

十二指肠溃疡患者 *H pylori* 根治前后 NO、TNF α 含量和 NOS 表达的变化及意义

冯丽英, 冯志杰, 姚希贤

冯丽英, 冯志杰, 姚希贤, 河北医科大学第二医院消化内科
河北省石家庄市 050000

项目负责人: 冯丽英, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化内科, ffly513@sohu.com

电话: 0311-7222301

收稿日期: 2004-12-10 接受日期: 2005-01-26

摘要

目的: 观察 *H pylori* 感染对十二指肠溃疡(DU)患者 NOS、NO 和 TNF α 的影响, 探讨 *H pylori* 感染、NO 和 TNF α 在 DU 中的作用和意义。

方法: 随机选择经电子胃镜和病理检查确诊的 *H pylori* 阳性 DU 患者 60 例, 采用快速尿素酶试验、组织涂片 Gram 染色和 Warthin-Starry 银染色进行 *H pylori* 检测。用兰索拉唑 + 阿莫西林 + 克拉霉素治疗 7 d, 于 *H pylori* 根治前后检测血清 NO、TNF α 的含量、免疫组化法检测胃窦黏膜 eNOS 和 iNOS 蛋白的表达, 并与内镜和病理检查证实胃黏膜大致正常 *H pylori* 阴性的 15 名健康志愿者作对照观察。

结果: *H pylori* 根治率为 82.14%(46/56), 溃疡愈合率 89.28%(50/56)。正常人胃黏膜以 eNOS 表达为主, iNOS 表达很少, NO、TNF α 含量少, *H pylori* 感染后胃黏膜 eNOS、iNOS 表达和 NO、TNF α 含量较正常对照增加(3568.78 ± 624.34 , 238.43 ± 72.92 与 2448.27 ± 723.31 , 138.53 ± 59.65 ; $P < 0.001$), iNOS 表达更显著。*H pylori* 根除后, eNOS、iNOS 的表达以及 NO 和 TNF α 含量(2908.74 ± 717.58 , 142.43 ± 58.63)均低于治疗前($P < 0.001$), 但 iNOS 和 NO 仍高于正常对照组($P < 0.05$)。

结论: iNOS 过度表达和 NO、TNF α 含量增加可能在消化性溃疡的发病机制中发挥一定作用, 有可能是 *H pylori* 感染导致消化性溃疡的发病机制之一。NO 在溃疡的愈合中也起一定作用。

冯丽英, 冯志杰, 姚希贤. 十二指肠溃疡患者 *H pylori* 根治前后 NO、TNF α 含量和 NOS 表达的变化及意义. 世界华人消化杂志 2005;13(5):695-697
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/695.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)是消化性溃疡(PU)的主要致病因子, 根除 *H pylori* 可促进溃疡愈合, 降低溃疡复发。至今为止 *H pylori* 的致 PU 机制并未完全阐明, 由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化 L-精氨酸生成的一氧化氮(NO)是机体的一种重要的调节递质, 其参与胃黏膜的损伤、修复和炎症反应^[1]。我们观察十二指肠溃

疡(DU)患者在根治 *H pylori* 前后体内 NO、诱生型一氧化氮合酶(iNOS)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和肿瘤坏死因子 α (TNF α)含量的变化, 以探讨 *H pylori* 感染对 NO、TNF α 的影响以及上述因素在 DU 发病及愈合中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 随机选择经电子胃镜(Olympus GIF-XQ10; Olympus Optical Co; Tokyo, Japan)和病理检查确诊的 *H pylori* 阳性 DU 患者 60 例(男 50 例, 女 10 例, 年龄 22 岁-70 岁, 平均 43.5 岁)和经胃镜和病理检查证实胃黏膜大致正常 *H pylori* 阴性的健康志愿者 15 名(男 12 名, 女 3 名, 年龄 20-65 岁, 平均 42.6 岁)为研究对象。除外严重心、肝、肾功能损害, 以及孕妇、酗酒和药物过敏者。

1.2 方法 对所有 *H pylori* 阳性的 DU 患者给与兰索拉唑 30 mg 早餐前 30 min 口服 + 阿莫西林 0.5 bid + 克拉霉素 0.25 bid, 连用 7 d。治疗结束后 4 wk 复查胃镜。

1.3 *H pylori* 检测 胃镜直视下于距幽门口 3 cm 以内的胃窦小弯、前壁、大弯处各取活检组织 1 块, 分别用于快速尿素酶试验、组织涂片 Gram 染色和 Warthin-Starry 银染色进行 *H pylori* 检测。上述方法 2 项或以上阳性者, 定为 *H pylori* 阳性; 停药后 4 wk 上述 3 项试验均阴性者, 定为 *H pylori* 根除。

1.4 NO 测定 治疗前及治疗后 4 wk 取空腹静脉血 2 mL, 室温静置析出血清后, 离心 10 min, 分离血清, -70℃ 保存待测, 采用高效液相法同批检测, 以血清中 NO₂⁻/NO₃⁻ 总量间接显示体内 NO 的生成量。

1.5 NOS 测定 治疗前及停药后 4 wk 钳取胃窦黏膜组织各 1 块, 16g/L 甲醛溶液固定、脱水、包埋, 采用 SABC 法染色。eNOS 和 iNOS 抗体(一抗为兔抗大鼠 IgG)购自美国 Santa Cruz 公司, 即用型 SABC 试剂盒, 购自武汉博士德生物工程公司。结果判定: 细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性, 综合染色强度及阳性细胞数, 从两方面进行半定量分析, 分别评为 0-3 分。染色强度判定: 阴性(0 分); 染色弱但明显强于阴性对照(1 分); 染色清晰(2 分); 染色强(3 分)。阳性细胞数判定: $\leq 10\%$ (0 分); 11-25%(1 分); 26-50%(2 分); $\geq 50\%$ (3 分)。根据两项指标的积分分为四级: 0-1 分为“-”; 2 分为“+”; 3-4 分为“++”; 5-6 分为“+++”。

1.6 TNF α 测定 治疗前及治疗后 4 wk 取空腹静脉血 2 mL, 用 EDTA 抗凝, 高速离心取上清液, 置 -20℃ 冰箱保存待测。TNF α 测定用酶联免疫黏附法(ELISA), 以 ng/L 为单位表示血清含量。

统计学处理 计量资料用 F 检验和配对 t 检验, 计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有显著差异性。

2 结果

有 75 例患者进入观察研究, 其中 *H. pylori* 感染组 4 例患者因拒绝内镜复查退出试验, 完成本研究者共 71 例 (*H. pylori* 感染组 56 例, 对照组 15 例), 各组年龄、性别等一般情况具有可比性 ($P > 0.05$)。 *H. pylori* 根治率为 82.1% (46/56), 溃疡愈合率 89.3% (50/56)。

2.1 DU 患者 *H. pylori* 根治前后血清 NO 和 TNF α 含量的变化 DU 患者在 *H. pylori* 感染时 NO 和 TNF α 含量均明显高于正常人 ($F = 14.4$ 和 16.1), 根除 *H. pylori* 后二者含量明显降低。如果 *H. pylori* 根治失败, NO 和 TNF α 的含量较治疗前有继续增高的趋势, 但无统计学意义。NO 含量在 *H. pylori* 根治后低于治疗前, 但仍高于正常人, TNF α 含量在 *H. pylori* 根治后含量降低接近正常人 (表 1)。

表 1 *H. pylori* 根治前后 NO 和 TNF α 含量及与正常对照组的比较 (mean \pm SD)

	<i>n</i>	NO (μ g/L)	TNF α (ng/L)
<i>H. pylori</i> 根治前	46	3568.8 \pm 624.3 ^d	238.4 \pm 72.9 ^d
<i>H. pylori</i> 根治后	46	2908.7 \pm 717.6 ^{bc}	142.4 \pm 58.6 ^b
<i>H. pylori</i> 根治失败	10	3998.1 \pm 628.3 ^d	273.4 \pm 79.4 ^d
正常对照组	15	2448.3 \pm 723.3	138.5 \pm 59.7

^b $P < 0.01$ vs 治疗前; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.001$ vs 正常对照组。

2.2 *H. pylori* 根治前后胃黏膜 eNOS 和 iNOS 的表达 正常人胃黏膜可见 eNOS 呈弱阳性, iNOS 表达很少。 *H. pylori* 感染的患者胃黏膜 eNOS 和 iNOS 表达量均明显高于正常人 ($P < 0.001$), 但后者表达更显著。根治 *H. pylori* 后, eNOS 和 iNOS 表达显著低于治疗前, iNOS 仍较正常对照组表达增多 (表 2)。

3 讨论

NO 在消化系统有两种产生机制^[1-2]: 生理状态下, 结构型一氧化氮合酶 (cNOS) 在胃内主要存在于内皮细胞^[3], 称 eNOS; iNOS 不表达或很少表达, NO 主要来源于 cNOS, 产生量少, 具有调节胃肠黏膜局部血循环, 抑制胃酸分泌, 清除氧自由基, 抑制血小板聚集, 改善胃肠蠕

动, 保护胃肠黏膜的作用; 而在感染炎症等病理刺激时, NO 主要由中性粒细胞、巨噬细胞等中的 iNOS 在细胞因子白介素 (IL-1、IL-2)、TNF 及细菌脂多糖等激活下产生, 该机制在提高机体抵抗外来微生物能力的同时, 又可对机体正常组织造成损伤。本研究结果显示, 正常对照组胃黏膜主要表达 eNOS, iNOS 表达很少, 产生少量 NO, *H. pylori* 感染患者的胃黏膜组织内 eNOS 和 iNOS 表达均增多 ($P < 0.001$), 但 iNOS 表达更显著。NO 含量明显高于正常对照组 ($P < 0.001$), *H. pylori* 根治后 NOS 表达和 NO 含量均较治疗前下降, eNOS 表达接近正常对照组, 而 iNOS 的表达仍高于正常对照 ($P < 0.05$); 如果 *H. pylori* 根治失败则 NOS 表达和 NO 含量均持续升高。表明 *H. pylori* 感染不但诱导胃黏膜 iNOS 表达增多, 也使 eNOS 表达增多, 二者均参与了 *H. pylori* 相关 DU 的发病机制^[1], 可能 iNOS 作用更强^[4]。血清 NO 含量变化曲线与 NOS 表达曲线相同, 说明 *H. pylori* 感染不但促进 NOS 的表达, 而且增强 NOS 的活性, NO 的产生主要来源于 iNOS。随着 *H. pylori* 的根除和溃疡的愈合, eNOS 的表达恢复正常, 但 iNOS 的表达和 NO 含量仍高于正常 ($P < 0.05$), 提示 NO 可能不仅参与了 *H. pylori* 相关 PU 的发病机制, 还参与了溃疡的愈合过程。有研究报道^[5-7], *H. pylori* 感染可能通过激活 NF- κ B 因子, 进而促进 COX-2、iNOS mRNA 的表达, NO 的产生的量与 *H. pylori* 的感染程度呈正相关, *H. pylori* 可通过 NO 途径引起十二指肠黏膜上皮细胞损伤, 认为过量生成的 NO 可直接引起细胞毒作用或通过氧自由基氧化生成毒性更大的过氧硝基阴离子和羟自由基, 导致组织细胞氧化损伤和坏死, 形成溃疡。另有研究表明 NO 不仅参加炎症的损伤过程, 而且在炎症和溃疡愈合中也起到重要促进作用^[8]。Tatemichi *et al*^[9]研究发现溃疡愈合中, iNOS 不影响溃疡愈合处的细胞再生和血管形成, 但在 iNOS 基因缺陷鼠, 可引起巨大胃溃疡且炎症反应严重。NO 可通过调节细胞的增生与分化、胶原的沉积与血管再生, 促进损伤愈合^[10]。本研究 DU 患者在根除 *H. pylori* 后, iNOS 和 NO 仍增高的原因, 可能与胃黏膜的慢性炎症的存在、治疗时间短、溃疡愈合质量不佳以及 NO 继续参与溃疡的修复过程有关, 这也许是其有益的一方面。

TNF α 是由巨噬细胞和活化的 T 细胞产生, 对机体具有免疫防护和病理损伤双重的生物学作用。本研究 DU 患者在

表 2 *H. pylori* 根治前后胃黏膜 eNOS 和 iNOS 的表达 (例)

	<i>n</i>	eNOS				iNOS			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
<i>H. pylori</i> 根治前	46	0	13	27	6 ^d	0	4	29	13 ^d
<i>H. pylori</i> 根治后	46	6	34	6	0 ^b	10	20	14	2 ^{bc}
正常对照组	15	3	10	2	0	10	4	0	0

^b $P < 0.001$ vs 治疗前; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.001$ vs 正常对照组。