

幽门螺杆菌在原发性胆总管结石患者胆汁和胆石中的表达

宋敏, 吴杰, 王萍, 黄晓东, 张姮, 孙圣斌, 范彦, 廖宇圣, 李晖

宋敏, 吴杰, 王萍, 黄晓东, 张姮, 孙圣斌, 范彦, 廖宇圣, 李晖, 武汉市中心医院消化内科 湖北省武汉市 430014

作者贡献分布: 宋敏、吴杰、王萍、黄晓东、张姮、孙圣斌、范彦、廖宇圣及李晖对此文所作贡献均等; 此课题由宋敏设计; 研究过程由宋敏、吴杰、王萍、黄晓东、张姮、孙圣斌、范彦、廖宇圣及李晖操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由宋敏、吴杰、王萍、黄晓东、张姮、孙圣斌、范彦、廖宇圣及李晖提供; 数据分析由宋敏完成; 本论文写作由宋敏完成。

通讯作者: 吴杰, 教授, 430014, 湖北省武汉市, 武汉市中心医院消化内科. wujie988@sina.com

电话: 027-82211450

收稿日期: 2010-08-30 修回日期: 2010-10-14

接受日期: 2010-11-02 在线出版日期: 2010-12-18

Detection of *Helicobacter pylori* DNA in bile and gallstone of patients with primary choledocholithiasis

Min Song, Jie Wu, Ping Wang, Xiao-Dong Huang, Heng Zhang, Sheng-Bing Sun, Yan Fan, Yu-Sheng Liao, Hui Li

Min Song, Jie Wu, Ping Wang, Xiao-Dong Huang, Heng Zhang, Sheng-Bing Sun, Yan Fan, Yu-Sheng Liao, Hui Li, Department of Gastroenterology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Jie Wu, Department of Gastroenterology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, Hubei Province, China. wujie988@sina.com

Received: 2010-08-30 Revised: 2010-10-14

Accepted: 2010-11-02 Published online: 2010-12-18

Abstract

AIM: To detect *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) DNA in bile and gallstone of patients with primary choledocholithiasis.

METHODS: Thirty-two patients with primary choledocholithiasis (experiment group) and 30 control subjects (control group) were included in the study. All the patients underwent endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP). *H.pylori* DNA in bile and gallstone was detected by real-time PCR.

RESULTS: The cycle threshold (Ct) value obtained from bile of patients with primary choledocholithiasis was significantly higher than that from bile of control subjects (16.78 ± 9.28 vs 3.75 ± 7.71 , $P < 0.01$). No significant differ-

ences were noted in *H.pylori* DNA levels in bile and gallstone among patients with bile pigment calculi, those with cholesterol stones and those with mixed stones ($P > 0.05$).

CONCLUSION: *H.pylori* DNA can be detected in bile and gallstone of patients with primary choledocholithiasis. *H.pylori* DNA level is not correlated with stone type. *H.pylori* present in bile and gallstone of patients with primary choledocholithiasis may play an important role in the development of primary choledocholithiasis.

Key Words: Real-time PCR; Primary choledocholithiasis; Bile; Gallstone; *Helicobacter pylori*

Song M, Wu J, Wang P, Huang XD, Zhang H, Sun SB, Fan Y, Liao YS, Li H. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in bile and gallstone of patients with primary choledocholithiasis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(35): 3809-3812

摘要

目的: 研究原发性胆总管结石(primary choledocholithiasis)患者胆汁和胆石中幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)的表达。

方法: 采用对照研究方法, 对原发性胆总管结石患者(试验组)32例和对照就诊者(对照组)30例行内镜下逆行胰胆管造影术(ERCP), 采用实时荧光定量PCR法检测胆汁及胆石中*H.pylori* DNA表达。

结果: 利用比较平均循环数值(Ct)法测定*H.pylori* DNA的表达水平, 原发性胆总管结石组胆汁*H.pylori* DNA Ct值为 16.78 ± 9.28 , 对照组胆汁Ct值 3.75 ± 7.71 , 两组之间*H.pylori* DNA表达比较, 差异具有统计学意义($P < 0.01$); 分组两两比较胆色素结石组(16例), 胆固醇结石组(5例), 混合性结石组(11例)间胆汁及胆石中*H.pylori* DNA表达, 无统计学差异($P > 0.05$)。

结论: 原发性胆总管结石患者胆汁及胆石中存在*H.pylori*表达, 但*H.pylori*表达与结石类型无明显相关, 其高表达提示*H.pylori*可能参与了原发性胆总管结石的发生及发展, 但其具体

■背景资料

近年来, 国内外大量研究表明胆囊结石患者胆石、胆囊组织及胆汁中存在*H.pylori*表达, 并认为*H.pylori*参与了胆囊结石形成, 而有关原发性胆总管结石患者胆汁及胆石中是否存在*H.pylori*表达及其表达水平的报道鲜见。

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

■相关报道

曹月敏等采用PCR方法发现*H.pylori* DNA存在于胆囊结石患者的胆汁及结石中,并认为*H.pylori*感染与胆囊结石形成有关。

作用机制有待进一步研究。

关键词: 实时定量PCR; 原发性胆总管结石; 胆汁; 胆石; 幽门螺杆菌

宋敏, 吴杰, 王萍, 黄晓东, 张姮, 孙圣斌, 范彦, 廖宇圣, 李晖. 幽门螺杆菌在原发性胆总管结石患者胆汁和胆石中的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(35): 3809-3812
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3809.asp>

0 引言

近年来,国内外大量研究表明胆囊结石患者胆石、胆囊组织及胆汁中存在幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)表达,并认为*H.pylori*参与了胆囊结石形成^[1-8],而有关原发性胆总管结石(primary choledocholithiasis)患者胆汁及胆石中是否存在*H.pylori*表达及其表达水平的报道鲜见。为进一步探讨原发性胆总管结石患者胆汁及胆石中是否存在*H.pylori*表达及其表达水平,我们建立原发性胆总管结石患者胆汁及胆石*H.pylori*表达水平的实时定量PCR方法,并检测原发性胆总管结石患者胆汁及胆石中*H.pylori*表达水平。

1 材料和方法

1.1 材料 按照原发性胆总管结石定义^[9],选取原发性胆总管结石组32例,其中男17例,女15例;平均年龄65.5岁(33-79岁)。所有患者经内镜下逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)均未提示肝内胆管结石及胆囊结石。13例为胆总管结石,胆囊及肝内胆管无结石,伴胆管炎者7例;19例为胆囊切除术后胆总管结石,肝内胆管无结石,伴胆管炎者10例。选取非胆石症患者30例为对照组,其中胰头肿瘤21例,Oddis括约肌功能障碍6例,胆道蛔虫3例。ERCP术中取胆总管胆汁2 mL及胆石标本,分别置灭菌管内,标本均立即置入-80℃冰箱保存。按文献[10]方法判断结石成分。组织基因组DNA提取试剂盒(TIANamp Genomic DNA Kit)(离心柱型)购自天根生化(北京)有限公司;实时荧光定量PCR试剂盒(Real Master Mix)(SYBR Green)购自天根生化(北京)有限公司;基因扩增仪(BIO-RAD PTC-200)伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.2 方法 SYBR green实时荧光定量PCR: (1)DNA的提取:按照试剂说明书,使用试剂盒提供的提取液,分别从解冻混匀的胆汁1 mL及捣碎后的

胆石100 mg中提取DNA,放-20℃冰箱保存; (2)引物的设计及合成:所有引物采用Primer 5.0软件设计,均由上海生工生物工程技术服务公司合成和纯化。*H.pylori*:上游5'-CTCATCTCTAGCCAGGTCTA-3',下游5'-TCGCATCATCTCAAAACAGAC-3',产物大小244 bp; (3)实时荧光定量PCR反应:目的基因反应体系为模板2 μL,上下游引物各1 μL, Realtime PCR Master Mix 9 μL,蒸馏水补齐至总体积7 μL。总反应体积20 μL,反应参数为94℃ 20 s, 59℃ 30 s, 68℃ 50 s(收集荧光),共40个循环。反应完成后,得到所有标本的所有记录点曲线。软件将自动进行数据分析,调整基线,计算出Threshold cycle(Ct值),即每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。

统计学处理 根据每个样本的Ct值,比较各组样本的表达变化情况。数据采用SPSS13.0统计软件进行分析, $P<0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 实时荧光定量PCR扩增曲线分析 图1为*H.pylori*的扩增曲线,从图中可见扩增曲线为典型的倒s形曲线,说明此次荧光定量PCR测定的敏感性良好。

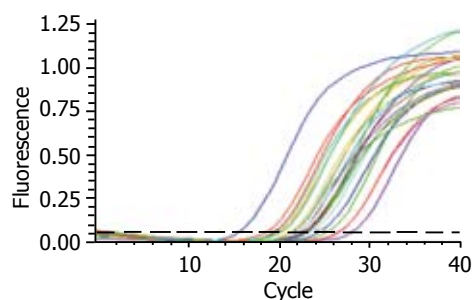
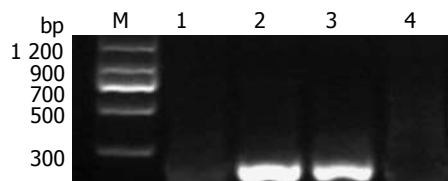
2.2 *H.pylori*扩增产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定 *H.pylori*扩增产物大小在244 bp标准片段附近,与预期结果一致(图2)。

2.3 试验组及对照组中胆汁*H.pylori*的表达变化

2.3.1 试验组及对照组中胆汁*H.pylori*检出率的比较:试验中无Ct值出现认为*H.pylori*阴性表达,反之为*H.pylori*阳性表达。本试验*H.pylori*在对照组中仅有6例表达,在32例原发性胆总管结石患者胆汁中*H.pylori* DNA阳性表达25例。原发性胆总管结石组较对照组胆汁*H.pylori* DNA检测结果有差异,两组之间的*H.pylori* DNA检出率具有统计学差异(阳性检出率:78.13% vs 20.00%, $P<0.01$; 阴性检出率:21.87% vs 80.00%)。

2.3.2 试验组及对照组中胆汁*H.pylori*表达水平的比较:利用比较平均循环数值(Ct)法测定*H.pylori* DNA的表达水平,原发性胆总管结石组胆汁*H.pylori* DNA Ct值为 16.78 ± 9.28 ,对照组胆汁Ct值 3.75 ± 7.71 ,两组之间比较*H.pylori* DNA表达具有统计学差异($P<0.01$)。

2.3.3 不同类型原发性胆总管结石胆汁*H.pylori*的表达变化:原发性胆总管结石组中胆色素结石16例,胆固醇结石5例,混合性结石11例,分组

图1 *H. pylori*的扩增曲线。图2 *H. pylori*扩增产物琼脂糖凝胶电泳鉴定。M: DNA Marker; 1: 胆汁阴性对照; 2: 胆汁阳性标本; 3: 胆石阳性标本; 4: 胆石阴性对照。

两两比较, 胆色素结石、胆固醇结石和混合性结石患者胆汁*H. pylori* DNA表达水平并无明显差异(18.23 ± 7.48 ; 12.54 ± 11.53 ; 16.60 ± 10.83)。

2.3.4 不同类型原发性胆总管结石胆石*H. pylori*的表达变化: 32例原发性胆总管结石患者胆石中*H. pylori* DNA阳性4例表达, 其中胆色素结石2例(12.50%), 混合性结石2例(18.18%), 胆固醇结石未见*H. pylori* DNA阳性表达。分组两两比较, 胆色素结石、胆固醇结石和混合性结石患者胆石*H. pylori* DNA表达水平并无明显差异(2.65 ± 7.24 , 0.00 ± 0.00 , 1.86 ± 6.18)。

3 讨论

近年来, 国内外大量研究表明胆囊结石患者胆石、胆囊组织及胆汁中存在*H. pylori*表达, 并认为*H. pylori*参与了胆囊结石形成^[1-8]。曹月敏等^[2]采用PCR方法发现*H. pylori* DNA存在于胆囊结石患者的胆汁及结石中, 并认为*H. pylori*感染与胆囊结石形成有关。Misra等^[4]研究发现, 胆囊结石患者胆石及胆汁中存在*H. pylori*, 并通过PCR方法检测到*H. pylori*序列存在。而有关原发性胆总管结石患者胆汁中是否存在*H. pylori*表达及其表达水平的报道鲜见。实时定量PCR技术利用了PCR技术核酸扩增的高效性, 探针技术的高特异性和光谱技术的高敏感性以及计量高准确性等优点, 同时又克服了普通PCR技术易污染, 不能定量等不足, 将染料SYBR Green I 与双链DNA结合后发出荧光, 通过实时监测反应体系

中的SYBR Green I 的荧光强度, 达到检测PCR产物扩增量的目的。因其具有引物和探针的双重特异性, 故在精确度、敏感性、检测范围、产出率及PCR后处理步骤方面均优于传统的半定量, 实时定量PCR^[11]是一种高效的核酸定量分析方法, 该技术在本试验中的应用, 可以相对准确地检测胆汁和胆石中*H. pylori* DNA量的变化给予定量。我们采用实时定量PCR的方法对原发性胆总管结石组和对照组胆汁及胆石进行*H. pylori* DNA检测, 结果显示原发性胆总管结石患者胆汁及胆石中均存在*H. pylori*感染因素, 胆汁中的*H. pylori* DNA检出率明显高于胆石, 并且*H. pylori*在胆汁中具有较高的表达水平, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 提示*H. pylori*可能是进入胆道系统, 先在胆汁中繁殖, 然后进入胆石, 并参与原发性胆总管结石的发生发展。

体外培养研究表明, 胆汁酸对*H. pylori*的黏附生长有抑制作用。在血琼脂中, *H. pylori*不能在含有5%胆汁的情况下生长, 但是暴露于含有5%胆汁的液体培养基中30 min仅有25%的*H. pylori*被杀死^[12]。这说明*H. pylori*具有逃避胆汁碱性环境的自我保护机制, 通过十二指肠时尚有存活的可能性。方驰华等^[13]采用PCR技术对胆囊结石患者的胆汁、黏膜、结石和门静脉血细菌群进行同步研究, 发现胆汁中存在*H. pylori* DNA, 而门脉血液及淋巴系统中均未检测到*H. pylori* DNA, 故而推测胆汁中的*H. pylori*可能系十二指肠逆流所致。国外研究表明^[14], *H. pylori*可能是胆固醇性结石菌群中固有的一部分, 定植在胆道诱发胆固醇性结石的形成。Figura等^[15]认为*H. pylori*感染导致胆管上皮增殖, 胆管狭窄, 胆流变缓, 胆汁淤滞进而促进胆色素结石的形成。而有关不同类型胆总管结石*H. pylori*表达的报道甚少。我们的研究发现, 胆色素结石、胆固醇结石及混合性结石胆汁和胆石中*H. pylori* DNA表达并无明显差异。这可能与样本量较少有一定关系。

总之, 我们认为原发性胆总管结石患者胆汁及胆石中存在*H. pylori*表达, 但*H. pylori*表达与结石类型无明显相关, 其高表达提示*H. pylori*可能是原发性胆总管结石形成过程中的重要病原菌之一。

4 参考文献

- Farshad Sh, Alborzi A, Malek Hosseini SA, Oboodi B, Rasouli M, Japoni A, Nasiri J. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in Iranian patients with gallstones. *Epidemiol Infect* 2004; 132: 1185-1189
- 曹月敏, 张万星, 郭怀斌, 彭彦辉, 王兰辉, 谭文科, 宁

■应用要点

原发性胆总管结石患者胆汁及胆石中存在*H. pylori*表达, 但*H. pylori*表达与结石类型无明显相关, 其高表达提示*H. pylori*可能参与了原发性胆总管结石的发生及发展, 但其具体作用机制有待进一步研究。

同行评价

本文可读性较好,为幽门螺杆菌在原发性胆总管结石发生发展中的作用奠定了实验基础。

- 3 Isaeva GSh, Abuzarova ER, Valeeva IuV, Pozdeev OK, Murav'eva EV. [Helicobacter pylori in patients with disorders of hepatobiliary system] *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2009; : 96-101
- 4 Misra V, Misra SP, Dwivedi M, Shouche Y, Dharne M, Singh PA. Helicobacter pylori in areas of gastric metaplasia in the gallbladder and isolation of H. pylori DNA from gallstones. *Pathology* 2007; 39: 419-424
- 5 Nilsson I, Shabo I, Svanvik J, Monstein HJ. Multiple displacement amplification of isolated DNA from human gallstones: molecular identification of Helicobacter DNA by means of 16S rDNA-based pyrosequencing analysis. *Helicobacter* 2005; 10: 592-600
- 6 Abayli B, Colakoglu S, Serin M, Erdogan S, Isiksal YF, Tuncer I, Koksall F, Demiryurek H. Helicobacter pylori in the etiology of cholesterol gallstones. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 134-137
- 7 Neri V, Margiotta M, de Francesco V, Ambrosi A, Valle ND, Fersini A, Tartaglia N, Minenna MF, Ricciardelli C, Giorgio F, Panella C, Ierardi E. DNA sequences and proteic antigens of H. pylori in cholecystic bile and tissue of patients with gallstones. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 715-720
- 8 Lee JW, Lee DH, Lee JI, Jeong S, Kwon KS, Kim HG, Shin YW, Kim YS, Choi MS, Song SY. Identification of Helicobacter pylori in Gallstone, Bile, and Other Hepatobiliary Tissues of Patients with Cholecystitis. *Gut Liver* 2010; 4: 60-67
- 9 李兆申, 许国铭. 胆道疾病内镜诊断与治疗学. 第1版. 上海: 第二军医大学出版社, 2006: 257
- 10 傅培彬, 张圣道, 戴坤扬, 郑魁元, 张臣烈, 薛永寿, 蒋渝, 王体芬. 以胆石剖面结构及化学成分为基础的胆石分类法. *中华外科杂志* 1984; 22: 258-260
- 11 Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30: 503-512
- 12 Mathai E, Arora A, Cafferkey M, Keane CT, O'Morain C. The effect of bile acids on the growth and adherence of Helicobacter pylori. *Aliment Pharmacol Ther* 1991; 5: 653-658
- 13 方驰华, 杨继震, 康惠广. 胆囊结石胆汁、黏膜、结石幽门螺杆菌与结石核心形成的关系. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 233-235
- 14 Kuroki T, Fukuda K, Yamanouchi K, Kitajima T, Matsuzaki S, Tajima Y, Furui J, Kanematsu T. Helicobacter pylori accelerates the biliary epithelial cell proliferation activity in hepatolithiasis. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 648-651
- 15 Figura N, Cetta F, Angelico M, Montalto G, Cetta D, Pacenti L, Vindigni C, Vaira D, Festuccia F, De Santis A, Rattan G, Giannace R, Campagna S, Gennari C. Most Helicobacter pylori-infected patients have specific antibodies, and some also have H. pylori antigens and genomic material in bile: is it a risk factor for gallstone formation? *Dig Dis Sci* 1998; 43: 854-862

编辑 李薇 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊,并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前,我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology*, WJG)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录,全文免费向公众开放,见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任:程剑侠 2009-03-26)