

。 综述与编译。 。

PCR法检测研究 HP传染途径

中国医学科学院 北京协和医院核医学科(北京,100730) 徐乐焱 姜国辉综述 王世真审校
中国协和医科大学

摘要: PCR(多聚酶链反应)核酸探针是分子核医学研究的重要手段之一。利用该技术检测幽门螺杆菌(HP)是HP检测中最准确、最有效的方法。在PCR法中常用的是随机片段扩增(RAPD)及限制性片段长度多态性分析(RFLP)技术,它们的敏感性、特异性优于细胞培养、组织学、血清学检测及尿素酶呼气实验法,并且能够检测离体实验样品,因此它不仅适用于临床诊断,也适用于流行病学调查研究。利用RAPD和RFLP研究HP的传染途径发现:HP可出现于人的唾液、牙斑、牙洞、胃液、粪便及水中,证明HP可能通过口-口、粪-口、胃-口、水等途径传播。在猫、犬等一些动物中也发现了HP,说明它们可能也是HP的宿主,但其确切的传播方式还需进一步研究。

关键词: PCR探针 HP传播途径

当前核医学正迈向分子核医学的新时代,分子生物学及其技术在核医学中的广泛应用将大大促进核医学向纵深发展。近年来,利用多聚酶链反应(PCR)方法中含有放射性核素的高敏感、高特异性的探针来检测及诊断幽门螺杆菌(HP)取得了可喜的进展。HP是一类微厌氧、Gram染色阴性、能够移动的螺旋杆菌,它是胃炎、胃及十二指肠溃疡的重要病源体,甚至可能导致胃癌的发生。有资料表明,全世界有40%以上的人群感染了HP^[1],在发展中国家甚至可达89%~90%。所以,HP的检测及治疗越来越引起人们的重视。兹将近年来利用分子核医学技术研究HP取得的进展作一综述。

1 HP的传统检测方法

检测HP的传统方法可分为直接法和间接法两大类。从组织学检查证实HP感染或通过细菌培养获得HP感染的证据,这是直接法,如内窥镜活检、组织学检查、活检组织细菌培养等;通过测定HP产生的尿素酶对尿素的水解作用,或测定体内免疫系统产生的抗HP抗体,这是间接的方法,如快速尿素

酶实验、呼气实验、血清抗HP抗体测定等。由于直接法及间接法中的快速尿素酶实验均依赖于内窥镜组织活检,若以此类方法在短期内观察对HP感染的治疗效果及有无复发,则很难使患者接受。另外,由于内窥镜活检仅获得极其有限的胃粘膜组织,若在这有限的标本中不含HP或HP含量极少,则往往容易造成“假根除”。间接法中的血清抗HP抗体测定是不依赖内镜检查HP感染的方法,能够大规模测定人群中HP的感染情况,以酶联免疫吸附分析(ELISA)为基础的血清学检测方法的敏感度及准确度都很高,但可靠性差,这是由于感染HP后,人体血清内能够长时间保持一定的抗体滴度,难免有假阳性,故这一方法也不适用于HP治疗的短期随访观察。现在比较常用的尿素呼气实验是一种简便、快速、非侵入性的方法,它利用HP能够产生尿素酶,尿素酶分解尿素成CO₂及氨气,当病人饮入含有¹³C或¹⁴C标记的尿素液体时,如果胃内感染了HP,那么HP会把尿素分解,含有¹³C或¹⁴C的CO₂将被呼出,通过测定CO₂气体中¹³C或¹⁴C的量,可以确定是否感染HP。这种方法特异性

高,无需胃镜活检,但此法的缺点是可产生假阴性,容易受到药物影响,并且不能做体外标本的测定。因此,需要一种非损伤性、简单、准确、灵敏、适用于儿童及成人,既能够监测治疗前后 HP清除情况,又能用来做流行病学调查的方法。

2 HP的 PCR检测法

检测 HP的分子生物学方法很多,如 rRNA探针以及 Southern blot杂交法等,但这些方法费时、技术要求高,所以较少采用。而 PCR方法是一种非常适合的方法,有研究表明,此法比细胞培养及其它实验室检查法更灵敏。它不仅可检测胃的活检标本^[2,3],也可以在非损伤情况下测定胃液、胆汁、粪便、牙斑、水等其它离体标本^[4,5],而且样品不需要严格的保存条件,因为利用 PCR方法测定的是 HP的 DNA分子,并不需要存活的完整细菌活体,DNA分子的化学性能较稳定,可在外界环境长时间存在,易于被检出;另外,HP能被一些药物转变成球菌,这可能是 HP的休眠状态,这种状态很难被传统方法测出,但用 PCR法可以测出^[6],并且即使样品中存在着的细菌量极少,也能够检测出来;更重要的是,PCR法可测定治疗前后和感染的 HP分型及消除的情况^[7,8],这就使 PCR法不仅适用于临床诊断,判定持续的感染是由于治疗失败还是重新感染,区分病人感染的 HP是由病人之间还是由家庭之间传播造成的;同时它也适用于环境标本,能够测定样品中是否存在着 HP及其存在的类型,所以它又是一项流行病学调查的重要工具。

检测 HP的最常用 PCR技术是指纹法,它利用放射性核素标记的寡聚核苷酸探针与所需检测的 HP的 DNA进行分子杂交,经过 PCR扩增,行琼脂糖凝胶电泳,然后放射自显影,比较观察电泳带来鉴定 HP和分型。指纹法中随机片段扩增法(RAPD)是利用非细菌特异的基因序列来随意选择短链的探

针,通过在早期 PCR的循环中这些随机的探针扩增了从基因起始位点到与这些探针随意匹配的位点的基因序列,在进一步的序列循环中,产生了严格的高度特异的片段,根据这些片段组成的电泳图来判定 HP在 RAPD法中,因为需要整个的细菌基因图作为起始位点,首先要在培养下分离出单一的菌株,这在某些情况下是很困难的。在这种情况下,另一种方法比较适合一些,那就是片段长度多态性分析(RFLP)法。它利用细菌固有的基因序列作为特定的探针,进行 PCR扩增,扩增的产物再经过不同的限制性内切酶进行切割而产生不同长度的片段,通过这些不同的片段来测定 HP的存在及其分类。RFLP法的 HP不需要分离就可以直接测定,适用于比较复杂的情况,但它的分辨性能不及 RAPD法,尤其是当它的探针序列特异性不强或多种不同的菌株同时存在时表现明显^[9],因为不同菌株的限制性片段将会混在一起而产生与任何菌株不相对应的模型。一般来说,这个问题可以通过仔细加长每一个片段的长度来解决。

作为 PCR探针的特定基因序列,研究较多的是 HP的 RNA基因(如 16S rRNA 5S rRNA 23S rRNA等)、尿酶基因(如 ureA ureB ureC等),这几种基因是 HP特定的基因序列,对 HP的检测灵敏度较好,但有时可能与其它菌株有交叉反应,故而做探针时应严格挑选以增加特异性。另外,还有人选择其它的基因序列(如 HP的蛋白抗原^[10])或其基因文库中的不同片段来做探针^[11,12],也达到了很好的效果。

3 HP的传播途径

HP的传染源及传播途径一直是人们研究的热点,因为缺少适当的方法,在 PCR法应用于 HP的检测以前,对它的传播的了解较少。PCR法具有高灵敏度、高特异性,能够测定胃体外的环境样品,且重复性好等的优

点使得 HP的流行病学调查成为现实

现在比较流行的看法是 HP的口-口传播途径。研究表明,感染 HP的病人唾液中的细菌培养检查结果基本上是阴性的,但利用 PCR技术,人们发现并已证实,病人唾液中有定量的 HP存在,而且存在率很高(可达84%)^[13]。利用此技术,人们又发现,在病人的牙斑和牙洞中也存在着 HP^[14,15]。一项研究表明,9例胃内未检出 HP的病人中,利用 PCR技术发现了口腔中存在着 HP^[13],这些细菌可能是暂时存在的,但也说明胃中的 HP可由口腔传入。经药物治疗消除 HP一段时间后,病人有一定的复发率。PCR法检测发现,再感染的 HP类型同配偶、父母、子女或本人口腔中的 HP相同,因此有人认为,这是通过无法接触到药物的口腔传播或重新感染造成的^[16]。另外一些研究者认为,口腔及唾液中的 HP是通过胃液返流造成的^[17,18],在以往的细菌培养检查中,由于酸性的胃液中细菌含量少并且在此条件下活性容易丧失,因此在病人胃液中 HP的检出率低(38%~56%),而 PCR探针的检测特异性高达100%,灵敏度可达96%,其检出率在85%以上^[19]。不管检出率高低,都证实胃液确可携带 HP。在一些 PCR分析的结果中,HP随机分布出现在口腔中的生态窝中,其 PCR扩增产物经过内切酶消化后,发现其类型与在胃中存在着的 HP类型一致^[20],这更可能同胃液返流相关。但也有一些研究表明,很多胃中有 HP感染的人,口腔中并不一定同时存在着 HP,或者在唾液、牙斑和牙洞中的 HP感染率是很低的,而且由于在牙斑中能够存在350种不同的细菌,一些病人的 PCR检测可能存在假阳性,可见口腔中细菌作为传染源并不是很确定的。但总的来说,口腔中存在着的 HP,不管是暂时的还是永久的,都与配偶、父母、子女等家庭内部生活联系紧密的人群通过横向或纵向的口-口传播有着密切关系。

另外一个可能的传播途径是粪-口途径。由于粪便中的 HP含量少并且有不同细菌共存等因素的共同作用,使得培养分离活 HP几乎不可能,利用高灵敏的 PCR技术,已经在粪便样品中检测出了 HP DNA的存在,但结果并不很一致,有的检出率很高(12/30),有的检出率却很低(2/29)。粪便可以污染水,通过污染的水进行传播是粪-口途径的主要方式,人们利用 PCR探针在污染的水中也发现了 HP^[21]。另外,不同地理和社会类型中 HP的感染程度不同,也证明粪-口途径是一个重要的方式。在智利等一些发展中国家,其生活水平低,卫生状态差,人口密集,HP的发病率高于发达国家^[22],而且在智利首都利马的污水中用 PCR也检测出了 HP,说明了粪-口途径存在的可能性。但需要说明的是,由于 PCR只是检测细菌的 DNA存在与否,并不能说明细菌是死是活,如果是死的或是 DNA片段,那么就不能作为传染源,所以是否能在粪便中分离出 HP是其作为传染源关键。虽然个别人已从粪便中分离出 HP,但大部分实验结果是阴性的。

现在还有一种说法是胃-胃途径^[23,24]。在病人的胃液中利用 PCR技术发现了 HP,同时在给感染 HP的病人做检查用的胃镜或胃管中,由于消毒不彻底而检出有一定量的 HP附在上面^[25]。如果将消毒不彻底的胃镜用于检查其他正常人,那么就可以通过胃与胃的间接接触造成 HP的传播。流行病学调查中,操作胃镜或下胃管等经常接触胃液的医生的 HP发生率较高,也可以在某种程度上说明了可能存在着这一途径。另外,胃的粘液性呕吐物也可能作为 HP的传染源^[26]。儿童时期是感染 HP最危险的时期,其感染率非常高,尤其是那些生活在家庭子女多、无固定热水供应等生活、社会经济条件差、人群密集的地区及在校儿童的感染率更高。儿童,特别是婴儿,更易出现呕吐,而且儿童经常将不清洁的手指和外来物放入口中,如果对呕吐

物清除不彻底,呕吐物中的 HP污染了周围物体,那么儿童的手指接触到后,就可造成感染。但此项假设缺乏细菌培养和 PCR检测的证据

利用 PCR技术在猪和猫中也分离检测出了 HP,这些动物同人类的关系密切,也可将 HP传染给人类。有人发现,苍蝇身上也携带着 HP^[27],虽然目前缺乏进一步的证明,但如果确是如此,那么这将是主要的传染源之一。

总之,HP的传染是比较复杂的,可能是多方面因素共同作用的结果,在研究这些问题时,PCR法是一项不可缺少的高效工具。

参 考 文 献

- 1 Talor KN. Epidemiol J Blaser Rev, 1991; 13: 42-59
- 2 Clayton CL et al. J Clin Microbiol, 1992; 30: 192-200
- 3 Van Zwet AA et al. J Clin Microbiol, 1993; 31: 1918-1920
- 4 Foxall PA et al. J Clin Microbiol, 1992; 30: 739-741
- 5 Hammar M et al. J Clin Microbiol, 1992; 30: 54-58
- 6 Nedenskov-Sorensen P et al. J Infect Dis, 1990; 161: 365-370
- 7 Schutze K et al. Gut, 1995; 36: 831-833
- 8 Clayton CL et al. J Clin Microbiol, 1993; 31: 1420-1425
- 9 Hurtado A et al. Res Microbiol, 1994; 145(8): 585-594
- 10 Marten H et al. J Clin Microbiol, 1992; 30(1):

- 54-58
- 11 Valentine JL et al. J Clin Microbiol, 1991; 29(4): 689-695
- 12 Kleanthous H et al. Ital J Gastrienterol, 1991; 23(suppl. 2): 32-34
- 13 Banatvala N et al. Microb Ecol Health Dis, 1994; 7: 1-8
- 14 Ferguson DA Jr et al. J Clin Microbiol, 1993; 31(10): 2802-2804
- 15 Musich PR et al. Clin Pathol, 1995; 48(7): 662-666
- 16 Genta RM et al. Hum Pathol, 1994; 25: 221-226
- 17 Bernander S et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1993; 12: 282-285
- 18 Von Recklinghausen G et al. Int J Med Microbiol Virlo Parasitol Infect Dis, 1994; 281: 102-106
- 19 Kawamata O et al. Biochem Biophys Res Commun, 1996; 219(1): 266-272
- 20 Chuanfu LI et al. Digestive Dis Sci, 1990; 41(11): 2142-2149
- 21 Westblom TU et al. Clin Infect Dis, 1993; 16(3): 367-371
- 22 Westblom TU. Immunol Invest, 1997; 26: 163-174
- 23 Thomas JE et al. Lancet, 1992; 340: 1194-1195
- 24 Kelly SM et al. Gastroenterology, 1994; 107: 1671-1674
- 25 Robert R et al. J Clin Microbiol, 1994; 32(4): 1123-1126
- 26 Axon ATR. Aliment Pharmacol Ther, 1995; 9: 585-588
- 27 Grubel P et al. J Clin Microbiol, 1997; 35(6): 1300-1303

(收稿日期: 1998-06-19)

血管活性肠肽受体研究现状

华西医科大学附一院核医学科(成都, 610041) 史育红 谭天秩

摘 要: 血管活性肠肽(VIP)是由 28个氨基酸组成的多肽,结构上属胰泌素-胰高血糖素多肽家族。血管活性肠肽受体广泛分布于人和动物的多种组织器官上。现代分子生物学方法证明,该类受体有两种亚型,即 VIP1和 VIP2型受体。通过对其分布、结构与功能、染色体定位及受体激动剂和拮抗剂的研究,将有助于阐明其与某些疾病的关系,并建立一种对疾病尤其是恶性肿瘤具有诊断和治疗价值的新技术。

关键词: 血管活性肠肽 血管活性肠肽受体