

[文章编号] 1000-2200(2008)04-0498-03

· 综述 ·

## 幽门螺杆菌及其代谢产物与胆结石相关性的研究进展

张震 综述,孟翔凌 审校

[关键词] 幽门螺杆菌;胆结石;相关因素;综述

[中国图书资料分类法分类号] R 378.99;R 575.62

[文献标识码] A

自1982年Marshall和Warren等成功地在人胃黏膜组织中分离出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)以来,人们对此进行了大量的研究。目前,已确认Hp与4种上消化道疾病密切相关:慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌及胃黏膜相关淋巴组织(MALT)恶性淋巴瘤。随着人们对Hp的生物特性及致病机制认识逐渐深入,近年来国内外均有文献报道在胆结石患者的胆汁、黏膜和胆结石中通过聚合酶链反应(PCR)扩增到Hp DNA,从而使Hp在胆结石形成中的作用成为新的研究热点。

## 1 Hp简介

Hp是一种微需氧、革兰染色阴性、弯曲呈S状或螺旋状的杆菌,它能产生碱性、酸性磷酸酶及谷氨酸氨基转移酶,不能利用葡萄糖或其它碳水化合物生长。它的另一个显著特点是具有很强的尿素酶活性,这使它得以在胃内的强酸环境中生长繁殖。Hp主要定居在胃黏膜上皮表面和胃黏液的底层,在胃窦部数量较多,胃底则较少。其致病机制与细菌在胃黏膜上的定植、侵入宿主的防御系统、毒素直接作用及诱导炎症反应的间接作用而损害宿主组织有关。

## 2 Hp存在于胆道系统的相关研究

由于研究发现在含有胆汁十二指肠液中96%的Hp会被杀死,因此通常认为Hp对胆汁非常敏感,但体外实验发现在含有5%胆汁液体培养基中30 min仍有76%的Hp存活。同时在胆汁返流性胃炎患者的胃黏膜及含有大量胆汁的十二指肠中均检测出Hp,并且研究证实胆道系统病理条件下由于胆汁构成的改变会导致Hp在胆管中繁殖。由于Hp的存在非常广泛,而胆道与十二指肠连接,易发生上行感染,故国内外学者相继对Hp与胆结石成因开展了大量的研究。

2.1 Hp与胆囊结石 Fox等<sup>[1]</sup>对智利23例慢性胆囊炎患者胆汁和胆囊黏膜进行Hp检测,培养结果均为阴性。他们进一步采用螺杆菌属的16Sr RNA通用引物进行PCR测定,发现56.5%(13/23)的胆汁和39.1%(9/23)的胆囊黏膜PCR结果阳性。Monstein等<sup>[2]</sup>采用PCR和分子生物学技术,从胆囊结石患者的胆结石、胆汁和胆囊黏膜中检测到HPDNA,并用直接测序法,证实为HP属细菌。Silva等<sup>[3]</sup>对胆结石患者的胆囊黏膜、胆汁进行细菌培养,未见Hp生长,但应用PCR检测方法,Hp DNA在胆汁、胆囊组织中的检出率分别为31.3%、42.9%;田志杰等<sup>[4]</sup>采用先进的nested-PCR,胆囊结石患者的胆汁中Hp检出率为23.8%。Abali等<sup>[5]</sup>用微生物培养、组织病理学染色和PCR方法,对77例

混合型胆固醇胆结石的胆囊进行检查,结果从6个胆囊标本中分离出Hp,PCR扩增在7个胆结石中检出Hp,用不同的组织病理学染色方法在18个标本中发现了螺杆菌样微生物。Monstein等<sup>[2]</sup>采用分子生物学技术,从胆囊结石患者的胆结石、胆汁和胆囊黏膜中检测到HPDNA,并用直接测序法,证实为HP属细菌。高鹏等<sup>[6]</sup>采用PCR方法检测70例胆囊结石患者的胆汁、黏膜、结石和门静脉血Hp DNA,结果Hp DNA存在分别为21例(30.0%)、12例(17.1%)、15例(21.4%),门静脉血中未检测出Hp DNA。郭吕等<sup>[7]</sup>对50例胆结石症患者血清及胆汁HpIgG阳性的29例手术切除胆囊标本,采用常规Giemsa染色及特殊HP免疫组化染色进行观察,结果29例胆囊黏膜中Giemsa检出23例(79.3%),6例为阴性。与之相反,Robert等<sup>[8]</sup>同样采用16Sr RNA的方法并未从胆囊结石患者胆汁中检出Hp DNA;Chen等<sup>[9]</sup>虽从胆囊结石胆汁中检出HPDNA,但与无结石组间无差异,从而认为HP并未参与胆囊结石的形成。

2.2 Hp与肝内胆管结石 Milutin等<sup>[10]</sup>通过ERCP收集72例患者(48例胆结石,17例胆管炎,7例非胆道疾病)的胆汁,并且所有患者经电子胃镜活检胃黏膜行快速尿素酶检查示Hp阳性。采用UreA引物行PCR检测结果Hp DNA存在分别为胆结石组26例(54.2%)、胆管炎组9例(52.9%)、对照组1例(14%),由于三组间无统计学意义,从而认为Hp并未参与胆结石的形成。Harada等<sup>[11]</sup>对69例胆道疾病患者胆汁及胆管黏膜分别采用HP和弯曲杆菌引物行16Sr RNA基因扩增,其中8例肝内胆管结石和10例胆总管结石患者胆管黏膜各有1例HP阳性。而弯曲杆菌16Sr RNA检测显示14例肝内胆管结石病人胆汁中3例阳性,8例胆管黏膜中5例阳性。据此认为弯曲杆菌较HP与原发性肝内胆管结石的形成更有意义。包文中等<sup>[12]</sup>对39例肝内胆管结石患者采用PCR的方法检测胆汁及肝内胆管黏膜组织中的HPDNA,采用Western-blotting方法对胆汁中的Hp感染相关蛋白进行检测,结果39例患者胆汁Hp DNA PCR阳性26例(66.67%),胆管黏膜组织21例中PCR阳性11例(52.38%)。其中胆汁及胆管黏膜均阳性者9例。26例胆汁Hp DNA阳性患者中,细胞毒素相关蛋白(CagA)检出17例(65.38%),细胞空泡毒素(VacA)检出14例(53.85%)。尿素酶B(UreB)及尿素酶A(UreA)分别为19例(73.08%)和12例(46.15%)。同时检出Hp VacA相关亚单位37 kDa、35 kDa糖蛋白。

尽管目前已从多种动物肝脏、胆囊及胰腺中分离出数种螺杆菌,从胆汁、胆囊黏膜或结石中用PCR方法检出Hp DNA, Hp CagA抗体,并且黏膜组织的Giemsa染色、尿素酶试验都有阳性结果报道,但直至今日尚未能从肝脏、胆囊黏膜

[收稿日期] 2006-10-14

[作者单位] 安徽医科大学第一附属医院 普外科,安徽 合肥 230022

[作者简介] 张震(1976-),男,硕士研究生。

及胆汁中培养出 Hp, 故推测 Hp 可能经肝胰壶腹括约肌逆流一过性地进入胆道和定植于胆道系统并通过其自身大量的代谢产物影响胆结石的形成。

### 3 Hp 代谢产物与胆结石

胆结石的形成与胆道细菌感染关系密切。细菌产生  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶, 将卵磷脂、结合胆汁酸降解为脂肪酸和游离脂肪酸, 从而消耗了胆汁的胆盐和卵磷脂, 使得胆固醇沉积。而且, 细菌感染后胆道黏膜和胆汁发生炎性改变, 细菌产生有损害黏膜上皮的酶和有害物质, 黏膜上皮增生, 黏液物质增加并形成网状结构, 在结石形成各个阶段都起作用。此外, 细菌产生的代谢产物也参与结石的形成。近年国外有报道, HP 可明显地抑制局部正常的免疫调节和修复功能, 同时诱导局部炎症反应, 造成了局部细胞组织的慢性损伤<sup>[13]</sup>。因此, Hp 可能通过改变胆汁内、外源性  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶 ( $\beta$ -G) 活性、相关毒素以及体液免疫应答产生的相关抗体参与结石的形成。

**3.1  $\beta$ -G 与胆结石**  $\beta$ -G 是一种酸性水解酶, 参与机体的生理、病理及药物代谢过程, 能特异地水解葡萄糖醛酸苷的糖苷键, 释放出葡萄糖醛酸和配基, 其具有如下功能: (1) 对结合型醛酸酯的水解; (2) 作为蛋白成分参与胆汁沉淀; (3) 参与细胞的增生; (4) 与类固醇激素结合的作用。胆汁中  $\beta$ -G 能持续地水解结合胆红素为游离胆红素以促进结石形成。

胆汁中有两种不同来源的  $\beta$ -G: 内源性  $\beta$ -G 与外源性  $\beta$ -G。 (1) 内源性  $\beta$ -G 主要存在于组织细胞的溶酶体、内质网以及高尔基复合体等超微结构内。正常生理条件下, 胆汁中有少量内源性  $\beta$ -G。在炎症等情况下, 胆道细胞中的溶酶体被破坏, 内源性  $\beta$ -G 随之释放出来。杨波等<sup>[14]</sup>应用免疫电镜胶体金探针技术对胆红素结石组与健康对照组人肝细胞溶酶体进行定量比较研究, 发现内源性  $\beta$ -G 作为人体内一种活性酶, 是胆红素结石形成相关因素之一。进而采用 ELISA 法对胆红素结石和胆固醇结石患者血清、胆汁、唾液  $\beta$ -G 进行测定, 表明内源性  $\beta$ -G 活性是由机体内在因素决定的以及胆囊作为具有分泌内源性  $\beta$ -G 的组织器官对胆红素结石的形成也有一定的影响。 (2) 外源性  $\beta$ -G 则由细菌产生。Maki<sup>[15]</sup>早在 1966 年就证实外源性  $\beta$ -G 可水解胆汁中结合胆红素为游离胆红素, 并与钙结合而形成胆红素钙结石。Vitetta 等<sup>[16]</sup>指出细菌感染所致外源性  $\beta$ -G 的增高是胆管结石发病机制的关键因素; 而且在胆汁淤积等情况下, 外源性  $\beta$ -G 不仅是结石形成的启动因素, 还在结石增大过程中有支持作用。胆汁中最常见的产酶细菌为大肠埃希菌 L 型。此外, 葡萄球菌、链球菌以及芽孢杆菌等也与外源性  $\beta$ -G 的产生相关。外源性  $\beta$ -G 活性的最适 pH 为 6.5 ~ 7.2, 当胆囊存在细菌感染时, 胆汁可以检测到外源性  $\beta$ -G 活性。

张磊等<sup>[17]</sup>研究显示内、外源性  $\beta$ -G 均可参加成石的过程, 外源性  $\beta$ -G 在成石前期迅速升高, 以后随胆道感染控制而下降。内源性  $\beta$ -G 在成石初期逐步升高, 以后长期维持较高水平。因此提出细菌源性  $\beta$ -G 主要在成石前期发挥作用, 人组织源性  $\beta$ -G 在成石初期和成石发展期发挥作用。

综上所述, 胆道细菌感染引起内、外源性  $\beta$ -G 的改变与胆结石的形成密切相关。因此, Hp 亦有可能通过自身产生外源性  $\beta$ -G 以及刺激机体产生内源性  $\beta$ -G 而参与结石的形

成, 但目前尚缺乏其相关研究报道。

**3.2 Hp 相关抗体与胆结石** 目前研究表明, Hp 毒素是两种在致病性方面密切相关而在免疫源性方面又相互独立的蛋白质, 一种是相对分子质量约为 87 000 的 VacA, 编码它的基因为 vacA。VacA 是 Hp 非常重要的致病因子, 可以在体外诱导各种哺乳动物细胞胞质发生空泡变性。另一种是相对分子质量为 128 000 的 CagA, 编码它的基因为 cagA。CagA 只存在于 50% ~ 60% 的 Hp 菌株中, 虽不直接介导毒素活性, 但与毒素活性的存在密切相关<sup>[18]</sup>。根据是否表达 VacA 和 CagA, 提出将 Hp 分为 I 型 (VacA<sup>+</sup>, CagA<sup>+</sup>) 和 II 型 (VacA<sup>-</sup>, CagA<sup>-</sup>), I 型为高毒力株。而 Offner 等<sup>[19]</sup>在最新的研究中发现在胆汁中亦存在一种相对分子量为 130 kDa 的蛋白, 该蛋白具有氨基肽酶活性和促进胆固醇结晶的性质。因此, 这种相对分子量为 130 kDa 的蛋白很可能是 Hp 的代谢产物。Upadhyad 等<sup>[20]</sup>纯化胆汁中的免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA, 并进行成核试验, 发现 IgG 的分子量较 IgM、IgA 小; 胆汁的 IgG 和 IgM 较 IgA 具有更强的成核活性。根据 Figura 等<sup>[2]</sup>的研究, 在结石组与无结石组间胆汁 Hp 感染无统计学意义, 但大部分的感染标本 (65.2%) 可检测到抗 Hp CagA 抗体, 一些标本还存在细菌抗原和细菌基因组成分, 这些物质均可介导胆固醇成核, 而与 CagA 具有相似氨基肽酶 N 端序列的类似物是很少的。

郭吕等<sup>[21]</sup>对 50 例胆结石患者的血清及胆囊胆汁同时采用 ELISA 法进行抗 Hp IgG 检测, 阳性率分别为 70.0% (35/50) 和 58.0% (29/50)。对血清及胆汁抗 Hp IgG 均阳性的 29 例血清胆汁标本采用 Western-blot 法检测 Hp 相关蛋白反应条带, 在 Hp IgG 均阳性的血清中, UreB (相对分子量为 61 kDa)、UreA (相对分子量为 30 kDa)、CagA (相对分子量为 116 kDa) 及 (VacA 相对分子量为 89 kDa) 均有较高的检出率; 胆汁中 UreB、UreA 和 CagA 的检出率高。在非胆结石组血清及胆汁中, UreB、CagA 和 VacA 亦有较高的检出率。胆结石与非胆结石组血清中这 3 种主要相关蛋白检出率差异无统计学意义, 仅胆结石组血清胆汁中 UreA、现症感染条带 (CIM) 较非胆结石组高, 而从胆结石胆汁中检出抗 Hp IgG、IgM、IgA 及 CagA、VacA 抗体, 均与 130 kDa、95 kDa、84 kDa 糖蛋白的分子量相近。但相关抗体促进结石形成的具体机制未见报道。

目前已知胆结石的形成与促成核糖蛋白有关, 成核活性的糖蛋白含量增加, 胆固醇结晶形成加速, 并且高分子量糖蛋白更具成核活性。由于在被检测的胆汁标本中存在特异的抗 Hp 抗体、Hp 感染及 Hp 相关抗原, 因此提示 Hp 相关抗原、抗 Hp 抗体及 Hp 感染可能是促进胆结石形成的潜在危险因素, Hp 的代谢产物可能是重要的成核因子。

### 4 结语

Hp 是人群感染率较高的一种致病菌, 目前的结果仅限于在分子水平检测到 Hp DNA, 推测 Hp 可能通过肝胰壶腹括约肌逆行感染途径进入胆道, 感染可能造成胆囊黏膜的破坏, 并通过其自身大量的代谢产物影响胆结石的形成。但是, 要证明 Hp 感染和其代谢产物是否通过一系列的病理变化在胆结石的形成过程中具有某种作用, 尚待进一步的深入研究。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] Fox JG, Dewhirst FE, Shen Z, et al. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis [J]. *Gastroenterology*, 1998, 144(4): 755 - 763.
- [2] Monstein HJ, Jonsson Y, Zdolsek J, et al. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in human cholesterol gallstones [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2002, 37(1): 112 - 119.
- [3] Silva CP, Pereir-Lima JC, Oliveira AG, et al. A association of the presence of *Helicobacter* in gallbladder tissue with cholelithiasis and cholecystitis [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(12): 5 615 - 5 618.
- [4] 田志杰, 韩天权, 胡厚佳, 等. 胆囊结石病患者胆道系统的螺杆菌 DNA [J]. *中华消化杂志*, 2003, 23(6): 359 - 362.
- [5] Abali B, Colakoglu S, Serin M, et al. *Helicobacter pylori* in the etiology of cholesterol gallstones [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2005, 39(2): 134 - 137.
- [6] 高 鹏, 方驰华. 聚合酶链式反应检测胆囊结石患者胆汁细菌 DNA 及意义 [J]. *宁夏医学杂志*, 1999, 21(6): 331 - 332.
- [7] 郭 吕, 李 民, 郭新瑛, 等. 胆结石症病人胆囊粘膜中 Hp 的免疫组化检测及意义 [J]. *外科理论与实践*, 2002, 7(4): 305 - 307.
- [8] Robert R, Ernst J. *Helicobacter* species are not detectable by 16sr-DNA PCR in bile from dutch patients with common [J]. *Bile Duct Digestion*, 2002, 66(1): 89 - 91.
- [9] Chen W, Li D, Cannan RJ, et al. Common pesence of *Helicobacter* DNA in the gallbladder of patients with gallstone diseases and controls [J]. *Dig Liver Dis*, 2003, 35(4): 237 - 243.
- [10] Milutin B, Bojan S, Miroslav M, et al. Modalities of testing *Helicobacter pylori* in patients with nonmalignant bile duct diseases [J]. *Gastroenterology*, 2002, 8(2): 301 - 304.
- [11] Harada K, Ozaki S, Kono N, et al. Frequent molecular identification of *Campylobacter* but not *Helicobacter* genus in bile and biliary epithelium in hepatolithiasis [J]. *J Pathol*, 2001, 193(2): 218 - 223.
- [12] 包文中, 孟翔凌. 幽门螺杆菌与原发性肝内胆管结石形成的关系 [J]. *安徽医科大学学报*, 2006, 41(2): 199 - 201.
- [13] Arabski M, Kazmierczak P, Wisniewska-jarosinska M, et al. Interaction of amoxicillin with DNA in human lymphocytes and *H. pylori*-infected and non-infected gastric mucosa cells [J]. *Chemico Biological Interact*, 2005, 152(1): 13 - 24.
- [14] 杨 波, 朱善德, 杜晓炬, 等. 肝细胞内源性  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶与胆红素结石关系的免疫电镜研究 [J]. *中华外科杂志*, 2000, 6(2): 123 - 125.
- [15] Maki T. Pathogenesis of calcium bilirubinate gallstones: role of *E coli*  $\beta$ -glucuronidase and coagulation by inorganic ions polyelectrolyte and agitation [J]. *Ann SURG*, 1966, 164(1): 90.
- [16] Vitetta L, Sali A. Primary bile duct stones and bacterial activity [J]. *HPB Surg*, 1992, 6(1): 23 - 32.
- [17] 张 磊, 孟翔凌, 夏 泉, 等.  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶在胆管结石形成中的意义 [J]. *中国医师杂志*, 2005, 8(12): 141 - 142.
- [18] 杨桂彬, 胡伏莲, 郭 飞. 幽门螺杆菌毒素及其与临床疾病的关系和检测方法 [A]. 见: 胡伏莲, 周殿元, 主编. 幽门螺杆菌感染的基础与临床 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2001: 97 - 105.
- [19] Offner GD, Gong DH, Afidhal NH. Identification of a 130-kilodalton human biliary concanavalin. A binding protein as aminopeptidase N [J]. *Gastroenterology*, 1994, 106(3): 755.
- [20] Upadhy GA, Harvey PRC, Stasbery SM. Effect of human biliary immunoglobulins on the nucleation of cholesterol [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(7): 5 193.
- [21] 郭 吕, 李 民, 郭新瑛, 等. 胆结石患者血清和胆汁幽门螺杆菌相关蛋白免疫印迹检测 [J]. *临床消化病杂志*, 2002, 14(4): 168 - 170.

[文章编号] 1000-2200(2008)04-0500-04

· 综述 ·

## 具有肌上皮分化特征的基底细胞样乳腺癌研究进展

张 帆

[关键词] 乳腺肿瘤; 基底细胞样癌; 免疫组织化学; 基因表达; 综述

[中国图书资料分类法分类号] R 737.9 [文献标识码] A

增生性乳腺病理当前的分类系统是依据两种细胞, 认为在分化谱系中只有腺上皮细胞和肌上皮细胞。腺上皮表达某些细胞角蛋白(CK)(如 CK7、CK8、CK18 和 CK19)和上皮膜抗原(EMA)等; 而肌上皮细胞既表达某些(主要是高分子量角蛋白如 34BE12、CK5/6、CK14 和 CK17 等), 又表达平滑肌肌动蛋白(SMA)、CD10、p63 和 S-100 蛋白等标志物(marker), 但不表达 CK。基于这种模式, 人们始终认为乳腺癌起源于乳腺腺上皮, 表达腺上皮型免疫标志物; 但 Tsuda

等<sup>[1]</sup>发现一组切面带有大的中央无细胞区的浸润性导管癌(invasive ductal carcinomas, IDCs), 无细胞区由坏死、组织梗死、胶原和玻璃样物质构成, 癌细胞表达肌上皮(myoepithelial)免疫表型如[S-100 $\alpha$ 蛋白、S-100 $\beta$ 蛋白、 $\alpha$ -SMA、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和 CK14], 说明此种类型的癌具有肌上皮分化, 且预后较一般浸润性癌差, 并预示有重要的临床病理意义。

随着分子生物学的发展, 人们在探讨浸润性乳腺癌的分子生物学特征时, 发现其免疫表型具有一定的特点, 并结合大宗病例的回顾性分析和随访, 逐步认识到基底细胞样乳腺癌(basal-like breast carcinoma, BLBC)是乳腺浸润性癌的特殊亚型。

[收稿日期] 2008-02-27

[作者单位] 皖南医学院弋矶山医院 病理科, 安徽 芜湖 241001

[作者简介] 张 帆(1963-), 男, 副主任医师。