

[文章编号] 1000-2200(2005)06-0487-03

·基础医学·

# 幽门螺杆菌及其 CagA 基因感染与胃癌关系的研究

王启之<sup>1</sup>, 于东红<sup>2</sup>, 汪强武<sup>1</sup>, 吴炎<sup>3</sup>, 燕善军<sup>1</sup>, 田怡<sup>4</sup>, 周蕾<sup>2</sup>, 承泽农<sup>2</sup>

[摘要] 目的: 通过检测胃癌和浅表性胃炎组织幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)和细胞毒素相关蛋白基因(CagA), 探讨 Hp 及 CagA 基因与胃癌相关性及其 Hp 形成胃癌的可能机制。方法: 应用快速尿素酶试验和组织切片革兰染色和血清 Hp CagA 抗体检测 Hp, 用 PCR 检测 Hp CagA 基因。结果: 慢性浅表性胃炎、胃癌组织中 Hp 检出率分别为 45.9% 和 54.8%, 两者差异无显著性( $P > 0.05$ ), 两种组织中 Hp CagA 检出率分别为 35.3% 和 77.5%, 两者差异有显著性( $P < 0.005$ )。结论: 胃癌组织与浅表性胃炎组 Hp 感染相比差异无显著性, 胃癌组织中 Hp CagA 基因检出率明显高于浅表性胃炎组, Hp CagA 基因与胃癌有一定相关性, Hp CagA 基因可能涉及胃癌的形成机制。

[关键词] 胃肿瘤; 幽门螺杆菌; 细胞毒素相关蛋白基因; 胃炎, 浅表性

[中国图书资料分类法分类号] R 735.2 [文献标识码] A

## Study of the relationship between the *Helicobacter pylori* and CagA gene in patients with gastric carcinoma

WANG Qi-zhi<sup>1</sup>, YU Dong-hong<sup>2</sup>, WANG Qiang-wu<sup>1</sup>, WU Yan<sup>3</sup>, YAN Shan-Jun<sup>1</sup>, TIAN Yi<sup>4</sup>, ZHOU Lei<sup>2</sup>, CHENG Ze-nong<sup>2</sup>

(1. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004; 2. Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu 233003; 3. Department of Gastroenterology, Central Hospital of Nanshan District, Shenzhen 518052; 4. Department of Gastroenterology, Central Hospital of Minhang District, Shanghai 201100, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship between the expression of *Helicobacter pylori* (Hp), cytotoxic-associated gene A (CagA) and gastric cancer (GC), as well as the possible mechanism of Hp infection leading to oncogenesis by examining the Hp and CagA of patients with GC and chronic superficial gastritis (CSG). **Methods:** Hp was examined by rapid urease test, gram stain and serum CagA antibodies. CagA gene of Hp was tested by polymerase chain reaction (PCR). **Results:** There was no difference in the positive rates of Hp between CSG and GC (45.9% vs 54.8%,  $P > 0.05$ ), but the difference was significant in the positive rates of CagA gene between them (35.3% vs 77.5%,  $P < 0.005$ ). **Conclusions:** The positive rate of CagA gene in the GC group is significantly higher than that in the CSG group. Hp is correlated to CagA gene and GC. Hp CagA may be involved in the formation of gastric cancer.

[Key words] stomach neoplasms; *Helicobacter pylori*; cytotoxic-associated gene A; gastritis, superficial

胃癌是最常见的恶性肿瘤, 探讨胃癌的病因学和发病机制一直是科研工作者研究热点。幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)与胃癌发生密切相关, Hp 可通过诱发炎症、调节癌基因和抑癌基因的表达、诱导胃黏膜上皮增殖和凋亡异常及其代谢产物包括一些酶类、毒素和蛋白直接损害胃黏膜引起胃癌发生。本文旨在检测胃癌和浅表性胃炎胃黏膜 Hp 及其 CagA 基因, 探讨 Hp 及其 CagA 基因与胃癌的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料 标本: 胃癌和浅表性胃炎组织取自我院

[收稿日期] 2005-03-07

[基金项目] 安徽省科技厅重点科研项目(01041180)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院附属医院 消化科, 安徽 蚌埠 233004; 2. 蚌埠医学院 病理学教研室, 安徽 蚌埠 233003; 3. 广东省深圳市南山区中心医院 消化科, 518052; 4. 上海市闵行区中心医院 消化科, 201100

[作者简介] 王启之(1963—), 男, 安徽太和县人, 主任医师, 副教授, 硕士生导师。

2002 年 3 月~2003 年 9 月胃镜活检标本, 胃癌 186 例, 其中男 102 例, 女 84 例; 浅表性胃炎 74 例, 其中男 48 例, 女 26 例。所选病例电子胃镜下观察为胃癌和浅表性胃炎, 病变处再取 6 块活检标本, 其中 4 块送病理检查, 1 块作尿素酶试验, 1 块装于无菌进口冻存管, 冷冻于 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存。快速尿素酶试验试剂盒: 三明三强公司; 幽门螺杆菌免疫印迹试剂盒: 深圳伯劳特生物制品有限公司; UNIQ 柱式临床样品基因组抽提试剂盒: 上海生工生物工程技术有限公司; CagA 基因引物 1 序列: 5'-GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G-3', 引物 2 序列: 5'-CTG CAA AAG ATT GTT TGC GAG A-3', 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 快速尿素酶试验 采用快速尿素酶试验试剂盒检测, 试纸不变色(仍为黄色)为阴性, 变色(如紫红色)为阳性, 胃黏膜组织 Hp 感染的轻、中、重度分别以+、++、+++表示。

1.2.2 血清 Hp CagA 抗体检测 每位患者于胃镜检查结束后抽取静脉血 2 ml, 常温下分离血清, 抗

体检测按试剂盒中所述步骤进行,待阳性带显色清楚,干燥后对比标准带判断结果。

1.2.3 病理切片革兰染色找 Hp 根据活检标本的病理号(见病历或活检标本病理出来后取胃镜报告单所登记)找到病理教研室的存档蜡块,并切病理薄片,行革兰染色,油镜下(10×100)观察并计数,每例随机观察 10~15 个视野,分别取 Hp 平均数, Hp 均数  $\geq 20$  个定为阳性,  $< 20$  个或未查见 Hp 则为阴性,以排除因染色原因而造成的假阳性。Hp 呈螺旋形、“S”形或海鸥形。

1.2.4 Hp CagA 基因检测 取活检胃黏膜组织块(-80℃保存),未等解冻,用研钵研碎收集到 1.5 ml 无菌离心管中,用 200TE 悬浮,柱式临床样品基因组抽提试剂盒(操作步骤详见说明书)提取出 DNA 样品, -4℃或 -20℃保存。反应体系如下: 10×PCR 缓冲液 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L dNTP 1  $\mu$ l, 引物 1、2 各取 1.5  $\mu$ l, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ l, TaqDNA 酶 1  $\mu$ l, Hp DNA 提取液 5  $\mu$ l, water(无核酸酶)32  $\mu$ l, 石蜡油 20  $\mu$ l 覆盖。于 94℃预变性 5 min 后, 94℃1 min(变性)55℃1 min(退火)72℃1.5 min(延长)35 个循环后, 72℃延伸 10 min。取 PCR 产物 6  $\mu$ l 于琼脂糖凝胶电泳。电泳条件 87.5 mV, 30 min 于紫外线透射仪上观察,于 349 bp 处出现橙黄色条带为 CagA 基因阳性。

1.3 统计学方法 采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

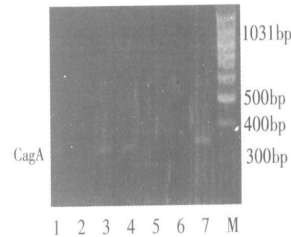
革兰染色找 Hp, 结合快速尿素酶试验及免疫印迹试验检测血清 Hp CagA 抗体三者有两项阳性确定 Hp 感染。胃癌和浅表性胃炎标本中 CagA 基因的 PCR 扩增产物检测结果见图 1; 胃癌和浅表性胃炎标本 Hp 和 CagA<sup>+</sup> 株感染率的结果显示, 胃癌组 Hp 感染率与浅表性胃炎组 Hp 感染率相比差异无显著性( $P > 0.05$ ), 而胃癌组 CagA<sup>+</sup> 株感染率则显著高于浅表性胃炎组( $P < 0.05$ )(见表 1)。

## 3 讨论

自 1983 年 Mashall 等首次从胃黏膜中分离出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)以来, Hp 研究成为学术界的热点, 业已证实, Hp 是慢性胃炎和消化性溃疡的主要致病因子, 并研究 Hp 感染与胃癌相关。1994 年 WHO 国际癌症研究会把 Hp 定为 I 类致癌原<sup>[1]</sup>。

Scotiniotis 等<sup>[2]</sup> 研究胃癌患者与胃黏膜 Hp 感染关系, 发现 Hp 感染患者中细胞的增殖和凋亡均增加, 且增加的程度与炎症的程度呈正相关。Hp 感

染时, 胃黏膜上皮细胞的增殖明显增加, 但尚不清楚 Hp 感染是同时诱发了细胞增殖与凋亡, 还是仅诱发了其中之一。



M: DNA 分子量标准; 1、7 为胃癌组织 CagA 基因阳性带; 4、6 为慢性浅表性胃炎组织 CagA 基因阳性带; 3 为慢性萎缩性胃炎组织 CagA 基因阳性带; 2.5 为 CagA 基因阴性

图 1 胃癌和慢性胃炎组织 CagA 基因 PCR 扩增产物

表 1 胃癌和浅表性胃炎标本 Hp 和 CagA<sup>+</sup> 株感染率比较

分组	Hp			CagA <sup>+</sup> 株		
	例数	感染数	感染率(%)	例数	感染数	感染率(%)
胃癌组	186	102	54.8	102	79	77.5
浅表性胃炎组	74	34	45.9	34	12	35.3
合计	260	136	52.3	136	91	66.9
$\chi^2$		1.68			20.47	
P		> 0.05			< 0.005	

1990 年, Cover 等<sup>[3]</sup> 发现具有空泡毒素活性的 Hp 培养液中全部可以查到相对分子量为 12 800 的蛋白质, 它虽不直接表达毒素活性, 但与毒素活性表达密切相关, 可作为细胞毒性的标志, 称为细胞毒素相关蛋白, 即 CagA。目前世界范围内对 Hp CagA 基因和 CagA 与胃十二指肠疾病的关系报道结果众说纷纭。

本次研究发现胃癌 Hp 感染率 54.8%, 浅表性胃炎 Hp 感染率 45.9%, 两者差异无显著性( $P > 0.05$ ); 胃癌 CagA 基因表达率 77.5%, 浅表性胃炎 CagA 基因表达率 35.3%, 两者相比差异有显著性( $P < 0.005$ )。这是因为 Hp 菌株又分为两大类: (1) I 型菌株, 高毒力株含有 CagA 基因, 同时表达 CagA 蛋白与 Vac 蛋白; (2) II 型菌株, 低毒力株, 不含有 CagA 基因。可能是胃癌组感染的 Hp 多为 I 型菌株, 即高毒力株(含有 CagA 基因)有关。也可能是胃组织发生癌变后, 由于癌变组织的组织学发生改变, 胃内环境变化很大, 原来的环境已不适合 Hp 细菌的生存, 而致 Hp 死亡或迁移, 表现为 Hp 感染率的降低, 最终导致胃癌组和浅表性胃炎组 Hp 感染率差异无显著性。

Parsonnet 等<sup>[4]</sup> 经过对 179 例患者的平均 14.2 年的随访发现, CagA 阳性的 Hp 菌株感染者发展成胃癌是无 Hp 感染者的 5.8 倍。Blaser 研究发现 CagA 阳性的 Hp 菌株感染能明显加重胃黏膜的损

伤,使其失去正常的上皮细胞结构,感染有 CagA 基因的 Hp 菌株明显增加胃癌的危险性。众多研究表明,CagA 是 Hp 重要毒力因子,与胃癌发生密切相关<sup>[5]</sup>。Moss 等<sup>[6]</sup>研究认为,CagA 阳性 Hp 可造成胃黏膜上皮损伤,使上皮细胞增殖与凋亡失衡,最终导致胃癌的发生。本研究亦发现,CagA 基因在胃癌组织中高表达,高于浅表性胃炎,两者差异有显著性( $P < 0.005$ ),亦提示 CagA 基因与胃癌的发生有关。

胃癌的形成机制非常复杂,决不可能只由一个因素引起或一个基因控制。Hp 感染致胃癌的病因学缺乏生物学依据,此外,胃癌组织还有相当一部分 CagA 基因不表达,甚至 Hp 检测也为阴性,进一步说明癌变机制可能有 Hp CagA<sup>+</sup>株感染外的其他机制参与,值得进一步探讨。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] Wang TG, Fox JG. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Koch's postulates fulfilled [J]. *Gastroenterology*, 1998, 115(3): 780~783.
- [2] Scotiniotis IA, Rokkas T, Furth EE, et al. Altered gastric epithelial cell kinetics in *Helicobacter pylori* associated intestinal metaplasia [J]. *Int J Cancer*, 2000, 85(2): 192~200.
- [3] Cover TL, Dooley CP, Blaser MJ. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity [J]. *Infect Immun*, 1990, 58(3): 603~610.
- [4] Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, et al. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection [J]. *Gut*, 1997, 40(3): 297~301.
- [5] 张万岱,姚永莉.幽门螺杆菌致病因子的研究现状与展望 [J]. 中华消化杂志, 2002, 22(5): 299~300.
- [6] Moss SF, Sordillo EM, Abdalla AM, et al. Increased gastric epithelial cell apoptosis associated with colonization with CagA<sup>+</sup> *Helicobacter pylori* strains [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(4): 1406~1411.

[ 文章编号 ] 1000-2200(2005)06-0489-01

·短篇报道·

# 以双侧乳房发育为首发症状的甲状腺机能亢进 1 例

潘曙升

[ 关键词 ] 甲状腺机能亢进; 男子女性型乳房

[ 中国图书资料分类号 ] R 581.1 [ 文献标识码 ] B

患者男性,40岁。2005年2月2日因双侧乳房肿痛半月余就诊外科门诊,当时无怕热、多汗,无心悸,伴失眠。查体:右侧乳房可触及黄豆大小肿块,左侧乳房可触及蚕豆大小肿块各一枚,质韧轻度触痛,予以左侧乳房肿块针吸穿刺病理检查后,诊为双侧乳房发育症。2005年3月22日患者因双侧乳房继续增大伴失眠、易激动、多食、怕热、多汗及双眼外凸就诊我院。查体:甲状腺机能亢进(甲亢)面容,突眼,眼裂增宽,双侧视野无缺损(目测),双侧乳房发育,无乳汁分泌,心率102次/分,律齐,无病理性杂音。指颤(+),无胫前水肿,腱反射亢进。辅助检查: T<sub>3</sub> 5.9 nmol/L; T<sub>4</sub> 169.1 nmol/L; TSH < 0.2 IU/L; PRL 8.36 mg/L; TM-Ab 11.5%。TR-Ab 阳性。全胸片:两肺纹理增多,余未见异常。垂体薄层扫描:垂体积偏大,最大层面大小为9 mm×16 mm,高约12 mm,密度尚均,边缘光整,鞍上池形态正常,所扫描颅骨未见骨质破坏。2005年4月7日南京军区总医院放射免疫实验室性激素测定: T 36.6 nmol/L, E<sub>2</sub> 0.23 nmol/L, FSH 7.6 IU/L; LH 8.9 IU/L; PRL 214.8 mIU/L。诊断为(1)甲状腺功能亢进(2)双侧乳房发育原因待查。予以甲巯咪唑 10 mg 每天3次,普萘洛尔 10 mg 每天3次,治疗1个月,患者怕热多汗、多食、失眠等症明显改善,双侧肿大乳房变软缩小,乳晕着色减退,乳核明显缩小。2005年5月20日复诊,已无怕热、多汗、多食、失眠、急躁等症,双侧乳房完全消退,已无

乳核,无触痛,但仍有突眼。

讨论 男性出现双侧乳腺发育,应同垂体病变、药物性乳房发育、乳腺肿瘤进行鉴别。本例患者泌乳素、性激素、促性腺素测定、垂体影像学检查结果以及后来患者对抗甲亢治疗的反应,可以排除因垂体病变所引起的以性激素改变为主要特征的乳腺发育。患者就诊前未服用性激素、H<sub>2</sub>受体阻滞剂、降压药、多巴胺激动剂、抗心律失常药,近3个月没有使用抗生素,故可排除药物引起的乳腺发育。其乳腺组织活检以及病情的转归亦可排除乳腺肿瘤。综上所述可以认为,患者乳腺发育是甲亢的一种临床表现。

作为男性甲亢患者,以乳腺发育为首发临床表现国内报道不多。1994~2004年有7篇文献报道10例,其共同点为乳腺发育随甲亢的发生而发生,随甲亢的加重而加重,当甲亢症状得到控制时乳腺发育停止而转为消退。但没有追踪患者甲亢复发时乳腺发育情况。Graves病患者出现乳腺发育的内在机制主要有两种解释:(1)为游离 E<sub>2</sub> 与游离 T 的比值可能升高,而刺激乳腺增生<sup>[1]</sup>;(2)为血清 LH 水平增高<sup>[2]</sup>。本例 LH 未升高,故与之不符。亦有文献报道甲状腺激素可引起性激素结合球蛋白增加(结合睾酮增加,游离睾酮减少大于 E<sub>2</sub>)和对外周芳香化酶也有促进作用,使睾酮转化为 E<sub>2</sub> 增多<sup>[3]</sup>。从而比较支持游离 E<sub>2</sub> 与游离 T 比值学说。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] 王广芬,郑师璧.以男性乳腺增生为首发症状的 Graves 病 3 例报告 [J]. 福建医学院学报, 1995, 29(1): 77~78.
- [2] Braunstein GD. Aromatase and gynecomastia [J]. *Endocr Relat Cancer*, 1999, 6(2): 315~324.

[ 收稿日期 ] 2005-06-09

[ 作者单位 ] 安徽省郎溪县人民医院 内科, 242100

[ 作者简介 ] 潘曙升(1970—),男,安徽郎溪县人,主治医师。