

幽门螺杆菌硫氧还蛋白 1 表达量对胃癌 BCG-823 细胞生长的影响

张月霞 刘琳娜 丁士刚 石岩岩 张婷 张静 王晔 蓝宇

【摘要】 目的 研究幽门螺杆菌(Hp)不同表达量硫氧还蛋白 1(Trx1)对人胃癌细胞(BCG-823)生长的作用。**方法** 将高表达 Trx1 及低表达 Trx1 Hp 分别以 1:50, 1:100, 1:200 细胞细菌浓度比进行细菌细胞共培养, 设不加菌空白对照组, 分别于 24 h 及 48 h 后分别用倒置显微镜及 MTT 法观察细胞形态及细胞存活率, 并收集 1:100 浓度组细胞用流式细胞仪检测细胞周期。**结果** 从镜下观察及测细胞 OD 值均发现 Hp 可使 BCG-823 细胞增生活跃, 并呈浓度及时间依赖性, 高 Trx1 组细胞存活率明显高于对应时间及浓度的低 Trx1 组, 两组比较有统计学差异; 用流式细胞仪检测细胞周期结果表明高 Trx1 组 BCG-823 细胞进入 S 期的比例于 24 h 及 48 h 均明显高于低 Trx1 细菌组, 且无亚二倍体出现, 结果有统计学差异。**结论** 高表达 Trx1 的 Hp 对胃癌细胞有促增殖作用, Trx1 与 Hp 的致癌机制可能有关。

【关键词】 螺杆菌, 幽门; 硫氧还蛋白质类; 胃肿瘤; 细胞周期; BCG-823

The roles of *helicobacter pylori* with different expressed thioredoxin-1 on the growth of gastric cancer cell BCG-823 ZHANG Yue-xia, LIU Lin-na, DING Shi-gang, SHI Yan-yan, ZHANG Ting, ZHANG Jing, WANG Ye, LAN Yu. Department of Gastroenterology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China
Corresponding author: DING Shi-gang, Email: dingshigang222@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of *Helicobacter pylori* (Hp) with different expressed thioredoxin-1 (Trx1) on the growth of gastric cancer cell BCG-823. **Methods** There were three groups: High-expressed Trx1 Hp group, low-expressed Trx1 Hp group and the control group without Hp. BCG-823 cells were co-cultured with different proportions of Hp (1:50, 1:100, 1:200) for 24 and 48 hours respectively. Morphology changes of BCG-823 cells were observed by inverted microscope. The cell proliferation was assessed by MTT spectrophotometric analysis. The cell cycles (1:100 group) were measured by flow cytometry (FCM). **Results** The results of inverted microscope and MTT assay showed that Hp could promote cell growth of BCG-823, which was concentration-dependent and time-dependent. The cell survival rate of high-expressed Trx1 group was significantly higher than the group of low-expressed Trx1, and there were significant differences between the two groups ($P < 0.05$). The result of FCM showed that the percentage of the cells in S phase with high-expressed Trx1 group was significantly increased than the low-expressed Trx1 group at both 24 h and 48 h ($P < 0.05$), and hypodiploids were not found. **Conclusions** Hp with high-expressed Trx1 may promote the proliferation of gastric cancer cells BCG-823, and has potential function in tumor genesis.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; Thioredoxins; Stomach neoplasms; Cell cycle; BCG-823

幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, Hp)与人类疾病的关系,特别是与胃癌等消化道疾病的关系一直被关注。1994年世界卫生组织国际癌症研究机构将其列为 I 类

致癌因子^[1],但 Hp 的致病机制尚未明确。很多研究显示, Hp 的致病性与其毒力因子有关,目前研究较多的毒力因子有 CagA、VacA 等^[2-3],但这些因子在中国地区感染菌中的阳性率达到 90% 以上,提示在中国地区,这些因子并非影响 Hp 致病性的关键因子^[4-5]。2006 年,张静等^[6]用蛋白质组学的方法发现胃癌患者 Hp 临床分离菌株中的硫氧还蛋白 1 (Trx1) 高表达,推测 Hp Trx1 可能与胃癌密切相关。本次实验将 Trx1 高、低表达的 Hp 以不同比例分别与胃癌 BCG-823 细胞系共培养,检测不同 Trx1 表达水平的 Hp 对胃癌细胞系生长速度及细胞周期的作用,以探讨 Hp Trx1 对胃癌细胞系

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.16.012

基金项目: 国家自然科学基金(30770980)

作者单位: 100191 北京大学第三医院消化科[张月霞(在职研究生,现工作单位北京积水潭医院消化内科)、刘琳娜、丁士刚、石岩岩、张静、王晔];北京大学医学部病原生物学系(张婷);北京积水潭医院消化内科(蓝宇)

通讯作者: 丁士刚, Email: dingshigang222@163.com

生长的影响,为进一步研究 Hp Trx1 的致病机制提供依据。

材料和方法

一、材料

1. Hp 菌株及细胞系:高、低表达 Trx1 Hp(由北京大学第三医院消化内科实验室细胞库提供冻存细胞);人胃癌细胞株 BCG-823(由北京大学医学部鲁凤民教授实验室提供)。

2. 主要试剂:胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司(美国),RPMI1640 培养基购自 Hyclone 公司(美国),哥伦比亚琼脂基础培养基购自北京奥博星生物公司,二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigama 公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自凯基生物公司,碘化丙啶(PI)购自 Sigama 公司。

3. 主要仪器:倒置显微镜(Leica DMIL 090-135.001),流式细胞仪(BD FACSCalibur),酶联免疫检测仪(Thermo Scientific)。

二、方法

1. 细菌培养:取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的菌株,室温下解冻后,取解冻的菌株悬液接种于哥伦比亚固体培养基(含新鲜全羊血 10%),并置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 微需氧环境中($5\%\text{ O}_2, 10\%\text{ CO}_2, 85\%\text{ N}_2$),72 h 后,细菌生长良好,肉眼观察菌落形态,革兰染色油镜下观察,尿素酶、触酶试验等鉴定细菌,收集细菌,并用分光光度计测定细菌的浓度。(660 nm 波长下,IOD 值为 1×10^8 cfu/ml)

2. 细胞培养:BCG-823 置于细胞培养箱,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 ml/L CO_2 , 饱和湿度的环境培养,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,每周更换 3 次营养液,并于细胞生长约 80% 融合时,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化并以 1:3 传代。

3. 细菌细胞共培养:细胞处于对数生长期时,收集细胞,分别接种 6 孔板(1×10^5 /孔)和 96 孔板(1×10^4 /孔,复 3 孔),按细胞/细菌 1:50、1:100、1:200 比例加入高低表达 Trx1 的两种不同菌株,设不加菌组为阴性对照,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 ml/L CO_2 , 饱和湿度的环境共同孵育。

4. BCG-823 倒置显微镜观察:于共培养 24 h,48 h 分别通过倒置显微镜观察与高低表达 Trx1Hp 共培养后的 BCG-823 细胞形态,数量及状态的变化。

5. 细胞增殖活力检测(MTT):经不同浓度不同菌株 Hp 与 BCG-823 共培养 24 h 及 48 h 的 96 孔板,加 MTT 溶液(6 mg/ml),每孔 50 μl , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h 后,吸去上清液,每孔加入 150 μl DMSO,震荡 10 min,使蓝紫色结晶物充分溶解,酶联免疫检测仪测取波长 550 nm

的吸光度值(OD 值),复三孔,重复实验 3 次,细胞存活率 = (实验组 OD/对照组 OD) \times 100%。

6. 流式细胞学细胞周期检测:分别于共培养 24 h, 48 h 时收集细胞细菌比 1:100 组及不加菌阴性对照组细胞原培养液,制成细胞悬液,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,冷 PBS 洗涤 1 次,然后重新悬浮于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 75% 酒精中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,测量时调整细胞浓度为 1×10^6 /ml,取 1 ml 细胞悬液,PBS 洗涤 3 次,细胞重悬于 1 ml PI 染液中,30 min 后进行流式细胞学分析。

三、统计学分析

用 IBM SPSS 20.0 对数据进行统计学分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),用卡方检验对进入 S 期的细胞的数量进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 倒置显微镜观察结果:于共培养 24 h 及 48 h 观察细胞,对照组 BCG-823 细胞生长良好,融合成集落,细胞间接触紧密,细胞为类圆形,细胞轮廓清楚,培养液较清亮;加入 Hp 组细胞数明显增多,集落增大,呈增殖旺盛表现,且随时间延长及细菌浓度增加,细胞增多现象更加明显,并且出现细胞体积增大,形态多样,染色质疏松,可见中毒颗粒,部分呈空泡样病变,以上现象高 Trx1 组变化较低 Trx1 组明显。见图 1。

2. MTT 结果:随时间的延长和细菌浓度的增大,MTT 吸光度值(OD 值)明显升高,与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$),见表 1;高 Trx1 组细胞存活率明显高于对应时间及浓度的低 Trx1 组,两组比较有统计学差异,见表 2;细胞存活率在 24 h 升高明显,48 h 又有所降低,48 h 时 BCG-823 存活率高于对照组,但明显低于对应菌株对应浓度 24 h 组,两者有统计学差异,见表 2。

表 1 不同浓度高低表达 Trx1 菌株与 BCG-823 共培养 MTT OD 值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h
阴性对照组	0.4057 \pm 0.0084	0.6764 \pm 0.0197
低 Trx1 组		
1:50	0.4568 \pm 0.0210 ^a	0.6761 \pm 0.0131
1:100	0.5797 \pm 0.0142 ^a	0.7810 \pm 0.0376 ^a
1:200	0.6012 \pm 0.0315 ^a	0.8876 \pm 0.0736 ^a
高 Trx1 组		
1:50	0.5740 \pm 0.0255 ^a	0.8212 \pm 0.0030 ^a
1:100	0.6668 \pm 0.0281 ^a	0.8259 \pm 0.0620 ^a
1:200	0.6837 \pm 0.0378 ^a	0.9411 \pm 0.0353 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

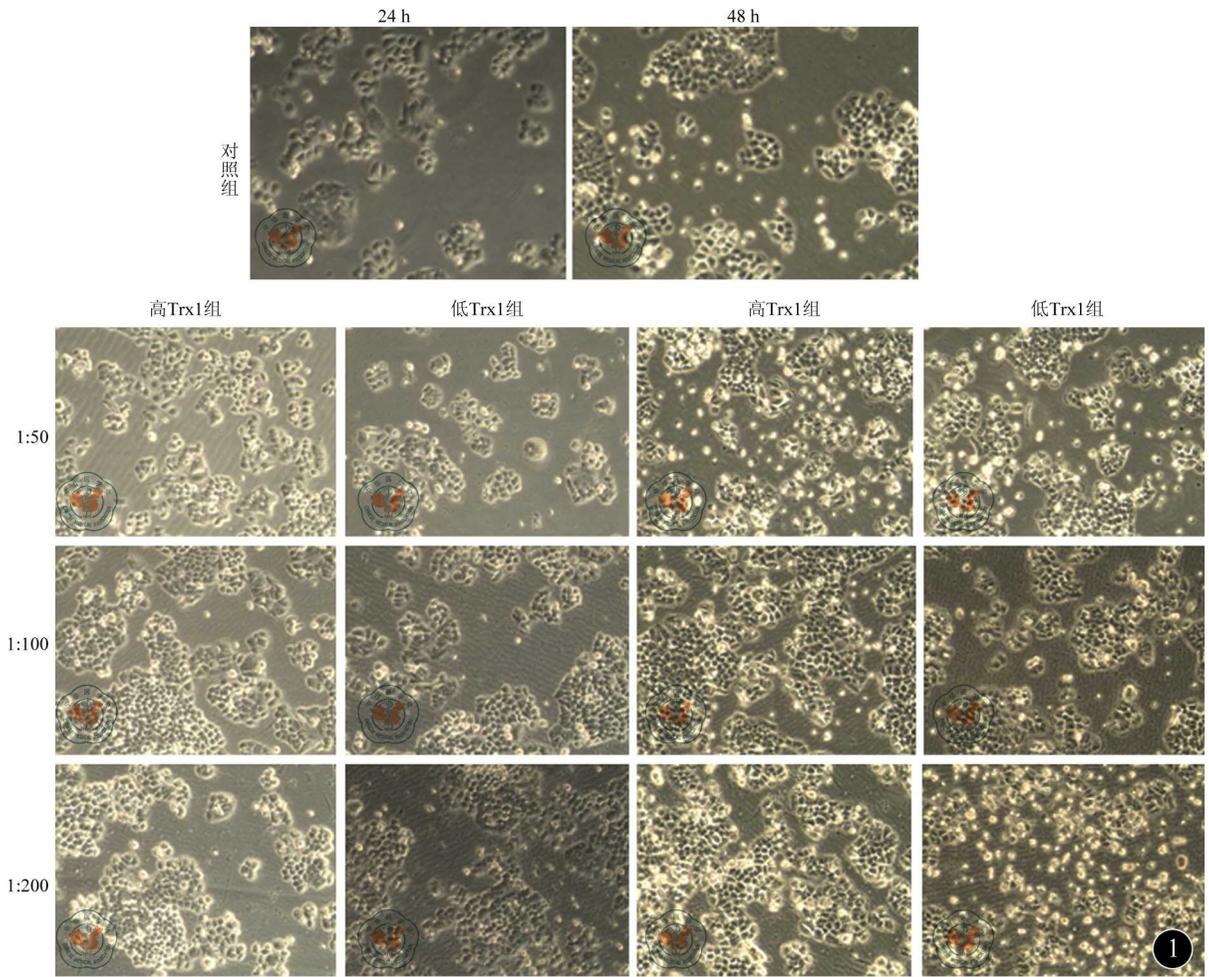


图1 倒置相差显微镜下BCG-823细胞的生长情况(×100)

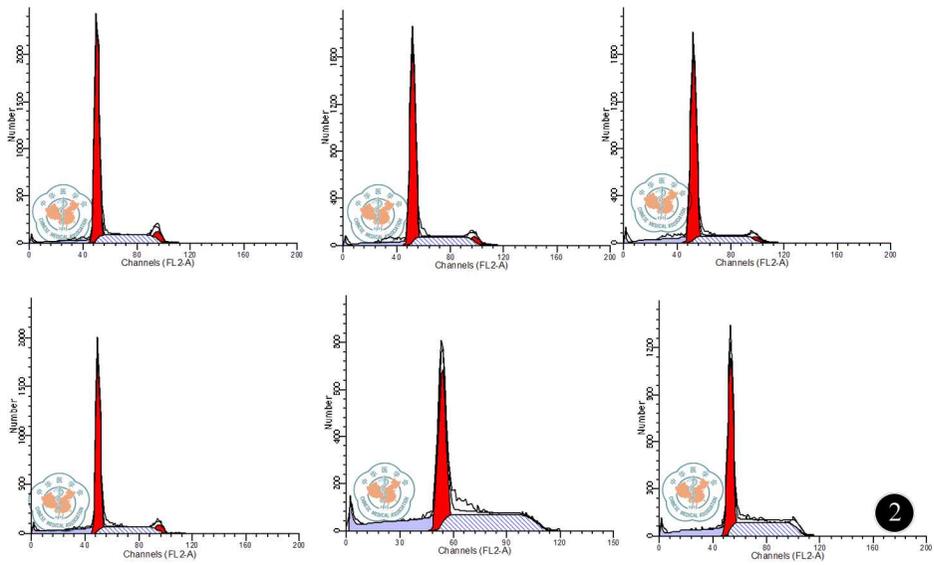


图2 流式细胞仪检测BCG-823细胞周期分布图

表2 不同时间高低表达 Trx1 菌株与 BCG-823 细胞共培养存活率比较(%)

组别	24 h			48 h		
	1:50	1:100	1:200	1:50	1:100	1:200
低 Trx1 组	1.1260	1.4289	1.4819	0.9970 ^a	1.1547 ^a	1.3124 ^a
高 Trx1 组	1.4147 ^b	1.6436 ^b	1.6852 ^b	1.2142 ^{ab}	1.2210 ^{ab}	1.3913 ^{ab}

注:与24 h比较,^a $P < 0.05$;与低 Trx1 组比较,^b $P < 0.05$

3. 流式细胞仪检测细胞周期结果:48 h 时两组 BCG-823 细胞进入 S 期比例较对照组均明显增多,且无亚二倍体出现,具有统计学差异($P < 0.05$),此变化较 24 h 时明显;高 Trx1 组 BCG-823 细胞进入 S 期的比例于 24 h 及 48 h 均明显高于低 Trx1 细菌组,有统计学差异($P < 0.05$),见图 2,表 3。

表3 不同时间与高低表达 Trx1 菌株共培养 BCG-823 细胞进入 S 期比例比较(%)

组别	24 h	48 h
对照组	24.93	25.42
低 Trx1 组	22.12	43.09 ^a
高 Trx1 组	25.43 ^b	48.41 ^{ab}

注:与对照组 48 h 比较,^a $P < 0.05$;与低 Trx1 组比较,^b $P < 0.05$

讨 论

硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)是一种广泛分布于各种生物体的小分子多功能蛋白质,Trx 主要分为两型,Trx1 位于胞质和胞核,Trx2 位于线粒体。Grogan 等^[7]发现,80%的人类原发性胃癌中 Trx1 表达较正常胃黏膜增加,提示人 Trx1 可能与胃癌的发生有关。对其他肿瘤的研究^[8]也证实,一些肿瘤组织 Trx1 表达明显升高,提示 Trx1 可能是一种重要的致癌因子。对 Trx1 的作用机制研究显示,人 Trx1 均含有一个 Cys-Gly-Pro-Cys 氧化还原活性位点,其中的半胱氨酸亚基有促进细胞增殖,抑制细胞凋亡的作用^[9],肿瘤的发生机制可能与此氨基酸序列的作用有关^[10]。目前对 Hp Trx1 的研究较少,尚不充分。我们课题组前期的研究显示 Hp 临床分离菌株的 Trx1 核苷酸序列有不同程度的位点突变,但氨基酸的序列同源性较高,均为无效突变。不同疾病分离的 Hp Trx1 均含有一个 Cys-Gly-Pro-Cys 氧化还原活性位点^[11],研究结果为进一步探讨 Hp Trx1 的生物学功能及其致病机制提供了可靠依据。我们以往的研究用实时定量荧光 PCR 检测胃癌、消化性溃疡、慢性胃炎患者 Hp Trx1 的表达水平,结果发现胃癌及消化性溃疡患者 Hp Trx1 mRNA 表达水平明显升高^[12],提示 Hp Trx1 高表达可能与 Hp 高致病性有关。Hp Trx1 的致病机制尚不明确,需进一步研究。

本研究将高低 Trx1 菌株加入细胞共培养后在倒置显微镜下观察发现,细胞分裂增多,增殖旺盛,集落增大,出现明显的增殖促进,凋亡抑制现象,且有时间及浓度的依赖性,且高 Trx1 Hp 组变化较低 Trx1 组更明显,表明 Hp Trx1 对胃癌细胞增殖有促进作用。同时发现随着时间的延长及细菌浓度的增加,细胞数量增多的同时,也出现了细胞变大,形态多变,出现中毒颗粒及空泡变性现象,并且脱壁漂浮的细胞增多,表明 Hp 在促进增殖的同时对细胞有损害作用。

本研究发现,与对照组比较,加入 Hp 的 BCG-823 的 OD 值明显升高,且随时间延长及细菌浓度增加,OD 值升高更明显,具有统计学意义($P < 0.05$),高 Trx1 组细胞存活率明显高于对应时间及浓度低 Trx1 组,表明 Hp Trx1 高表达在促进胃癌细胞 BCG-823 增殖中起重要作用。同时实验发现在同一细胞/细菌比值的不同共培养时间,也具有统计学意义($P < 0.05$),细胞存活率虽然均较对照组升高,但 24 h 细胞存活率高于 48 h,与 OD 值升高不一致,这可能是因为随着共培养时间的延长,细菌损害作用更明显,虽然因为 Hp 的促增殖作用,48 h 存活的细胞总数增加,但细胞死亡数目增加较 24 h 更明显,故存活率下降,这与镜下观察到的结果一致。

我们以往的研究^[13-14]用质粒转染的方法,使 Trx1 过表达,利用流式细胞技术,测定细胞周期,研究人 Trx1 与胃癌细胞系生长的关系,结果表明 Trx1 过表达可以促进胃癌细胞进入 S 期,提示 Trx1 有调节细胞周期的作用,人 Trx1 可能是胃癌发生发展的促进因素。但 Hp 的 Trx1 表达量是否会影响胃癌细胞的细胞周期尚不明确。本实验通过流式细胞仪检测 Hp 作用后胃癌细胞的细胞周期发现,高 Trx1 组细菌作用的 BCG-823 细胞进入 S 期的比例明显高于低 Trx1 组,再次证明 Trx1 高表达的 Hp 对胃癌 BCG-823 细胞的生长增殖具有明显的促进作用。同时实验发现 48 h 时 BCG-823 细胞进入 S 期的比例升高更明显,考虑可能与随时间延长 Hp 毒性作用所致细胞损伤的代偿有关,这与镜下观察及 MTT 结果一致。

综上所述,高表达 Trx1 的 Hp 能更明显地促进胃癌 BCG-823 细胞增殖,抑制其凋亡,表明 Trx1 与 Hp 的致癌机制可能有关,在以上研究的基础上,我们拟进一步检测细胞增殖相关蛋白,以探明 Hp Trx1 促肿瘤细胞增殖的具体机制,为胃癌的防治提供新的思路。

参 考 文 献

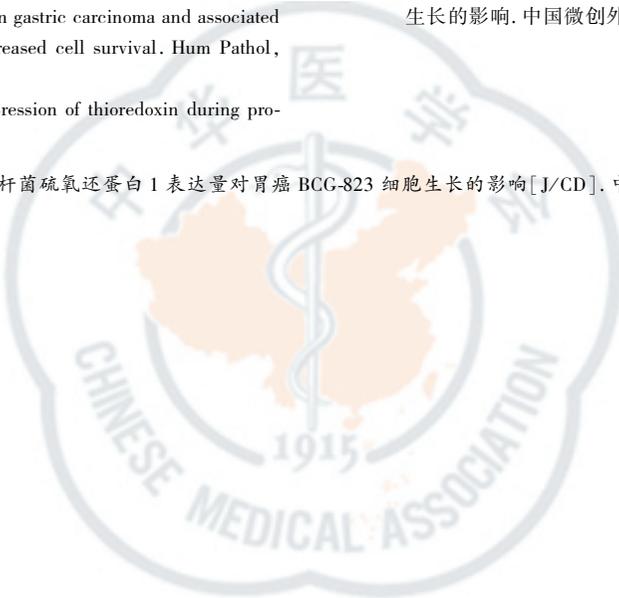
- [1] IARC. International Agency for Research of Cancer. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. World Health Organization, 1994, 61: 177-241.

- [2] Montecucco C, Rappuoli R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 457-466.
- [3] Xia Y, Yamaoka Y, Zhu Q, et al. A comprehensive sequence and disease correlation analyses for the C-terminal region of CagA protein of *Helicobacter pylori*. *PLoS One*, 2009, 4: e7736.
- [4] Bronte-Tinkew DM, Terebiznik M, Franco A, et al. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A activates the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 2009, 69: 632-639.
- [5] Saxena A, Shukla S, Prasad KN, et al. Virulence attributes of *Helicobacter pylori* isolates & their association with gastroduodenal disease. *Indian J Med Res*, 2011, 133: 514-520.
- [6] 张静, 丁士刚, 钟丽君, 等. 消化性溃疡、胃炎与胃癌患者幽门螺杆菌蛋白质组的差异分析. *中华医学杂志*, 2006, 86: 2690-2694.
- [7] Grogan TM, Fenoglio-Prieser C, Zeheb R, et al. Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival. *Hum Pathol*, 2000, 31: 475-481.
- [8] Yoon BI, Kim YH, Yi JY, et al. Expression of thioredoxin during progression of hamster and human cholangiocarcinoma. *Cancer Sci*, 2010, 101: 281-288.
- [9] Go YM, Ziegler TR, Johnson JM, et al. Selective protection of nuclear thioredoxin-1 and glutathione redox systems against oxidation during glucose and glutamine deficiency in human colonic epithelial cells. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42: 363-370.
- [10] Tonissen KF, Di Trapani G. Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53: 87-103.
- [11] 石岩岩, 丁士刚, 鲁凤民, 等. 幽门螺杆菌硫氧还蛋白两种不同亚型基因序列的测定及分析. *中华医学杂志*, 2010, 40: 2830-2833.
- [12] 石岩岩, 丁士刚, 鲁凤民, 等. 胃癌和消化性溃疡患者幽门螺杆菌临床菌株硫氧还蛋白1表达量分析. *胃肠病学*, 2011, 10: 601-604.
- [13] 石岩岩, 丁士刚, 蒋素贞, 等. 人硫氧还蛋白-1基因克隆及重组载体的构建与鉴定. *山东大学学报: 医学版*, 2011, 48: 41-45.
- [14] 石岩岩, 丁士刚, 鲁凤民, 等. 硫氧还蛋白1对胃癌细胞系 BCG823 生长的影响. *中国微创外科杂志*, 2011, 11: 1030-1033.

(收稿日期: 2012-03-08)

(本文编辑: 马超)

张月霞, 刘琳娜, 丁士刚, 等. 幽门螺杆菌硫氧还蛋白1表达量对胃癌 BCG-823 细胞生长的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(16): 4598-4602.



中华医学会