

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.28.003

牙龈卟啉单胞菌与食管癌临床病理特征和预后的关系*

李硕果,贾瑞诺,高社干[△]

(河南科技大学第一附属医院肿瘤内七科,河南洛阳 471003)

[摘要] **目的** 检测牙龈卟啉单胞菌(PG)在食管黏膜中的表达,以及 PG 与食管鳞癌(ESCC)诊断及预后的关系。**方法** 通过免疫组织化学 SP 法检测 PG 及其分泌的独特蛋白酶 Kgp 在 ESCC 组织、癌旁组织及正常食管黏膜中的表达。并分析 PG 感染和 ESCC 临床特征的关系。**结果** PG 在 ESCC 组织、癌旁组织、正常食管黏膜的阳性表达率分别为 60%、15%、0;Kgp 的阳性表达率分别为 68%、40%、0,PG 感染与分化程度、淋巴结转移及 TNM 分期正相关。**结论** PG 感染 ESCC 患者的食管上皮细胞,且与 ESCC 进展有关,它可能是 ESCC 的生物标志物;根治口腔病原菌可能减少 ESCC 的发生。

[关键词] 牙龈卟啉单胞菌;食管肿瘤;细胞分化;淋巴转移;预后

[中图法分类号] R735.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)28-3614-04

The relationship between Porphyromonas gingivalis and clinicopathological characteristics and prognosis of esophageal cancer*

LI Shuoguo, JIA Ruinuo, GAO Shegan[△]

(Seven Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

[Abstract] **Objective** To detect the expression of Porphyromonas gingivalis (PG) in the esophageal mucosa and the relationship between PG and the diagnosis and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** The immunohistochemical SP method was used to detect the expression of PG and its Unique protease Kgp in percutaneous tissue, adjacent normal tissues and normal esophageal mucosa. The relationship of PG infection and clinicopathologic characteristics of ESCC was analyzed. **Results** The positive expression rate of PG in percutaneous tissue, adjacent normal tissues and normal esophageal mucosa was 60%, 15%, 0, and the positive expression rate of Kgp was 68%, 40%, 0 respectively. PG infection was positively correlated with differentiation, lymph node metastasis and TNM stage. **Conclusion** PG infects the epithelium of the esophagus of ESCC patients, PG infection is associated with the progression of ESCC, it may be a biomarker of ESCC. Eradication of PG may reduce the incidence of ESCC.

[Key words] Porphyromonas gingivalis; esophageal neoplasms; cell differentiation; lymphatic metastasis; prognoses

自幽门螺杆菌在胃癌的中的作用被发现后^[1],多种病原菌与癌症的关系已经被报道,包括伤寒沙门氏菌与胆囊癌^[2],痤疮丙酸杆菌与前列腺癌^[3],大肠杆菌与结肠癌^[4]等。食管癌是第 8 位常见的恶性肿瘤,在癌症死因中排第 6 位。大部分发生在亚洲,尤其是中国^[5]。它有两种主要的组织学亚型,包括鳞癌和腺癌,且早期诊断困难,病死率高。因此,减少发生和降低病死率是必要的。

慢性牙周病的微生物群中含有丰富的革兰阴性厌氧菌。其中,牙龈卟啉单胞菌(*porphyromonas gin-*

givalis, PG)是一种关键的口腔致病菌,它能侵入上皮细胞,干扰宿主免疫反应和细胞周期^[6-7]。流行病学表明牙周病和牙齿的缺失及某些癌症有关,比如口腔癌、胃癌、胰腺癌^[7-10]。口腔鳞癌细胞中,PG 通过激活 ERK1/2-Ets1、p38/HSP27 和 PAR2/NF- κ B 通路进而诱导 MMP-9 表达促进了细胞迁移^[10]。因为食管黏膜在组织学上与口腔黏膜相似,因此笔者认为口腔疾病可引起食管感染,PG 可能与食管癌有关。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究经本院伦理委员会批准,并

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81472234)。 作者简介:李硕果(1987—),住院医师,硕士,主要从事消化道肿瘤的研究。
[△] 通信作者, E-mail:lsj68066707@163.com。

取得患者书面知情同意。选择2010—2014年本院接受手术治疗的食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma,ESCC)患者100例,患者术前均未接受放疗,并取相应癌旁组织(距离癌组织3 cm以上);另外30例活检标本取自胃镜检查时,且病理证实为正常食管黏膜组织。4 μm厚连续切片,进行免疫组织化学SP法染色观察。

1.2 试剂和方法 SP超敏免疫组织化学试剂盒购于福州迈新公司。兔抗人PG蛋白多克隆抗体和鼠抗人Lys-gingipain(Kgp,PG分泌的独特蛋白酶,批号15C8G5E6C2)单克隆抗体由美国路易斯维尔大学实验室获赠被用于检测PG感染。抗兔IgG和正常鼠IgG被作为阴性对照。PG及Kgp原始抗体稀释浓度为1∶1 000及1∶500。

1.3 结果评估 每个组织切片由两位资深的病理学专家评估。结果判定按阳性细胞百分率评分:<10%为0分,10%~<30%为1分,30%~<60%为2分,

≥60%为3分。≥2分被看做PG或Kgp染色阳性。
1.4 统计学处理 采用SPSS19.0软件分析数据,计数资料采用χ²检验,随访30个月,以死亡为终点事件,生存分析采用Kaplan-Meier法并用Log-rank检验,生存状态影响因素分析采用COX回归。以P<0.05为差异有统计学意义。

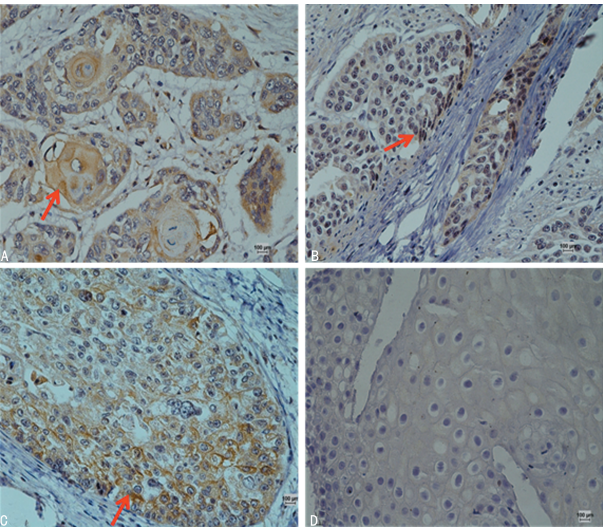
2 结 果

2.1 PG蛋白在ESCC组织中高表达 PG蛋白在ESCC组织及癌旁组织中高表达,且在ESCC组织(60%)中的表达高于癌旁组织(15%),在正常食管黏膜中不表达(P<0.01),见表1。PG蛋白的表达主要定位于细胞质,偶尔也位于细胞核,见图1。

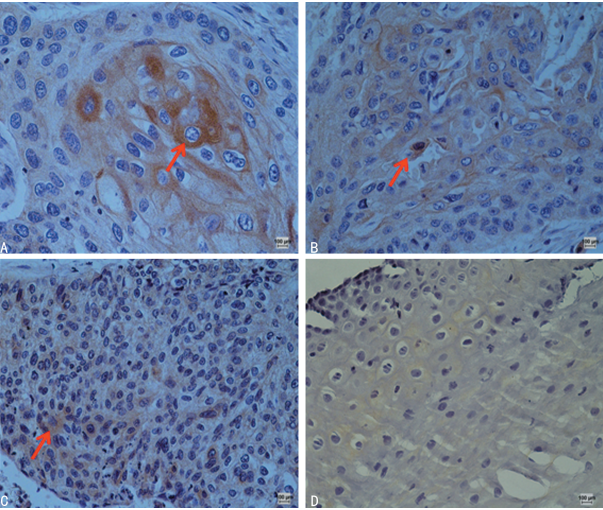
2.2 Kgp在ESCC组织中表达 Kgp在ESCC组织中表达(68%)明显高于癌旁组织(40%),且在正常食管黏膜中不表达(P<0.01),见表1。Kgp的表达也主要定位于细胞质,偶尔也位于细胞核,见图2。

表1 PG蛋白及Kgp在食管癌中的表达及与临床病理的关系[n(%)]

项目	n	PG			Kgp		
		阳性	χ ²	P	阳性	χ ²	P
组别			62.760	<0.01		46.270	<0.01
食管癌组织	100	60(60.0)			68(68.0)		
食管癌旁组织	100	15(15.0)			40(40.0)		
正常食管黏膜	30	0			0		
性别			0.198	0.656		2.836	0.092
男	70	41(58.6)			44(62.8)		
女	30	19(63.3)			24(80.0)		
年龄(岁)			3.706	0.054		0.446	0.504
≤60	39	28(71.8)			25(64.1)		
>60	61	32(52.5)			43(70.5)		
吸烟史			1.515	0.218		1.255	0.263
吸烟	45	30(66.7)			28(62.2)		
不吸烟	55	30(54.5)			40(72.7)		
分化程度			7.380	0.025		7.671	0.022
高分化	22	10(45.5)			10(45.5)		
中分化	58	33(56.9)			45(77.6)		
低分化	20	17(85.0)			13(65.0)		
淋巴结转移			4.732	0.029		7.402	0.007
阳性	38	28(73.7)			32(84.2)		
阴性	62	32(51.6)			36(58.0)		
TNM分期			4.412	0.036		8.223	0.004
I+II	68	36(52.9)			40(58.8)		
III	32	24(75.0)			28(87.5)		



A: 高分化;B: 中分化;C: 低分化;D: 正常食管黏膜
图 1 PG 蛋白在食管癌中的阳性表达 (SP×400)



A: 高分化;B: 中分化;C: 低分化;D: 正常食管黏膜
图 2 Kgp 在食管癌中的阳性表达 (SP×400)

2.3 PG 蛋白表达与 ESCC 临床病理特征呈正相关

PG 蛋白及 Kgp 的表达均与患者的年龄、性别、有无吸烟史无关,与分化程度、淋巴结转移、TNM 分期相关($P<0.05$),见表 1。

2.4 PG 蛋白和 Kgp 表达的相关性 100 例 ESCC 组织标本中,58% 的标本 PG 蛋白和 Kgp 均为阳性(表 2)。PG 蛋白的表达与 Kgp 的表达呈正相关($P<0.01$, $r=0.601$)。

表 2 PG 蛋白与 Kgp 表达之间的关系(n)

蛋白	KGP		R	P
	阳性	阴性		
PG 阳性	58	2	0.601	0.000
PG 阴性	10	30		

2.5 PG 蛋白、Kgp 表达与 ESCC 的总生存相关性
根据染色情况,将 PG 蛋白和 Kgp 的表达归为两组:

阴性表达组和阳性表达组,分析 PG 蛋白和 Kgp 与预后之间的关系,绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。PG 蛋白阳性表达组 30 个月生存率为 44.4%,低于阴性表达组的 71.9%,差异有统计学意义($\chi^2=8.392$, $P=0.004$),同时 COX 回归多因素分析显示淋巴结转移是 ESCC 患者累积生存率的独立预后因素($Wald \chi^2=9.232$, $P=0.002$)。同时,Kgp 阳性表达组 30 个月生存率为 55.3%,低于阴性表达组的 83.3%,差异有统计学意义($\chi^2=4.050$, $P=0.044$),COX 回归多因素分析显示淋巴结转移是 ESCC 患者累积生存率的独立预后因素($Wald \chi^2=6.497$, $P=0.011$),见图 3。

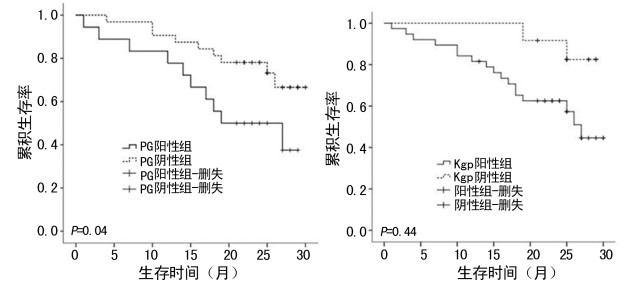


图 3 食管癌组织中 PG 及 KGP 表达水平与患者预后的关系

3 讨 论

流行病学研究已证实细菌感染能够增加某些肿瘤的罹患风险,如幽门螺杆菌和胃癌^[1],中国食管癌高发区林州人群随访发现牙齿缺失与 ESCC 发生呈正相关,而 PG 蛋白感染及口腔微生态失衡是慢性牙周炎和牙齿脱落的主要致病菌^[11]。越来越多证据表明:PG 蛋白与多种消化道、呼吸道肿瘤的发生、发展相关^[7-10]。目前有关研究认为:口腔关键致病菌之一的 PG 蛋白数量异常增加是造成口腔局部微生态失衡的重要因素之一。与口腔紧邻的消化道食管上皮均为鳞状上皮,不可避免成为口腔细菌的定植场所之一。

本研究发现 PG 作为一个潜在的病原体,在 ESCC 患者的食管黏膜中不仅能被检测到,并且 PG 蛋白在 ESCC 组织中的表达明显高于相应癌旁组织,而在正常食管黏膜中不表达,PG 低分化组表达明显高于中高分化组($P=0.025$),淋巴结转移组的表达率高于无淋巴结转移组($P=0.029$),Ⅲ期患者表达阳性率高于 I + II 期患者($P=0.036$),PG 分泌的独特蛋白酶 Kgp 亦有同样的表达趋势。因此笔者认为,PG 的表达与多种病理因素有关,包括分化、转移、TNM 分期、总生存。这些发现表明 PG 感染可能是 ESCC 的一个新的危险因素,也许是食管癌的预后靶标之一。

PG 和宿主细胞相互作用的许多方面提示了 PG

可能介导机体的癌变过程^[12]。(1)慢性炎症与肿瘤的发展有关,比如,已知增加 IL-6 和 STAT3 活性可以促进肿瘤发生^[13-14]。有关研究表明 PG 激活 JAK2 和 GSK3 β 通路,从而增加了上皮细胞中 IL-6 的产生^[13]。(2)PG 也通过多种途径产生抗凋亡作用,包括 Jak1/Akt/STAT3 的活化,增加 Bcl-2 (抗凋亡): Bax (促凋亡) 的值,阻碍细胞凋亡效应器细胞色素 C 的释放,以及下游凋亡蛋白酶的活化。(3)PG 能上调微 RNAs(micro-RNAs),例如 miR-203 在牙龈上皮细胞中可以抑制凋亡^[15]。同样的 PG 能通过激活 cyclin/CDK 加快细胞周期进程,减少肿瘤抑制因子 p53 的水平。(4)PG 可能诱导致癌物质产生,例如,PG 可以将乙醇转化为致癌物质乙醛,可诱导 DNA 损伤、突变和上皮增生,这可以解释饮酒与某些癌症发生的流行病学证据^[7]。

PG 可能促进了食管上皮细胞的转化。本研究结果表明 PG 感染与 ESCC 发生呈正相关,PG 作为 ESCC 新的病原体或辅助因子,其意义是巨大的,它暗示了改善口腔卫生可能降低 ESCC 的危险性,筛查牙垢 PG 也许能辨别易感人群,应用抗菌药物或者其他的抗菌方法也许能够预防 ESCC 的进程。

PG 感染与 ESCC 的关系暗示了真核细胞溶解酶可能成为 ESCC 的一个新的有效治疗方法。最后,PG 感染促进了口腔益生菌的共生转化,这个过程对于牙周疾病的进展是重要的^[16]。食管黏膜微生态失调也许能引起或加速食管病变^[6]。因此,结果表明在 ESCC 发展中感染 PG 可能会导致食管微生物态的变化。

总之,本研究表明 PG 存在于 ESCC 患者的食管上皮细胞中,PG 感染与 ESCC 的严重程度及差的预后有关,且与 ESCC 的进展有关。PG 可能是食管癌的生物标志物之一。重要的是,这些数据表明,根除口腔致病菌可能有助于 ESCC 的治疗。

参考文献

- [1] COVER T L. *Helicobacter pylori* diversity and gastric cancer risk[J]. *MBio*, 2016, 7(1): e1815-1869.
- [2] KOSHIOL J, WOZNIAK A, COOK P, et al. *Salmonella enterica* serovar Typhi and gallbladder cancer: a case-control study and meta-analysis [J]. *Cancer Med*, 2016, 5(11): 3310-3325.
- [3] DAVIDSSON S, MOLLING P, RIDER J R, et al. Frequency and typing of *Propionibacterium acnes* in prostate tissue obtained from men with and without prostate cancer[J]. *Infect Agent Cancer*, 2016, 11(1): 26-35.

- [4] MOMEN-HERAVI F, BABIC A N A, TWO ROGER S S, et al. Periodontal disease, tooth loss and colorectal cancer risk: results from the Nurses' Health Study [J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(3): 646-652.
- [5] SOHDA M, KUWANO H. Current status and future prospects for esophageal cancer treatment [J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surgery*, 2017, 23(1): 1-11.
- [6] HAJISHENGALLIS G, LAMONT R J. Breaking bad: manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Eur J Immunol*, 2014, 44(2): 328-338.
- [7] 葛阳, 程磊, 周学东. 口腔微生物与肿瘤关系的研究进展 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2014, 32(5): 527-531.
- [8] SALAZAR C R, SUN J H, LI Y H, et al. Association between selected oral pathogens and gastric precancerous lesions [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e51604.
- [9] MICHAUD D S. Role of bacterial infections in pancreatic cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(10): 2193-2197.
- [10] WHITMORE S E, LAMONT R J. Oral bacteria and cancer [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(3): e1003933-1003936.
- [11] CUGINI C, KLEPAC-CERAJ V, RACKAITYTE E, et al. *Porphyromonas gingivalis*: keeping the pathos out of the biont [J]. *J Oral Microbio*, 2013, 5: 19804-19815.
- [12] LEE J, ROBERTS J S, ATANASOVA K R, et al. Human primary epithelial cells acquire an epithelial-mesenchymal-transition phenotype during long-term infection by the oral opportunistic pathogen, *porphyromonas gingivalis* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 493-507.
- [13] WANG H Z, ZHOU H X, DUAN X X, et al. *Porphyromonas gingivalis*-induced reactive oxygen species activate JAK2 and regulate production of inflammatory cytokines through c-Jun [J]. *Infect Immun*, 2014, 82(10): 4118-4126.
- [14] YEE M, KIM S, SETHI P, et al. *Porphyromonas gingivalis* stimulates IL-6 and IL-8 secretion in GSM-K, HSC-3 and H413 oral epithelial cells [J]. *Anaerobe*, 2014(28): 62-67.
- [15] 吴武超, 吴亚菲, 赵蕾, 等. 牙龈卟啉单胞菌与口腔鳞状细胞癌关系的研究进展 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2015, 33(6): 651-655.
- [16] MAEKAWA T, KRAUSS J L, ABE T, et al. *Porphyromonas gingivalis* manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis [J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 15(6): 768-778.

(收稿日期: 2018-05-19 修回日期: 2018-06-21)