

长期反复感染幽门螺杆菌对蒙古沙鼠胃黏膜超微结构的影响

潘亮亮¹,周 燕¹,任晓丽²,方周溪¹,林 刚¹,杜季梅¹

(1.温州医学院检验医学院,浙江 温州 325000;2.温州医学院实验动物中心,浙江 温州 325000)

摘 要:[目的] 研究长期、反复感染幽门螺杆菌(*H. pylori*)对蒙古沙鼠胃黏膜的影响。[方法] 4周龄蒙古沙鼠 20 只,随机分为实验组和对照组。实验组在完成 *H. pylori* 定植感染后,隔 4 周灌喂 1 次为反复感染,共 6 次;对照组灌喂相同体积无菌肉汤。在定植感染 100 周后处死沙鼠,透射电镜观察其胃黏膜上皮细胞超微结构。[结果] 实验组 10 只沙鼠胃黏膜均出现不同程度的慢性胃炎的超微病理改变,胃黏膜出现不同程度的萎缩,胃腺体数目减少,腺细胞排列不规则,细胞间连接疏松,有的细胞出现空泡变性甚至坏死。多数胃壁细胞分泌小管扩张,微绒毛稀疏,线粒体数量减少,有的出现空泡化现象;部分胃主细胞内质网不同程度扩张,核出现固缩,分泌颗粒淡染或空泡化,部分线粒体轻度肿胀。其中 4 只沙鼠的胃黏膜出现异型细胞,核大而不规则,核仁明显,细胞排列紊乱,有偏位核样体分泌颗粒,细胞间连接疏松,类似腺癌细胞。多数胃黏膜间质内有嗜酸性粒细胞浸润。[结论] *H. pylori* 长期反复感染可引起蒙古沙鼠胃黏膜上皮细胞及其超微结构发生病理学改变,严重者可引起上皮细胞的异型改变甚至癌变。

关键词:幽门螺杆菌;蒙古沙鼠;超微结构;胃癌

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2013)05-0397-06

The Effects of Long-term and Repeated *Helicobacter pylori* Infection on the Ultrastructures of Mongolia Gerbil's Gastric Mucosa Cells

PAN Liang-liang¹,ZHOU Yan¹,REN Xiao-li²,et al.

(1.School of Laboratory Medicine of Wenzhou Medical College,Wenzhou 325000,China;

2.The Animal Experimental Center of Wenzhou Medical College,Wenzhou 325000,China)

Abstract:[Purpose] To study the long-term and repeated infection of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) on Mongolia gerbil's gastric mucosa cells. [Methods] Twenty 4-week-old Mongolia gerbils were randomly divided into experimental group and control group. In the experimental group, the gerbils were reinfected at 4 weeks after *H. pylori* colonization infection, and repeated for 6 times, while the gerbils of control group were treated with sterile broth. All gerbils were sacrificed at the 100th week after the first time of *H. pylori* colonization, then the gastric mucosa were aseptically obtained immediately and processed for transmission electron microscopy observation. [Results] The gastric mucosa in the experimental group showed the ultrastructural changes of chronic gastritis, appeared different degree of atrophy, the number of gastric glands reduced, glandular cells arranged irregularly, connections between cells loosed, vacuolar degeneration and even necrosis in some cells. The majority of gastric parietal cell secretion of tubular dilatation, microvilli sparse, the quantity of mitochondria decreased, some vacuolated; chief cell's endoplasmic reticulum dilation, nuclear pyknosis, secretory granules are pale or vacuolization, mitochondrial swelling. Four of the experimental gerbil's gastric mucosal cells became atypically, with larger and irregularly nucleus, derangement arranged of cells, offset nucleoid secretory granules, loosed cells connections, similar to adenocarcinoma cells. Most of gastric interstitial were infiltrated with eosinophils. [Conclusions] The long-term and repeated *H. pylori* infection may cause the ultrastructure pathological changes abnormal changes, and even tumorigenesis of Mongolia gerbil gastric epithelial cells.

Key words: *Helicobacter pylori*; Mongolia gerbil; ultrastructure; gastric cancer

胃癌在世界范围内发病率和死亡率虽然呈下降

趋势,但仍居肿瘤死因和常见肿瘤的第 2 位和第 4 位。《2012 中国肿瘤登记年报》报道,我国胃癌居全国恶性肿瘤发病第 2 位,仅次于肺癌。幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 是导致人类慢性活动

收稿日期:2013-04-08;修回日期:2013-04-15

基金项目:浙江省科技计划项目(2009F80012);温州市科技局项目(H20110025)

通讯作者:杜季梅,E-mail:djm@wzmc.edu.cn

性胃炎、消化性溃疡的主要病原菌,与胃腺癌以及胃黏膜相关淋巴组织癌的发生密切相关并已成为共识^[1],但对 *H. pylori* 导致胃黏膜发生一系列改变的致病机制尚未明确。

蒙古沙鼠因自然患胃炎的概率小、寿命较长以及 *H. pylori* 感染后胃内定植菌量较高等特点,是建立 *H. pylori* 感染的理想动物模型。早在 1998 年, Honda 等^[2]就报道了 5 只感染 *H. pylori* 的蒙古沙鼠在 18 个月后有 2 只发生腺癌,由于诸多原因,现有的研究多为 *H. pylori* 中短期感染,主要研究炎症、溃疡、黏膜萎缩和肠化生等病变。数据显示长期感染的沙鼠胃癌的发生率并不高^[2-5],我们在前期的研究中发现,*H. pylori* 感染后 48 周,沙鼠胃部出现慢性活动性胃炎和胃溃疡,未见胃癌的发生^[6]。鉴于临床上进行 *H. pylori* 清除治疗后,许多患者又会重新感染甚至多次反复的现象,作者应用蒙古沙鼠作为模型动物进行长期反复感染 *H. pylori*,用电镜观察其胃黏膜上皮细胞的超微结构改变,以探讨 *H. pylori* 长期反复感染在胃癌发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 *H. pylori* 菌株及培养

H. pylori 标准菌株 NCTC11637 由浙江大学严杰教授馈赠。接种菌种于哥伦比亚血琼脂平板,微需氧培养 48h,用无菌肉汤稀释成 10^9 CFU/ml,用于灌喂。

1.2 实验动物

蒙古沙鼠 20 只,3 周龄,雄性,体重 22~30g,浙江省医学科学院实验动物中心提供(许可证号:2008-0034),温州医学院实验动物中心饲养,每天光照、黑暗交替各 12h,室温 25℃。适应饲养一周后,动物随机分为实验组和对照组,每组 10 只。

1.3 动物感染

1.3.1 定植感染

实验组沙鼠禁食不禁水 24h 后,用小鼠灌胃针对每只沙鼠灌喂 0.5ml 菌液,对照组则灌喂相同体积的无菌肉汤,均 2h 后喂食。隔天灌喂 1 次,连续 3 次。

1.3.2 反复感染

在定植感染 4 周后,实验组沙鼠禁食不禁水

24h 后,用小鼠灌胃针对每只沙鼠灌喂 0.5ml 菌液,对照组则灌喂相同体积的无菌肉汤,2h 后喂食。每 4 周重复一次,共反复感染 6 次。

1.4 胃黏膜标本及各脏器的采集

在感染周期完成后的 100 周处死沙鼠。处死前 24h 禁食,10%氯醛麻醉,称重,取血分离血清待用,无菌操作取沙鼠胃,沿胃大弯剖开,用无菌 PBS 轻轻冲洗胃壁,取胃黏膜标本,分别用于 *H. pylori* 检查和透射电镜标本制作。同时取肝、脾及左侧的肾脏组织,称重以便比较。

1.5 *H. pylori* 检查

黏膜用组织匀浆器研磨后,进行快速尿酶实验和分离培养。

1.6 透射电镜观察

标本用 2.5%戊醛和 1%四氧化锇双重固定后,丙酮梯度脱水,Epon-812 环氧树脂包埋聚合,RMC-PT 超薄切片机半薄切片,甲苯胺蓝染色后在光镜下定位,超薄切片经醋酸铀、柠檬酸铅双重染色后用日立 H-7500 透射电镜观察。

1.7 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 *t* 检验比较组间差异的显著性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *H. pylori* 检查结果

对照组未检出 *H. pylori*,且有大量乳酸杆菌生长。以胃黏膜快速尿酶实验阳性及分离培养出 *H. pylori* 为定植成功,10 只实验组沙鼠感染率达到 100%,实验组胃内乳酸菌数量较少,个别甚至无乳酸菌生长。

2.2 肉眼观察胃体及各脏器重量改变

经称重,除了脾较对照组偏重外,实验组沙鼠体重、肝和肾的重量均较对照组轻($P < 0.05$)(Table 1)。

肉眼观察见对照组沙鼠胃体表面光滑,颜色红润(Figure 1)。实验组沙鼠胃体则见红肿、出血、溃疡,与对照组相比胃体颜色显著变浅,胃壁变薄(Figure 2A),并可见菜花样改变(Figure 2B)。

2.3 超微结构观察

2.3.1 对照组

透射电镜观察,胃黏膜上皮细胞:微绒毛排列整

齐,线粒体、游离核糖体、粗面内质网丰富。胃壁细胞:细胞内分泌小管微绒毛丰富且密集,线粒体丰富、嵴清晰,细胞间连接紧密。胃主细胞:粗面内质网丰富呈板层状排列,核较规则(Figure 3~5)。

2.3.2 实验组

10只沙鼠中,均表现为不同程度的慢性胃炎的改变:胃黏膜萎缩,胃腺体减少,腺细胞数目减少,胃黏膜上皮细胞微绒毛稀疏,线粒体肿胀,内质网扩张,游离核糖体减少,细胞间隙扩大(Figure 6)。胃壁细胞内分泌小管减少,线粒体数量减少,线粒体内嵴减少,空泡化,内质网扩张明显,核固缩明显,核膜间隙增大(Figure 7)。主细胞胞质内质网扩张,分泌颗粒

淡染并有空泡化,核不规则(Figure 8)。可见部分细胞坏死,出现细胞碎片,嗜酸性粒细胞浸润(Figure 9、10)。其中有4例出现异型细胞,细胞表面微绒毛松散,细胞连接不清楚,可见细胞内微腺腔,核不规则,核仁大,细胞排列紊乱,有偏位核样体分泌颗粒(Figure 11、12)。

3 讨论

蒙古沙鼠人工感染 *H. pylori* 后发生相关胃病与人类最为相似,自1996年 Hirayama 报道使用 *H. pylori* 感染沙鼠致胃炎、胃溃疡成功以来,国内外有众多学者采用沙鼠建立动物模型,研究胃部炎症、溃疡及胃癌等病理学变化和致病机制研究^[7]。李洁等^[8]沙鼠感染后24周末未发现炎性细胞浸润、胃溃疡等病理改变。我们在前期研究中发现沙鼠感

Table 1 The body weight and organ weight of gerbil($\bar{x}\pm s$,g)

Groups	Body weight	Liver	Spleen	Kidney
Experimental group	81.66±6.99	2.33±1.09	0.46±0.25	0.58±0.23
Control group	95.84±16.87	3.38±0.92	0.15±0.14	0.68±0.34
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

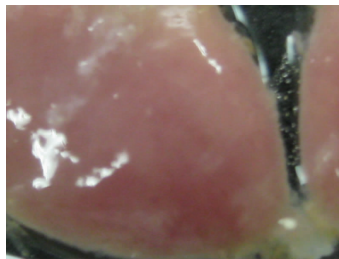
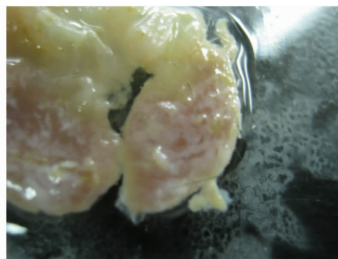
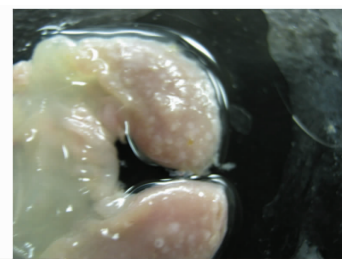


Figure 1 Gastric corpus of control group



A



B

Figure 2 Gastric corpus of experimental group

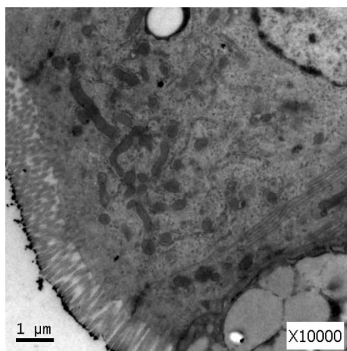


Figure 3 Normal gastric epithelial cells, the microvilli arranged neatly, with tight cell junction, and rich in mitochondria, free ribosomes and rough endoplasmic reticulum

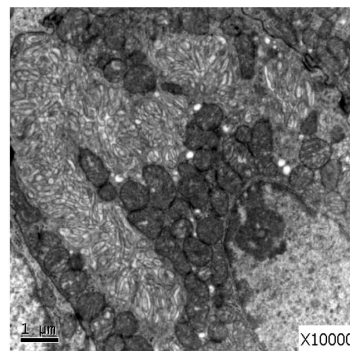


Figure 4 Normal parietal cells, with abundant of secretory tubules and mitochondria which showed limpid mitochondrial crista, and with tight cell junction

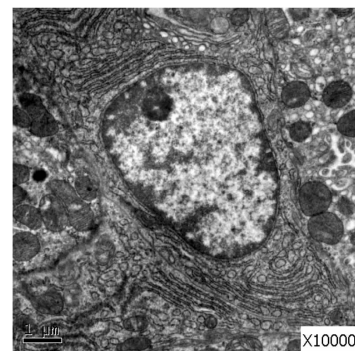


Figure 5 Normal gastric chief cells, with normally nucleus, and rich in rough endoplasmic reticulum which appeared lamellar arrangement

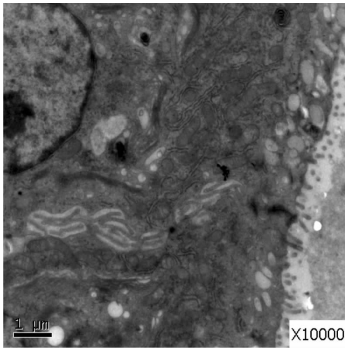


Figure 6 Gastric epithelial cells with sparse microvilli, mild swelling of mitochondria, slight expansion of the endoplasmic reticulum, decreased free ribosomes, and slight expansion of cell connection

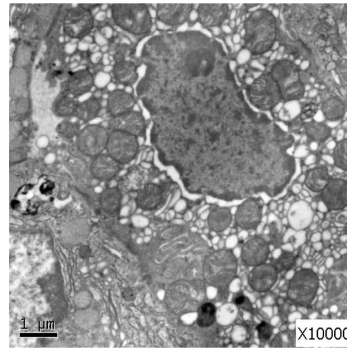


Figure 7 In the parietal cells, the secretory tubule expanded, the microvilli became sparse, the mitochondrial cristae mildly expanded and showed tubuloalveolar

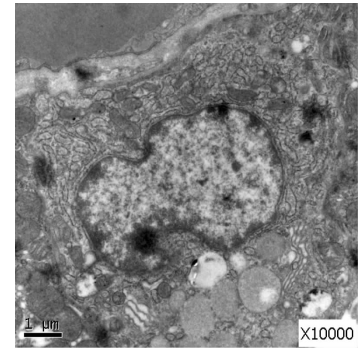


Figure 8 In the gastric chief cells, the endoplasmic reticulum expanded slightly, the secretory granules stained lightly and showed vacuolization, and with irregular nucleus

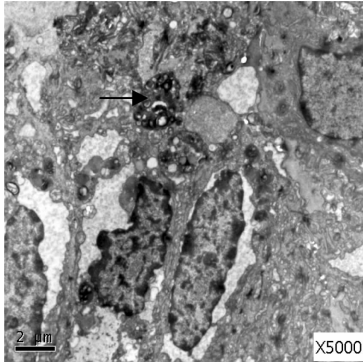


Figure 9 Part of the epithelial cell necrosis, cells arranged in abnormality, karyopyknosis appeared, the nuclear membrane gap expanded, and visible of cell debris (arrow)

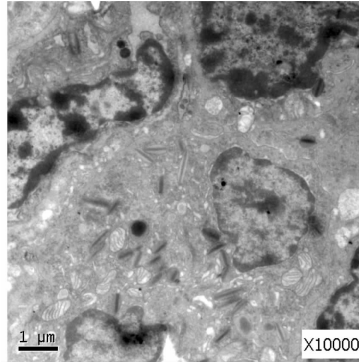


Figure 10 Gastric stromal infiltrated of eosinophils

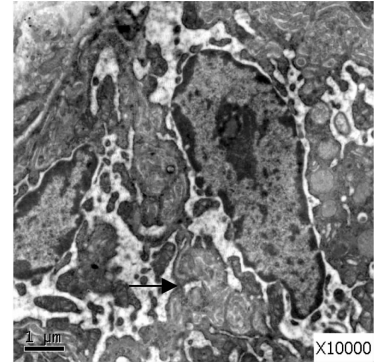


Figure 11 In the gastric atypical cells, sparse microvilli on the cell surface, cell connection appeared un-clearness, observed intracellular micro glandular cavity (arrow), and with irregular nucleus which nucleolus enlarged

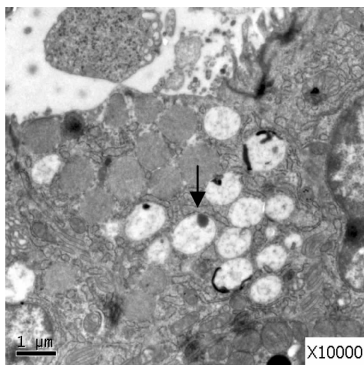


Figure 12 In the gastric atypical cells, observed offset nucleoid-like secretory granules (arrow), few cell microvilli, abnormally arranged endoplasmic reticulum

染 *H. pylori* 后 48 周也未见癌变的发生, Tokieda 等^[9] 的结果显示在单一感染后 52 周末发生腺癌, 姚永莉等^[10] 的结果显示感染后 65 周出现不典型增生, 提示单一 *H. pylori* 感染在中短期内引起胃癌的可能性不高。另外, 国内外的研究结果显示, 定植后长期感染 *H. pylori* 的沙鼠胃癌发生率不高^[3-5, 11, 12]。虽然国内外均有许多学者采用致癌剂辅助 *H. pylori* 感染以增加癌症发生率进行研究, 我们认为采用单一因素对 *H. pylori* 致病机制进行研究, 可排除其他因素的干扰。因此, 如何提高 *H. pylori* 感染动物模型的胃癌模型发生率, 是一个急需解决的问题。

资料显示, 相同菌株感染沙鼠因感染时间不同

导致胃癌发生率明显不同,长期感染 *H. pylori* 可以通过刺激黏膜细胞增生^[12-14]。鉴于临床上有些胃炎和胃癌患者在接受 *H. pylori* 清除治疗后,又反复感染的现象,我们推测长期感染加上反复感染有可能是引起部分人群发生胃癌的危险因素,因此在前期动物模型建立的基础上,对沙鼠进行反复多次的感染,结果发现定植感染后反复感染 *H. pylori* 可使沙鼠胃癌发生率提高到 40%(4/10),高于其他文献报道^[3-5,11]。另外,本实验发现实验组沙鼠不仅胃壁变薄和颜色变浅,脾脏的重量和体积均比对照组增大,提示 *H. pylori* 感染不仅刺激免疫系统,可能还会影响机体的造血功能。

通过观察长期反复感染 *H. pylori* 沙鼠胃黏膜超微结构,发现其腺细胞数目减少,细胞间间隙增宽,局灶性壁细胞分泌小管扩张,微绒毛减少,小管泡状结构增多,示壁细胞呈静止状态,这与 XU 等^[15]的体外感染细胞的实验结果相符。另见壁细胞内线粒体肿胀,部分嵴呈管泡状,部分嵴减少或消失,部分细胞基质空泡化,细胞核固缩;主细胞内质网扩张,酶原颗粒减少,电子密度降低,说明腺体有萎缩,腺细胞分泌功能受损,进而影响机体的消化功能。线粒体肿胀是 *H. pylori* 感染引起低氧状态下细胞能量产生不足的结果,提示细胞损伤变性。总体上看胃黏膜呈慢性萎缩性胃炎的改变,而最近几年国外研究表明,慢性炎症与恶性肿瘤(癌症)发生息息相关,很多肿瘤是由慢性炎症发展而成的。长期慢性炎症不仅能导致组织癌变,还能导致癌细胞的“疯狂”生长,而且还能协助这种变异细胞“逃离”癌症原发灶,从而转移到身体的其他部位^[16]。结果中 4 例沙鼠电镜下见异型细胞,核不规则,核仁大,细胞排列紊乱,有偏位核样体分泌颗粒,提示反复、长期感染 *H. pylori* 可诱发产生异型细胞。慢性萎缩性胃炎→异型增生→早期胃癌→进展期胃癌为胃癌的发展模式,这已为人们所接受,即异型增生为胃癌重要的癌前病变。电镜下观察到的异型细胞类似低分化的腺癌细胞,边界细胞表面微绒毛松散,细胞连接不清楚,可见细胞内微腺腔,那么很可能最后会演变为胃癌。

综上所述,*H. pylori* 长期反复感染可引起蒙古沙鼠胃黏膜上皮细胞及其超微结构发生病理性改变,同时与胃癌的发生息息相关。另外本研究结果显示,对动物模型进行长期及反复感染,是一个较好

的提高 *H. pylori* 感染相关胃癌发生率的方法。

参考文献:

- [1] Olbermann P, Josenhans C, Moodley Y, et al. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* cagpathogenicity island [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(8):e1001069.
- [2] Honda S, Fujioka T, Tokieda M, et al. Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(19):4255-4259.
- [3] Hirayama F, Takagi S, Iwao E, et al. Development of poorly differentiated adenocarcinoma and carcinoid due to long-term *Helicobacter pylori* colonization in Mongolian gerbils [J]. *J Gastroenterol*, 1999, 34(4):450-454.
- [4] Zheng Q, Chen XY, Shi Y, et al. Development of gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori* [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 19(10):1192-1198.
- [5] Lan CH, Pang DC. Animal model of *H. pylori* infection [J]. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2007, 16(2):193-197. [兰春慧, 房殿春. 幽门螺杆菌感染的动物模型研究进展 [J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2007, 16(2):193-197.]
- [6] Xu CL, Lu SY, Zong SJ, et al. Influence of *Helicobacter pylori* colonization on gastric microbial flora and mucosal cell proliferation of Mongolian gerbils [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2011, 23(5):404-406. [徐昌隆, 陆少燕, 宗素进, 等. 幽门螺杆菌感染蒙古沙鼠胃部菌群改变及病理学变化 [J]. *中国微生态学杂志*, 2011, 23(5):404-406.]
- [7] Hirayama F, Takagi S, Kusuhara M. Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori* [J]. *J Gastroenterol*, 1996, 31(5):755-757.
- [8] Li J, Liu CJ, Tao HX, et al. Establishing Mongolian gerbils models of gastritis and peptic ulcer by long-term infection with *Helicobacter pylori* [J]. *Bulletin of the Academy of Military (Medical Sciences)*, 2003, 27(4):255-258. [李洁, 刘纯杰, 陶好霞, 等. 幽门螺杆菌长期感染蒙古沙土鼠导致胃炎、胃溃疡的实验研究 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2003, 27(4):255-258.]
- [9] Tokieda M, Honda S, Fujioka T, et al. Effect of *Helicobacter pylori* infection on the N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils [J]. *Carcinogenesis*, 1999, 20(7):1261-1266.
- [10] Yao YL, Xu B, Song YG, et al. Effect of *Helicobacter py-*

- lori infection on gastric mucosal cell proliferation in Mongolian gerbils[J]. Journal of First Military Medical University, 2002, 22(4):348-350, 365.[姚永莉,徐波,宋于刚,等.幽门螺杆菌对蒙古沙鼠胃上皮细胞增殖的影响[J].第一军医大学学报, 2002, 22(4):348-350, 365.]
- [11] Zheng Q, Chen XY, Shi Y, et al. Development of gastric adenocarcinoma in mongolian gerbils after long-term infection of Helicobacter pylori[J]. Chinese Journal of Digestion, 2003, 23(2):92-96.[郑青,陈晓宇,施尧,等.幽门螺杆菌长期感染蒙古沙土鼠建立胃癌模型的研究[J].中华消化杂志, 2003, 23(2):92-96.]
- [12] Jin Z, Hu FL, Wei H, et al. Establishment of Mongolian gerbil model of long-term Helicobacter pylori infection [J]. National Medical Journal of China, 2008, 88(22):1518-1522.[金哲,胡伏莲,魏红,等.幽门螺杆菌长期感染蒙古沙土鼠腺胃模型的建立与评价[J].中华医学杂志, 2008, 88(22):1518-1522.]
- [13] Gonzalez-Obeso E, Fujita H, Deshpande V, et al. Gastric hyperplastic polyps: a heterogeneous clinicopathologic group including a distinct subset best categorized as mucosal prolapse polyp[J]. Am J Surg Pathol, 2011, 35(5):670-677.
- [14] Liu YE, Yuan Y. Gastric diseases in Mongolian gerbils infected with different strains of Helicobacter pylori [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2011, 19(23):2467-2472.[柳云恩,袁媛.蒙古沙土鼠不同幽门螺杆菌菌株感染相关性胃病的研究进展[J].世界华人消化杂志, 2011, 19(23):2467-2472.]
- [15] Xu CX, Jia Y, Yang WB, et al. Helicobacter pylori infection and changes of cell gap junction of gastric epithelial cells in patients with gastric cancer and precancerous lesion[J]. Journal of Central South University (Medical Sciences), 2008, 33(4):338-343.[徐灿霞,贾燕,杨文斌,等.胃癌和癌前病变患者细胞间隙连接改变与幽门螺杆菌感染的关系[J].中南大学学报(医学版), 2008, 33(4):338-343.]
- [16] Zhao LM, Liu YG, Xu HW. Protective effects of brucine against chronic gastritis and precancerous lesions of Gastric cancer model rats [J]. China Pharmacy, 2012, 23(35):3285-3288.[赵立民,刘玉国,徐恒卫.马钱子碱对大鼠慢性胃炎胃癌前病变模型的保护作用研究[J].中国药房, 2012, 23(35):3285-3288.]

多学科协作“中国模式” 2013 中国肿瘤专科管理论坛第一轮会议通知

目前,恶性肿瘤已成为危害我国人民生命和社会发展的重大疾病,呈现年轻化、发病率和死亡率“三线”走高趋势,癌谱也发生了变化。为进一步促进经验分享交流,探讨多学科协作的“中国模式”,提高医院管理尤其是肿瘤专科医院管理人员对多学科协作的认识,由《中国医院院长》杂志社、中国抗癌协会肿瘤医院(研究所)管理专业委员会、中国医院协会肿瘤分会、浙江省肿瘤医院和《中国肿瘤》杂志社联合举办的 2013 中国肿瘤专科管理论坛将于 2013 年 7 月 26 日~28 日在浙江绍兴召开。

本次论坛将特别邀请肿瘤学术界著名专家和资深医院管理者赵平、王平、赫捷、郝希山、曾益新、于金明、毛伟敏、季加孚、高国兰、吴一龙、郭小毛、高文、李卫民、耿仁文、樊晋川、应敏刚、周琦、唐金海、申宝忠、单保恩等作专题演讲和讨论,针对肿瘤专科诊疗医学实践中遇到的相关问题进行详细解析,展示最新探索经验,并配以对多学科协同需要的人才培养、医改零差率、多元资本对肿瘤专科建设的影响以及肿瘤专科领域的政策需求等进行深入解读。

会务组联系方式

地 址:杭州市拱墅区半山桥广济路 38 号行政科研楼 206 室
邮 编:310022
联系人:夏庆民(13757142507, 0571-88122556)
刘 念(13735889701, 0571-88122280)
电子邮箱:tony_588588@163.com

地 址:北京市西城区西环广场 A 座 17-18 层
邮 编:100044
联系人:仲 颖(13910558335, 010-58302828 转 6635)
张国鹏(13699270065, 010-58302828 转 6639)
电子邮箱:zgp0006@126.com