·论　著·

儿童胃黏膜白细胞介素 mRNA 水平与幽门螺旋杆菌感染的研究

李　娟[1],嘉红云[1],陈浩宇[1],周　强[1],吴晓蔓[1],王方金[2],何蕴韶[2](1.广州医学院第二附属医院检验科　510260;2.中山大学达安基因诊断中心,广东　510260)

【摘要】 **目的**　分析儿童胃黏膜白细胞介素(IL-1β)水平与幽门螺旋杆菌(H. pylori)及其高毒力亚型感染间的相关性。**方法**　实时定量聚合酶链(real-time PCR)检测 H. pylori 的保守基因 ure 以判断 H. pylori 的感染,高毒力亚型基因 vacA s1 用 real-time PCR 检测,用 PCR 扩增另一高毒力基因 cagA 羧基端 EPIYA 基序所在区,然后测序确定其亚型。IL-1β mRNA 使用 PCR-荧光探针法检测,比较循环 CT 法分析。**结果**　患儿中无论是低毒力还是高毒力的 H. pylori 感染都与胃黏膜 IL-1β mRNA 水平无显著相关性。**结论**　H. pylori 对儿童胃黏膜 IL-1β 表达的影响作用并不明显,可能还有其他一些环境、遗传因素如 IL-1 基因簇多态性与 H. pylori 共同作用调节胃黏膜 IL-1β 的表达。

【关键词】 白细胞介素;　幽门螺旋杆菌;　实时荧光定量聚合酶链检测

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.14.008　**文献标志码:**A　**文章编号:**1672-9455(2012)14-1700-02

Relationship between gastric mucosal IL-1β mRNA level and H. pylori infection in children with digestive tract diseases

LI Juan[1],*JIA Hong-yun*[1],*CHEN Hao-yu*[1],*ZHOU Qiang*[1],*WU Xiao-man*[1],*WANG Fang-Jin*[2],*HE Yun-shao*[2](1.*Department of Laboratory*,*Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University*,*Guangzhou*,*Guangdong* 510260,*China*;2.*Daan Genetic Diagnostic Center*,*Sun Yat-sen University*,*Guangzhou*,*Guangdong* 510260,*China*)

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the gastric mucosal IL-1β level in children and to study its relationship with Helicobacter(H.) pylori and its genotypes. **Methods**　The real-time PCR was adopted to detect the conserved gene ureA to diagnose H. pylori infection. High virulence gene vacA s1 was tested by real-time PCR. EPIYA motifs in the 3′ region of cagA were detected by conventional PCR and DNA sequencing. IL-1β mRNA level was tested by the real-time PCR-fluorescent probe assay and analyzed by CT method. **Results**　In children with peptic symptoms,no matter H. pylori with high or low toxicity,neither of them had relationship with gastric mucosal IL-1β mRNA level. **Conclusion**　H. pylori infection has no evident effect on gastric mucosal IL-1β mRNA production in children. There may be some other environment and genetic factors such as IL-1 gene polymorphisms combined H. pylori infection co-regulating the gastric mucosal IL-1β expression.

【**Key words**】 interleukin mRNA;　Helicobacter pylori;　real-time polymerase chain reaction

幽门螺旋杆菌(H. pylori)已与人类共存了成千上万年,成人中研究显示它可引起胃黏膜白细胞介素(IL-1β)mRNA 表达增高,进而抑制胃酸分泌,推动慢性胃炎-胃黏膜萎缩-不典型增生-胃癌这一过程的发展。本研究拟检测消化道疾病患儿胃黏膜 IL-1β mRNA 水平,探究 H. pylori 是否在形成初期就对人类有着较大的影响。

1　材料与方法

1.1　材料　128 例年龄在 14 岁及以下有消化道症状患儿的胃黏膜标本用来做本次研究。胃黏膜标本由广州市儿童医院提供。

1.2　主要试剂与仪器　DNA、RNA 核酸提取试剂盒(德国 qiagen 公司),耐热 DNA 聚合酶(Taq 酶)、缓冲液(Buffer),MgCl2 50 mmol/L(MBI Fermentas 公司),pMD-18T 载体试剂盒(大连宝生物工程公司)。7500 荧光定量聚合酶链反应(PCR)扩增仪(美国 ABI 公司),9700 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),GDS7600 凝胶扫描系统(英国 UVP 公司)。

1.3　H. pylori 及其毒力因子的检测　Real-time PCR 检测 H. pylori的保守基因 ure 以判断 H. pylori 的感染,高毒力亚型基因 vacA s1 用 Real-time PCR 检测,用 PCR 扩增另一高毒力基因 cagA 羧基端 EPIYA 基序所在区,然后测序确定其亚型[1]。

1.4　IL-1β mRNA 水平检测使用 Real-time PCR 荧光探针法,保守基因 GAPDH 做内参,反应在 Applied Biosystems 7500 上进行,由 PCR 仪 7500 附带的软件 ddCT study 自动分析 IL-1β 表达水平[2]。

1.5　统计学方法　所得数据应用 SPSS13.0 统计软件进行分析,不同组间的 IL-1β mRNA 水平使用双侧 Mann-Whitney 检测,检验标准 $\alpha=0.05$,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

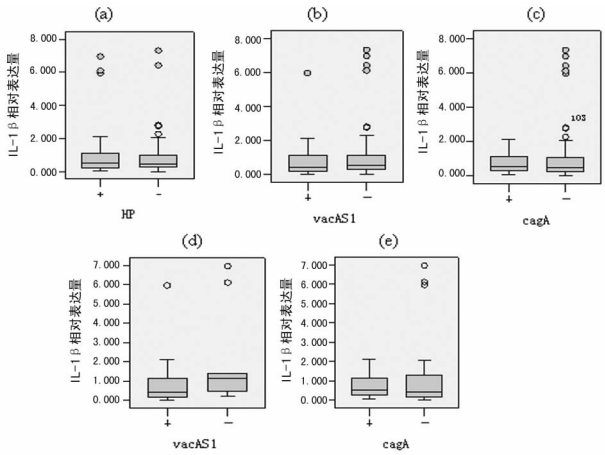
2　结　　果

2.1　胃黏膜标本 IL-1β、GAPDH mRNA 的检测　所有接受检查的 128 例儿童胃黏膜标本,经仪器软件分析得到了 108 个 IL-1β mRNA 的相对表达值,20 例未检测到 IL-1β 表达值的胃黏膜其 GAPDH mRNA 表达量亦偏低。

2.2 IL-1β mRNA 定量结果的正态性检验　使用 SPSS13.0 中的 Kolmogorov Smirnov 方法检测 IL-1β mRNA 数据的正态性。统计分析 Kolmogorov Smirnov Z 值为 2.529，$P<0.05$，数据资料不符合正态分布，选用非参数检验方法 Mann-Whitney 做统计分析。

2.3 108 例儿童中，48 例 H. pylori 阳性，60 例 H. pylori 阴性，统计显示儿童感染 H. pylori 与否对 IL-1β mRNA 表达无影响（$P>0.05$ 图 1-a）。所测儿童中 39 例为 vacA s1 阳性，69 例 vacA s1 阴性；21 例 cagA 阳性，87 例 cagA 阴性，统计分析结果显示强毒力基因 vagA s1，cagA 的细菌感染亦与 IL-1β mRNA 表达水平无关，P 值均大于 0.05（$P=0.278$ for vacA s1 图 1-b，$P=0.682$ for cagA 图 1-c）。

48 例 H. pylori 阳性的儿童中，vacA s1 阳性 39 例，vacA s1 阴性 9 例；cagA 阳性 21 例阴性 27 例。在 H. pylori 感染者中分析毒力因子与 IL-1β mRNA 表达的关系，也没有观察到二者之间的相关性（for vacA s1 基因 $P=0.072$ 图 1-d，for cagA 基因 $P=0.58$ 图 1-e）。



(a)IL-1β 在 H. pylori 阳性与阴性组中的相对表达量；(b)IL-1β 在 vacA s1 阳性与阴性组中的相对表达量；(c)IL-1β 在 cagA 阳性与阴性组中的相对表达量；(d)H. pylori 阳性范围内，IL-1β 在 vacA s1 阳性与阴性组中的相对表达量；(e)H. pylori 阳性范围内，IL-1β 在 cagA 阳性与阴性组中的相对表达量

图 1　H. pylori 与 IL-1β 的相对表达

3　讨　论

IL-1β 是抑制胃酸分泌的强有力的前炎症因子[3]，感染 H. pylori 会引起 IL-1β 高表达，胃酸分泌降低，胃液 pH 值增高，从而进一步加剧 H. pylori 的定植及其他细菌的感染，致使细菌产生的毒素及炎性产物不断堆积，故 IL-1β 可能在慢性胃炎-胃黏膜萎缩-不典型增生-胃癌这一发病模式中起了先导作用[4]。

成人中不少研究发现 H. pylori 阳性者胃黏膜 IL-1β 表达水平上调[5-7]。本研究中并没有检测到 H. pylori 阳性组与 H. pylori阴性组 IL-1β 表达水平的差异，可能与所选取的人群有关。在本次研究中，所有的儿童均有消化道症状，即便是在 H. pylori 阴性组中，胃黏膜也都可有不同程度的炎症，炎症的存在一定水平上影响着 IL-1β 的表达量。Peek 等[5]研究显示 H. pylori感染者中 cagA 阳性个体较 cagA 阴性个体的 IL-1β 表达增多。Sun 等于体外研究发现细胞形成空泡毒素（VacA）可以降低 AGS 细胞的生存能力，这种能力被高剂量的 NaCl 增强；VacA 可单独引发 TNF-α，IL-8 及 IL-1β 的表达，而 NaCl 单独作用也可引起 TNF-α 及 IL-1β 的表达[8]。本研究对儿童胃黏膜 IL-1β mRNA 及 H. pylori 毒力因子做检测，没有观察到 vacA s1、cagA 与 IL-1β 表达水平的相关性。可能是由于不同地区的 H. pylori 型别存在差异，另外胃内环境复杂相对用 AGS 细胞做研究有着较多的干扰因素。

总之，本研究分析了 108 例儿童胃黏膜 IL-1β mRNA 的表达水平，并未发现其与 H. pylori 感染间的相关性。该结果一定程度上解释了为什么 H. pylori 常在儿童时期寄居宿主，而与该细菌相关的一些疾病如胃溃疡、胃癌却主要见于成人[9]。另外，可能还有其他一些环境、遗传因素如 IL-1 基因簇多态性与 H. pylori 共同作用调节胃黏膜 IL-1β 的表达。

参考文献

[1] 李娟，周强，嘉红云，等. 广州地区消化道疾病患者中 H. pylori ureA 和 vacA s1 基因及 cagA 基因亚型分布[J]. 中华检验医学杂志，2011，34(7)：638-642.

[2] Juan Li, Fang jin Wang, Qiang Zhou, et al. IL-1 polymorphisms in children with peptic symptoms in south china [J]. Helicobacter, 2011, 16(3): 246-251.

[3] Kuipers EJ, Lundell L, Klinkenberg-Knol EC, et al. Atrophic gastritis and Helicobacter pylori infection in patients with reflux esophagitis treated with omeprazole or fundoplication[J]. N Engl J Med, 1996, 334(16): 1018-1022.

[4] Gatti LL, Burbano RR, de Assumpcao PP, et al. Interleukin-1beta polymorphisms, Helicobacter pylori infection in individuals from Northern Brazil with gastric adenocarcinoma[J]. Clin Exp Med, 2004, 4(2): 93-98.

[5] Peek RM, Miller GG, Tham KT, et al. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA + Helicobacter pylori strains[J]. Lab Invest, 1995, 73(5): 760-770.

[6] Noach LA, Bosma NB, Jansen J, et al. Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with Helicobacter pylori infection [J]. Scand J Gastroenterol, 1994, 29(5): 425-429.

[7] Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, et al. Relation between clinical presentation, Helicobacter pylori density, interleukin 1beta and 8 production, and cagA status[J]. Gut, 1999, 45(6): 804-811.

[8] Sun J, Aoki K, Zheng JX, et al. Effect of NaCl and Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin on cytokine expression and viability[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(14): 2174-2180.

[9] Imrie C, Rowland M, Bourke B, et al. Is Helicobacter pylori infection in childhood a risk factor for gastric cancer? [J] Pediatrics, 2001, 107(2): 373-380.

（收稿日期：2011-11-22）