

幽门螺杆菌与原发性肝内胆管结石的关系

李霆 孟翔凌

【摘要】 目的 研究幽门螺杆菌(helicobacter pylori, Hp)与原发性肝内胆管结石(primary intrahepatic stones, PIS)之间的关系。**方法** 采用 PCR 法检测胆汁及肝内胆管黏膜组织中 Hp-DNA; 采用改良 fishman 法检测 β -葡萄糖醛酸苷酶(β -Glucuronidase, β -G)。**结果** 37 例 PIS 患者胆汁及胆管黏膜行 Hp-DNA PCR 检测, 总阳性数为 26 例(70.27%), 而对照组胆汁中 Hp-DNA 仅 1 例阳性, Hp 感染率两组之间比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。PIS 患者有 Hp 感染者与无 Hp 感染者外源性 β -G 比较无明显差异, 然而内源性 β -G 升高, 具有统计学意义。**结论** PIS 与 Hp 感染相关, 并且 Hp 可能通过内源性 β -G 途径参与 PIS 的形成。

【关键词】 幽门螺杆菌; β -葡萄糖醛酸苷酶; 胆管结石

【中图分类号】 R657.4⁺2 **【文献标识码】** A

Pathogenic mechanism of helicobacter pylori in primary intrahepatic stones Li Ting, MENG Xiang-ling.
Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

【Abstract】 Objective To study pathogenic mechanism of helicobacter pylori (Hp) infection in primary intrahepatic stones (PIS). **Methods** Hp DNA in bile and mucosa of PIS samples was detected by PCR while activity of β -glucuronidase (β -G) measured by enzymological method. **Results** PCR showed that 26 cases (70.27%) had positive Hp-DNA in bile and bile duct mucosa of 37 cases with PIS; but there was only 1 case with positive Hp-DNA in the control, with statistical significance upon infection rate of Hp between two groups ($P < 0.01$). PIS cases included those infected with or without Hp. There was no statistical difference upon exogenous β -G activity but statistical difference upon endogenous β -G activity between positive Hp DNA and negative Hp DNA. **Conclusion** PIS involves Hp infection agents that may accelerate formation of PIS by enhancing activity of endogenous β -G activity.

【Key words】 Helicobacter pylori; β -Glucuronidase; Intrahepatic stones

胆汁中幽门螺杆菌(helicobacter pylori, Hp)-DNA 的发现使得 Hp 与肝胆疾病的关系成为研究的热点^[1-3]。但是, 目前关于 Hp 与原发性肝内胆管结石(primary intrahepatic stones, PIS)之间的关系报道较少。为进一步探讨 Hp 与 PIS 之间可能存在的关系, 我们设计本实验进行研究。

1 材料与方法

1.1 标本采集

选取病例均排除肝硬化和肝癌等疾病。PIS 组 37 例, 其中男 22 例, 女 15 例; 平均年龄 49.5 岁(33 ~ 73 岁)。17 例为左肝内胆管结石, 伴胆管炎者 9 例; 8 例为右肝内胆管结石, 伴胆管炎者 5 例; 左右肝内胆管结石者 12 例, 伴胆管炎者 6 例。对照组 8 例, 其中肝血管瘤 2 例, 胆道损伤 1 例, 壶腹部周围癌

5 例。开腹后穿刺抽取肝门部胆管胆汁 1 ml 立即送需氧、厌氧和 Hp 培养, 另取 2 ~ 3 ml 胆汁置灭菌管内, 行肝叶切除者取肝组织及肝内胆管黏膜组织各约 0.5 cm × 0.5 cm 置灭菌管内, 标本均立即置 -80 °C 冰箱保存。

1.2 材料

采用 UreA 引物, 其核苷酸序列为: HpU1, 5'-CATCTCCCCCAACAAATC-3'; HpU2, 5'-TTCAC-CACACGACCCATA-3', 由上海生物工程公司合成和纯化。扩增产物长度为 697 bp。 β -G 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。组织 DNA 抽提试剂盒购自中美合资优品生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌培养: 胆汁和胆管黏膜即刻接种行厌氧菌、需氧菌及幽门螺杆菌培养。

1.3.2 Hp-DNA 的检测: (1) Hp 阳性对照来源于胃癌手术患者胃黏膜组织(术前胃镜检查尿素酶实验

强阳性)。(2)Hp-DNA 的抽提:应用组织 DNA 抽提试剂盒提取胆汁和黏膜匀浆中 DNA。(3)Hp-DNA PCR 扩增反应:总反应体积为 25 μ l。其中模板量为 1 μ l,热启动 Taq DNA 聚合酶 0.5 μ l(5 U/ μ l),10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ l,10 μ mol/L 上下游引物各为 1 μ l,10 mmol/L dNTP 2 μ l,25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μ l,加无菌去离子水至 25 μ l。在 DNA 热循环仪(珠海黑马医学仪器有限公司)上,94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,50 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 40 个循环,最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。(4)经 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳后,紫外凝胶成像系统拍照、记录。

1.3.3 β -G 的测定:应用南京建成生物公司的 β -G 测定试剂盒进行检测,根据试剂盒说明书进行操作,分别测定内、外源性 β -G。酶单位定义为:每毫克肝脏蛋白或每毫升胆汁在 37 $^{\circ}$ C 条件下,每分钟能催化生成 1 μ mol 酚酞的酶量就是 1 个酶活力单位。

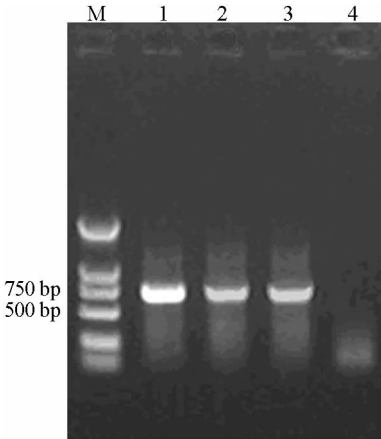
1.4 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件进行数据分析,定量资料组间比较采用 *t* 检验,分类资料分析采用 χ^2 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hp 检测结果

37 例 PIS 患者胆汁中均未培养出 Hp。37 例 PIS 患者行 Hp-DNA PCR 检测,胆汁中 Hp-DNA 阳性 22 例,胆管黏膜组织中 Hp-DNA 阳性 13 例,其中胆汁及胆管黏膜组织中 Hp-DNA 均阳性者 9 例,胆管黏膜组织 Hp-DNA 阳性而胆汁 Hp-DNA 阴性 4 例。PIS 组 Hp-DNA 总阳性数为 26 例,对照组 8 例胆汁中 Hp-DNA 仅 1 例阳性。见图 1、表 1。



1. Hp 阳性对照; 2. 胆管黏膜阳性结果; 3. 胆汁阳性结果; 4. 胆汁阴性对照

图 1 胆汁及胆管黏膜 Hp-DNA PCR 电泳图

表 1 PIS 组和对照组中 Hp-DNA 检测结果比较

组别	Hp-DNA PCR		<i>P</i> 值
	阳性	阴性	
结石组	26	11	0.009
对照组	1	7	

由表 1 可知,PIS 组较对照组 Hp-DNA 检测结果有差异,两组之间的 Hp 感染率比较差异有统计学意义(*P* < 0.01)。

2.2 β -G 检测结果

表 2 和表 3 对 β -G 检测结果按照其他普通细菌培养结果及 Hp-DNA PCR 结果进行分层检验,以排除其他普通细菌对 β -G 检测结果的干扰。其他普通细菌培养阴性的患者中 Hp-DNA 阳性者与阴性者之间的内源性 β -G 比较差异有统计学意义(*P* < 0.01),然而外源性 β -G 比较差异无统计学意义(*P* > 0.05);其他普通细菌培养阳性的患者中 Hp-DNA 阳性者与阴性者之间的内、外源性 β -G 比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

表 2 HP 对肝内胆管结石组胆汁 β -G 的影响($\bar{x} \pm s$, $\times 10^3$ U/ml)

指标	普通细菌培养阳性(<i>n</i> = 17)		普通细菌培养阴性(<i>n</i> = 20)	
	Hp-DNA 阳性(<i>n</i>)	Hp-DNA 阴性(<i>n</i>)	Hp-DNA 阳性(<i>n</i>)	Hp-DNA 阴性(<i>n</i>)
内源性 β -G	5.489 $\pm$ 0.927 (11)	5.168 $\pm$ 1.301 (6)	6.021 $\pm$ 0.941 (15) ^a	4.598 $\pm$ 0.531 (5)
外源性 β -G	5.749 $\pm$ 0.687 (11)	5.756 $\pm$ 0.633 (6)	4.909 $\pm$ 0.640 (15)	4.380 $\pm$ 0.471 (5)

a: *P* < 0.01,与普通细菌培养阴性且 Hp-DNA 阴性组比较

表 3 HP 对肝内胆管结石组肝组织 β -G 的影响($\bar{x} \pm s$, $\times 10^3$ U/mgprot)

指标	普通细菌培养阳性($n = 12$)		普通细菌培养阴性($n = 12$)	
	Hp-DNA 阳性(n)	Hp-DNA 阴性(n)	Hp-DNA 阳性(n)	Hp-DNA 阴性(n)
内源性 β -G	7.528 $\pm$ 0.485 (7)	7.405 $\pm$ 0.250 (5)	7.627 $\pm$ 0.409 (7) ^a	5.457 $\pm$ 0.205 (5)
外源性 β -G	1.556 $\pm$ 0.150 (7)	1.625 $\pm$ 0.090 (5)	1.019 $\pm$ 0.164 (7)	1.134 $\pm$ 0.287 (5)

a: $P < 0.01$, 与普通细菌培养阴性且 Hp-DNA 阴性组比较

3 讨论

目前研究显示, Hp 是上消化道的主要致病菌, 并且 Hp 在国人中具有高感染率。而胆管与胃肠道紧密相邻的解剖关系, 使人们有理由推测 Hp 可能进入胆管系统致病。我们对 PIS 组和对照组胆汁进行 Hp 培养, 结果均未见 Hp 菌落, 与文献报道相同^[1-2]。这可能与 Hp 生长条件苛刻有关。同时本组采用 PCR 的方法对 PIS 组和对照组的胆汁和胆管黏膜行 Hp-DNA 检测, 结果显示 PIS 患者胆道中存在 Hp 感染因素, 并且具有较高的检出率, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。说明 PIS 与 Hp 感染有关, Hp 可能进入胆管系统并具有逃避胆汁碱性环境的自我保护机制, 成为 PIS 的原发性基础致病菌。既往研究表明, 细菌繁殖产生的外源性 β -G 在胆红素结石形成中所起作用已得到公认^[4]。近年来国内外学者^[5-6]更提出内源性 β -G 的质和量与胆红素结石形成也有密切关系。故而我们探究 Hp 是否像大肠杆菌和厌氧菌一样产生外源性 β -G, 进而导致 PIS 的形成, 同时通过实验了解 Hp 与内源性 β -G 关系。我们对 PIS 患者胆汁和肝组织中的内、外源性 β -G 进行检测, 研究了 Hp 和 β -G 关系。由表 2 和表 3 可知, 在排除了其他普通细菌干扰后, PIS 患者有 Hp 感染者较无 Hp 感染者的外源性 β -G 无明显差异, 然而内源性 β -G 升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。然而在伴有其他普通细菌感染的 PIS 患者中 Hp-DNA 阳性者与阴性者之间的内、外源性 β -G 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。其可能由于其他细菌如大肠杆菌等作为一种混杂因素, 对内、外源性 β -G 有影响, 掩盖了 Hp 感染与 β -G 之间的关系。以上研究结果显示 Hp 并没有通过产生大量的外源性 β -G 参与 PIS 的形成, 然而伴有 Hp 感染者其内源性 β -G 活性升高,

是因为 Hp 具有更强的促进肝组织释放内源性 β -G 的作用。Hp 经某种途径进入胆道系统并定植其中, 使胆管上皮细胞和肝细胞发生损伤、变性和坏死, 内源性 β -G 被大量释放出来, 导致胆汁中内源性 β -G 明显升高。释放的内源性 β -G 在病灶处使结合胆红素分解为游离胆红素, 与钙等金属离子结合, 在胆管内形成小的肝内胆管结石, 并成为 PIS 核心部分。其导致肝内胆管的狭窄, 胆汁淤滞, 胆流变缓, 更易发生细菌感染, 促进结石的形成、增大和复发, 造成恶性循环, 导致 PIS 的形成。

总之, 我们认为 PIS 与 Hp 感染有关, 并且 Hp 可能通过内源性 β -G 途径参与 PIS 的形成, 其具体致病机制有待于更深一步的研究, 以便有效的指导临床对于 PIS 的预防和治疗。

参 考 文 献

- [1] Neri V, Margiotta M, de Francesco V, *et al*. DNA sequences and proteic antigens of *H. pylori* in cholecystic bile and tissue of patients with gallstones. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005, 22(8): 715 - 720.
- [2] Apostolov E, Al-Soud W A, Nilsson I, *et al*. *Helicobacter pylori* and other *Helicobacter* species in gallbladder and liver of patients with chronic cholecystitis detected by immunological and molecular methods. *Scand J Gastroenterol*, 2005, 40(1): 96 - 102.
- [3] Wu X Z, Chen D. *Helicobacter pylori* and hepatocellular carcinoma: correlated or uncorrelated? *J Gastroenterol Hepatol*, 2006, 21(2): 345 - 347.
- [4] 黄志强. 原发性肝胆管结石症//吴阶平, 裘法祖. 黄家驷外科学. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 1393 - 1395.
- [5] 杨波, 朱善德, 赵永光, 等. 肝细胞内源性 β -葡萄糖醛酸酶与胆红素结石关系的免疫电镜研究. *中华肝胆外科杂志*, 2000, 6(2): 123 - 125.
- [6] Ho K J, Hsu S C, Chen J S, *et al*. Human biliary beta-glucuronidase: correlation of its activity with deconjugation of bilirubin in the bile. *Eur J Clin Invest*, 1986, 16(5): 361 - 367.

(收稿日期: 2006-09-28)

(本文编辑: 毛蜀)