

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.01.003

NOD1 和 NOD2 在 Hp 阳性胃癌发生、发展中的作用机制研究

中学东¹,王红卫¹,呼延智伟²

(1. 武警第一机动总队医院门诊部,河北定州 073000;2. 山西省晋中市第一人民医院消化科 030600)

[摘要] **目的** 研究核苷酸结合寡聚化结构域(NOD)1 和 NOD2 蛋白在幽门螺杆菌(Hp)阳性胃癌发生、发展中的机制。**方法** 分别采用免疫组织化学和实时荧光定量聚合酶链反应检测 NOD1 和 NOD2 蛋白、mRNA 的表达水平,并将 Hp 阴性和阳性胃癌组的结果进行比较;采用 Western blot 检测 Hp 阳性的早期和中晚期胃癌组天冬氨酸蛋白水解酶-3(caspase-3)和核因子- κ B(NF- κ B)的表达水平。**结果** Hp 阴性和 Hp 阳性胃癌组间 NOD1 和 NOD2 的蛋白表达水平差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中 Hp 阳性胃癌组中 NOD1 和 NOD2 蛋白均呈高表达;Hp 阴性和 Hp 阳性胃癌组间 NOD1 和 NOD2 mRNA 的表达水平差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中 Hp 阳性胃癌组中 NOD1 和 NOD2 mRNA 呈高表达;Hp 阳性的早期和中晚期胃癌组间 caspase-3 和 NF- κ B 的表达水平差异均有统计学意义($P < 0.05$),中晚期胃癌组 caspase-3 和 NF- κ B 表达水平均高于早期胃癌组。**结论** Hp 阳性胃癌组织 NOD1 和 NOD2 的表达增加,二者可能通过激活 NF- κ B 通路和凋亡因子 caspase-3,在胃癌的发展中发挥着促凋亡作用。

[关键词] 核苷酸结合寡聚化结构域 1;核苷酸结合寡聚化结构域 2;幽门螺杆菌;胃肿瘤;机制

[中图法分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)01-0013-04

Mechanism of NOD1 and NOD2 in pathogenesis and development of Hp positive gastric cancer

SHEN Xuedong¹,WANG Hongwei¹,HU Yanzhiwei²

(1. Department of Outpatient, the First Mobile Corps of Armed Police Hospital, Dingzhou, Hebei 073000, China;

2. Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Jinzhong, Shanxi 030600, China)

[Abstract] **Objective** To study the mechanism of nucleotide oligomerization domain(NOD)1 and NOD2 in the pathogenesis and development of Hp positive gastric cancer. **Methods** The protein and mRNA expression levels of NOD1 and NOD2 were detected by immunohistochemistry and real-time fluorescence quantitative PCR, respectively, and the results of Hp negative and positive gastric cancer groups were compared. And the expression levels of caspase-3 and NF- κ B in early and middle-advanced Hp positive gastric cancer group were detected by Western blot. **Results** There were significant differences in the expressions of NOD1 and NOD2 protein between Hp negative and Hp positive gastric cancer group ($P < 0.05$), and the expressions of NOD1 and NOD2 protein were high in Hp positive gastric cancer group. There were significant differences in expressions of NOD1 and NOD2 mRNA between the two groups ($P < 0.05$), in which NOD1 and NOD2 mRNA expressions were high in Hp positive gastric cancer group. There were significant differences in expressions of caspase-3 and NF- κ B between in early and middle-advanced Hp positive gastric cancer group ($P < 0.05$), in which the expression of caspase-3 and NF- κ B in the middle-advanced Hp positive gastric cancer group was higher than that in the early gastric cancer group. **Conclusion** The expressions of NOD1 and NOD2 increased in Hp positive gastric cancer. Both of them may play a role in promoting apoptosis in the development of gastric cancer by activating NF- κ B pathway and apoptosis factor caspase-3.

[Key words] NOD1;NOD2;helicobacter pylori;stomach neoplasm;mechanism

当前世界范围内胃癌发病率不断升高,相关死亡 病例已居恶性肿瘤的第 2 位,有数据显示我国恶性肿

瘤死亡患者中约 1/4 为胃癌患者^[1]。胃癌的危险因素包括幽门螺杆菌(Hp)感染、高盐摄入、吸烟、饮酒和宿主遗传易感性等,据估计有 65% 的胃癌与 Hp 感染有关^[2]。先天免疫系统作为人体抵抗 Hp 感染的第一道防线,其抵抗力强弱与 Hp 感染的临床结局直接相关。核苷酸结合寡聚化结构域(NOD)1 和 NOD2 蛋白可通过核因子- κ B(NF- κ B)通路诱导天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)活化,促进细胞凋亡,在免疫系统抵御 Hp 感染过程中发挥着重要作用^[3]。因此,本研究分析 NOD1 和 NOD2 在 Hp 阳性胃癌发生、发展中的作用机制,为临床诊疗提供帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2016 年 1 月至 2019 年 6 月于山西省晋中市第一人民医院行手术治疗的 124 例胃癌患者标本,患者均经病理检查诊断明确,其中男 67 例,女 57 例,年龄 27~74 岁。根据¹³C 呼气试验和快速尿素酶试验结果,将患者分为 Hp 阳性胃癌组($n=83$)和 Hp 阴性胃癌组($n=41$);根据组织病理结果,将 Hp 阳性胃癌患者分为早期胃癌组($n=29$)和中晚期胃癌组($n=54$)。早期胃癌指病灶局限于黏膜及黏膜下层,不考虑病灶大小和淋巴结转移情况;中晚期胃癌指病灶达肌层或浆膜层^[4]。排除标准:(1)合并其他恶性肿瘤;(2)合并甲状腺功能异常;(3)术前曾口服激素、非甾体抗炎药、避孕药或进行抗 Hp 治疗者;(4)临床资料缺失者。

1.2 实验试剂

鼠抗人 β -肌动蛋白(β -actin)、NOD1、NOD2、NF- κ B 及 caspase-3 抗体均购自美国 R&D 公司;山羊抗兔 IgG 二抗、中性树脂及 DAB 显色液试剂盒均购自北京百奥莱博科技有限公司;实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学法检测 NOD1 和 NOD2 的表达水平

将 124 例胃癌患者胃癌组织的石蜡标本连续切片 5 张,用 5% 血清于室温下封闭 40 min,分别加入 NOD1 和 NOD2 的单抗进行孵育,置于 4 °C 条件下过夜。复温后加入二抗,37 °C 孵育 30 min,PBS 清洗后加入 SP 进行 40 min 恒温反应,显色后使用中性树脂封片。显微镜下可见细胞内的棕黄色颗粒,即为 NOD1 和 NOD2 阳性表达。随机选择显微镜下的 6 个高倍视野($\times 40$),计算平均光密度(mean optical density,MOD),MOD=累计光密度/面积。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测 NOD1 和 NOD2 的 mRNA 表达水平

以 Trizol 法提取总 RNA,再将 RNA 逆转录合成 cDNA,最后以 β -actin 为内参进行实时荧光定量 PCR。NOD1 上游引物:5'-AAG CAT TTC TGC TAC CCG GAG-3';下游引物:5'-AAG CAT TTC TGC TAC CCG GAG-3'。NOD2 上游引物:5'-CCG TGT CCT GTT AAC CTT TG-3';下游引物:5'-AGG ATC AGC AGG TAC ATG TC-3'。内参上游引物:5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3';下游引物:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算目的基因 mRNA 的相对表达水平。

1.3.3 Western blot 检测 caspase-3 和 NF- κ B 的表达水平

将标本在冰上裂解 2 h 后离心,使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,将样本蛋白浓度调整至 30 μ g/ μ L。蛋白样本电泳后转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,按照 1:1 000 加入一抗和二抗。样本进行 ECL 显色后,使用 Bio-Pro 凝胶分析仪和 Quantity-one 软件进行灰度扫描,得出各条带蛋白表达水平。

1.4 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料以百分率表示,两组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料比较

两组患者一般临床资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

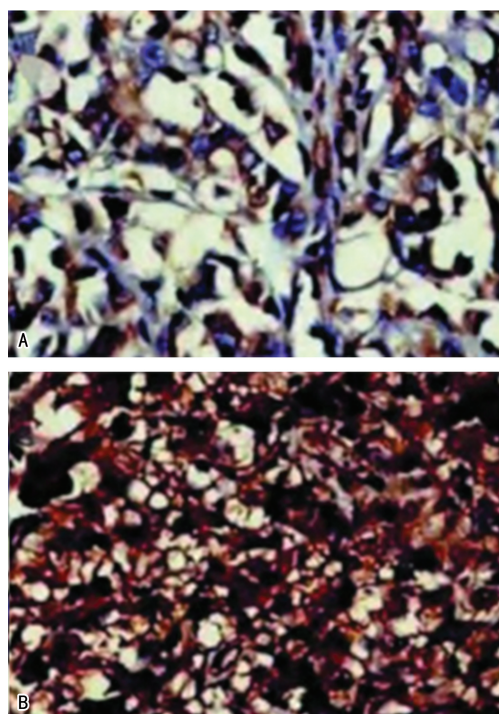
表 1 一般临床资料比较

项目	Hp 阴性胃癌组 ($n=41$)	Hp 阳性胃癌组 ($n=83$)	t/χ^2	P
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	57.24 \pm 6.36	58.15 \pm 6.79	-0.717	0.475
性别(男/女, n/n)	26/15	47/36	0.522	0.470
吸烟(是/否, n/n)	12/29	32/51	1.034	0.309
饮酒(是/否, n/n)	15/26	35/48	0.356	0.551
肿瘤部位(n)			0.516	0.773
贲门癌	14	27		
非贲门癌	27	55		
混合型	0	1		

2.2 Hp 阴性胃癌组和 Hp 阳性胃癌组 NOD1、NOD2 蛋白的表达水平比较

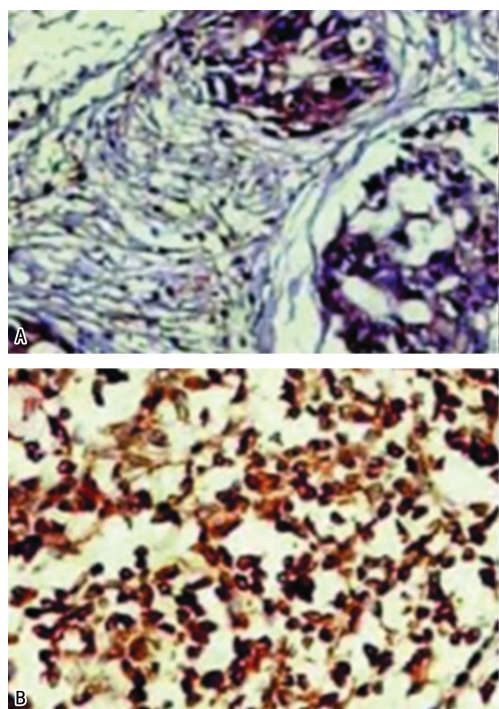
Hp 阴性胃癌组和 Hp 阳性胃癌组 NOD1、NOD2 蛋白的免疫组织化学染色强度差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 1、2;经光密度检测, Hp 阴性胃癌组和 Hp 阳性胃癌组 NOD1、NOD2 蛋白表达水平差异

均有统计学意义($P < 0.05$),其中 Hp 阳性胃癌组中 NOD1 和 NOD2 蛋白均呈高表达,见表 2。



A: Hp 阴性胃癌($\times 400$); B: Hp 阳性胃癌($\times 400$)。

图 1 NOD1 蛋白在胃癌组织中的表达



A: Hp 阴性胃癌($\times 400$); B: Hp 阳性胃癌($\times 400$)。

图 2 NOD2 蛋白在胃癌组织中的表达

2.3 Hp 阴性胃癌组和 Hp 阳性胃癌组 NOD1、NOD2 mRNA 的表达水平比较

Hp 阴性胃癌组和 Hp 阳性胃癌组 NOD1、NOD2 mRNA 的表达水平差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中 Hp 阳性胃癌组 NOD1 和 NOD2 mRNA 均呈高

表达,见表 3。

表 2 NOD1 和 NOD2 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

项目	Hp 阴性胃癌组 (n=41)	Hp 阳性胃癌组 (n=83)	t	P
NOD1 蛋白	0.77±0.08	1.62±0.15	-33.932	<0.001
NOD2 蛋白	0.61±0.05	1.27±0.09	-43.686	<0.001

表 3 NOD1 和 NOD2 mRNA 的表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

项目	Hp 阴性胃癌组 (n=41)	Hp 阳性胃癌组 (n=83)	t/ χ^2	P
NOD1 mRNA	0.83±0.05	1.50±0.09	-44.348	<0.001
NOD2 mRNA	0.74±0.05	1.16±0.08	-30.745	<0.001

2.4 Hp 阳性的早期和中晚期胃癌 caspase-3、NF- κ B 的表达水平比较

Hp 阳性的早期和中晚期胃癌组间 caspase-3、NF- κ B 的表达水平差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中中晚期胃癌组 caspase-3 和 NF- κ B 的表达水平均高于早期胃癌组,见图 3 和表 4。

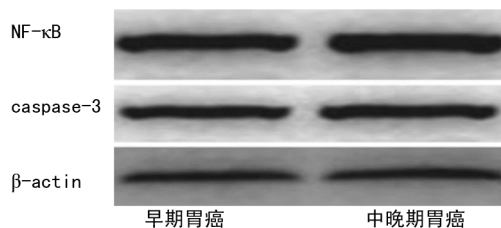


图 3 Hp 阳性早期和中晚期胃癌组 caspase-3 和 NF- κ B 的表达水平

表 4 caspase-3 和 NF- κ B 的表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

项目	Hp 阳性早期胃癌组 (n=29)	Hp 阳性中晚期胃癌组 (n=54)	t	P
caspase-3	0.81±0.08	1.19±0.10	-17.640	<0.001
NF- κ B	0.66±0.07	0.97±0.11	-13.745	<0.001

3 讨论

流行病学研究表明,胃癌与 Hp 感染有很强的相关性,早在 1994 年 WHO 已将 Hp 列为胃癌的 I 类致癌因子^[5-6]。我国 Hp 感染率超过 50%,这也是中国胃癌发生率和死亡率较高的重要原因。目前关于 Hp 感染的致病机制主要有以下几种学说,即基因学说、促胃液素联系学说、漏顶学说和免疫学说,其中免疫学说越来越为人们所关注。该观点认为 Hp 长期定植于胃黏膜表面,可通过黏附作用和产生多种毒力因子对胃黏膜细胞造成直接损伤^[7]。此外,机体对 Hp 的炎性反应而导致的组织损伤也是胃溃疡、慢性胃

炎、胃癌及胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤发生的原因之一。Hp 感染后机体免疫系统被激活,单核细胞和中性粒细胞可诱导产生一氧化氮(NO)、白细胞介素(IL)-2、IL-6 及氧自由基,进而导致炎症损伤^[8]。

大多数感染 Hp 的患者表现为胃炎,只有少部分患者发展为胃癌,这其中宿主免疫应答对 Hp 的感染结局至关重要^[9]。Hp 通过激活识别病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)的受体来触发炎症,而这些 PAMPs 是通过一组生殖系编码的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别的。PRRs 的激活可诱导一系列促炎细胞因子的表达迅速增加,其在先天和获得性免疫反应中均发挥着重要作用。NOD1 和 NOD2 是一类位于细胞质中的 PRRs,它们的分子结构包括 1 个中心节点、1 个 N 端效应器结合结构域和 1 个由富含亮氨酸重复序列组成的 C 端配体识别结构域。NOD1 可识别主要存在于革兰阴性细菌中的神经肽,而 NOD2 可识别肽聚糖合成或降解过程中产生的成分^[10]。目前已有研究^[11]表明,NOD1 和 NOD2 可通过激活 NF- κ B、STAT1 等转录因子,在炎症相关肿瘤的发生发展中发挥重要作用。NF- κ B 是一种具有多向调节作用的核蛋白因子,参与机体氧化应激、炎症及细胞增殖等病理生理过程,被激活后可活化效应性 caspase-3,参与调控凋亡基因的转录,最终导致细胞核 DNA 链断裂和细胞凋亡^[12]。

本研究发现 Hp 阴性和 Hp 阳性胃癌患者一般临床资料无明显差异,具有可比性;NOD1 和 NOD2 在 Hp 阳性胃癌标本中蛋白和 mRNA 的表达水平均高于 Hp 阴性胃癌标本,表明 NOD1 和 NOD2 在 Hp 阳性胃癌的发生过程中发挥重要抑制作用。Hp 阳性中晚期胃癌标本中 NF- κ B 和 caspase-3 的表达水平高于 Hp 阳性早期胃癌标本,表明随着胃癌的发展 NF- κ B 通路和 caspase-3 的活化增强,NOD1 和 NOD2 所发挥的凋亡效应也随之增强。有报道^[13]指出,中国汉族人群 NOD1 的基因多态性与胃癌发生相关。另有动物研究^[14]发现,NOD1 缺陷的小鼠更容易受到具有功能型 IV 分泌系统的 HP 菌株感染,在野生型小鼠中, Hp 感染后 NOD1 信号通路被激活,致使 IL-1 β 的表达增加,而 IL-1 β 可诱导和放大天然及适应性免疫反应,这进一步证实了 NOD1 与 Hp 感染相关性胃病发生发展的相关性。有研究^[15]表明,在慢性萎缩性胃炎-胃黏膜肠上皮化生及不典型增生-胃癌这一病理进展过程中,NOD2 的表达率和表达强度逐渐升高,推测 NOD2 与胃癌的发生发展存在联系,并可在一定程

度上作为诊断疾病的参考指标。

综上所述,NOD1 和 NOD2 通过激活 NF- κ B 通路进而活化凋亡因子 caspase-3,最终诱导肿瘤细胞的凋亡,在 Hp 阳性胃癌的发生发展过程中发挥着一定作用,但具体作用机制还有待进一步阐明。胃黏膜组织中 NOD1 和 NOD2 的表达增加,可在一定程度上提示 Hp 阳性胃癌的发生及发展程度,此外检测 NF- κ B 和 caspase-3 的表达水平也可为临床诊断提供重要的参考信息。

参考文献

- [1] LI M, WAN X, WANG Y, et al. Time trends of esophageal and gastric cancer mortality in China, 1991 - 2009: an age-period-cohort analysis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6797.
- [2] 周法庭, 朱红玲, 朱华, 等. 幽门螺杆菌诱导胃癌细胞上皮-间充质转化的研究 [J]. *重庆医学*, 2018, 47(27): 3485-3489.
- [3] ASANO N, IMATANI A, WATANABE T, et al. Cdx2 expression and intestinal metaplasia induced by h. pylori infection of gastric cells is regulated by nod1-mediated innate immune responses [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(5): 1135-1145.
- [4] VIRGILIO E, GIARNIERI E, GIOVAGNOLI M R, et al. Early gastric cancer exfoliating into gastric lavage (GL1 EGC) shows a more aggressive behavior and poorer survival compared to the non-exfoliative counterpart (GL0 EGC) [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(8): 4199-4203.
- [5] BAE S E, CHOI K D, CHOE J, et al. Effect of eradication of helicobacter pylori on gastric cancer prevention in healthy asymptomatic population [J]. *Helicobacter*, 2017, 152(5): 60-61.
- [6] 孙艳珍, 张涛, 陈良荣, 等. 幽门螺杆菌联合 MNU 灌胃法制备 BALC/c 小鼠胃癌模型研究 [J]. *重庆医学*, 2017, 46(20): 2806-2808.
- [7] GENG W, ZHANG H Y. Research on the mechanism of Hp mediated PI3K/AKT/GSK3 β pathways in gastric cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21: 33-37.
- [8] 王金春, 张海莲, 刘军权, 等. Hp 感染胃黏膜 IL-17、TLR2 及 PD-1 表达及意义 [J]. *徐州医学院学报*, 2017, 37(10): 636-641. (下转第 21 页)

- [8] GALVÁN J M, RAJAS O, ASPA J. Review of non-bacterial infections in respiratory medicine: viral pneumonia[J]. Arch Bronconeumol, 2015, 51(11):590-597.
- [9] CROTTY M P, MEYERS S, HAMPTON N, et al. Epidemiology, co-infections, and outcomes of viral pneumonia in adults: an observational cohort study[J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(50):e2332.
- [10] 袁冕, 杨彦环. 磷酸奥司他韦颗粒治疗儿童病毒性肺炎的疗效观察[J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(8):1043-1044, 1047.
- [11] 袁向尚, 王晓东. 奥司他韦联合炎琥宁治疗小儿病毒性肺炎的临床疗效[J]. 临床合理用药杂志, 2016, 9(12):47-48.
- [12] 余霞. 磷酸奥司他韦胶囊治疗成人病毒性肺炎 52 例临床观察[J]. 医药前沿, 2018, 8(13):218-219.
- [13] 王晓红, 林燕, 胡丹, 等. 奥司他韦联合炎琥宁在小儿病毒性肺炎中的应用[J]. 河北医学, 2017, 23(4):535-539.
- [14] 罗伟. 热毒宁注射液联合磷酸奥司他韦治疗儿童病毒性肺炎的临床研究[J]. 中国社区医师, 2017, 33(30):110-111.
- [15] 宋宏玲. 异丙托溴胺联合布地奈德雾化吸入对病毒性肺炎患儿血清免疫球蛋白、T 淋巴细胞和炎性因子的影响[J]. 河北医药, 2016, 38(13):1946-1949.
- [16] 沈林. 白细胞、C 反应蛋白和免疫球蛋白检测在小儿肺炎中的运用分析[J]. 中国医药指南, 2017, 15(7):159-160.
- [17] 杨煜峰. 感染性肺炎患者血清白细胞介素-5 和免疫球蛋白检测结果分析[J]. 包头医学院学报, 2016, 32(6):66-67.
- [18] 彭思璐, 刘冰, 罗大勇, 等. 慢性乙型肝炎患者感染病原菌分布与 Notch 信号通路蛋白异常研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(3):543-545.
- [19] 杜许芳, 周炯英. Th17/Treg 失衡在肺炎支原体肺炎患儿中的作用及其机制[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(12):2017-2021.
- [20] 董广通, 张知云, 祁鑫, 等. 养阴清肺方调控放射性肺炎大鼠外周血 T 细胞 Notch1, Jagged1 信号通路[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24):121-127.

(收稿日期:2020-02-17 修回日期:2020-10-02)

(上接第 16 页)

- [9] 李光艳, 薛明辉, 张兰芳, 等. 胃癌组织中 IFN- γ 、IL-4、SOX-2 蛋白的表达特点及与 Hp 感染的相关性[J]. 实验与检验医学, 2019, 37(3):430-432.
- [10] BRYANT A H, BEVAN R J, SPENCER-HARTY S, et al. Expression and function of NOD-like receptors by human term gestation-associated tissues[J]. Placenta, 2017, 58:25-32.
- [11] ZHE X L, YU M W, FU B T, et al. NOD1 and NOD2 genetic variants in association with risk of gastric cancer and its precursors in a Chinese population [J]. PLoS One, 2015, 10(5):e0124949.
- [12] GU J, LIU G, XING J, et al. Fecal bacteria from Crohn's disease patients more potently activated NOD-like receptors and Toll-like receptors in macrophages, in an IL-4-repressible fashion [J]. Microb Pathog, 2018, 121:40-44.
- [13] 路滢, 徐耀初, 沈洪兵. NOD1 和 NOD2 基因多态性与胃癌遗传易感性的研究 [J]. 中华疾病控制杂志, 2011, 15(9):735-739.
- [14] DEWOLF S E, SHIGEOKA A A, SCHEINOK A, et al. Expression of TLR2, NOD1, and NOD2 and the NLRP3 inflammasome in renal tubular epithelial cells of male versus female mice [J]. Nephron, 2017, 137(1):68-76.
- [15] AMIRI R M, TEHRANI M, TAGHI-ZADEH S, et al. Association of nucleotide-binding oligomerization domain receptors with peptic ulcer and gastric cancer[J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2016, 15(5):355-362.

(收稿日期:2020-02-14 修回日期:2020-08-09)