

幽门螺杆菌感染对 AOM/DSS 诱导的小鼠炎症相关性结直肠癌的影响及免疫机制

李罗娜 刘芸 张鸿晨 吴婷 戴芸 王蔚虹

北京大学第一医院消化内科, 北京 100034

通信作者: 王蔚虹, Email: wangweihong2581@163.com

【摘要】 目的 探讨幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染对氧化偶氮甲烷(AOM)联合葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠炎症相关性结直肠癌的影响及相关机制。方法 C57BL/6J 小鼠 60 只, 随机分为正常对照组(Control 组, $n=9$)、*H.pylori* 感染组(Hp 组, $n=9$)、AOM/DSS 诱导组(AOM/DSS 组, $n=21$)和 *H.pylori* 感染合并 AOM/DSS 诱导组(Hp+AOM/DSS 组, $n=21$), 分别在 AOM/DSS 造模第 19、45 和 85 天处死小鼠。苏木精-伊红染色检测结肠组织病理学变化, 流式细胞术检测结肠组织中辅助性 T 细胞 17(Th17)和调节性 T 细胞(Treg)比例, 实时定量聚合酶链反应和酶联免疫吸附法检测白细胞介素(IL)-10、IL-17A、维 A 酸相关孤儿受体(ROR) γ t 和叉头/翼状转录因子(Foxp3)等 Th17 和 Treg 细胞相关因子的表达水平。结果 Control 组和 Hp 组小鼠结肠黏膜结构完整; Hp+AOM/DSS 组小鼠结肠炎症(第 19 天)和异型增生(第 45 天)阶段的病理评分以及(第 85 天)结肠肿瘤负荷均低于 AOM/DSS 组(均 $P<0.05$)。在造模第 85 天, Hp+AOM/DSS 组小鼠结肠组织中 CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺Th17 和 CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例(1.88±0.17 比 2.07±0.89, 1.06±0.13 比 1.89±0.23)及 ROR γ t 和 IL-17A 的 mRNA 表达水平(1.08±0.59 比 2.35±1.35, 2.96±0.92 比 7.78±4.57)均低于 AOM/DSS 组(均 $P<0.05$), 而 CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 和 CD3⁺CD4⁺IL-10⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例(20.60±3.39 比 15.63±2.71, 2.94±0.52 比 2.14±0.47)及 Foxp3 和 IL-10 的 mRNA 表达水平[17.59(13.77, 24.87)比 6.27(4.41, 13.36), 3.52(1.59, 5.99)比 1.17(1.15, 2.75)]均高于 AOM/DSS 组(均 $P<0.05$)。结论 胃内 *H.pylori* 感染减缓 AOM/DSS 诱导的小鼠结肠炎症-异型增生-肿瘤进程, 伴随结肠 Th17 细胞比例减少和 Treg 细胞比例增加。

【关键词】 幽门螺杆菌; 辅助性 T 细胞 17; 调节性 T 细胞; 炎症相关性结直肠癌

基金项目: 北京市自然科学基金(7182165)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20200112-00076

The effects and immunologic mechanisms of *Helicobacter pylori* infection on AOM/DSS induced colitis-associated cancer in mice

Li Luona, Liu Yun, Zhang Hongchen, Wu Ting, Dai Yun, Wang Weihong

Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Corresponding author: Wang Weihong, Email: wangweihong2581@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects and potential mechanisms of *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) infection on azoxymethane (AOM)/dextran sulfate sulphate (DSS) induced colitis-associated cancer (CAC) in mice. **Methods** A total of 60 specific pathogen free C57BL/6J mice were randomly divided into four groups: normal control group (control group, $n=9$), *H.pylori*-infected group (Hp group, $n=9$), AOM/DSS-treated group (AOM/DSS group, $n=21$) and AOM/DSS-treated with *H.pylori* infection group (Hp+AOM/DSS group, $n=21$). Mice were sacrificed on day 19, 45 or 85 after AOM/DSS challenge. Histopathological changes in colonic tissues were determined by hematoxylin and eosin staining. Flow cytometry analysis was performed to determine T helper cells 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in colonic lamina propria. The expression levels of Th17- and Treg-associated cytokines and transcription factors [interleukin (IL)-10, IL-17A, retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t (ROR) γ t and forkhead box P3 (Foxp3)] were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** There were no histopathological changes in colonic tissues of mice in control group and Hp group. *H.pylori* colonization reduced the histopathological scores at the stages of colitis (day 19) and dysplasia (day 45), and also decreased tumor load (day 85) in mice treated with AOM/DSS (all $P<0.05$). Compared with AOM/DSS group, the percentages of CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺Th17 and CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺Foxp3⁺Treg cells (1.88±0.17 vs 2.07±0.89, 1.06±0.13 vs 1.89±0.23) and the expression levels of ROR γ t and IL-17A (1.08±0.59 vs

2.35±1.35, 2.96±0.92 vs 7.78±4.57) were decreased in colonic tissues of Hp+AOM/DSS group (all $P<0.05$). The percentages of CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg and CD3⁺CD4⁺IL-10⁺Foxp3⁺Treg cells (20.60±3.39 vs 15.63±2.71, 2.94±0.52 vs 2.14±0.47) and the expression levels of Foxp3 and IL-10 [17.59(13.77,24.87) vs 6.27(4.41,13.36), 3.52(1.59,5.99) vs 1.17(1.15,2.75)] in colonic tissues were higher (all $P<0.05$) in mice of Hp+AOM/DSS group compared with AOM/DSS group on day 85. **Conclusion** *H.pylori* infection slows the progress from inflammation to tumor in a AOM / DSS induced CAC modal, accompanied with the downregulation of Th17 response and upregulation of Treg response.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; T helper cells 17; Regulatory T cells; Colitis-associated cancer

Fund program: Natural Science Foundation of Beijing (7182165)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20200112-00076

炎症性肠病(IBD)是一种慢性非特异性肠道炎症性疾病,其长期反复的炎症刺激,增加炎症相关性结肠癌(CAC)发病风险^[1]。新近的荟萃分析^[2]显示,幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染降低IBD发病风险。本课题组前期研究表明,*H.pylori*感染对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠慢性结肠炎具有保护作用^[3]。然而,*H.pylori*感染对CAC的作用尚不明确。本研究建立合并*H.pylori*感染的氧化偶氮甲烷(AOM)/DSS诱导小鼠CAC模型,探讨*H.pylori*感染对结肠炎症-异型增生-肿瘤进程的影响及相关机制。

材料与方法

1. 实验动物:5周龄无特定病原体级雄性C57BL/6J小鼠60只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。本研究经北京大学第一医院实验动物福利伦理委员会审查通过(批号J201823)。

2. 实验菌株及试剂:*H.pylori*菌株使用悉尼菌株(SS1),由北京大学第一医院消化内科保存。AOM购自美国Sigma公司;DSS(相对分子质量36 000~50 000)购自美国MP Biomedicals公司。

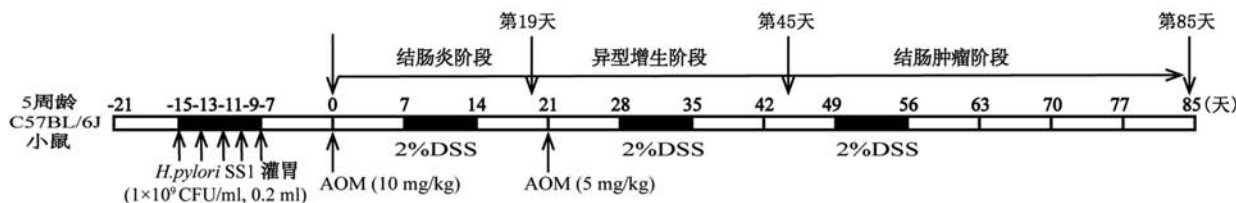
3. 动物模型的建立:实验小鼠随机分为4组:正常对照组(Control组, $n=9$)、*H.pylori*感染组(Hp组, $n=9$)、AOM/DSS诱导组(AOM/DSS组, $n=21$)和*H.pylori*感染合并AOM/DSS诱导组(Hp+AOM/DSS组, $n=21$)。适应性喂养1周后, Hp组和Hp+AOM/DSS组给予含 1×10^9 集落形成单位(CFU)/ml

H.pylori SS1的脑心浸液灌胃,每只每次灌胃0.2 ml,隔日1次,共5次。Control组和AOM/DSS组使用相同量不含*H.pylori*的脑心浸液灌胃。灌胃结束1周后, AOM/DSS组和Hp+AOM/DSS组小鼠在造模第0天腹腔注射AOM(10 mg/kg),一周后自由饮用2% DSS溶液7 d,改换正常饮水2周,期间于第21天补注AOM(5 mg/kg)一次,再次饮用2% DSS溶液7 d,换正常饮水2周,共3个循环。Control组和Hp组给予正常饮水。分别在AOM/DSS造模第19天结肠炎症阶段、第45天异型增生阶段和第85天结肠肿瘤阶段处死小鼠(图1)。

4. 标本采集与处理:小鼠处死后取胃,沿胃大弯剪开,清除内容物,留取标本;取全结肠,测量自肛门至盲肠长度,纵行切开,清除肠内容物,造模第85天测量结肠肿瘤直径,以单只小鼠所有肿瘤直径之和作为单只小鼠的肿瘤负荷,留取标本。

5. 苏木精-伊红(HE)染色及组织病理学评分:胃和结肠组织经石蜡包埋切片,常规HE染色,光学显微镜下观察并进行病理学评分。胃组织病理学评分采用胃黏膜损伤评分标准^[4],结肠组织病理学评分按文献^[5]进行评定。

6. 免疫组化染色:石蜡切片经脱蜡水化,枸橼酸钠微波热修复,牛血清白蛋白室温封闭,一抗4℃过夜,内源性过氧化物酶阻断剂封闭和二抗室温孵育,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染后脱水封片。兔源抗*H.pylori*浓度为1:250,兔源抗Ki67浓度为1:200,每张切片随机选取10个高倍镜



注:*H.pylori* SS1为幽门螺杆菌悉尼菌株;CFU为集落形成单位;AOM为氧化偶氮甲烷;DSS为葡聚糖硫酸钠

图1 *H.pylori*感染合并AOM/DSS诱导小鼠CAC模型处理示意图

视野 (HPF), 计数免疫组化标记阳性细胞数。

7. 实时定量聚合酶链反应 (qPCR) 检测辅助性 T 细胞 17 (Th17) 和调节性 T 细胞 (Treg) 相关因子的 mRNA 表达水平: 结肠组织经 Trizol 试剂、氯仿、异丙醇等提取总 RNA, 随后反转录为 cDNA, 使用 SYBR Green PCR Mix 试剂盒以 cDNA 为模板进行 qPCR。引物序列见表 1, 以小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参基因, 运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对 mRNA 表达水平。

8. 结肠固有层免疫细胞分离: 按文献 [6] 方法取小鼠结肠, 清除内容物, 用预冷磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 冲洗, 切割成约 1 cm 组织块, 加入含有 5 mmol/L 乙二胺四乙酸和 1 mmol/L 二硫苏糖醇的 Hank's 平衡盐溶液中, 37 °C 摇床孵育 20 min, 再重复 1 次; 使用 PBS 洗净, 眼科剪剪碎, 加入含有 0.5 mg/ml 胶原酶 IV、0.5 mg/ml DNA 酶 I 和 3 mg/ml 中性蛋白酶 II 的 RPMI 1640 培养基中, 37 °C 摇床孵育 20 min, 40 μ m 的细胞滤网过滤, 回收残余组织再重复 1 次, 收集两次细胞滤液, 离心后计数用适量 RPMI 1640 完全培养基重悬, 加入 50 ng/ml 佛波酯和 1 μ g/ml 离子霉素以及 5 μ g/ml 布雷非德菌素 A 刺激 6 h。

9. 流式细胞术检测 Th17 和 Treg 细胞比例: 取 100 μ l 细胞悬液, 加入抗小鼠 APC/Cy7-CD3 抗体和 APC-CD4 抗体表面染色, 经固定、破膜后加入抗小鼠 PE-IL-17A 抗体进行 Th17 细胞染色。Treg 细胞染色时, 加入抗小鼠 APC/Cy7-CD3 抗体、FITC-CD4 抗体和 Percp/Cy5.5-CD25 抗体表面染色, 经固定、破膜后加入抗小鼠 Alexa Flour 647-Foxp3 抗体及 PE-IL-17A 或 PE-IL-10 抗体进行染色, Flow Jo7.6 软件分析。

10. 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 IL-10 和 IL-17 蛋白表达水平: 取小鼠结肠组织称重, 加入适量预冷 PBS, 使用组织细胞破碎仪获得组织匀浆,

采用 BCA 法测定蛋白浓度。按照 ELISA 试剂盒 (购自美国 R&D systems 公司) 说明书操作检测 IL-10 和 IL-17 蛋白表达水平, 以 pg/mg 蛋白表示。

11. 统计学方法: 采用 SPSS 20.0 软件和 GraphPad Prism 7.0 软件对数据进行分析, 体重、结肠长度、肿瘤负荷、Ki67 阳性细胞数、Th17、Treg、IL-17A⁺Foxp3⁺Treg 和 IL-10⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例、造模第 19 和 85 天时所有组的 (ROR γ t、IL-17A、IL-21 和 TGF- β) mRNA 结果和 IL-17 蛋白水平、造模第 19 天时所有组的 (Foxp3 和 IL-10) mRNA 结果和 IL-10 蛋白水平以及造模第 85 天 (AOM/DSS 组和 Hp+AOM/DSS 组) 的 IL-10 蛋白水平符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用独立样本 *t* 检验进行两组比较; 胃组织和结肠组织的病理评分为非正态分布; 造模第 85 天时 Hp+AOM/DSS 组的 (Foxp3 和 IL-10) mRNA 结果为正态分布, 而 AOM/DSS 组为非正态分布; Control 组的 IL-10 蛋白水平为正态分布, 而 Hp 组为非正态分布, 均以 $M (Q_1, Q_3)$ 表示, 采用 Mann-Whitney *U* 检验进行两组比较。双侧检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

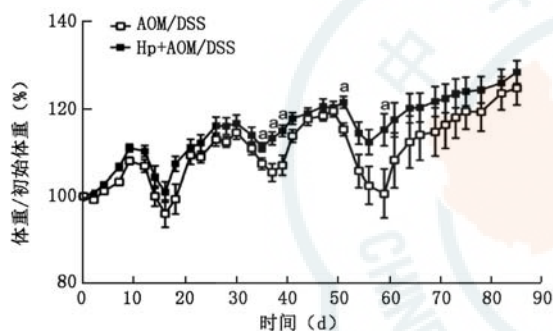
1. *H.pylori* 感染对小鼠胃组织病理学的影响: Hp 组和 Hp+AOM/DSS 组小鼠胃组织使用免疫组化染色检测 *H.pylori* 定植情况, 结果显示造模第 85 天 Hp+AOM/DSS 组有 1 只小鼠胃黏膜 *H.pylori* 抗体染色阴性 (后续研究中剔除)。HE 染色见胃黏膜上皮受损, 固有层中炎性细胞浸润。Hp 组和 Hp+AOM/DSS 组小鼠胃组织病理评分为 2.00 (2.00, 3.00) 和 2.00 (2.00, 3.25) 分, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。Control 组和 AOM/DSS 组小鼠胃黏膜 *H.pylori* 抗体免疫组化染色均为阴性, 胃黏膜未见明显组织病理学变化。

表 1 实时定量 PCR 引物序列表

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
GAPDH	AGGTCCGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
ROR γ t	GACCCACACCTCACAAATTGA	ACTAGGCCACATTACCCTGCT
IL-17A	CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC	AGCTTTCCCTCCGCAATGACACAG
IL-21	GGACCCTTGCTGTCTGGTAG	TGTGGAGCTGATAGAAGTTTCAGG
Foxp3	CACCTATGCCACCCTTATCCG	CATGCCAGTAAACCAATGCTAGA
IL-10	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGACCATCTG
TGF- β	CCACCTGCAAGACCATCGA	CTGGCGAGCCTTACTTTGGAC

注: IL 为白细胞介素; ROR γ t 为维 A 酸相关孤儿受体 γ t; Foxp3 为叉头/翼状转录因子; TGF- β 为转化生长因子- β ; GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶

2. *H. pylori* 感染对小鼠体重、结肠长度和肿瘤负荷的影响: 给予 DSS 后 AOM/DSS 组和 Hp+AOM/DSS 组小鼠体重均下降, 在第 2 轮和第 3 轮给予 DSS 期间 Hp+AOM/DSS 组小鼠体重下降程度低于 AOM/DSS 组 ($P<0.05$) (图 2)。造模第 19 天, 与 Control 组相比, AOM/DSS 组小鼠结肠长度较短 ($P<0.01$), 而 Hp+AOM/DSS 组小鼠结肠长度长于 AOM/DSS 组 [(8.65±0.71) 比 (7.75±0.47) cm, $P<0.05$]。AOM/DSS 组和 Hp+AOM/DSS 组小鼠造模第 85 天均有肿瘤生长, Hp+AOM/DSS 组小鼠结肠肿瘤负荷低于 AOM/DSS 组 [(9.98±5.70) 比 (19.38±10.17) mm, $P<0.05$]; Control 组和 Hp 组小鼠未见体重下降和结肠肿瘤生长。



注: AOM/DSS 为 AOM/DSS 诱导组; Hp+AOM/DSS 为 *H. pylori* 感染合并 AOM/DSS 诱导组; * $P<0.05$

图 2 AOM/DSS 造模过程中各组小鼠体重变化情况

3. *H. pylori* 感染对小鼠结肠组织病理学的影响: 光镜下 HE 染色结果显示, Control 组和 Hp 组小鼠结肠黏膜结构完整, 未见明显炎症、溃疡和增生 (图 3A、D); 造模第 19 天, AOM/DSS 组和 Hp+AOM/DSS 组小鼠结肠上皮损伤, 隐窝结构紊乱, 可见溃

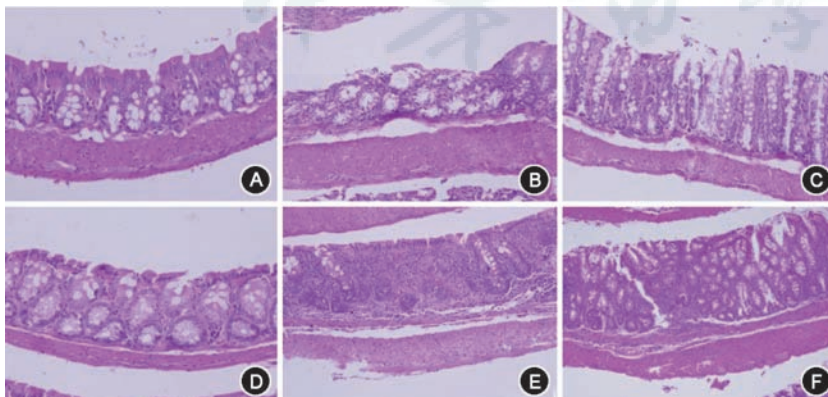


图 3 各组小鼠结肠组织不同时间病理学检查结果 (HE 染色 ×200) A: 正常对照 (Control) 组第 19 天; B: AOM/DSS 诱导 (AOM/DSS) 组第 19 天; C: *H. pylori* 感染合并 AOM/DSS 诱导 (Hp+AOM/DSS) 组第 19 天; D: *H. pylori* 感染 (Hp) 组第 19 天; E: AOM/DSS 诱导 (AOM/DSS) 组第 45 天; F: *H. pylori* 感染合并 AOM/DSS 诱导 (Hp+AOM/DSS) 组第 45 天

疡形成, 较多淋巴细胞浸润 (图 3B、C), Hp+AOM/DSS 组结肠组织病理评分低于 AOM/DSS 组 [7.00 (7.00, 8.00) 比 8.00 (8.00, 10.00) 分, $P<0.05$]; 造模第 45 天, AOM/DSS 组和 Hp+AOM/DSS 组结肠组织除炎症表现外, 杯状细胞减少, 隐窝增厚, 黏膜增生 (图 3E、F), Hp+AOM/DSS 组病理评分低于 AOM/DSS 组 [8.00 (8.00, 9.00) 比 10.00 (9.00, 10.00) 分, $P<0.05$]; 造模第 85 天, AOM/DSS 组和 Hp+AOM/DSS 组小鼠结肠黏膜见高级别异型增生, AOM/DSS 组有小鼠结肠出现黏膜下癌, 并且 AOM/DSS 组结肠肿瘤组织中 Ki67 阳性细胞数高于 Hp+AOM/DSS 组 [(234.00±20.74) 比 (170.00±39.37) 个/HPF, $P<0.05$] (图 4)。

4. *H. pylori* 感染对小鼠结肠组织 Th17 和 Treg 细胞比例的影响: 造模第 19、45 和 85 天流式分析显示, Hp+AOM/DSS 组小鼠结肠组织的 Th17 (CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺) 细胞比例低于 AOM/DSS 组, 而 Treg (CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) 细胞比例高于 AOM/DSS 组 (均 $P<0.05$) (图 5, 表 2); 此外, Control 组与 Hp 组小鼠结肠 Th17 和 Treg 细胞比例差异无统计学意义 ($P>0.05$)。造模第 85 天, Hp+AOM/DSS 组 CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例低于 AOM/DSS 组 [(1.06±0.13)% 比 (1.89±0.23)%, $P<0.05$], 而 CD3⁺CD4⁺IL-10⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例高于 AOM/DSS 组 [(2.94±0.52)% 比 (2.14±0.47)%, $P<0.05$] (图 6)。

5. *H. pylori* 感染对小鼠结肠组织 Th17 和 Treg 细胞相关因子表达水平的影响: 造模第 19 和 85 天小鼠结肠组织的 qPCR 结果显示, 与 AOM/DSS 组相比, Hp+AOM/DSS 组结肠组织 Th17 细胞相关因子 ROR γ t, IL-17A 和 IL-21 的 mRNA 表达水平较低,

Treg 细胞相关因子 Foxp3 和 IL-10 的 mRNA 表达水平较高; 而 TGF- β 的 mRNA 表达水平仅在造模第 19 天 Hp+AOM/DSS 组高于 AOM/DSS 组 (均 $P<0.05$) (表 3、4)。Control 组与 Hp 组小鼠结肠组织 Th17 和 Treg 细胞的上述相关因子 mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。ELISA 与 qPCR 结果一致, Hp+AOM/DSS 组 IL-17 蛋白表达水平低于 AOM/DSS 组 [第 19 天 (2.84±0.88) 比 (4.40±1.22) pg/mg, 第 85 天 (2.46±0.34) 比 (3.04±0.45) pg/mg, 均 $P<0.05$], IL-10 蛋白表达水平高于

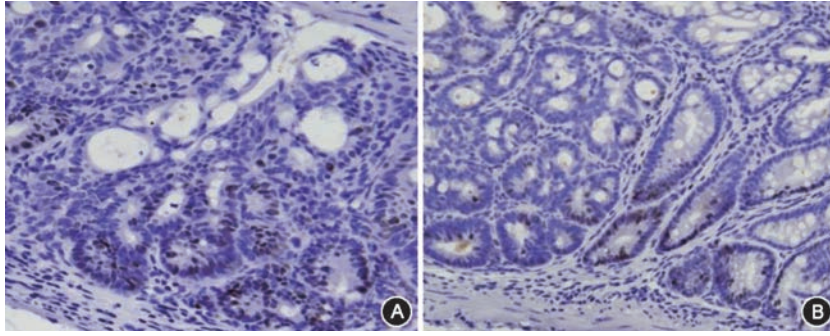


图 4 造模第 85 天各组小鼠结肠肿瘤组织 Ki67 表达水平(免疫组化染色 ×400) A: AOM/DSS 诱导(AOM/DSS)组; B: *H.pylori* 感染合并 AOM/DSS 诱导(Hp+AOM/DSS)组

感染合并 AOM/DSS 诱导小鼠 CAC 模型,探讨 *H.pylori* 感染对炎症相关肿瘤模型小鼠炎症到肿瘤进程的影响及机制。研究表明, *H.pylori* 感染可减轻 AOM/DSS 诱导的小鼠体重下降、结肠长度缩短和结肠炎症病理评分,这些指标与 DSS 诱导的结肠炎症严重程度相关^[7]。该结果与近期报道的 *H.pylori* 感染可减轻 DSS 诱导的小鼠急性和慢性结肠炎结果一致^[3,8]。本研究

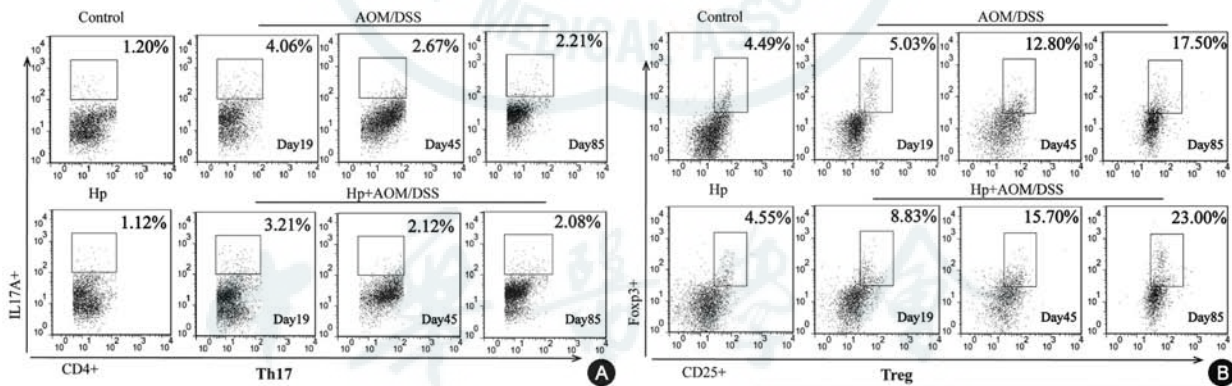
AOM/DSS 组[第 19 天(2.03±0.83)比(1.12±0.66) pg/mg,第 85 天(2.32±0.48)比(1.67±0.32) pg/mg,均 $P < 0.05$]。Control 组与 Hp 组的 IL-10[1.38(0.81, 2.61) 比 1.07(0.98, 2.03) pg/mg]和 IL-17 蛋白表达水平 [(2.21±0.41)比(2.54±0.39)pg/mg]差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

同时发现 *H.pylori* 感染降低异型增生阶段结肠病理评分和肿瘤阶段结肠肿瘤负荷及肿瘤组织中增殖蛋白 Ki67 表达水平。有研究显示,在 AOM/DSS 模型中结肠慢性炎症程度与肿瘤数量和大小均呈正相关^[9]。推测 *H.pylori* 感染通过减轻 AOM/DSS 诱导的小鼠结肠炎症,减缓 CAC 的病理进程。

讨 论

近年来,越来越多的研究提示, *H.pylori* 感染可能是 IBD 的保护性因素,但是未见有研究探讨 *H.pylori* 感染对 CAC 的影响。本研究建立 *H.pylori*

既往研究显示, *H.pylori* 感染影响感染者外周血中 Treg 细胞比例^[10],并通过调节胃黏膜 Th17/Treg 细胞平衡促进其持续定植^[11]。近期有研究发现, *H.pylori* 感染可以通过下调 Th17 细胞比例来减轻三硝基苯磺酸诱导的小鼠结肠炎^[12]。本课题组前期研究也提示, *H.pylori* 感染可能通过上调 Treg



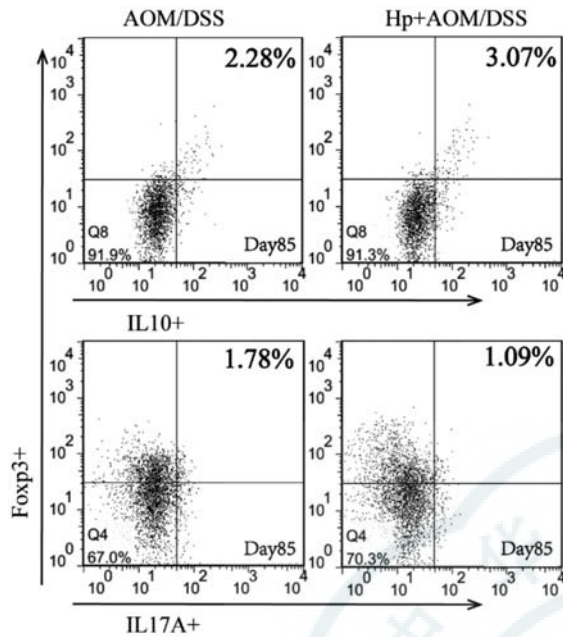
注:IL-17A 为白细胞介素-17A;Foxp3 为叉头/翼状转录因子;Th17 为辅助性 T 细胞 17;Treg 为调节性 T 细胞;Control 为正常对照组;Hp 为 *H.pylori* 感染组;AOM/DSS 为 AOM/DSS 诱导组;Hp+AOM/DSS 为 *H.pylori* 感染合并 AOM/DSS 诱导组

图 5 各组小鼠结肠组织 Th17(A)和 Treg(B)细胞的流式分析图

表 2 各组小鼠结肠组织不同时间 Th17 和 Treg 细胞比例($\bar{x} \pm s$)

组别	Th17 细胞比例 (%)			Treg 细胞比例 (%)		
	第 19 天	第 45 天	第 85 天	第 19 天	第 45 天	第 85 天
AOM/DSS 组	4.06±0.29	2.80±0.30	2.07±0.89	4.87±0.82	12.06±1.64	15.63±2.71
Hp+AOM/DSS 组	3.27±0.19	2.18±0.15	1.88±0.17	8.49±2.05	14.90±1.50	20.60±3.39
t 值	5.493	4.483	2.236	-4.022	-3.117	-2.804
P 值	<0.001	0.001	0.049	0.002	0.011	0.019

注:Th17 为辅助性 T 细胞 17;Treg 为调节性 T 细胞;AOM/DSS 为 AOM/DSS 诱导组;Hp+AOM/DSS 为 *H.pylori* 感染合并 AOM/DSS 诱导组;每阶段每组小鼠为 6 只



注:IL为白细胞介素;Fxp3为叉头/翼状转录因子;AOM/DSS为AOM/DSS诱导组;Hp+AOM/DSS为*H.pylori*感染合并AOM/DSS诱导组

图6 各组小鼠结肠组织IL-17A⁺Treg细胞和IL-10⁺Treg细胞的流式分析图

细胞应答和下调Th17细胞应答拮抗DSS诱导的小鼠慢性结肠炎^[3]。在CAC动物模型中,IL-17A和IL-21基因敲除小鼠经AOM/DSS诱导后结肠肿瘤数量和大小低于野生型小鼠,提示Th17细胞因子IL-17A和IL-21在实验性CAC具有促肿瘤作用^[9,13]。Tosolini等^[14]发现Th17细胞相关因子表达量增高的结直肠癌患者预后差,而Treg细胞转录因子Fxp3表达量高的患者无病生存期更长。

Pastille等^[15]的研究表明,CAC小鼠模型中Treg细胞和IL-10表达升高,但是Treg细胞中特异性IL-10失活的CAC小鼠肿瘤更严重。以上结果表明,Th17和Treg细胞失衡参与结肠炎症到肿瘤的进程。本研究显示,在结肠炎症到肿瘤过程中,*H.pylori*感染可降低结肠组织Th17细胞比例及IL-17A和IL-21的表达,升高Treg细胞比例及Fxp3和IL-10的表达,提示*H.pylori*感染可能是通过调节Th17/Treg细胞平衡减缓CAC进程。

新近的研究发现,Treg细胞中的IL-17⁺Fxp3⁺Treg细胞与经典的IL-10⁺Fxp3⁺Treg细胞具有完全不同的功能,对IBD和CAC的发生发展起促进作用。Hovhannisyan等^[16]研究发现,克罗恩病患者结肠黏膜中有IL-17⁺Fxp3⁺细胞,表达ROR γ t,仍留有体外抑炎功能。Ueno等^[17]研究发现,IBD患者外周血中CD4⁺IL-17⁺Fxp3⁺细胞比例高于健康对照者,且表达ROR γ t和Fxp3,但Treg细胞向表达ROR γ t和分泌IL-17转化后,其抑制T细胞的功能降低。Rizzo等^[18]推测这种Treg细胞表达ROR γ t和Fxp3是向Th17促炎症表型转化的中间阶段,且在CAC动物模型中发现,肿瘤局部Treg细胞表达ROR γ t后不能抑制DC细胞产生IL-6,导致肿瘤生长;但当敲除ROR γ t基因后肿瘤局部Treg细胞的抑制性分子CTLA-4表达量增加,降低IL-6和肿瘤发生率。本研究发现,*H.pylori*感染可以降低结肠肿瘤组织中IL-17⁺Treg细胞比例,升高IL-10⁺Treg细胞比例,提示*H.pylori*感染可能通过减少肿瘤组织中Treg细胞向IL-17⁺Treg表型转化,进而拮抗小鼠

表3 各组小鼠结肠组织不同时间Th17细胞相关因子mRNA表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	第19天			第85天		
	ROR γ t	IL-17A	IL-21	ROR γ t	IL-17A	IL-21
AOM/DSS组(n=21)	4.22±2.26	12.76±5.28	3.78±2.53	2.35±1.35	7.78±4.57	0.63±0.31
Hp+AOM/DSS组(n=21)	1.81±1.04	6.85±2.49	1.13±0.78	1.08±0.59	2.96±0.92	0.20±0.14
t值	2.374	2.281	2.629	2.398	2.758	3.046
P值	0.039	0.048	0.023	0.038	0.020	0.012

注:IL为白细胞介素;ROR γ t为维A酸相关孤儿受体 γ t;AOM/DSS为AOM/DSS诱导组;Hp+AOM/DSS为*H.pylori*感染合并AOM/DSS诱导组

表4 各组小鼠结肠组织不同时间Treg细胞相关因子mRNA表达水平

组别	第19天			第85天		
	Fxp3($\bar{x}\pm s$)	IL-10($\bar{x}\pm s$)	TGF- β ($\bar{x}\pm s$)	Fxp3 [M(Q ₁ ,Q ₃)]	IL-10 [M(Q ₁ ,Q ₃)]	TGF- β ($\bar{x}\pm s$)
AOM/DSS组(n=21)	92.15±44.96	4.34±2.58	5.67±2.42	6.27(4.41,13.36)	1.17(1.15,2.75)	4.96±2.11
Hp+AOM/DSS组(n=21)	199.17±84.98	8.93±3.78	9.17±2.41	17.59(13.77,24.87)	3.52(1.59,5.99)	3.95±2.07
t/Z值	-2.760	-2.386	-2.605	-1.984	-2.236	0.963
P值	0.019	0.041	0.024	0.047	0.025	0.352

注:Fxp3为叉头/翼状转录因子;IL为白细胞介素;TGF- β 为转化生长因子- β ;AOM/DSS为AOM/DSS诱导组;Hp+AOM/DSS为*H.pylori*感染合并AOM/DSS诱导组

CAC 发展,但 *H.pylori* 感染调控 Treg 细胞表型转化的机制尚不清楚。

综上所述,胃内 *H.pylori* 感染可减缓 AOM/DSS 诱导的小鼠结肠炎症-异型增生-肿瘤的进程,伴随结肠 Th17 细胞比例降低和 Treg 细胞比例升高,并且减少 Treg 细胞向分泌 IL-17 促炎症促肿瘤表型的转化,提示 *H.pylori* 感染可能通过调节结肠 Th17/Treg 细胞平衡拮抗炎症相关结肠肿瘤进程。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Feagins LA, Souza RF, Spechler SJ. Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2009,6(5):297-305. DOI: 10.1038/nrgastro.2009.44.
- [2] Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, et al. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: an umbrella review of Meta-analyses[J]. Gastroenterology, 2019, 157(3): 647-659.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.04.016.
- [3] Zhang H, Dai Y, Liu Y, et al. *Helicobacter pylori* colonization protects against chronic experimental colitis by regulating Th17 / Treg balance[J]. Inflamm Bowel Dis, 2018, 24(7): 1481-1492. DOI: 10.1093/ibd/izy107.
- [4] Genta RM, Lew GM, Graham DY. Changes in the gastric mucosa following eradication of *Helicobacter pylori*[J]. Mod Pathol, 1993,6(3):281-289.
- [5] Zaki MH, Vogel P, Malireddi RK, et al. The NOD-like receptor NLRP12 attenuates colon inflammation and tumorigenesis[J]. Cancer Cell, 2011, 20(5): 649-660. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.10.022.
- [6] Weigmann B, Tubbe I, Seidel D, et al. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue[J]. Nat Protoc, 2007, 2(10): 2307-2311. DOI: 10.1038/nprot.2007.315.
- [7] 葛君,李亚俊,刘爱琴,等.慢性溃疡性结肠炎小鼠的肠黏膜屏障受损的研究[J].中华医学杂志,2018,98(48):3950-3953. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.48.009.
- [8] Li X, Tan J, Zhang F, et al. *H.pylori* infection alleviates acute and chronic colitis with the expansion of regulatory B cells in mice[J]. Inflammation, 2019,42(5):1611-1621. DOI: 10.1007/s10753-019-01022-0.
- [9] Hyun YS, Han DS, Lee AR, et al. Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer[J]. Carcinogenesis, 2012,33(4):931-936. DOI: 10.1093/carcin/bgs106.
- [10] Cook KW, Letley DP, Ingram RJ, et al. CCL20 / CCR6-mediated migration of regulatory T cells to the *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa[J]. Gut, 2014,63(10):1550-1559. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-306253.
- [11] Ikuse T, Blanchard TG, Czinn SJ. Inflammation, immunity, and vaccine development for the gastric pathogen *Helicobacter pylori*[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2019,421:1-19. DOI: 10.1007/978-3-030-15138-6_1.
- [12] Wu YZ, Tan G, Wu F, et al. *H. pylori* attenuates TNBS-induced colitis via increasing mucosal Th2 cells in mice [J]. Oncotarget, 2017, 8(43): 73810-73816. DOI: 10.18632/oncotarget.17962.
- [13] Stolfi C, Rizzo A, Franzè E, et al. Involvement of interleukin-21 in the regulation of colitis-associated colon cancer[J]. J Exp Med, 2011,208(11):2279-2290. DOI: 10.1084/jem.20111106.
- [14] Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer[J]. Cancer Res, 2011,71(4):1263-1271. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2907.
- [15] Pastille E, Bardini K, Fleissner D, et al. Transient ablation of regulatory T cells improves antitumor immunity in colitis-associated colon cancer[J]. Cancer Res, 2014, 74(16): 4258-4269. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3065.
- [16] Hovhannisyan Z, Treatman J, Littman DR, et al. Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases[J]. Gastroenterology, 2011, 140(3):957-965. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.12.002.
- [17] Ueno A, Jijon H, Chan R, et al. Increased prevalence of circulating novel IL-17 secreting Foxp3 expressing CD4⁺ T cells and defective suppressive function of circulating Foxp3⁺ regulatory cells support plasticity between Th17 and regulatory T cells in inflammatory bowel disease patients[J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 19(12): 2522-2534. DOI: 10.1097/MIB.0b013e3182a85709.
- [18] Rizzo A, Di Giovangiulio M, Stolfi C, et al. ROR γ t-expressing tregs drive the growth of colitis-associated colorectal cancer by controlling IL-6 in dendritic cells[J]. Cancer Immunol Res, 2018,6(9):1082-1092. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0698.

(收稿日期:2020-01-12)

(本文编辑:周阳)