

• 论 著 •

口腔与胃内幽门螺杆菌感染的相关性研究

万洋洋, 陈 相, 赵 杠, 王 朔[△]

(江苏省南通市第一人民医院 226001)

摘要:目的 探讨口腔与胃幽门螺杆菌感染的相关性。方法 用幽门螺杆菌的特异性引物及特异 Taqman 探针进行荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测 27 例根除治疗失败患者牙菌斑和胃黏膜幽门螺杆菌 DNA, 并进一步运用单链构象多态性(SSCP)分析技术分析口腔和胃内幽门螺杆菌菌株 DNA 基因型。结果 FQ-PCR: 27 例胃黏膜及牙菌斑标本采用 FQ-PCR 检测幽门螺杆菌, 胃黏膜均为阳性; 牙菌斑 25 例阳性, 2 例阴性。SSCP: 胃黏膜和牙菌斑幽门螺杆菌基因型相同者(SSCP 带型相同)19 例, 其余 6 例两者至少有 1 种相同的 SSCP 带型。结论 同一个体牙菌斑和胃黏膜中的幽门螺杆菌属同种菌株的可能性大。口腔幽门螺杆菌可能是胃幽门螺杆菌感染的重要来源。胃幽门螺杆菌感染与口腔幽门螺杆菌感染密切相关。

关键词:幽门螺杆菌; 荧光定量聚合酶链反应; 多态性分析

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.18.023

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2016)18-2566-03

The correlation between helicobacter pylori infection in oral cavity and stomach

WAN Yangyang, CHEN Xiang, ZHAO Ping, WANG Shuo[△]

(First People's Hospital of Nantong, Jiangsu Nantong 226001, China)

Abstract: Objective To explore relationship between helicobacter pylori(Hp) infection in oral cavity and stomach. **Methods** A fluorogenic quantitative polymerase chain reaction(FQ-PCR) assay with specific primers and specific Taqman probe was used to detect Hp in dental plaque and gastric biopsy in 27 patients with eradication failure. Then the products were further processed by single-strand conformation polymorphism(SSCP). **Results** (1) FQ-PCR: we detected Hp in 27 gastric biopsy samples and dental plaque using fluorogenic quantitative polymerase chain reaction(FQ-PCR) technique. As the results, positive results could be found in 27 gastric biopsy samples. 25 of positive results and 2 of negative results could be found in 27 dental plaque samples. (2) SSCP: Hp can be detected both in gastric biopsy samples and dental plaque in 25 patients, and 19 of them have the same genotype of Hp, since the banding patterns detected by SSCP method were all same in Hp from gastric biopsy and dental plaque. At least one specific banding pattern by SSCP was found to be same in the Hp from dental plaques and gastric biopsy of other 6 patients. **Conclusion** The results suggest that the genotype in gastric biopsy samples and dental plaque in one person may be same. Oral Hp infection may be an important source of gastric Hp infection. The Hp infection in stomach might be closely relevant to the infection in oral cavity.

Key words: helicobacter pylori; fluorogenic quantitative polymerase chain reaction; single-strand conformation polymorphism

目前, 胃幽门螺杆菌在我国人群中的感染率为 50% 以上, 感染后可产生不同的结局, 多数有不同程度慢性胃炎, 部分可发生消化性溃疡, 少数发生胃恶性肿瘤^[1]。研究表明, 幽门螺杆菌感染后胃癌发生率增加 4~9 倍, 且 60% 胃癌患者有幽门螺杆菌感染, 幽门螺杆菌感染在动物模型有直接的致突变作用^[2-4]。在治疗上, 幽门螺杆菌对抗菌药物的耐药性是根除治疗失败的主要因素, 其次, 幽门螺杆菌胃黏膜外寄生可能是治疗胃幽门螺杆菌根除率低下的又一原因。临床医生在用药方面急需寻求一些用于辅助改进或完善现有的抗菌治疗方案的新的检测方法作为指导, 以提高胃幽门螺杆菌治疗后的根除率。基于上述情况, 作者依据幽门螺杆菌的特异性引物及特异 Taqman 探针进行荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR), 检测复发者牙菌斑和胃内幽门螺杆菌, 并用单链构象多态性(SSCP)分析牙菌斑和胃内幽门螺杆菌的基因型异同, 探讨口腔幽门螺杆菌感染与胃幽门螺杆菌感染的相关性, 以指导临床在制订胃、口同步治疗的新方案上提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 8 月至 2015 年 6 月在本院消化内科就诊的 27 例经 PPI 三联或四联 7 d 疗法、规范的抗幽门

螺杆菌根除治疗失败患者, 并取得患者知情同意提取胃黏膜及牙菌斑标本 DNA。

1.2 仪器与试剂 幽门螺杆菌荧光定量检测试剂盒由上海源奇生物医药科技有限公司提供, 仪器采用 Roche 公司的 Cobas z 480 荧光定量 PCR 仪。上海万达科技器材服务部 DY-501 电泳仪。美国 Bio-Rad 公司的凝胶图像分析系统。

1.3 方法 QF-PCR 操作过程: 口腔牙菌斑标本提取由口腔科医生完成, 用无菌洁齿器刮取龈上、龈下多牙位菌斑 3~5 份标本, 混合放置于含 200 μL TE 缓冲液的 Ep 管中, 4 ℃ 冰箱保存。胃黏膜标本提取: 患者行电子胃镜检查的同时在胃窦距幽门 2~4 cm 范围取胃黏膜 2~3 块, 大小一般直径 3 mm 左右, 置于 1.5 mL 离心管中, 4 ℃ 保存不超过 24 h, 密闭送检。所有样本 -70 ℃ 下长期保存不超过 3 个月, 避免反复冻融。样本处理: 样本解冻后加入 200 μL 生理盐水振荡 5 s, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加 50 μL 核酸提取液(内含固体沉淀颗粒物, 混匀颗粒均态分布), 再加入 5 μL 蛋白酶 K, 剧烈振荡 1 min。55 ℃ 水浴 30~60 min, 其间每间隔 10 min 振荡 15 s; 100 ℃ 水浴或干浴 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液供 PCR 扩增用。阴性对照直接提取 50 μL, 加入 50 μL 核酸提

取液,混匀后 100 ℃水浴或干浴 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,备用(目的:监控提取液和提取过程是否存在污染),也可以不做处理,直接作为已提取完成的样本加样。试剂配制:从试剂盒中取出幽门螺杆菌反应混合液,在室温下融化并振荡混匀后,2 000 r/min 离心 10 s。计算需准备反应试剂人份数($n=$ 样本数+阴性对照数+4 管定量标准品)。将幽门螺杆菌 PCR 反应液充分混匀后加入 Ep 管中,制备混合管,随后按 36 μL/管加样量分装到 PCR 反应管中,转移至样本处理区。加样:分别加入 4 μL 的阴性对照、定量标准品(1#~4#)、样品处理上清液,盖紧反应管,转移到检测区。PCR 扩增及荧光检测:将各反应管按照一定顺序放入 PCR 仪上,按以下程序进行 PCR 扩增:步骤 1,循环数 1,温度 95 ℃,3 min;步骤 2,循环数 40,温度 94 ℃,15 s,温度 60 ℃,30 s。检测荧光选择:选择 FAM 荧光检测,反应体系总体积:40 μL。 $C_t \leq 36.0$ 者阳性, $C_t > 36.0$ 者阴性。SSCP 操作过程:取牙菌斑和胃黏膜标本 FQ-PCR 均为阳性的产物按以下过程试验,5 μL PCR 产物中加入变性液 10 μL,37 ℃水浴 10 min,变性为单链 DNA 片段,经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(100 V,4 h),硝酸银染色 30 min,加入显色液显色,直至条带出现,封胶后利用凝胶图像分析系统进行分析。

2 结 果

2.1 FQ-PCR 27 例患者胃黏膜及牙菌斑标本采用 FQ-PCR 检测幽门螺杆菌,胃黏膜均为阳性;牙菌斑阳性 25 例,阴性 2 例。见图 1、2。

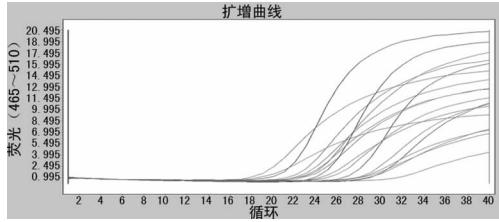


图 1 部分患者标本及幽门螺杆菌标准品的 FQ-PCR 扩增曲线

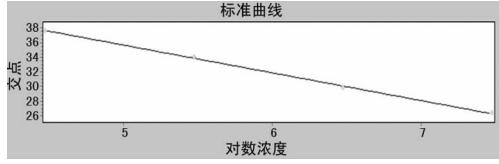
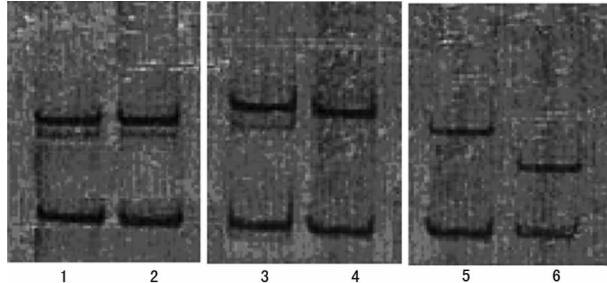


图 2 幽门螺杆菌的 FQ-PCR 标准品标准曲线



注:单数为胃黏膜标本,双数为牙菌斑标本。

图 3 3 例患者胃黏膜和牙菌斑的 SSCP 带型配对分析

2.2 SSCP 结果表明,25 例牙菌斑幽门螺杆菌阳性标本中胃黏膜和牙菌斑幽门螺杆菌基因型相同者 19 例,表现为 SSCP 带型一致;其余 6 例两者至少有 1 种相同的 SSCP 带型。图 3 中为 3 例患者胃黏膜和牙菌斑的 SSCP 带型配对分析,前 2 例

患者带型基本一致,后 1 例患者有 1 个带相同,1 个带不同。

3 讨 论

幽门螺杆菌感染是慢性胃炎和消化性溃疡的主要致病因素,也是胃癌的诱发因素之一,被国际癌症研究机构认定为 I 类致癌因子^[5]。近年来,三联、四联疗法的胃幽门螺杆菌根除率呈明显下降趋势,究其原因:幽门螺杆菌的耐药性^[6-7];定植密度大,不易根除;宿主的免疫状态及患者的依从性较差;胃黏膜外有其他的幽门螺杆菌储存灶等。口腔作为幽门螺杆菌的另一个储存灶,支持了幽门螺杆菌可经口-口及胃-口传播的学说。常规的三联、四联疗法虽可杀灭胃内幽门螺杆菌,却不能有效地根除定植于牙菌斑中的幽门螺杆菌^[8]。牙菌斑屏障使口腔中的幽门螺杆菌难以根除,而口腔中持续存在的幽门螺杆菌无疑会影响胃内幽门螺杆菌的根除效果,且会不断地随吞咽而进入胃内,给后续根除治疗带来困难,并诱发幽门螺杆菌耐药菌产生。

口腔与胃内再感染幽门螺杆菌的基因是否具有同源性,作者首先运用 FQ-PCR 对 27 例根除治疗失败患者的胃黏膜及牙菌斑标本进行检测,发现胃黏膜 27 例均为阳性,牙菌斑 25 例阳性。牙菌斑 2 例阴性可能是由于菌斑量微影响 PCR 检测的结果,亦或存在幽门螺杆菌其他传播途径。然后作者运用 SSCP 分析法对 25 例 FQ-PCR 均阳性的扩增产物进行分析发现,SSCP 带型 19 例相同,其余 6 例 SSCP 带型至少有 1 种相同,表明同一患者的胃黏膜和牙菌斑中检测到的幽门螺杆菌可能属于同种菌株,但也不能排除少数呈不同菌株的混合性感染。从比较结果来看,作者有理由认为,口腔不仅是幽门螺杆菌在人体内的另一个聚集地,而且口腔中寄生的幽门螺杆菌可能是胃内幽门螺杆菌感染的重要来源之一。可通过基因测序进一步加以确证。由此,作者得出由于口腔是幽门螺杆菌又一聚集地,临幊上常规治疗幽门螺杆菌均为口服全身给药,药物很难将口腔中寄生的幽门螺杆菌杀灭,其原因可能是牙菌斑中的微生物具有独特的“生物膜”结构,药物不易侵入,且药物在唾液中的水平较低,幽门螺杆菌能借此逃避抗菌药物的杀灭,故目前的给药方式对其作用甚微;此外,菌斑的生物膜结构又是幽门螺杆菌避难的一道屏障,帮其逃避药物的杀害^[9]。即使胃内幽门螺杆菌经初次治疗被根除,定植于牙菌斑中的幽门螺杆菌可释放入唾液中,可能不断地伴随着吞咽运动入胃,引起胃内幽门螺杆菌的再感染。定植于口腔中的幽门螺杆菌,是胃幽门螺杆菌根除治疗失败或再感染的重要原因。因此,口腔与胃幽门螺杆菌感染的检测和治疗同样重要,鉴于全身用药效果不佳,口腔幽门螺杆菌局部治疗也必须同步进行,才能真正提高幽门螺杆菌的根除率^[10-11]。

综上所述,口腔是除胃以外的幽门螺杆菌又一重要定植地,胃内幽门螺杆菌再感染与口腔内是否存在幽门螺杆菌感染密切相关,口腔内是否定植幽门螺杆菌是影响胃幽门螺杆菌根除治疗能否成功的关键。

参考文献

- [1] 徐开生,施为民. 幽门螺杆菌感染的检测方法及临床应用选择[J]. 现代检验医学杂志,2010,25(1):27-29.
- [2] 全俊,范学工. 幽门螺杆菌感染与胃癌发生的实验研究进展[J]. 世界华人消化杂志,1999,7(12):1068-1069.
- [3] Kodama M, Murakami K, Sato R, et al. Helicobacter pylori-infected animal models are extremely suitable for the investigation of gastric carcinogenesis (下转第 2570 页)

较,差异无统计学意义($P < 0.05$)。2种方法检测利福平耐药的菌株有43例,均为敏感的菌株121例,以比例法药物敏感试验作为金标准,Xpert MTB/RIF检测利福平耐药的敏感度为97.73%(43/44),特异性为97.58%(121/124),检测结果见表4。

3 讨 论

传统的结核病诊断方法的敏感度和特异度较低且耗时耗力,无法满足临床需要,近年来,随着分子生物学技术的发展,越来越多的分子诊断技术不断涌现,Xpert MTB/RIF技术便是其中之一。该技术是将PCR所需的3个步骤即样本准备、扩增、检测集于一体的实时荧光定量核酸扩增检测技术,操作简便,试验中基本不产生气溶胶,极大程度地减少了操作中污染的可能性。该方法自动运行并检测是否为MTB及是否对RIF耐药,快速、简便完成整个试验约2 h。

本文对408例结核患者标本同时采用抗酸染色法、固体培养法和Xpert MTB/RIF检测,Xpert MTB/RIF法具有更高的敏感度及特异度^[3-4]。Xpert MTB/RIF检测痰标本与灌洗液标本阳性率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),这与相关的报道基本一致^[5-6]。表2、3显示,Xpert MTB/RIF检测为“低”和“极低”2个量级的标本,抗酸染色法的阳性率极低,这与国外报道类似^[7-8]。表1中有1例抗酸染色法和培养阳性而Xpert MTB/RIF检测为阴性的标本,后经菌种鉴定为胞内分枝杆菌。

传统的MTB药敏试验需要进行菌株的分离培养,耗时长达2个月,而Xpert MTB/RIF可快速测定对利福平的耐药情况,并且具有较高的符合率,为临床选择药物治疗提供重要依据。对于Xpert MTB/RIF与比例法检测RIF耐药结果不一致的4株菌,可能与药物敏感性试验的控制条件不良有关,也可能与某些基因位点突变的低水平耐药相关^[9]。

综上所述,Xpert MTB/RIF具有敏感度及特异度高、检出时间短的优势,适用于抗酸染色阴性的可疑结核病患者的快速诊断,并且与参考方法的药敏试验结果有较高的符合率。

参考文献

- [1] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组,全国(上接第2567页)
[J]. World Journal of Gastroenterology, 2005, 11(45): 7063-7071.
- [4] Watanabe T, Tada M, Nagai H, et al. Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils[J]. Gastroenterology, 1998, 115(3): 642-648.
- [5] Venerito M, Selgrad M, Malfertheiner P. Helicobacter pylori: gastric cancer and extragastric malignancies-clinical aspects[J]. Helicobacter, 2013, 18(Suppl1): 39-43.
- [6] Selgrad M, Tammer I, Langner C, et al. Different antibiotic susceptibility between antrum and corpus of the stomach, a possible reason for treatment failure of Helicobacter pylori infection[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(43): 16245-16251.
- [7] Gisbert JP, Romano M, Molina-Infante J, et al. Two-week, high-dose proton pump inhibitor, moxifloxacin triple Helicobacter pylori therapy after failure of standard

第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 485-508.

- [2] 赵雁林, 刘志敏. 结核病实验室标准化操作与网络建设[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 227-280.
- [3] Mour R, Munoz L, Torres M, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method[J]. Clin Microbiol, 2011, 49(3): 1137-1139.
- [4] 李辉, 谭耀驹, 李洪敏. 利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术的诊断效果对比研究[J]. 中国防痨杂志 2014, 36(6): 472-476.
- [5] 刘亚芹, 杨振斌. Gene Xpert MTB/RIF法检测MTB及其对利福平耐药性的研究[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2015, 9(4): 524-527.
- [6] 李妍, 张天华, 鲜小萍, 等. Xpert MTB/RIF技术在MTB检测中的应用价值[J]. 医学检验, 2016, 31(1): 52-55.
- [7] Rachow A, Zumla A, Heinrich N, et al. Rapid and accurate detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples by Cepheid Xpert MTB/RIF assay-a clinical validation study[J]. PLoS One, 2011, 6(6): 20458.
- [8] Lawn SD, Nicol MP. Xpert MTB/RIFassay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance[J]. Future Microbiology, 2015, 6(9): 1067-1082.
- [9] 张卓然, 夏梦岩, 倪语星, 等. 微生物耐药的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 193-287.

(收稿日期:2016-04-27 修回日期:2016-07-05)

triple or non-bismuth quadruple treatments[J]. Dig Liver Dis, 2015, 47(2): 108-113.

- [8] Czesnikiewicz-Guzik M, Loster B, Bielanski W, et al. Implications of oral Helicobacter pylori for the outcome of its gastric eradication therapy[J]. J Clin Gastroenterol, 2007, 41(2): 145-151.
- [9] Scherubl H, Fischbach W, Glocker E, et al. What is new in treating Helicobacter pylori infection [J]. Dtsch Med Wochenschr, 2015, 140(4): 277-280.
- [10] Ferreira J, Moss SF. Current paradigm and future directions for treatment of helicobacter pylori infection[J]. Curr Treat Options Gastroenterol, 2014, 12(4): 373-384.
- [11] Bang CS, Baik GH. Attempts to enhance the eradication rate of Helicobacter pylori infection[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(18): 5252-5262.

(收稿日期:2016-04-08 修回日期:2016-06-15)