

幽门螺杆菌通过Bcl-2/Bax机制诱导HepG2细胞凋亡的研究*

陈辉星 陈燕凌

摘要 目的:探讨幽门螺杆菌(*H.pylori*)对肝细胞HepG2细胞凋亡的影响及其机制。方法:应用HepG2细胞为实验模型,用MTT、荧光染色技术、透射电子显微镜、AO/EB染色、流式细胞仪定性和定量地检测HepG2细胞凋亡情况;Western Blotting法检测凋亡相关蛋白Bcl-2和Bax蛋白的表达。结果:不同浓度*H.pylori*处理组(4.0×10^5 、 4.0×10^6 、 4.0×10^7 和 4.0×10^8 CFU/mL)的24 h细胞生长抑制率分别为(2.64±0.34)%、(16.35±4.24)%、(27.15±3.19)%和(33.35±2.36)% ($P < 0.05$),抑制率随作用时间的延长而增加 ($P < 0.05$)。HepG2细胞与 4×10^7 /mL浓度的NCTC11637共培养24h后,在透射电镜下可见部分细胞呈不同时期的凋亡形态。不同浓度*H.pylori*的凋亡率分别为(2.50±0.45)%、(6.00±0.35)%、(11.10±0.45)%和(14.65±0.27)% ,当*H.pylori*的浓度 $\geq 4.0 \times 10^6$ CFU/mL, HepG2细胞凋亡率与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 *H.pylori*作用HepG2细胞后, HepG2细胞的Bcl-2蛋白表达明显减少, Bax蛋白表达则与Bcl-2蛋白表达情况相反。结论:*H.pylori*通过Bcl-2/Bax机制诱导HepG2细胞凋亡。

关键词 幽门螺杆菌 HepG2细胞 凋亡

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.19.001

Bcl-2/Bax Induced Apoptosis of HepG2 Cells by *Helicobacter pylori*

Huixing CHEN, Yanling CHEN

Correspondence to: Yanling CHEN; E-mail: ylchen@medmail.com.cn

Department of Hepatobiliary Surgery, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China

This work was supported by funds from the Research Project of Fujian Provincial Department of Education (No. JA08096)

Abstract Objective: This study investigated the effects of live *Helicobacter pylori* on the apoptosis of the human hepatoma cells (HepG2). **Methods:** The effect of the co-incubation with different concentrations of the *H. pylori* NCTC11637 strain (4.0×10^5 , 4.0×10^6 , 4.0×10^7 and 4.0×10^8 CFU/ml) for 24 h on the apoptotic rates of HepG2 cells were investigated by the MTT assay, fluorescence imaging, ultrastructural analysis, and flow cytometry. **Results:** *H. pylori* significantly inhibited the HepG2 cell growth in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The respective inhibition ratios were (2.64 ± 0.34)%, (16.35 ± 4.24)%, (27.15 ± 3.19)%, and (33.35 ± 2.36)%, in the order of increasing NCTC11637 concentrations, after 24 h of incubation. *H. pylori* promoted the apoptosis of HepG2 cells, and this effect was enhanced with the increased bacterial concentration. The different phases of the apoptosis were observed after the co-incubation with *H. pylori* using an electron microscope. The respective apoptotic rates of the HepG2 cells were (2.50 ± 0.45)%, (6.00 ± 0.35)%, (11.10 ± 0.45)%, and (14.65 ± 0.27)% after 24 h of incubation with the increasing NCTC11637 concentrations. Differences in the apoptotic rates that were higher than (2.50 ± 0.45)% were considered significant ($P < 0.05$). The Bcl-2 protein levels were inhibited, whereas the Bax protein levels were increased in the HepG2 cells after treatment with *H. pylori*. **Conclusion:** The co-incubation of HepG2 cells with *H. pylori* increases their rate of apoptosis in a concentration-dependent manner through the Bcl-2/Bax mechanism.

Keywords *Helicobacter pylori*; HepG2 cell; Cell apoptosis

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)与胃癌和胃淋巴瘤的发生有密切关系,国内外越来越多的研究认为螺杆菌与肝癌的发生有关,提出细菌致肝癌的新病因学理论,揭示乙肝病毒阴性的肝癌发病原因具有重要意义^[1]。因此本研究拟通过研究*H.pylori*对HepG2细胞凋亡的影响,为螺杆菌致肝癌理论提供佐证。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

国际标准菌株NCTC11637(中国疾病预防控制中心传染病研究所)。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、胎牛血清(Life-tech公司)。吖啶橙(AO)、溴化乙啶(EB,上海华美生物工程有限公司)。鼠抗Bcl-2和Bax单克隆抗体(Santa Cruz公

作者单位:福建医科大学附属协和医院肝胆外科(福州市350001)

*本文课题受福建省教育厅课题(编号:JA08096)资助

通信作者:陈燕凌 ylchen@medmail.com.cn

司),肝细胞株 HepG2 由本实验室保种。

1.2 方法

1.2.1 H.pylori 的培养及其菌悬液的制备 H.pylori 标准菌株接种于布氏血平板,置 37℃ 微氧环境(5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂)培养。3 天后传代,再培养 2 天。用 DMEM 培养液制成细菌悬液,在分光光度仪上确定 H.pylori 的浓度(10D660=10⁸ CFU/mL)。用细胞培养液作稀释液,细胞凋亡作用以 4.0×10⁸ CFU/mL 的菌液连续 10 倍稀释至 4.0×10⁵ CFU/mL。

1.2.2 HepG2 细胞的培养 HepG2 细胞在含 10% 小牛血清的 DMEM 中 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度下培养,按贴壁细胞传代培养法,胰酶消化液(0.25% 胰酶, 0.02% EDTA)消化,用对数生长期细胞进行实验。

1.2.3 MTT 检测细胞生长抑制情况 细胞以 1×10⁴/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板,置于 37℃, 5% CO₂ 环境中培养,对照组只加细胞培养液。处理组加入不同浓度的 NCTC11637 细菌悬液,共同孵育 24 h 后,按文献[2]操作。以上试验重复 5 孔次取平均值。抑制率=(1-细菌处理组 OD 值/正常对照组 OD 值)×100%。

1.2.4 电镜观察凋亡细胞形态 细胞经 4.0×10⁸ 至 4.0×10⁵ CFU/mL 的不同浓度 NCTC11637 处理 24 h 后,离心收集悬浮细胞,贴壁细胞直接用细胞刮刀刮下。按文献[3]介绍方法处理,透射电镜(Hu-12A 型,日本 HITACHI 公司)观察拍照。

1.2.5 培养于盖片上的细胞 AO/EB 法染色后荧光镜下观察、拍照 观察凋亡细胞核的形态,并计数凋亡细胞个数,每张玻片至少计数 1 000 个细胞,细胞凋亡率用凋亡细胞数占细胞总数的百分比表示。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率 将细胞接种培养于细胞培养瓶。24 h 后加入不同浓度的 NCTC11637 细菌悬液,每个浓度重复 3 瓶,对照组加细胞培养液。在细胞与细菌共培养 24 h 后,胰酶消化细胞,1 000rpm 离心 5min 收集细胞。100% 乙醇固定,将每个待测样本的细胞总数调整至 10⁶ 个,再加入 PI 溶液。用 Beckman Coulter XL 流式细胞仪检测。Mu-ityCycle 软件进行 DNA 含量和细胞凋亡率分析。

1.2.7 Western Blotting 印迹法检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 抗体的表达 收集经不同浓度 NCTC

11637 作用 24 h 的细胞,PBS 洗 2 次后用细胞裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白。测定蛋白浓度,调整各组蛋白浓度为一致,加入上样缓冲液,95℃ 变性 10 min。行 8%~12% SDS-PAGE 分离蛋白后,电转移至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉封闭后依次加入一抗和二抗,室温培育 2 h, TBST 洗涤 5 次,10 min/次。化学发光法检测,图像采集分析。

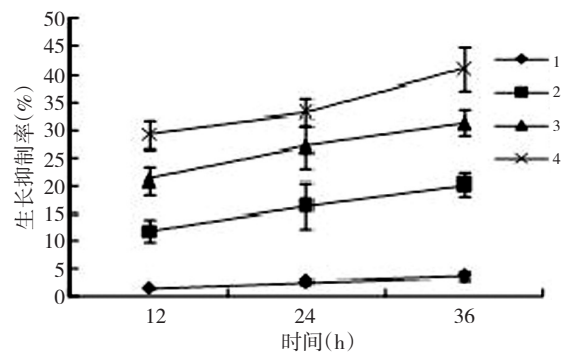
1.3 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,每个实验均重复 3 次以上,采用 SPSS 16.0 软件分析:多个样本均数的比较用 One-way ANOVA 和 Student-Newman-Keuls 分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测检测细胞生长增殖抑制情况

不同浓度 H.pylori 处理组的抑制率均随作用时间的延长而增加($P < 0.05$),同一时间点内各处理组的抑制率随其剂量的增加而上升($P < 0.05$,图 1,表 1)。



1: 4.0 × 10⁵ CFU/mL; 2: 4.0 × 10⁶ CFU/mL; 3: 4.0 × 10⁷ CFU/mL; 4: 4.0 × 10⁸ CFU/mL

图 1 H.pylori 对肝细胞生长增殖抑制的量效与时效关系

Figure 1 Correlation between the dose- and time-effects of the *H. pylori*-induced inhibition of liver cell growth

2.2 荧光镜检测凋亡情况

不同浓度 H.pylori 与胃上皮细胞共培养 24h 后,随着 H.pylori 浓度增大,细胞凋亡率也越来越高(表 1),4.0×10⁵ CFU/mL H.pylori 对凋亡率的影响与对照组比较无显著性差异($P > 0.05$),而当 H.pylori 浓度 $\geq 4.0 \times 10^6$ CFU/mL 时,细胞凋亡率显著高于对照组($P < 0.05$,表 1)。

表 1 不同浓度 H.pylori 处理不同时间 HepG2 抑制率和 24h 凋亡率 % , $\bar{x} \pm s$

Table 1 Inhibition ratio of HepG2 cells by *H. pylori* at various bacterial concentrations, incubation times, and the corresponding apoptotic rates after 24 h of co-incubation, followed by flow cytometry and the acridine orange/ethidium bromide staining (Data are presented as the mean \pm SD; * indicates that $P < 0.05$ as compared with the previous group)

浓度 (CFU/mL)	H.pylori 处理不同时间的抑制率			24h 凋亡率	
	12h	24h	36h	AO/EB 法	流式仪法
0	—	—	—	1.58 ± 0.13	1.75 ± 0.11
4.0 × 10 ⁵	1.57 ± 0.11*	2.64 ± 0.34*	3.64 ± 0.76*	2.15 ± 0.33	2.50 ± 0.45

(续表1)

浓度 (CFU/mL)	H.pylori 处理不同时间的抑制率			24 h 凋亡率	
	12h	24h	36h	AO/EB法	流式仪法
4.0×10^6	$11.71 \pm 2.17^*$	$16.35 \pm 4.24^*$	$20.25 \pm 2.19^*$	$6.25 \pm 0.25^*$	$6.00 \pm 0.35^*$
4.0×10^7	$21.05 \pm 2.51^*$	$27.15 \pm 3.19^*$	$31.37 \pm 2.25^*$	$9.75 \pm 0.27^*$	$11.10 \pm 0.45^*$
4.0×10^8	$29.26 \pm 2.69^*$	$33.35 \pm 2.36^*$	$41.16 \pm 3.84^*$	$15.13 \pm 0.20^*$	$14.65 \pm 0.27^*$

* $P < 0.05$

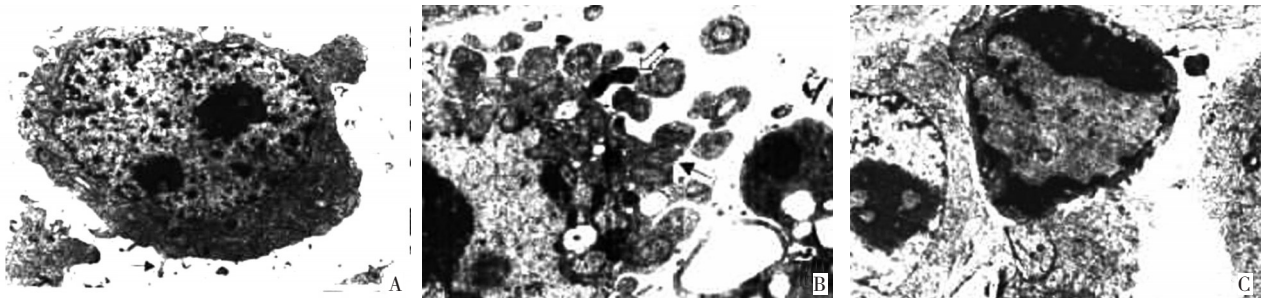
2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡百分率

不同浓度的 H.pylori 与细胞共育 24h 后,用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 4.0×10^5 CFU/mL 的 H.pylori 组与对照组的细胞凋亡率无显著性差异($P > 0.05$,表 1),当 H.pylori 的浓度 $\geq 4.0 \times 10^6$ CFU/mL 时,随 H.pylori 浓度增加,细胞凋亡率越高,与对照组比较有显著

性差异($P < 0.05$)。荧光染色与流式细胞仪两种方法检测细胞凋亡率所得结果相似。

2.4 电镜观察凋亡细胞情况

HepG2 细胞与 4×10^7 /mL 浓度的 NCTC11637 共培养 24h 后,在透射电镜下可见部分细胞呈不同时期的凋亡形态(图 2)。



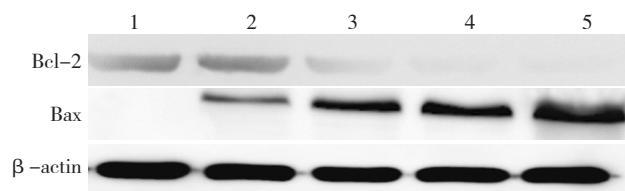
A: 正常对照 HepG2 细胞核较大,核膜清晰,核仁致密电子密度大,细胞器正常,胞膜完整,膜表面有微绒毛($\times 4800$);B: 核中染色质浓缩边聚(\uparrow 示),周边见 H.pylori(\downarrow 示)胞膜形成指状突出,细胞核固缩($\times 7000$);C: 细胞皱缩,细胞变小,胞浆致密,核中染色质边聚浓缩,沿着核膜排列,形成凋亡小体($\times 4800$)

图2 电镜下幽门螺杆菌致观察 HepG2 细胞凋亡

Figure 2 Different phases of cell apoptosis after incubation with *H. pylori*, as observed under an electron microscope

2.5 不同浓度 NCTC11637 对 HepG2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Western Blotting 印迹法结果显示,NCTC11637 对 Bcl-2 家族蛋白表达具有调控作用,呈浓度依赖性地诱导 Bax 上调表达和 Bcl-2 表达下调,最终引起 HepG2 细胞凋亡(图 3)。



1:0; 2: 4.0×10^5 CFU/mL; 3: 4.0×10^6 CFU/mL; 4: 4.0×10^7 CFU/mL; 5: 4.0×10^8 CFU/mL

图3 不同浓度 NCTC11637 作用 HepG2 细胞 24 h 后 Bcl-2、Bax 蛋白的变化

Figure 3 Expression of Bcl-2 and Bax in HepG2 cells after 24 h of co-incubation with NCTC11637

3 讨论

Fan 等^[3-6]发现人原发性肝癌和癌旁组织中螺杆菌 16SrRNA 基因阳性,部分测序结果与 H.pylori 具有

高度同源性。Dore 等^[7]用 H.pylori 的 vacA 引物检测病毒性肝炎或肝硬化、原发性肝癌标本总阳性率为 24%,认为螺杆菌与肝癌的发生有关,特别是在乙肝病毒阴性的肝癌发生上具有意义。研究在离体条件下幽门螺杆菌(H.pylori)对肝 HepG2 细胞的作用,对肝细胞癌细菌学致病理论有一定佐证价值。

近年来,一些研究发现 H.pylori 感染患者的胃黏膜中凋亡细胞数目增加^[8],也有报道^[9]显示凋亡细胞增加的同时,增殖细胞的数量同样增加,但两者的变化并不平行。这种过度导致的代偿性增生与胃癌有关^[10]。本研究用 AO/EB 法和流式细胞仪证实了 H.pylori 可促进培养的 HepG2 细胞发生凋亡,H.pylori 的浓度为 4.0×10^6 CFU/mL 时,HepG2 的凋亡率即增加,随着 H.pylori 浓度的增高,HepG2 的凋亡率进一步提高。两种方法结果相似。流式细胞仪分析结果显示,H.pylori 的浓度为 4.0×10^6 CFU/mL 时, G_2 期细胞占 4.6%;H.pylori 的浓度为 4.0×10^8 CFU/mL 时, G_2 期为 0,说明 H.pylori 在与 HepG2 共培养体系中,有明显的抑制细胞生长作用,使细胞生长停滞于 G_2 期。MTT 实验也显示当 H.pylori 浓度增加到 4.0×10^6 CFU/mL 以

上时,可明显抑制细胞增殖,且随浓度进一步加大,抑制效应愈大,在同一浓度随时间延长抑制效应也越大。

在电镜下可见共培育后典型的细胞凋亡形态, H.pylori 多数游离在 HepG2 细胞附近,而在 H.pylori 与体外培养的胃上皮细胞共育后, H.pylori 多与细胞紧密接触的方式黏附于胃上皮细胞。HepG2 细胞可能缺乏胃黏膜上皮细胞表面的与黏附有关的因子。但与 H.pylori 培养液可导致胃癌上皮细胞凋亡相似。

上述结果表明 H.pylori 能以浓度依赖方式诱导 HepG2 凋亡,抑制细胞增殖,这与 H.pylori 感染初期能促进胃黏膜上皮细胞凋亡相似。H.pylori 致胃黏膜上皮细胞凋亡的机制尚未完全阐明,已有的研究结果表明胃黏膜上皮细胞凋亡与 Bcl-2 家族有关。Bcl-2 家族是与 CEK-9 同源的哺乳动物蛋白,包括 Bax、Bcl-2、Bad 和 Bak 等,当 Bax 同源二聚体形成时,可通过促使细胞色素 C(Cyt C)从线粒体释放和激活凋亡蛋白酶(Caspase)而诱导细胞凋亡,Bcl-2 过量时,能形成 Bcl-2 同源二聚体或 Bcl-2/Bax 异源二聚体,可抑制 Bax/Bax 的促凋亡作用^[11]。本研究发现当 NCTC11637 浓度为 4.0×10^5 /mL 时,NCTC11637 作用 HepG2 细胞 24h 后,HepG2 的 Bcl-2 蛋白表达减少;当 NCTC11637 浓度继续增加,HepG2 细胞的 Bcl-2 蛋白表达逐渐减少。HepG2 的 Bax 蛋白表达则与 Bcl-2 蛋白表达情况相反。说明 H.pylori 通过促进 HepG2 细胞 Bax 的表达,抑制 Bcl-2 的表达,从而发挥其致细胞凋亡效应。

参考文献

- 1 Nakonieczna J, Stalke P, Al-Soud WA, et al. Detection of Helicobacter rodentium-like DNA in the liver tissue of patients with chronic liverdiseases by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis and DNAsequence analysis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010, 68(3): 201-207.
- 2 梅娟娟,朱尤庆,常 城,等.2-甲氧基雄二醇对肝癌 huh7 细胞增殖与凋亡的作用及机制[J].武汉大学学报(医学版),2012,33(1):23-27.
- 3 Fan XG, Peng XN, Huang Y, et al. Helicobacter species ribosomal DNA recovered from the liver tissue of chinese patients with primary hepatocellular carcinoma[J]. Clin Infect Dis, 2002, 35(12): 1555-1557.
- 4 陈燕凌,叶敬旻,余菲菲,等.原发性肝细胞癌病人肝组织中螺杆菌的检测及分析[J].中华肝胆外科杂志,2007,13(10):667-671.
- 5 陈 仁,陈小苹,林秋雄,等.慢性肝脏疾病患者肝组织中螺杆菌相关基因 16SrRNA 的检测[J].南方医科大学学报,2010,30(1):131-132.
- 6 Pandey M, Shukla M. Helicobacter species are associated with possible increase in risk of hepatobiliary tract cancers[J]. Surg Oncol, 2009, 18(1): 51-56.
- 7 Dore MP, Realdi G, Mura D, et al. Helicobacter infection in patients with HCV-related chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma[J]. Dig Dis Sci, 2002, 47(7): 1638-1643.
- 8 Matsumoto A, Isomoto H, Nakayama M, et al. Helicobacter pylori VacA reduces the cellular expression of STAT3 and pro-survival Bcl-2 familyproteins, Bcl-2 and Bcl-XL, leading to apoptosis in gastric epithelial cells[J]. Dig Dis Sci, 2011, 56(4): 999-1006.
- 9 蔡 英,丛 旭,费 然,等.幽门螺杆菌、奥美拉唑及胃泌素对胃黏膜上皮细胞增生凋亡的影响[J].中华医学杂志,2010,90(36): 2558-2563.
- 10 王 芬,潘建华,罗丽丹,等.不同幽门螺杆菌临床菌株对人胃黏膜细胞系 GES-1 增殖和凋亡的影响及其致癌性的研究[J].中南大学学报(医学版),2011,36(9):865-871.
- 11 吴武军,潘承恩,曾 健.前淋巴化疗对乳腺癌腋窝转移癌细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响[J].第一军医大学学报,2005,25(8): 1001-1004.

(2011-12-27 收稿)

(2012-05-02 修回)

(本文编辑:邢颖)