病中的比例

疾病	<i>H. pylori</i> (Tox ⁺)数	<i>H. pylori</i> (Tox ⁻)数	总数	阳性率 /%
消化性溃疡	22	6	28	78.6
十二指肠球部溃疡	17	3	20	85.0
胃溃疡	3	2	5	60.0
复合溃疡	2	1	3	66.7
胃炎	5	4	9	55.6
胃癌	1	2	3	33.3

(No significant difference between every group, P > 0.05)

2.4 *H. pylori* (Tox⁻) 致细胞空泡变性作用的 TCID₅₀

按 Reed-Muench 公式计算 TCID₅₀ 值, 表 2 为 NCTC 11637 标准菌株致细胞空泡变性作用的 TCID₅₀ 的计算表, 由表 2 可见, NCTC 11637 的 TCID₅₀ 介于 $4 \times 10^6 \sim 8 \times 10^5$ CFU/mL 之间, 两浓度间的距离比例为: (高于 50% 感染百分数 - 50) ÷ (高于 50% 感染百分数 - 低于 50% 感染百分数) = (60 - 50) ÷ (60 - 16.7) = 0.23, 则 *H. pylori* 致细胞空泡变性作用的 TCID₅₀ 值为: $[40 - (40 - 8) \times 0.23] \times 10^5 = 3.26 \times 10^6$ CFU/mL, 这一结果表明, 以 3.26×10^6 CFU/mL 的 NCTC 11637 感染 SGC-7901 细胞时, 约 50% 的细胞发生空泡变性。

表 2 NCTC 11637 致细胞空泡变性作用的 TCID₅₀ 值计算

<i>H. pylori</i> 浓度 (CFU/mL)	细胞培养空泡变性孔数 /细胞总孔数	累积孔数		空泡病变	
		空泡变性孔数	未病变孔数	比例	百分率
1.0×10^8	4/4	11	0	11/11	100.0
2.0×10^7	4/4	7	0	7/7	100.0
4.0×10^6	2/4	3	2	3/5	60.0
8.0×10^5	1/4	1	5	1/6	16.7
1.6×10^5	0/4	0	9	0/9	0
3.2×10^4	0/4	0	13	0/13	0

用同样的方法计算从消化性溃疡患者分离的 22 株 *H. pylori* (Tox⁺) 和从慢性胃炎患者分离的 5 株 *H. pylori* (Tox⁺) 的 TCID₅₀ 值。比较两组 *H. pylori* (Tox⁺) 的 TCID₅₀ 值的结果表明, 来源于消化性溃疡患者的 *H. pylori* (Tox⁺) 的 TCID₅₀ 值为 $(3.78 \pm 1.34) \times 10^6$ CFU/mL, 显著低于来源于慢性胃炎患者 *H. pylori* (Tox⁺) 的 TCID₅₀ 值 $[(20.14 \pm 1.87) \times 10^6$ CFU/mL] ($p < 0.01$) (表 3)。

表 3 分离自消化性溃疡和慢性胃炎患者的 *H. pylori* (Tox⁺) 的 TCID₅₀ 值

组别	TCID ₅₀ ($\times 10^6$ CFU/mL)
消化性溃疡	$3.78 \pm 1.34^{**}$
慢性胃炎	20.14 ± 1.87

(** $p < 0.01$ vs group of chronic gastritis; Data represent mean \pm SD)

3 讨论

本实验在分离自消化性溃疡、慢性胃炎和胃癌的 *H. pylori* 中, *H. pylori* (Tox⁺) 株所占比例未见显著差异, 但发现来自于消化性溃疡的 *H. pylori* (Tox⁺) 较来自慢性胃炎的 *H. pylori* (Tox⁺) 毒力更强, 有更低的 TCID₅₀ 值, 即引起细胞空泡变性所需要的浓度更低。Kodama 等的研究也获类似结果^[6], 即同样是 *H. pylori* 毒力株, 由于来源不同, *H. pylori* 产生 VacA 的量或活性不同, 认为这可能与 vacA 基因型有关。Atherton 等发现, 在现有或既往患消化性溃疡的病人所感染的 *H. pylori* 中有 90% 为 s1 型, 而非溃疡患者感染的 *H. pylori* 只有 45% 为 s1 型^[7]。该作者的另一项调查显示 vacA s1a 型与胃窦部淋巴细胞和中性粒细胞浸润有关, vacAm1 型与胃上皮细胞的损伤呈正相关, 而 s1a 与 m1 二者均与空泡毒素的活性相关^[8]。Wang 等对来自台湾患者的 179 株 *H. pylori* 基因分析及其与临床表现相关性的研究显示, s1a/m1T 型 *H. pylori* (s1a/m1 型高度同源) 分泌的空泡毒素的活性显著高于 s1a/m2 型, 且感染了 s1a/m1T 型 *H. pylori* 的人群患消化性溃疡的危险性也显著高于感染其他类型 *H. pylori* 的人群, 该结果表明 s1a/m1T 型 *H. pylori* 株具有较强的毒素活性, 并与高的溃疡发生率相关^[9,10]。这些工作均提示 *H. pylori* 的不同生物学活性表现与其 vacA 基因变异有关^[11], 感染不同的 *H. pylori* 菌株将可能造成不同的病理特征和临床结局。

关于 VacA 引起细胞变性的机制, 目前尚未定论, 但 *H. pylori* VacA 可能通过多种途径发生的致细胞空泡变, 在 *H. pylori* 损伤胃粘膜上皮细胞的过程中起着非常重要的作用。深入研究 *H. pylori* VacA 基因型和表现型的多态性及其与临床结局之间的关系, 将有助于阐明 *H. pylori* 的致病机制, 并为 *H. pylori* 相

关疾病的防治提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] Marshall B J, Warren J R, Normre J R, et al. *Lancet*, 1983, **2**: 1273 ~ 1275.
- [2] Nardone G, Staibano S, Rocco A, et al. *GUT*, 1999, **44**(6): 789 ~ 799.
- [3] Kohda K, Tanaka K, Aiba Y, et al. *Gut*, 1999, **44**(4): 456 ~ 462.
- [4] Leunk R D, Cain C C, Tsien R Y, et al. *Rev Infect Dis*, 1991, **43**(Suppl 8): S686 ~ 689.
- [5] 杜 平, 范中善, 郭葆玉. 病毒的细胞致病效应实验. 见: 杜 平主编. 医用实验病毒学. 第一版. 北京: 人民军医出版社, 1985. 107 ~ 109.
- [6] Kodama K, Fujioka T, Ito A, et al. *Kansenshogaku Zasshi*, 1998, **72**(10): 1027 ~ 1034.
- [7] Atherton J C, Ping C, Peek R M, et al. *J Biol Chem*, 1996, **270**: 17771.
- [8] Atherton J C, Peek R M Jr, Tham K T, et al. *Gastroenterology*, 1997, **112**(1): 92 ~ 99.
- [9] Wang H J, Kuo C H, Yeh A A, et al. *J Infect Dis*, 1998, **178**(1): 207 ~ 212.
- [10] Wang H J, Chang P C, Kuo C H, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **250**(2): 397 ~ 402.
- [11] Henning E E, Trzeciak L, Regula J, et al. *Scand J Gastroenterol*, 1999, **34**(8): 743 ~ 749.

VACUOLATION EFFECT OF *HELICOBACTER PYLORI* ON GASTRIC EPITHELIAL CELLS

Yang Yi Deng Changsheng Peng Junzhong

(Department of Gastroenterology of 2nd Affiliated Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: This study was designed to observe vacuolation effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. The *H. pylori* isolates derived from patients with peptic ulcer, chronic gastritis and gastric cancer were plated on common selective medium and their vacuolation effects on SGC-7901 cells were compared. The percentage of *H. pylori* (Tox⁺) strain in clinical isolates from different gastroduodenal diseases had no significant difference. The toxicity of the *H. pylori* (Tox⁺) strain from peptic ulcer was significantly higher than that from chronic gastritis.

Key words: *Helicobacter pylori*, Cytopathic effect, Vacuolation