

幽门螺杆菌感染儿童胃黏膜细胞凋亡相关蛋白的研究

刘卫平 孙素芳 张桂丽

(河南周口市西华县人民医院,河南 周口 466600)

[摘要] 目的 旨在研究儿童胃黏膜细胞凋亡相关蛋白 p53 和 Bax 的表达水平与幽门螺杆菌(Hp)感染的关系。方法 采用免疫组化法检测了33例胃黏膜病变儿童胃黏膜上皮细胞中 p53 和 Bax 表达水平,并采用快速尿素酶试验和组织病理学检测两种方法检查这些病例的 Hp 感染情况。结果 在17例 Hp 阳性组织标本中,15例(88%)p53 表达阳性,而在16例 Hp 阴性组织标本中,9例(56%)呈阳性。分析 Bax 的表达水平发现,在17例 Hp 阳性组织标本中,13例(76%)标本 Bax 表达呈阳性,而在16例 Hp 阴性组织标本中,6例(38%)呈阳性。统计学分析显示, Hp 阳性标本的 p53 和 Bax 表达水平要明显高于 Hp 阴性标本($P < 0.05$)。结论 儿童期 Hp 感染与胃黏膜上皮细胞 p53 蛋白和 Bax 蛋白过度表达密切相关。 [中国当代儿科杂志,2010,12(2):110-112]

[关键词] 幽门螺杆菌;p53;Bax;儿童

[中图分类号] R725 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)02-0110-03

Expression of apoptosis-related proteins in gastric mucosa of children with Helicobacter pylori infection

LIU Wei-Ping, SUN Su-Fang, ZHANG Gui-Li. Xihua County People's Hospital, Zhoukou, Henan 466600, China (Zhang G-L, Email: lwping1978@163.com)

Abstract: Objective To investigate the relationship between apoptosis-related proteins in gastric mucosa, p53 and Bax, and Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection in children. **Methods** p53 and Bax expression in gastric mucosa were measured using immunohistochemical technique in 33 children with gastric mucosal lesions. Presence/absence of *H. pylori* infection was detected by the rapid urease and pathological tests. **Results** Fifteen children (88%) showed positive expression of p53 in 17 children who were confirmed with *H. pylori* infection, compared with 9 (56%) in 16 *H. pylori* negative children. Thirteen children (76%) showed positive expression of Bax in the 17 children with *H. pylori* infection, compared with 6 (38%) in the 16 *H. pylori* negative children. The expression levels of p53 and Bax in the *H. pylori* positive group were significantly higher than those in the *H. pylori* negative group ($P < 0.05$). **Conclusions** *H. pylori* infection is associated with the over-expression of p53 and Bax proteins in gastric mucosa in children.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (2):110-112]

Key words: Helicobacter pylori; p53; Bax; Child

幽门螺杆菌(Hp)感染是慢性胃炎和消化性溃疡的主要病因,并与某些胃癌和胃黏膜相关淋巴样组织淋巴瘤密切相关^[1]。在儿童期,Hp感染被认为是导致慢性胃炎和消化性溃疡的主要病因^[2-3],也是日后胃癌发生的危险因素^[4]。最近有报道儿童期Hp感染也可导致胃黏膜细胞凋亡^[5]。然而,对于究竟有哪些蛋白参与儿童期Hp感染所诱导的胃黏膜细胞凋亡还未见报道。p53是一种重要的肿瘤抑制基因,它所翻译的蛋白质在细胞中作为一种转录因子调节许多蛋白的表达,例如Bax^[6]。Bax是一种凋亡促进蛋白,可抑制凋亡抑制蛋白Bcl-2的

功能从而发挥凋亡诱导的作用^[7]。此两种蛋白直接或间接地参与了细胞凋亡的发生。本研究旨在探讨这两种蛋白质的表达与儿童Hp感染的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

对2005~2008年我院收治的具有上消化道症状(胃胀、胃痛及反酸)的37例患儿行胃镜检查,获得组织标本。Hp感染的诊断方法为快速尿素酶(RUT)试验和Giemsa染色,两项均为阳性者确诊为

[收稿日期]2009-03-02;[修回日期]2009-04-14

[作者简介]刘卫平,男,本科,主治医师。

[通讯作者]张桂丽,主任医师。

Hp 感染,均为阴性者确诊为 Hp 阴性,仅 1 项阳性的病例被剔除。共有 33 例入选本次研究,其中 Hp 阳性者 17 例,Hp 阴性者 16 例。男 19 例,女 14 例;平均年龄 9.9 岁(7~12 岁)。其中浅表性胃炎 18 例,十二指肠球炎 7 例,球部溃疡 6 例,混合溃疡 2 例。检查前 4 周无抗生素及非甾体类药物应用史。两组病例在年龄、性别和临床症状上差异无显著性。

1.2 主要方法

1.2.1 取材 两组患儿均行胃镜检查,取胃窦黏膜 2 块,进行 RUT 试验及病理组织学。

1.2.2 免疫组织化学方法 上述组织常规用 10% 的中性福尔马林固定后,石蜡包埋。制作组织微列阵切片。组织切片脱蜡,脱水,浸没在 3% H₂O₂ 中,使内源性的过氧化氢酶活性淬灭。随后浸入硼酸盐缓冲液(pH 8.3, 40 mM 硼酸盐, 1 mM EDTA, 1 mM NaCl), 并放入微波炉中进行抗原恢复 20 min,连续地应用抗生物素蛋白和生物素。加入 1:50 的鼠抗 p53 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)或 1:30 的鼠抗 Bax 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),孵化 60 min,(0.1% Tween-20)连续冲洗 3 次,加入生物素化的山羊抗鼠抗体,孵化 20 min。经过 3 次冲洗后,加入辣根过氧化物酶连接的抗生物素蛋白链菌素溶液孵化 20 min。再次冲洗,然后浸入 3,3'-二氨基联苯液体 5 min。最后经过苏木精复染,脱水和树脂包埋后检测。

1.2.3 免疫组织化学染色数据评估 根据 Simi-crope 的评分方法^[8],免疫组织化学染色的强度和着色的表皮细胞的比例都被考虑在内。具体的方法如下:染色强度被划分为 1(弱染),2(中度)和 3(强染)。而染色比例是根据阳性染色上皮细胞所占总共上皮细胞的比例来划分:0, <5%; 1, 5%~25%; 2, 26%~50%; 3, 51%~75%; 4, >75%。每个样本的染色得分(IS)是根据染色比例的分值乘以染色强度的分值。IS 值高于 3 的被认为是阳性表达组织标本。免疫组化评分由两位病理学家共同完成。

1.3 数据处理

运用 SPSS 11.0 统计分析软件,计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 p53 在胃黏膜组织中的表达

免疫组织化学结果显示 p53 主要为细胞核染色。在 17 例 Hp 阳性组织标本中,2 例(12%)的

p53 表达水平较低(IS = 0~3),5 例(29%)呈中等强度的表达(IS = 4~6),而另外 10 例(59%)表达较强(IS = 7~12)。而在 16 例 Hp 阴性组织标本中,7 例(44%)的 p53 表达水平较低(IS = 0~3),5 例(31%)呈中等强度表达(IS = 4~6),4 例(25%)表达较强(IS = 7~12)。统计学分析显示,Hp 阳性标本的 p53 表达水平要明显高于 Hp 阴性标本($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 Bax 在胃黏膜组织中的表达

免疫组织化学结果显示 Bax 蛋白主要为细胞浆染色,但在细胞核中也有表达。在 17 例 Hp 阳性组织标本中,4 例(24%)的 Bax 表达水平较低(IS = 0~3),6 例(35%)呈中等强度表达(IS = 4~6),而另外 7 例(41%)表达较强(IS = 7~12)。在 16 例 Hp 阴性组织标本中,10 例(62%)的 Bax 表达水平较低(IS = 0~3),4 例(25%)呈中等强度表达(IS = 4~6),2 例(12%)表达较强(IS = 7~12)。统计学分析显示,Hp 阳性感染标本的 Bax 表达水平要明显高于 Hp 阴性标本($P < 0.05$)。见图 1。

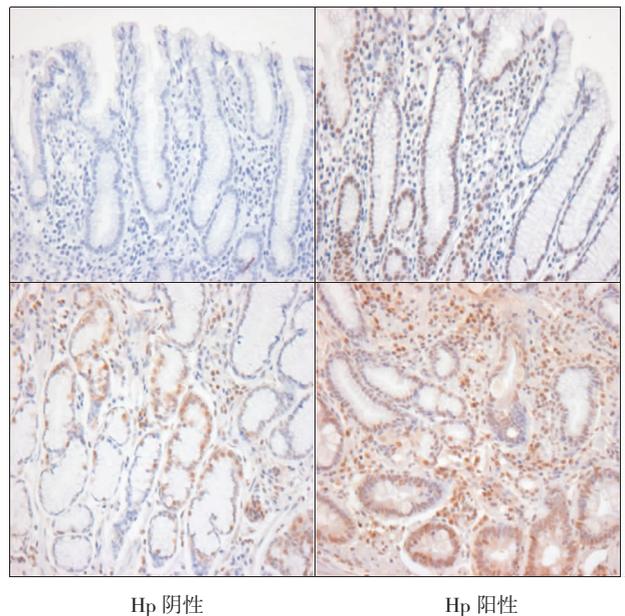


图 1 p53 及 Bax 蛋白在胃黏膜组织中的表达($\times 400$)
上排为 p53 蛋白表达,下排为 Bax 蛋白表达。Hp 阳性病例的 p53 及 Bax 蛋白表达均明显高于 Hp 阴性病例。棕色表示阳性细胞表达。

3 讨论

近年来的研究表明 Hp 感染通常可持续几十年,因此某些胃癌的发生与儿童期感染 Hp 有关^[4]。此外,也有研究表明儿童期 Hp 感染与成年感染 Hp 一样,也可以诱导细胞发生凋亡^[6]。且当去除 Hp

感染后,胃黏膜上皮凋亡发生率恢复正常^[9]。这些研究结果提示了研究儿童期 Hp 感染的重要性。

p53 是一种经典的肿瘤抑制基因。研究表明 p53 基因所编码的蛋白产物参与细胞周期调控、DNA 损伤修复及诱导凋亡^[7,10]。本研究结果表明 p53 蛋白在 Hp 感染患儿的胃黏膜上皮中的表达水平明显高于未感染患儿的胃黏膜上皮,说明 p53 蛋白参与了 Hp 感染诱导胃黏膜上皮细胞的凋亡过程。究其原因还不是很清楚。但可能与 Hp 感染导致活性氧增加有关。之前有研究表明 Hp 感染可导致患儿胃黏膜上皮细胞 DNA 损伤增加,而 DNA 损伤增加则是由 NO 释放增加所致^[11-12]。因此,p53 的表达增加可能是由于活性氧导致的 DNA 损伤增加所诱导。

在众多与细胞凋亡相关的分子中,Bcl-2 家族蛋白扮演着一种核心角色。Bax 是 Bcl-2 家族中的一个重要成员,研究表明过度表达 Bax 则可促进细胞发生凋亡^[7,13]。最近有研究表明,在 Hp 感染的成年患者胃黏膜组织中,Bax 蛋白的表达水平要明显高于未感染的组织。且当去除 Hp 感染后,Bax 蛋白的表达水平又明显降低^[14]。这一研究说明了 Bax 蛋白与 Hp 感染的相关性。这与本研究结果基本一致,说明在儿童期 Hp 感染的胃黏膜上皮组织的分子变化可能与成年患者的相似。分析 Bax 表达增加的原因,发现可能与 Hp 感染产生内毒素,及 Hp 感染导致胃黏膜释放细胞因子、一氧化氮合酶及氧自由基释放相关。另外,也可能与 p53 的表达增加有关。p53 作为转录因子可促进 Bax 的基因转录^[6],因此当 p53 表达增加后也可促进 Bax 的表达增加。

综上所述,本研究结果表明儿童期 Hp 感染可诱导胃黏膜上皮细胞 p53 蛋白和 Bax 蛋白过度表达,但关于其确切上调机制还需要进一步研究。

致谢:感谢复旦大学儿科医院消化科及病理科的老师对本研究的支持和帮助。

[参 考 文 献]

[1] Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi

S, Yamakido M, et al. Helicobacter pylori infection and development of gastric cancer[J]. N Engl J Med, 2001, 345(11):784-789.

[2] Drumm B, Shermann P, Cutz E, Karmali M. Association of Campylobacter pylori on the gastric mucosa with antral gastritis in children [J]. N Engl J Med, 1987, 316(25):1557-1561.

[3] Kato S, Nishino Y, Ozawa K, Konno M, Maisawa S, Toyoda S, et al. The prevalence of Helicobacter pylori in Japanese children with gastritis or peptic ulcer disease[J]. J Gastroenterol, 2004, 39(8):734-738.

[4] Blaser MJ. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of Helicobacter pylori-induced inflammation [J]. Gastroenterology, 1992, 102(2):720-727.

[5] Ozawa K, Kato S, Sekine H, Koike T, Minoura T, Iinuma K, et al. Gastric epithelial cell turnover and mucosal protection in Japanese children with Helicobacter pylori infection[J]. J Gastroenterol, 2005, 40(3):236-246.

[6] Sun Y. p53 and its downstream proteins as molecular targets of cancer[J]. Mol Carcinog, 2006, 45(6):409-415.

[7] Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential [J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(5):488-496.

[8] Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ, Levin B. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis [J]. Cancer Res, 1995, 55(2):237-241.

[9] Hoshi T, Sasano H, Kato K, Ohara S, Shimosegawa T, Toyota T, et al. Cell damage and proliferation in human gastric mucosa infected by Helicobacter pylori: a comparison before and after H. pylori eradication in nonatrophic gastritis [J]. Hum Pathol, 1999, 30(12):1412-1417.

[10] Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(22):7475-7484.

[11] Davies GR, Simmonds NJ, Stevens TRJ, Sheaff MT, Banatvala N, Lurenson IF. Helicobacter pylori stimulates antral mucosal reactive oxygen species[J]. Gut, 1994, 35(2):179-185.

[12] Baik SC, Youn HS, Chung MH, Lee WK, Cho MJ, Ko GH, et al. Increased oxidative DNA damage in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa[J]. Cancer Res, 1996, 56(6):1279-1282.

[13] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy[J]. Oncogene, 2007, 26(9):1324-1337.

[14] Liu HF, Liu WW, Wang GA, Teng XC. Effect of Helicobacter pylori infection on Bax protein expression in patients with gastric precancerous lesions[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(37):5899-5901.

(本文编辑:王庆红)