

DOI:10.13350/j.cjpb.241106

• 论著 •

# 幽门螺杆菌感染对胃上皮细胞铁死亡相关脂代谢蛋白表达及脂质过氧化水平的影响<sup>\*</sup>

黄婷婷<sup>1,2</sup>, 陈定宇<sup>3</sup>, 桂书琴<sup>1,2</sup>, 赵艳<sup>1,2</sup>, 王琴容<sup>1,2</sup>, 周建奖<sup>1,2</sup>, 谢渊<sup>1,2\*</sup>

(1. 贵州医科大学地方病与少数民族性疾病教育部重点实验室, 贵州贵阳 550004;

2. 贵州医科大学分子生物学重点实验室; 3. 华中科技大学同济医学院附属协和医院妇产科)

**【摘要】 目的** 探究幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染对胃上皮细胞和 C57BL/6 小鼠胃组织中铁死亡相关脂代谢蛋白 ACSL4、LPCAT3 表达及对脂质过氧化物降解产物丙二醛(MDA)和 4-羟基壬烯醛(4-HNE)水平的影响。

**方法** 用 HpGZ7 和 Hp26695 菌株感染正常胃上皮 GES-1 细胞和胃癌 AGS 细胞, 感染复数为 50 : 1, 6 h、24 h、48 h 后分别收集细胞总蛋白和细胞裂解液, Western blot 检测 ACSL4 和 LPCAT3 的蛋白表达, 试剂盒检测细胞裂解液 MDA、4-HNE 水平。用 Hp 灌胃感染 C57BL/6 小鼠 1、3、6 月, 取胃黏膜组织并制备切片, 免疫组织化学染色检测 ACSL4、LPCAT3 蛋白的表达。 **结果** 与未感染组比较, Hp 感染 GES-1 (*F* 值分别为 18.82、13.07、4.28、13.03) 和 AGS (*F* 值分别为 14.51、25.88、17.90、16.62) 细胞 ACSL4、LPCAT3 蛋白表达水平均增加, 并随着感染时间的延长表达呈上升趋势, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与未感染对照组比较, Hp 感染 C57BL/6 小鼠胃组织中 ACSL4、LPCAT3 的表达水平均显著升高, 其中 LPCAT3 表达水平增加更显著(*F* 值分别为 27.11、103.62,  $P < 0.05$ )。MDA 含量均高于未感染组(Hp 感染 AGS 细胞 6 h、24 h、48 h 后分别为  $0.27 \pm 0.06$ 、 $1.13 \pm 0.14$ 、 $0.83 \pm 0.12$ 、 $0.56 \pm 0.13$ 、 $0.86 \pm 0.11$ 、 $0.72 \pm 0.16$ 。Hp 感染 GES-1 细胞 6 h、24 h、48 h 后分别为  $0.22 \pm 0.08$ 、 $0.29 \pm 0.09$ 、 $0.80 \pm 0.08$ 、 $0.17 \pm 0.06$ 、 $0.40 \pm 0.08$ 、 $0.63 \pm 0.09$ ), 差异有统计学意义(*F* 值分别为 27.29、10.56、30.85、18.42,  $P < 0.05$ )。4-HNE 含量均高于未感染组(Hp 感染 AGS 细胞 6 h、24 h、48 h 后分别为  $0.12 \pm 0.03$ 、 $0.20 \pm 0.06$ 、 $0.25 \pm 0.04$ 、 $0.06 \pm 0.02$ 、 $0.21 \pm 0.03$ 、 $0.30 \pm 0.04$ 。Hp 感染 GES-1 细胞 6 h、24 h、48 h 后分别为  $0.23 \pm 0.06$ 、 $0.36 \pm 0.06$ 、 $0.63 \pm 0.09$ 、 $0.19 \pm 0.04$ 、 $0.19 \pm 0.05$ 、 $0.41 \pm 0.07$ ), 差异有统计学意义(*F* 值分别为 7.48、32.31、16.83、12.55,  $P < 0.05$ )。 **结论** Hp 感染可引起胃上皮细胞和 C57BL/6 小鼠胃组织中铁死亡相关脂代谢蛋白 ACSL4、LPCAT3 表达增加, 细胞内脂质过氧化物降解产物 MDA 与 4-HNE 积累, 提示 Hp 可能通过影响其感染细胞内的脂代谢水平, 诱导胃上皮细胞发生铁死亡。

**【关键词】** 幽门螺杆菌; 铁死亡; 脂代谢; ACSL4; LPCAT3

**【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2024)11-1277-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Nov.; 19(11):1277-1282.]

## The Effects of *Helicobacter pylori* infection on the expression of ferroptosis related lipid metabolism proteins and lipid peroxidation in gastric epithelial cells

HUANG Tingting<sup>1,2</sup>, CHENG Dingyu<sup>3</sup>, GUI Shuqin<sup>1,2</sup>, ZHAO Yan<sup>1,2</sup>, WANG Qinrong<sup>1,2</sup>, ZHOU Jianjiang<sup>1,2</sup>, XIE Yuan<sup>1,2</sup> (1. Key laboratory of Endemic and Minority Disease of the Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Key Laboratory of Molecular Biology; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology)\*\*\*

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of *Helicobacter pylori* (Hp) infection on the expression of the ferroptosis-related lipid metabolism proteins ACSL4 and LPCAT3 in gastric epithelial cells and gastric tissue from C57BL/6 mice, and on the levels of malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) in gastric epithelial cells.

**Methods** Normal gastric epithelial GES-1 cells and gastric cancer AGS cells were infected with Hp GZ7 and Hp 26695 strains at a multiplicity of infection of 50 : 1. Total protein and cell lysates were collected 6, 24 and 48 h after infection. Protein expressions of ACSL4 and LPCAT3 were detected by Western blot, and levels of MDA and 4-HNE in cell lysates were detected using kits. C57BL/6 mice were infected by intragastric administration of Hp for 1, 3 and 6 months, and

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82260405, 32160166); 贵州省科技基金项目(黔科合基础项目 ZK[2022]041); 贵州医科大学国基培育项目(No. 21NSFC03)。

\*\* **【通讯作者】** 谢 渊, E-mail: 37408126@qq.com

**【作者简介】** 黄婷婷(1995-), 女, 贵州遵义人, 硕士研究生, 主要研究方向: 肿瘤分子发病机制。E-mail: 931804895@qq.com

gastric mucosal tissues were collected and sectioned. The expression of ACSL4 and LPCAT3 proteins was detected by immunohistochemical staining. **Results** Compared with the non-infected group, the expression levels of ACSL4 and LPCAT3 proteins in GES-1 ( $F$  values were 18.82, 13.07, 4.28, 13.03) and AGS ( $F$  values were 14.51, 25.88, 17.90, 16.62) cells with Hp infection were significantly increased, and the expression showed an increasing trend with increasing infection time, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the uninfected control group, the expression levels of ACSL4 and LPCAT3 were significantly increased in the gastric tissues of C57BL/6 mice with Hp infection, and the expression level of LPCAT3 increased more significantly ( $F$  values were 27.11, 103.62,  $P < 0.05$ ). The content of MDA in the infected group was higher than that in the uninfected group (AGS cells infected with Hp at 6 h, 24 h and 48 h were  $0.27 \pm 0.06$ ,  $1.13 \pm 0.14$ ,  $0.83 \pm 0.12$ ,  $0.56 \pm 0.13$ ,  $0.86 \pm 0.11$ ,  $0.72 \pm 0.16$ . GES-1 cells infected with Hp at 6 h, 24 h and 48 h were  $0.22 \pm 0.08$ ,  $0.29 \pm 0.09$ ,  $0.80 \pm 0.08$ ,  $0.17 \pm 0.06$ ,  $0.40 \pm 0.08$ ,  $0.63 \pm 0.09$ ). The difference was statistically significant ( $F$  values were 27.29, 10.56, 30.85, 18.42,  $P < 0.05$ ). The content of 4-HNE in the infected group was higher than that in the uninfected group (AGS cells infected with Hp at 6 h, 24 h and 48 h were  $0.12 \pm 0.03$ ,  $0.20 \pm 0.06$ ,  $0.25 \pm 0.04$ ,  $0.06 \pm 0.02$ ,  $0.21 \pm 0.03$ ,  $0.30 \pm 0.04$ . GES-1 cells infected with Hp at 6 h, 24 h and 48 h were  $0.23 \pm 0.06$ ,  $0.36 \pm 0.06$ ,  $0.63 \pm 0.09$ ,  $0.19 \pm 0.04$ ,  $0.19 \pm 0.05$ ,  $0.41 \pm 0.07$ ). The difference was statistically significant ( $F$  values were 7.48, 32.31, 16.83, 12.55,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Hp infection can increase the expression of ferroptosis-related lipid metabolism proteins ACSL4 and LPCAT3 in gastric epithelial cells and gastric tissues of C57BL/6 mice, and the accumulation of intracellular lipid peroxide degradation products MDA and 4-HNE. These results suggest that Hp may induce ferroptosis in gastric epithelial cells by affecting lipid metabolism in Hp infected cells.

**【Keywords】** *Helicobacter pylori*; ferroptosis; lipid metabolism; ACSL4; LPCAT3

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 感染是引起胃癌的诱因之一, Hp 长期持续感染会引起慢性活动性胃炎、消化不良、胃溃疡, 甚至胃癌等胃部疾病<sup>[1-2]</sup>, 但其致病机制尚未阐明。铁死亡 (Ferroptosis) 是一种铁依赖性的活性氧和脂质过氧化物积累导致的新程序性细胞死亡形式<sup>[3]</sup>, 其发生机制主要涉及铁离子代谢、脂质代谢、氨基酸代谢和铁死亡抑制蛋白 1 (Ferroptosis suppressor protein 1, FSP1)/CoQ10 等通路的调节异常<sup>[4]</sup>。在脂代谢途径, 脂质过氧化及其氧化产物积累是铁死亡的标志, 酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 和溶血卵磷脂酰基转移酶 3 (Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, LPCAT3) 等脂肪氧合酶参与了脂肪过氧化的酶促反应过程, 细胞内脂质过氧化物降解产物丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、4-羟基壬烯醛 (4-hydroxynonenal, 4-HNE) 可使参与正常生理功能的蛋白失活<sup>[5]</sup>, 敲低 ACSL4 和 LPCAT3 可减少细胞内脂质过氧化底物积累从而抑制铁死亡。从胃癌代谢异常的角度出发寻找新的治疗途径, 一些研究表明胃癌与异常脂质代谢相关, 但具体机制研究较少。胃癌患者与正常人相比存在脂质代谢异常, Xiong 等<sup>[6]</sup> 研究证实了胃癌与正常胃组织间脂质代谢途径存在差异。有报道称幽门螺杆菌细胞毒素相关基因 A (CagA) 阳性菌株通过胃癌细胞中的脂质调节诱导铁死亡敏感状态的有效活性<sup>[7]</sup>。此外, 在许多传染病中也检测到铁死亡, 例如丙型肝炎感染、结核分枝杆菌感染和铜绿假单

胞菌感染。然而, 铁死亡是否在 Hp 致癌过程中发挥作用尚不清楚, 相关机制更是鲜有报道。

本研究拟探索 Hp 感染对胃上皮细胞铁死亡相关脂代谢蛋白 ACSL4、LPCAT3 表达和脂质过氧化物降解产物 MDA 和 4-HNE 水平的影响, 从铁死亡的角度探索 Hp 引起胃癌的分子机制, 为探索新的 Hp 感染治疗方法提供理论基础。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 细胞系、菌株和组织切片** 人胃癌细胞株 AGS (编号: CRL-1739) 购于美国 ATCC 细胞库, 人胃上皮细胞株 GES-1 购于中国科学院上海细胞库。Hp GZ7 菌株由本课题组前期分离后鉴定并保存, Hp 26695 菌株购于美国 ATCC 菌株库。Hp 灌胃感染 C57BL/6 小鼠 1、3、6 月胃黏膜组织切片由课题组前期制备。

**1.2 主要试剂** 胎牛血清 (新西兰) 和 DMEM 高糖培养基购自美国 Gibco 公司; 10000 U/mL 青霉素/链霉素、0.25% EDTA 胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司; 哥伦比亚琼脂培养基、Hp 选择剂购自英国 OXOID 公司; ACSL4、LPCAT3 鼠多克隆抗体、 $\beta$ -actin 抗体及山羊抗鼠 IgG 二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司; 脂质氧化 (MDA) 检测试剂盒购自碧云天生物技术股份有限公司; 人 4-羟基壬烯醛 (4-HNE) 定量检测试剂盒 (ELISA) 购自泉州市睿信生物科技有限公司; 苏木素购自武汉塞维尔生物技术有限公司。

### 2 方法

**2.1 细胞及细菌培养** 将 AGS 和 GES-1 细胞用含

10%胎牛血清、1%青-链霉素的DMEM培养基于37℃、5% CO<sub>2</sub>的恒温培养箱内培养,待细胞贴壁生长>80%融合度时进行传代,备用。

Hp GZ7和Hp 26695菌株接种于含有10%绵羊血、0.4% Hp选择剂的哥伦比亚血琼脂平板上,置于三气培养箱(5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>、85% N<sub>2</sub>) 37℃培养,待生长旺盛时(细菌接种3~4 d)收集细菌至含1 mL PBS的无菌离心管中,5 000 g离心3 min,弃去上清后再加1 mL PBS重悬,用分光光度计测定菌液浓度。

**2.2 细胞感染** 在哥伦比亚血琼脂培养基上刮下Hp GZ7和Hp 26695菌株,用分光光度计测量菌的浓度。对数生长期AGS和GES-1细胞制成细胞悬液,计数后以1×10<sup>6</sup>/孔的密度接种至六孔板,过夜培养使细胞贴壁后,以细菌数:细胞数[感染复数(multiplicity of infection, MOI)]为50:1感染细胞,感染6 h、24 h和48 h后收集各组细胞,进行后续试验。

**2.3 Western blot检测AGS和GES-1细胞ACSL4、LPCAT3蛋白的表达** 取各组细胞,用RIPA裂解液充分裂解,提取总蛋白,用BCA蛋白定量试剂盒定量后进行10% SDS-PAGE电泳3 h,转膜2 h,封闭液封闭1 h,一抗ACSL4(1:3 000)、LPCAT3(1:2 000)4℃孵育过夜,用含0.05% Tween20的TBS(TBST)漂洗3次,10 min/次,加入二抗孵育1 h,同上漂洗后加入化学发光液显色,Image J软件对蛋白条带灰度值进行量化计算。

**2.4 试剂盒检测细胞内丙二醛(MDA)水平** 细胞感染后收集各组细胞,10 000~12 000 g离心10 min取上清于1.5 mL离心管中,用BCA蛋白试剂盒测定样品蛋白浓度。按照MDA检测试剂盒说明书比列配制MDA工作液,分组为空白对照组(100 μL裂解液)、标准品(100 μL标准品)、样品组(100 μL待测样品),各组分别加入200 μL MDA检测工作液后混匀。100℃水浴加热15 min后流水冷却,1 000 g室温离心10 min。每组取200 μL上清于96孔板,设置3组复孔,酶标仪波长设置为532 nm,测定各孔的吸光值。运用吸光值以及每组样品蛋白浓度,按照说明书公式计算细胞内丙二醛含量。

**2.5 试剂盒检测细胞内4-羟基壬烯醛(4-HNE)水平** 细胞感染后收集各组细胞,预冷1×PBS洗涤3次,每1×10<sup>6</sup>个细胞中加入150~200 μL 1×PBS重悬,轻轻吹打混匀,-20℃以下冰冻30 min后37℃解冻,重复3次形成细胞裂解液,1 500 g离心10 min,收集上清液。根据ELISA试剂盒说明书,检测细胞内4-HNE水平。

**2.6 免疫组织化学染色法检测C57BL/6小鼠胃组织**

中ACSL4、LPCAT3蛋白的表达 将石蜡包埋的胃组织切片梯度酒精去除石蜡,然后使用柠檬酸缓冲液进行热介导的抗原修复,血清室温封闭1 h,加一抗ACSL4(1:500)、LPCAT3(1:300)4℃孵育过夜,洗涤3次,每次5 min;加入二抗,室温孵育后根据说明书方法使用底物试剂盒进行染色,用Image Pro Plus 6.0图像分析统计DAB显色后的平均灰度值并进行免疫组化阳性表达分析,再用GraphPad Prism8.0软件进行图片绘制。

### 3 统计分析

采用SPSS 16.0软件进行数据统计分析,GraphPad Prism8.0软件进行图片绘制,多组之间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。所有试验均重复3次,取平均值。

## 结果

### 1 Hp感染对AGS和GES-1细胞中ACSL4蛋白表达的影响

经Western blot检测结果显示,Hp GZ7和Hp 26695菌株感染AGS细胞中ACSL4水平均高于未感染细胞,随着感染时间的延长,表达均上升,蛋白表达检测灰度值分别为0.03±0.05、0.15±0.05、0.37±0.06、0.06±0.03、0.14±0.04、0.37±0.04,差异有统计学意义( $F$ 值分别为14.51、25.88, $P<0.05$ )。Hp GZ7和Hp 26695菌株感染GES-1细胞中ACSL4水平同样高于未感染细胞,蛋白表达检测灰度值分别为0.22±0.07、0.24±0.07、0.46±0.07、0.30±0.12、0.35±0.11、0.65±0.09,差异有统计学意义( $F$ 值分别为18.82、13.07, $P<0.05$ )。提示Hp感染可调控铁死亡相关脂代谢蛋白ACSL4表达,并引起其表达上调(图1)。

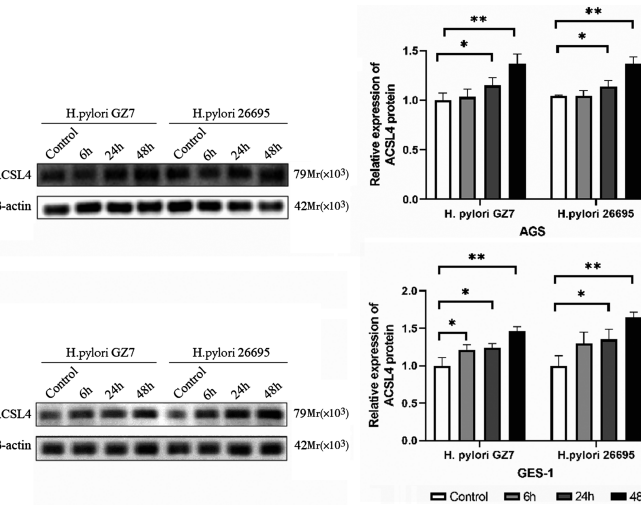


图1 Hp感染后对ACSL4蛋白表达的影响  
Fig. 1 Effects of Hp infection on the expression of ACSL4 protein



## 2 Hp 感染对 AGS 和 GES-1 细胞中 LPCAT3 蛋白表达的影响

经 Western blot 检测结果显示, Hp GZ7 和 Hp 26695 菌株感染 AGS 细胞中 LPCAT3 水平均高于未感染细胞, 随着感染时间的延长, 感染 6 h、24 h 和 48 h 表达均上升, 蛋白表达检测灰度值分别为  $0.50 \pm 0.12$ 、 $0.73 \pm 0.11$ 、 $1.07 \pm 0.14$ 、 $0.66 \pm 0.11$ 、 $0.73 \pm 0.11$ 、 $0.98 \pm 0.13$ , 差异有统计学意义 ( $F$  值分别为 17.90、16.62,  $P < 0.05$ )。Hp GZ7 和 Hp 26695 菌株感染 GES-1 细胞中 LPCAT3 水平同样高于未感染细胞, 蛋白表达检测灰度值分别为  $0.09 \pm 0.07$ 、 $0.17 \pm 0.04$ 、 $0.22 \pm 0.04$ 、 $0.004 \pm 0.04$ 、 $0.04 \pm 0.03$ 、 $0.21 \pm 0.03$ , 差异有统计学意义 ( $F$  值分别为 4.28、13.03,  $P < 0.05$ )。提示 Hp 感染可调控铁死亡相关脂代谢蛋白 LPCAT3 表达, 并引起其表达上调 (图 2)。

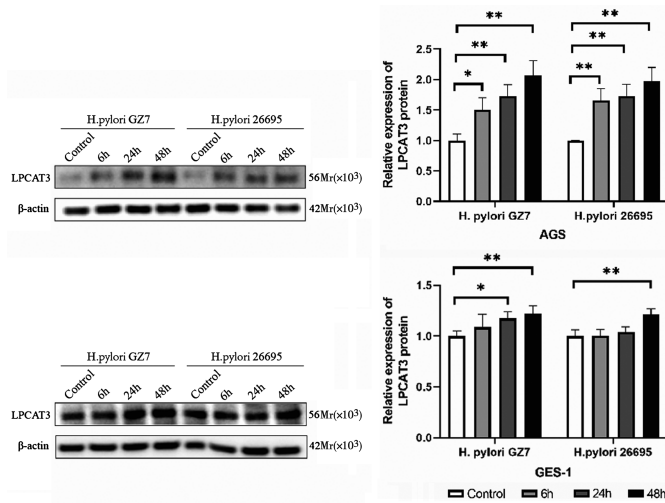


图 2 Hp 感染后对 LPCAT3 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of Hp infection on the expression of LPCAT3 protein

## 3 Hp 感染对胃上皮细胞内脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 水平的影响

试剂盒检测细胞内 MDA 的含量变化结果发现与对照组相比, 在感染 6 h、24 h 和 48 h 时, 细胞内 MDA 含量均显著上升。HpGZ7 和 Hp26695 菌株感染 AGS 细胞 6 h、24 h、48 h 分别为  $0.27 \pm 0.06$ 、 $1.13 \pm 0.14$ 、 $0.83 \pm 0.12$ 、 $0.56 \pm 0.13$ 、 $0.86 \pm 0.11$ 、 $0.72 \pm 0.16$ , 差异有统计学意义 ( $F$  值分别为 27.29、10.56,  $P < 0.05$ )。HpGZ7 和 Hp26695 菌株感染 GES-1 细胞 6 h、24 h、48 h 分别为  $0.22 \pm 0.08$ 、 $0.29 \pm 0.09$ 、 $0.80 \pm 0.08$ 、 $0.17 \pm 0.06$ 、 $0.40 \pm 0.08$ 、 $0.63 \pm 0.09$ , 差异有统计学意义 ( $F$  值分别为 30.85、18.42,  $P < 0.05$ ) (图 3), 提示 Hp 感染可引起脂质过氧化及其氧化产物 MDA 积累。

## 4 Hp 感染对胃上皮细胞内脂质过氧化产物 4-羟基壬烯醛 (4-HNE) 水平的影响

ELISA 法检测细胞内 4-HNE 的含量变化如图显示, 与未感染组相比, Hp 感染 AGS 和 GES-1 细胞中 4-HNE 水平均高于未感染细胞, 随着感染时间的延长呈上升趋势。HpGZ7 和 Hp26695 菌株感染 AGS 细胞 6 h、24 h、48 h 分别为  $0.12 \pm 0.03$ 、 $0.20 \pm 0.06$ 、 $0.25 \pm 0.04$ 、 $0.06 \pm 0.02$ 、 $0.21 \pm 0.03$ 、 $0.30 \pm 0.04$ , 差异有统计学意义 ( $F$  值分别为 7.48、32.31,  $P < 0.05$ )。HpGZ7 和 Hp26695 菌株感染 GES-1 细胞 6 h、24 h、48 h 分别为  $0.23 \pm 0.06$ 、 $0.36 \pm 0.06$ 、 $0.63 \pm 0.09$ 、 $0.19 \pm 0.04$ 、 $0.19 \pm 0.05$ 、 $0.41 \pm 0.07$ , 差异有统计学意义 ( $F$  值分别为 16.83、12.55,  $P < 0.05$ ) (图 4), 提示 Hp 感染可引起脂质过氧化及其氧化产物 4-HNE 积累。

## 5 Hp 感染 C57BL/6 小鼠胃组织中 ACSL4 高表达

免疫组织化学染色结果显示, 与未感染 Hp 的 C57BL/6 小鼠组比较, 感染 Hp 的 C57BL/6 小鼠在 1、3、6 个月时胃组织 ACSL4 表达水平均上调, 差异有统计学意义 ( $F = 27.11$ ,  $P < 0.05$ ), 且随 Hp 感染时间的延长呈上升趋势, 提示 Hp 感染可上调 C57BL/6 小鼠胃组织中 ACSL4 蛋白的表达 (图 5)。

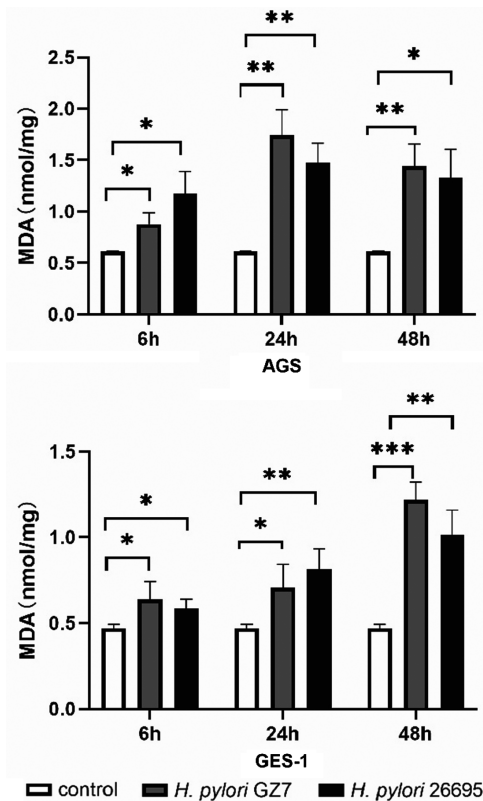


图 3 Hp 感染后各组细胞内单位质量蛋白 MDA 相对含量

Fig. 3 The relative content of MDA per mass of protein in each group after Hp infection

## 6 Hp 感染 C57BL/6 小鼠胃组织中 LPCAT3 高表达

免疫组织化学染色结果显示, 与未感染 Hp 的 C57BL/6 小鼠组比较, 感染 Hp 的 C57BL/6 小鼠在

1、3、6 个月时胃组织 LPCAT3 表达水平均上调,差异有统计学意义( $F=103.62, P<0.05$ ),且随 Hp 感染时间的延长呈上升趋势,且表达增加更显著,提示 Hp 感染可上调 C57BL/6 小鼠胃组织中 LPCAT3 蛋白的表达(图 6)。

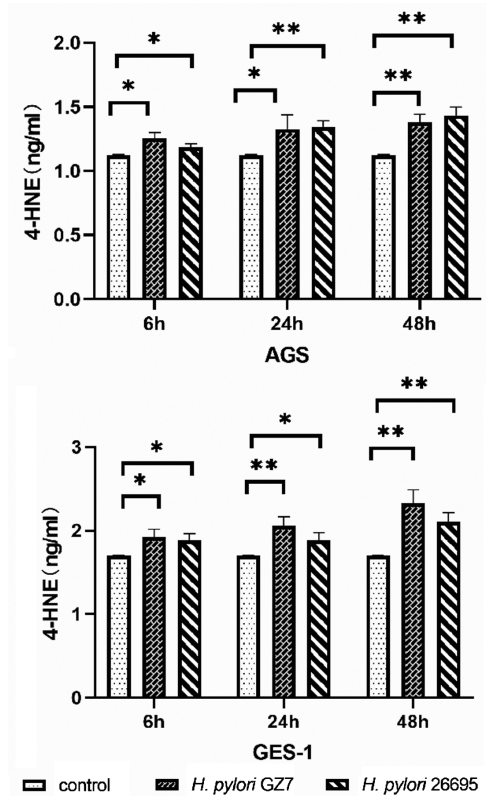
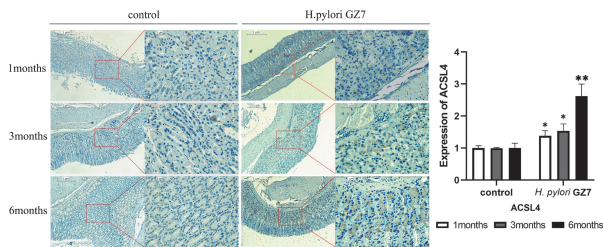


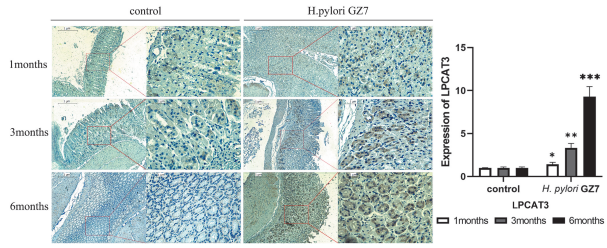
图 4 Hp 感染后细胞内 4-HNE 水平变化  
Fig. 4 Changes in intracellular 4-HNE levels in Hp infected cells



注:control 为未感染对照组;Hp GZ7 为感染 C57BL/6 小鼠组。  
图 5 Hp 感染 C57BL/6 小鼠胃组织中 ACSL4 表达情况  
Fig. 5 Expression of ACSL4 in gastric tissues of Hp infected C57BL/6 mice

讨论

Hp 是一种革兰阴性微需氧致病菌,专门定植于人胃黏膜,是世界范围内最常见的细菌感染,全球 Hp 感染率近 50%,在部分发展中国家的感染率甚至高达 90%<sup>[8]</sup>。Bakhti 等<sup>[9]</sup> 研究认为,胃癌的主要病因与 Hp 感染有关, Hp 感染可通过多种机制诱导胃黏膜产生免疫炎症反应,持续的慢性炎症可引起细胞增殖凋亡失衡、基因组不稳定等,导致胃粘膜损伤,从而启动



注:control 为未感染对照组;Hp GZ7 为感染 C57BL/6 小鼠组。  
图 6 Hp 感染 C57BL/6 小鼠胃组织中 LPCAT3 表达情况  
Fig. 6 Expression of LPCAT3 in gastric tissues of Hp infected C57BL/6 mice

“慢性非萎缩性胃炎→萎缩性胃炎→肠上皮化生→异型增生→胃癌”这一演变过程。铁死亡的特征是 GSH 耗竭,脂质过氧化物的增加和细胞内铁离子的沉积,在脂质合成代谢途径中 ACSL4 与 LPCAT3 是调节铁死亡的重要途径<sup>[10-11]</sup>。ACSL4 已被证明在多种癌症类型中过表达,<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7327075/-CR54> 它用长多不饱和  $\omega$ -6 脂肪酸富集细胞膜,并有助于 LPO 的产生。<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7327075/-CR55><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7327075/-CR49><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7327075/-CR56> 与铁死亡敏感癌细胞相比, ACSL4 在铁死亡耐药癌细胞中的表达显著下调, ACSL4 的上调增强了肿瘤的生长和增殖,但也促进了对铁死亡的敏感性<sup>[12]</sup>。

近年来,研究证实铁死亡在微生物感染和细菌性炎症中发挥作用,病原体感染机体后引发炎症性疾病的病理过程与细胞内铁代谢异常、谷胱甘肽代谢耗竭、脂质过氧化物蓄积等密切相关<sup>[13]</sup>。Hp 的存在会导致活性氧的产生,并促进脂质过氧化<sup>[14]</sup>,<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986123000590?via=ihub-bib7> 铁死亡的激活与细菌感染诱导的宿主组织损伤有关。本次研究发现 Hp 感染胃上皮细胞中脂质代谢关键蛋白 ACSL4、LPCAT3 的表达水平均上升,且随着感染时间的延长表达呈上升趋势。王虎年等<sup>[15]</sup> 研究证实在整个铁死亡发生的通路上, LPCAT3 是负责膜磷脂合成与代谢的下一个重要蛋白,当 AA-CoA 等这些上游产物积累超过一定量时, LPCAT3 合成随之增加,以保证高效率催化,再通过随后的酯化反应生成足够的 PE-AA 与 PE-ADA,进一步氧化为有害脂质过氧化物如 PE-AA-OOH 和 PE-ADA-OOH,过氧化物的充分蓄积最终导致组织细胞走向铁死亡。本研究中 Hp 感染 C57BL/6 小鼠 1、3、6 月胃组织切片结果也显示, ACSL4 和 LPCAT3 蛋白表达水平均高于未感染对照组,随着感染时间的

延长呈上升趋势,且 LPCAT3 的表达水平增加更明显,这与 Western blot 取得一致结果,提示 Hp 感染引起的细胞铁死亡可能与调控铁死亡相关脂代谢蛋白表达异常有关。

脂质过氧化及其氧化产物积累是铁死亡的重要指标之一,而脂质过氧化终产物包含 MDA 和 4-HNE,为进一步验证 Hp 对胃上皮细胞铁死亡脂代谢的影响,本研究检测了 Hp 感染胃上皮细胞后细胞内 MDA、4-HNE 的水平。结果显示, Hp 感染 AGS 和 GES-1 细胞内 MDA 含量均高于未感染细胞, Hp 感染 AGS 和 GES-1 细胞中 4-HNE 水平也均高于未感染细胞,且随着感染时间的延长呈上升趋势,MDA 与 4-HNE 水平上调进一步验证了 Hp 感染对铁死亡脂代谢途径的调控。

综上所述, Hp 感染可上调铁死亡相关脂代谢蛋白 ACSL4、LPCAT3 的表达,在 C57BL/6 小鼠胃组织中表达同样呈上升趋势,并且影响细胞内脂质过氧化 MDA 和 4-HEN 水平,表明 Hp 感染可引起铁死亡脂代谢途径发生变化。结果提示 Hp 可能通过影响其感染细胞内的脂代谢水平,诱导胃上皮细胞发生铁死亡,参与其诱导的胃癌发生发展,但 Hp 在铁死亡脂代谢致病机制中的作用还需进一步研究。

#### 【参考文献】

- [1] Valenzuela MA, Canales J, Corvalan AH, et al. *Helicobacter pylori*-induced inflammation and epigenetic changes during gastric carcinogenesis[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(45): 12742-12756.
- [2] Naumann M, Crabtree JE. *Helicobacter pylori*-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis[J]. Trend Microbiol, 2004, 12(1): 29-36.
- [3] Zhao L, Zhou X, Xie F, et al. Ferroptosis in cancer and cancer immunotherapy[J]. Cancer Communicat, 2022, 42(2): 88-116.
- [4] Bogdan RA, Miyazawa M, Hashimoto K, et al. Regulators of iron

(上接 1276 页)

- [23] Reinold J, Farahpour F, Fehring C, et al. A Pro-inflammatory gut microbiome characterizes SARS-CoV-2 infected patients and a reduction in the connectivity of an anti-inflammatory bacterial network associates with severe COVID-19 [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 747816.
- [24] Yeoh YK, Zuo T, Lui GC, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19 [J]. Gut, 2021, 70(4): 698-706.
- [25] Tang L, Gu S, Gong Y, et al. Clinical significance of the correlation between changes in the major intestinal bacteria species and COVID-19 severity [J]. Engineering (Beijing), 2020, 6(10): 1178-1184.
- [26] Liu H, Bai C, Xian F, et al. A high-calorie diet aggravates LPS-

homeostasis; new players in metabolism, cell death, and disease [J]. Trend Biochem Sci, 2016, 41(3): 274-286.

- [5] Bridges RJ, Natale NR, Patel SA. System xc cystine/glutamate antiporter; an update on molecular pharmacology and roles with in the CNS[J]. British J Pharmacol, 2012, 165(1): 20-34.
- [6] Xiong Z, Lin Y, Yu Y, et al. Exploration of Lipid metabolism in gastric cancer; a novel prognostic genes expression profile[J]. Front Oncol, 2021, 11(11): 712746-712746.
- [7] Peng Y, Lei X, Yang Q, et al. *Helicobacter pylori* CagA-mediated ether lipid biosynthesis promotes ferroptosis susceptibility in gastric cancer[J]. Exp Mol Med, 2024, 56(2): 441-452.
- [8] Zamani M, Ebrahimtabar F, Zamani V, et al. Systematic review with meta-analysis; the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2018, 47(7): 868-876.
- [9] Bakhti SZ, Latifi-Navid S, Safaralizadeh R. *Helicobacter pylori*-related risk predictors of gastric cancer: The latest models, challenges, and future prospects[J]. Cancer Med, 2020, 9(13): 4808-4822.
- [10] Dixon S, Lemberg K, Lamprecht M, et al. Ferroptosis; an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [11] 余增, 黄承浩. 脂质代谢调节肿瘤细胞铁死亡研究进展[J]. 生命科学, 2020, 32(7): 738-756.
- [12] Li D, Li L. The interaction between ferroptosis and lipid metabolism in cancer [J]. Signal transduction and targeted therapy, 2020, 5(1): 108.
- [13] 毛鹏, 王志浩, 李建基, 等. 铁死亡在细菌性感染中的研究进展 [J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(6): 2280-2287.
- [14] Giovanni D, Matteo N, Angela F, et al. *Helicobacter pylori* infection causes persistent platelet activation in vivo through enhanced lipid peroxidation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(1): 246-251.
- [15] 王虎年. ACSL4/LPCAT3 铁死亡通路蛋白及 AA 在特发性炎性肌病小鼠肌肉组织中的表达及意义[D]. 西宁: 青海大学, 2023.

【收稿日期】 2024-05-02 【修回日期】 2024-07-29

induced pneumonia by disturbing the gut microbiota and Th17/Treg balance [J]. J Leukoc Biol, 2022, 112(1): 127-41.

- [27] Ling Z, Liu X, Guo S, et al. Role of probiotics in *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children: A short-term pilot project [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 3261.
- [28] Tang W, Shao X, Chen Q, et al. Nutritional status of protein intake in severe pneumonia patients based on dietary nutrition information system [J]. J Infect Public Health, 2021, 14(1): 66-70.
- [29] Zhu Y, Ma G, Ren W, et al. Effect of oral probiotics on clinical efficacy and intestinal flora in elderly severe pneumonia patients [J]. Medicine (Baltimore), 2023, 102(48): e36320.

【收稿日期】 2024-05-21 【修回日期】 2024-08-10