

幽门螺杆菌上调Bcl-xL 基因的表达促进胃癌 BGC-823 细胞的增殖*

吴 莺^① 孙海波^② 艾宽宽^② 李 翔^③ 蒋晓猛^① 周 红^④

摘要 目的:探讨幽门螺杆菌(*H. pylori*)对胃癌细胞BGC-823 Bcl-xL基因表达的影响。**方法:**分别用东、西方型*H. pylori*裂解液处理胃癌细胞,MTT法检测细胞增殖情况,荧光定量PCR法检测细胞 Bcl-xL 基因 mRNA 表达水平的变化;Bcl-xL 短发夹 RNA(short hairpin,shRNA)质粒沉默 Bcl-xL 基因,MTT法检测胃癌细胞增殖能力。**结果:***H. pylori* 裂解液处理胃癌细胞 24 h 后,与对照组相比,处理组均出现细胞的增殖($P < 0.01$),并且东亚型处理组的增殖作用比西方型处理组更明显($P < 0.01$);Bcl-xL 基因的 mRNA 表达水平也均出现上调($P < 0.01$),东亚型处理组的上调水平比西方型处理组更明显($P < 0.01$);Bcl-xL shRNA 质粒转染胃癌细胞 BGC-823 后,与对照组、Bcl-xL shRNA 阴性对照组相比,细胞增殖受到抑制。**结论:***H. pylori* 的生物活性物质通过上调 Bcl-xL 基因的表达促进胃癌细胞 BGC-823 的增殖,东亚型 *H. pylori* 的生物活性作用比西方型强。Bcl-xL shRNA 质粒在一定程度上可抑制胃癌细胞 BGC-823 的增殖。

关键词 幽门螺杆菌 细胞增殖 Bcl-xL Bcl-xL shRNA 质粒 CagA 蛋白分型

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.18.003

Upregulation of Bcl-xL mRNA Cellular Expression by *Helicobacter pylori* Leads to the Proliferation of Gastric Cancer BGC-823 Cells

Ying WU¹, Haibo SUN², Kuankuan AI², Xiang LI³, Xiaomeng JANG¹, Hong ZHOU⁴

Correspondence to: Ying WU; E-mail: jszjwy@hotmail.com

¹Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China

²Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

³Department of Gastroenterology, Dongtai People's Hospital, Dongtai 224200, China

⁴Department of Clinical Laboratory and Hematology, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

This work was supported by the Postgraduate Training Program of Jiangsu Province (No. 1221270009) and the Science and Technology Project of Zhenjiang (No.SH2007025)

Abstract Objective: This study aims to investigate the effect of *Helicobacter pylori* on the expression of the Bcl-xL gene and its potential effect on human gastric cancer BGC-823 cell lines. **Methods:** Human gastric cancer BGC-823 cell lines were treated with extracts from East Asian-type and Western-type *H. pylori*. Cell proliferation was evaluated by MTT assay. The mRNA level of Bcl-xL was detected by real-time quantitative PCR. The Bcl-xL-mediated RNA interference technique was employed to inhibit Bcl-xL gene expression and BGC-823 cell proliferation. The mRNA level, Bcl-xL protein expression, and inhibitory percentage of BGC-823 cells were detected by RT-PCR, western blot, and MTT assay, respectively. **Results:** The proliferation of BGC-823 cells treated with *H. pylori* extract was observed after 24 hours ($P < 0.01$) in relation to the control group. The enhanced cellular proliferation in the East Asian type was higher than that in the Western type ($P < 0.01$). The expression of Bcl-xL mRNA in the groups treated with *H. pylori* extract was significantly elevated (all $P < 0.01$) compared with the control group. Statistical difference in Bcl-xL mRNA expression was also found between the East Asian type group and the Western type group ($P < 0.01$). Bcl-xL shRNA significantly reduced Bcl-xL mRNA and protein expressions as well as BGC-823 proliferation. **Conclusion:** The biologically active elements in *H. pylori* extract induced the proliferation of gastric epithelial cells by upregulating the expression of Bcl-xL mRNA in human gastric cancer cells. The East Asian-type *H. pylori* showed stronger influence on cell proliferation and Bcl-xL mRNA expression compared with the Western type. This result implies that the East Asian-type *H. pylori* had much more biological activity than the Western type. Moreover, Bcl-xL shRNA inhibited Bcl-xL expression and BGC-823 cell proliferation.

Keywords *Helicobacter pylori*; Cell proliferation; Bcl-xL; Bcl-xL shRNA plasmid; Type of CagA

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)与胃癌 H. pylori 可以促进胃上皮细胞的增殖^[1-2]。前期的研究的发生密切相关,其致癌机制仍未阐明。研究显示, H. pylori 可以影响细胞凋亡相关基因的表达^[3],

作者单位:①江苏大学附属医院消化科(江苏省镇江市212001);②江苏大学;③东台市人民医院消化科;④江苏大学医学基础与医学技术学院

*本文课题受江苏省研究生培养创新计划基金(编号:1221270009)和镇江市科技计划项目(编号:SH2007025)资助

通信作者:吴莺 jszjwy@hotmail.com

凋亡相关基因芯片检测显示,东西方 *H. pylori* 裂解液均引起了 Bcl-xL 基因的明显上调(数据未显示)。Bcl-xL 基因是一种凋亡抑制基因,在肿瘤的发生发展中具有重要作用^[4]。本研究采用 *H. pylori* 裂解液处理胃癌细胞 BGC-823,了解 *H. pylori* 对胃癌细胞 BGC-823 增殖,以及 Bcl-xL 基因 mRNA 表达水平的影响,然后敲除 Bcl-xL 基因,观察其对胃癌细胞增殖的可能作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人胃癌细胞 BGC-823 (ICLC cancer HTL98007) 由江苏大学生理教研室提供;东亚型 *H. pylori* (分离自镇江胃病患者,经基因检测及测序,鉴定为 *cagA* 阳性菌株,东亚型);西方型 *H. pylori* 为国际标准菌株 11637, *cagA* 阳性,西方型,由江苏大学附属医院消化科冻存,其核酸序列 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) 号:AB015416;蛋白序列号: BAB 20926.1^[5]。

H. pylori 固体培养基、微需氧发生袋、选择性抗生素及厌氧培养罐,均购于德国 Merck 公司;MTT 试剂购于 Sigma 公司;荧光定量 PCR 试剂盒 (SYBR Green) 购于 TaKaRa 公司;脂质体 2000 购于 Invitrogen 公司 (USA); Bcl-xL 短发夹 RNA shRNA (short hairpin, shRNA) 质粒 (h) 以及 Bcl-xL 单克隆抗体购于 Santa Cruz Biotechnology, INC。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胃癌细胞 BGC-823 于含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养基、37°C、5%CO₂ 温箱中连续培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 *H. pylori* 培养及菌体超声裂解液的制备 将 *H. pylori* 接种于哥伦比亚固体琼脂培养基,微需氧环境、37°C 下培养 3d 后收集细菌,鉴定(快速尿素酶、氧化酶、触酶试验均阳性),悬于不含血清的 DMEM 培养液中,经超声裂解(100 W, 30 s, 10 次,间隔 20 s, 冰浴冷却, 4°C 离心, 10 000 r/min, 30 min), 吸取上清, 调整蛋白浓度为 1g/L, -20°C 保存备用。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖 细胞接种于 96 孔培养板, 实验组分别加入东、西方型 *H. pylori* 裂解液; 对照组加入等量不含血清的 DMEM 培养液。继续培养 24 h; 每孔加入 20 μL MTT, 继续培养 4 h; 弃上清, 再加入 150 μL 的二甲基亚砜, 在酶联免疫仪上选择 490 nm 波长测定吸光度值 (OD 值)。细胞的增殖率 (%) = OD (实验组 - 对照组) / OD 对照组 × 100%。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测 Bcl-xL 基因 mRNA 水平表达 接种于 6 孔培养板内的细胞用 *H. pylori* 裂解液处理后 (方法如 1.2.3) 24 h, 提取细胞总 RNA, 然后检测吸光度 (A) 值, A₂₆₀ / A₂₈₀ 均在 1.80 以上。按照逆转

录试剂盒说明书, 将 RNA 逆转录成 cDNA, 以 GAPDH 为内参照进行 PCR。引物的设计与合成: 参照 GenBank 中的 Bcl-xL 的基因全序列设计 PCR 引物: 上游引物 P1: 5'-tggcagcagtaaagcaag-3'; 下游引物 P2: 5'-catttccgactgaagagtga-3' (GenBank 登录号: NM_138578.1), 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。扩增产物的长度为 137 bp。反应条件: 95°C 1min, 95°C 30 s, 58°C 40 s, 72°C 30 s, 40 个循环。

1.2.5 细胞转染 细胞接种于 6 孔培养板内, 达到 90% ~ 95% 的融合后, 进行转染。细胞分组: 1) 空白对照组: 未经任何处理的胃癌细胞; 2) 空载对照组: shRNA 阴性对照组; 3) shRNA 组: shRNA 质粒转染细胞组: 将含 shRNA 质粒的混合液, 逐滴加入细胞培养孔中, 加入 20% 的胎牛血清, 于 24 ~ 72 h 分别检测转染水平、以及进行 MTT 实验。

1.2.6 转染水平检测 1) 荧光定量 PCR 检测 Bcl-xL mRNA 表达水平: 转染后 24 h 进行检测 (方法同 1.2.4)。2) 蛋白印迹法检测蛋白表达: 转染后 72 h, 按照总蛋白提取说明书提取细胞总蛋白。经 15% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转移 PVDF 膜, 然后用 5% 的脱脂奶粉、0.05% Tween 的 TBST 缓冲液、37°C 下封闭 1 h。洗膜后分别加入 Bcl-xL 或者 β-actin 单克隆抗体 (1:1 000), 4°C 孵育过夜, 然后与辣根过氧化酶标记的二抗结合, 在暗室用 X 光胶片显影。3) 转染后 MTT 法检测细胞增殖: 转染 24 h 后用 0.25% 胰蛋白酶消化胃癌细胞, 制成单细胞悬液, 接种于 96 孔培养板, 继续培养 24 h 后, 分别在 24 h、48 h 和 72 h 时间段换液进行实验 (方法同 1.2.3)。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 16.0 统计软件, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多个均数间比较, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。所有实验至少独立重复 3 次。

2 结果

2.1 *H. pylori* 裂解液促进胃癌细胞 BGC-823 增殖

MTT 结果显示, *H. pylori* 裂解液处理胃癌细胞 BGC-823 24 h 后, 细胞增殖增加: 与对照组相比, 东亚型处理组增值率为 29.7%, 西方型为 14.6% (P 均 < 0.01); 与西方型处理组相比, 东亚型处理组的细胞增殖率增高更明显 ($P < 0.01$, 图 1)。

2.2 *H. pylori* 裂解液上调胃癌细胞 BGC-823 Bcl-xL 基因的 mRNA 水平的表达

荧光定量 PCR 检测显示, 与对照组相比, 东亚型处理组细胞中 Bcl-xL 基因的 mRNA 水平上调了 2.39 倍, 西方型上调了 2.06 倍 (P 均 < 0.01); 并且, 与西方型处理组相比, 东亚型处理组 Bcl-xL mRNA 上调水

平更高($P<0.05$,图2)。

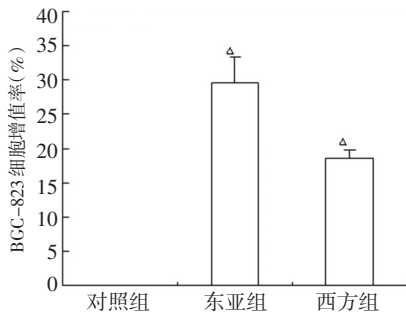


图1 H.pylori裂解液处理胃癌细胞BGC-823 24 h后MTT法检测细胞的增殖情况
Figure 1 Proliferation rate of MTT assay in BGC-823 cells treated with Hp extract

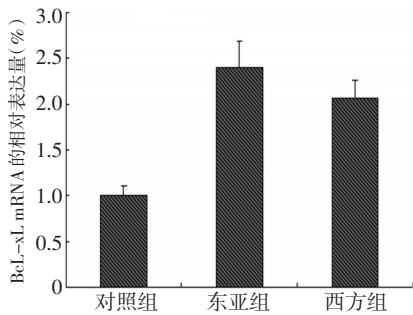


图2 H.pylori裂解液处理胃癌细胞BGC-823 24 h后荧光定量PCR检测细胞中Bcl-xL mRNA水平的表达
Figure 2 Relative Bcl-xL mRNA levels of BGC-823 cells treated with Hp extract for 24 h

2.3 Bcl-xL shRNA 转染对胃癌细胞 BGC-823 Bcl-xL 基因 mRNA 表达及蛋白表达水平的影响

Bcl-xL shRNA 质粒转染胃癌细胞 BGC-823 24h 后, 荧光定量 PCR 检测显示, 与对照组及 shRNA 阴性对照组相比, shRNA 质粒处理组 Bcl-xL mRNA 的表达量下调了 45% (P 均 <0.01 , 图 3); 转染 72 h 后, 蛋白印迹法检测显示, shRNA 质粒处理组的 Bcl-xL 蛋白表达水平也明显下调 (P 均 <0.01 , 图 4)。

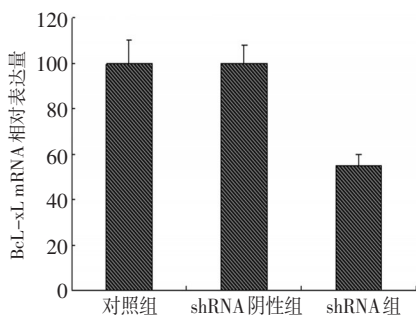


图3 Bcl-xL shRNA 质粒转染胃癌细胞 BGC-823 24 h 后荧光定量 PCR 检测细胞中 Bcl-xL 基因的 mRNA 的相对表达量
Figure 3 Relative Bcl-xL mRNA levels (%) of BGC-823 cells at 24 h after transfection with Bcl-xL shRNA

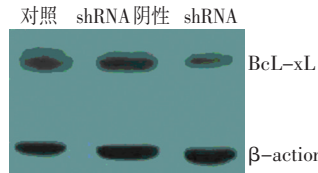


图4 Bcl-xL shRNA 质粒转染胃癌细胞 BGC-823 72 h 后蛋白印迹法检测 Bcl-xL 的蛋白水平的相对表达量
Figure 4 Relative Bcl-xL protein levels of BGC-823 cells at 72 h after transfection with Bcl-xL shRNA

2.4 Bcl-xL shRNA 转染对胃癌细胞 BGC-823 增殖的影响

分别转染胃癌细胞 BGC-823 24h、48h 和 72 h 后, 与对照组及 shRNA 阴性对照组相比, MTT 检测胃癌细胞 BGC-823 的增值率分别为 -7.5%、-24.7%、-53% (P 均 <0.01)。Bcl-xL shRNA 质粒明显抑制了细胞增殖(图 5)。

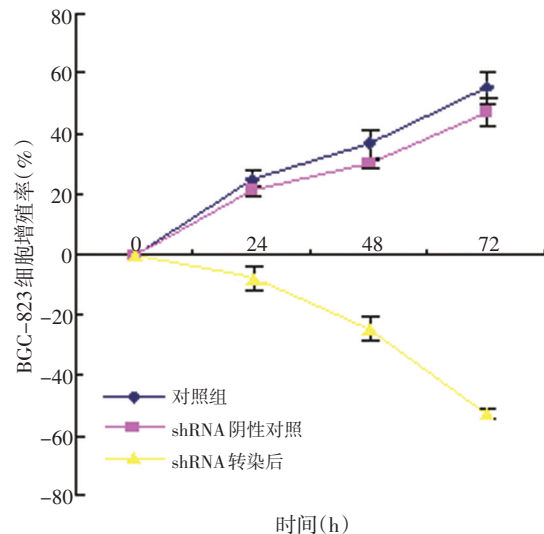


图5 Bcl-xL shRNA 质粒分别转染胃癌细胞 BGC-823 后, MTT 法检测胃癌细胞的增殖情况
Figure 5 Proliferation rate of BGC-823 cells after transfection with Bcl-xL shRNA

3 讨论

H.pylori 的主要毒力因子 CagA 蛋白, 与胃癌的发生密切相关^[6-8]。H.pylori 感染是胃黏膜炎症和萎缩的主要启动者, 同时伴有某些生长因子如胃泌素的过表达, 以及 COX-2 和凋亡抑制蛋白表达的异常, 如 Bcl-2 的过表达, 从而引起突变体萎缩细胞的增殖, 血管生成加速, 凋亡抑制和胃癌形成^[9]。

Bcl-2 家族是一组重要的凋亡相关蛋白, 具有抗凋亡因子 (Bcl-2、Bcl-XL 和 Mcl-1), 以及促凋亡因子 (Bax、Bak 和 Bcl-XS)。Nardone 等^[10]对胃癌临床标本的研究发现, H. pylori 阳性的肠型胃癌患者胃黏膜中 Bcl-xL 的表达显著增高; Yang 等^[11]对 289 例临床标本的研究发现, 感染 CagA 阳性 H. pylori 的肠型胃癌患

者, NF- κ B p65、c-myc、CyclinD(1)和Bcl-xL的表达显著增高。显示H.pylori感染, 尤其cagA阳性H.pylori可能通过上调胃黏膜中Bcl-xL蛋白的表达, 促进胃癌形成。

本研究显示, H.pylori裂解液处理胃癌细胞后, 引起了细胞增殖的增加, 以及Bcl-xL基因mRNA表达水平的上调。提示Bcl-xL蛋白可能在胃癌的发生发展过程中起着重要的作用。应用针对Bcl-xL基因特点的Bcl-xL shRNA质粒, 观察敲除Bcl-xL基因表达对胃癌细胞BGC-823增殖的可能作用。结果, 与对照组及shRNA阴性对照组相比, 荧光定量PCR检测显示了Bcl-xL基因的表达下调了45%; 蛋白印迹法检测显示了Bcl-xL蛋白表达的显著降低。MTT法检测显示, 细胞增殖率的明显抑制(P 均 <0.01)。提示, Bcl-xL shRNA质粒能够有效抑制胃癌细胞Bcl-xL基因的mRNA水平表达、以及蛋白水平的表达, 并在一定程度上抑制了胃癌细胞的增殖, 并呈时间依赖性。

CagA蛋白分为东亚型和西方型2种类型^[5, 12]。研究显示, 东亚型CagA蛋白, 与西方型相比, 具有更强的与SHP-2结合的能力, 因而具有更强的生物活性, 与胃癌发生的关系更密切, 并可能是造成东亚、和西方地区胃癌发病率不同的原因之一^[9, 13]。我们前期研究显示, 镇江地区H.pylori菌株的CagA蛋白主要表现为东亚型^[5], 与日本、韩国H.pylori菌株的CagA蛋白亚型一致^[13-14], 这个结果也与东亚地区胃癌的高发病率和高死亡率一致。

本实验分别应用东亚型CagA蛋白菌株和西方型CagA蛋白菌株^[5]的裂解液, 处理胃癌细胞后, 显示了东西方菌株之间的生物活性差异, 东亚型菌株具有更强的促进细胞增殖、上调Bcl-xL基因的mRNA表达的作用(与西方型相比, P 均 <0.01)。提示, 东亚型H.pylori菌株的生物活性作用, 比西方型H.pylori菌株的生物活性作用强。

本研究显示, H.pylori的裂解液能够上调凋亡抑制基因Bcl-xL的mRNA水平的表达, 促进细胞增殖; 针对Bcl-xL基因的shRNA质粒转染胃癌细胞后, 能够有效抑制胃癌细胞的Bcl-xL基因的mRNA表达和蛋白水平的表达, 并在一定程度上抑制胃癌细胞的增殖。显示Bcl-xL基因在胃癌细胞的增殖中可能起重要作用, 针对Bcl-xL的基因沉默, 有可能成为胃癌治疗的一个靶点。含有东西方CagA蛋白的H.pylori菌株, 存在显著的生物学作用差异。进一步研究东西方菌株之间的毒性差异, 可能有助于阐明胃癌的发病机制。

参考文献

- Nagy TA, Wroblewski LE, Wang D, et al. β -Catenin and p120 mediate PPAR δ -dependent proliferation induced by Helicobacter pylori in human and rodent epithelia[J]. Gastroenterology, 2011, 141(2):553-564.
- Wang F, Pan J, Luo L, et al. Chronic Helicobacter pylori infection induces the proliferation and apoptosis in gastric epithelial cells and gastric precancerosis in Mongolian gerbils[J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2011, 36(9): 865-871.
- 吴莺, 李翔, 周红, 等. 幽门螺杆菌对胃癌细胞BGC-823形态及凋亡相关基因表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(17): 1767-1772.
- Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(4):1126-1132.
- 吴莺, 张允历, 王文兵, 等. 不同地区幽门螺杆菌cagA基因羧基端可变区及其蛋白EPIYA基序的研究[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(27):746-749.
- Hatakeyama M. Oncogenic mechanism of Helicobacter pylori[J]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 2008, 31(3):132-140.
- Zabaleta J. Multifactorial etiology of gastric cancer[J]. Methods Mol Biol, 2012, 863: 411-435.
- Hatakeyama M. SagA of CagA in Helicobacter pylori pathogenesis[J]. Curr Opin Microbiol, 2008, 11(1): 30-37.
- Tanaka H, Yoshida M, Azuma T. The role of CagA in H. pylori infection[J]. Nippon Rinsho, 2009, 67(12): 2245-2249.
- Nardone G, Rocco A, Vaira D, et al. Expression of COX-2, mPGE-synthase1, MDR-1 (P-gp), and Bcl-xL: a molecular pathway of H pylori-related gastric carcinogenesis[J]. J Pathol, 2004, 202(3): 305-312.
- Yang GF, Deng CS, Xiong YY, et al. Expression of nuclear factor- κ B and target genes in gastric precancerous lesions and adenocarcinoma: association with Helicobacter pylori cagA (+) infection[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(4): 491-496.
- Uchida T, Nguyen LT, Takayama A, et al. Analysis of virulence factors of Helicobacter pylori isolated from a Vietnamese population[J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 175.
- Kawai M, Furuta Y, Yahara K, et al. Evolution in an oncogenic bacterial species with extreme genome plasticity: Helicobacter pylori East Asian genomes[J]. BMC Microbiol, 2011, 11:104.
- Jang S, Jones KR, Olsen CH, et al. Epidemiological link between gastric disease and polymorphisms in VacA and CagA[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 559-567.

(2012-04-07收稿)

(2012-06-17修回)

(本文编辑:王展宏)