

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01412

原发性病理性十二指肠胃反流患者胃黏膜细胞增殖与凋亡的研究

Apoptosis and proliferation of gastric mucosal cells in patients with primary pathological duodenogastric reflux

韩俊岭^{1*}, 杨艳红¹, 任凤杰¹, 韩莹², 谢长顺¹, 郑岳¹, 姚树坤³

1. 秦皇岛市第一医院消化内科, 秦皇岛 066000

2. 秦皇岛港口医院检验科, 秦皇岛 066000

3. 卫生部中日友好医院, 北京 100029

[摘要] **目的:** 研究原发性病理性十二指肠胃反流患者胃黏膜组织中的凋亡细胞、增殖细胞, 探讨原发性病理性十二指肠胃反流的发病机制。 **方法:** 应用脱氧核糖核酸转移酶介导的缺口末端标记技术和免疫组化方法分析 86 例原发性病理性十二指肠胃反流和 42 例正常对照胃黏膜细胞凋亡及增殖细胞核抗原的表达。 **结果:** 原发性病理性十二指肠胃反流组凋亡指数和增殖指数均显著高于正常对照组 ($P < 0.05$), Hp 阳性和 Hp 阴性亚组之间凋亡指数和增殖指数无显著性差异 ($P > 0.05$)。 **结论:** 胃黏膜细胞增殖与凋亡增强可能是原发性病理性十二指肠胃反流的发病机制之一, Hp 感染未加重原发性病理性十二指肠胃反流所致胃黏膜细胞凋亡和增殖反应。

[关键词] 原发性病理性十二指肠胃反流; 细胞凋亡; 增殖细胞核抗原

[中图分类号] R 573 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2008)11-1412-03

原发性病理性十二指肠胃反流 (duodenogastric reflux, DGR) 在胃良性或恶性病变中所起的作用越来越受到重视, 反流至胃内的胆汁、胰液和肠液等十二指肠内容物长期缓慢地造成胃黏膜细胞损伤最终诱发细胞癌变^[1-2], 近年来研究发现增殖与凋亡参与胃黏膜的损伤过程, 因此, 研究胃黏膜上皮细胞的增殖与凋亡在原发性病理性 DGR 发病过程中所起的作用对于其防治具有重要意义。通过对原发性病理性 DGR 患者胃黏膜组织中的凋亡细胞、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 表达的研究, 探讨它们在原发性病理性 DGR 发生中所起的作用, 研究其发病机制, 为临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象 原发性病理性 DGR 组: 随机选取 86 例原发性病理性 DGR 患者, 男性 50 例, 女性 36 例, 年龄 21~63 岁, 中位年龄 43 岁。纳入标准: 具有上腹痛、腹胀、吐苦水、体质量下降、烧心、早饱、恶心等症状, 且至少存在 4 周以上。胃镜检查具备以下 4 个特征: (1) 胃黏膜, 尤其是胃窦黏膜水肿、充血或脆性增加; (2) 胃镜插至胃内静止不动 1 分钟后, 仍可见到胆汁反流; (3) 胃黏液湖有黄色或绿色胆汁染色; (4) 胃黏膜有胆汁染色。且胃镜检查除外上消化道其他器质性病变, 无胃肠道手术史, 经超声、血液生化等检查除外其他

器质性疾病。

正常对照组: 筛选健康志愿者 42 例作为正常对照组, 男性 26 例, 女性 16 例, 年龄 19~56 岁, 中位年龄 39 岁。

1.2 标本来源 每名受试者均进行胃镜检查, 活检取材根据悉尼系统取 5 块标本, 胃窦 2 块取自距幽门 2~3 cm 的大弯和小弯, 胃体 2 块取自距贲门 8 cm 的大弯和小弯 (约距胃角近侧 4 cm) 和胃角 1 块, 深达黏膜肌层。健康对照组: 分别从胃窦小弯侧和大弯侧距幽门 2 cm 处取胃黏膜组织活检。活检标本立即行快速尿素酶试验 (胃幽门螺杆菌快速诊断试剂盒购自福建三强生物化工有限公司), 后经甲醛固定, 行胃黏膜垂直包埋、切片, 分别用于改良 Giemsa 染色、TUNEL 法检测细胞凋亡 (TUNEL 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司) 和免疫组织化学研究。所有参与者均于研究开始前签署知情同意书。

1.3 幽门螺旋杆菌 (Hp) 测定 (1) 快速尿素酶试验阳性; (2) 改良 Giemsa 染色镜检找到 Hp。同时具备 (1) 和 (2) 者作为 Hp 阳性标准^[3]。

1.4 TUNEL 法检测细胞凋亡及免疫组化法观察 PCNA 的表达 所有标本均在 Simple PCI 医学图像分析系统内在相同的放大倍数下观察。凋亡指数 (apoptotic index, AI) 及增殖指数 (proliferating index, PI) 判定标准: 每张切片观察 5 个视野, 每个视野计数 100 个胃黏膜上皮细胞中阳性细胞数,

[收稿日期] 2008-04-09 **[接受日期]** 2008-06-16

[基金项目] 河北省科学技术研究与发展指导计划 (072761861)。Supported by Hebei Technology Research and Development Project (072761861)。

[作者简介] 韩俊岭, 博士, 副主任医师。

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 0335-8859977, E-mail: junlinghan@126.com

计数中凋亡细胞比率、增殖细胞比率的均数分别为凋亡指数和增殖指数^[4]。

1.5 统计学处理 所有资料录入微机, 建立数据库, 应用 SPSS 12.0 软件包进行统计学分析, 两样本均数的比较采用 *t* 检验, 多样本均数的比较及均数的两两比较采用单因素方差分析检验, 两因素之间的相关性采用 Spearman 相关分析。

2 结果

活检胃黏膜标本经快速尿素酶试验和改良 Giemsa 染色后, 原发性病理性 DGR 组中 Hp 阳性者为 28 例, Hp 阴性者为 58 例。

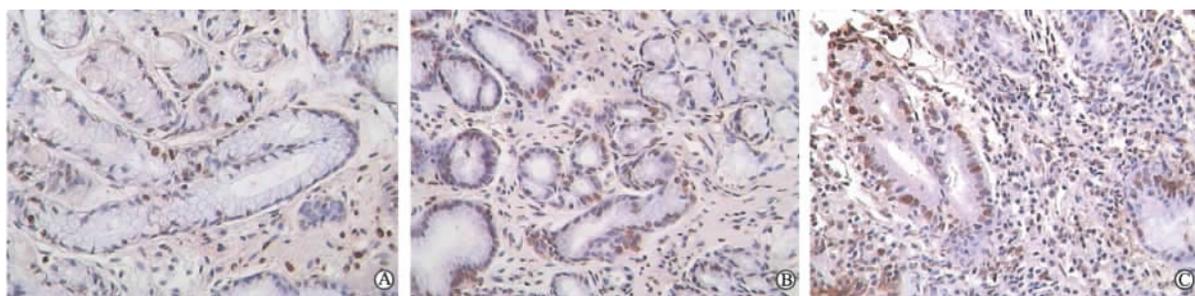


图 1 正常对照组(A)、原发性病理性 DGR 组 Hp 阳性(B)和阴性(C)组胃黏膜凋亡细胞

Original magnification: $\times 400$

正常对照组 PCNA 主要表达于胃腺颈部细胞核(图 2A), 原发性病理性 DGR 组 PCNA 均表达胃腺各部位细胞核, 以胃腺体部及底部的细胞核为主, 呈黄色或棕黄色(图 2B、2C)。原发性病理性 DGR 组中 Hp 阳性和 Hp 阴性亚组

正常对照组胃黏膜上皮凋亡细胞量少且主要分布在黏膜表层(图 1A), 而原发性病理性 DGR 组胃黏膜上皮凋亡细胞显著增加, 且分布于腺体各部位, 凋亡细胞核呈棕褐色, 体积小, 形态呈浓缩或碎点状, 不规则, 大小不一致, 周围无炎症反应。非凋亡细胞被苏木素复染成蓝色, 核较大, 形态大小较为一致(图 1B、1C)。原发性病理性 DGR 组中 Hp 阳性和 Hp 阴性亚组凋亡指数均显著高于正常对照组 $[(15.31 \pm 1.49), (12.71 \pm 1.58) \text{ vs } (5.46 \pm 1.01) P < 0.05]$, 原发性病理性 DGR 组中 Hp 阳性和 Hp 阴性亚组之间凋亡指数无显著性差异 $(P > 0.05)$ 。

增殖指数均显著高于正常对照组 $[(15.76 \pm 1.83), (12.93 \pm 1.52) \text{ vs } (5.52 \pm 1.16), P < 0.05]$, Hp 阳性和 Hp 阴性亚组之间增殖指数无显著性差异 $(P > 0.05)$ 。

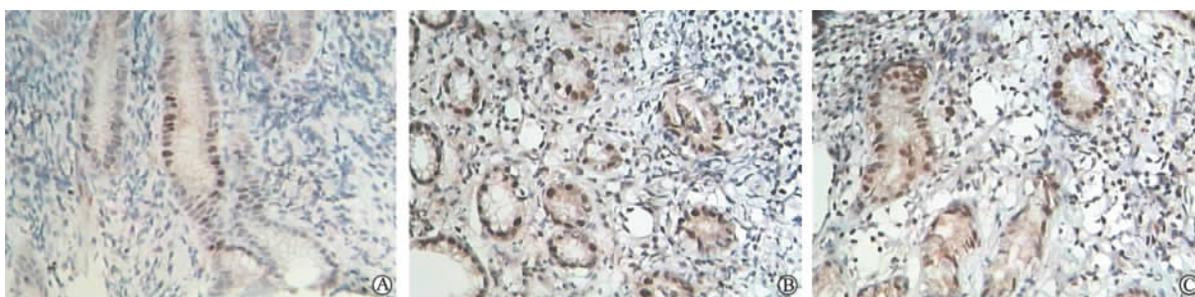


图 2 正常对照组(A)、原发性病理性 DGR 组 Hp 阳性(B)和阴性(C)组胃黏膜 PCNA 表达

Original magnification: $\times 400$

正常对照组细胞凋亡指数与增殖指数呈正相关 $(r = 0.702, P = 0.000)$, 原发性病理性 DGR 组中 Hp 阳性和 Hp 阴性亚组的细胞凋亡指数与增殖指数均呈正相关 $(r = 0.612, P = 0.020$ 和 $r = 0.565, P = 0.001)$ 。

3 讨论

原发性病理性 DGR 可造成胃黏膜慢性炎症、萎缩、肠上皮化生等改变, 病变产生与反流频率增加、反流持续时间延长以及反流量增大有密切关系。国外学者报道, 存在胃黏膜肠上皮化生的患者其胃内总胆酸的浓度显著高于无肠上皮

化生者^[5]。肠上皮化生发生在受损黏膜的修复过程中, 它的存在被认为是胃癌的高危因素。近年来研究发现细胞增殖和凋亡之间的失衡参与胃黏膜的损伤过程, 因此, 探讨原发性病理性 DGR 胃黏膜上皮细胞增殖和凋亡的关系可以进一步研究其发病机制, 为临床上的治疗提供理论依据。

胃黏膜完整性的维持依赖于胃黏膜上皮细胞增殖和死亡之间的动态平衡, 其中凋亡是黏膜上皮细胞死亡的主要形式。在正常胃黏膜中, 凋亡细胞主要位于黏膜表层上皮中, 形成“凋亡细胞带”, 增殖细胞主要位于胃黏膜腺颈部, 形成“增殖细胞带”, 这种分布特点体现了上皮自基底向表层逐渐

成熟、衰老、死亡的生长规律。正常情况下,细胞增殖和凋亡保持着一定的生长规律,当细胞正常增殖和分化被扰乱,从而导致细胞过度增殖和凋亡异常时,就会诱发疾病的发生^[6]。

TUNEL法通过从细胞水平检测凋亡时产生的特异性核小体片段所伴有的大量3'-OH来检测凋亡细胞,是目前原位检测凋亡细胞中灵敏度、特异度均较高的方法。PCNA是DNA聚合酶 δ 的辅助蛋白之一,对DNA的复制起重要的调节作用,与细胞的增殖状态密切相关。PCNA蛋白是目前公认的细胞增殖标记物,其表达上调或下调提示细胞增殖水平的上升或下降。本研究结果显示正常胃黏膜凋亡细胞量少且主要分布在黏膜表层,而原发性病理性DGR胃黏膜上皮凋亡细胞显著增加,且分布于腺体各部位,大量胃黏膜上皮细胞凋亡,可造成胃黏膜损伤,提示胃黏膜上皮细胞凋亡在原发性病理性DGR发生中起重要作用。细胞凋亡的增加可以导致胃黏膜的萎缩,胃腺体缩小,是萎缩性胃炎发生的原因之一。另外,胃腺体萎缩引起胃酸分泌减少,导致胃内细菌过度生长,有利于内源性致癌物的形成,进一步加重了胃黏膜的萎缩。为了保持胃黏膜的正常功能,胃黏膜上皮细胞代偿性增殖加快。胃黏膜上皮细胞凋亡增加伴随有代偿性增殖上调,其中增殖活跃的细胞会可能偏离正常的分化方向,导致肠上皮化生的发生^[7]。

Hp感染胃黏膜上皮后出现细胞凋亡增加,同时可伴随细胞增殖的增加^[8]。李子俊等^[9]报道Hp阳性者的慢性胃炎,胃黏膜细胞凋亡指数显著高于Hp阴性者,认为Hp诱导胃黏膜上皮细胞凋亡和过度增殖。原发性病理性DGR胃黏膜上皮细胞增殖和凋亡的研究尚未见报道,本研究中,原发性病理性DGR组中Hp阳性和Hp阴性亚组细胞凋亡指数及增殖指数均显著高于正常对照组,Hp阳性和Hp阴性亚组之间细胞凋亡指数及增殖指数无显著性差异,Hp阳性和Hp阴性亚组凋亡指数与增殖指数均呈正相关。说明原发性病理性DGR胃黏膜上皮细胞凋亡与增殖的调节紊乱,表现为大量的细胞凋亡和活跃的细胞增殖。在原发性病理性DGR发病过程中Hp阳性患者凋亡指数及增殖指数较之Hp阴性患者有所增加,但无统计学意义,因此Hp感染在原发性病理性DGR胃黏膜上皮细胞凋亡和增殖中可能不发挥重要作用。原发性病理性DGR可见胃黏膜丧失凋亡带和增殖带

的正常分布特点而发生紊乱,使胃黏膜细胞动力学发生改变,可能是原发性病理性DGR发病机制之一,从而在分子水平上揭示了原发性病理性DGR与慢性萎缩性胃炎及胃癌形成的关系,为慢性萎缩性胃炎及胃癌的防治提供了参考,然而,原发性病理性DGR胃黏膜损伤乃至癌变的发病机制是十分复杂的,尚需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Byrnes C K, Bahadursingh A, Akhter N, Parinandi N L, Nataraajan V, Montgomery E, et al. Duodenal reflux produces hyperproliferative epithelial esophagitis—a possible precursor to esophageal adenocarcinoma in the rat[J]. *Gastrointest Surg*, 2003, 7: 172-180.
- [2] Ma Z F, Wang Z Y, Zhang J R, Gong P, Chen H L. Carcinogenic potential of duodenal reflux juice from patients with long-standing postgastrectomy[J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7: 376-380.
- [3] 张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 林三仁, 胡品津, 刘文忠, 等. 幽门螺杆菌共识意见(2003·安徽桐城)[J]. *中华消化杂志*, 2004, 24: 126-127.
- [4] 许岸高, 李韶光. 胃癌癌前病变演化与细胞凋亡和增殖的关系[J]. *中华医学杂志*, 1999, 79: 185-186.
- [5] Nakamura M, Haruma K, Kamada T, Mihara M, Yoshihara M, Imagawa M, et al. Duodenogastric reflux is associated with antral metaplastic gastritis[J]. *Gastrointest Endosc*, 2001, 53: 53-59.
- [6] 彭黎明, 王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 412.
- [7] Scotiniotis I A, Rokkas T, Furth E E, Rigas B, Shiff S J. Altered gastric epithelial cell kinetics in *Helicobacter pylori*-associated intestinal metaplasia: implications for gastric carcinogenesis[J]. *Int J Cancer*, 2000, 85: 192-200.
- [8] Jang T J, Kim J R. Proliferation and apoptosis in gastric antral epithelial of patients infected with *Helicobacter Pylori*[J]. *Gastroenterol*, 2000, 35: 265-271.
- [9] 李子俊, 陈颜芳, 彭仲生, 林秋雄, 聂玉强, 王启仪. 幽门螺杆菌感染性胃炎细胞凋亡与 bcl-2/bax 表达的意义[J]. *癌症*, 2000, 19: 40-52.

[本文编辑] 孙岩, 尹茶