

# 儿童幽门螺杆菌相关性胃炎与胃黏膜闭锁蛋白关系的研究

赵燕<sup>1</sup> 田飞<sup>1</sup> 张丽娟<sup>1</sup> 陈云庆<sup>2</sup> 王彩霞<sup>1</sup>

(青岛大学附属医院,山东 青岛 266003 1 儿科; 2 病理科)

**[摘要]** 目的 探讨幽门螺杆菌(Hp)相关性胃炎患儿感染的 Hp 类型、胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率及胃黏膜炎症程度间的关系。方法 选取 2018 年 6 月—2021 年 12 月于我院接受胃镜检查并且确诊为 Hp 相关性胃炎的 90 例患儿作为研究对象。采用免疫印迹法检测患儿血清 Hp 抗体表达情况,对 Hp 进行血清学菌株分型,并观察患儿胃黏膜病理变化;采用免疫组织化学定量法检测胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率,分析 Hp 菌株类型、胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率及胃黏膜炎症程度间的关系。结果 I 型菌株感染患儿胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率显著低于 II 型及中间型( $P < 0.05$ ),II 型与中间型比较无显著差异( $P > 0.05$ )。不同 Hp 菌株感染患儿胃黏膜炎症程度有显著差异( $H = 18.013, P < 0.01$ ),II 型轻于 I 型及中间型( $P < 0.05$ ),I 型与中间型差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。胃黏膜轻、中、重度炎症患儿的闭锁蛋白阳性表达率分别为 80.0%、35.1%和 11.6%,3 种炎症程度患儿闭锁蛋白阳性表达率均有显著差异( $\chi^2 = 19.655, P < 0.05$ )。结论 Hp 相关性胃炎患儿的胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率与 Hp 菌株类型及胃黏膜炎症程度有关,I 型菌株感染和胃黏膜重度炎症时闭锁蛋白阳性表达率最低;不同类型菌株感染所致胃黏膜炎症程度不同,II 型菌株感染所致胃黏膜炎症程度最轻。Hp 抗体分型检测或可预测胃黏膜紧密连接和炎症程度,胃黏膜闭锁蛋白有望成为治疗 Hp 相关性胃炎的重要靶点。

**[关键词]** 胃炎;幽门螺杆菌;闭锁蛋白;胃黏膜;儿童

**[中图分类号]** R725.7 **[文献标志码]** A

**RELATIONSHIP BETWEEN *HELICOBACTER PYLORI*-ASSOCIATED GASTRITIS AND GASTRIC MUCOSAL OCCLUDIN IN CHILDREN** ZHAO Yan, TIAN Fei, ZHANG Lijuan, CHEN Yunqing, WANG Caixia (Department of Pediatrics, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the relationship between *Helicobacter pylori* (Hp) type, positive expression rate of gastric mucosal occludin and degree of gastric mucosal inflammation in children with Hp-associated gastritis. **Methods** Ninety children who received gastroscopy and were diagnosed with Hp-associated gastritis in our hospital from June 2018 to December 2021 were selected as the research object. The expression of serum Hp antibody in children was measured by Western blot. The strains of Hp were serotyped. The pathological changes of gastric mucosa in children were observed. The positive expression rate of gastric mucosal occludin was determined by quantitative immunohistochemistry method. The relationship between Hp strain type, positive expression rate of gastric mucosal occludin and degree of gastric mucosal inflammation was analyzed. **Results** The positive expression rate of gastric mucosal occludin in children infected with type I strain was significantly lower than that in children infected with type II strain or intermediate type strain ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference in the positive expression rate between children infected with type II strain and those infected with intermediate type strain ( $P > 0.05$ ). There were significant differences in the degree of gastric mucosal inflammation among children infected with different Hp strains ( $H = 18.013, P < 0.01$ ); the degree was significantly less severe in children infected with type II strain than in children infected with type I strain or intermediate type strain ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference in the degree between children infected with type I strain and those infected with intermediate type strain ( $P > 0.05$ ). The positive expression rates of occludin in children with mild, moderate, and severe gastric mucosal inflammation were 80.0%, 35.1%, and 11.6%, respectively ( $\chi^2 = 19.655, P < 0.05$ ). **Conclusion** The positive expression rate of occludin in the gastric mucosa of children with Hp-associated gastritis is related to the type of Hp strain and the degree of gastric mucosal inflammation, and the positive expression rate of occludin is the lowest when type I strain is infected and gastric mucosal inflammation is severe. The degree of gastric mucosal inflammation caused by different types of strain infection is different, and the degree of gastric mucosal inflammation caused by type II strain infection is the mildest. Hp antibody typing detection may predict the tight junction and inflammation degree of gastric mucosa, and occludin is expected to become an important target for the treatment of Hp-related gastritis.

**[KEY WORDS]** Gastritis; *Helicobacter pylori*; Occludin; Gastric mucosa; Children

生发展密切相关,且属于胃癌重要危险因素之一<sup>[2]</sup>。儿童是 Hp 的易感人群,全球约有三分之一的儿童感染 Hp<sup>[3]</sup>,且一旦被感染很少自然清除。并非所有 Hp 感染患儿均存在相同临床结局,其不仅与宿主及环境等因素相关,还可能与 Hp 菌株毒力因子类型有关<sup>[4-5]</sup>。紧密连接蛋白在胃黏膜机械屏障中起着非常重要的作用,胃黏膜闭锁蛋白是紧密连接蛋白的重要组成部分<sup>[6-7]</sup>。闭锁蛋白的异常表达会导致紧密连接蛋白的结构和功能紊乱<sup>[6]</sup>,上皮细胞间通透性增加,胃黏膜屏障遭到破坏,上述过程与胃部疾病的发生发展密切相关<sup>[8]</sup>。国内有研究探讨了 Hp 阳性与阴性的慢性胃炎患儿胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率差异<sup>[9]</sup>,但关于不同 Hp 菌株感染及胃黏膜不同炎症程度下闭锁蛋白阳性表达率的异同,目前尚无相关研究。本研究回顾性分析我院 90 例 Hp 相关性胃炎患儿的临床资料,探讨不同 Hp 菌株类型及胃黏膜炎症程度与胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率间的关系,旨在为 Hp 相关性胃炎患儿的临床诊疗提供新思路。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2018 年 6 月—2021 年 12 月于我院行胃镜检查并确诊为 Hp 相关性胃炎<sup>[10-11]</sup>的患儿作为研究对象。患儿纳入标准:①年龄 < 14 岁者;②未行 Hp 根除治疗者;③同期行 Hp 抗体分型检测者;④临床资料完整者。排除标准:①检查前 2 周内服用质子泵抑制剂和(或)检查前 4 周内服用抗生素及铋剂者;②严重心肝肾功能不全者;③有消化道手术史及消化道穿孔者。

收集所有患儿的临床资料,包括年龄、性别、血清 Hp 抗体分型检测结果、<sup>13</sup>C 尿素呼气试验(<sup>13</sup>C-UBT)结果及胃黏膜组织病理检查结果。根据血清 Hp 抗体分型检测结果,将 Hp 分为 I 型、中间型、II 型<sup>[12-13]</sup>。胃黏膜组织病理炎症程度参照最新的指南<sup>[11,14]</sup>分为轻、中、重度。

### 1.2 免疫组织化学法检测胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率

固定胃黏膜组织标本,然后脱水、石蜡包埋、切片(3~4 μm 厚),室温下脱蜡、水化,多次洗涤,加入牛奶液体封闭 5 min,滴加闭锁蛋白抗体(Abcam 公司,滴度 1:1 000),37 °C 下孵育 2 h,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,每次 2 min,再加入荧光标记的二抗(Abcam 公司),37 °C 下孵育 20 min,PBS 洗涤,

二氨基联苯胺显色,封片,在光学显微镜下观察闭锁蛋白表达情况。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。闭锁蛋白的阳性表达部位是细胞膜,以呈现淡黄色-棕褐色为阳性反应细胞;免疫组化结果评定标准参照 2000 年 TANAKA 改良的定量记分法<sup>[15]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 Hp 相关性胃炎患儿临床资料比较

共有 90 例患儿纳入本研究,其中男 65 例,女 25 例,平均年龄为(10.38±1.97)岁。I 型菌株感染 52 例,中间型菌株感染 18 例,II 型菌株感染 20 例;闭锁蛋白阳性 26 例,闭锁蛋白阴性 64 例;胃黏膜轻度炎症 10 例,中度炎症 37 例,重度炎症 43 例。各型感染患儿的性别、年龄无显著差异( $P > 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 不同 Hp 菌株感染类型患儿胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率比较

免疫组化结果示,II 型、中间型、I 型菌株感染患儿胃黏膜闭锁蛋白染色强度依次变浅,说明表达量逐渐减少(图 1)。I 型、中间型、II 型菌株感染患儿胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率比较差异显著( $\chi^2 = 19.163, P < 0.001$ );其中 I 型患儿闭锁蛋白阳性表达率显著低于 II 型及中间型( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.3 不同 Hp 菌株感染患儿胃黏膜炎症程度比较

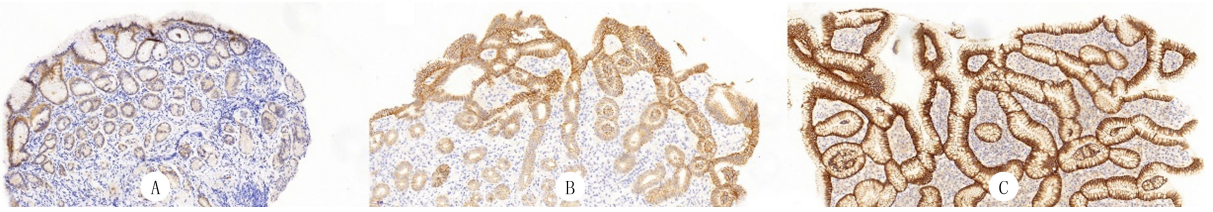
不同 Hp 菌株感染患儿胃黏膜炎症程度有显著差异( $H = 18.013, P < 0.01$ ),其中 II 型轻于 I 型及中间型( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 Hp 相关性胃炎不同分型患儿临床资料比较

指标	I 型 (n=52)	中间型 (n=18)	II 型 (n=20)	$\chi^2/H/F$	P
性别[例(X/%)]				0.816	>0.05
男	38(73.1)	14(77.8)	13(65.0)		
女	14(26.9)	4(22.2)	7(35.0)		
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ )	10.31±1.91	10.17±2.09	10.75±2.07	0.485	>0.05
闭锁蛋白[例(X/%)]				19.163	<0.01
阳性	6(11.5)	8(44.4)	12(60.0)		
阴性	46(88.5)	10(55.6)	8(40.0)		
胃黏膜炎症程度[例(X/%)]				18.013	<0.01
轻度	0(0.0)	1(5.6)	9(45.0)		
中度	21(40.4)	9(50.0)	7(35.0)		
重度	31(59.6)	8(44.4)	4(20.0)		

### 2.4 胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率与患儿胃黏膜炎症程度的关系

胃黏膜轻、中、重度炎症患儿闭锁蛋白阳性表达率分别为 80.0%、35.1%和 11.6%,3 种炎症程度患儿闭锁蛋白阳性表达率差异显著( $\chi^2 = 19.655, P <$



A~C 分别为 I 型、中间型、II 型菌株感染患儿胃黏膜组织,免疫组化染色,100 倍

图 1 Hp 相关性胃炎患儿胃黏膜组织中闭锁蛋白表达情况

0.05),且两两比较均有统计学差异( $P < 0.05$ )。

### 3 讨 论

Meta 分析结果显示我国儿童 Hp 感染率约为 30.31%,且其随年龄增长呈上升趋势,并与经济卫生条件和家庭聚集性等因素相关<sup>[16-17]</sup>。Hp 是儿童慢性胃炎的重要致病因素,儿童感染 Hp 后可选择的抗生素少,耐药率、复发率均高<sup>[18]</sup>,因此对于儿童 Hp 感染的研究显得尤为重要。越来越多的研究重视将 Hp 菌株进行分型。紧密连接蛋白是胃黏膜屏障细胞间连接结构中最重要的一种蛋白复合体,闭锁蛋白是紧密连接蛋白当中最具代表性的蛋白之一<sup>[6,19]</sup>,闭锁蛋白的异常表达与多种疾病密切相关。

本研究发现,在儿童 Hp 相关性胃炎中,感染不同 Hp 菌株的患儿其胃黏膜闭锁蛋白的阳性表达率存在着显著差异,I 型菌株感染患儿的胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率低于其他两型菌株。研究表明,感染 Hp 可导致胃黏膜闭锁蛋白表达下降<sup>[20-22]</sup>。本研究进一步研究显示,Hp 菌株类型与胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率有关。分析其可能的原因包括 I 型菌株可同时分泌细胞毒素相关蛋白 A(CagA)和细胞空泡毒素 A(VacA)<sup>[12]</sup>,CagA 是 Hp 感染引起炎症反应的重要效应蛋白<sup>[23]</sup>,炎症作用导致胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率下降;VacA 也可导致机体慢性 Hp 感染<sup>[24]</sup>,还会疏松上皮细胞之间的紧密连接<sup>[23]</sup>,同时引发炎症反应<sup>[25]</sup>,共同导致闭锁蛋白阳性表达率下降;VacA 和 CagA 协同通过错综复杂的网络系统导致胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率发生变化。有研究表明紧密连接蛋白的表达与胃黏膜损伤严重程度密切相关<sup>[26]</sup>,提示对于因消化道症状就诊且<sup>13</sup>C-UBT 结果为阳性的患儿,或许可以通过 Hp 血清抗体分型来预测胃黏膜受损情况,从而有针对性地进行胃镜检查,这样既能避免过度医疗导致患儿痛苦,同时也避免了因早期未予重视导致胃黏膜进一步受损,有助于制定个体化的诊疗方案。

本研究结果表明,与其他两型相比 II 型菌株引起胃黏膜炎症程度较轻,与师梦等<sup>[27]</sup>研究结果相符

合。分析原因可能因为 II 型菌株不能分泌 VacA 和 CagA,而 I 型菌株可以同时分泌 VacA 和 CagA,中间型菌株则只能分泌 VacA 或者 CagA 中的任意一种<sup>[13,23]</sup>。CagA 可诱导机体分泌高水平的炎症因子 IL-1 和 IL-8<sup>[28-29]</sup>,IL-8 可能会放大机体对 Hp 的炎症反应<sup>[30]</sup>,具有强大的致炎作用;VacA 可维护 Hp 生存的局部微环境,同时可以活化淋巴细胞和肥大细胞产生炎症因子<sup>[25]</sup>,诱发炎症反应。本研究结果提示,不同 Hp 菌株类型所致胃黏膜炎症程度不同,与上述结果均提示,早期行 Hp 血清抗体分型检测或可初步预测胃黏膜病变程度,有望提高 Hp 抗体分型检测在临床中的应用价值。

胃黏膜病理检查可反映胃黏膜炎症程度,但不同炎症程度下胃黏膜屏障结构发生何种变化尚不明确。本研究结果表明胃黏膜轻、中、重度炎症患儿胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率依次下降。闭锁蛋白的异常表达将导致紧密连接的结构和功能受损,上皮细胞之间的通透性增加,各种病原体或者毒素通过紧密连接侵入机体,导致多种疾病的发生<sup>[19]</sup>。在成人研究中,慢性胃炎患者胃黏膜闭锁蛋白的表达显著低于健康对照组<sup>[20-21]</sup>。本研究进一步明确了在儿童中胃黏膜不同炎症程度下闭锁蛋白阳性表达率的差异。胃黏膜炎症程度越重,闭锁蛋白表达水平越低,细菌、内毒素等更易侵入黏膜下,加重炎症程度,形成恶性循环。因此,探究通过上调闭锁蛋白表达水平恢复紧密连接的完整结构及功能,可以成为今后治疗 Hp 相关性胃炎的重要研究方向。

综上所述,Hp 相关性胃炎患儿的胃黏膜闭锁蛋白阳性表达率与 Hp 菌株类型及胃黏膜炎症程度有关,Hp 抗体分型检测或可预测胃黏膜紧密连接和炎症程度,胃黏膜闭锁蛋白则有望成为治疗 Hp 相关性胃炎的重要靶点。

**伦理批准和知情同意:**本研究涉及的所有试验均已通过青岛大学附属医院医学伦理委员会的审核批准(文件号 QYFYWZLL27174)。所有试验过程均遵照《人体医学研究的伦理准则》的条例进行。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

**作者声明:**赵燕、王彩霞、田飞、张丽娟、陈云庆参与了研究设计;赵燕、王彩霞参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

## [参考文献]

- [1] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori* [J]. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1994,61:1-241.
- [2] 张雪,朱亚萍,张玲,等. 银川市幽门螺杆菌感染现状分析[J]. 中华消化杂志, 2020,40(1):47-50.
- [3] ZABALA TORRES B, LUCERO Y. Review: Prevalence and dynamics of *Helicobacter pylori* infection during childhood [J]. 2017,22(5).
- [4] NELL S, ESTIBARIZ I, KREBES J, et al. Genome and methylome variation in *Helicobacter pylori* with a *cag* pathogenicity island during early stages of human infection[J]. Gastroenterology, 2018,154(3):612-623.e7.
- [5] SZKARADKIEWICZ A, KARPI SKI T M, LINKE K, et al. Expression of *cagA*, *virB/D* complex and/or *VacA* genes in *Helicobacter pylori* strains originating from patients with gastric diseases[J]. PLoS One, 2016,11(2):e0148936.
- [6] SCHULZKE J D, FROMM M. Tight junctions; Molecular structure meets function[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009,1165:1-6.
- [7] NEHME Z, ROEHLEN N, DHAWAN P, et al. Tight Junction Protein Signaling and Cancer Biology[J]. 2023,12(2):243.
- [8] CHOI S, KIM N. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on the expression of tight junction proteins in the gastric epithelium in relation to gastric carcinogenesis[J]. 2022,27(6):e12929.
- [9] 马敏,程淑华,王学增. 幽门螺杆菌感染对患儿胃粘膜相关紧密连接蛋白表达水平的影响[J]. 热带医学杂志, 2020,20(6):754-758.
- [10] 中华医学会儿科学分会消化学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童幽门螺杆菌感染诊治专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2015,53(7):496-498.
- [11] 中华医学会病理分会消化病理学组筹备组. 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.
- [12] XIANG Z, CENSINI S, BAYELI P F, et al. Analysis of expression of *CagA* and *VacA* virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that *CagA* is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin[J]. Infect Immun, 1995,63(1):94-98.
- [13] 俞建蔚,齐国卿,张德奎. 幽门螺杆菌分型的研究现状[J]. 中华传染病杂志, 2021,39(4):243-247.
- [14] 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见(2017年,上海)[J]. 中华消化杂志, 2017,37(11):721-738.
- [15] TANAKA K, IWAMOTO S, GON G, et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2000,6(1):127-134.
- [16] 黎文鸿,李紫薇,汪娜,等. 中国儿童幽门螺杆菌感染现状及其影响因素的 Meta 分析[J]. 中国全科医学, 2022,25(28):3569-3578.
- [17] ZHOU M, ZENG Y, XI Y, et al. School-based hygiene intervention to prevent *Helicobacter pylori* infection among children (SHIP HOPE): protocol for a cluster-randomised controlled trial[J]. 2022,12(12):e064207.
- [18] 祝荫,吕农华. 儿童和老年人群的幽门螺杆菌治疗[J]. 中华消化杂志, 2022,42(11):729-732.
- [19] 李炜. 紧密连接蛋白与幽门螺杆菌感染相关性胃病的关系研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2014,16(3):242-247.
- [20] 樊叶,汪志兵,关月,等. 紧密连接蛋白 Occludin 及 ZO-1 在根除幽门螺杆菌慢性胃炎组织中的表达[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2017,26(4):440-443.
- [21] 陈俊,张慧,张琼慧,等. 闭锁蛋白和闭锁小带蛋白在慢性胃炎组织中的表达和意义[J]. 胃肠病学, 2018,23(10):619-621.
- [22] TENG G G, LIU Y, WU T, et al. Efficacy of sucralfate-combined quadruple therapy on gastric mucosal injury induced by *Helicobacter pylori* and its effect on gastrointestinal flora[J]. Biomed Res Int, 2020,2020:4936318.
- [23] 师梦. 幽门螺杆菌毒力基因与致病性研究进展[J]. 临床儿科杂志, 2019,37(3):233-236.
- [24] 石岩岩,丁士刚. 幽门螺杆菌毒力因子及其致病机制的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2009,89(32):2301-2303.
- [25] DELIOS M M, MONTECUCCO C, DE BERNARD M. *VacA* and HP-NAP, Ying and Yang of *Helicobacter pylori*-associated gastric inflammation[J]. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 2007,381(1):32-38.
- [26] 王晗,石莎,陈飞雪,等. 共聚焦激光显微镜在体评估 NSAIDs 相关胃病及其药物干预效果[J]. 山东大学学报(医学版), 2014,52(8):6-13.
- [27] 师梦,谢庆芝,张雨萌,等. 幽门螺杆菌分型检测在儿童再发性腹痛中的应用价值[J]. 国际医药卫生导报, 2019,25(9):1432-1435.
- [28] BLASER M J, BERG D E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease[J]. The Journal of clinical investigation, 2001,107(7):767-773.
- [29] WANG F, QU N, PENG J, et al. *CagA* promotes proliferation and inhibits apoptosis of GES-1 cells by upregulating TRAF1/4-1BB[J]. Molecular medicine reports, 2017,16(2):1262-1268.
- [30] FAZELI Z, ALEBOUYEH M, REZAEI TAVIRANI M, et al. *Helicobacter pylori* *CagA* induced interleukin-8 secretion in gastric epithelial cells [J]. Gastroenterology and hepatology from bed to bench, 2016,9(Suppl1):S42-S46.