

二甲基亚硝胺诱发大鼠肝纤维化模型中库普弗细胞与星状细胞的分布

朴金花, 金京顺, 崔京淑, 朴东明

朴金花, 金京顺, 崔京淑, 朴东明, 延边大学医院病理科 吉林省延吉市 133000

通讯作者: 朴东明, 133000, 吉林省延吉市局子街119号, 延边大学医院病理科, pdm11172000@yahoo.com.cn

电话: 0433-2660121 传真: 0433-2513610

收稿日期: 2005-08-03 接受日期: 2005-08-10

Distribution of Kupffer Cells and hepatic stellate cells in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Jin-Hua Piao, Jing-Shun Jin, Jing-Shu Cui, Dong-Ming Piao

Jin-Hua Piao, Jing-Shun Jin, Jing-Shu Cui, Dong-Ming Piao, Department of pathology, Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China

Correspondence to: Dong-Ming Piao, Department of pathology, Hospital of Yanbian University, 119 Juzi Street, Yanji 133000, Jilin Province, China. pdm11172000@yahoo.com.cn

Received: 2005-08-03 Accepted: 2005-08-10

Abstract

AIM: To investigate the distribution and significance of Kupffer cells (KCs) and hepatic stellate cells (HSCs) in dimethylnitrosamine(DMN)-induced liver fibrosis in rats.

METHODS: Rat liver fibrosis was induced by peritoneal injection of DMN(10 g/L)for 4 wk. The activities of serum alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase(AST), the contents of total proteins(TP), the ratio of liver/body weight and the area density of collagenous fiber were examined 4 and 7 wk after injection. Meanwhile, the pathological changes of the liver tissues were observed under light microscope. The expression of ED1 and α -smooth muscle actin(α -SMA) were detected by immunohistochemical SP method.

RESULTS: Compared with those in the control group, the levels of ALT and AST were significantly elevated 4 and 7 wk after injection(4 wk: 1201.91 ± 215.04 , 5741.15 ± 1000.20 nkat/L vs 398.91 ± 106.35 , 1365.27 ± 435.09 nkat/L, $P < 0.01$; 7 wk: 745.15 ± 413.42 , 2355.47 ± 1418.62 nkat/L vs 289.72 ± 43.01 , 1018.54 ± 215.04 nkat/L, $P < 0.05$). TP content was significantly decreased 4 wk after injection (50.32 ± 9.81 g/L vs 69.67 ± 6.09 g/L, $P < 0.01$), but returned to normal after 7 wk. The ratio of liver/body

weight was decreased(4 wk: $2.156 \pm 0.539\%$ vs $2.950 \pm 0.147\%$, $P < 0.01$; 7 wk: $2.250 \pm 0.638\%$ vs $2.863 \pm 0.158\%$, $P < 0.01$), but the area density of collagenous fiber was increased 4 and 7 wk after injection ($9.90 \pm 1.93\%$ vs $1.27 \pm 0.28\%$, $P < 0.01$; $9.20 \pm 0.97\%$ vs $1.46 \pm 0.67\%$, $P < 0.01$). Diffuse cirrhosis was observed in most model rats after 4 wk and it was still significant after 7 wk. The ED1 and α -SMA positive cells aggregated prominently in the fibrotic tissue and septa in the model rats.

CONCLUSION: DMN induces obviously liver dysfunction and diffuse cirrhosis in rats, and KCs are closely associated with the activation of HSCs.

Key Words: Dimethylnitrosamine; Liver fibrosis; Rats; Hepatic stellate cell; Kupffer cell

Piao JH, Jin JS, Cui JS, Piao DM. Distribution of Kupffer cells and hepatic stellate cells in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rat. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2138-2141

摘要

目的: 探讨二甲基亚硝胺(DMN)诱发大鼠肝纤维化库普弗细胞(kupffer cell, KC)与肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的分布及意义。

方法: 用10 g/L DMN腹腔注射4 wk制备大鼠肝纤维化模型, 实验第4、7周末检测大鼠血清ALT、AST活性及总蛋白(total proteins, TP)含量, 测定肝/体质量比及肝组织胶原纤维的面密度、观察肝组织的病理变化, 免疫组化采用SP法观察KC和HSC标志物ED1及 α -SMA的表达及分布。

结果: 第4周模型组与正常组比较血清ALT、AST活性显著升高($P < 0.01$), TP含量和肝/体质量比明显下降($P < 0.01$), 肝组织内胶原纤维面密度明显升高, 大部分形成弥漫性肝硬化; 第7周模型组除了血清TP含量无变化外ALT、AST活性仍维持较高水平, 并维持肝硬化的特点。免疫组化染色第4、7周模型组ED1和 α -SMA阳性细胞数量明显增加, 两种细胞分布的部位相同, 主要在增生的纤维组织及纤维间隔弥漫分布, 在肝实质内少量散在分布。

结论: DMN引起大鼠肝功能明显障碍, 大部分形成弥漫肝

硬化, KC与HS的分布表明KC与激活、活化HSC密切相关.

关键词: 二甲基亚硝胺; 肝硬化; 大鼠; 肝星状细胞; 库普弗细胞

朴金花, 金京顺, 崔京淑, 朴东明. 二甲基亚硝胺诱发大鼠肝纤维化库普弗细胞与星状细胞的分布. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2138-2141

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2138.asp>

0 引言

在各种原因引起肝脏疾病时, 库普弗细胞 (Kupffer cell, KC) 可在内毒素的介导下产生多种细胞因子, 通过多种机制参与肝纤维化的调控, 其中心环节是激活肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC). 近10多年来国内外利用二甲基亚硝胺 (DMN) 研究大鼠肝纤维化的报道较多, 但有关该模型肝KC与HSC的研究报道甚少. 本实验用DMN制备大鼠肝纤维化模型, 观察KC和HSC的表达, 探讨肝纤维化形成过程中两种细胞的分布及意义.

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar δ 大鼠32只, 清洁级, 体质量160-180 g (延边大学实验动物中心提供). 血清ALT、AST及TP检测试剂盒购自Eiken Chemical (Tokyo, Japan) 公司; DMN购自美国Sigma公司; 直接红 (Direct Red 80) 购自美国Aldrich Chem公司; 免疫组化试剂: Mous抗Rat ED1是英国Serotec公司产品, 单克隆鼠抗人 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 是Denmark Dako公司产品, SP试剂盒购自北京中山生物技术公司.

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 参照Matsuda *et al*^[1]的方法, 实验动物随机分为2组, 模型组 ($n = 20$): 10 g/L DMN (生理盐水稀释) 1 mL/kg连续3 d/wk, 腹腔内注射共4 wk. 正常组 ($n=12$): 注射用生理盐水1 mL/kg连续3 d/wk, 腹腔内注射共4 wk. 实验第4、7周末模型组各选10只、正常组各选6只大鼠, 测定体质量后用乙醚麻醉, 心脏采血离心处理.

1.2.2 血清生化指标的测定 血清ALT、AST活性测定采用Reiman氏方法, TP含量采用Biuret法, 严格按Kit说明书进行操作, 利用分光光度计 (Uitraspec 4050, LKB, Switzerland) 测定吸光度, 对照标准曲线计算AST、ALT

活性和TP的含量.

1.2.3 病理学检查 肝/体质量百分比: 采血后立即取肝脏称质量, 计算肝/体质量百分比. 病理学观察: 取肝左叶组织经40 g/L中性甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, 行HE染色光镜下观察肝组织的病理变化: 直接红染色 (1 g/L直接红苦味酸饱和液) 观察纤维组织的增生程度, 并利用彩色病理图象分析系统 (CMIAS, 北京航空航天大学) 检测胶原纤维的面密度, 观察条件: 物镜4倍, 每张切片随机选4个视野, 图象采集、分割处理, 参数统计分析, 得出目标总面积/统计场总面积之比值. 免疫组织化学染色: 切片厚4-5 μ m, 常规脱蜡至水, 用SP法进行免疫组织化学染色, ED1工作浓度为1:500, α -SMA工作浓度为1:50.

统计学处理 资料采用SPSS10.0软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 模型制备过程 第3周时模型组大鼠死亡1只, 第7周时死亡2只. 第4周模型组血清ALT和AST活性明显升高, TP含量明显下降 ($P < 0.01$); 第7周模型组血清ALT及AST仍维持较高水平 ($P < 0.05$), TP含量与正常组相似; 第4、7周模型组肝/体质量比明显下降 ($P < 0.01$), 胶原纤维面密度明显增加 ($P < 0.01$, 表1).

2.2 病理学变化 正常组肝小叶结构正常, 无变性、坏死及出血, 汇管区见少量纤维组织. 第4周模型组肝小叶结构紊乱, 肝细胞变性、灶状或片状坏死, 汇管区内大量纤维组织增生, 并形成较粗的纤维间隔深入肝组织内形成大小不等的假小叶 (7/9). 第7周肝组织病理变化较第4周略减轻, 但仍维持肝硬化的特点 (7/8). 免疫组化染色结果: 正常组ED1阳性细胞在汇管区、中央静脉周围和肝实质内少量散在分布; 在中央静脉壁有少量 α -SMA阳性表达, 汇管区各种血管壁阳性表达, 肝细胞间无阳性细胞. 模型组第4、7周肝组织内KC (ED1+) 和HSC (α -SMA+) 数量明显增多, 两种细胞分布的部位相同, 主要在增生的纤维组织及纤维间隔弥漫分布, 在肝实质内少量散在分布 (图1-2).

3 讨论

DMN是一种具有肝毒性、基因毒性和免疫毒性的化学物

表1 实验第4 wk、7 wk末各项指标的检测结果

时间	组别	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	TP (g/L)	肝/体质量比 (%)	面密度 (%)
4 wk	正常组	398.91 \pm 106.35	1365.27 \pm 435.09	69.67 \pm 6.09	2.950 \pm 0.147	1.27 \pm 0.28
	模型组	1201.91 \pm 215.04 ^b	5741.15 \pm 1000.20 ^b	50.32 \pm 9.81 ^b	2.156 \pm 0.539 ^b	9.90 \pm 1.93 ^b
7 wk	正常组	289.72 \pm 43.01	1018.54 \pm 215.04	63.56 \pm 4.55	2.863 \pm 0.158	1.46 \pm 0.67
	模型组	745.15 \pm 413.42 ^a	2355.47 \pm 1418.62 ^a	63.10 \pm 5.69	2.250 \pm 0.638 ^b	9.20 \pm 0.97 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常组.

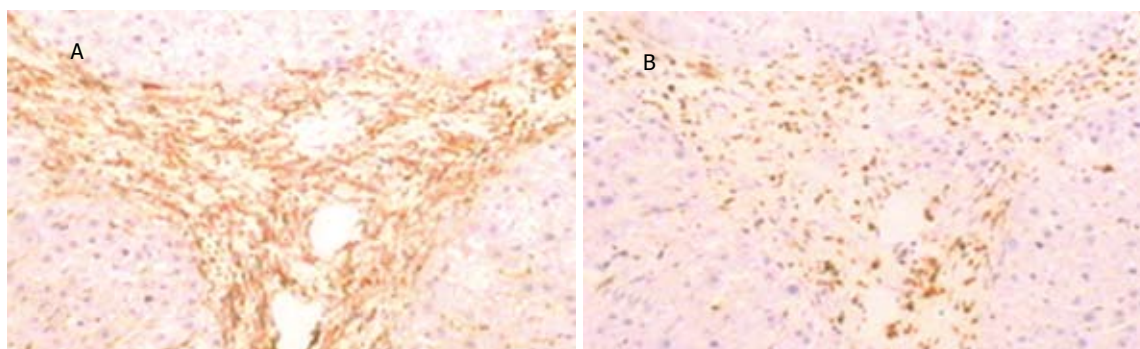


图1 第4周模型组 ($\times 100$). A: α -SMA; B: ED-1.

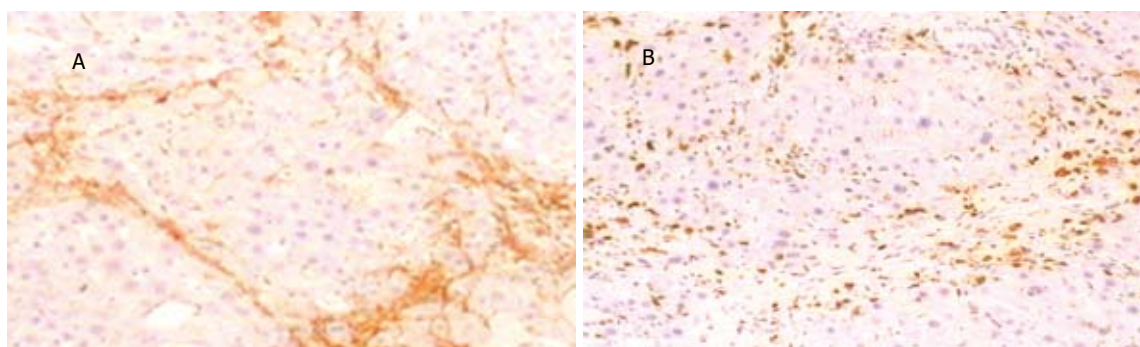


图2 第7周模型组 ($\times 100$). A: α -SMA; B: ED-1.

质, 小剂量长期给药可发生肝肿瘤, 大剂量发生肝细胞坏死和肝纤维化, 给药途径主要是腹腔内注射. 实验动物腹腔注射DMN 4 wk后形成与人酒精性肝硬化相似的病理所见. CCl_4 诱发大鼠肝纤维化的模型在停止攻击后有自然恢复的倾向, 但DMN模型有停药后仍维持肝硬化几个月特点^[2,3].

本实验第4周模型组与正常组比较, 血清ALT、AST活性明显升高, TP含量明显下降, 表明肝功能损伤严重, 第7 wk末除TP含量无明显变化以外, ALT、AST活性仍维持较高水平, 表明肝功能损伤仍较明显, 与陈文慧 *et al*^[4]报道相似. 第4周模型组肝/体质量比明显减少, 胶原纤维面密度明显增高; 病理学观察表明肝细胞排列紊乱, 失去正常结构, 汇管区大量纤维组织增生, 并形成较粗的纤维间隔深入肝实质, 大部分形成大小不等的假小叶. 第7周模型组与第4周比较肝/体质量比稍增加, 胶原纤维面密度略减少, 肝组织病理变化略减轻, 但仍维持肝硬化的特点.

肝纤维化形成的中心通路是肝细胞损伤、坏死, 刺激和激活KC, 是启动纤维化的重要因素. KC参与肝纤维化的形成, 主要通过释放转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、血小板衍生生长因子(PDGF)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等细胞因子, 作用于HSC使其增殖和合成细胞外基质. HSC转化为成纤维样细胞或肌纤维细胞后表达 α -SMA. 正常肝组织中有两种KC, 第一种是小的、ED1阳性而ED2阴性的细胞, 主要位于门脉血管和中央静脉周围; 第二种是大的、ED1和ED2均阳性, 沿着血窦分布的细胞称为肝组织

巨噬细胞^[5]. 单克隆抗体ED1可识别全部单核巨噬细胞系统的细胞, 包括几乎全部肝KC. Orfila *et al*^[6]用 CCl_4 诱发大鼠肝纤维化, 9 wk后ED1阳性细胞明显增加, 主要位于纤维间隔; Bhunchet *et al*^[7]用猪血清诱发大鼠肝纤维化, ED1阳性细胞在新、旧纤维间隔和肝被膜纤维变性部位显著聚集; Hori *et al*^[8]用硫代乙酰胺诱发大鼠肝纤维化, 6 wk后ED1阳性细胞数量明显增加, 位于纤维间隔部位. Baba *et al*^[9]用猪血清诱发3种不同种系大鼠(BN、SD及Wistar)肝纤维化, 8 wk后3种大鼠都形成很多小的假小叶, 免疫组化染色表明CD3、ED1及 α -SMA阳性细胞数量增加. Jeong *et al*^[10]用 CCl_4 诱发大鼠肝纤维化, 免疫组化染色发现肝纤维化发展时肝巨噬细胞和肌纤维母细胞的数量增加, 而发生肝硬化后减少. 最近国内应用巨噬细胞标志物CD68, 采用免疫组化SP法观察肝癌及肝硬化组织中巨噬细胞的数量和分布的报道^[11-12]. 范建高 *et al*^[13]采用免疫组化二步法观察了大鼠非酒精性脂肪性肝炎组织中的KC, 结果模型组KC数显著增加, 但利用DMN制备肝纤维化动物模型观察肝KC和HSC的研究尚未见报道. 本组结果表明模型组第4、7周KC和HSC分布的部位相同, 均在增生的纤维组织及纤维间隔弥漫分布, 与国外报道的其他肝纤维化模型中的分布相似, 表明在DMN诱发大鼠肝纤维化的发生中KC与HSC关系密切, 深入研究KC在肝纤维化发生、发展中的作用机制, 明确其在肝纤维化中的作用才有可能解决肝纤维化的治疗问题, 与KC有关的抗肝纤维化的治疗已有研究报道^[14], 最近Imamura *et al*^[15]认为阻断巨噬细胞

浸润,抑制HSC激活,可制止肝纤维化的发生.

4 参考文献

- 1 Matsuda Y, Matsumoto K, Yamada A, Ichida T, Asakura H, Komoriya Y, Nishiyama E, Nakamura T. Preventive and Therapeutic Effects in Rats of Hepatocyte Growth Factor Infusion on Liver Fibrosis/ Cirrhosis. *Hepatology* 1997;26:81-89
- 2 徐光福, 张凤朝. DMN诱发大鼠肝硬化模型MMP-2活性的动态变化. *世界华人消化杂志* 2005;13:902-905
- 3 Tsukamoto H, Matsuoka M, French S. Experimental Models of Hepatic Fibrosis: A Review. *Seminars in Liver Dis* 1990;10:56-65
- 4 陈文慧, 刘平, 徐光福等. 脂质过氧化在二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化形成过程中的作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:645-648
- 5 Armbrust T, Ramadori G. Functional characterization of two different Kupffer cell populations of normal rat liver. *J of Hepatol* 1996;25:518-528
- 6 Orfila C, Lepert JC, Alric L, et al. Expression of THF-alpha and immuno-histochemical distribution of hepatic macrophage surface markers in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rat. *Histochem J* 1999;31:677-85
- 7 Bhunchet E, Eishi Y, Wake K. Contribution of immune response to the hepatic fibrosis induced by porcine serum. *Hepatology* 1996;23:811-817
- 8 Hori Y, Sato S, Yamate J, Kurasaki M, Nishihira J, Hosokawa T, Fujita H, Saito T. immunohistochemical study of macrophage migration inhibitory factor in rat liver fibrosis induced by thioacetamide. *Eur J Histochem* 2003;47:317-324
- 9 Baba Y, Uetaska K, Nakayama H, Dot K. Rat strain differences in the early stage of porcine-serum-induced hepatic fibrosis. *Exp Toxicol Pathol* 2004;55:325-330
- 10 Jeong WI, Lee CS, Park SJ, et al. Kinetics of macrophages, myofibroblasts and mast cells in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis. *Anticancer Res* 2002;22:869-877
- 11 Liu K, He X, Lei XZ, Zhao LS, Tang H, Liu L, Lei BJ. Pathomorphological study on location and distribution of Kupffer cells in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1946-1949
- 12 陈罡, 罗殿中, 郭芳, 李萍. 肝癌及肝硬化组织中巨噬细胞和NK细胞的研究. *现代肿瘤医学* 2005;13:307-310
- 13 范建高, 钟岚, 王国良, 巫协宁, 李明升, 靖大道, 张丕利. 枯否氏细胞在大鼠非酒精性脂肪性肝炎发病中的作用. *中华肝脏病杂志* 2001;9:16-18
- 14 周馨, 李宣海, 李定国. 库普弗细胞与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2002;10:65-68
- 15 Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, et al. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology* 2005;128:138-146

编辑 王谨辉 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

胃癌组织环氧合酶-2表达与幽门螺杆菌cagA⁺菌株感染

张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 王钊, 陈虹彬

张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 王钊, 陈虹彬, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083

通讯作者: 张勇, 610083, 四川省成都市天回镇, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科. zhangyol967@163.com

电话: 028-86570349

收稿日期: 2005-07-19 接受日期: 2005-07-28

General Hospital of Chengdu Military Command of Chinese PLA, Chengdu 610083, Sichuan Province, China.

Correspondence to: Yong Zhang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Military Command Chinese PLA, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. zhangyol967@163.com

Received: 2005-07-19 Accepted: 2005-07-28

Relationship between expression of cyclooxygenase-2 and cagA⁺ *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinoma

Yong Zhang, Ming-De Jiang, Wei-Zheng Zeng, Hui Xu, Zhao Wang, Hong-Bin Chen

Yong Zhang, Ming-De Jiang, Wei-Zheng Zeng, Hui Xu, Zhao Wang, Hong-Bin Chen, Department of Gastroenterology,

Abstract

AIM: To explore the relations of cagA⁺ *Helicobacter pylori* infection with the expression of cyclooxygenase-2 (COX2) in human gastric carcinogenesis.

METHODS: In situ polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the expression of *H. pylori* cagA gene, and immunohistochemical technique was used to detect the expression of COX2 in 56 patients with gastric carcinoma.

RESULTS: The rates of *cagA*⁺ *H. pylori* infection and COX2 expression were 55.4% and 71.4%, respectively, in gastric carcinoma. The level of COX2 expression was significantly higher in the gastric carcinoma of III-IV stage than I-II stage (14/30 vs 5/26, $P < 0.05$), and was also higher in gastric carcinoma with lymph node metastasis than that without lymph node metastasis (4/19 vs 15/37, $P < 0.01$). *CagA*⁺ *H. pylori* infection was not correlated with TNM stage and lymph node metastasis in gastric carcinoma ($P > 0.05$). The level of COX2 expression was significantly higher in *cagA*⁺ *H. pylori* group than that in *cagA*⁻ *H. pylori* group (15/31 vs 4/25, $P < 0.05$).

CONCLUSION: *CagA*⁺ *H. pylori* infection is not related with the malignant progression of gastric carcinoma, but COX2 expression is involved in the carcinogenesis and malignant progression of gastric carcinoma. *CagA*⁺ *H. pylori* infection up-regulates the expression of COX2 in gastric cancer.

Key Words: *CagA*⁺ *H. pylori*; Cyclooxygenase-2; *In situ* polymerase chain reaction; Immunohistochemical technique

Zhang Y, Jiang MD, Zeng WZ, Xu H, Wang Z, Chen HB. Relationship between expression of cyclooxygenase-2 and *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13 (17):2141-2144

摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)*cagA*菌株感染及环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX2) 表达在胃癌发生中的作用及两者的关系。

方法: 采用原位聚合酶链反应(PCR)技术及免疫组织化学技术检测56例胃癌手术标本*cagA*基因及COX2蛋白表达情况。

结果: 胃癌组织*H. pylori cagA*菌株感染率为55.4%, COX2在胃癌组织中表达率为71.4%。COX2表达水平在Ⅲ-Ⅳ期胃癌组显著高于Ⅰ-Ⅱ期胃癌组(14/30 vs 5/26, $P < 0.05$); 有淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组(4/19 vs 15/37, $P < 0.01$); *H. pylori cagA*菌株感染与TNM分期及淋巴结转移无关($P > 0.05$)。COX2表达水平在*H. pylori cagA*阳性组显著高于*H. pylori cagA*阴性组(15/31 vs 4/25, $P < 0.05$)。

结论: *H. pylori cagA*菌株感染与胃癌的恶性进展无关; COX2的表达参与胃癌的发生及恶性进展。*H. pylori cagA*菌株感染能上调胃癌组织COX2的表达。

关键词: *CagA*⁺ *H. pylori*感染; 环氧合酶-2; 原位聚合酶链反应; 免疫组织化学

张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 王钊, 陈虹彬. 胃癌组织环氧合酶-2表达与幽门螺杆菌*cagA*⁺菌株感染. *世界华人消化杂志* 2005;13(17):2141-2144
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2141.asp>

0 引言

在胃癌发生的诸多因素中, 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)被世界卫生组织国际癌症研究机构列为一类致癌因子。而含*cagA*基因的*H. pylori*菌株为高毒菌株, 与胃癌的关系可能更为密切^[1], 但其确切的致癌机制仍不清楚。环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX2)是与肿瘤发生密切相关的前列腺素合成酶之一, 许多类型的炎症细胞因子、各种促癌因素等均可诱导体内组织产生COX2。*H. pylori cagA*菌株能引起胃黏膜的炎症反应, 其能否诱导COX2的表达及两者在胃癌发生、发展中的关系值得探讨。我们采用原位聚合酶链反应(PCR)及免疫组织化学技术检测胃癌组织中*H. pylori cagA*基因及COX2表达情况, 探讨*H. pylori cagA*菌株感染、COX2表达在胃癌发生中的作用及其相互关系, 为胃癌的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选择我院1998年以来手术切除胃癌胃组织标本56例。诊断均经病理检查证实。其中男31例, 女25例, 年龄32-69岁, 平均50.8岁。有淋巴结转移37例, 无淋巴结转移19例。TNM分期: 参照1978年制定的我国胃癌TNM分期法, I期 11例, II期15例, III期 17例, IV期13例。

1.2 方法

1.2.1 原位PCR扩增检测*cagA*基因感染率 *H. pylori cagA*基因引物序列由中国军事医学科学院二所合成。引物序列: 引物1: 5'-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3'; 引物2: 5'-TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT-3'。常规石蜡切片, 二甲苯脱蜡、梯度酒精水化, 0.2 mmol/L HCl酸化, 1 mg/L蛋白酶K消化, RNA酶消化, 40 g/L多聚甲醛固定; PCR扩增: 在10 μL/张切片的反应液中, 含4 mmol/L MgCl₂、400 μmol/L dNTPs (其中1/4 dUTP由Bio-11-dUTP取代)、1 U Taq酶、*cagA*基因引物各2 mg/L, 加盖硅化玻片, 指甲油密封, 热循环条件: 94℃预变性5 min; 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35个循环; 72℃ 10 min延伸。检测: 30 g/L BSA封闭1 h, AV-AP 37℃ 30 min, BCIP和NBT显色, 核固红复染, 紫蓝色颗粒为阳性。分别以无Bio-11-dUTP, 无Taq酶及无引物条件下作为阴性对照。

1.2.2 免疫组织化学检测环氧合酶蛋白表达 常规石蜡切片; 10 mL/L H₂O₂甲醇孵育15 min, 山羊血清封闭15 min; 滴加1:50稀释的COX2一抗, 37℃孵育2 h, 滴加生物素化二抗(1:200), 37℃ 30 min; 滴加辣根过氧

化物酶标记的卵白素, 37℃ 30 min; DAB显色; 苏木素复染; 脱水透明、中性树脂封片. 同时用PBS代替一抗作为空白对照, 以已知阳性反应的大肠癌组织作阳性对照. 光镜下($\times 400$)随机选取10个视野, 每个视野计数100个细胞, 取其均值, 无表达或阳性细胞数5%为表达阴性(-), <30%为弱阳性(+), 30-50%为阳性(++), >50%为强阳性(+++).

统计学处理 各组*H. pylori* cagA感染率用百分数表示, 进行 χ^2 检验, COX2用等级资料表示, 进行秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有显著意义.

2 结果

2.1 胃癌组织*H. pylori* cagA基因、COX2表达及其临床病理特征 *H. pylori* cagA基因在胃癌组织中表达率为55.4%, COX2在胃癌组织中表达率为71.4%. COX2表达水平在III-IV期胃癌组显著高于I-II期胃癌组($P < 0.05$); 有淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组($P < 0.01$), 提示COX2表达水平与TNM分期及淋巴结转移有关. *H. pylori* cagA基因表达水平与TNM分期及淋巴结转移无关($P > 0.05$) (表1).

表1 COX2表达及幽门螺杆菌感染与胃癌临床病理特征的关系

临床病理特征		<i>n</i>	COX2				cagA	
			-	+	++	+++	-	+
TNM分期	I-II期	26	10	5	6	5	11	15
	III-IV期	30	6	1	9	14 ^a	14	16
淋巴结转移	有	37	7	5	10	15	19	18
	无	19	9	1	5	4 ^b	6	13

^a $P < 0.05$ vs TNM I-II期; ^b $P < 0.01$ vs 淋巴结转移组.

cagA基因阳性信号为紫蓝色颗粒, cagA基因分布于癌组织及癌旁组织胞浆、胃腺腔、黏膜上皮细胞表面(图1), 且以癌旁组织表达为主. COX2阳性信号为棕黄色颗粒, 主要表达于肿瘤细胞胞浆及核膜, 间质细胞少量表达(图2).

2.2 胃癌组织COX2表达与*H. pylori* cagA表达的关系 COX2表达水平在*H. pylori* cagA阳性组显著高于*H. pylori* cagA 阴性组($P < 0.05$, 表2).

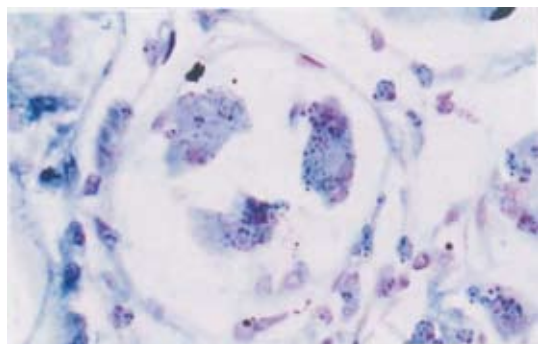


图1 胃癌组织cagA基因表达(原位PCR法, $\times 400$).

表2 胃癌组织COX2表达与*H. pylori* cagA表达的关系

分组	<i>n</i>	COX2			
		-	+	++	+++
cagA ⁺	31	6	2	8	15
cagA ⁻	25	10	4	7	4 ^b

^b $P < 0.01$ vs cagA⁺组.

3 讨论

流行病学资料提示长期*H. pylori*感染可导致胃黏膜萎缩、肠上皮化生及异型增生, 最终形成胃癌^[2]. cagA基因株为高毒菌株, 与胃癌及癌前疾病关系更为密切^[3,4]. Kuiper *et al*^[5]发现血清cagA抗体阳性患者萎缩性胃炎发生率为62.0%, 阴性组为32.0%, 差异显著. Parsonnet *et al*^[6]通过对14 a前库存血液作*H. pylori* cagA抗体的检测及随访, 发现cagA阳性感染者与*H. pylori*阴性者相比, 发生胃癌的危险性明显增高(OR值约为2.2). 我们在以往的研究^[7]显示cagA基因在癌前病变中有较高的表达率, 且能引起胃黏膜更为明显的炎症反应, 导致胃黏膜上皮细胞的损伤. 提示cagA菌株感染是胃癌发生的一个早期事件. 其引起胃癌发生的机制尚不清楚, 可能与以下因素有关: cagA菌株感染后胃黏膜壁细胞损害, 导致胃酸分泌减少, 胃内细菌过度生长, 促使硝酸盐降解为亚硝酸盐和亚硝胺等致癌物^[1]; 激活炎症反应中多种细胞因子、自由基和一氧化氮(NO)的释放, 导致DNA损伤及刺激细胞增生; cagA蛋白可能促进细胞凋亡抑制基因Bcl-2表达, 诱导抑癌基因p53突变, 从而使细胞增生和凋亡失平衡, 最终导致胃癌的发生^[8]. 其与进展期胃癌的关系如何? 该研究结果提示cagA基因在III-IV期、I-II期胃癌组中均表达; 有、无淋巴结转移组无显著差异, 且cagA基因在胃癌组织中的表达以癌旁组织为主, 推测随着疾病由慢性胃炎→萎缩→肠化→异型增生→胃癌的发展, *H. pylori*生存的局部环境发生变化, 不利于细菌生长, 使*H. pylori*难以定植, 或导致*H. pylori*死亡, *H. pylori*的致病作用逐渐减小, 故*H. pylori* cagA菌株感染与胃癌的恶性进展无关.

许多研究显示COX2在胃癌前病变及胃癌组织中表达增加. Lim *et al*^[9]检测胃癌组织标本104例, 发现70.2%

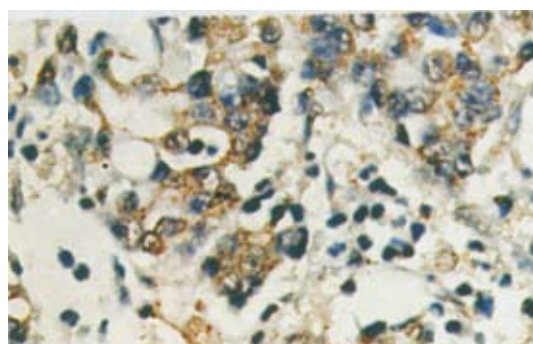


图2 胃癌组织COX2蛋白表达(SP法, $\times 400$).

的病例有COX2蛋白的高表达,而正常黏膜没有COX2蛋白表达.汪步海 *et al*^[10]对内镜诊断并手术证实的36例 *H. pylori*阳性胃癌患者的癌组织及其邻近组织标本中COX2的表达状况进行了回顾性分析,免疫组化染色显示,COX2蛋白在肠上皮化生、异型增生和胃癌中阳性率分别为72.2% (13/18)、77.8% (14/18)和83.3% (15/18),三组间无显著性差异.但也有研究^[11]认为,随着癌前病变的进展COX2蛋白表达递增.说明COX2的过表达是胃癌发生的早期事件,其与胃癌的恶性进展关系如何?该研究结论显示COX2在胃癌组织中表达率为71.4%,且COX2表达水平在III-IV期胃癌组显著高于I-II期胃癌组($P<0.05$)、有淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组($P<0.01$),提示COX2表达水平与TNM分期及淋巴结转移相关.说明COX2不仅与早期胃癌的发生有关,同时与胃癌的恶性进展密切相关,在胃癌的发生、发展中起着重要的作用.其机制可能经多种途径^[12, 13]如促进细胞增生、抑制细胞凋亡、调节肿瘤新生血管形成和增加癌细胞的侵袭性等而发挥致癌和促癌作用.

cagA菌株感染及COX2表达两者在胃癌变中的作用是两个独立的因素或是相互关联尚不清楚.近来体外研究^[14]显示 *H. pylori*能诱导胃黏膜细胞株COX2的表达.国内陆红 *et al*^[15]研究显示 *H. pylori*感染可使慢性胃炎患者胃黏膜COX2表达增加,根除 *H. pylori*后其COX2表达水平下降. *H. pylori*的高毒菌株-cagA阳性菌株感染与胃癌中COX2的表达关系如何值得探讨.我们的结果显示COX2表达在cagA阳性组明显高于cagA阴性组,提示胃癌组织中cagA菌株感染能上调COX2的表达. cagA菌株感染可通过介导COX2的表达在胃癌的发生中起重要作用. cagA菌株诱导COX2表达可能与其引起胃黏膜炎性反应、上皮细胞损伤、刺激生长因子及炎症介质的释放有关.本组资料显示cagA阴性的胃癌组织中仍有COX2表达,提示除 *H. pylori* cagA菌株感染之外尚有其他因素及机制参与调节COX2的表达.因此根除 *H. pylori*和COX2抑制剂是预防和控制胃癌发生的重要途径.

4 参考文献

- 1 Farinati F, Cardin R, Russo VM, Busatto G, Franco M, Rugge M. *Helicobacter pylori* CagA status, mucosal oxidative damage and gastritis phenotype: a potential pathway to cancer? *Helicobacter* 2003;8:227-234
- 2 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002;47:107-113
- 3 张沥, 张玲霞, 张宁霞, 刘永国, 阎小君, 韩锋产, 侯瑜. 幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白A与胃癌关系的病例对照研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:593-595
- 4 卢启明, 张丽萍, 姜瑞, 张岫兰, 李淑兰, 曹萍, 石丽清, 陈翔, 薛群基. 胃癌高发区人群CagA⁺幽门螺杆菌与胃黏膜病变的关系. *世界华人消化杂志* 2005;13:408-410
- 5 Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the cagA status. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1777-1780
- 6 Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997;40:297-301
- 7 张勇, 曾维政, 蒋明德, 陈晓斌, 徐辉, 陈虹彬. 胃癌组织中 *H. pylori* cagA基因表达. *第四军医大学学报* 2002;23:451-454
- 8 杜雅菊, 赵晶, 赵瑞波, 李宝杰. 幽门螺杆菌CagA蛋白与胃癌组织中Bcl-2、p53蛋白表达的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11:554-557
- 9 Lim HY, Joo HJ, Choi JH, Yi JW, Yang MS, Cho DY, Kim HS, Nam DK, Lee KB, Kim HC. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:519-525
- 10 汪步海, 汪竹, 童建东, 钱伟, 侯晓华. 环氧化酶-2蛋白在胃癌患者肠上皮化生、异型增生及癌灶中的表达. *中华消化内镜杂志* 2003;20:179-181
- 11 孙为豪, 俞谦, 曹大中, 欧希龙, 俞婷, 钱斌, 朱峰, 孙运良. 幽门螺杆菌感染和环氧合酶-2表达在胃癌发生中的作用. *肿瘤* 2004;24:38-41
- 12 朱瑞平, 邓长生, 朱尤庆, 黄俊军. 环氧合酶-2调控血管内皮生长因子表达的研究. *中华消化杂志* 2003;23:470-472
- 13 Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY. Upregulated cyclooxygenase-2 inhibits apoptosis of human gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 2000;45:2436-2443
- 14 Smith GV, Farthing MJ. The effect of ascorbic acid on *Helicobacter pylori* induced cyclooxygenase 2 expression and prostaglandin E2 production by gastric epithelial cells *in vitro*. *Helicobacter* 2005;10:83-89
- 15 陆红, 陈晓宇, 刘文忠, 彭延申, 萧树东. 幽门螺杆菌感染对胃黏膜环氧合酶-2表达的影响. *中华消化杂志* 2001;21:287-289

编辑 王谨辉 审读 张海宁