

· 基础研究 ·

幽门螺杆菌与胆囊结石形成关系的研究*

曹月敏 张万星 郭怀斌 彭彦辉 王兰辉 谭文科 宁殿宾

(河北省人民医院肝胆外科, 石家庄 050051)

【摘要】目的 研究胆囊幽门螺杆菌感染与胆囊结石形成的关系。方法 采用对照研究方法, 对 35 例单纯胆囊结石(实验组)和 25 例单纯胆囊息肉样病变(对照组)的胃幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)进行检测, 用 PCR 方法检测 2 组患者的胆汁及结石 Hp 细胞毒素相关基因抗原(cagA)。结果 2 组患者胃 Hp 感染率分别为 51.4% (18/35), 48.0% (12/25), 差异无显著性($\chi^2 = 0.069$, $P = 0.793$)。实验组胆汁标本中 cagA 7 例阳性(20.0%, 7/35), 结石标本中 1 例阳性(2.9%, 1/35), 对照组胆汁标本无一例阳性, 2 组胆汁 cagA 检出率差异有显著性($\chi^2 = 5.822$, $P = 0.016$)。胆汁中 cagA 检出情况与胃幽门螺杆菌感染有关($\chi^2 = 3.886$, $P = 0.049$)。结论 幽门螺杆菌 DNA 存在于胆囊结石患者的胆汁及结石中, 与胃 Hp 感染有关, 胆囊 Hp 感染与胆囊结石形成有关。

【关键词】胆囊结石; 幽门螺杆菌; 细胞毒素相关基因抗原; 胆汁

中图分类号 R657.4⁺2

文献标识 A

文章编号 1009-6604(2005)08-0674-02

Correlation between *Helicobacter pylori* and human gallstones Cao Yuemin, Zhang Wanxing, Guo Huaibin, et al. Department of Hepatobiliary Surgery, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China

【Abstract】Objective To study the relationship between the *Helicobacter pylori* (Hp) infection and the formation of gallstones. Methods In this controlled study, the Hp infection rate was detected in both 35 cases of simple gallbladder stones (Experimental Group) and 25 cases of polypoid lesions of the gallbladder (Control Group). The Hp cytotoxin associated gene antigen (cag-A) in bile and gallstones of the both groups was amplified by PCR technique. Results The Hp infection rate was 51.4% (18/35) in the Experimental Group and 48.0% (12/25) in the Control Group, without significant differences ($\chi^2 = 0.069$, $P = 0.793$). In the Experimental Group, cag-A positive results were noted in bile samples in 7 cases (20.0%, 7/35) and in gallstone samples in 1 case (2.9%, 1/35), whereas in the Control Group there were no positive results observed. The Hp cag-A positive rate was significantly different between the two groups ($\chi^2 = 5.822$, $P = 0.016$). The presence of Hp cag-A in bile was correlated with the Hp infection of the stomach ($\chi^2 = 3.886$, $P = 0.049$). Conclusions That the DNA of the Hp can be found in bile and gallstones of patients with cholelithiasis indicates a correlation between Hp infection of the gallbladder and the formation of gallstones.

【Key Words】Cholelithiasis; *Helicobacter pylori*; Cytotoxin associated gene antigen; Bile

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)与慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃癌的关系目前已有明确的认识。幽门与肝胆道解剖学关系毗邻, 近年来, 发现在胆道中有 Hp 的存在^[1]。我们采用对照研究的方法, 针对 Hp 特异性基因——Hp 细胞毒素相关基因抗原(cagA), 用聚合酶链反应(PCR)对 35 例单纯胆囊结石的结石、胆汁和 25 例单纯胆囊息肉样病变的胆汁进行检测, 以期发现胆囊结石患者的胆囊中存在 Hp 感染的证据, 探讨胆囊结石形成与胆囊 Hp 感染的关系。

1 临床资料与方法

1.1 一般资料

收集 2002 年 6 月~2004 年 1 月我院肝胆外科腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy, LC)60 例, 其中胆囊结石 35 例(实验组), 男 7 例, 女 28 例, 年龄 27~72 岁, 平均 51 岁; 胆囊息肉样病变 25 例(对照组), 男 10 例, 女 15 例, 年龄 31~62 岁, 平均 47 岁。实验组患者术前 7 d 内均无急性炎症, 均未使用任何抗生素, 择期行 LC, 术后病理学诊断胆囊结石伴慢性

胆囊炎。对照组患者均为无症状者, 术前 7 d 均未使用任何抗生素, 择期行 LC, 术后病理学诊断胆固醇性息肉 23 例(1 例伴胆固醇结晶), 炎性息肉 2 例。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集 术中取出胆囊后, 无菌条件下取出所有胆囊结石并抽取胆汁 1 ml, 分别置于无菌试管内, 所有标本均于 30 min 内置于 -70℃ 冰箱保存。

1.2.2 幽门螺杆菌 cagA 的检测 取胆汁 1 ml 或取结石 1 g, 采用酚-氯仿-异戊醇法提取胆汁中的 DNA, 用针对 Hp cagA 的特异引物(上海生物工程公司合成), 上游 5'-AGACAACTTGAGC GAGAAAG-3'; 下游 5'-TATTGGGATTCTTGGAGCG-3', 扩增长度为 324 bp。反应体系为 DNA 模板 10 μ l, 上下游引物各 10 μ l(终浓度 0.5 mmol/L), buffer 5 μ l, TaqDNA 聚合酶 0.5 μ l(终浓度 2 U/ μ l), dNTP 5 μ l(终浓度 0.2 μ mol/L), 补充 DEPC 水至终体积 50 μ l。加入石蜡油 30 μ l 封闭。反应过程为 95℃ 1 min, 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 次循环, 最后 72℃ 延伸 6 min。反应产物 10 μ l 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.3 ¹⁴C-呼吸试验 术前 3 d 用¹⁴C-呼吸试验 ,测定所有患者胃 Hp 感染情况。患者当天早晨禁食水 ,试验时先将患者基础呼气样本收集在呼气袋中 ,然后患者口服 75 mg ¹⁴C 标记的尿素 ,30 min 收集呼气样本 ,上机检测。

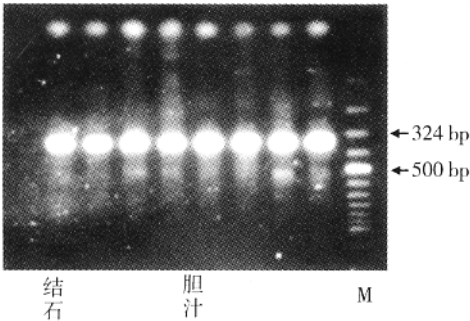
2 结果

2.1 胃 Hp 感染率

实验组胃 Hp 感染率为 51.4%(18/35) ,对照组为 48.0%(12/25) 2 组胃 Hp 感染率差异无显著 ($\chi^2 = 0.069$, $P = 0.793$)。2 组 60 例中胃 Hp 感染阳性 30 例 (感染率 50.0%) ,阴性 30 例 ,30 例胃 Hp 感染阳性中 7 例胆汁 Hp *cagA* 阳性 ,23 例 Hp *cagA* 阴性 ,30 例胃 Hp 感染阴性中胆汁 Hp *cagA* 均为阴性 ,表明胆汁 Hp *cagA* 检出与患者胃 Hp 的感染有关 ,差异显著 ($\chi^2 = 5.822$, $P = 0.016$)。

2.2 Hp *cagA* PCR 扩增

实验组 35 例胆汁标本 7 例 Hp *cagA* 阳性 (20.0%) ,其中 1 例结石标本 Hp *cagA* 阳性(2.9%) ,这例结石标本的胆汁也为阳性见图 1 ,占胆汁标本 Hp *cagA* 阳性的 14.3%(1/7) ;对照组中胆汁标本 Hp *cagA* 皆为阴性。2 组胆汁 Hp *cagA* 检出率差异有显著 ($\chi^2 = 3.886$, $P = 0.049$) ,见表 1。



左起第 1 列为 35 例结石标本中 Hp *cagA* 基因检测结果 ,仅 1 例阳性 ,其余为 35 例胆汁标本中 Hp *cagA* 基因检测结果 ,7 例阳性 ; M 为 DNA 标记 ,324 bp 处可见阳性条带

图 1 胆汁及结石中 Hp *cagA* PCR 电泳图

表 1 实验组与对照组胆汁中 *cagA* 检出情况

组别	例数	胆汁中 <i>CagA</i> 检出	
		阳性	阴性
实验组	35	7	28
对照组	25	0	25
χ^2 值		3.886	
<i>P</i> 值		0.049	

3 讨论

健康人的胆道通常被认为是无菌的 ,并且所有试图从胆囊胆汁和新鲜胆囊结石中培养出细菌的尝试都以失败而告终 ,因而认为胆囊结石的形成与细菌无关 ,直到 1994 年 ,Swidsinski 等^[2]采用分子生物学方法 (nested - PCR) ,在胆囊结石中分离出细菌 DNA ,并进行扩增、克隆和测序 ,证明胆囊结石中存在细菌 ,才使研究者们重新考虑细菌在胆囊结石形成机制中的作用。

Hp 主要定植于人和动物的胃粘膜粘液层 ,是慢性活动性胃炎、消化性溃疡的主要致病因素 ,而且与胃癌关系密切。其细胞毒素相关基因治病岛 (*cag* PAI) 中的多个基因能增加胃上皮白细胞介素 - 8 (IL - 8) 基因转录与 IL - 8 蛋白分泌 ,其中 *cagA* 是 Hp 带有 *cag* PAI 的标记。国内外有报道采用分子生物学技术 ,从胆囊结石患者的胆石、胆汁和胆囊黏膜中检测到幽门螺杆菌 DNA ,并用直接测序法 ,证实为幽门螺杆菌属细菌^[1,3,4]。

本研究对 35 例单纯胆囊结石的胆石、胆汁和 25 例单纯胆囊息肉样病变的胆汁中 Hp *cagA* 基因进行检测 ,结果显示 ,实验组中胆汁标本 7 例 Hp *cagA* 阳性 (20.0%) ,结石标本 1 例 Hp *cagA* 阳性(2.9%)。因此提示 ,在被检测的胆汁标本存在特异的 Hp 抗体 ,胆囊 Hp 感染及 Hp 相关抗原可能是促使结石形成的潜在危险因素。Silva 等^[5]对胆结石患者的胆囊黏膜、胆汁进行细菌培养 ,未见 Hp 细菌生长 ,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^[3]采用先进的 nested - PCR ,胆囊结石患者的胆汁中幽门螺杆菌检出率为 23.8% ;本研究结果与之相符。

对照组患者的胆汁中未检出 Hp *cagA* 基因 ,2 组胆汁 Hp *cagA* 基因检出阳性率差异有显著性 ($\chi^2 = 3.886$, $P = 0.049$)。此外 ,Mendez - Sanchez 等^[6]在墨西哥胆囊炎患者的胆汁标本中未检测到幽门螺杆菌 DNA ,最近的研究^[1,3]也未能从胆囊结石患者的胆汁标本中培养出幽门螺杆菌。

本研究中 ,7 例胆汁标本 Hp *cagA* 基因阳性 ,其胃 Hp 感染呈阳性 ,提示胆囊内胆汁 Hp 感染与胃 Hp 感染有关 ,胆囊结石及胆囊炎的形成与 Hp 感染有关 ,其具体机制尚有待于进一步研究。

研究显示 40% ~ 70% 的正常人胆囊胆汁中胆固醇过饱和 ,却未有结石形成 ,本研究也发现 1 例胆固醇性息肉伴胆固醇结晶 ,说明胆囊结石的形成需要一个启动因素。因此 ,胆囊内促成核因子与抗成核因子成为目前胆囊结石成因研究的焦点。Hp 如何参与胆囊结石的形成 ,还需要更多的研究。

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. *Gastroenterology* ,1998 ,114 :755 - 763.

2 Swidsinski A , Ludwig W , Pahlig H , et al. Molecular genetic evidence of bacterial colonization of cholesterol gallstones. *Gastroenterology* ,1995 ,108 :860 - 864.

3 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. *中华消化杂志* ,2003 ,23(6) :359 - 362.

4 Monstein HJ , Jonsson Y , Zdolsek J , et al. Identification of Helicobacter pylori DNA in human cholesterol gallstones. *Scand J Gastroenterol* ,2002 ,37(1) :112 - 119.

5 Silva CP , Pereira - lima JC , Oliverira AG , et al. Association of the presence of helicobacter in gallbladder tissue with cholelithiasis and cholecvtitis. *J Clin Microbiol* ,2003 ,41 :5615 - 5618.

6 Mendez - Sanchez N , Pichardo R , Gonzalez J , et al. Lack of association between Helicobacter sp colonization and gallstone disease. *J Clin Gastroenterol* ,2001 ,32(2) :138 - 141.

(收稿日期 2005 - 05 - 09)
(修回日期 2005 - 06 - 21)