

• 临床实验研究论著 •

消化性溃疡患者血清幽门螺杆菌尿素酶表达及其影响因素

肖 晋¹, 王立军¹, 蔡方梅²

(广东省东莞市樟木头医院: 1. 检验科; 2. 胃镜室, 广东东莞 523633)

摘要:目的 研究消化性溃疡患者血清幽门螺旋杆菌尿素酶(UreA 和 UreB)表达及其影响因素。方法 选择消化性溃疡患者作为观察组、健康体检者作为对照组, 采用 RT-PCR 和 Western blot 的方法检测外周血尿素酶 mRNA 和蛋白水平表达量的变化情况, 并以尿素酶的变化作为因变量对影响因素进行二分类非条件 Logistic 回归分析。结果 观察组 UreA 的 mRNA 和蛋白水平与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$); UreB 的 mRNA 和蛋白平均明显高于对照组($P<0.05$); 消化性溃疡 UreB 表达量大于或等于 100 的患者中, 年龄大于或等于 40 岁的例数与 UreB<100 的患者比较差异无统计学意义($P>0.05$); 饮食规律的例数明显少于 UreB<100 的患者, 有吸烟史、酗酒史、焦虑和抑郁情绪的例数明显多于 UreB<100 的患者($P<0.05$); UreB 表达量升高与吸烟史、酗酒史和精神状态呈正相关, 与饮食习惯呈负相关。结论 消化性溃疡患者外周血尿素酶 UreB 的表达量明显升高, 并且与饮食因素呈负相关, 与精神因素、吸烟、酗酒呈正相关。

关键词: 消化性溃疡; 螺杆菌, 幽门; 尿素酶; 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.011 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2013)03-0282-03

The expression of Helicobacter pylori urease in peptic ulcer patients and its influencing factors

Xiao Jin¹, Wang Lijun¹, Cai Fangmei²

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Gastroscopy Room, Zhangmutou Hospital, Dongguan, Guangdong 523633, China)

Abstract: Objective To study the expression of Helicobacter pylori urease in peptic ulcer patients' serum and its influencing factors. Methods Peptic ulcer patients and healthy people were chosen as observation group and control group, respectively. Real time PCR and western-blot method were used to detect urease mRNA in peripheral blood and its expression on protein level. Unconditional Logistic regression analysis was put through to explore the influencing factors with the changes of urease as dependent variables. Results The levels of UreA mRNA and protein in observation group was not significantly different from those in control group($P>0.05$). The levels of UreB mRNA and protein in observation group were all higher than those in control group($P<0.05$). Among the peptic ulcer patients whose UreB expression more than or equal to 100, the distribution of 40-year-old patients was the same with the peptic ulcer patients whose UreB expression less than 100($P>0.05$), while the case number of patients having regular diet was less than peptic ulcer patients whose UreB expression less than 100, and the case number of patients having smoking history, alcoholism history, anxiety and the depression was significantly more than the latter group. The increase of UreB expression level had positive correlation with smoking history, alcoholism history and mental state, and had negative correlation with dietary habit. Conclusion In peripheral blood of patients with peptic ulcer, urease UreB expression level was elevated, and negatively correlated with dietary factors, positively correlated with psychological factors, smoking, and alcoholism.

Key words: peptic ulcer; Helicobacter pylori; urease; genes

消化性溃疡的发生与胃酸分泌过多、幽门螺杆菌感染、胃黏膜屏障损坏、胃排空延缓以及胆汁反流密切相关。幽门螺杆菌通过表达和分泌 Cag 蛋白、尿素酶等来诱发溃疡的发生。其中, 尿素酶(Urease)能够通过水解尿素释放 NH_4^+ 与胃酸发生中和反应, 进而保证幽门螺杆菌能够耐受胃部酸性环境、穿过胃黏液的物理屏障而定植于胃黏膜表面。在此为了进一步探讨消化性溃疡患者血清幽门螺杆菌尿素酶表达及其影响因素, 笔者进行了下列研究, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2010 年 6 月 30 日到 2011 年 6 月 30 日期间在本院就诊的 160 例消化性溃疡患者的临床资料作为观察组, 其中胃溃疡 91 例、十二指肠溃疡 69 例, 男 92 例、女 68 例, 年龄分布在 27~59 岁, 平均年龄(42.58±6.93)岁, 病程 1~7 年、平均(3.87±0.56)年。所有患者均出现了典型的腹部疼痛、饱胀感、消化功能不良等临床症状, 并且经过胃镜检查及 ^{14}C 尿素呼气试验确诊为幽门螺杆菌阳性胃溃疡。选择同

期在我院体检的 160 例健康者作为对照组, 其中男 90 例、女 70 例, 年龄分布在 25~60 岁, 平均年龄(41.98±5.98)岁。两组患者性别、年龄、全身情况等差异均无统计学意义($P>0.05$), 具有可比性。

1.2 观察指标

1.2.1 一般情况调查 采用问卷调查的形式了解患者的年龄层次、饮食习惯、吸烟史、酗酒史、焦虑和抑郁的精神状况。

1.2.2 血清尿素酶 mRNA 水平检测(RT-PCR) 采用血清 RNA 提取试剂盒(北京天根公司)抽提患者外周血中的总 mRNA, 并反转录合成 cDNA 第一链。PCR 扩增采用 sybgrn 荧光定量 PCR 试剂盒(Takara 公司), 扩增仪器为安捷伦 Mx3000P 荧光定量 PCR 仪, 扩增条件: 95℃、15 s, 特异性退火温度、30 s, 72℃、30 s, 40 个循环。β-actin: 上游 5'-TGT GTT GGC GTA CAG GIC TTT G-3'、下游 5'-GGG AAA TCG TGC GTG ACA TTA AG-3', 退火温度 60℃。UreA: 上游 5'-GCG TCC CTA ATG GCT AGC CA-3'、下游 5'-TTC

GCC AAT CCA TGG CAA CGC-3',退火温度 58.1 ℃;UreB:上游 5'-TGC CAC GTC AAT GGC ATC-3';下游 5'-GGA ACT CAG CGC TTA ACG GAT-3',退火温度 62.1 ℃。

分别扩增同一样本的目的基因 UreA、UreB 以及看家基因 β -actin。根据扩增曲线得到 Ct 值(cycle threshold)并利用其 Δ Ct 值进行相对定量,即用每个样本目的基因的 Ct 值减去的 β -actin 的 Ct 值得到 Δ Ct 值,再用观察组的 Δ Ct 减去对照组的 Δ Ct($\Delta\Delta$ Ct),代入公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算即得到处理组相对对照组 PCR 产物的浓度比值。取对照组的基因的数值为 100,乘以上述的浓度比值即得出对照组的基因的数值,以此来反映 UreA 和 UreB 表达量的变化。

1.2.3 血清尿素酶蛋白水平检测(Western blot) 配制 10% 的上层胶和 5% 的下层胶。上样后采用 100 V 电压进行垂直电泳(天能公司 VE-180 垂直电泳槽)20 min,当样品进入上下层胶的交界处并形成水平线状时,将电压调至 120 V,继续电泳 90 min。取出凝胶,进行电转膜。电转膜后将 NC 膜置于 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h,而后用 TBST 洗 3 遍,每遍 5 min。按照 NC 膜上标记物的指示,分别裁剪 CK 和 actin 所在的条带,加入山羊来源的 UreA、UreB 第一抗体和兔来源的 actin 第一抗体,摇床孵育 1 h 后放于 4 ℃ 孵育过夜。第 2 天取出 NC 膜, TBST 洗 3 遍,每遍 5 min,加辣根过氧化物酶标记的驴抗羊第二抗体或鼠抗兔第二抗体室温孵育 1 h。最后在 NC 膜上加 0.2~0.5 mL ECL 发光试剂进行显影。采用 Image 图像分析软件对所得图片进行灰度分析,得到基因条带的灰度值。用每个样本目的基因 UreA、UreB 的灰度值与 β -actin 的灰度值相比,即得到该样本中目的基因蛋白水平的相对浓度。取对照组的基因的相对浓度为 100,计算出目的基因 UreA 和 UreB 蛋白水平的相对浓度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件对上述数据进行统计学分析,计量资料采用 *t* 检验、计数资料单因素分析采用卡方检验,所得结果均按 $P<0.05$ 判定为具有统计学差异。根据单因素分析结果,按下列标准进行二分类量化:年龄小于 40 岁为 0 分、大于或等于 40 岁为 1 分;饮食习惯不规律为 0 分、规律为 1 分;吸烟史无为 0 分、有为 1 分;无酗酒史为 0 分、有酿酒为 1 分;精神状态, HAMA 评分小于 18、HAMD 评分小于 16 则为 0 分, HAMA 评分大于或等于 18、HAMD 评分大于或等于 16 则为 1 分,并以尿素酶的变化作为应变变量对影响因素进行二分类非条件 Logistic 回归分析。

2 结 果

2.1 两组患者外周血尿素酶表达情况 观察组 UreA 的 mRNA 和蛋白水平与对照组比较无统计学差异($P>0.05$);UreB 的 mRNA 和蛋白水平均明显高于对照组($P<0.05$)。

组别	mRNA 水平		蛋白水平	
	UreA	UreB	UreA	UreB
对照组	100	100	100	100
观察组	103.74±11.48	198.57±20.85	102.95±10.88	219.85±23.57
<i>t</i> 值	0.723	8.952	0.623	9.852
<i>P</i> 值	0.0872	0.0318	0.0782	0.0296

2.2 消化性溃疡患者 UreB mRNA 表达水平影响因素的单因素分析 消化性溃疡 UreB mRNA 水平大于或等于 100 的患者中,年龄大于或等于 40 岁的例数与 UreB<100 的患者比较差异无统计学意义($P>0.05$);饮食规律的例数明显少于

UreB<100 的患者,有吸烟史、酗酒史、焦虑和抑郁情绪的例数明显多于 UreB<100 的患者($P>0.05$),见表 2。

表 2 UreB mRNA 表达水平影响因素的单因素分析结果(*n*)

mRNA 水平	<i>n</i>	年龄大于或等于 40 岁	规律饮食	有吸烟史	有酗酒史	焦虑抑郁
UreB≥100	97	63	18	72	54	61
UreB<100	63	43	53	13	7	11
χ^2 值	—	1.083	7.742	12.482	15.327	10.842
<i>P</i> 值	—	0.062 5	0.038 7	0.019 8	0.010 7	0.028 4

—:无数据。

2.3 消化性溃疡患者 UreB 蛋白表达水平影响因素的单因素分析 消化性溃疡 UreB 蛋白水平大于或等于 100 的患者中,年龄大于或等于 40 岁的例数与 UreB<100 的患者差异无统计学意义($P>0.05$);饮食规律的例数明显少于 UreB<100 的患者,有吸烟史、酗酒史和焦虑抑郁情绪的例数明显多于 UreB<100 的患者($P<0.05$),见表 3。

表 3 UreB 蛋白表达水平影响因素的单因素分析结果(*n*)

mRNA 水平	<i>n</i>	年龄大于或等于 40 岁	规律饮食	有吸烟史	有酗酒史	焦虑抑郁
UreB≥100	96	65	15	69	51	59
UreB<100	64	41	56	16	10	13
χ^2 值	—	0.971	7.174	11.942	14.883	10.174
<i>P</i> 值	—	0.071 8	0.039 8	0.021 3	0.011 8	0.029 9

—:无数据。

2.4 消化性溃疡患者 UreB 表达影响因素的 Logistic 分析 以消化性溃疡患者 UreB 表达量的变化作为因变量,对饮食习惯、吸烟史、酗酒史、精神状态 4 个自变量进行 Logistic 分析可知,UreB 表达量升高与吸烟史、酗酒史和精神状态呈正相关,与饮食习惯呈负相关($P<0.05$),见表 4。

表 4 消化性溃疡患者 UreB 表达影响因素的 Logistic 分析结果

影响因素	回归系数	标准误	OR 值	95%CI	<i>P</i> 值
饮食习惯	-0.822	0.184	0.564	0.382~0.789	0.002
吸烟史	0.492	0.131	1.984	1.292~2.567	0.001
酗酒史	0.588	0.322	1.678	1.039~2.294	0.005
精神状态	0.842	0.577	2.394	1.742~3.094	0.001

3 讨 论

消化性溃疡是指发生于胃和十二指肠的溃疡,是消化道常见的疾病,患者会腹部节律性疼痛、消化道出现出血、穿孔甚至发生梗阻。近些年该病的发病率呈现出日益升高的趋势。溃疡的发生与多种因素相关,其中最根本的原因是攻击胃黏膜的因素要强于保护胃黏膜的因素,攻击胃黏膜的因素包括胃酸分泌过多、幽门螺杆菌感染、胃黏膜屏障损坏、胃排空延缓以及胆汁反流^[1]。其中胃酸是造成胃和十二指肠黏膜损伤的直接因素,因此一直以来都将抑制胃酸分泌作为治疗消化性溃疡的重点。抑制胃酸分泌的药物包括 H2 拮抗剂、毒草碱受体拮抗剂、质子泵抑制剂,这些药物的使用能够有效抑制胃酸的分泌、缓解胃溃疡的临床症状。但是临床研究发现使用抑制胃酸分泌药物后 6 个月溃疡的复发率相当高,达到了 40%~50%。相关研究发现,溃疡的复发与幽门螺杆菌(H. pylori)的感染密切相关^[2],在使用抑酸药物治疗消化性溃疡时,并不能根除幽

门螺杆菌,因此损伤胃黏膜的因素持续存在,进而导致了疾病的复发。

幽门螺杆菌引起消化性溃疡的机制与其所表达和分泌的 Cag 蛋白、尿素酶等密切相关。其中,Cag 蛋白能直接作用于胃黏膜的上皮细胞,诱导细胞凋亡、引起细胞坏死,进而导致胃黏膜损伤和胃溃疡的发生^[3]。尿素酶(Urease)虽然不能直接作用于胃和十二指肠黏膜,但是对于幽门螺杆菌在胃和十二指肠黏膜上的定植和寄居具有极为重要的意义。尿素酶能够通过水解尿素释放 NH₄⁺与胃酸发生中和反应,进而保证幽门螺杆菌能够耐受胃部酸性环境、穿过胃黏液的物理屏障而定植于胃和十二指肠黏膜表面。尿素酶占幽门螺杆菌所合成分泌蛋白的 6%~10%,含量极为丰富^[4-7]。该酶是一个相对分子质量 550 000 的金属蛋白酶,由尿素酶 A(UreA)和尿素酶 B(UreB)两个亚单位构成,呈六聚体结构。相关研究显示,UreB 是尿素酶的活性亚基,对尿素酶的生物学功能起决定性的作用^[8-9]。由上述研究可知,观察组 UreA 的 mRNA 和蛋白水平与对照组差异无统计学意义($P>0.05$);UreB 的 mRNA 和蛋白水平均明显高于对照组($P<0.05$)。这就进一步验证了尿素酶 UreB 亚基在消化性溃疡发生发展过程中起着至关重要的作用。

消化性溃疡的发生与年龄、饮食因素、精神因素以及吸烟、饮酒等密切相关^[10-12],为了进一步探讨这些因素对于尿素酶 UreB 表达量的影响,笔者进行了单因素分析和多因素分析。通过单因素分析可知,消化性溃疡 UreB 表达量大于或等于 100 的患者中,年龄大于或等于 40 岁的例数与 UreB<100 的患者比较差异无统计学意义($P>0.05$);饮食规律的例数明显少于 UreB<100 的患者($P<0.05$),有吸烟史、酗酒史和焦虑抑郁情绪的例数明显多于 UreB<100 的患者。这就说明饮食习惯、精神因素、吸烟史和酗酒史与 UreB 表达量的升高密切相关。为了进一步探讨上述因素与 UreB 表达量的关系,笔者以 UreB 的表达量为因变量进行了 Logistic 回归分析。有结果可以看出,UreB 表达量升高与吸烟史、酗酒史和精神状态呈正相关,与饮食习惯呈负相关。这就说明吸烟、酗酒以及焦虑抑郁情绪可以促进 UreB 的表达,是消化性溃疡发生的危险因素;规律饮食可以抑制 UreB 的表达,是消化性溃疡发生的保护因素。

(上接第 281 页)
的应用提供一些理论帮助。

参考文献

[1] Blom HJ. Folic acid, methylation and neural tube closure in humans[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2009, 85(4): 295-302.

[2] van der Put NM, van Straaten HW, Trijbels FJ, et al. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview[J]. Exp Biol Med, 2001, 226(4): 243-270.

[3] Zeycek D, Soran M, Cakmak A, et al. Serum copper and zinc levels in mothers and cord blood of their newborn Infants with neural tube defects: a case-control study[J]. Indian Pediatr, 2009, 46(8): 675-80.

[4] 张卫, 任爱国, 裴丽君, 等. 微量元素与神经管畸形关系的病例对照研究[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(10): 772-776.

[5] 陈志杰, 陈意振, 殷美芳, 等. 神经管畸形的产前筛查[J]. 中国优生与遗传杂志, 2005, 13(7): 103.

综合以上讨论可以得出结论,消化性溃疡患者外周血尿素酶 UreB 的表达量明显升高,并且与饮食因素、精神因素、吸烟、酗酒密切相关。

参考文献

[1] 关新, 胡掌朝, 孟君杰. 3 065 例尿素¹⁴C 呼气试验结果的分析[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(12): 2150-2150.

[2] 李海侠, 吴亚男, 王宪灵. 抗幽门螺旋杆菌尿素酶 B 亚单位(UreB)单克隆抗体抗原识别表位的初步鉴定[J]. 免疫学杂志, 2007, 23(2): 184-187.

[3] 王学海, 毛亚飞, 严杰. 幽门螺杆菌 UreB 抗原表位预测及其有效表位噬菌体展示的筛选[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(5): 432-436.

[4] 杨武晨, 郭红. 幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位的疫苗研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(12): 1139-1141.

[5] Leal YA, Flores LL, Fuentes-Panana EM. ¹³C-urea breath test for the diagnosis of Helicobacter pylori infection in children: a systematic review and meta-analysis[J]. Helicobacter, 2011, 16(4): 327-337.

[6] 李虎, 谭礼让, 易鸣. ¹⁴C 呼气试验与快速尿素酶试验检测幽门螺杆菌感染的对比研究[J]. 中国当代医药, 2011, 18(33): 74-75.

[7] Weeks DL, Sachs G. Sites of pH regulation of the urea channel of Helicobacter pylori[J]. Mol Microbiol, 2009, 40(6): 1249-1259.

[8] Gueneau P, Loiseaux DG. Helicobacter: molecular phylogeny and the origin of gastric colonization in the genus[J]. Infect Genet Evol, 2008, 1(3): 215-223.

[9] Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, et al. Expression of the Helicobacter pylori ureI gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease[J]. Infect Immun, 2008, 68(2): 470-477.

[10] Goldman, Bennett, 王贤才. 西氏内科学[M]. 21 版. 西安: 世界图书出版西安公司, 2008.

[11] 周中银, 罗和生. 埃索美拉唑三联疗法治疗幽门螺杆菌阳性十二指肠溃疡近期及远期疗效[J]. 四川医学, 2006, 27(7): 708-709.

[12] 樊德存, 王永利. 中国药物大全·西药卷[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 401.

(收稿日期: 2012-10-09)

[6] Simmons CJ, Mosley BS, Fulton-Bond CA, et al. Birth defects in Arkansas: is folic acid fortification making a difference[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Terato, 2004, 70(9): 559-564.

[7] Walker MC, Smith GN, Perkins SL, et al. Changes in homocysteine levels during nonnal Pregnancy[J]. Am J Obstet Gynecol, 1999, 180(3 Pt 1): 660-664.

[8] Roberts RF, Roberts WL. Performance characteristics of total homocysteine in serum or plasma[J]. Clin Chim Acta, 2004, 344(1/2): 95-104.

[9] 刘大艳, 肖立. 孕妇羊水同型半胱氨酸、叶酸及 Vit B12 与胎儿畸形的关系[J]. 吉林医学, 2011, 32(10): 1893-1894.

[10] Wenstrom KD, Johanning GL, Owen J, et al. Role of amniotic fluid homocysteine level and of fetal 5, 10-methylenetetrahydra folate reductase genotype in the etiology of neural tube defects[J]. Am J Med Genet. 2000, 90(1): 12-16.

(收稿日期: 2012-10-11)