

幽门螺杆菌感染者胃上皮细胞凋亡与维生素C 之间的关系

晏楠,吕农华,陈江

晏楠,北京市263医院消化内科 北京市 101149
 吕农华,陈江,江西医学院第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006
 项目负责人:晏楠,101149,北京市,北京263医院消化内科. yn1992@sohu.com
 收稿日期:2002-08-06 接受日期:2002-10-03

摘要

目的:研究幽门螺杆菌(Hp)感染者细胞凋亡与胃液维生素C (VitC) 含量之间的关系。

方法:用切口末端标记法(TUNEL)对Hp阳性的十二指肠球部溃疡(DU)、胃溃疡(GU)、癌前病变、胃癌患者以及组织学上正常的Hp阴性者各10例的胃黏膜活检组织进行细胞凋亡检测,并测定其胃液中的 VitC 含量。

结果:细胞凋亡从Hp阳性的十二指肠溃疡 胃溃疡 癌前病变 胃癌 Hp阴性的正常组织逐渐减少,凋亡指数分别为 17.5%、15.1%、9.2%、5.1%、2.5%。除胃溃疡与球部溃疡之间无统计意义外($P > 0.05$),其他各组之间相互比较的差别均有统计学意义($P < 0.05$)。VitC含量从正常组织(34.8 ug/ml) 十二指肠溃疡(18.6 ug/ml) 胃溃疡(16.5 ug/ml) 癌前病变(11 ug/ml) 胃癌(6.2 ug/ml) 逐渐下降;除DU与GU组之间无统计意义外,其他各组之间相互比较的差别均有统计学意义($P < 0.01$)。HP根除以后细胞凋亡显著下降,VitC含量明显增高至正常水平。HP阳性的十二指肠溃疡、胃溃疡细胞凋亡指数与VitC含量呈显著负相关($P < 0.05$),而癌前病变组和胃癌组,细胞凋亡指数与VitC含量之间均无显著相关性($P > 0.05$)。

结论:上述结果提示(1) Hp感染可能诱导胃上皮细胞凋亡,并使胃液 VitC 含量减少,使机体失去对 VitC 的保护作用,这可能是 Hp 导致胃癌的机制之一,补充 VitC 可能有助于预防胃癌的发生;(2)在Hp感染早期,胃液 VitC 含量的减少可能促进胃上皮细胞凋亡。因此,根除 Hp 使胃腔 VitC 浓度升高,以减少细胞凋亡可能有助于预防胃癌的发生。

晏楠,吕农华,陈江.幽门螺杆菌感染者胃上皮细胞凋亡与维生素C 之间的关系. 世界华人消化杂志 2003;11(1):94-96
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/94.htm>

0 引言

目前有多项研究认为 Hp 感染能诱导胃上皮细胞的凋亡,但其机制目前尚不十分清楚,有证据表明 Hp 感染能引起胃液 VitC 含量的减少,而胃液 VitC 的减少被认为胃癌发生的重要机制之一。在目前有关 Hp 感染中二者是否有关的国内外研究甚少,本研究旨在探讨二

者之间的关系,并分析其在胃癌发生中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 实验组为 Hp 阳性的胃癌患者 10 例、Hp 根除前后的十二指肠球部溃疡和胃溃疡各 10 例、病理证实有萎缩性胃炎伴不完全大肠化生或者不典型增生等癌前病变者共 10 例,对照组为胃黏膜组织学正常的 Hp 阴性者 10 例。所有病例在进入实验前 1 mo 内均未接受抗生素或其他非甾体类抗炎药物的治疗。Hp 的根除治疗采用三联疗法(洛塞克 20 mg 1 次/d、阿莫仙 0.5 g 3 次/d、灭滴灵 0.2 g 3 次/d 共 2 wk),停药至少 4 wk 后复查胃镜。

1.2 方法

1.2.1 组织标本 经胃镜取胃窦部黏膜活检组织作 Hp 的检测,如尿素酶试验均阳性,细菌培养和组织学检查(Giemsa 染色)2 项至少 1 项阳性者判断为 Hp 感染,3 项检查均为阴性者判断为 Hp 根除。同时在活检前取胃液 5 mL 作 VitC 等检测,如混有血液或有胆汁反流者弃用。胃液离心 20 min,3 000 rpm,取上清液置 -20 °C 待测。

1.2.2 细胞凋亡检测采用切口末端标记法(TUNEL) 试剂为德国原装进口宝灵曼产品(Cat.No.1684817)具体操作按说明书。细胞核中有棕色颗粒者为阳性细胞。每张切片至少观察 5 个连续视野,每个视野计数 100 个上皮细胞中的凋亡细胞数,以平均数为凋亡指数(apoptotic index, AI)。

1.2.3 VitC 的测定 试剂为南京建成生物工程研究所产品。操作步骤按说明。

统计学处理 方差分析,配对 t 检验, Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 Hp 感染与细胞凋亡

2.1.1 实验组与对照组细胞凋亡指数比较 与 Hp 阴性的正常者相比, Hp 阳性的 DU、GU、癌前病变及胃癌患者的细胞凋亡指数明显增加(表 1)。

表 1 Hp 阳性的实验组与 Hp 阴性的对照组 AI 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AI
十二指肠球部溃疡组	10	17.5 ± 5.2 ^b
胃溃疡组	10	15.1 ± 4.4 ^b
癌前病变组	10	9.2 ± 3.2 ^b
胃癌组	10	5.1 ± 1.6 ^a
正常对照组	10	2.5 ± 0.7

组间比较 $F=36.7, P < 0.01$, 进一步 q 检验结果:与对照组比较, $q > 7.6, {}^b P < 0.01$, $q = 3.42, {}^a P < 0.05$. 各实验组两两比较 $q > 4.48, P < 0.01$.

2.1.2 Hp 根除前后 AI 比较 Hp 根除以后细胞凋亡指数有显著下降(表 2).

表 2 Hp 根除前后 AI 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	治疗前	治疗后
十二指肠球部溃疡组	17.5 ± 5.2	3.3 ± 1.0 ^b
胃溃疡组	15.1 ± 4.4	3.7 ± 1.1 ^b
癌前病变组	9.2 ± 3.2	3.9 ± 1.8 ^b

根除后 $t > 6.5$, $P < 0.01$.

2.2 Hp 感染与 Vit C

2.2.1 Hp 阳性的各实验组与 Hp 阴性的正常对照组 Vit C 水平比较 Hp 阳性的各实验组 VitC 水平明显低于 Hp 阴性的正常对照组(表 3).

表 3 各实验组与对照组 VitC 水平($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

组别	VitC 浓度
十二指肠溃疡组	18.6 ± 5.3
胃溃疡组	16.5 ± 4.2
癌前病变组	11.0 ± 2.4
胃癌组	6.2 ± 2.9
正常对照组	34.8 ± 7.8

各组间比较 $F=48.87$, $P < 0.01$, 进一步 q 检验结果:与对照组比较, $q > 10.4$, P 均 < 0.01 .

2.2.2 Hp 根除前后胃液 Vit C 浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)比较 Hp 根除以后 VitC 浓度明显恢复到接近正常水平(表 4).

表 4 Hp 根除前后胃液 VitC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)浓度之间的相互比较

组别	治疗前	治疗后
十二指肠溃疡组	18.6 ± 5.3	33.5 ± 7.4
胃溃疡组	16.5 ± 4.2	31.4 ± 9.4
癌前病变组	11.0 ± 2.4	26.5 ± 10.8

根除前后比较, $t > 4.58$, $P < 0.01$.

2.3 Hp 阳性的各实验组 AI 与 VitC 之间的关系 在 Hp 感染的十二指肠溃疡组、胃溃疡组 AI 与 VitC 呈显著负相关($r = -0.7$ 及 -0.75 , $P < 0.05$), 而癌前病变组和胃癌组 AI 与 VitC 之间无明显相关性($r = -0.55$ 及 -0.55 , $P > 0.05$).

3 讨论

3.1 Hp 感染与细胞凋亡之间的关系 从慢性胃炎 肠化 不典型增生 胃癌的演变过程是肠型胃癌发生的规律, 而 Hp 感染可能是这一过程的始动因子^[1]. Hp 的感染在其他致癌因素(如宿主因素及多种环境因素等)共同作用下促使正常胃黏膜细胞向癌细胞转化. 近年来

的研究表明肿瘤的发生不但与细胞的过度增生有关, 而且与细胞的过度抑制有关, 多数学者认为 Hp 引起的胃黏膜上皮细胞动力学改变即细胞凋亡和增生变化可能在胃十二指肠疾病的发生过程中起着非常重要的作用.

本研究证实: Hp 阴性者细胞凋亡的发生很少, 且仅见于胃黏膜的浅层, 而 Hp 感染者细胞凋亡显著增加, 不仅见于黏膜浅层, 而且在黏膜深层甚至固有层也可发生. 这与国内外的研究一致^[2-4]. Hp 根除以后细胞凋亡的发生显著减少, 从胃十二指肠溃疡 肠化或不典型增生 胃癌细胞凋亡指数呈现逐渐减少的趋势, 这一结果符合胃癌发生的理想模式, 提示 Hp 感染与胃上皮细胞凋亡增加有关, 大量的细胞凋亡可能是 Hp 感染致胃十二指肠疾病的形成机制^[5]. 胃黏膜上皮细胞增生和凋亡的失衡^[6,7]以及宿主在 Hp 感染时的胃酸分泌状态可能决定 Hp 感染后的最终结果^[8,9]. 如果细胞凋亡活跃, 细胞增生减少, 宿主胃酸分泌高, 则可能形成十二指肠溃疡, 若此时宿主胃酸分泌低则可能形成萎缩性胃炎、胃溃疡, 如果细胞增生活跃, 凋亡减少, 宿主胃酸分泌过低, DNA 复制错误增多则易发生细胞累积性疾病如恶性病变. 随着 Hp 的根除, 细胞凋亡明显减少, 溃疡愈合速度明显加快, 而 Hp 未根除者细胞凋亡无明显改变, 溃疡愈合率明显降低. 通过对 Hp 进行干预性治疗以减少细胞凋亡的发生, 可能有利于提高 Hp 相关性胃十二指肠疾病的治愈率, 降低其复发率, 最终可能减少胃癌的发生.

我们对 200 多例 Hp 感染的十二指肠溃疡、胃溃疡、萎缩性胃炎伴肠化或不典型增生患者使用三联疗法根除 Hp, 其总的根除率为 80%, 与国内外报道基本一致^[10-12]. 对于经济条件不发达地区把洛赛克 20 mg 2 次/d 减为 1 次/d, 同时适当延长抗生素的用药时间也不失为一种有效而经济的根除 Hp 的治疗方案. 对 Hp 阳性的 10 例胃癌患者的凋亡指数进行进一步的分析, 发现 3 例分化程度较好的患者比 7 例分化程度差的患者的细胞凋亡指数高(平均凋亡指数为 6.8% vs 4.4%), 这可能反映分化好的胃癌细胞自然生长缓慢的特征, 分化差的胃癌可能存在着细胞凋亡逃避机制^[13-16].

3.2 Hp 感染与 VitC 之间的关系 VitC 是一种重要的抗氧化剂, 他对胃黏膜具有抗氧化性保护作用. 研究表明, 人的正常胃黏膜具有分泌 VitC 的生理功能, 使其胃液浓度高于血浆浓度, 而 Hp 感染可能抑制胃黏膜分泌 VitC, 使胃液 VitC 的浓度减少^[17-20].

本研究表明, 在 Hp 阴性的正常组织其胃液 VitC 的浓度较高, 而在 Hp 阳性的十二指肠溃疡、胃溃疡、癌前病变以及胃癌患者中, VitC 浓度很低且依次递减, Hp 根除以后 VitC 浓度基本恢复至正常水平. 这一结果提示胃液 VitC 的减少与 Hp 感染有关, 胃液 VitC 的减少可能是胃癌发生的重要因素. Hp 感染何以使胃液 VitC

减少的机制目前尚不十分清楚,有研究表明 CagA+ 菌株感染者胃液 VitC 的浓度明显低于 CagA- 菌株感染者^[22,23],这可能由于 CagA + 菌株致胃炎程度较重所致。由于 Hp 感染可能使空腹胃酸减少,又可引起中性粒细胞、巨噬细胞的浸润,从而使抗坏血酸氧化能力增强,这可能是 Hp 致胃液 VitC 减少的重要机制。在 Hp 根除以后,随着空腹胃酸的增高、炎症反应的减轻, VitC 浓度逐渐恢复到正常水平,可能有利于胃黏膜的修复过程,甚至有可能预防胃癌的发生。

3.3 细胞凋亡与 VitC 之间的关系 由于 VitC 是一种重要的抗氧化剂,可以与亚硝酸盐反应阻止内源性 N-硝基化合物的形成,从而阻止氧化 DNA 的损伤和突变,因此有可能阻止细胞凋亡的发生。

本研究发现在 Hp 阳性的十二指肠溃疡、胃溃疡患者中细胞凋亡与 VitC 的浓度呈负相关 (r 值分别为 -0.7、-0.75),而癌前病变和胃癌患者其细胞凋亡与 VitC 之间无明显相关性 (P > 0.05)。我们推测在 Hp 感染的早期, VitC 浓度的减低使胃黏膜失去 VitC 的保护作用而使受损的 DNA 增多,从而引起细胞凋亡显著增加,随着病理演变进一步发展,由于机体免疫机制遭到破坏,抗凋亡蛋白增多,细胞增生加强,受损的细胞可能逃避细胞凋亡机制,而使细胞凋亡呈代偿性减少。通过根除 Hp 以提高胃液 VitC 的浓度有望逆转或阻断胃黏膜细胞的恶性转化。有研究表明单用 VitC 可能减少细胞凋亡的发生^[24,25]。因此,我们认为在 Hp 根除时适当补充 VitC 可能有利于减少 DNA 的损伤,有助于机体免疫功能的恢复,补充 VitC 可作为抗 Hp 的辅助治疗措施^[26]。

总之,通过 Hp 的成功根除,胃黏膜上皮细胞的凋亡显著减少,而胃液 VitC 的浓度恢复至正常水平,因此我们有理由认为根除 Hp 对预防胃癌的发生有着潜在而重要的作用。

4 参考文献

- Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric Carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995;19:S37-43
- 卢世云,潘秀珍,彭孝伟,施作霖. 幽门螺杆菌感染与胃上皮细胞增生和凋亡. *世界华人消化杂志* 1999;7:760-762
- 姚金锋,姚希贤. 慢性萎缩性胃炎与幽门螺杆菌感染的关系. *世界华人消化杂志* 2000;8:1042-1045
- Kato K, Ohara S. Alteration of cellular turnover in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol* 2002;35:312-314
- Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implication in gastric Carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:16-26
- Rokkas T, Ladas S, Liatsos C, Petridou E, Papatheodorou G, Theocharis S, Karameris A, Raptis S. Relationship of *Helicobacter pylori* Cag A status to gastric cell proliferation and apoptosis. *Dig Dis Sci* 1999;44:487-493
- Anti M, Armuzzi A, Iacone E, Valenti A, Lippi ME, Covino M, Vecchio FM, Pierconti F, Buzzi A, Pignataro G, Bonvicini F, Gasbarrini G. Epithelial-cell apoptosis and proliferation in *Helicobacter pylori*-related chronic gastritis. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998;30:153-159
- McColl KE, El-Omar E, Gillen D. *Helicobacter pylori* gastritis and gastric physiology. *Gastroenterol Clin North Am* 2000;29:687-703
- McColl KE, El-Omar E, Gillen D. Interactions between *Helicobacter pylori* infection, gastric-acid secretion and anti-secretory therapy. *Bri Med Bull* 1998;54:121-138
- Kiyota K, Habu Y, Sugano Y, Inokuchi H, Mizuno S, Kimoto K, Kawai K. Comparison of 1-week and 2-week triple therapy with omeprazole, amoxicillin, and clarithromycin in peptic ulcer patients with *Helicobacter pylori* infection: results of a randomized controlled trial. *J Gastroenterol* 1999;34(suppl 11):76-79
- Houben MH, Hensen EF, Rauws EA, Hulst RW, Hoff BW, Ende AV, Kate FJ, Tytgat GN. Randomized trial of omeprazole and clarithromycin combined with either metronidazole or amoxicillin in patients with metronidazole-resistant or susceptible *Helicobacter pylori* strains. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:883-889
- Savarino V, Zentilin P, Bisso G, Pivari M, Mele MR, Mela GS, Mansi C, Vigneri S, Termini R, Celle G. Head-to-head comparison of 1-week triple regimens combining ranitidine or omeprazole with two antibiotics to eradicate *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13: 643-649
- 林静,王超,景燕,庞有成,杨红,乔进朋,陈勃,姚希贤. 胃癌组织中内分泌细胞的表达及与细胞凋亡的关系. *世界华人消化杂志* 2000;8: 1054-1055
- 申兴斌,赵晓明,胡建功,金小平,王军. 胃癌组织中细胞凋亡及 PCNA 表达的意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:1050-1052
- 刘海峰,刘为纹,房殿春. 胃癌前病变及胃癌中细胞凋亡与细胞增生间关系的研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:649-651
- Masutani M, Suzaki J, Matsuda T, Dochin A, Sadaoka K, Nomura A, Ohira K, Takahashi K, Yamazaki K, Dosaka A, Kita H, Nishimura M, Kawakami Y. Increased apoptosis associated with depressed type of early intestinal gastric cancer. *Jhn J Cancer Res* 2001;92:1214-1219
- Phullp S, Price AB, White KL, Schorah CJ, Jacyna MR. Gastrointestinal mucosal vitamin C levels in *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:361-366
- Woodward M, Tunstallpedoe H, McColl KE. *Helicobacter pylori* infection reduces systemic availability dietary vitamin. *C Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:233-237
- Zhang ZW, Patchett SE, Perret D, Katelari S, Domizio P, Farthing MJ. The relation between gastric Vitamin C concentrations, mucosal histology and cagA seropositivity in human stomach. *Gut* 1998; 43:322-32
- Kockar C, Ozturk M, Bavbek N. *Helicobacter pylori* eradication with beta-carotene, ascorbic acid and allicin. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2001;44:97-100
- Reed PI. Effects of high dose vitamin C treatment on *Helicobacter pylori* infection and total vitamin C concentration in gastric juice. *Eur J Cancer Prev* 1998;7:449-454
- Zhang ZW, Patchett SE, Perret D, Katelari PH, Domizio P, Farthing MJ. The relation between gastric vitamin C concentrations, mucosal histology, and Cag A seropositivity in human stomach. *Gut* 1998;43:322-326
- Rokkas T, Liatsos C, Petridou E, Papatheodorou G, Karameris A, Ladas SD, Raptis SA. Relationship of *Helicobacter pylori* Cag+ status to gastric juice vitamin C levels. *Eur J Invest* 1999;29:56-62
- Zhang ZW, Abdullahi M, Farthing MJ. Effect of physiological concentrations of vitamin C on gastric cancer cells and *Helicobacter pylori*. *Gut* 2002;50:165-169
- Mannick EE, Bravo LE, Zarama G, Realpe JL, Zhang XJ, Ruiz B, Eonhan ETH, Mera R, Miller MJL, Correa P. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter Pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res* 1996;56: 3238-3243
- Safranow K, Korzone KM, Szmatloch E, Rzeuski R, Sulzy C, Bielicka V. Vitamin C and uric acid concentrations in plasma and gastric mucosa in patients regularly consuming vegetables, fruits and fruit juices. *Pol Arch Med Wewn* 2001;105:383-389