

[文章编号] 1000-4718(2007)03-0595-03

· 短篇论著 ·

## 幽门螺杆菌对大鼠胃上皮细胞环氧合酶-2表达的影响\*

沈洪<sup>1</sup>, 孙为豪<sup>2△</sup>, 吴爱娟<sup>2</sup>, 许海尘<sup>2</sup>, 邵耘<sup>2</sup>, 肖斌<sup>2</sup>, 薛绮萍<sup>2</sup>, 丁国宪<sup>2</sup>, 程蕴琳<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>南京中医药大学附属江苏省中医院消化科, <sup>2</sup>南京医科大学第一附属医院老年医学科, 江苏南京 210029)

**[摘要]** 目的: 探讨幽门螺杆菌(Hp)水提取物对大鼠胃上皮细胞环氧合酶-2(COX-2)表达及前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)合成的影响。方法: 大鼠胃上皮细胞株 RGM1 体外常规培养, Hp 组细胞培养液内 Hp 水提取物终浓度为 2.5 mg/L、5 mg/L、10 mg/L, 大肠埃希菌组大肠埃希菌水提取物终浓度 10 mg/L。培养 24 h 后收集细胞和上清液分别用于 Western blotting 分析 COX-1、COX-2 表达和酶免疫方法测定前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)含量。结果: Hp 水提取物剂量依赖地增加 RGM1 细胞 COX-2 表达但不影响 COX-1 表达, 而大肠埃希菌水提取物对 COX-1 和 COX-2 表达均无明显影响。RGM1 细胞培养上清液中 PGE<sub>2</sub> 水平在 Hp 组(2.5、5、10 mg/L)和大肠埃希菌组分别为 (230.70 ± 48.55) ng/g protein、(291.82 ± 33.49) ng/g protein、(342.94 ± 28.70) ng/g protein 和 (130.54 ± 42.81) ng/g protein。结论: Hp 体外诱导大鼠胃上皮细胞 COX-2 表达而增加 PGE<sub>2</sub> 合成, Hp 感染的致癌机制可能与其诱导的 COX-2 表达有关。

**[关键词]** 螺杆菌, 幽门; 环氧合酶-2; 前列腺素 E 类; 大鼠; 胃

**[KEY WORDS]** *Helicobacter pylori*; Cyclooxygenase-2; Prostaglandins E; Rats; Stomach

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

胃癌是最常见的消化系统恶性肿瘤, 其发病率位于恶性肿瘤的第 2 位。流行病学资料提示幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 感染是胃癌发生的重要病因之一, 但其确切的致癌机制尚不清楚。环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 是前列腺素 (prostaglandins, PGs) 合成的限速酶, 已知 COX 至少有两种亚型, 即 COX-1 和 COX-2。国内外的研究表明, COX-2 表达在胃粘膜癌变过程中起重要作用<sup>[1]</sup>。Hp 感染者胃粘膜 COX-2 表达增加<sup>[1]</sup>, 体外实验显示 Hp 诱导 MKN 28 胃癌细胞系 COX-2 mRNA 表达并增加 PGE<sub>2</sub> 的合成<sup>[2]</sup>。然而, Hp 对正常胃上皮细胞 COX-2 蛋白表达和 PGE<sub>2</sub> 合成的影响, 文献报道不多。本研究探讨 Hp 菌体水提取物对正常大鼠胃粘膜上皮细胞系 (RGM1) COX-1、COX-2 表达及 PGE<sub>2</sub> 合成的影响。

### 材 料 和 方 法

#### 1 材料

**1.1 菌株** Hp 标准菌株 43504 购自美国 ATCC 公司。

**1.2 胃上皮细胞系** 源自正常 Wistar 大鼠胃黏膜的胃上皮细胞系 RGM1 由日本大阪大学医学部保健学科川野淳教授惠赠。

**1.3 主要试剂和仪器** DMEM、Ham's F-12 (F12) 培养液和胎牛血清 (FCS) 购自美国 Gibco 公司; 蛋白质定量 BCA 试

剂盒购自美国 Pierce 公司; 马血液购自美国 BBL 公司; 苯甲磺酰氟 (phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF) 和抑肽酶 (aprotinin) 购自美国 Sigma 公司。山羊抗大鼠 COX-1、COX-2 的多克隆抗体购自美国 Santa Cruze 公司; 辣根过氧化物酶标记的抗山羊 IgG 抗体购自丹麦 DAKO 公司; PVDF 膜和 ECL 化学发光试剂盒购自英国 Amersham 公司。PGE<sub>2</sub> 酶免疫测定 (EIA) 试剂盒购自美国 Cayman 公司; 其它试剂为国产分析纯级。酶联免疫检测仪 (DG3022A 型) 为南京华东电子管厂产品; 半干式电泳转录仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

#### 2 方法

**2.1 Hp 培养及菌体水提取物的制备** 将 CagA<sup>+</sup> 和 VacA<sup>+</sup> 的 Hp 菌株 ATCC 43504 接种于含 5% 马血的布氏琼脂平板, 置 37℃ 微需氧环境 (5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>、85% N<sub>2</sub>) 中培养, 3 d 后收集细菌于生理盐水中, 3 000 × g 4℃ 离心 25 min, 弃上清后菌体再混悬于无菌蒸馏水, 室温孵育 30 min, 20 000 × g 4℃ 离心 20 min, 上清即为 Hp 菌体水提取物, 经 0.22 μm 滤膜过滤后 BCA 试剂盒测定菌体水提取物中总蛋白质浓度, -20℃ 保存待用。

**2.2 RGM1 细胞培养和 Hp 水提取物处理** RGM1 细胞按常规传代于含 10% FCS、1 × 10<sup>5</sup> U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM/F12 (1:1) 培养液中, 置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱, 隔天换培养液, 待细胞长至亚单层后换无血清的 DMEM/

[收稿日期] 2005-07-05 [修回日期] 2005-12-12

\* [基金项目] 江苏省卫生厅“135 工程”医学重点人才基金资助项目 (No. 苏卫科教 [2003] 19 号); 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK2001186)

△ 通讯作者 Tel: 025-83718836-6044; E-mail: weihaosun@hotmail.com

F12 液培养 24 h,再分组实验。①对照组,培养液不加细菌水提取物;②Hp 组,培养液中 Hp 水提取物蛋白质终浓度分别为 2.5 mg/L、5 mg/L 和 10 mg/L;③大肠埃希菌组,培养液中 大肠埃希菌水提取物蛋白质终浓度为 10 mg/L;各组细胞均培养 24 h。此外,为研究 Hp 水提取物对 RGM1 细胞作用的 时效关系,RGM1 细胞加 Hp 水提取物(终浓度 10 mg/L)前 (0 h)、后培养 6 h、12 h、24 h 和 48 h,收集各组、各时点 RGM1 细胞及其上清液分别用于 Western blotting 检查 COX - 1、COX - 2 表达和 EIA 法检测 PGE<sub>2</sub> 水平。

**2.3 Western blotting 检查 COX - 1、COX - 2 表达** RGM1 细胞用预冷的 PBS 洗涤 2 次,以 100 μL 细胞裂解液(PBS 内 含:Nonidet P - 40 1%,脱氧胆酸钠 5 g/L,SDS 1 g/L,PMSF 0.1 g/L 和抑肽酶 10 mg/L)4 °C 处理 60 min。细胞裂解物 经 11 000 × g 4 °C 离心 10 min 后取上清,BCA 试剂盒测定其 蛋白浓度。常规进行 SDS - PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜,山 羊抗大鼠 COX - 1 和 COX - 2 抗体为第 I 抗体,辣根过氧化 物酶标记的抗山羊 IgG 为第 II 抗体。ECL 发光,X 线胶片感 光。为评价 COX - 1 和 COX - 2 蛋白的表达水平,应用扫描 仪(EPSON GT - 8000, Seiko 公司,日本)扫描 Western blotting 胶片,使用 NIH Image 图像分析软件对 COX - 1 和 COX - 2 蛋白电泳带的密度进行半定量分析。

**2.4 EIA 法检测 RGM1 细胞培养液中 PGE<sub>2</sub>** 按 EIA 试剂盒 说明测定 PGE<sub>2</sub> 含量,培养液中 PGE<sub>2</sub> 水平表示为 ng/g pro- tein。

**3 统计学处理**

实验数据采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,以单因素方差 分析(ANOVA)组间数据差异。

**结 果**

**1 Hp 水提取物对 RGM1 细胞 COX - 1 和 COX - 2 表达的 影响**

图 1 显示 COX - 1 在对照组细胞即有明显的表达,Hp 或 大肠埃希菌水提取物对 RGM1 细胞 COX - 1 表达无明显影响。COX - 2 在对照组细胞表达较低,Hp 水提取物剂量依赖 性地增加 RGM1 细胞 COX - 2 表达,而大肠埃希菌水提取物 对 COX - 2 表达无明显影响。Hp 水提取物处理 RGM1 细胞 前、后 COX - 1 的表达基本一致;而 COX - 2 表达在 Hp 水提 取物处理后 6 h 开始增加,24 h 达高峰,48 h 下降到 Hp 水提 取物处理前的水平(图 2)。

**2 Hp 水提取物对 RGM1 细胞 PGE<sub>2</sub> 合成的影响**

图 3A 显示 Hp 水提取物剂量依赖性地增加 RGM1 细胞 培养液中 PGE<sub>2</sub> 水平,图 3B 显示 Hp 水提取物处理 RGM1 细胞 前、后培养液中 PGE<sub>2</sub> 水平变化。

**讨 论**

已有研究表明,Hp 感染人群胃癌发生危险性显著高于对 照人群,动物实验证实,Hp 慢性感染易引起胃粘膜组织恶性 转化,但对其致癌机制尚未完全阐明。Hp 细胞毒素相关基因 A(*cagA*)阳性菌株具有更强的毒力和危险性,*cagA*<sup>+</sup> 菌株感染 后胃粘膜上皮细胞损伤明显并影响壁细胞的分泌功能,导

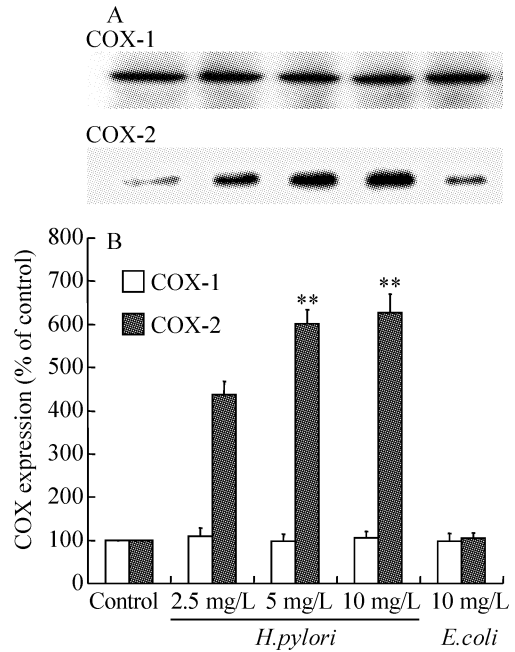


Fig 1 Effects of *H. pylori* water extracts on COX - 1 and COX - 2 expression in RGM1 cells. A: Western blotting analysis for COX - 1 and COX - 2 in RGM1 cells; B: quantified data using densitometry, densities of COX - 1 and COX - 2 are expressed as the percentages of the densities of the control treated without water extracts.  $\bar{x} \pm s$ . *n* = 4. \*\* *P* < 0.01 vs the control.

图 1 Hp 水提取物对 RGM1 细胞 COX - 1 和 COX - 2 表达的 影响

致胃酸分泌减少,胃内细菌过度生长,促使硝酸盐降解为亚 硝酸盐和亚硝酸胺等致癌物。因此,*cagA*<sup>+</sup> Hp 感染与癌前病变 和胃癌的发生密切相关<sup>[3]</sup>。COX - 2 在胃肠道肿瘤的发生和 发展中起重要作用<sup>[4]</sup>,我们的既往研究已经证明 Hp 感染诱 导胃粘膜 COX - 2 表达<sup>[1]</sup>,根除 Hp 后胃粘膜上皮细胞 COX - 2 表达显著减少<sup>[5]</sup>。COX - 2 异常表达在肿瘤发生、发展中 的确切作用尚不明确,可能与胃粘膜上皮细胞凋亡抑制或增 殖过度有关。体内研究结果表明,Hp 感染后胃粘膜内增殖细 胞数增加,Hp 及其 *CagA* 蛋白促进细胞凋亡抑制基因 *bcl - 2* 表达,诱导抑癌基因 p53 突变,从而使细胞增殖和凋亡失平 衡,最终导致胃癌的发生<sup>[6]</sup>。因此,Hp 感染的致癌机制可能 与其诱导的 COX - 2 表达增加有关。

由于胃酸、炎症反应或损伤等因素均可刺激胃粘膜 COX - 2 表达,因此,Hp 感染者胃粘膜 COX - 2 表达增加并不能 说明是 Hp 菌体的直接作用。然而,本研究清楚地证明,在体 外 Hp 菌体水提取物剂量和时间依赖性地增加 RGM1 细胞 COX - 2 表达和 PGE<sub>2</sub> 合成,但对 COX - 1 表达无明显影响。 本研究结果首次证明 Hp 在体外直接刺激正常胃上皮细胞系 COX - 2 蛋白表达,COX - 2 催化合成的 PGs 可能经多种途径 促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、调节肿瘤新生血管形成和增 加癌细胞的侵袭性等而发生致癌和促癌作用。Romano 等<sup>[2]</sup> 将 MKN28 胃腺癌细胞株分别与 Hp 及大肠埃希菌孵育培养, 24 h 后发现 Hp 组 COX - 2 mRNA 水平增加 5 倍,COX - 2 催

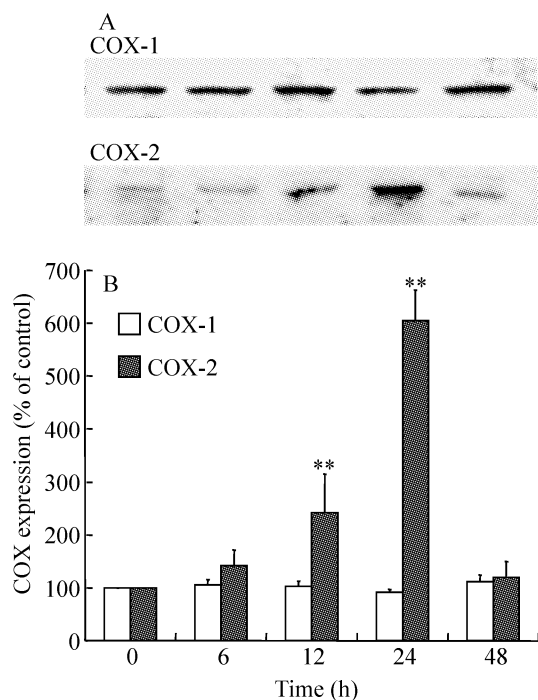


Fig 2 Time course of *H. pylori* water extracts on COX - 1 and COX - 2 expression in RGM1 cells. A: Western blotting analysis for COX - 1 and COX - 2 in RGM1 cells; B: quantified data using densitometry, densities of COX - 1 and COX - 2 are expressed as the percentages of the densities before cultivation with *H. pylori* water extracts (0 h).  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 4$ . \*\*  $P < 0.01$  vs 0 h.

图 2 Hp 水提取物和 RGM1 细胞培养前后的 COX - 1 和 COX - 2 表达

化合成的 PGE<sub>2</sub> 增加 3 倍, 而 COX - 1 表达无变化。大肠埃希菌组 COX - 1、COX - 2 表达和 PGE<sub>2</sub> 水平均无明显改变, 结果表明 Hp 在体外能够特异性诱导胃粘膜细胞表达 COX - 2。

Hp 感染诱导胃粘膜 COX - 2 表达的机制尚待阐明, 可能是 Hp 感染引起胃粘膜损伤刺激 COX - 2 表达, 也可能是 Hp 感染及其毒素直接诱导 COX - 2 表达。已有研究表明, Hp 细菌悬液、超声提取物甚至 Hp 细菌培养液均可诱导培养细胞的 COX - 2 表达。Hp 感染可能通过炎症细胞释放细胞因子的间接作用, 亦可能是诱导胃粘膜炎症细胞表达 COX - 2, 再通过旁分泌机制和信号转导引起上皮细胞表达 COX - 2。总之, Hp 感染通过 COX - 2 途径诱导胃上皮细胞增殖, COX - 2 表达可能参与了 Hp 相关性胃炎向癌前病变及胃癌的演变过程。因此, 根除 Hp 和特异性 COX - 2 抑制剂的使用可能成为预防胃癌的有效手段。

[参 考 文 献]

[1] Sun WH, Yu Q, Shen H, et al. Roles of *Helicobacter pylori* infection and cyclooxygenase - 2 expression in gastric carcinogenesis [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10 (19): 2809 - 2813.  
 [2] Romano M, Ricci V, Memoli A, et al. *Helicobacter pylori*

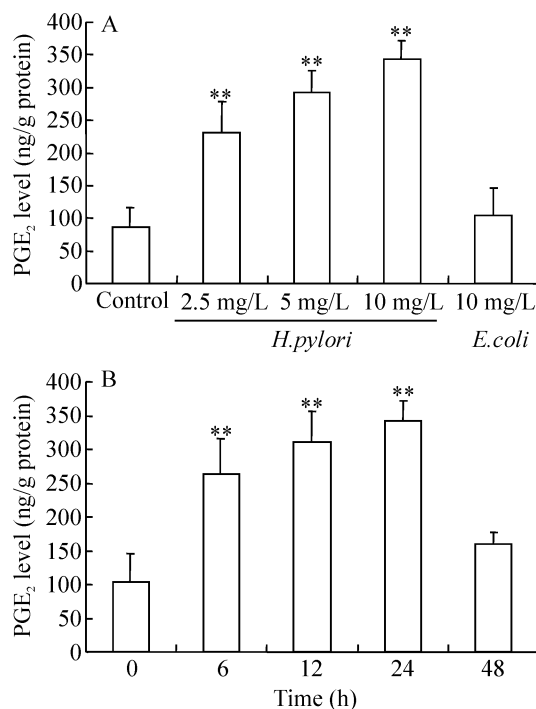


Fig 3 Effect of *H. pylori* water extracts on PGE<sub>2</sub> synthesis in RGM1 cells. A: 24 h after cultivation with media (control), *H. pylori* water extracts at the concentration of 2.5, 5, 10 mg/L, or 10 mg/L *E. coli* water extracts; B: 0, 6, 12, 24, or 48 h after cultivation with 10 mg/L *H. pylori* water extracts. PGE<sub>2</sub> levels in the media from RGM1 cells were measured by enzyme - linked immunosorbent assay and expressed as ng/g protein.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 5$ . \*\*  $P < 0.01$  vs the control or 0 h.

图 3 Hp 水提取物对 RGM1 细胞 PGE<sub>2</sub> 合成的影响

up - regulates cyclooxygenase - 2 mRNA expression and prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis in MKN 28 gastric mucosal cells *in vitro* [J]. J Biol Chem, 1998, 273 (44): 28560 - 28563.

[3] 郑青, 陈晓宇, 施尧, 等. 幽门螺杆菌长期感染蒙古沙土鼠建立胃癌模型的研究 [J]. 中华消化杂志, 2003, 23 (2): 92 - 96.  
 [4] 孙为豪, 曹大中, 俞谦, 等. 胃泌素对大鼠胃粘膜环氧合酶及生长因子表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21 (2): 271 - 275.  
 [5] Kimura A, Tsuji S, Tsujii M, et al. Expression of cyclooxygenase - 2 and nitrotyrosine in human gastric mucosa before and after *Helicobacter pylori* eradication [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2000, 63 (5): 315 - 322.  
 [6] Tatemichi M, Hamada GS, Nishimoto IN, et al. Ethnic difference in serology of *Helicobacter pylori* CagA between Japanese and non - Japanese Brazilians for non - cardia gastric cancer [J]. Cancer Sci, 2003, 94 (1): 64 - 69.