

## 胃型上皮Fas表达的调节：幽门螺杆菌致病的自身免疫机制之一

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)已被确定是慢性胃部疾患包括胃炎和溃疡的首要病原因子,根除该菌有利于溃疡愈合、降低复发率并改善胃炎的组织学病变。但Hp致病的确切机制尚不甚明了。就细菌而言,分泌黏附素、尿素酶、细胞毒素及相关毒性蛋白,分泌过氧化物促进氧自由基的产生有助于细菌突破胃粘液屏障并损害定居处的粘膜上皮[1][2][3],而对宿主而言,对Hp这一外来病原的反应包括中性粒细胞浸润释放的酯酶及氧自由基等也会损伤胃上皮。但Hp致病过程中是否存在和存在怎样的自身免疫机制则知之更少。这一问题的解决不仅有助于全面了解Hp的致病地位,且对发展安全的疫苗大有裨益。已知应用Hp的热灭活或福尔马林灭活抗原免疫小鼠可使胃炎加重,提示免疫原选择失当不但不能取得预期的保护作用,反而可能诱发自身免疫性损伤。鉴于Hp中存在一些潜在的自身免疫原如尿素酶B亚单位N-末端与胃上皮H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATP酶高度同源;Hp的热休克蛋白家族分子与胃上皮的同类分子极为保守,人们推测这些抗原组分能够激发宿主传统的“错误自我识别”而损伤上皮。而我们在研究中发现,Hp还可诱发另一类型的自身免疫,即通过诱发宿主上皮细胞固有的膜受体分子CD95(Fas, Apo1)而使其遭受自身的细胞免疫攻击(T细胞上的Fas-ligand),Hp自然感染时胃粘膜浸润的Th1细胞分泌的细胞因子干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )可以加强这一作用,现报告如下。

### 1 材料和方法

#### 1.1 Hp菌株

国际标准株ATCC26695为cagA阳性株,系本研究所保存菌株。在Skirrow选择性培养基(含5%羊血)上37℃微需氧培养。

#### 1.2 胃上皮细胞系

Kato-III、N87和AGS-NY2均为胃癌细胞株,为本所保存细胞株。按常规在含10%胎牛血清、100 U青/链霉素、10 mmol/L HEPES及谷氨酰胺的RPMI 1640中进行培养。

#### 1.3 临床取材

对行胃镜检查的病人常规胃窦取材,应用快速尿素酶试验和组织病理切片Giemsa染色确定有无Hp感染。随机选取8例Hp阳性和8例Hp阴性病人进行复检,从胃窦多点活检中分离原代胃上皮细胞。

#### 1.4 胃粘膜上皮细胞的分离

多块活检组织置入含1 mmol/L DTT/EDTA的无钙镁Hank's液中,37℃震荡15 min去除粘液成分,余下组织块加入含2.4  $\mu$ l/ml Dispase的Hank's液中37℃震荡1 h,取上清离心收取细胞,0.25%锥虫蓝染色鉴定细胞活性(均大于90%)。

#### 1.5 流式细胞仪检测Fas表达

胃新鲜分离上皮细胞漂洗后加入PE标记鼠抗人Fas单抗(购自PharMingen公司),4℃染色30 min。对照应用PE标记的鼠IgG1(购自PharMingen公司)。经PBS漂洗,多聚甲醛固定,流式细胞仪检测。结果以阳性细胞百分比(%)和平均荧光强度(MFI)表示,相对MFI=(抗体组MFI/对照组MFI)×100。

#### 1.6 Fas表达的调控

胃上皮细胞系Kato-III与Hp(细菌/细胞比例为300:1)、IFN- $\gamma$ (100  $\mu$ g/ml)、TNF- $\alpha$ (40 ng/ml)单独或联合孵育48 h后测定Fas表达的变化。

#### 1.7 Fas介导的胃上皮细胞凋亡

已知Fas的IgM单抗与其结合后可诱发细胞凋亡,因此应用Fas IgM单抗(CH11, PharMingen公司, 100 ng/ml)与经不同处理的Kato-III细胞单独或共同孵育12 h,ELISA试剂盒(Boehringer-Mannheim公司)检测细胞凋亡指数[4]。其基本原理是检测凋亡细胞DNA结合组蛋白的释放情况。抗组蛋白单抗与裂解的Kato-III细胞孵育后加入标记的抗DNA二抗,加底物(DAB)显色后酶标仪上测定405和492 nm处的D( $\lambda$ ),计算细胞凋亡指数(apoptotic index, AI)。

#### 1.8 统计处理

行Student's t检验。

### 2 结果

#### 2.1 新鲜分离胃粘膜上皮细胞的Fas表达

自胃粘膜活检标本中新鲜分离上皮细胞后,立即进行染色并进行流式细胞仪检测。发现Hp阳性和阴性胃上皮细胞的Fas阳性百分率分别为11.32±2.00和1.35±0.28(P<0.05),而Fas染色平均荧光强度分别为18.96±4.7和7.75±1.08(P<0.05)。这些说明Hp阳性胃上皮的Fas表达高于阴性者。

## 2.2 胃上皮细胞系的Fas表达

为在体外研究Fas表达情况及调控机制，检测了3株胃上皮细胞系的Fas表达情况。3株胃上皮细胞系均有Fas蛋白表达(图1)。本实验重复6次，结果一致。

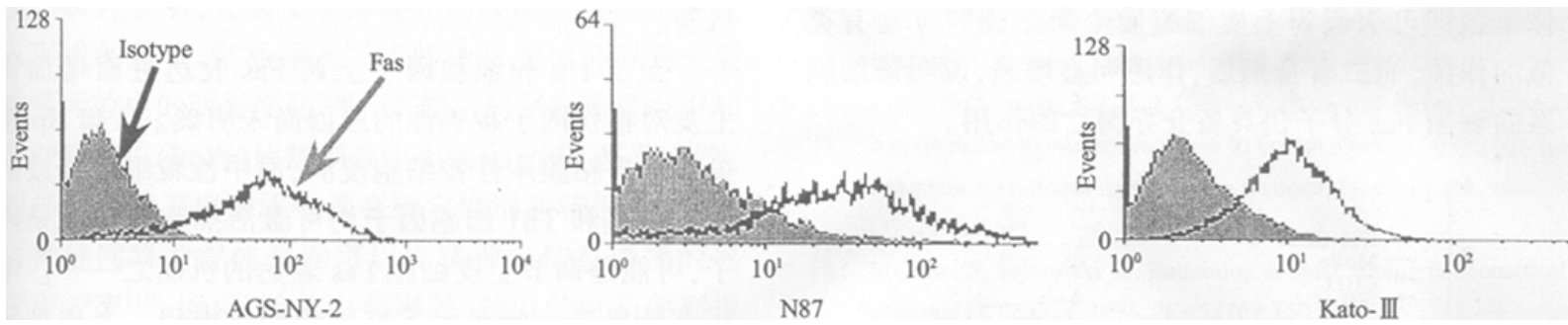


图1 胃上皮细胞系的Fas的表达

Fig.1 Fas expression on the freshly isolated gastric epithelial cells

## 2.3 胃型上皮Fas表达的调控

有研究报道Hp感染胃粘膜T细胞表型以Th1为主，且应用免疫组化方法可检测到该型细胞因子 $IFN-\gamma$ 和 $TNF-\alpha$ 。为探讨这两类常见细胞因子在Fas介导胃上皮损伤中的作用，我们首先检测了Hp菌、 $IFN-\gamma$ 和 $TNF-\alpha$ 单独或联合与胃上皮孵育后，对胃上皮细胞系Fas表达的影响(图2)。 $IFN-\gamma$ 与3株胃上皮孵育48 h均显著提高了Fas的表达( $IFN-\gamma$ 加入前后相比,  $P < 0.05$ )。图3所示为胃上皮细胞Kato-III的Fas表达情况。与培养液对照相比，无论Hp、 $IFN-\gamma$ 、 $TNF-\alpha$ 单独或联合应用，均可提高Fas的表达。以上各数据均为3次重复试验的结果。

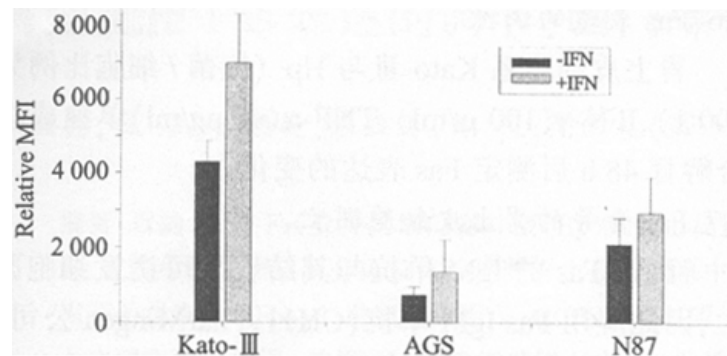


图2  $IFN-\gamma$ 对胃上皮细胞Fas表达的上调作用

Fig.2  $IFN-\gamma$  up-regulates the expression of Fas by the gastric epithelial cells  
MFI: Mean fluorescence intensity

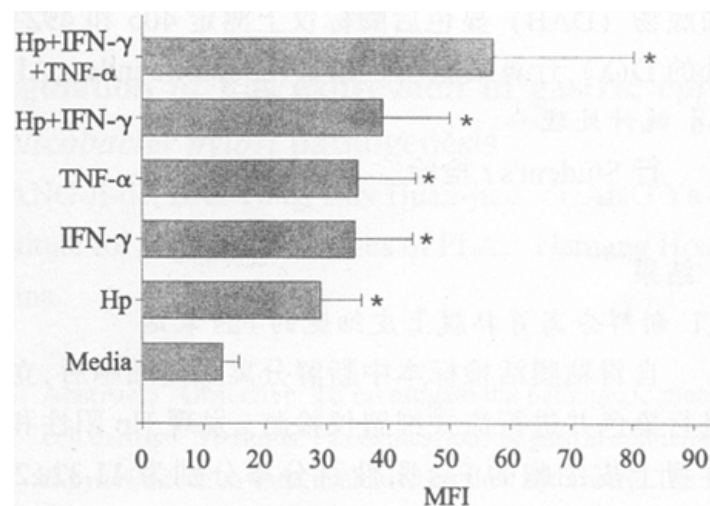


图3 胃上皮细胞Fas表达的调节

Fig.3 Regulation of Fas expression on gastric epithelial cells

## 2.4 Fas介导的胃上皮细胞凋亡

由于某些恶性肿瘤表面的Fas失去了介导细胞凋亡的作用而逃避免疫T细胞的杀伤。我们探讨了胃上皮细胞系Fas的功能(图4)，发现抗Fas IgM 抗体单独即可引起胃上皮细胞发生凋亡， $IFN-\gamma$ 也有类似的作用，而二者合用后，作用明显增强，说明该细胞系的表面Fas分子仍具备介导凋亡的作用。

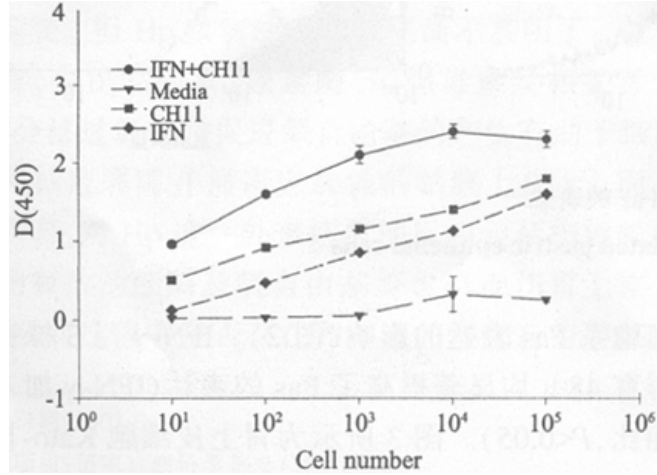


图4 Fas介导的胃上皮细胞凋亡  
Fig.4 Fas-mediated apoptosis of gastric epithelial cells

### 3 讨论

细胞凋亡是细胞的正常代谢活动之一，但在炎症和感染时，凋亡速率会有所改变。目前已有大量报道认为，Hp感染可打破胃上皮细胞的增殖/凋亡平衡，从而导致不同的后果(如糜烂、溃疡或增生等[5])。Jones等[6]发现Hp相关胃炎的细胞凋亡指数较阴性者升高了3倍；有研究者指出Hp脂多糖具有促进细胞凋亡的作用[7]。但Hp致上皮凋亡的确切机制尚知之甚少。

作为一种TNF受体族的蛋白，Fas是最早被发现的凋亡相关基因之一，其主要生理作用为维持免疫系统的稳定，尤其在T细胞分化和成熟阶段。但在感染、肿瘤等一些病理情况下，Fas也可参与诸如自身免疫和免疫逃避等机制[8]。由于Hp致病机制中，人们一直无法排除自身免疫现象的存在，有许多作者推测胃上皮的ATP酶和Fas分子为Hp调节的自身免疫原之一，更有作者在小鼠发现Fas能介导自身免疫性胃炎[9]。我们的研究发现，Hp感染无论在体内还是体外均可提高胃上皮的Fas表达，从而增加其对致凋亡因子如抗Fas IgM 抗体及Fas-ligand的敏感性。事实上，人们已发现Hp可同时激活胃T细胞，释放可溶性及膜结合Fas-ligand，参与胃上皮的损伤。因此我们认为Hp感染时存在一种间接的自身免疫机制，机体并非只对胃上皮细胞的Hp样抗原起排斥，更能排斥被Hp改变了的胃上皮细胞。同时，Hp感染引发的免疫-炎症反应通过分泌损伤性细胞因子加剧了这一过程。Hp感染选择性地致Th1细胞浸润胃粘膜[10]，其主要细胞因子IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 均可参与Hp对胃上皮Fas表达的上调作用。已知TNF- $\alpha$ 是一种致凋亡因子，本研究又发现IFN- $\gamma$ 单独可致胃上皮凋亡，说明Fas介导的上皮凋亡并非Hp损伤胃上皮的唯一机制。

至于Hp和细胞因子上调Fas表达进而增加胃上皮对损伤因子敏感性的原因尚未明确。已知Hp感染常伴胃粘膜中性粒细胞浸润，而中性粒细胞释放的氧自由基和Th1细胞因子均可激活细胞内的转录因子，可能是调节上皮细胞Fas表达的机制之一[11]。本研究结果进一步揭示了粘膜免疫中淋巴-上皮细胞相互作用中各机制的复杂性与关联性。

(责任编辑: 黄开颜)

#### 参考文献:

- [1] 白杨, 张亚历, 王继德, 等. 幽门螺杆菌4种黏附素基因保守区的克隆、序列及其生物信息学分析[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(10): 869-71.  
Bai Y, Zhang YL, Wang JD, et al. Conservative region of the genes encoding four adhesins of Helicobacter pylori: cloning, sequence analysis and biological information analysis[J]. J First Mil Med Univ/ Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(10): 869-71.
- [2] 白杨, 唱韶红, 王继德, 等. 表达幽门螺杆菌黏附素BabA克隆的构建及其黏附活性评价[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(4): 293-5.  
Bai Y, Chang SH, Wang JD, et al. Construction of clone expressing adhesin BabA of Helicobacter pylori and evaluation on its adherence[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(4): 293-5.
- [3] 白杨, 但汉雷, 王继德, 等. 幽门螺杆菌AlpA基因中四种黏附素基因保守区的克隆、表达、纯化及鉴定[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(6): 922-6.  
Bai Y, Dan HL, Wang JD, et al. Cloning, expression, purification and identification of conservative region of four Helicobacter pylori adhesin genes in AlpA gene[J]. Prog Biochen Biophys, 2002, 29(6): 922-6.
- [4] Silvestris F, Nagata S, Cafforio P, et al. Cross-linking of Fas by antibodies to a peculiar domain of gp120 V3 loop can enhance T cell apoptosis in HIV-1-infected patients[J]. J Exp Med, 1996, 184(6): 2287-300.
- [5] Rokkas T, Ladas S, Liatsos C, et al. Relationship of Helicobacter pylori CagA status to gastric cell proliferation and apoptosis[J]. Dig Dis Sci, 1999, 44(3): 487-93.
- [6] Jones NL, Shannon PT, Cutz E, et al. Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of Helicobacter pylori infection[J]. Am J Pathol, 1997, 151(6): 1695-703.
- [7] Piotrowski J, Piotrowski E, Skrodzka D, et al. Induction of acute gastritis and epithelial apoptosis by Helicobacter pylori lipopoly- saccharide[J]. Scand J Gastroenterol, 1997, 32(3): 203-11.

- [8] 白杨, 张亚历, 陈焯, 等. 幽门螺杆菌粘附素保守区蛋白的免疫原性、安全性和粘附作用的体外评价[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(3): 422-6.
- Bai Y, Zhany YL, Chen Y, et al. Study of immunogenicity and safety and adherence of conservative region of four *Helicobacter pylori* adhesin in vitro[J]. Prog Biochem Biophys, 2003, 30(3): 422-6.
- [9] Nishio A, Katakai T, Oshima C, et al. A possible involvement of Fas-Fas ligand signaling in the pathogenesis of murine autoimmune gastritis[J]. Gastroenterology, 1996, 111(4): 959-67.
- [10] Whary MT, Morgan TJ, Dangler CA, et al. Chronic active hepatitis induced by *Helicobacter hepaticus* in the A/JCr mouse is associated with a Th1 cell-mediated immune response[J]. Infect Immun, 1998, 66(7): 3142-8.
- [11] Suhara T, Fukuo K, Sugimoto T, et al. Hydrogen peroxide induces up-regulation of Fas in human endothelial cells[J]. J Immunol, 1998, 160(8): 4042-7.

#### 参考文献:

- [1] 白杨, 张亚历, 王继德, 等. 幽门螺杆菌4种黏附素基因保守区的克隆、序列及其生物信息学分析[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(10): 869-71.
- Bai Y, Zhang YL, Wang JD, et al. Conservative region of the genes encoding four adhesins of *Helicobacter pylori*: cloning, sequence analysis and biological information analysis[J]. J First Mil Med Univ/ Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(10): 869-71.
- [2] 白杨, 唱韶红, 王继德, 等. 表达幽门螺杆菌黏附素BabA克隆的构建及其黏附活性评价[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(4): 293-5.
- Bai Y, Chang SH, Wang JD, et al. Construction of clone expressing adhesin BabA of *Helicobacter pylori* and evaluation on its adherence[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(4): 293-5.
- [3] 白杨, 但汉雷, 王继德, 等. 幽门螺杆菌AlpA基因中四种黏附素基因保守区的克隆、表达、纯化及鉴定[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(6): 922-6.
- Bai Y, Dan HL, Wang JD, et al. Cloning, expression, purification and identification of conservative region of four *Helicobacter pylori* adhesin genes in AlpA gene[J]. Prog Biochem Biophys, 2002, 29(6): 922-6.
- [4] Silvestris F, Nagata S, Cafforio P, et al. Cross-linking of Fas by antibodies to a peculiar domain of gp120 V3 loop can enhance T cell apoptosis in HIV-1-infected patients[J]. J Exp Med, 1996, 184(6): 2287-300.
- [5] Rokkas T, Ladas S, Liatsos C, et al. Relationship of *Helicobacter pylori* CagA status to gastric cell proliferation and apoptosis[J]. Dig Dis Sci, 1999, 44(3): 487-93.
- [6] Jones NL, Shannon PT, Cutz E, et al. Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of *Helicobacter pylori* infection[J]. Am J Pathol, 1997, 151(6): 1695-703.
- [7] Piotrowski J, Piotrowski E, Skrodzka D, et al. Induction of acute gastritis and epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori* lipopoly- saccharide[J]. Scand J Gastroenterol, 1997, 32(3): 203-11.
- [8] 白杨, 张亚历, 陈焯, 等. 幽门螺杆菌粘附素保守区蛋白的免疫原性、安全性和粘附作用的体外评价[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(3): 422-6.
- Bai Y, Zhany YL, Chen Y, et al. Study of immunogenicity and safety and adherence of conservative region of four *Helicobacter pylori* adhesin in vitro[J]. Prog Biochem Biophys, 2003, 30(3): 422-6.
- [9] Nishio A, Katakai T, Oshima C, et al. A possible involvement of Fas-Fas ligand signaling in the pathogenesis of murine autoimmune gastritis[J]. Gastroenterology, 1996, 111(4): 959-67.
- [10] Whary MT, Morgan TJ, Dangler CA, et al. Chronic active hepatitis induced by *Helicobacter hepaticus* in the A/JCr mouse is associated with a Th1 cell-mediated immune response[J]. Infect Immun, 1998, 66(7): 3142-8.
- [11] Suhara T, Fukuo K, Sugimoto T, et al. Hydrogen peroxide induces up-regulation of Fas in human endothelial cells[J]. J Immunol, 1998, 160(8): 4042-7.