

# 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

王继德袁 杨袁林焕建袁张亚历袁黄 文袁周殿元渊第一军医大学南方医院全军消化病研究所袁广东 广州 510515 冤

摘要目的 探讨 Fas 介导的幽门螺杆菌渊H.pylori)致胃上皮损伤机制遥方法 从 Hp 感染和非感染胃粘膜新鲜分离胃上皮细胞袁流式细胞仪测定新分离及体外培养胃上皮细胞系中 Fas 的表达曰调查 Hp 活菌及 Hp 感染时胃粘膜主要的 Th1 细胞因子干扰素-酌渊IFN-酌)渊肿瘤坏死因子-琢渊TNF-琢)对胃上皮 Fas 表达的调节作用袁同时应用 ELISA 法探讨 Fas 介导的胃上皮细胞凋亡作用遥结果 Hp 感染胃粘膜上皮 Fas 阳性数和表达量均高于非感染者渊P<0.05)袁IFN-酌及 TNF-琢单独或合用均能提高胃上皮 Fas 的表达袁而胃上皮表面的 Fas 分子能够介导其 IgM 单抗引起的致细胞凋亡作用袁IFN-酌可增强这种作用遥结论 直接或间接通过 Th1 细胞因子增加 Fas 表达进而损伤胃上皮细胞袁是 Hp 致胃上皮损伤的自身免疫机制之一遥

关键词 螺杆菌, 幽门; 螺杆菌感染; CD95; 胃粘膜; 脱噬作用

中图分类号 R329.24; R516.06; R573.9 文献标识码 文章编号 院000-2588渊003冤1-1184-04

## Regulation of Fas expression in gastric epithelium: one of the auto-immune mechanisms of Helicobacter pylori pathogenesis

WANG Ji-de, BAI Yang, LIN Huan-jian, ZHANG Ya-li, HUANG Wen, ZHOU Dian-yuan

Institute for Digestive Diseases of PLA, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the pathogenic mechanism of Helicobacter pylori (H.pylori)-mediated gastric epithelial cell damage. Methods Fas expressions in gastric epithelial cell lines and freshly isolated gastric epithelial cells with or without H.pylori infection were evaluated by flow cytometry. The modulation of Fas expression in gastric epithelial cells by H.pylori or by Th1 cytokines present in H.pylori-infected gastric mucosa was assessed in vitro. The function of Fas expressed by the gastric epithelial cells to induce cell apoptosis was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after incubation of the cells with anti-Fas antibody. Results All of the three gastric epithelial cell lines, AGS, N87 and kato-III, expressed detectable Fas protein when examined by flow cytometry. The percentage of positive cells and the amount of Fas protein on cell surface were larger in freshly isolated gastric epithelial cells with H.pylori infection than in uninfected cells (P<0.05). H. pylori alone or in combination with Th1 cytokines (IFN-酌and TNF-琢 significantly increased the expression of Fas in gastric epithelial cell lines in vitro. After incubation with IgM anti-Fas mAb, Fas-bearing gastric epithelial cells underwent apoptosis, and this effect of Fas was enhanced by IFN-酌Conclusion Th1 cells accumulated in the gastric mucosa during H.pylori infection is involved in the damage of gastric epithelium through the modulation of Fas/Fas ligand interaction.

Key words: Helicobacter pylori; helicobacter infection; CD95; gastric mucosa; apoptosis

幽门螺杆菌渊Helicobacter pylori)袁p 冤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袁根除该菌有利于溃疡愈合袁降低复发率并改善胃炎的组织学病变遥但 Hp 致病的确切机制尚不甚明了遥就细菌而言袁分泌黏附素袁尿素酶袁细胞毒素及相关毒性蛋白袁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遥而对宿主而言袁对 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遥但 Hp 致病过程中是否存在和存在怎样的自身免疫机制

则知之更少遥这一问题的解决不仅有助于全面了解 Hp 的致病地位袁且对发展安全的疫苗大有裨益遥已知应用 Hp 的热灭活或福尔马林灭活抗原免疫小鼠可使胃炎加重袁提示免疫原选择失当不但不能取得预期的保护作用袁反而可能诱发自身免疫性损伤遥鉴于 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 酶高度同源曰Hp 的热休克蛋白家族分子与胃上皮的同类分子极为保守袁人们推测这些抗原组分能够激发宿主传统的 野错误自我识别)而损伤上皮遥而我们在研究中发现袁Hp 还可诱发另一类型的自身免疫袁即通过诱发宿主上皮细胞固有的膜受体分子 CD95 渊Fas)袁使其遭受自身的细胞免疫攻击渊细胞上的 Fas-ligand 渊FasL)自然感染时胃粘膜浸润的 Th1 细胞分泌的细胞因子干扰素-酌渊IFN-酌)渊肿瘤坏死因子-琢渊TNF-琢)可以加强这一作

收稿日期 院003-04-01

基金项目 院国家自然科学基金渊0170890 冤

Supported by National Natural Science Foundation of China 渊0170890 冤

作者简介 院王继德 渊967- 冤男 袁河南偃师人 袁997 年毕业于第一军医大学 袁硕士 袁副教授 袁电话 院20-61641569 袁e-mail: jdwang88@hotmail.com

用表报告如下遥

1 材料和方法

1.1 Hp 菌株

国际标准株 ATCC26695 为 cagA 阳性菌株系本研究所保存菌株遥在 Skirrow 选择性培养基含 5% 羊血兔上 37 益微需氧培养遥

1.2 胃上皮细胞系

Kato-III 尧 87 和 AGS-NY2 均为胃癌细胞株袁本所保存细胞株遥按常规在含 10% 胎牛血清尧 0.00 U 青 / 链霉素尧 0 mmol/L HEPES 及谷氨酰胺的 RPMI 1640 中进行培养遥

1.3 临床取材

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

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 液中袁 7 益震荡 15 min 去除粘液成分袁下组织块加入含 2.4 滋/ml Dispase 的 Hank's 液中 37 益震荡 1 h 袁取上清离心收取细胞袁 25% 锥虫蓝染色鉴定细胞活性渊均大于 90% 冤遥

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 单抗渊购自 PharMingen 公司冤袁 益染色 30 min 遥对照应用 PE 标记的鼠 IgG1 渊购自 PharMingen 公司冤遥经 PBS 漂洗袁多聚甲醛固定袁流式细胞仪检测遥结果以阳性细胞百分比渊 冤和平均荧光强度渊MFI冤表示袁相对 MFI=渊抗体组 MFI/ 对照组 MFI冤<sup>100</sup>遥

1.6 Fas 表达的调控

胃上皮细胞系 Kato-芋与 Hp 渊细菌 / 细胞比例为 300 000 00 滋/ml 冤渊IFN-酌 100 ng/ml 冤单独或联合孵育 48 h 后测定 Fas 表达的变化遥

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袁因此应用 Fas IgM 单抗渊H11 袁harMingen 公司袁 100 ng/ml 冤与经不同处理的 Kato-芋细胞单独或共同孵育 12 h 袁LISA 试剂盒 渊Boehringer-Mannheim 公司冤检测细胞凋亡指数遥其基本原理是检测凋亡细胞 DNA 结合组蛋白的释放情况遥抗组蛋白单抗与裂解的 Kato-III 细胞孵育后加入标记的抗 DNA 二抗袁加底物 渊DAB 冤显色后酶标仪上测定 405 和 492 nm 处的 D 渊吸光率冤计算细胞凋亡指数渊apoptotic index 冤遥

1.8 统计处理

行 Student's t 检验遥

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袁即进行染色并进行流式细胞仪检测遥发现 Hp 阳性和阴性胃上皮细胞的 Fas 阳性百分率分别为 11.32 依.00 和 1.35 依.28 渊<0.05 冤遥而 Fas 染色平均荧光强度分别为 18.96 依.7 和 7.75 依.08 渊<0.05 冤遥这些说明 Hp 阳性胃上皮的 Fas 表达高于阴性者遥

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袁检测了 3 株胃上皮细胞系的 Fas 表达情况遥 3 株胃上皮细胞系均有 Fas 蛋白表达渊图 1 冤遥本实验重复 6 次袁结果一致遥

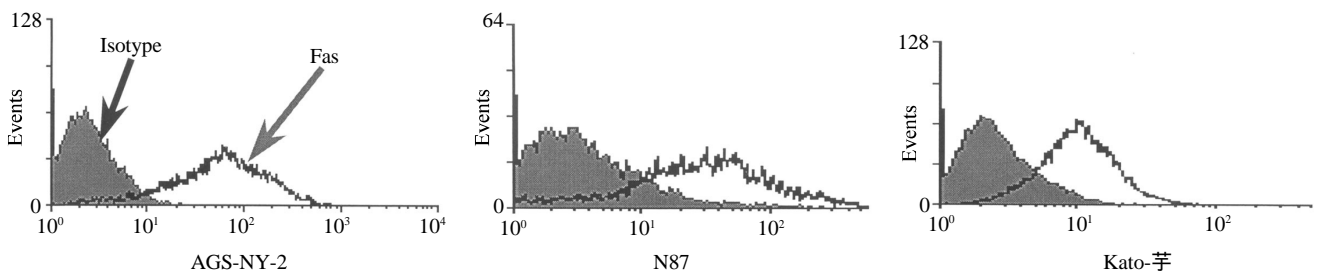


图 1 胃上皮细胞系的 Fas 的表达

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 为主袁且应用免疫组化方法可检测到该型细胞因子 IFN-酌和 TNF-琢遥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袁我们首先检测了 Hp 菌尧 IFN-酌和 TNF-琢单独或联合与胃上皮孵育后袁对胃上

皮细胞系 Fas 表达的影响渊图 2 冤遥 IFN-酌与 3 株胃上皮孵育 48 h 均显著提高了 Fas 的表达渊IFN-酌加入前后相比袁 <0.05 冤遥图 3 所示为胃上皮细胞 Kato-芋的 Fas 表达情况遥与培养液对照相比袁无论 Hp 尧 IFN-酌尧 TNF-琢单独或联合应用袁均可提高 Fas 的表达遥以上各数据均为 3 次重复试验的结果遥

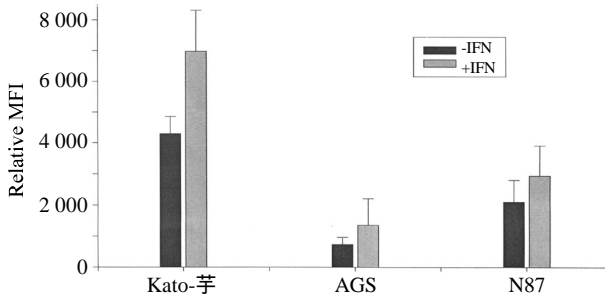


图 2 IFN- $\alpha$  对胃上皮细胞 Fas 表达的上调作用  
Fig.2 IFN- $\alpha$  up-regulates the expression of Fas by the gastric epithelial cells  
MFI: Mean fluorescence intensity

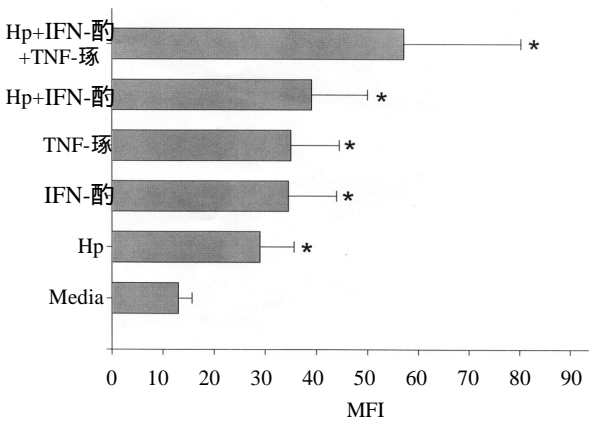


图 3 胃上皮细胞 Fas 表达的调节  
Fig.3 Regulation of Fas expression on gastric epithelial cells

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- $\alpha$  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。

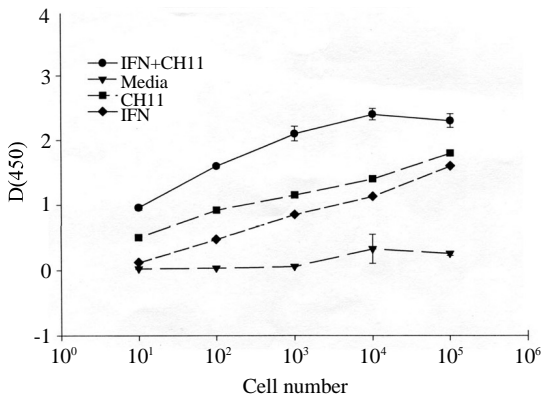


图 4 Fas 介导的胃上皮细胞凋亡  
Fig.4 Fas-mediated apoptosis of gastric epithelial cells

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。Jones 等发现 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。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。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。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。其主要细胞因子 IFN- $\alpha$  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- $\alpha$  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。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。

参考文献

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. 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 First Mil Med

Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(10): 869-71.

咱暂白 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咱暂第一军医大学学报, 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咱暂J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(4): 293-5.

咱暂白 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咱暂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咱暂Prog Biochen Biophys, 2002, 29(6): 922-6.

咱暂 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咱暂J Exp Med, 1996, 184(6): 2287-300.

咱暂 Rokkas T, Ladas S, Liatsos C, et al. Relationship of *Helicobacter pylori* CagA status to gastric cell proliferation and apoptosis咱暂Dig Dis Sci, 1999, 44(3): 487-93.

咱暂 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咱暂Am J Pathol, 1997, 151(6): 1695-703.

咱暂 Piotrowski J, Piotrowski E, Skrodzka D, et al. Induction of acute gastritis and epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide咱暂Scand J Gastroenterol, 1997, 32(3): 203-11.

咱暂白 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咱暂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咱暂Prog Biochen Biophys, 2003, 30(3): 422-6.

咱暂 Nishio A, Katakai T, Oshima C, et al. A possible involvement of Fas-Fas ligand signaling in the pathogenesis of murine autoimmune gastritis咱暂Gastroenterology, 1996, 111(4): 959-67.

咱0暂 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咱暂Infect Immun, 1998, 66(7): 3142-8.

咱1暂 Suhara T, Fukuo K, Sugimoto T, et al. Hydrogen peroxide induces up-regulation of Fas in human endothelial cells咱暂J Immunol, 1998, 160(8): 4042-7.

责任编辑 隋开颜 冤

## 渊上接 1183 页冤

从结果可见袁随着交感神经刺激频率的增加袁损伤 DRG 神经元的反应逐渐增大遥刺激频率是影响反应的重要因素袁即突触前神经放电的频率与突触后反应密切相关遥我们比较周期和混沌两种交感神经刺激引起受损 DRG 神经元的反应袁这两种刺激的平均频率和强度相等袁只是刺激时间序列不同遥混沌交感神经刺激引起的反应明显大于周期交感神经引起的反应遥研究表明袁大脑皮层神经元的放电受到其突触输入形式的影响袁突触输入形式的微小变化可引起皮层神经元放电的明显变化遥不规则的突触前放电引起突触后电位渊SPs冤比规则放电引起的 PSPs 显著大渊咱暂袁而神经网络的不规则放电具有确定性混沌特性渊咱暂袁袁皮层神经网络的混沌活动可以提高神经信息传递的速度和效率渊咱暂袁因此袁除放电频率外袁放电的时间序列也是影响突触后效应的重要因素袁而且混沌放电引起的效应大于周期放电的效应袁不同时间序列的突触前神经元放电传递给突触后神经元的神经信息是不同的遥

## 参考文献院

咱暂 Ferster D, Spruston N. Cracking the neuronal code咱暂 Science, 1995, 270(5237): 756-7.

咱暂 Jacques G, Simon T. Rate coding versus temporal order coding: a

theoretical approach咱暂Biosystems, 1998, 48(1): 57-65.

咱暂 Rabinovich MI, Abarbanel DI. The role of chaos in neural systems咱暂Neuroscience, 1998, 87(1): 5-14.

咱暂 Hu SJ, Yang HJ, Long KP, et al. Adrenergic sensitivity of neurons with non-periodic firing activity in rat injured dorsal root ganglion咱暂Neuroscience, 2000, 101(3): 689-98.

咱暂 Mclachlan M, Janig W, Devor M, et al. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia咱暂Nature, 1993, 363(10): 543-5.

咱暂 Yang HJ, Hu SJ, Xu H. Modulation of spontaneous activities in chronically compressed dorsal root ganglion neurons by sympathetic efferent activation咱暂J Med Coll PLA, 2000, 15(4): 254-7.

咱暂 Xu H, Hu SJ, Long KP, et al. Cyclic AMP-dependent protein kinase contributes to excitatory response to norepinephrine in chronically compressed rat dorsal root ganglion neurons咱暂Analgesia, 2001, 5(4): 229-37.

咱暂 Mainen ZF, Sejnowski TJ. Reliability of spike timing in neocortical neurons咱暂Science, 1995, 268(5216): 1503-6.

咱暂 Holt GR, Softky WR, Koch C, et al. Comparison of discharge variability in vitro and in vivo in cat visual cortex neurons咱暂J Neurophysiol, 1996, 75(5): 1806-14.

咱0暂 Kim U, McCormick DA. The functional influence of burst and tonic firing mode on synaptic interactions in the thalamus咱暂J Neurosci, 1998, 18(22): 9500-16.

咱1暂 Liljeström H. Global effects of fluctuations in neural information processing咱暂Int J Neural Syst, 1996, 7(4): 497-505.

责任编辑 隋开颜 冤