

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.18.008

文章编号: 1005-8982(2017)18-0043-04

新进展研究·论著

核苷酸结合寡聚化结构域 1 和 2 基因在 幽门螺杆菌相关胃癌中的表达及意义

王雪纯¹, 张凤芹²

(1. 河北医科大学口腔学院, 河北 石家庄 050011; 2. 河北医科大学
附属哈励逊国际和平医院 病理科, 河北 衡水 053000)

摘要:目的 探讨核苷酸结合寡聚化结构域(NOD)1 和 2 基因在幽门螺杆菌(Hp)相关胃癌患者中的表达变化及意义。**方法** 采用免疫组织化学法检测胃癌患者癌组织中 NOD1 和 NOD2 蛋白的表达;采用实时聚合酶链反应(real-time PCR)检测胃癌组织中 NOD1 和 NOD2 mRNA 的表达;采用 Western blot 检测胃癌组织中凋亡蛋白核转录因子 κ B(NF- κ B)和半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase-3)表达。**结果** 与 Hp 阴性胃癌患者相比, Hp 阳性胃癌患者癌组织中的 NOD1 和 NOD2 蛋白表达含量和 mRNA 表达含量上升; Hp 阳性胃癌患者中的 NF- κ B 和 Caspase-3 蛋白含量升高($P < 0.05$)。**结论** Hp 阳性胃癌患者中的 NOD1 和 NOD2 呈高表达状态;且过表达 NOD1 和 NOD2 可能在 Hp 阳性胃癌发生、发展机制中起重要的作用。

关键词: 幽门螺杆菌;胃癌;核苷酸结合寡聚化结构域;凋亡;免疫组织化学

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Expression and significance of nucleotide binding oligomerization domains 1 and 2 in *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer

Xue-chun Wang¹, Feng-qin Zhang²

(1. School of Stomatology, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China;

2. Department of Pathology, Harrison International Peace Hospital Affiliated

Hebei Medical University, Hengshui, Hebei 053000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of NOD1 and NOD2 in patients with *Helicobacter pylori* (*Hp*) associated gastric cancer. **Methods** Immunohistochemical method was used to detect the expression of NOD1 and NOD2 proteins in patients with *Hp*-associated gastric cancer. The expression of NOD1 and NOD2 mRNA was detected by real-time PCR. Western blot was used to detect the expression of NF- κ B and Caspase-3. **Results** Compared with the control group (patients with *Hp*-negative gastric cancer), the expression of NOD1 and NOD2 protein and mRNA in the patients with *Hp*-positive gastric cancer increased significantly, the levels of NF- κ B and Caspase-3 in the *Hp*-positive gastric cancer patients were increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Compared with the *Hp*-negative gastric cancer, NOD1 and NOD2 are highly expressed in the patients with *Hp*-associated gastric cancer. And NOD1 and NOD2 over-expressions may play important roles in the development and progression of *Hp*-associated gastric cancer.

Keywords: *Helicobacter pylori*; gastric cancer; NOD; apoptosis; immunohistochemistry

胃癌是世界范围内发病率和死亡率较高的恶性肿瘤之一,且发病率与病死率逐渐上升^[1-2]。胃癌的

病因及发病机制尚不明确,主要是饮食、生活习惯、环境和遗传等因素共同作用的结果^[3]。研究表明,

幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, Hp)感染、营养素缺乏、N-亚硝基化合物及饮酒吸烟均是胃癌发病的主要危险因素^[4-5]。目前研究发现,幽门螺杆菌感染不仅取决于其菌株的多样性,而且与感染机体的遗传易感性相关^[6-7]。先天免疫系统核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide-binding oligomerization domain, NOD) 1 和 2 蛋白作为蛋白家族中 2 个重要的成员,通过识别和清除外源性病原微生物、介导天然免疫,是抵御 Hp 感染的第一道防线^[8-9]。NOD1 和 NOD2 的免疫调节作用可能参与 Hp 相关胃癌的发生、发展过程,为研究 NOD1 和 NOD2 在 Hp 相关胃癌发病中的作用,本研究采用免疫组织化学(SP 法)及实时聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)检测患者活检标本中 NOD1 和 NOD2 的表达,探讨 NOD1 和 NOD2 在幽门螺杆菌阳性胃癌组织中的表达及意义。

1 资料与方法

1.1 标本

选取 2015 年 3 月 -2017 年 1 月河北医科大学附属哈励逊临床医院外科收集的 90 例 Hp 阳性的胃癌患者组织学标本为实验组,均经组织病理学确诊。其中,男性 49 例,女性 41 例;年龄 25~72 岁,平均 53 岁。经快速尿素酶试验和 ¹³C 尿素呼气试验均证实患者 Hp 阳性。同时,取 30 例 Hp 阴性胃癌患者的组织标本作为对照组。

1.2 实验材料

小鼠抗人 NOD1、NOD2、肌动蛋白(β -actin)、核转录因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)及天冬氨酸蛋白水解酶 3(cysteiny l aspartate specific proteinase, Caspase-3)单克隆抗体(均购于美国 Santa Cruz 公司),二抗碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG、DAB 染色盒、抗体稀释液及中性树脂(均购于北京中杉金桥有限公司),real-time 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 的蛋白表达水平 取 120 例患者的胃癌病理石蜡标本(Hp 阳性 90 例, Hp 阴性 30 例),分别连续切片 5 张(5 μ m/张)。用 5%血清进行室温封闭 40 min 后,分别加入 1:1 000 的 NOD1 和 NOD2 单克隆抗体孵育,4℃过夜。隔天复温后,加入二抗孵育 37℃ 30 min, PBS 清洗后加入 SP 后进行恒温反应 40 min, 加入

DAB 显色液进行显色,中性树脂封片后用($\times 10$)($\times 40$)显微镜进行观察。阳性表达 NOD1 和 NOD2 的主要表现是棕黄色颗粒在细胞内出现。随机选择 6 个($\times 40$)显微镜下的高倍视野,计算反应组织中 NOD1 和 NOD2 蛋白的表达含量的平均光密度(mean optical density, MOD)。MOD= 累积光密度(IOD)与面积(area)的比值,即 MOD=(IOD SUM)/area。

1.3.2 Real-time PCR 检测 NOD1 和 NOD2 mRNA 表达含量

采用 real-time PCR 对 NOD1 和 NOD2 mRNA 表达进行检测。Trizol 提取胃癌组织中的总 RNA,用 TaKaRa 公司的 Prime Script RT 试剂盒逆转录合成 cDNA 后,用 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行 real-time PCR 操作。实验采用相对定量法,采取循环阈值(cycle threshold, Ct)比较法,计算不同样本之间的相对百分比。NOD1 正向引物:5'-ACAAC AGCGGAAGTCTGCGTCA-3';反向引物:5'-TCTT AACCGGAAGTAGGCGGAAG-3'。NOD2 正向引物:5'-CCGTGTCCTGTAAACCTTTG-3';反向引物:5'-AG GATCAGCAGGTACATGTC-3'。 β -actin 正向引物:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3';反向引物:5'-T CCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。公式: $\Delta \Delta Ct = (Ct_{\text{实验组}} - Ct_{\text{实验组管家基因}}) - (Ct_{\text{对照组}} - Ct_{\text{对照组管家基因}})$;目的 mRNA 的量 = $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 。

1.3.3 蛋白质印迹法检测凋亡蛋白 Caspase-3 和 NF- κ B

取组织冰上裂解 2 h,离心后用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度检测,将各组蛋白浓度总量调整为 30 μ g/ μ l。将各组蛋白样品加入到 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,转膜至 PVDF 膜后按 1:1 000 的稀释比例加入一抗和二抗。用 ECL 显色剂显色,用 Bio-Pro 凝胶成像分析仪成像以及用 Quantity-one 软件对各泳道条带进行灰度扫描得出相应蛋白表达量。

1.4 统计学方法

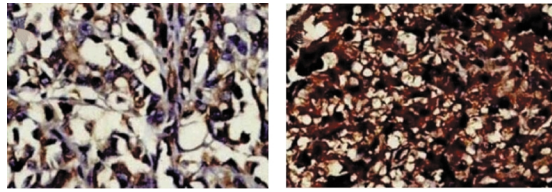
数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

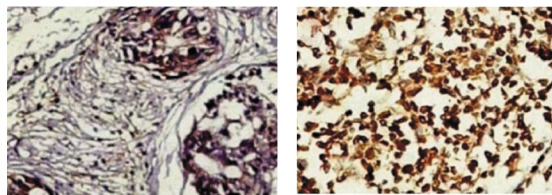
2.1 NOD1 和 NOD2 免疫组织化学结果

Hp 阴性胃癌组织和 Hp 阳性胃癌组织中的 NOD1 蛋白免疫组织化学染色强度有差异($P < 0.05$), Hp 阳性胃癌组织中 NOD1 呈高表达水平。Hp 阴性胃癌和 Hp 阳性胃癌组织中的 NOD2 蛋白免疫组织

化学染色强度差异有统计学意义($P < 0.05$),Hp 阳性胃癌组织中 NOD2 呈高表达水平。见图 1、2。



Hp 阴性胃癌组织 Hp 阳性胃癌组织($\times 400$)
图 1 NOD1 的蛋白表达含量



Hp 阴性胃癌组织 Hp 阳性胃癌组织($\times 400$)
图 2 NOD2 的蛋白表达含量

2.2 NOD1 和 NOD2 的蛋白表达水平

免疫组织化学法检测光密度的结果,其中,Hp 阳性胃癌组织中 NOD1 蛋白表达含量为(1.823 ± 0.042),Hp 阴性胃癌组织中为(0.794 ± 0.041),经 t 检验,差异有统计学意义($t=78.40, P=0.000$),与 Hp 阴性胃癌组织中的蛋白表达量比较, Hp 阳性胃癌组织中 NOD1 的蛋白表达量增加 56.45%。Hp 阳性胃癌组织中 NOD2 蛋白表达含量为(1.337 ± 0.035),Hp 阴性胃癌组织中为(0.645 ± 0.035),经 t 检验,差异有统计学意义($t=62.52, P=0.000$),与 Hp 阴性胃癌组织中的蛋白表达量比较, Hp 阳性胃癌组织中 NOD1 的蛋白表达量增加 51.76%。

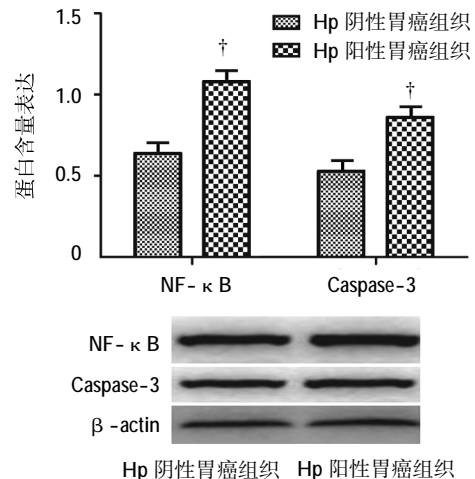
2.3 NOD1 和 NOD2 mRNA 表达含量

Hp 阳性胃癌组织中 NOD1 mRNA 表达含量(1.511 ± 0.062),Hp 阴性胃癌组织 NOD1 mRNA 表达含量(1.00 ± 0.040),经 t 检验,差异有统计学意义($t=38.010, P=0.000$),Hp 阳性胃癌组织中 NOD1 mRNA 表达含量升高。Hp 阴性胃癌组织 NOD2 mRNA 表达含量(1.00 ± 0.037),Hp 阳性胃癌组织中 NOD2 mRNA 表达含量(1.282 ± 0.043),经 t 检验,差异有统计学意义($t=31.300, P=0.000$),Hp 阳性胃癌组织中 NOD2 mRNA 表达含升高量。

2.4 NF- κ B 和 Caspase-3 蛋白含量

Hp 阴性胃癌组织 NF- κ B 蛋白表达(0.641 ± 0.030),Hp 阳性胃癌组织中的 NF- κ B 蛋白表达(1.083 ± 0.061),经 t 检验,差异有统计学意义($t=$

$29.330, P=0.000$),Hp 阳性胃癌组织中 NF- κ B 表达升高;Hp 阴性胃癌组织 Caspase-3 蛋白表达(0.593 ± 0.019),Hp 阳性胃癌组织中的 Caspase-3 蛋白表达(0.857 ± 0.037),经 t 检验,差异有统计学意义($t=33.000, P=0.000$),Hp 阳性胃癌组织中的 Caspase-3 蛋白表达升高。见图 3。



† 与 Hp 阴性胃癌组织中蛋白含量比较, $P < 0.01$

图 3 NF- κ B 和 Caspase-3 蛋白含量

3 讨论

Hp 胃癌是人类健康与生命威胁最大的恶性肿瘤之一^[1],研究表明, Hp 的菌株的多样性和机体的遗传易感性均是与胃癌发病的主要危险因素^[10-11]。机体抵御外来病原生物入侵的第一道防线是先天固有免疫系统。NOD1 和 NOD2 作为在遗传上高度保守的 NOD 蛋白质家族成员,广泛存在于植物、动物和人体细胞内^[12-13]。可通过识别细菌细胞外壁中的肽聚糖和脂多糖,依靠蛋白激酶间的相互作用,激活和活化丝裂原活化蛋白激酶及 NF- κ B 信号通路,使外源性病原微生物细胞内的 DNA 破裂降解而逐渐清除^[14-15]。其中, NF- κ B 作为一种多向转录调节作用的核蛋白因子,在炎症、氧化应激及细胞增殖等生理病理过程中发挥作用,激活后可密切参与凋亡基因的转录调控及细胞凋亡的过程,这最终导致效应性 Caspase-3 活化,胞核内 DNA 链断裂,细胞结构的全面解体细胞死亡发生^[16-17]。

本研究结果显示,与 Hp 阴性胃癌组织相比, Hp 阳性胃癌组织中 NOD1 和 NOD2 的蛋白表达含量均上升,差异明显;对 NOD1 和 NOD2 进行基因水平检测显示,与 Hp 阴性胃癌组织比较, Hp 阳性胃癌组织

中 NOD1 和 NOD2 mRNA 表达含量均升高,有明显差异。结果表明,NOD1 和 NOD2 在抵御 Hp 感染及 Hp 相关胃癌发生过程中发挥重要的抑制作用。Hp 相关胃癌组织中 NF- κ B 信号通路过度激活,NOD1 和 NOD2 高表达抑制 Hp 相关胃癌的细胞的增殖过程,同时使凋亡相关基因 Caspase-3 活性升高,加速细胞凋亡的过程。结果说明 NOD1 和 NOD2 的特异性高表达可能加速细胞凋亡的过程,促进 Hp 相关胃癌细胞的凋亡发生。

综上所述,NOD1 和 NOD2 在 Hp 相关胃癌的发生和发展过程中发挥一定的抑制作用,通过调控自身免疫系统来加速细胞凋亡的发生,但 NOD1 和 NOD2 在 Hp 相关胃癌中的具体作用机制还需进一步研究。在正常人群中,胃黏膜细胞中的 NOD1 和 NOD2 的异常表达可能提示幽门螺杆菌感染及 Hp 相关胃癌的发生,联合检测 NF- κ B 的蛋白表达含量有助于 Hp 阳性胃癌的诊断,为临床治疗提供有效的帮助。

参 考 文 献:

- [1] 周衍,肖景榕,应敏刚,等.胃癌高、低发区饮用水中化学元素、硝酸盐及亚硝酸盐含量调查[J].中华疾病控制杂志,2009,13(5):619-620.
- [2] 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.
- [3] YANG L. Incidence and mortality of gastric cancer in China[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(1): 17-20.
- [4] 胡立民.幽门螺杆菌的致病机制[J].临床军医杂志,2004,32(6):117-118.
- [5] 李唯琼,张超.幽门螺杆菌与胃癌相关性探讨[J].当代医学,2010,16(32):41-42.
- [6] STADTL-NDER C T, WATERBOR J W. Molecular epidemiology, patho-genesis and prevention of gastric cancer[J]. Carcinogenesis, 1999, 20(12): 2195-2208.
- [7] JORDENS J, JANSSENS V, LONGIN S, et al. The protein phosphatase 2A phosphataseactivator is a novel peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase[J]. J Biol Chem, 2006, 281(10): 6349-6357.
- [8] ROSENSTIEL P, HELLMIG S, HAMPE J, et al. Influence of polymor-phisms in the NOD1 / CARD4 and NOD2 /CARD15 genes on the clinical outcome of Helicobacter pylori infection[J]. Cell Micro-biol, 2006, 8(7): 1188-1198.
- [9] 席琼,胡巢凤.NOD 样受体在炎症反应中的调控作用[J].中国动脉硬化杂志,2016,24(5):474-478.
- [10] 侯亮,路英进,陈伟,等.NOD1/RIP2 信号通路对巨噬细胞炎症活化的作用[J].生命科学,2010,22(5):454-458.
- [11] van LIMBERGEN J, RUSSELL R K, NIMMO E R, et al. Con-tribution of the NOD1 /CARD4 insertion/deletion polymorphism +32656 to inflammatory bowel disease in Northern Europe[J]. Inflamm Bowel Dis, 2007, 13(7): 882-889.
- [12] 唐寅思,曹蓉,翁洋,等.幽门螺杆菌阳性患者胃黏膜组织中 NOD1 受体的表达变化[J].山东医药,2016,56(21):79-81.
- [13] HARDER J, NUNEZ G. Functional expression of the intracellu-lar pattern recognition receptor NOD1 in human keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 2009, 129(5): 1299-1302.
- [14] ANGELETTI S, GALLUZZO S, SANTINI D, et al. NOD2/CARD15 poly-morphisms impair innate immunity and increase suscepti-bility to gastric cancer in an Italian population[J]. Hum Im-munol, 2009, 70(9): 729-732.
- [15] VIALA J, CHAPUT C, BONECA I G, et al. Nod1 responds to peptido-glycan delivered by the helicobacter pylori cag pathogenicity is-land[J]. Nat Immunol, 2004, 5(11): 1166-1174.
- [16] YANG X, LU H, YAN B, et al. Δ Np63 versatilely regulates a broad NF- κ B gene program and promotes squamous epithelial proliferation, migration, and inflammation[J]. Cancer Res, 2011, 71(10): 3688-3700.
- [17] AFRIN M R, ARUMUGAM S, RAHMAN M A, et al. Le car-bone, a charcoal supplement, modulates DSS-induced acute colitis in mice through activation of AMPK α and downregula-tion of STAT3 and caspase 3 dependent apoptotic pathways[J]. International Immunopharmacology, 2016, 12(43): 70-78.