

胆囊结石与胆囊壁黏膜幽门螺杆菌定植的关系

王 炜, 朱建华, 韩 江, 吴 衍, 丁佩芬

■背景资料

胆囊结石的形成机制比较复杂, 目前认为可能与遗传、胆固醇及脂质代谢平衡紊乱、胆囊动力学异常、胆汁促一抗成核因子平衡紊乱以及细菌感染等有关。自从在胆道系统检测出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), 其与胆囊结石形成的关系成为研究的热点。

王炜, 韩江, 吴衍, 上海市浦东新区周浦医院普通外科 上海市 201318

朱建华, 上海市浦东新区周浦医院急诊外科 上海市 201318

丁佩芬, 上海市浦东新区周浦医院病理科 上海市 201318

王炜, 主治医师, 主要从事肝胆胃肠外科的临床研究。

上海市卫生和计划生育委员会基金资助项目, No. 2010Y085

作者贡献分布: 课题的设计与论文写作由王炜与朱建华完成。研究过程与数据分析由韩江与吴衍共同完成; 试剂的提供由丁佩芬完成。

通讯作者: 朱建华, 副主任医师, 201318, 上海市浦东新区周浦镇周园路1500号, 上海市浦东新区周浦医院急诊外科。

viviankent@163.com

电话: 021-68135590-2132

收稿日期: 2014-02-25 修回日期: 2014-03-31

接受日期: 2014-04-04 在线出版日期: 2014-05-18

Relationship between gallbladder stones and *Helicobacter pylori* colonization of the gallbladder mucosa

Wei Wang, Jian-Hua Zhu, Jiang Han, Yan Wu, Pei-Fen Ding

Wei Wang, Jiang Han, Yan Wu, Department of General Surgery, Zhoupu Hospital of Pudong New Area, Shanghai 201318, China

Jian-Hua Zhu, Department of Emergency Medicine, Zhoupu Hospital of Pudong New Area, Shanghai 201318, China

Pei-Fen Ding, Department of Pathology, Zhoupu Hospital of Pudong New Area, Shanghai 201318, China

Supported by: the Shanghai Municipal Health and Family Planning Commission Fund Project, No. 2010Y085

Correspondence to: Jian-Hua Zhu, Associate Chief Physician, Department of Emergency Medicine, Zhoupu Hospital of Pudong New Area, 1500 Zhouyuan Road, Zhoupu Town, Shanghai 201318, China. viviankent@163.com

Received: 2014-02-25 Revised: 2014-03-31

Accepted: 2014-04-04 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To investigate the relationship between gallbladder stones and *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) colonization of the gallbladder mucosa.

METHODS: *H. pylori* was detected in bile and gallbladder mucosa of 64 patients with gallbladder stones (experimental group) and 16 patients without gallbladder stones (control group). Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect specific DNA fragments. Enzyme-linked immu-

noabsorbent assay (ELISA) was used to detect *H. pylori* IgG antibody. Immunohistochemistry was also used to detect *H. pylori* specific protein in gallbladder mucosa specimens.

RESULTS: ELISA analysis showed that the rate of *H. pylori* infection did not differ significantly between the experimental group and control group (48.44% vs 43.75%, $P < 0.05$). PCR analysis showed that the rate of *H. pylori* colonization of the gallbladder mucosa was significantly higher in the experimental group than in the control group (39.06% vs 12.50%, $P = 0.04$), but the rate of *H. pylori* in bile did not significantly between the two groups (59.38% vs 56.25%, $P < 0.05$). Immunohistochemistry analysis detected 19 positive cases in the experimental group and only 1 positive case in the control group.

CONCLUSION: *H. pylori* infection in the biliary tract does not play a major role in the process of gallbladder stone formation, but *H. pylori* colonization in the gallbladder mucosa is involved in the formation of gallstones.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Gallbladder stones; Formation

Wang W, Zhu JH, Han J, Wu Y, Ding PF. Relationship between gallbladder stones and *Helicobacter pylori* colonization of the gallbladder mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(14): 2064-2068 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2064.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2064>

摘要

目的: 研究和探讨幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)在胆囊壁黏膜中的定植与胆囊结石形成的相关性。

方法: 分别对结石性胆囊炎和非结石性胆囊切除患者的胆囊组织和胆汁进行幽门螺杆菌检测, 采用多聚酶链式反应检测幽门螺杆菌特异性DNA片段、酶联免疫吸附试验检测幽门

■同行评议者

陈进宏, 副主任医师, 复旦大学附属华山医院普外科

螺杆菌抗体蛋白IgG、并对两组胆囊黏膜标本行幽门螺杆菌免疫组织化学技术染色检测。

结果: 采用ELISA方法检测结石组和非结石组中*H. pylori*抗体蛋白, 结石组中48.44%阳性, 非结石组43.75%阳性, 两者之间无统计学差异。采用PCR方法检测结石组和非结石组胆囊黏膜和胆汁标本中*H. pylori*特异性DNA片段, 胆囊黏膜中结石组25例阳性(39.06%), 非结石组2例阳性(12.50%), 两者之间有统计学差异($P = 0.04$); 而胆汁中结石组59.38%阳性, 非结石组56.25%阳性, 两者之间无统计学差异。对两组胆囊黏膜标本行免疫组织化学检测, 结石组有19例阳性, 在胆囊黏膜腺腔中可见棒状、弯曲杆状或球形的菌体, 呈棕黄色或棕褐色。而非结石组仅有1例检出。

结论: 胆道中*H. pylori*感染在胆囊结石形成的过程中不起主要作用, 而*H. pylori*在胆囊黏膜的定植则参与胆囊结石的形成。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 幽门螺旋杆菌; 胆囊结石; 成因

核心提示: 胆汁中的幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)阳性率远远高于和胆囊黏膜的阳性率, 结石组和非结石组之间无统计学差异, 结石患者黏膜中*H. pylori*检出率高于非结石患者, 本课题认为胆道中*H. pylori*感染在胆囊结石形成的过程中不起主要作用, 而*H. pylori*在胆囊黏膜的定植则参与胆囊结石的形成。

王炜, 朱建华, 韩江, 吴衍, 丁佩芬. 胆囊结石与胆囊壁黏膜幽门螺杆菌定植的关系. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 2064-2068
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2064.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2064>

0 引言

胆囊结石是一种严重影响人民身体健康的常见病和多发病, 胆结石的形成机制比较复杂, 目前认为可能与遗传、胆固醇及脂质代谢平衡紊乱、胆囊动力学异常、胆汁促-抗成核因子平衡紊乱以及细菌感染等有关。自从在胆道系统检测出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)之后, 相关研究屡见报道, 但相关*H. pylori*在胆囊壁黏膜定植对胆囊结石的形成是否有影响鲜见报道, 为此, 我们观察了胆囊结石患者和非结石患者的胆囊组织、胆汁中的*H. pylori*感染情况, 探讨胆囊壁黏膜*H. pylori*定植对结石形成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 结石组: 收集我院普通外科2011-01/2013-06 64例因胆囊结石合并慢性胆囊炎择期行腹腔镜胆囊切除术(男性29例, 女性35例, 年龄26-80岁, 平均年龄57.6岁±9.47岁患者的胆囊壁、胆汁标本。非结石组: 收集同期16例因非胆结石疾病行胆囊切除术(13例为胆囊胆固醇息肉, 2例为肝内胆管结石行肝切除及胆囊切除, 1例为胆囊癌)患者的胆囊组织、胆汁标本。胆囊组织在手术室无菌条件下收集, 胆汁标本术中采用腹腔镜下穿刺吸引收集, 所有标本立即放置于液氮罐冻存, 并及时移送-80℃超低温冰箱中保存待测。

1.2 方法

1.2.1 胆汁抗*H. pylori*免疫球蛋白(*H. pylori* IgG)检测: 应用ELISA法, 上海研吉生物科技有限公司提供人*H. pylori* IgG试剂盒要求对胆汁进行*H. pylori* IgG检测, 胆汁标本在室温下解冻并确保样品均匀地充分解冻, 1:1稀释后, 依照次序对应加入阴性、阳性对照液和待测样品于酶标板空白微孔中, 标记样本编号, 在对照孔和样品孔中加入酶标溶液, 混匀, 恒温孵育, 洗板, 加入底物, 孵育, 终止反应, 15 min内在波长450 nm的酶标仪上读取各孔的A值。试验有效性: 阳性对照孔平均值≥1.00; 阴性对照平均值≤0.10。临界值(CUT OFF)计算: 临界值 = 阴性对照孔平均值+0.15。阴性判定: 样品A值<临界值(CUT OFF)者为入*H. pylori* IgG(Hp-IgG)阴性。阳性判定: 样品A值≥临界值(CUT OFF)者为入*H. pylori* IgG(Hp-IgG)阳性。

1.2.2 胆囊黏膜和胆汁PCR检测: 采用*H. pylori* 16S rRNA、*H. pylori* Ure A两对不同引物, 从*H. pylori* 基因文库采用Primer 5.0自行设计, 引物序列如表1, 引物由中国科学院上海高等研究院协助合成纯化, 对所取标本进行PCR扩增, 扩增产物经凝胶电泳分析, 如果在电泳中出现与引物相符的DNA带, 可判断为阳性。

1.2.3 胆囊组织*H. pylori* 免疫组织化学检测: 采用PV9000免疫组织化学二步法对两组胆囊黏膜标本进行*H. pylori* 检测。同时以PBS缓冲液代替一抗作阴性对照, 以胃溃疡患者胃黏膜*H. pylori* 阳性切片作为阳性参照。菌体位于胆囊黏膜腺腔中, 杆状、短杆状或球形, 染色呈棕黄色或棕褐色为阳性。

统计学处理 计数资料以率(%)表示, 数据输

■研发前沿

关于*H. pylori*与胆道结石的相关研究屡见报道, 但关于*H. pylori*在胆囊壁黏膜定植对胆囊结石的形成是否有影响鲜见报道。

■相关报道

Zhou等在2011年进行的一项Meta分析认为: 胆道系统*H. pylori*感染与胆结石形成有密切关系。2013年Attaallah等的研究显示37%的胆结石患者的胆囊黏膜中有*H. pylori*定植。

■创新盘点

本课题研究通过ELISA、PCR、免疫组织化学(SP)等多种方法检测显示*H. pylori*存在与胆囊结石和非胆囊结石患者的胆道中,其中胆汁中的阳性率远远高于和胆囊黏膜的阳性率,结石组和非结石组胆道*H. pylori*感染之间无统计学差异,而PCR基因检测显示结石患者黏膜中*H. pylori*特异基因检出率高于非结石患者($P<0.05$),免疫组织化学*H. pylori*染色也观察到类似结果,因此本课题认为胆道中*H. pylori*感染在胆囊结石形成的过程中不起主要作用,而*H. pylori*在胆囊黏膜的定植则参与胆囊结石的形成。

表 1 PCR引物表

引物名称		序列	扩增大小(bp)
<i>H. pylori</i> 16S rRNA	Hp1	5'-CTGGAGAGACTAAGCCCTCC-3'	109
	Hp2	5'-ATTACTGACGCTGATTGTGC-3'	
<i>H. pylori</i> Ure A	P1	5'-CGGGATCCAAGTTTCAACCATTAGGA-3'	675
	P2	5'-CGGAATTCTTAGTGTTTTTTGTGATC-3'	

H. pylori: 幽门螺杆菌。

表 2 胆汁中抗*H. pylori*免疫球蛋白IgG检测 (ELISA)

分组	胆汁中 <i>H. pylori</i> 检出		合计
	阳性	阴性	
结石组	31	33	64
非结石组	7	9	16
合计	38	42	80
χ^2 值	0.11		
<i>P</i> 值	0.74		

H. pylori: 幽门螺杆菌。

表 3 胆囊黏膜和胆汁标本中*H. pylori*特异性DNA片段检测(PCR)

分组	黏膜			胆汁		
	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计
结石组	25	39	64	38	26	64
非结石组	2	14	16	9	7	16
合计	27	53	80	47	33	80
χ^2 值	4.04			0.05		
<i>P</i> 值	0.04			0.82		

H. pylori: 幽门螺杆菌。

入SPSS18.0进行统计分析,采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 检测

2.1.1 ELISA检测结石组和非结石组中*H. pylori*抗体蛋白: 结石组中48.44%阳性,非结石组43.75%阳性,两者之间无统计学差异($P>0.05$)(表2)。

2.1.2 PCR检测结石组和非结石组胆囊黏膜和胆汁标本中*H. pylori*特异性DNA片段(图1): 胆囊黏膜中结石组25例阳性(39.06%),非结石组2例阳性(12.50%),两者之间有统计学差异($P = 0.04$);而胆汁中结石组59.38%阳性,非结石组56.25%阳性,两者之间无统计学差异($P>0.05$)(表3)。

表 4 胆囊黏膜*H. pylori*定植免疫组织化学染色检测

分组	黏膜		合计
	阳性	阴性	
结石组	19	45	64
非结石组	1	15	16
合计	20	60	80
χ^2 值	3.75		
<i>P</i> 值	0.05		

H. pylori: 幽门螺杆菌。

表 5 两种胆汁*H. pylori*检测方法的差异

方法	胆汁		合计
	阳性	阴性	
ELISA	38	42	80
PCR	47	33	80
合计	85	75	160
χ^2 值	2.03		
<i>P</i> 值	0.15		

H. pylori: 幽门螺杆菌。

2.1.3 免疫组织化学对*H. pylori*的检测: 对两组胆囊黏膜标本行免疫组织化学检测,结石组有19例阳性,在胆囊黏膜腺腔中可见棒状、弯曲杆状或球形的菌体,呈棕黄色或棕褐色(图2)。而非结石组仅有1例检出。两者之间有一定的差异, $P = 0.051$,结合PCR检测结果,可以认为两组的检出率不同(表4)。

2.2 3种检测方法*H. pylori*检测阳性率的比较 对3种方法检测数据行统计学分析,均 $P>0.05$,无统计学意义,表明检测方法的不同对结果的判定无差异(表5, 6)。

3 讨论

H. pylori 是上消化道疾病的重要致病菌,弯曲形、S形、螺旋形或棒状,主要通过其产生的毒素蛋白

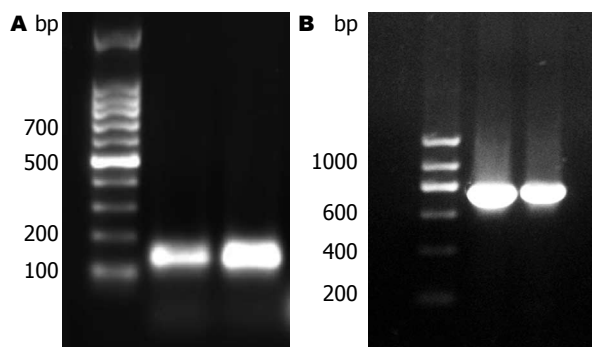


图 1 *H. pylori* 特异基因片段PCR电泳图. A: 16S rRNA, Marker 100 bp; B: UreA, Marker 200 bp. *H. pylori*: 幽门螺杆菌.

应用要点
胆结石的发病率逐年上升, 本研究结果可以为各级医院肝胆外科、普通外科临床治疗、预防胆囊结石, 降低医疗费用, 减轻广大患者痛苦与负担起到一定的借鉴作用, 并为相关研究提供理论参考.

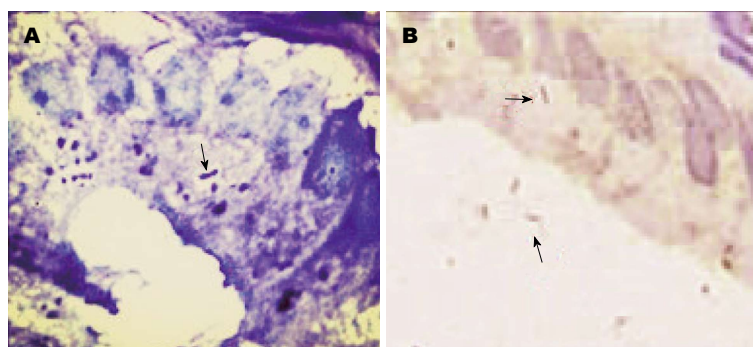


图 2 胆囊黏膜免疫组织化学染色 ($\times 400$). A: 箭头所指为 *H. pylori*, 在胆囊黏膜腺腔中可见棒状; B: 箭头所指为 *H. pylori*, 在胆囊黏膜腺腔中可见弯曲杆状或球形的菌体. *H. pylori*: 幽门螺杆菌.

表 6 两种黏膜 *H. pylori* 检测方法差异

方法	黏膜		合计
	阳性	阴性	
PCR	27	53	80
免疫组织化学	20	60	80
合计	47	113	160
χ^2 值	1.48		
P值	0.22		

H. pylori: 幽门螺杆菌.

如空泡毒素(VacA)与细胞毒素相关蛋白(CagA蛋白)和相关酶类如尿素酶、黏液酶和磷脂酶以及诱导的炎症反应造成黏膜屏障的损害^[1-4]. *H. pylori* 具有鞭毛和黏附因子使其在黏性环境中表现出很强的移行能力和定植能力. 本研究采用ELISA方法在胆囊结石患者和非胆囊结石患者的胆囊胆汁中都发现了 *H. pylori*, 前者阳性率为48.44%, 后者为43.75%, 说明 *H. pylori* 能在碱性的胆汁环境中存活. 这与Galdwell等^[5]的研究结果基本相符. 由此可推测胆汁可能对 *H. pylori* 起到一个选择作用, 使那些能耐受胆盐的 *H. pylori* 被筛选存活下来, 说明胆汁对 *H. pylori* 的杀灭作用是相对的, 在某些情况下如胆道感染、Oddis括约肌功能紊乱, 螺杆菌可通过松弛Oddis括约肌逆行感染胆道. Zhou等^[6]通过病理学研究认为胆囊黏膜中的 *H. pylori* 感染与胃中 *H. pylori* 存在

密切相关, 也从另一个侧面证明了该观点.

本研究采用PCR方法检测发现, *H. pylori* 存在于胆囊结石和非胆囊结石患者的胆道中, 胆汁中的阳性率远远高于胆囊黏膜的阳性率, 结石组和非结石组胆道(胆汁) *H. pylori* 感染之间无统计学差异, 据此, 我们认为, 胆汁中 *H. pylori* 特异基因的检测结果与胆囊结石的形成无相关性. 同时, PCR基因检测显示结石患者黏膜中 *H. pylori* 特异基因检出率高于非结石患者 ($P < 0.05$), 免疫组织化学 *H. pylori* 染色也观察到类似结果, 因此笔者认为, *H. pylori* 在胆囊黏膜的定植参与胆囊结石的形成. Zhou等^[7]在2011年进行的一项Meta分析认为: 胆道系统 *H. pylori* 感染与胆结石形成有密切关系. 2013年Attaallah等^[8]的研究显示37%的胆结石患者的胆囊黏膜中有 *H. pylori* 定植也支持此观点. *H. pylori* 在胆囊黏膜的定植可以引起急、慢性胆囊炎, 导致胆囊黏膜分泌紊乱, 胆囊运动功能障碍, 最终导致胆汁淤积、胆汁理化性质及成分的改变^[9-11]. *H. pylori* 在胆囊黏膜的定植致胆囊结石形成的机制可能涉及以下几个方面: (1)通过其CagA蛋白增加及磷脂酶A2活性增加促进胆固醇沉淀; (2) *H. pylori* 在胆囊黏膜的定植破坏黏膜屏障, 诱导局部炎症反应, 粘蛋白表达增加, 与其他促成核因子共同导致促、抗成核因子失衡, 并形成一个色素核心, 吸附沉积的钙盐和胆固醇; (3) *H. pylori* 在胆囊黏膜定植损伤胆囊黏膜、破坏了胆囊黏膜功能, 促

■同行评价

该课题立意有一定的新颖性,内容较为详实,对同类研究有一定的参考价值。

使胆汁淤滞,同时胆囊、胆管损伤后又利于其他细菌的侵袭,共同促进结石形成^[12-18]。

总之,本研究认为,胆道中*H. pylori*感染在胆囊结石形成的过程中不起主要作用,而*H. pylori*在胆囊黏膜的定植则参与胆囊结石的形成。

4 参考文献

- 1 秦俭, 韩天权, 蔡杏兴, 姜志宏, 杨小妹, 张宇, 杨士勇, 蒋兆彦, 张圣道. 一个大型胆囊结石病家系的遗传特征及流行病学分析. 中华流行病学杂志 2005; 26: 448-450
- 2 任建军, 牛剑祥, 王万祥, 孟兴凯. 综合性治疗措施对老年肝硬化合并胆囊结石患者的干预效果. 中国老年学杂志 2013; 33: 5533-5535
- 3 张雪梅, 刘丽娜, 马红霞, 高勇. 幽门螺杆菌、高胃泌素血症对结肠腺瘤形成的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1390-1394
- 4 张展, 刘志强, 郑鹏远, 唐美爱. 外排泵抑制剂对幽门螺杆菌多重耐药性的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18: 262-267
- 5 Caldwell MT, McDermott M, Jazrawi S, O'Dowd G, Byrne PJ, Walsh TN, Hourihane DO, Hennessy TP. Helicobacter pylori infection increases following cholecystectomy. Ir J Med Sci 1995; 164: 52-55 [PMID: 7890538 DOI: 10.1007/BF02968117]
- 6 Zhou D, Guan WB, Wang JD, Zhang Y, Gong W, Quan ZW. A comparative study of clinicopathological features between chronic cholecystitis patients with and without Helicobacter pylori infection in gallbladder mucosa. PLoS One 2013; 8: e70265 [PMID: 23936177 DOI: 10.1371/journal.pone.0070265]
- 7 Zhou D, Zhang Y, Gong W, Mohamed SO, Ogbomo H, Wang X, Liu Y, Quan Z. Are Helicobacter pylori and other Helicobacter species infection associated with human biliary lithiasis? A meta-analysis. PLoS One 2011; 6: e27390 [PMID: 22087306 DOI: 10.1371/journal.pone.0027390]
- 8 Attaallah W, Yener N, Ugurlu MU, Manukyan M, Asmaz E, Aktan AO. Gallstones and Concomitant Gastric Helicobacter pylori Infection. Gastroenterol Res Pract 2013; 2013: 643109 [PMID: 23762037 DOI: 10.1155/2013/643109]
- 9 Admirand WH, Small DM. The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. J Clin Invest 1968; 47: 1043-1052 [PMID: 5645851 DOI: 10.1172/JCI105794]
- 10 Bode G, Barth R, Song Q, Adler G. Phospholipase C activity of Helicobacter pylori is not associated with the presence of the cagA gene. Eur J Clin Invest 2001; 31: 344-348 [PMID: 11298782 DOI: 10.1046/j.1365-2362.2001.00814.x]
- 11 陈东风, 胡轲, 易萍, 刘为纹, 房殿春, 曹红. 幽门螺杆菌对体外原代培养的人胆囊上皮细胞损伤作用. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1835-1839
- 12 Vilkin A, Nudelman I, Morgenstern S, Geller A, Bar Dayan Y, Levi Z, Rodionov G, Hardy B, Konikoff F, Gobbic D, Niv Y. Gallbladder inflammation is associated with increase in mucin expression and pigmented stone formation. Dig Dis Sci 2007; 52: 1613-1620 [PMID: 17385041 DOI: 10.1007/s10620-006-9162-9]
- 13 孙登群, 孟翔凌, 龚仁华, 王敬民. 胆囊动力学变化对胆囊结石形成的作用. 中华消化外科杂志 2009; 8: 228-299
- 14 张万星, 郭怀斌, 曹月敏, 王兰辉, 彭彦辉, 孟惠彦. 胆囊幽门螺杆菌感染与胆囊壁胆囊收缩素受体mRNA表达的关系. 中华实验外科杂志 2006; 23: 931-933
- 15 宋敏, 吴杰, 王萍, 黄晓东, 邓昊. 幽门螺杆菌与原发性胆总管结石形成的关系. 广东医学 2011; 32: 607-609
- 16 于岚, 何小东, 武岍, 刘卫, 洪涛. 胆囊结石相关危险因素探讨. 中华肝胆外科杂志 2011; 17: 711-713
- 17 崔鸿斌, 李培武, 王秉钧, 魏丽娜. 内镜与腹腔镜联合治疗胆囊结石合并胆总管结石的疗效. 中国老年学杂志 2012; 32: 721-722
- 18 吴波, 郑长青. 幽门螺杆菌、胃肠激素与糖尿病胃轻瘫的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1616-1619

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

