

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.04.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220130.1309.003.html\(2022-01-30\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220130.1309.003.html(2022-01-30))

NOD1 基因在 Hp 感染小鼠炎性反应及免疫功能的作用*

王 剑,贾纯亮,梁 磊,张 磊,李翰嵩,刘远廷

(河北省唐山市人民医院胃肠外科 063000)

[摘要] **目的** 探讨核苷酸结合寡聚化结构域 1(NOD1)基因对幽门螺杆菌(Hp)感染小鼠炎性反应及免疫功能的作用。**方法** 将 80 只 C57BL/6 小鼠随机分为对照组和感染组,分别给予磷酸盐缓冲液(PBS)和 Hp 灌胃,间隔 48 h 灌胃 1 次,共 5 次;末次灌胃后 24 h,快速尿素酶试验鉴定是否感染成功,不同时间点处死小鼠,无菌获取胃组织、脾脏组织及血液,苏木素-伊红(HE)染色法鉴定感染小鼠胃组织炎症程度的变化;PCR 检测小鼠胃组织中 NOD1、受体相互作用蛋白 2(RIP2)mRNA 的表达;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清干扰素诱导蛋白 10(IP-10)、干扰素 β (IFN- β)水平;Western blot 检测胃组织细胞核中核因子 κ B(NF- κ B)p65 表达水平;流式细胞技术分析 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞百分比。**结果** 感染组小鼠均 Hp 感染阳性。与对照组比较,感染组小鼠胃组织腺体结构破坏、减少、萎缩,肌层间质出现炎性细胞;胃组织中 NOD1、RIP2 mRNA 表达水平,细胞核中 NF- κ B p65 表达水平在 Hp 感染 48、72、120 h 后明显升高($P < 0.05$),NOD1 mRNA 表达水平在 Hp 感染 48 h 后达到峰值,RIP2 mRNA 表达水平在 Hp 感染 120 h 后达到峰值,细胞核中 NF- κ B p65 表达水平在 Hp 感染 72 h 后达到峰值;血清 IP-10、IFN- β 水平在感染 8、12、16 周后明显升高($P < 0.05$),Hp 感染 16 周后达到峰值;小鼠脾脏组织 CD4⁺ T 淋巴细胞百分比在感染 12、16 周后明显降低($P < 0.05$),Hp 感染 12 周后最低,CD8⁺ T 淋巴细胞百分比在感染 8、12、16 周后明显升高($P < 0.05$),Hp 感染 12 周后达到峰值。**结论** Hp 感染可以诱导小鼠产生炎性反应,降低其免疫功能,可能与 NOD1 和 NF- κ B 激活有关。

[关键词] 幽门螺杆菌;感染;炎性反应;免疫功能;核苷酸结合寡聚化结构域 1;小鼠**[中图法分类号]** R573 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)04-0557-06

Effect of NOD1 gene on the inflammatory response and immune function in the Hp infected mice*

WANG Jian, JIA Chunliang, LIANG Lei, ZHANG Lei, LI Hansong, LIU Yuanting

(Department of Gastrointestinal Surgery, Tangshan People's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of nucleotide-binding oligomerization domain1 (NOD1) gene on the inflammatory response and immune function of the Helicobacter pylori (Hp) infected mice. **Methods** A total of 80 C57BL/6 mice were randomly divided into the control group and the infection group, and were given phosphate-buffered saline (PBS) and Hp gavage respectively, once every 48 hours, for five times totally. The rapid urease test was used to determine whether the infection was successful at 24 hours after the last intragastric administration. The mice were sacrificed at different time points, and their gastric tissues, spleen tissues and blood specimen were obtained aseptically. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to identify the changes in the degree of inflammation in the gastric tissue of infected mice. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the expression of NOD1 gene and receptor-interacting protein 2 (RIP2) mRNA in the mice gastric tissue. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of serum interferon-inducible protein 10 (IP-10) and interferon β (IFN- β). Western blot was used to detect the nuclear factor kappa-B (NF- κ B) p65 expression in the nucleus of gastric tissue. Flow cytometry was used to analyze the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. **Results** Mice in the infected group were all positive for Hp infection. Compared with the control group, the glandular structures of gastric tissues were destroyed, reduced and atrophied, and inflammatory cells appeared in the muscularis interstitium of the mice in the infected group. The expression levels of NOD1 and RIP2 mRNA in gastric tissue and the expression level of NF- κ B p65

* 基金项目:2020 年度河北省医学科学研究课题计划(20201528)。 作者简介:王剑(1989-),主治医师,硕士,主要从事胃肠肿瘤外科研究。

in the nucleus were significantly increased at 48,72 and 120 hours after Hp infection ($P < 0.05$). The expression level of NOD1 mRNA reached the peak at 48 hours after Hp infection, the expression level of RIP2 mRNA reached the peak at 120 hours after Hp infection, and the expression level of NF- κ B p65 in the nucleus reached the peak at 72 hours after Hp infection. The levels of serum IP-10 and IFN- β were significantly increased at 8,12 and 16 weeks after infection, and peaked at 16 weeks after Hp infection. The percentage of CD4⁺ T lymphocytes in the spleen of mice was significantly decreased after 12 and 16 weeks of infection ($P < 0.05$), and reached the lowest level after 12 weeks of Hp infection. The percentage of CD8⁺ T lymphocytes was significantly increased after 8,12, and 16 weeks of infection ($P < 0.05$), and reached the peak at 12 weeks after Hp infection. **Conclusion** Hp infection can induce inflammatory response in mice and reduce their immune function, which may be related to the activation of NOD1 and NF- κ B.

[Key words] helicobacter pylori; infection; inflammatory reaction; immune function; nucleotide binding oligomerization domain 1; mice

幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, Hp)是一种革兰阴性螺旋形细菌,普遍存在于人的胃黏膜中,可定植于人胃黏膜上皮细胞,据报道全球已有超过一半的人感染 Hp,是功能性消化不良、慢性萎缩性胃炎、肠黏膜肠化生、胃黏膜异常增生和胃癌的主要病因^[1-3]。胃癌是导致癌症相关死亡的主要原因之一, Hp 参与胃癌的发生、发展过程,被 WHO 列为 I 类致癌物^[4]。虽然众多研究表明, Hp 的根除有助于溃疡愈合,可降低胃癌发生风险,延缓淋巴瘤的进程,但到目前为止, Hp 感染的预防及治疗效果仍不理想。因此, Hp 感染对机体炎性反应及免疫功能的作用机制研究具有重要意义。核苷酸结合寡聚化结构域(NOD)样受体(nucleotide binding oligomerization domain like receptor, NLR)是一类重要的细胞质内模式受体,可以识别、结合病原相关分子模式并激活一系列信号通路,诱导机体发生固有免疫应答^[5]。核苷酸结合寡聚化结构域 1(nucleotide binding oligomerization domain 1, NOD1)是 NLR 家族中一个重要的病原模式识别受体,可通过激活转录因子如核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B),在炎症相关肿瘤的发生、发展中发挥重要作用^[6]。本研究拟通过建立正常小鼠经胃感染 Hp 模型,探讨 Hp 感染对小鼠炎性反应及免疫功能的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和实验动物

Hp 菌种购自美国菌种保藏中心(ATCC),编号:700392。80 只无特殊病原体(SPF)级 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,雌雄各半,体重 18~22 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2016-0002。SPF 级环境饲养,温度 20~25 °C,相对湿度 45%~55%,光照周期 12 h,自由饮食、饮水,适应性饲养 1 周。

1.1.2 主要仪器与试剂

反转录 PCR 试剂盒购自美国 Fermentas 公司;小鼠干扰素诱导蛋白 10(interferon-inducible protein

10, IP-10)、小鼠干扰素 β (interferon β , IFN- β)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自深圳欣博生物技术有限公司;兔抗鼠 p65 多克隆抗体、核纤层蛋白 B1(lamin B1)抗体购自美国 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自英国 Abcam 公司;FITC 标记的兔抗鼠 CD4、PE 标记的兔抗鼠 CD8a 购自美国 BD 公司;光学显微镜购自日本 Nikon 公司;核酸蛋白分析仪购自美国 Beckman 公司;PCR 仪购自珠海黑马医学仪器有限公司;凝胶图像分析仪购自美国 Kodak 公司;全自动酶标仪购自芬兰 Lad systems 公司;水平电泳仪、转膜仪购自美国 Bio-rad 公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 Hp 的培养

从液氮中取出 Hp 菌种,立即放入 40 °C 温水中迅速搅拌使其融化,1 000 r/min(离心半径 10 cm)低速离心 2 min,弃上清液,用接种环三线法将 Hp 菌株分离划线于哥伦比亚血琼脂平板,微需氧条件(10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂),37 °C 培养 48 h 复苏 Hp。将复苏的菌种在含万古霉素(Vancomycin, 10 mg/L)、两性霉素 B(Amphotericin B, 10 mg/L)、多粘菌素 B(Polymyxin B, 2 500 U/L)、头孢氨苄-甲氧苄啶(TMP, 5 mg/L)和 7% 脱纤维羊血的哥伦比亚血琼脂平板上分区划线,微需氧环境(10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂),37 °C 培养 48 h。取单菌落进行生化反应、革兰染色和 PCR 扩增鉴定,鉴定为阳性后,用灭菌的生理盐水将 Hp 从血琼脂平板上洗下,调整菌液浓度至 1×10⁹ CFU/mL。

1.2.2 Hp 感染小鼠模型的建立与分组

80 只 C57BL/6 小鼠采用随机数字表法分为对照组和感染组,各 40 只。实验前 24 h 禁食,感染组灌胃 Hp 培养悬液(1×10⁹ CFU/mL,每只 0.5 mL),对照组灌胃等量磷酸盐缓冲液(PBS)。间隔 48 h 灌胃 1 次,共 5 次。实验期间自由饮食、饮水。

1.2.3 Hp 感染鉴定

末次灌胃后 24 h, CO₂ 麻醉处死两组各 5 只小

鼠, 无菌条件下解剖打开小鼠腹腔取出全胃, 沿胃大弯解剖, 用灭菌的 PBS 洗去胃内残留物, 将胃黏膜置于液体尿素酶试剂中进行快速尿素酶试验, 观察 5 min, 如试剂变为红色则表示阳性。

1.2.4 PCR 检测小鼠胃组织中 NOD1 和受体相互作用蛋白 2(RIP2)mRNA 的表达水平

末次灌胃后 24、48、72、120 h 各处死 5 只小鼠, 解剖取其胃组织, 加液氮研磨, TRIzol 法提取小鼠胃组织总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 测定总 RNA 浓度和纯度, 按照 Fermentas RNA PCR (AMV) 试剂盒说明书对 RNA 进行反转录为 cDNA。PCR 反应体系: 25 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 5×PCR 缓冲液 4 μL, 上下游引物各 0.5 μL, 聚合酶 2 μL, cDNA 2 μL, RNase-free H₂O 9 μL; 反应程序: 94 °C, 2 min; 94 °C, 40 s; 50~65 °C, 40 s; 72 °C, 1 min, 30 个循环, 72 °C, 补延伸 5 min, 终止反应。PCR 引物应用 premier 6.0 设计, 序列见表 1。PCR 反应产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 结束后凝胶图像分析系统灰度扫描确定密度积分值。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) 作为内参, 以目的基因产物电泳条带灰度值与内参 GAPDH 条带灰度值的比值来表示目的基因 mRNA 表达水平。

表 1 引物序列

基因	方向	引物序列	产物大小 (bp)
GAPDH	正向	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	127
	反向	5'-TCCACCACCCCTGTTGCTGTA-3'	
NOD1	正向	5'-ACAACAGGCGAACTATCTGCGTCA-3'	221
	反向	5'-TCTTAACCGGAAGTAGGCCGAAG-3'	
RIP2	正向	5'-GGCCATTTGTTGAGACCAGATGA-3'	178
	反向	5'-CGTTTCGTAGCCGTGAAGTTTA-3'	

1.2.5 Western blot 检测小鼠胃组织细胞核中 NF-κB p65 的表达水平

取部分胃组织置于匀浆器中, 加入 400 μL 核蛋白提取液 A 液充分研磨, 冰上作用 15 min, 4 °C 12 000 r/min(离心半径 8 cm) 离心 2 min, 弃上清液, 加 50 μL 核蛋白提取液 B 液, 轻轻吹打以重悬沉淀, 冰上继续作用 20 min, 4 °C 12 000 r/min(离心半径 8 cm) 离心 15 min, 吸取上清液即为细胞核蛋白提取液, 二喹啉甲酸(BCA) 法测定蛋白浓度, 100 °C 使蛋白变性, 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE) 进行电泳, 结束后将蛋白转至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, NF-κB p65 一抗(1:1 000)、Lamin B1 一抗(1:1 000) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 10 min×3 次, 辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000) 37 °C 孵育 2 h, TBST 洗膜 10 min×3 次, 加电化学发光(ECL) 检测的发光液反应, 暗室中曝光显影, 以目蛋白条带灰度值与内参 Lamin B1 条带灰度值的比值来表示目的蛋白相对表达水平,

BandScan 软件进行数据处理。

1.2.6 ELISA 检测小鼠血清 IP-10 及 IFN-β 水平

末次灌胃后 8、12、16 周两组各处死 5 只小鼠, 采集其下腔静脉血, 室温静置 1 h, 3 000 r/min(离心半径 8 cm) 离心 10 min, 上清液即为血清样品, 酶标包被板上设空白孔、标准品孔和待测样品孔, 空白孔不加样品和酶标试剂, 标准品孔加入梯度稀释的标准品, 待测样品孔先加样品稀释液 40 μL, 再加血清样品 10 μL(最终稀释度为 5 倍), 轻轻晃动混匀, 封板膜封板, 37 °C 孵育 30 min, 洗涤液清洗 5 次, 吸水纸上拍干, 除空白孔外每孔加 50 μL 酶标试剂, 封板膜封板, 37 °C 孵育 1 h, 洗涤液清洗 5 次, 吸水纸上拍干, 每孔加入 100 μL 显色液 TMB 轻轻震荡混匀, 37 °C 避光显色 20 min, 待标准品孔前 5 孔出现明显的颜色梯度变化时, 每孔加 50 μL 终止液终止反应, 15 min 内以空白孔调零, 450 nm 波长测量各孔的吸光度值(A 值), 以标准品的浓度为横坐标, A 值为纵坐标, 使用 CurveExpert 软件绘制标准曲线, 计算出样品浓度。

1.2.7 苏木素-伊红(HE) 染色镜检小鼠胃黏膜组织的病变程度

取灌胃 Hp 后第 8、12、16 周小鼠部分胃组织, 10% 中性甲醛固定, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片机切片厚度为 4 μm, 二甲苯、乙醇脱蜡、水化, HE 染色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶加盖玻片封片, 显微镜下观察胃黏膜炎症情况并拍照保存结果, 胃组织病理改变情况参照 Miyashita 标准进行评分^[7]。

1.2.8 流式细胞技术分析 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞比例

取灌胃 Hp 后第 8、12、16 周小鼠脾脏组织, 用手术剪剪碎, 70 μm 筛网过滤后加入预冷的 PBS 混匀, 1 500 r/min(离心半径 8 cm) 离心 10 min, 弃上清液, 加入 2 mL 红细胞裂解液充分混匀, 避光裂解 10 min, 1 500 r/min(离心半径 8 cm) 4 °C 离心 5 min, 弃上清液, PBS 洗涤后重悬细胞, 调整细胞浓度至 1×10⁶/mL, 取 300 μL 细胞悬液至流式管, 将 FITC 标记的兔抗鼠 CD4、PE 标记的兔抗鼠 CD8 加入管中混合均匀, 同时设置不加抗体的空白对照组, 4 °C 避光反应 0.5 h, 1 500 r/min(离心半径 8 cm) 4 °C 离心 5 min, 弃上清液, PBS 洗涤后加入 200 μL PBS 将其重悬, 上机检测, CellQuest 软件分析数据并计算 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞百分比。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步组间两两比较采用 LSD-t 检验, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Hp 感染结果

对照组 5 只小鼠胃黏膜快速尿素酶试验均为阴

性,感染率为0;感染组5只小鼠胃黏膜快速尿素酶试验均为阳性,感染率为100%。

2.2 各组小鼠胃组织中 NOD1、RIP2 mRNA 表达水平

Hp 感染 24 h 后,与对照组比较,感染组小鼠胃组织 NOD1 mRNA 表达水平无明显变化($P > 0.05$),RIP2 mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$);Hp 感染

48、72、120 h 后,与对照组比较,感染组胃组织 NOD1、RIP2 mRNA 表达水平均明显升高($P < 0.05$);对照组 NOD1、RIP2 mRNA 表达水平随感染时间增加无明显变化,感染组 NOD1 mRNA、RIP2 mRNA 表达水平随感染时间增加先升高后降低,其中 NOD1 mRNA 在 Hp 感染 48 h 后表达水平最高,RIP2 mRNA 在 Hp 感染 72 h 后表达水平最高,见表 2,图 1。

表 2 各组小鼠胃组织中 NOD1、RIP2 mRNA 表达水平比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

时间	NOD1 mRNA		RIP2 mRNA	
	对照组	感染组	对照组	感染组
24 h	0.20±0.02	0.25±0.04	0.39±0.04	0.59±0.07 ^a
48 h	0.21±0.03	1.05±0.07 ^{ab}	0.40±0.04	1.01±0.10 ^{ab}
72 h	0.23±0.03	0.68±0.06 ^{abc}	0.38±0.03	1.18±0.11 ^{abc}
120 h	0.24±0.02	0.59±0.05 ^{abcd}	0.37±0.04	0.87±0.08 ^{abcd}
F	2.564	171.574	0.585	37.300
P	0.091	<0.001	0.634	<0.001

^a: $P < 0.05$,与相同时间对照组比较;^b: $P < 0.05$,与 Hp 感染 24 h 比较;^c: $P < 0.05$,与 Hp 感染 48 h 比较;^d: $P < 0.05$,与 Hp 感染 72 h 比较。

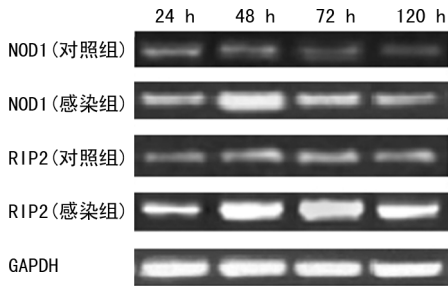


图 1 各组小鼠胃组织中 NOD1、RIP2 mRNA 的表达

2.3 各组小鼠胃组织细胞核中 NF-κB p65 表达水平

Hp 感染 24、48、72、120 h 后,与对照组比较,感染组小鼠胃组织细胞核中 NF-κB p65 表达水平明显升高($P < 0.05$);对照组小鼠胃组织细胞核中 NF-κB p65 表达水平随感染时间增加无明显变化,感染组小鼠胃组织细胞核中 NF-κB p65 表达水平随感染时间增加先升高后降低,在 Hp 感染 72 h 后表达水平最高,见表 3,图 2。

表 3 各组小鼠胃组织细胞核中 NF-κB p65 表达水平比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	120 h
对照组	0.17±0.02	0.16±0.04	0.15±0.03	0.13±0.03
感染组	0.25±0.04	0.87±0.07 ^a	1.19±0.06 ^{ab}	0.94±0.08 ^{abc}
t	4.000	19.692	34.667	21.199
P	0.004	<0.001	<0.001	<0.001

^a: $P < 0.05$,与 Hp 感染 24 h 比较;^b: $P < 0.05$,与 Hp 感染 48 h 比较;^c: $P < 0.05$,与 Hp 感染 72 h 比较。

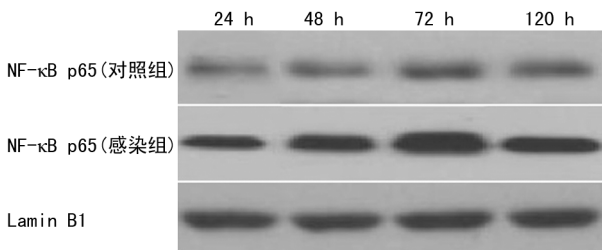


图 2 各组小鼠胃组织细胞核中 NF-κB p65 的表达

2.4 各组小鼠血清 IP-10、IFN-β 水平

Hp 感染 8、12、16 周后,与对照组比较,感染组小鼠血清 IP-10、IFN-β 水平明显升高($P < 0.05$);感染组小鼠血清 IP-10、IFN-β 水平随感染时间增加逐渐升

高,在 Hp 感染 16 周后最高,见表 4。

表 4 各组小鼠血清中 IP-10、IFN-β 水平 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	IP-10(ng/mL)	IFN-β(pg/mL)
对照组	27.41±8.52	10.54±4.61
感染组(8周)	58.63±10.37 ^a	26.37±5.25 ^a
感染组(12周)	108.97±11.21 ^{ab}	52.68±3.94 ^{ab}
感染组(16周)	164.15±12.46 ^{abc}	64.79±6.82 ^{abc}
F	314.473	220.832
P	<0.001	<0.001

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与感染组(8周)比较;^c: $P < 0.05$,与感染组(12周)比较。

2.5 HE染色观察小鼠胃黏膜组织病理变化

HE染色结果显示,对照组小鼠胃黏膜上皮结构完整,排列整齐,可见黏液细胞,无明显炎症损伤;Hp感染8、12和16周后,小鼠胃组织腺体结构破坏、减少、萎缩,肌层间质出现炎性细胞浸润,随着时间延长,胃黏膜病理损伤逐渐加重,见图3。感染8、12、16周后小鼠胃黏膜组织病理损伤评分分别为(2.31±0.21)、(3.68±0.35)、(4.73±0.37)分,差异有统计学意义($F=72.783, P<0.001$),且各组间两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.6 各组小鼠脾脏组织CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分比

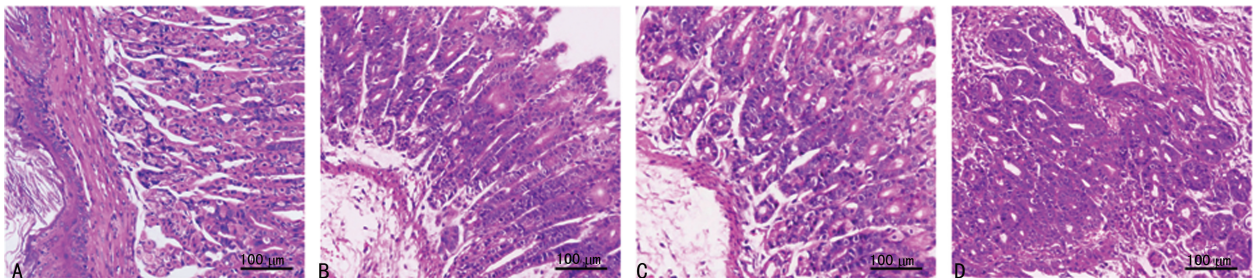
Hp感染8周后,与对照组比较,感染组小鼠脾脏组织CD4⁺T淋巴细胞百分比无明显变化($P>0.05$),CD8⁺T淋巴细胞百分比明显升高($P<0.05$);Hp感染12、16周后,与对照组比较,感染组小鼠脾脏组织CD4⁺T淋巴细胞百分比明显降低($P<0.05$),

CD8⁺T淋巴细胞百分比明显升高($P<0.05$);小鼠脾脏组织CD4⁺T淋巴细胞百分比随感染时间增加先降低后升高,在Hp感染12周后最低;小鼠脾脏组织CD8⁺T淋巴细胞百分比随感染时间增加先升高后降低,在Hp感染12周后最高,见表5,图4。

表5 各组小鼠脾脏组织CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分比($n=5, \bar{x} \pm s, \%$)

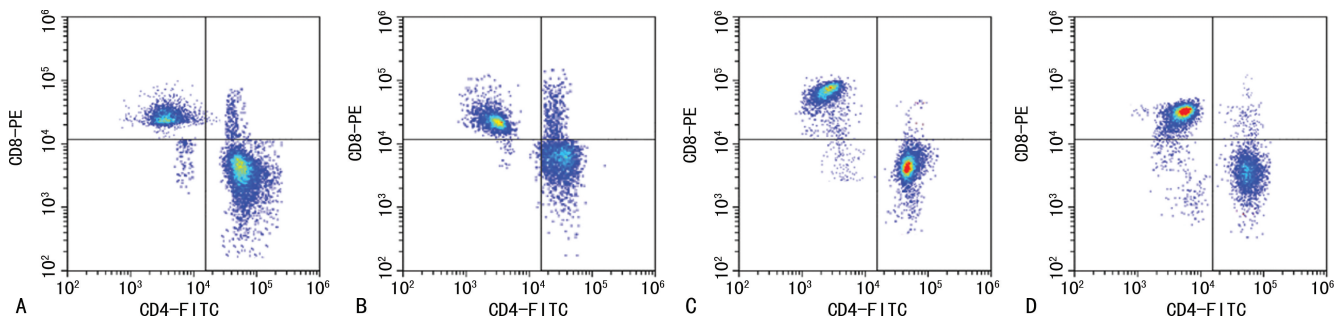
组别	CD4 ⁺ T淋巴细胞	CD8 ⁺ T淋巴细胞
对照组	62.41±5.53	25.46±2.96
感染组(8周)	54.34±6.12	32.37±3.82 ^a
感染组(12周)	41.37±4.25 ^{ab}	38.69±3.94 ^{ab}
感染组(16周)	49.78±3.97 ^{abc}	33.25±3.27 ^{abc}
F	14.746	11.895
P	<0.001	<0.001

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与感染组(8周)比较;^c: $P<0.05$,与感染组(12周)比较。



A:对照组;B:Hp感染8周;C:Hp感染12周;D:Hp感染16周。

图3 各组小鼠胃黏膜组织病理学变化(HE染色,×200)



A:对照组;B:Hp感染8周;C:Hp感染12周;D:Hp感染16周。

图4 小鼠脾脏组织CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分比

3 讨论

胃癌是消化系统常见恶性肿瘤之一,据WHO统计,全世界胃癌患者约106.4万,死亡人数约78.3万,且均呈上升趋势,其中死亡人数约占癌症死亡总数的8.2%,病死率仅次于肺癌,居第2位^[8]。胃癌产生的危险因素包括Hp感染、年龄、高盐摄入等,由内镜活检后组织学诊断,CT、内镜超声及腹腔镜等进行分期,是一种分子和表型高度异质的疾病^[9]。胃癌的发病机制主要是原癌基因和抑癌基因的遗传及表观遗传学改变积累导致多种信号通路失调,从而打破细胞周期、细胞增殖与凋亡之间的平衡^[10]。目前,手术

是胃癌唯一的根治性治疗手段,随着外科手术、放疗、化疗的进步和新辅助疗法的实施,早期胃癌的5年生存率可达到95%以上,晚期胃癌主要采用新辅助化疗、分子靶向治疗和免疫治疗的联合治疗方案^[11]。分子靶向治疗是以肿瘤细胞过度表达的分子作为靶点,选择特异性阻断剂,对其进行有效控制,抑制肿瘤生长、转移和复发^[12]。分子靶向治疗联合胃癌传统治疗效果显著,且毒副作用少。因此,研究胃癌的分子发病机制,寻找有效的新分子靶标对提高治疗效果具有重要意义。

Hp感染是导致十二指肠溃疡、胃癌及其他类型

胃和胃外疾病的主要致病因素,占肠道型胃癌病例的近 60%^[13-14]。SAYED 等^[15]研究发现, Hp 感染下调 Nei 样 DNA 糖基化酶 2, 导致基因组损伤增加, 胃上皮细胞炎症反应放大并引发胃癌。LV 等^[16]研究显示, Hp 感染诱导胃上皮细胞表达基质金属蛋白酶-10, 可促进胃细菌定植和胃炎。SEMPER 等^[17]研究表明, Hp 诱导白细胞介素(IL)-18 以 NF- κ B 依赖性方式抑制 β -防御素 1 的表达, 导致更多的细菌定植, 同时炎症小体活化增强中性粒细胞浸润, 从而导致炎症。本研究结果显示, 正常小鼠经 Hp 感染后, 胃组织腺体结构破坏、减少、萎缩, 肌层间质出现炎症细胞浸润, 血清 IP-10、IFN- β 水平升高, 脾脏组织 CD4⁺ 淋巴细胞百分比降低, CD8⁺ T 淋巴细胞百分比升高, 提示 Hp 感染诱导小鼠产生炎症反应, 降低其免疫功能。

NOD1 主要表达于抗原呈递细胞和胃上皮细胞, 此外在部分胃肠道细胞系中也有表达, 在宿主防御病原体发生固有免疫应答中发挥重要作用。NOD1 可以识别并结合革兰阴性细菌肽聚糖的保守结构, 通过半胱天冬酶活化募集结构域发出信号后与接头蛋白 RIP2 相互作用^[18]。NOD1/RIP2 激活转录因子 NF- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶, 产生促炎性细胞因子及趋化因子^[19]。ASANO 等^[20]研究发现, Hp 感染通过 NOD1 介导的天然免疫反应调控尾型同源盒转录因子 2 的表达, 引起肠上皮化生。TRAN 等^[21]研究表明, Hp 通过激活 NOD1 和其配体相互作用的丝氨酸-苏氨酸激酶 2 信号, 诱导 IL-33 反应。本研究结果显示, Hp 感染组小鼠胃组织 NOD1、RIP2 mRNA 表达明显上调, 细胞核 NF- κ B p65 表达水平升高, 提示 Hp 感染可以调控 NOD1 基因及下游相关分子的表达。

综上所述, NOD1 及 NF- κ B 的激活, 可能参与 Hp 感染诱导小鼠产生炎症反应, 致其免疫功能下降, 为 Hp 感染导致胃癌的分子靶向治疗提供了理论依据。

参考文献

- [1] SGAMBATO D, MIRANDA A, ROMANO L, et al. Gut microbiota and gastric disease[J]. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2017, 63(4): 345-354.
- [2] O'BRIEN V P, KOEHNE A L, DUBRULLE J, et al. Sustained *Helicobacter pylori* infection accelerates gastric dysplasia in a mouse model[J]. *Life Sci Alliance*, 2020, 4(2): 202000967.
- [3] MUZAHEED. *Helicobacter pylori* oncogenicity: mechanism, prevention, and risk factors[J]. *The Scientific World J*, 2020, 2020: 3018326.
- [4] LEE M H, YANG J Y, CHO Y, et al. Inhibitory effects of menadione on *helicobacter pylori* growth and *helicobacter pylori*-Induced inflammation via NF- κ B inhibition[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1169.
- [5] 章旭之, 马毅. NOD 样受体在免疫耐受中的作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(6): 930-933.
- [6] LI Z X, WANG Y M, TANG F B, 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.
- [7] MIYASHITA M, JOH T, WATANABE K, et al. Immune responses in mice to intranasal and intracutaneous administration of a DNA vaccine encoding *Helicobacter pylori*-catalase[J]. *Vaccine*, 2002, 20(17/18): 2336-2342.
- [8] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [9] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, et al. Gastric cancer[J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-648.
- [10] ZHANG X, QIN Y, PAN Z, et al. Cannabidiol induces cell cycle arrest and cell apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(8): 302.
- [11] SONG Z, WU Y, YANG J, et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(7): 1010428317714626.
- [12] LI T, GUO H, ZHAO X, et al. Gastric cancer cell proliferation and survival is enabled by a cyclophilin B/STAT3/miR-520d-5p signaling feedback loop[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(5): 1227-1240.
- [13] FISCHBACH W, MALFERTHEINER P. *Helicobacter pylori* infection[J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2018, 115(25): 429-436.
- [14] CHMIELA M, KARWOWSKA Z, GONCIARZ W, et al. Host pathogen interactions in *Helicobacter pylori* related gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(9): 1521-1540.
- [15] SAYED I M, SAHAN A Z, VENKOVA T, et al. *Helicobacter pylori* infection downregulates the DNA glycosylase NEIL2, resulting in increased genome damage and inflammation in gastric epithelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(32): 11082-11098. (下转第 568 页)

- 腿综合征诊治的研究进展[J]. 中华肾脏病杂志, 2018,34(4):310-314.
- [19] GADE K, BLASCHKE S, RODENBECK A, et al. Uremic restless legs syndrome (RLS) and sleep quality in patients with end-stage renal disease on hemodialysis; potential role of homocysteine and parathyroid hormone[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2013,37(4/5):458-463.
- [20] STEFANIDIS I, VAINAS A, DARDIOTIS E, et al. Restless legs syndrome in hemodialysis patients: an epidemiologic survey in Greece[J]. *Sleep Med*, 2013,14(12):1381-1386.
- [21] 肖成根, 梁馨苓, 李锐钊, 等. 维持性血液透析患者不宁腿综合征的横断面研究[J]. *中华内科杂志*, 2013,52(8):672-674.
- [22] JABER B L, SCHILLER B, BURKART J M, et al. Impact of short daily hemodialysis on restless legs symptoms and sleep disturbances[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011,6(5):1049-1056.
- [23] KUTNER N G, ZHANG R, SZCZECH L A, et al. Restless legs syndrome reported by incident haemodialysis patients: is treatment time of day relevant? [J]. *Nephrology*, 2012, 17(8): 783-784.
- [24] 孙蕾, 王惠新, 高珺, 等. 高通量血液透析联合血液灌流对尿毒症并发症疗效观察[J]. *当代护士(学术版)*, 2012,19(4):115-117.
- [25] 金勇, 陈朝霞. 血液透析滤过联合血液灌流治疗尿毒症血液透析患者不安腿综合征疗效观察[J]. *中国社区医师*, 2014,30(15):62-63.
- [26] GRANDI F, BOLASCO P, PALLADINO G, et al. Adsorption in extracorporeal blood purification: how to enhance solutes removal beyond diffusion and convection [M/OL]//SUZUKI H. *Hemodialysis*. London: Intech Open. (2012-08-11) [2021-04-11]. <https://www.intechopen.com/chapters/43103>.
- [27] 王志红. 组合型人工肾中血液灌流器卸载方法的改进[J]. *中国社区医师*, 2015, 31(4): 123-124.
- [28] DE SIMONE W, DE SIMONE M, DE SIMONE A, et al. Aspects of the on-line hemodiafiltration with regeneration and reinfusion of the ultrafiltrate (HFR): multicenter study[J]. *G Ital Nefrol*, 2004,21(Suppl 30):S161-167.
- [29] CHEN X, SHEN B, CAO X, et al. Acute effect of one session of hemodiafiltration with endogenous reinfusion on uremic toxins and inflammatory mediators[J]. *Int J Artif Organs*, 2020, 43(7):437-443.
- [30] BALLABENI C, MACCARIO M, CIURLINO D, et al. On-line hemodiafiltration with endogenous reinfusion (HFR) Experience of a Centre [J]. *G Ital Nefrol*, 2004, 21(Suppl 30): S181-184.

(收稿日期:2021-09-29 修回日期:2021-12-29)

(上接第 562 页)

- [16] LV Y P, CHENG P, ZHANG J Y, et al. Helicobacter pylori-induced matrix metalloproteinase-10 promotes gastric bacterial colonization and gastritis[J]. *Sci Adv*, 2019,5(4):eaau6547.
- [17] SEMPER R P, VIETH M, GERHARD M, et al. Helicobacter pylori exploits the NLRC4 inflammasome to dampen host defenses [J]. *J Immunol*, 2019,203(8):2183-2193.
- [18] MAHARANA J, PRADHAN S K, DE S. NOD1/CARD might be using multiple interfaces for RIP2-Mediated CARD-CARD interaction: insights from molecular dynamics simulation [J]. *PLoS One*, 2017,12(1):e0170232.
- [19] SHIN W G, PARK B J, LEE S J, et al. Infection of human intestinal epithelial cells by invasive bacteria activates NF- κ B and increases ICAM-1 expression through NOD1[J]. *Korean J Intern Med*, 2018,33(1):81-90.
- [20] 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.
- [21] TRAN L S, TRAN D, DE PAOLI A, et al. NOD1 is required for Helicobacter pylori induction of IL-33 responses in gastric epithelial cells[J]. *Cell Microbiol*, 2018,20(5):e12826.

(收稿日期:2021-08-30 修回日期:2021-12-08)