

幽门螺杆菌对胎儿胃粘膜上皮细胞的粘附作用研究

张建中 陈晶晶[△] 杨昭徐 蒋秀高 梁丕霞

R378

摘要 实验选用 6 至 7 个月龄的胎儿胃粘膜组织进行有关幽门螺杆菌(Hp)的粘附部位及菌株间粘附能力差异的研究,发现 CAPM D32 株与 NCTC 11637 株的粘附部位相似,Hp 对胃窦及胃体下部粘膜组织具有很强的粘附能力,而对胃体上部及胃底部粘膜组织的粘附能力很差或不能粘附;而 CAPM Z-4 株则对胃体、胃窦及胃底部粘膜上皮组织均表现出很强的粘附能力;表明 Hp 的粘附存在明显的部位特异性,不同 Hp 菌株间在粘附同一胎儿胃粘膜组织时表现出明显的差异,Hp 与胃粘膜上皮细胞间的粘附过程比较复杂,至少包括两种类型,参与 Hp 粘附的粘附素和相应受体不止一种。结果提示 Hp 相关性慢性胃炎的好发部位及严重程度除与人胃粘膜组织不同部位细菌粘附受体的表达存在明显的差异外,还决定于 Hp 的粘附素的种类和粘附特性。不但首次在机体和细菌两个方面揭示了 Hp 相关性慢性胃炎的发病规律,也为进一步开展该菌疫苗的研制、开展对 Hp 感染及其相关疾病的防治提供了重要线索。

关键词 幽门螺杆菌 胎儿 胃粘膜 上皮细胞 粘附

Studies on adherence of *H. pylori* to human embryonic stomach membrane Zhang Jianzhong^{*}, Chen Jingjing, Yang Zhaoxu, et al. *Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

Abstract The therapeutic advances in *Helicobacter pylori* infection is hampered due to the lack of suitable animal model systems. The aim of this study was to further examine the binding of *H. pylori* to human gastric epithelial cells, we developed an *in vitro* bacterial adherence assay with human embryonic stomach mucosa. The mucosal specimens were taken from aborted human fetus (6~7 months old). Pieces of tissue were infected with *H. pylori in-vitro*, some pieces of infected tissue were observed with scanning electronmicroscopy, and some were put into culture immediately. Total number of *H. pylori* firmly attached were checked during the cultivation period of 72 hours. We found that NCTC 11637 and CAPM D32 strains only attached to the lower body and pyloric stomach epitheliocytes, but the CAPM Z-4 strain could attach to every parts of gastric mucosa. We would favor the hypothesis that there would be probably different "adhesins" within different *H. pylori* strains, and the corresponding receptors might distribute to different parts of gastric mucosa. Further studies are needed to confirm these hypotheses, and much knowledge needs to be gained about "adhesins" of *H. pylori* before development of effective therapy and vaccine.

Key words *Helicobacter pylori* Fetus Stomach memberane Epitheliocytes Adherence

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是慢性 B 型胃炎及消化性溃疡的主要致病因素^[1], 并与胃癌的发生密切相关^[2], 已被 WHO 列入

第一级致癌物质。Hp 的粘附过程是此菌致病过程中的关键, 而对参与粘附过程的细菌粘附素及其相应受体的研究不但对了解本菌的致病机理非常重要, 也是进一步开展本菌疫苗的研制、开展对 Hp 感染及其相关疾病的防治的关键。本实验选用 6 至 7 个月龄的胎儿胃粘膜组织进行有关 Hp 的粘附部位及菌株间粘附能力

本课题受国家自然科学基金和卫生部青年基金资助

作者单位: 102206 北京, 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所(张建中, 陈晶晶, 蒋秀高); 首都医学院附属天坛医院消化内科(杨昭徐, 梁丕霞)

差异的研究,拟从机体和细菌两个方面揭示 Hp 粘附胃粘膜上皮细胞的粘附机理,现简要报告如下。

材料与方 法

1. 菌株:Hp 选用国际标准菌株 NCTC 11637,北京分离株 CAPM Z-4 及 CAPM D32。

2. 胎儿胃粘膜组织片的制备:取 6~7 月龄正常流产胎儿胃组织(未进行胎儿血型测定),沿大弯侧剪开后展平于木板上,用 10%福尔马林固定 24 小时以上,用打孔器将组织打成直径 5mm 的膜片,对每片进行编号记录后,分别放入一经高压处理的小试管中,加入 10%福尔马林溶液 2ml 左右,放 4℃环境保存备用。在此实验中同时制作部分十二指肠肠片备用。将整个胃分为胃底大弯侧、胃底小弯侧、胃体大弯侧、胃体小弯侧、胃窦大弯侧和胃窦小弯侧六个区,胃底大弯侧、胃底小弯侧、胃窦大弯侧和胃窦小弯侧每区随机取 4~5 片,胃体大弯侧和胃体小弯侧每区随机取 7~8 片共同作为一个实验组。

3. Hp 对胎儿胃粘膜上皮细胞的粘附作用菌落计数实验:将各粘膜片管中的福尔马林溶液吸除,加入 KRT 液(含 0.75%的 NaCl,0.038%的 KCl,0.032%的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,0.031%的 $CaCl_2$ 及 0.121%的 Tris) 3ml,7 小时后更换 KRT 液一次并平衡过夜,更换为 10%小牛血清布氏肉汤,10 分钟后加入 2.43×10^{10} CFU/ml 菌浓度的 NCTC 11637 株和 2.04×10^{10} CFU/ml 菌浓度的 CAPM Z-4 株各 0.5ml,作用 10 分钟后用 10%小牛血清布氏肉汤洗两次,将每块组织片放入一研磨器中,研磨后加入 0.5ml 10%小牛血清布氏肉汤,混匀后吸取原液及 1:10 稀释液各 0.1ml 分别涂含 10%绵羊血的布氏平板(均作双份),平皿置混合气体环境(10%二氧化碳,5%氧气和 85%氮气)中,37℃培养 4 天后作菌落计数,计算每组织片所粘附的菌量。

4. Hp 对胎儿胃粘膜上皮细胞的粘附作用的电镜观察

(1)选择胃体上部,胃体下部粘膜片各一片,胃窦粘膜片及十二指肠肠片各两片,分别放入无菌小瓶中,用 KRT 液充分平衡后,各加入新鲜 CAPM D32 菌液 0.5ml(2.00×10^{10} CFU/ml 菌浓度),晃动数次后,置 37℃环境 15 分钟,其间经常晃动小瓶。

(2)用 KRT 液洗涤数次,每瓶加入 3ml 固定液(2%单宁酸,2.5%戊二醛 PBS 溶液),放 4℃环境固定 2 小时。

(3)将组织片依次通过 50%,60%,70%,80%,90%及 100%浓度的丙酮溶液,每步骤 10 分钟,然后放入丙酮-乙酸异戊酯(两者比例为 1:1)中 20 分钟,最后放入 100%乙酸异戊酯中过夜。

(4)将组织片作临界点干燥及喷金处理,喷金平均厚度为 50Å,Hitachi S-520 扫描电镜观察。

结 果

1. 粘附作用菌落计数实验结果:在两实验组中,各粘膜组织片所粘附的菌量见表 1 和表 2;各粘膜组织片及其粘附菌量在整个胃粘膜中的分布情况见图 1。

表 1 NCTC 11637 组各粘膜片粘附菌量的计数结果

Table 1. The number (CFU/slice) of NCTC 11637 adhering to stomach mucosa

Slice No	CFU/slice	Slice No	CFU/slice
32	0	4	0
22	0	3	0
28	0	10	0
56	70	6	0
25	0	14	0
54	30	13	0
44	1.24×10^3	94	0
50	0	58	0
36	6.4×10^2	26	0
77	8×10^2	88	3.2×10^3
86	8.4×10^2	37	9.2×10^2
91	1.01×10^3	48	1.68×10^3
66	0	75	$>10^4$
16	0	71	$>10^4$
69	0	79	4.92×10^3

表 2 CAPM Z-4 组各粘膜片粘附菌量计数结果

Table 2. The number (CFU/slice) of CAPM Z-4 adhering to stomach mucosa

Slice No	CFU/slice	Slice No	CFU/slice
8	5×10^2	47	2.76×10^3
93	7.6×10^2	17	1.22×10^3
84	6.6×10^2	5	9×10^2
55	4.52×10^2	81	1.4×10^3
76	8.4×10^2	67	1×10^3
23	7.5×10^2	39	6.4×10^2
89	8×10^2	57	1.2×10^3
19	9.2×10^2	31	6×10^2
7	8×10^2	83	3.15×10^2
18	6.8×10^2	33	8.8×10^2
40	5×10^6	41	1.68×10^3
20	1.02×10^3	62	8×10^2
34	1.02×10^3	70	3.15×10^2
78	2.42×10^3	45	6.1×10^2
51	1.25×10^3		

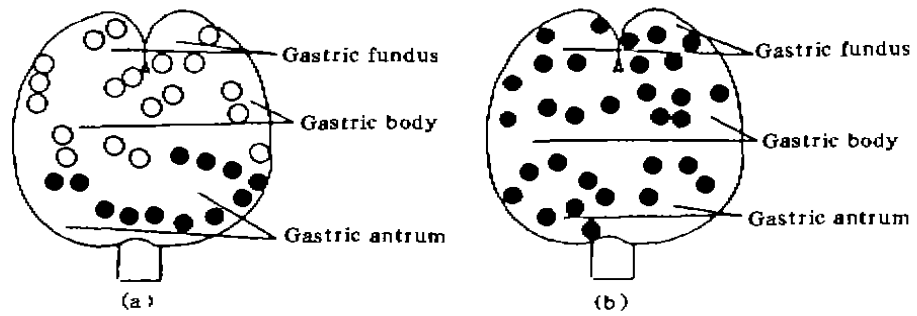


图1 幽门螺杆菌在胎儿胃粘膜组织表面粘附菌量及分布示意图

Fig 1. Adhesion of *H. pylori* to the tissue of stomach mucosa of fetus

(a) NCTC 11637 group

(b) CAPM Z-4 group

○: Non or few *H. pylori* adhered

●: Great amount of *H. pylori* adhered

2. 粘附作用的电镜观察结果: 电镜下发现各部位粘膜形态典型, 结构完整(见图 2a), 甲醛固定等处理方法对胃粘膜形态无明显影响。在胃体上部粘膜片及十二指肠肠片中很少发现

有 Hp 的粘附, 而在胃体下部粘膜片及胃窦粘膜片中则发现有大量 Hp 粘附(见图 2b), Hp 仍保持其典型形态。

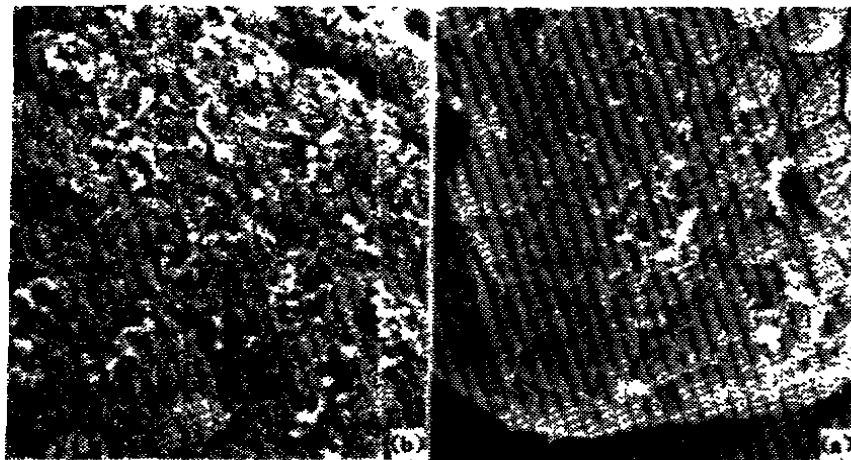


图2 幽门螺杆菌粘附胎儿胃粘膜表面的扫描电镜观察

Fig 2. Adhesion of *H. pylori* to the surface of the tissue of stomach mucosa of fetus

(a) Normal stomach mucosa tissue of fetus

(b) Stomach mucosa tissue adhered with *H. pylori*

讨 论

Hp 是慢性 B 型胃炎及消化性溃疡的主要致病因素, 并与胃癌的发生密切相关, 已被 WHO 列入第一级致癌物质。Hp 的粘附过程是此菌致病过程中的关键, 而对参与粘附过程的细菌粘附素及其相对应受体的研究不但对了解

本菌的致病机理非常重要, 也是进一步开展本菌疫苗的研制, 开展对 Hp 感染及其相关疾病的防治的关键。目前已知 Hp 与胃粘膜上皮细胞的结合是一特异性粘附过程, 粘膜上皮细胞表面粘附素受体的表达直接影响细菌的粘附过程, 人类感染 Hp 的机会在不同血型的人群中是不同的, H 血型物质和 Leb 抗原(为 Lewis 血

型系统中阳性分泌者在胃粘膜上皮细胞表面表达的主要血型相关抗原物质)是 Hp 的受体部位,也就是说,与 O 型血者相比,A 型和 B 型血者在胃粘膜上皮细胞部位具有更少的 Hp 的受体。同时,人类个体间粘附素受体表达的质和量也存在明显的差异,这些差异与 HLA-DQA1 基因间存在连锁关系,而 HLA-DQA1 和 HLA-DQB1 基因编码的多肽共同组成 T 细胞表面识别自身和外来肽类物质的受体。这可解释为什么 O 型血的人更多发生慢性胃窦胃炎和十二指肠溃疡,以及感染 Hp 者为何易发展成为慢性萎缩性胃炎及胃癌。但目前仍有许多问题没有得到圆满的解释,如人类感染 Hp 后 Hp 定居的部位大小以及引起的病变的严重程度除与机体有一定关系外,在多大程度上决定于细菌的粘附素的差异及细菌毒力的大小等。有人曾应用各传代细胞系及某些类型的动物及人胃粘膜上皮培养细胞来研究 Hp 的粘附能力及毒力,认为 Hp 的粘附与其 N-乙酰乳糖神经原纤维血凝素(NLBH)等粘附素有关^[3],国外学者也曾应用猪胃粘膜组织、人及其它动物胃粘膜培养细胞及传代细胞来研究 Hp 的粘附情况^[4-7],但所用研究体系对正常人感染 Hp 的情况的代表性差,不能真正反映 Hp 的感染能力及 Hp 间的差异。由于人胎儿在胚胎发育 5 个月胃粘膜在组织结构上已接近成熟,我们选用 6 至 7 个月龄的胎儿胃粘膜组织进行有关 Hp 的粘附部位及菌株间粘附能力差异的研究,此研究方法在国内外尚未见报道。

我们用胎儿胃粘膜组织片系统地研究了 Hp 对胃粘膜不同部位粘附作用的差异,发现 NCTC 11637 株 Hp 的粘附存在明显的部位特异性,对胃窦及胃体下部粘膜组织具有很强的粘附能力,而对胃体上部及胃底部粘膜组织的粘附能力很差或不能粘附,说明与此菌粘附作用有关的粘附素受体在胃粘膜不同部位的分布具有很大差异,主要分布在胃窦及胃体下部;而且观察到国内外不同 Hp 菌株间在粘附同一胎儿胃粘膜组织时表现出明显的差异,CAPM D32 株与 NCTC 11637 株的粘附部位相似,而

CAPM Z-4 株则对胃体、胃窦及胃底部粘膜上皮组织均表现出很强的粘附能力,表明 Hp 与胃粘膜上皮细胞间的粘附过程比较复杂,至少包括两种类型,参与 Hp 粘附的粘附素和相应受体均不止一种。本实验结果显示 Hp 相关性慢性胃炎的好发部位及严重程度除与人胃粘膜组织不同部位细菌粘附受体的表达存在明显的差异外,还决定于 Hp 的粘附素的种类和粘附特性,首次在机体和细菌两个方面揭示了 Hp 相关性慢性胃炎的发病规律。

此方法经济、简便、重复性好,避免了胃液成分等影响因素的干扰,能在最大程度上反映 Hp 与粘膜上皮细胞间的粘附作用。鉴于目前在建立 Hp 小动物感染模型中仍存在许多困难,因此利用各种小动物胃粘膜组织进行有关 Hp 的粘附作用的研究,有可能成为一种有效地筛选 Hp 小动物感染模型敏感动物的方法。

参 考 文 献

- 1 Dixon MF. Pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection. Scand J Gastroenterol, 1994, 201(Suppl): 7.
- 2 De Koster E, Buset M and Fernandes E, et al. *Helicobacter pylori*; the link with gastric cancer. Eur J Cancer Prev, 1994, 3((3): 247.
- 3 Evans DG, Evans DG Jr, Moulds JJ, et al. N-acetyl neuraminylactose-binding fibrillar hemagglutinin of *campylobacter pylori*; a putative colonization factor antigen. Infect Immun, 1988, 56: 2896.
- 4 Clyne M and Drumm B. Adherence of *Helicobacter pylori* to primary human gastrointestinal cells. Infect Immun, 1993, 16(10): 4051.
- 5 Rosberg K, Berglindh T, Gustavsson S, et al. Adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosal biopsy specimens cultivated *in vitro*. Scand J Gastroenterol, 1991, 26(11): 1179.
- 6 Kobayashi Y, Okazaki K, Murakami K. Adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells in primary cultures obtained from stomachs of various animals. Infect Immun, 1993, 61(10): 4058.
- 7 Rosberg K, Hubinette R, Nygard G, et al. Studies of *Helicobacter pylori* in a gastric mucosa *in vitro* animal model. Scand J Gastroenterol, 1991, 26(1): 43.

(收稿:1995-04-04 修回:1995-06-30)