



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.10.013

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.10.013

· 论著 ·

# 幽门螺杆菌感染的胃癌和癌前病变组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$ 的表达及临床意义

郑轶 刘颜敏 陈志涛 裴昕屿 龚旭阳 张姮

**【摘要】 目的** 检测幽门螺杆菌(HP)感染的慢性浅表性胃炎、癌前病变、胃癌组织中肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  表达,初步探讨 TNF- $\alpha$  在胃癌发生过程中的临床意义。**方法** 收集 HP 阳性[HP(+)]患者的胃黏膜活检标本 400 例,根据病理诊断分为 HP(+ )慢性浅表性胃炎组 200 例、HP(+ )癌前病变组 120 例、HP(+ )胃癌组 80 例。收集同期 HP 阴性[HP(-)]患者胃黏膜标本 110 例。分别采用实时荧光定量聚合酶链反应、蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测各组组织中 TNF- $\alpha$  的 mRNA 和蛋白表达水平并进行比较。**结果** HP(+ )慢性浅表性胃炎组、HP(+ )癌前病变组、HP(+ )胃癌组的标本中 TNF- $\alpha$  mRNA 和蛋白表达水平均逐渐升高( $P < 0.05$ )。HP(+ )的胃黏膜组织标本中 TNF- $\alpha$  mRNA 和蛋白表达水平均高于 HP(-)的同类型胃黏膜组织( $P < 0.05$ )。**结论** 在 HP 感染的慢性胃炎进展至癌前病变再到胃癌的过程中,TNF- $\alpha$  表达逐渐增加,提示 TNF- $\alpha$  可能与胃癌的发生相关,TNF- $\alpha$  的异常表达可能是 HP 促进胃癌发生的作用机制之一。

**【关键词】** 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 胃癌; 癌前病变; 幽门螺杆菌

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,严重威胁人类健康<sup>[1]</sup>。2018 年全球癌症统计数据显示,胃癌死亡率仍高居全球癌症死亡率的第三位<sup>[2]</sup>。我国约 90% 胃癌患者确诊时已处于中晚期,其治疗效果差、费用高。因此,寻找胃癌病因并降低其发病率、死亡率是亟待解决的重要问题。早在 1994 年 WHO 国际癌症研究机构即将 HP 定义为 I 类致癌因子,近年来多项共识意见提及 HP 感染与胃癌发生和预防的关系<sup>[3-4]</sup>。流行病学统计数据显示,在全球范围内,约 90% 非贲门胃癌与 HP 感染相关<sup>[5]</sup>。HP 感染通过其产生的毒力因素诱导机体产生炎症反应,可引起 T 细胞浸润和激活单核巨噬细胞,还可使胃黏膜中多种炎症细胞因子如肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  产生过多,而这些细胞因子在肿瘤的发生过程中可能具有重要作用<sup>[6]</sup>。TNF- $\alpha$  是由单核-吞噬细胞分泌的一种单核因子,最初被认为具有抗肿瘤作用,但目前的研究发现 TNF- $\alpha$  对肿瘤的发生、发展具有促进作用。有研究结果显示,TNF- $\alpha$  不仅可以启动凋亡信号,还可以激活抗凋亡因子核因子(NF)- $\kappa$ B,促进细胞增殖、抑制凋亡,从而导致肿瘤发

生,在慢性胃炎进展至胃癌的过程中起重要作用<sup>[7]</sup>。本研究通过检测 TNF- $\alpha$  在 HP 阳性的慢性浅表性胃炎、癌前病变及胃癌组织中的表达,探讨 TNF- $\alpha$  在胃癌发生过程中的作用及临床意义,为胃癌的早期诊断和治疗提供依据。

## 材料与方法

1. 材料:收集 2017 年 1 月~2019 年 6 月就诊于我院的 HP 阳性[HP(+)]患者胃黏膜活检标本 400 例,其中 HP(+ )慢性浅表性胃炎组 200 例、HP(+ )癌前病变组 120 例、HP(+ )胃癌组 80 例,病理诊断标准参照《慢性胃炎及上皮性肿瘤胃黏膜活检病理诊断共识》<sup>[8]</sup>。收集同期 HP 阴性[HP(-)]患者胃黏膜活检标本 110 例,其中 HP(-)慢性浅表性胃炎组 60 例、HP(-)癌前病变组 25 例、HP(-)胃癌组 25 例。本研究经我院伦理委员会审批通过。

## 2. 方法

(1) 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)测定 TNF- $\alpha$  mRNA:使用 Trizol(Invitrogen 公司)裂解新鲜胃黏膜组织标本,0.2 ml 氯仿抽提,以 12 000 r/min 离心 2 min,70% 乙醇洗涤,焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解,而后使用分光光度计(Bio-Rad 公司)测定 TNF- $\alpha$  的总 RNA 含量和纯度。cDNA 合成及 PCR 扩增具体步骤均参照 TaKaRa 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]

基金项目:武汉市卫生健康委员会临床医学科研项目(WX12B09、WX19Y23)

作者单位:430014 湖北省武汉市中心医院消化内科

通讯作者:张姮,E-mail:zhangheng0117@163.com

说明书进行,以 GAPDH 作为内参,引物序列和反应条件见表 1。PCR 反应条件为 94 ℃ 5 min,94 ℃ 15 s,60 ℃ 40 s,40 个循环。所得实验数据采用相对定量  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行结果分析,比较目的基因在不同样本中的差异,每个样本均重复检测 3 次,取平均值。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列(5'→3')
TNF- $\alpha$ F	GCCCTCTCCAGTTCTAGTTC
TNF- $\alpha$ R	AAAGTTGGGGACACACAAGC
GAPDH F	ACCACAGTCCATGCCATCAC
GAPDH R	TCCACCACCTGTTGCTGTA

(2)蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 TNF- $\alpha$  蛋白:提取胃黏膜组织蛋白后行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),根据目的蛋白分子量大小切割凝胶,以 200 mA 的电流冰上转膜 90 min,电转结束后,采用 5% 的牛血清白蛋白(BSA)封闭 2 h。将转膜封闭后的条带放入配置好的一抗稀释液(1:1 000,武汉博士德生物工程有限公司)中,置于 4 ℃ 冰箱孵育过夜,TBST(三缓冲生理盐水-吐温 20)缓冲液共洗涤 3 次,每次 10 min。配置合适的二抗稀释液(1:5 000,武汉博士德生物工程有限公司),室温孵育 1 h,然后用 TBST 缓冲液共洗涤 3 次,每次 5 min,在聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(Solarbio 公司)上加入化学发光液。采用 ImageQuant LAS 4000mini 凝胶成像仪对 PVDF 膜进行显影。

3. 统计学处理:应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. TNF- $\alpha$  mRNA 和 TNF- $\alpha$  蛋白在 HP(+)胃黏膜组织中的表达比较:TNF- $\alpha$  mRNA 和 TNF- $\alpha$  蛋白在 HP(+)慢性浅表性胃炎组、HP(+)癌前病变组和 HP(+)胃癌组中均有表达,且表达水平在 3 组中均依次升高,两两比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

2. TNF- $\alpha$  mRNA 和 TNF- $\alpha$  蛋白在同类型 HP(+)组和 HP(-)组胃黏膜组织中的表达比较:与 HP(-)组比较,各组织类型 HP(+)组的 TNF- $\alpha$  mRNA 和 TNF- $\alpha$  蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ )。见表 2。

## 讨 论

全球范围内约有 50% 的人口存在 HP 感染,HP 感染与慢性胃炎、胃溃疡、胃癌等胃部疾病的发生密切相

表 2 TNF- $\alpha$  mRNA 和 TNF- $\alpha$  蛋白在 HP(+)、HP(-)胃黏膜组织中的表达比较

组别	例数	TNF- $\alpha$ mRNA	TNF- $\alpha$ 蛋白
慢性浅表性胃炎组	HP(+)	200	3.28 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
	HP(-)	60	2.16 $\pm$ 0.01
癌前病变组	HP(+)	120	5.42 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>
	HP(-)	25	2.92 $\pm$ 0.01
胃癌组	HP(+)	80	6.56 $\pm$ 0.07 <sup>abc</sup>
	HP(-)	25	2.83 $\pm$ 0.06

注:与同组 HP(-)比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与慢性浅表性胃炎组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与癌前病变组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

关<sup>[9-10]</sup>。早在 1994 年,世界卫生组织将 HP 纳入 I 类致癌物,可介导正常胃黏膜向萎缩性胃炎、肠上皮化生、异型增生(又称上皮内瘤变)、胃癌转变,其感染可诱发胃癌发生<sup>[11]</sup>。HP 可诱导胃黏膜产生 TNF- $\alpha$ ,抑制胃酸分泌,有利于 HP 定植,最终导致多种胃黏膜病变<sup>[12]</sup>。Lee 等<sup>[13]</sup>对 48 064 例 HP 感染患者进行研究,发现根除 HP 能够有效降低胃癌的发生风险( $IRR = 0.53, 95\% CI 0.44 \sim 0.64$ )。

TNF- $\alpha$  本身具有细胞毒作用,可激活 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞,增加自然杀伤细胞的杀伤能力,可介导多种生物学作用如诱导凋亡、促进原癌基因表达等,直接或间接引起细胞损伤,在 HP 感染患者中具有重要作用。袁淑芳等<sup>[14]</sup>研究表明,HP 感染程度越严重,胃黏膜组织中 TNF- $\alpha$  水平越高,HP 根除后血清和胃黏膜组织中的 TNF- $\alpha$  水平明显下降,与根除前比较差异有统计学意义,提示 TNF- $\alpha$  与 HP 感染相关,且参与了胃黏膜损伤的病理过程。国外研究报道,胃癌患者血清中 TNF- $\alpha$  水平明显高于胃部良性疾病患者及正常人群,手术切除胃癌后患者血清 TNF- $\alpha$  水平明显下降,但术后复发或转移者血清 TNF- $\alpha$  水平又再度升高,提示 TNF- $\alpha$  与胃癌的发生有关且对其有促进作用<sup>[15]</sup>。

本研究通过研究 HP 感染的慢性胃炎进展至胃癌过程中 TNF- $\alpha$  的表达,探讨 TNF- $\alpha$  表达与 HP 感染和疾病严重程度的关系,结果显示,TNF- $\alpha$  在慢性浅表性胃炎进展至胃癌过程中表达水平逐渐升高,差异有统计学意义。此外,HP(+)胃黏膜组织中 TNF- $\alpha$  的表达水平明显高于 HP(-)同类型胃黏膜组织,与既往研究结果一致<sup>[14]</sup>。

综上所述,TNF- $\alpha$  异常表达可能是 HP 促进胃癌发生的机制之一,胃黏膜病变程度越重,TNF- $\alpha$  表达水平越高,为临床通过根除 HP 感染来预防胃癌的发生提供了一定的理论基础。

## 参 考 文 献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2020.10.014

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.10.014

· 论著 ·

# 低磷性骨软化症 30 例临床分析

付梦菲 李欢 曾仁丽 张欢 李裕明

**[摘要]** 目的 分析低磷性骨软化症(HO)的临床特点,提高临床医生对该疾病的认识。

**方法** 根据血磷水平将我院 30 例 HO 患者分为血磷 $\geq 0.6$  mmol/L 组(13 例)与血磷 $< 0.6$  mmol/L 组(17 例),回顾性分析其一般资料、首发表现、血电解质、24h 尿液及影像学检查结果、治疗方法并比较。**结果** 30 例患者中男 21 例,女 9 例,病程 1 个月~20 年,平均年龄 $(44.27 \pm 15.29)$  岁。大部分患者(25 例,83.33%)因不同部位疼痛就诊,实验室检查结果可见血磷水平较低,血钙水平多正常或轻度降低,甲状旁腺激素大多正常,碱性磷酸酶及 I 型前胶原氨基端前肽升高。X 线检查结果可见骨质疏松(8 例)、退行性病变(5 例)及不同部位骨折(3 例);骨密度检查结果可见不同程度骨密度降低;全身骨显像提示不同部位代谢活跃灶。正电子发射计算机断层显像(PET)/CT 及生长抑素受体显像检查可帮助发现肿瘤病灶。明确病因后,通过手术切除肿瘤、通过停药及改用其他药物并辅以补磷、补钙等治疗。**结论** 临床上遇到不明原因骨痛伴明显低磷血症及骨转化指标升高者应注意考虑 HO 的诊断。

**[关键词]** 低磷骨软化症; 阿德福韦酯;磷酸盐尿性间叶瘤; 成纤维细胞生长因子-23

低磷性骨软化症(HO)是由于低磷血症和(或)维生素 D 活性不足引起的以骨基质矿化障碍为主要特征的代谢性疾病<sup>[1]</sup>。其临床表现多不典型,患者多因骨痛、肌无力及活动障碍就诊。由于该病为罕见代谢性疾病,且临床表现不具有明显特异性,临床上误诊、误治较多。为提高临床医生对该病的认识,现将我院 30 例诊断为 HO 患者的临床资料进行总结和分析。

## 对象与方法

1. 对象:2003 年 8 月~2019 年 4 月于我院确诊的 HO 患者 30 例,其中男 21 例(70%),女 9 例(30%),年龄 13~66 岁,平均年龄 $(44.27 \pm 15.29)$  岁,病程 1 个月~20 年。排除标准:既往有骨质疏松症、甲状旁腺功能亢进症、肿瘤、肾脏及免疫系统等疾病患者。根据血磷水平将患者分为血磷 $\geq 0.6$  mmol/L 组(13 例)与血磷 $< 0.6$  mmol/L 组(17 例),血磷 $\geq 0.6$  mmol/L 组男 7 例,女 6 例,年龄 17~66 岁,平均年龄 $(43.85 \pm 15.73)$  岁;血磷 $< 0.6$  mmol/L 组男 14 例,女 3 例,年

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院内分泌科

通讯作者:李裕明,E-mail:lym.1020@163.com

- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of Incidence and mortality worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [3] 房静远,陈紫暄,高琴琰. 重视慢性萎缩性胃炎癌变的预警,早诊与预防[J]. 中华消化杂志, 2018, 38(3):145-148.
- [4] Mere RM, Bravo LE, Camargo MC, et al. Dynamics of Helicobacter pylori infection as a determinant of progression of gastric precancerous lesions: 16-year follow-up of an eradication trial[J]. Gut, 2018, 67(7):1239-1246.
- [5] 谢亦乐,房静远. 幽门螺杆菌与慢性萎缩性胃炎的新认识[J]. 临床内科杂志, 2018, 35(12):800-801.
- [6] Plummer M, Martel DC, Vignat J, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis[J]. Lancet Glob Health, 2016, 4(9):609-616.
- [7] Kamangar F, Qiao YL, Blaser MJ, et al. Helicobacter pylori and oesophageal and gastric cancer in a prospective study in China[J]. Br J cancer, 2007, 96(1):172-176.
- [8] 周炜涛,金木兰. 慢性胃炎及上皮性肿瘤胃黏膜活检病理诊断共识[J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(5):289-293.

- [9] Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. Helicobacter pylori infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis[J]. Biomed J, 2016, 39(1):14-23.
- [10] 周丽雅,肖士渝. 幽门螺杆菌与胃癌的研究进展[J]. 临床内科杂志, 2018, 35(12):797-799.
- [11] 刘文忠. 重视根除幽门螺杆菌预防胃癌[J]. 胃肠病学, 2017, 22(12):705-710.
- [12] 伍丹丹,董卫国. TNF- $\alpha$  在胃癌发生发展中的作用及治疗研究进展[J]. 疑难病杂志, 2018, 17(4):428-432.
- [13] Lee YC, Chiang TH, Chou CK, et al. Association between helicobacter pylori eradication and gastric cancer incidence: a systematic review and meta-analysis[J]. Gastroenterology, 2016, 150(5):1113-1124.
- [14] 袁淑芳,张嘉斌,梅焕明,等. 幽门螺旋杆菌感染与肿瘤坏死因子- $\alpha$  和白细胞介素-6 的关系[J]. 世界中医药, 2010, 5(4):241-242.
- [15] Levi F, Lucchini F, Vecchia CL. Trends in cancer mortality in Switzerland, 1980-2001[J]. Eur J cancer pre, 2006, 15(1):1-9.

(收稿日期:2020-03-03)

(本文编辑:张一冰)