

胃癌幽门螺杆菌 L 型感染与细胞凋亡关系的研究进展

宣兰兰 综述,于东红 审校

[关键词] 胃肿瘤;幽门螺杆菌 L 型;细胞凋亡;综述

[中国图书资料分类法分类号] R 735.2;R 378.99

[文献标识码] A

幽门螺杆菌 L 型 (*Helicobacter pylori* L-form, Hp-L) 是幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 的细胞壁缺陷型, 即球形幽门螺杆菌, 胃液、胆汁、溶菌酶、抗生素等均可使 Hp 发生细胞壁缺陷而转变成 Hp-L^[1]。已知 Hp-L 的生物学性状和致病性与 Hp 有相似之处, 也有明显不同, 且与胃癌的发生相关。近年研究表明, 在胃黏膜上皮细胞损伤和癌变的过程中, 细胞凋亡异常发挥了重要的作用, 许多基因参与细胞凋亡的调控, 如 IAP (inhibitor of apoptosis protein) 基因家族、Bcl-2 家族、caspase 家族、Fas/FasL、p53 等, 其中 Livin 是新近发现的一个 IAP 家族成员^[2], 并与肿瘤的发生有密切关系。本文就胃癌 Hp-L 感染、细胞凋亡和凋亡基因 Livin 调控机制的研究进展作一综述。

1 Hp-L 的感染

自 1983 年 Warren 和 Marshall 首先报道从慢性活动性胃炎患者的胃窦活检标本中分离并培养出 Hp 以来, 国内外对 Hp 流行病学、生物学、病理学和临床诊断与治疗等方面的研究一直方兴未艾。1994 年 Hp 被 WHO 定为 I 类致癌物, 是慢性胃炎、胃溃疡、胃癌等病变公认的致病因子, 已引起医学界和生物界的广泛重视。

Hp 是一种革兰染色阴性呈 S 型或弧型弯曲的细菌。Hp 在胃液、胆汁、抗生素以及环境中氧浓度改变等条件下易发生细胞壁缺陷而引起多形性变异, 形成 Hp-L^[3,4]。随着人们对 Hp 研究的深入, Hp-L 在消化性疾病中的作用已受到越来越多的关注。

Hp 通过较为可能的传播方式 (粪-口或口-口) 进入胃后很容易转变成 Hp-L, Hp-L 由于细胞壁缺陷难以维持原有的外部形态, 因此表现出多形性。于东红等^[5]用组织切片革兰染色和免疫组化染色法对 36 例胃癌、34 例胃不典型增生、42 例慢性胃炎及 15 例正常胃黏膜进行 Hp-L 检测, 革兰染色发现 Hp-L 形态多样, 大小不等, 圆球体、原生小体、巨形体、棒状体等均可见到, 大部分呈革兰染色阴性, 少数呈革兰染色阳性。Hp-L 分布广泛, 可聚集于腺腔、癌巢和间质, 也可散布于其中, 胃癌、胃不典型增生及胃炎组织中的 Hp-L 分布无明显区别。所有 Hp-L 阳性切片均见到 Hp-L 黏附于胃腺上皮细胞、不典型增生细胞及癌细胞表面的现象, 同时有 51.8% 上述 3 种细胞的胞质内见到 Hp-L 圆球体、巨形体等。

表现出多形性的 Hp-L 是休眠状态的存活形式还是死亡

过程的中间体, 一直存在争议。但越来越多的证据表明 Hp-L 具有生存活力, 扫描电镜可见 Hp-L 具有完整的细胞结构和基因结构, 仍有基因的转录及蛋白的合成, 其水平较 Hp 有所降低。Chuang 等^[6]利用比较蛋白组技术发现, Hp-L 具有和 Hp 相同的酶和蛋白质, 只是它们的合成量下降。Nilsson 等^[7]在实验中检测比较胁迫因素作用下的 Hp-L 中 ATP 浓度、总 RNA 含量等数个指标, 发现当把 Hp-L 放入营养丰富的红细胞裂解液中, 其代谢活性明显增强, ATP 浓度增高 120~150 倍, 证明 Hp-L 是具有生存活力的生命体形式。

具有生存活力的 Hp-L 因其表面的电荷发生了改变, 对宿主细胞的黏附性增强, 易于在宿主细胞内定植, 从而引起组织内环境的改变和宿主细胞的慢性损伤。吴小茜等^[8]用体外诱导的 Hp-L 给小鼠灌胃 4 周后, 实验组 BALB/c 小鼠组织尿素酶试验阳性率达 80%、Hp 培养阳性率达 100%, 病理学检测结果显示 70% 实验组小鼠胃黏膜出现糜烂, 与生理盐水对照组比较均有统计学意义 ($P < 0.05$), 成功建立了球形 Hp-BALB/c 小鼠感染模型, 证实了 Hp-L 在动物体内具有致病性。

原本存在于 Hp 细胞壁上的抗原因细胞壁缺陷而部分丢失, 使 Hp-L 的抗原性降低, 这样 L 型容易逃避机体的免疫攻击, 可在体内长期存活并继续生长繁殖, 当条件适宜时, Hp-L 还可回复成原菌, 使病变进展或复发, 所以 Hp-L 一旦感染就很难彻底清除^[9]。临床上用抗生素治疗 Hp 感染极易导致其发生 L 型变异, 而发生变异后, 传统的细菌培养、尿素酶试验、血清抗体检测往往不能发现 Hp-L 的感染^[10], 给诊断带来一定困难, 当然也容易忽视对 Hp-L 感染者的治疗, 因此对 Hp-L 诊断和彻底根除应引起临床医师的足够重视。目前, 有关针对 Hp-L 的高敏诊断及杀灭 Hp-L 的药物开发正是研究的热点。

2 凋亡基因 Livin 的调控机制

细胞凋亡又称细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD), 是细胞在一定的生理或病理条件下, 遵循自身的程序, 自己结束生命的过程。它是一个主动的、高度有序的、基因控制的一系列酶参与的过程。细胞凋亡概念提出至今还不到 30 年, 但由于它在保证多细胞生物的健康生存过程中扮演着关键角色, 对个体的正常发育及细胞凋亡紊乱在病理学研究中的重要作用, 已引起人们对其机制和组分的广泛而深入地研究, 成为目前生命科学界最为热门话题之一, 也是生命科学界乃至社会各界争相投入的研究领域。

细胞凋亡过程调控异常在肿瘤形成过程中发挥十分重要的作用, 这种调控机制涉及到促进或阻止细胞凋亡的多种

[收稿日期] 2008-05-30

[作者单位] 蚌埠医学院 病理学教研室, 安徽 蚌埠 233030; 蚌埠医学院 第一附属医院 病理科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 宣兰兰 (1981-), 女, 硕士研究生。

凋亡相关蛋白的参与,整个过程表现为进化上较为保守的级联反应。Bcl-2、Fas、Bax等凋亡相关蛋白均作用于级联反应的上游,而直接作用于级联反应的蛋白质分子报道极少。Livin是最近发现的凋亡抑制蛋白IAP家族中的新成员^[11],特异性表达于人的胚胎组织及某些实体肿瘤组织和肿瘤细胞系,在正常成人组织中低表达或无表达,提示该基因可能在肿瘤的发生、发展中起着重要作用。

Livin是由4个不同的实验小组几乎在同一时期所发现,这些实验小组均采用IAP同源序列(BIR或RING)寻找的方法,分别从人类基因组cDNA文库中克隆得到。Kasof等^[12]将该基因命名为Livin;Lin等^[13]由于是从人胎肾cDNA文库中分离到该基因,故将其称为KIAP(kidney IAP);Vucic等^[14]因该基因在人黑色素瘤细胞中高表达,所以被称为ML-IAP(melanoma IAP);Ashhab等^[15]明确了该基因存在2个剪接变体,分别命名为Livin α 和Livin β 。为避免混淆,我们将其统称为Livin。

Livin基因位于人染色体20q13.3,全长46 kbp,含7个外显子和6个内含子。其转录产物因剪接方式不同有2种mRNA亚型,分别编码298和280个氨基酸的蛋白质,我们将较长的亚型称为Livin α ,较短的亚型称为Livin β ,2种亚型均含有一个近氨基端的BIR结构域(长约70个氨基酸的杆状病毒IAP重复基序结构)及一个RING(环指)结构的羧基末端^[16],两者虽然只相差由介于BIR和RING结构之间的第6外显子5'端54 bp基因序列编码的18个氨基酸,但它们不仅在抗凋亡的功能上有差异,而且具有不同的组织表达谱^[17]。Livin的BIR结构域是其抗凋亡的活性结构,包含4个 α 螺旋和1个三股的反相平行 β 片层,与相应的氨基酸残基共同构成疏水核心。Livin的氨基酸残基C124、C127、H44及C151与锌原子结合,借以稳定整个重叠结构。目前认为多数Livin定位于细胞质中,但Kasof等^[12]认为Livin的细胞内分布与survivin相似,即Livin既在胞质内呈丝状表达,同时也表达于胞核。

Livin抗细胞凋亡作用和机制,目前主要认为存在2个途径,(1)抑制caspase途径。caspase蛋白是介导细胞凋亡的重要蛋白家族,大多数刺激物是通过caspase蛋白的级联激活反应引起细胞凋亡。caspase蛋白有10多个家族成员。Livin能与其中的多个成员相互作用,抑制凋亡的执行过程。例如与caspase-9前体蛋白和其激活形式结合从而抑制其功能。Livin也能与caspase-3、6、7、8、10作用,尤其caspase-3。Livin中的BIR结构域(N端86-154)是其抗凋亡活性所必需。只有含有BIR结构域的Livin突变体才能够抑制细胞凋亡,并且其活性与野生型相似。而N端片段(N端1~86)和C2端片段(N端145~280)则无此活性。研究表明Livin BIR结构域为一个新型的锌指结构^[12],它是与caspase蛋白结合的部位,可能阻止caspase蛋白在细胞凋亡时执行蛋白切除功能。Livin活性也受到细胞内Smac的调控,Vucic等^[18]研究表明,外界刺激正常细胞造成的应激或DNA严重损伤能使线粒体释放细胞色素C和Smac蛋白,Smac能与Livin中的BIR结构域结合,抑制其活性,促进细胞凋亡。而将Smac

和Livin共转染人的293T胎肾细胞和MCF7乳腺癌细胞系中,也可观察到相似的结果。可见Livin在细胞凋亡调节中起重要作用。(2)激活TAK1/JNK1信号转导途径:Livin可激活MAP(mitogen-activated protein)激酶JNK1和JNK2,对JNK3无激活作用,而Livin对JNK1的激活作用远远强于JNK2,并且是Livin对抗TNF- α 和ICE介导的细胞凋亡作用的一条重要途径。JNK蛋白家族可直接由MKK4/MKK7激活,但Livin对JNK1的激活并不依赖于MKK4/MKK7信号途径,而是通过TAB1/TAK1途径实现。TAK1是一个上游MAP3激酶,在肿瘤坏死因子TGF- β 的刺激下可激活JNK1。TAB1是TAK1的共反应子,TAB1本身对于JNK1无激活作用,但可促进TAK1介导的JNK1激活作用。Livin可与TAB1结合,并进一步激活TAK1^[19]。

此外,有些IAP家族成员在其碳末端拥有RING指结构,具有E3泛素连接酶活性,由于Livin同样具有该酶活性,可靶向降解Smac/DIABLO复合物,Smac/DIABLO复合物又可通过抑制IAP-caspase的交互作用,来发挥促凋亡功能,因此Livin对Smac/DIABLO复合物的降解被认为是Livin抗细胞凋亡的机制之一^[20]。

3 Hp-L感染与胃癌、细胞凋亡的关系

Hp是引起人类慢性胃炎、胃溃疡、胃癌等病变公认的致病因子。而Hp在体内外诸多因素作用下易发生细胞壁缺陷型变异,即L型变异。随着研究的深入,Hp-L与胃癌的发生、发展之间的关系日益受到人们的重视,并逐渐成为临床和基础研究的热点。大量研究表明,L型与慢性和反复发作性感染有关,并与肿瘤的关系密切。于东红等^[5]检测112例标本,慢性胃炎、不典型增生及胃癌的Hp-L检出率明显高于正常胃黏膜组($P < 0.05$),且3种类型组织的Hp-L检出率差异无统计学意义,表明Hp-L感染与慢性胃炎、不典型增生及胃癌均有关,并在胃癌的发生中可能起一定作用。叶兵等^[21]取186例胃癌患者胃窦和胃体黏膜组织常规切片后经革兰染色和免疫组化染色镜检Hp-L细菌,其检出率在肠型胃癌患者中为75.42%,明显高于弥漫型胃癌患者(23.53%),且胃窦部(64.71%)高于贲门部(41.79%),提示Hp-L感染主要作用于胃窦部,是引起肠型胃癌的重要致病因子之一。Bode等^[22]研究发现Hp-L能够在胃组织中中长期存在且不易被清除,而长期持续刺激被认为是肿瘤发生的前提条件之一。

肿瘤的发生是细胞凋亡与增殖失衡所致,肿瘤细胞凋亡调控失调导致的细胞凋亡抑制是肿瘤发生的主要原因之一。在Hp-L感染后引起胃黏膜癌变的过程中,胃黏膜上皮细胞凋亡异常与细胞增殖活跃并存,而细胞凋亡和增殖的这种平衡失调在胃癌发生、发展中可能起重要作用。陈豪等^[23]采用抗生素诱导Hp发生L型变异,然后将其作用胃癌细胞,结果显示低浓度Hp-L具有刺激其增殖的作用。由于体内Hp-L通常是在治疗后出现,菌量较低,因而Hp-L在体内可能起到抑制细胞凋亡及促进细胞增殖的作用,进一步提示Hp-L感染后可能通过抑制细胞凋亡而导致胃癌的发生、发展。

细胞凋亡机制非常复杂,其过程受到严密的多方面控

制。caspase的级联激活是凋亡过程的关键环节之一。IAP家族蛋白是控制caspase激活的重要因素,某些IAP成员异常高表达常引起组织细胞凋亡受阻,导致肿瘤的发生、发展。Livin是新近发现的一个IAP家族成员,与多种肿瘤的发生密切相关。

Yagihashi等^[24]在胃癌患者的血清中检测到抗Livin抗体,证实了Livin在胃癌中的表达。王同杉等^[25]取40例胃癌患者的胃癌组织、8例癌旁胃组织及5例非肿瘤性胃部疾病胃黏膜组织活检,然后采用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测胃癌组织中Livin α 、Livin β 的mRNA的表达,并用Western blot分析Livin蛋白的表达。RT-PCR结果显示40例胃癌组织中Livin表达阳性率为47.5%,而在正常和癌旁组织未检出阳性结果;Western blot结果显示胃癌中Livin蛋白表达情况在Livin mRNA阳性的胃癌和细胞样本中,均能检测到蛋白的阳性表达,且蛋白的表达水平与RT-PCR结果基本一致。并得出结论:Livin在胃癌组织中表达增高,可作为胃癌的分子标志物,可能成为胃癌治疗的新分子靶点。汪志兵等^[26]采用RT-PCR检测胃癌组织中Livin α 、Livin β 的mRNA表达,结果显示凋亡抑制蛋白Livin在胃癌组织中表达阳性率高于正常组织和癌旁组织,差异有统计学意义。尽管目前胃癌组织中Livin的研究较少,但已有的研究表明Livin在胃癌组织中的表达明显上调,其在胃癌组织中的特异性高表达,提示它在癌细胞的生长、增殖、凋亡过程中起着广泛的促进作用,有助于早期诊断和预后评估。

Hp-L感染后,引起IAP家族的Livin基因表达的失调,出现细胞凋亡异常,有可能是Hp-L诱导胃癌发生、发展的途径之一。不过Hp-L感染时Livin蛋白在胃癌发生、发展中的作用尚未见报道,以及对于Livin基因表达的诱导因素、调节过程、抗凋亡具体机制和两种异构体功能的差异等问题尚未完全清楚,有待进一步的探索。Hp-L可能通过影响Livin蛋白表达而导致胃黏膜上皮细胞凋亡调控异常,这也可能是Hp-L的致癌机制之一。因此从细胞凋亡的角度探讨Hp-L感染与胃癌的关系将有助于揭示Hp-L的致病机制和胃癌的发生机制,为胃癌及癌前病变的防治研究提供新的思路。

[参 考 文 献]

[1] 贾继辉,黄谷良,林特夫.幽门螺杆菌L型超微结构的研究[J].中华微生物和免疫学杂志,1996,16(1):19-21.
 [2] Hariu H, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 2(11):1000-1009.
 [3] 于东红,王萍,万敏,等.幽门螺杆菌和HPV16、18感染在人食管癌中同步检测的对比分析[J].中国人兽共患病杂志, 2000, 16(6):48-50.
 [4] 余菲菲.幽门螺杆菌的球形变异及其特征和意义[J].中国微生物生态学杂志, 2001, 13(5):299-300.
 [5] 于东红,王萍,叶荷萍.127例胃癌幽门螺杆菌L型感染与胃癌的研究[J].浙江肿瘤杂志, 1997, 3(2):82-84.
 [6] Chuang MH, Wu MS, Lin JT, et al. Proteomic analysis of proteins expressed by *Helicobacter Pylori* under oxidative stress [J]. Proteomics, 2005, 5(15):3895-3901.

[7] Nilsson HO, Blom J, Abu-Al-Soud W, et al. Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter Pylori* [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(1): 11-19.
 [8] 吴小茜,余菲菲,陈豪.球形幽门螺杆菌感染BALB/c小鼠动物实验研究[J].山西医科大学学报, 2006, 37(7):685-687.
 [9] 叶兵,王均,吴洪亮,等.胃癌患者幽门螺杆菌L型的临床研究[J].中国现代医药杂志, 2007, 9(6):7-9.
 [10] 韩雷,余菲菲.球形幽门螺杆菌研究进展[J].海南医学, 2006, 17(8):152-154.
 [11] Liu B, Han M, Wen JK, et al. Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment [J]. Cancer Letter, 2007, 250(2):168-176.
 [12] Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member [J]. Biol Chem, 2001, 276(5):3238-3246.
 [13] Lin JH, Deng G, Huang Q, et al. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279(3):820-831.
 [14] Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, et al. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas [J]. Curr Biol, 2000, 10(21):1359-1366.
 [15] Ashbab Y, Alian A, Polliack A, et al. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern [J]. FEBS Lett, 2001, 495(1-2): 56-60.
 [16] 吴桂新,王洪林.凋亡抑制蛋白Livin [J].实用医学杂志, 2008, 24(4):672-674.
 [17] 彭志敏,戴朝六,金山.凋亡抑制蛋白Livin的研究进展 [J].中国实验诊断学, 2008, 12(5):689-691.
 [18] Vucic D, Deshayes K, Ackerly H, et al. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP) [J]. Biol Chem, 2002, 277(14):12275-12279.
 [19] Sanna MG, da Silva Correia J, Ducrey O, et al. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms; the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(6): 1754-1766.
 [20] Ma L, Huang Y, Song Z, et al. Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway [J]. Cell Death Differ, 2006, 13(12):2079-2088.
 [21] 叶兵,王钧,吴洪亮,等.胃癌患者幽门螺杆菌L型感染的临床研究[J].中国现代医药杂志, 2007, 9(6):7-9.
 [22] Bode G, Mauch F, Malfertheier P. The coccoid forms of *Helicobacter Pylori*. Criteria for viability [J]. Epidemiol Infect, 2000, 111(6):483-490.
 [23] 陈豪,张静,余菲菲,等.球形幽门螺杆菌对SGC-7901细胞增殖的影响[J].中国微生物生态学杂志, 2004, 16(2):78-79.
 [24] Yagihashi A, Asanuma K, Nakamura M, et al. Detection of anti-survivin antibody in gastrointestinal cancer patients [J]. Clin Chem, 2001, 47(9):1729-1731.
 [25] 王同杉,游思洪,葛梅,等.凋亡抑制蛋白Livin在人胃癌中的表达以及和survivin表达的关系[J].南京医科大学学报·自然科学版, 2006, 26(1):39-43.
 [26] 汪志兵,张振玉,罗新华,等. Livin基因在胃癌中的表达研究 [J].现代肿瘤医学, 2008, 16(4):595-597.