论著

文章编号:1000-5404(2006)03-0198-03

幽门螺杆菌对胃癌细胞线粒体细胞色素氧化酶亚基Ⅰ表达的影响

兰春慧,房殿春 (第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要: 目的 观察幽门螺杆菌(*H. pylori*)作用于胃癌细胞后线粒体编码基因COXⅠmRNA及蛋白的表达变化,探讨*H. pylori*致胃癌的分子机制。**方法** *H. pylori*培养滤液分别作用于胃癌细胞4、8和12 h后,收集细胞,应用RT-PCR和Western blot法检测各时相点COXⅠ基因和蛋白表达变化。**结果** *H. pylori*培养滤液作用4 h后,线粒体COXⅠmRNA的表达开始降低,8 h下降更明显,12 h下降速度减缓。各时相点的表达量明显低于对照组($P<0.05$)。COXⅠ蛋白表达呈现出相同的趋势,各时相点的表达量明显低于对照组($P<0.05$)。**结论** *H. pylori*可下调胃癌细胞线粒体编码基因COXⅠmRNA及蛋白的表达,影响线粒体功能。

关键词: 幽门螺杆菌;COXⅠ;胃癌细胞;线粒体

中图法分类号: R377; R730.23; R735.2 **文献标识码**: A

Effects of *Helicobacter Pylori* on mitochondrial cytochrome oxidase subunit Ⅰ in gastric cancer cells

LAN Chun-hui, FANG Dian-chun (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of concentrated *H. pylori* culture supernatant (CHCS) on the expressions of COXⅠmRNA and protein in gastric carcinoma cells, and explore the potential role of *H. pylori* in the gastric carcinogenesis. **Methods** After SGC7901 cells were treated by 6 μl/ml CHCS for 4 h, 8 h, 12 h respectively, the expression of COXⅠmRNA and protein was detected by RT-PCR and Western blotting. **Results** The expression of COXⅠmRNA decreased gradually after exposure to CHCS for 4 h. Especially after 8 h, the expression decreased significantly. When treated with CHCS for 12 h, the expression continued to decrease ($P<0.05$). The expression of COXⅠprotein revealed the same trend. **Conclusion** *H. pylori* could affect mitochondrial function by down-regulating the expression of mitochondrial encoding cytochrome oxidase Ⅰ gene.

Key words: *Helicobacter pylori*; COXⅠ; gastric cancer cell; mitochondria

细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase, COX)是位于线粒体内膜上呼吸链末端的限速酶,是唯一能将电子传给氧分子的细胞色素复合物,是呼吸链氧化磷酸化过程中关键酶,其损伤可直接影响线粒体功能[1,2]。既往研究表明胃粘膜细胞核基因组有线粒体DNA(mitochondria DNA, mtDNA)片段的整合,且这种整合与*H. pylori*感染有关[3]。mtDNA片段与核基因整合后,是否会导致所编码基因表达的改变,这种改变是否与*H. pylori*感染有关尚不明确。本研究通过观察*H. pylori*对线粒体编码基因COXⅠmRNA及蛋白表达的影响,希望能较深入地探讨线粒体损伤在*H. pylori*致胃癌中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

胃癌细胞株SGC7901及*H. pylori* NCTC 11637菌种由本室保存;RPMI1640、抗小鼠IgG-HRP(Sigma公司);胎牛血清(华美公司);小鼠抗COX-I单抗(Molocular probes);Tripure(Roche公司);逆转录试剂盒(Promega公司);PCR试剂盒及DNA Marker(Takara公司)。

1.2 方法

1.2.1 *H. pylori*培养滤液的制备 取出1管本室保存的NCTC 11637.菌种,并进行鉴定。参照Leunk等[4]的方法以布氏肉汤于37 ℃微需氧条件下旋转(120 r/min)培养72 h,培养液于12 000×*g*低温离心30 min,上清液经0.22 μm微孔滤膜

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870345),全军医学科研技术研究"十五"计划基金重点课题(01Z075)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39870345) and the Key Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA (01Z075)

作者简介:兰春慧(1973-),女,重庆市人,博士,主治医师,讲师,主要从事胃癌发病机制及其防治方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68757342

通讯作者:房殿春,电话:(023)68754124

收稿日期:2005-01-24;修回日期:2005-10-13

过滤除菌，冷冻浓缩 20 倍，低温保存备用，以相同方法（不加 *H. pylori*）制备肉汤滤液作为对照。

1.2.2　细胞培养　　SGC 7901 细胞置于 37 ℃，饱和湿度，含 5% CO_2 的孵箱中培养，培养液 RPMI1640 含 100 ml/L 胎牛血清，100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素。根据细胞生长状况每 2～3 天换液 1 次，当细胞生长状态稳定，呈对数生长期，将 6 μl/ml 的 *H. pylori* 培养滤液与胃癌细胞分别作用 4、8、12 h，对照组用肉汤滤液替代 *H. pylori* 培养滤液，根据实验要求每个时相点设立 3 组平行对照。培养细胞至各组时相点后收集洗涤细胞，用于检测。

1.2.3　RT-PCR　　采用 Tripure 试剂一步法提取细胞总 RNA，1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定，紫外分光光度计测定纯度并定量。根据 GenBank 中的 Human mitochondrial genome sequencé 应用 Whitehead Institute for BiomedicalResearch www primer picking software（primer 3）设计引物 COX Ⅰ，上游序列为 5′- TCCATAACGCTCCTCATACT-3′，下游序列为 5′- GTGGTAAAAGGCTCAGAAAA-3′，以看家基因 β-actin 作为内对照，上游序列为 5′-CCAGAGCAAGAGAGGTATCC-3′，下游序列为 5′-CTGTGGTGGTGAAGCTGTAG-3′。COX Ⅰ mRNA 的检测应用 TaKaRa RT-PCR Kit（AMV），按要求操作。逆转录反应条件是 74 ℃ 5 min，45 ℃ 1 h。PCR 扩增循环条件是 95 ℃ 预变性 5 min，95 ℃ 变性 55 s，52 ℃退火 50 s，72 ℃延伸 1 min，反应 32 个循环，最后 72 ℃再延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测，紫外灯下观察，凝胶成像系统扫描存盘。记录各条带积分光密度（IOD），将各个检测基因与自身 β-actin 条带 IOD 相比较得到其相对 IOD。

1.2.4　Western blot　　收集培养的细胞，PBS 洗涤，按 10^6/ml 的细胞浓度加入细胞裂解缓冲液，置冰上孵育 30 min，于 4 ℃ 12 000 × *g* 离心 15 min，取上清液，Lowry 法蛋白定量，每组取 50 μg 蛋白，用 15 % 聚丙烯酰氨凝胶电泳，考马斯亮蓝染色标记 Marker，然后转移至 PVDP 膜上，6% 脱脂奶粉室温封闭 1 h，4 ℃过夜，洗涤后，膜和小鼠抗 COXI 单抗（1∶400）作用，室温反应 2 h，洗涤后加入抗小鼠 HRP-IgG，（1∶2 500），室温反应 1 h，化学发光试剂检测，X 线片显影。凝胶成像系统分析结果。

1.3　统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，以 SPSS 9.0 统计分析程序进行单因素方差分析。

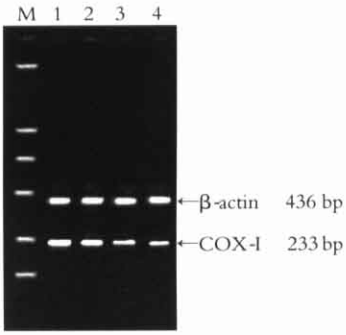
2　结果

2.1　*H. pylori* 对胃癌细胞 COX Ⅰ mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示：正常情况下，胃癌细胞 COX Ⅰ mRNA 有一定程度的表达，*H. pylori* 培养滤液作用 4 h 后，其表达量明显下降，显著低于对照组（$P < 0.05$），此后下降的速度减慢，作用 12 h 后其表达量不再有明显改变，呈较稳定的状态（图 1）。

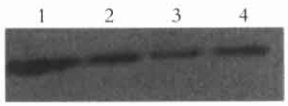
2.2　Western blot 检测线粒体 DNA COX Ⅰ 蛋白的表达变化

H. pylori 培养滤液作用 4 h 后，COX Ⅰ 蛋白的表达明显下降，8 h 下降更明显，显著低于对照组（$P < 0.05$），作用 12 h 后其表达量较 8 h 相比略有增高（图 2）。



M：标准；1：对照组；2－4：*H. pylori* 作用 SGC7901 4、8、12 h

图 1　*H. pylori* 作用胃癌细胞后 COX Ⅰ mRNA 的表达变化



1：对照组；2－4：*H. pylori* 作用 SGC7901 4、8、12 h

图 2　*H. pylori* 作用胃癌 SGC7901 细胞后 COX Ⅰ 蛋白的表达变化

3　讨论

3.1　*H. pylori* 对胃癌细胞 COX Ⅰ 基因及蛋白表达的影响

COX 由 13 个亚基构成，其中最大的 3 个亚基（COX Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ）由 mtDNA 编码，其损伤可直接影响线粒体功能。本研究表明 *H. pylori* 培养滤液作用 4 h 后，胃癌细胞 COX Ⅰ mRNA 表达量明显下降，显著低于对照组（$P < 0.05$），此后下降的速度减慢，作用 12 h 后其表达量不再有明显改变，呈较稳定的状态。其蛋白的表达呈现出大致相同的趋势，表明 *H. pylori* 可使 mtDNA 编码的 COX Ⅰ 转录活性降低，蛋白表达减少。文献[5]报道心脏和脑缺血缺氧后会表现出相应区域 COX 活性下降，COX 表达下降。柏干荣等[6]在失血性休克大鼠模型中发现缺血缺氧使肠黏膜上皮细胞线粒体编码基因 COX mRNA 的表达紊乱，其机制与氧自由基增多有关。当自由基产生增多且不能被抗氧化剂中和时，就会损伤膜脂、蛋白质、DNA 及其他生物大分子，在 DNA 中生成胸苷乙二醇和 8-羟基鸟嘌呤，抑制转录和翻译。在 *H. pylori* 感染者中也发现黏膜组织脂质过氧化产物显著增加[7]，由此推测，*H. pylori* 感染所导致的氧自由基增加可能是引起 COX 基因表达下调的原因之一。

3.2　线粒体在 *H. pylori* 致胃癌中的可能作用

H. pylori 已被确认为第 1 类致癌因子，但 *H. pylori* 诱发胃癌的机制仍未阐明。过去 10 多年的研究表明

线粒体功能异常以及线粒体DNA突变和人类肿瘤形成与发展之间密切相关，目前在肺癌、肝癌、直肠癌等多种恶性肿瘤中检测到线粒体基因组的不稳定性、突变或基因表达异常[8-9]。本研究从转录和翻译水平证实了胃癌细胞中线粒体编码基因的改变，并且与*H. pylori*感染有关。COX Ⅰ基因的表达下降，从一定程度上反映了mtDNA的功能障碍，提示细胞能量合成受阻，从而引起膜电位（$\Delta\psi m$）丧失，膜通透性加大[10]，启动凋亡通路。而凋亡和增殖失衡是*H. pylori*导致胃癌发生的机制之一。因此线粒体可能通过凋亡途径参与*H. pylori*诱发胃癌的过程。

本研究表明：*H. pylori*可引起胃癌细胞线粒体编码基因COX Ⅰ mRNA及蛋白的表达障碍，影响线粒体功能，为进一步揭示*H. pylori*致胃癌的分子机制提供新的线索。

参考文献：

[1] BARRIENTOS A, BARROS M H, VALNOT I, *et al*. Cytochrome oxidase in health and disease[J]. Gene, 2002, 286(1): 53-63.

[2] KADENBACH B, ARNOLD S, LEE I, *et al*. The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1655(1-3): 400-408.

[3] 凌贤龙，房殿春，周晓东，等. 胃黏膜细胞线粒体DNA不稳定及核内整合与幽门螺杆菌感染有关[J]. 中华消化杂志，2003，23(2)：80-83.

[4] LEUNK R D, JOHNSON P T, DAVID B C, *et al*. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*[J]. J Med Microbiol, 1988, 26(2): 93-99.

[5] FAULK E A, MCCULLY J D, HADLOW N C, *et al*. Magnesium cardioplegia enhances mRNA levels and the maximal velocity of cytochrome oxidase I in the senescent myocardium during global ischemia[J]. Circulation, 1995, 92(9 Suppl): II405-II412.

[6] 柏于荣，陆松敏，李 萍，等. 三七皂苷Rg_1对失血性休克大鼠肠上皮细胞线粒体损伤保护作用的研究[J]. 中国药学杂志，2003，38(9)：665-667.

[7] 梁后杰，刘为纹，房殿春，等. 幽门螺杆菌培养滤液诱癌和促癌作用的实验研究[J]. 中华医学杂志，1998，78(7)：485-487.

[8] BIANCHI N O, BIANCHI M S, RICHARD S M. Mitochondrial genome instability in human cancers[J]. Mutat Res, 2001, 488(1): 9-23.

[9] PENTA J S, JOHNSON F M, WACHSMAN J T, *et al*. Mitochondrial DNA in human malignancy[J]. Mutat Res, 2001, 488(2): 119-133.

[10] GREEN D R, REED J C. Mitochondria and apoptosis[J]. Science, 1998, 281(5381): 1309-1312.

[11] 凌贤龙，房殿春，周晓东，等. 胃粘膜幽门螺杆菌感染与线粒体DNA微卫星不稳的关系[J]. 第三军医大学学报，2001，23(9)：1024-1026.

[12] 凌贤龙，房殿春，周晓东，等. 胃粘膜细胞线粒体DNA核内整合及其与幽门螺杆菌感染的关系[J]. 第三军医大学学报，2001，23(9)：1043-1045.

（编辑 张大春）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)03-0200-01

28例新型隐球菌脑膜炎病例临床分析

马春华 （辽东学院医学院内科教研室，丹东 118002）

新型隐球菌脑膜炎近年来发病有上升趋势，现对我院1995年6月至2005年6月，收治的28例新型隐球菌脑膜炎诊疗过程进行分析。

1 临床资料

1.1 一般资料

28例新型隐球菌脑膜炎中，男性18例，女性10例。40岁以下21例，40岁以上7例。本组务农者11例，其他人员17例。发病前有禽鸟类饲养或接触史者有12例。既往有其他疾病的19例，患有结核病、糖尿病各4例；系统性红斑狼疮3例；乙型病毒性肝炎的6例；肾病、肝硬化各1例，其中患病前使用过激素6例。

作者简介：马春华（1971-），女，辽宁省丹东市人，硕士研究生，讲师，主要从事神经系统疾病方面的研究，发表论文6篇。电话：(0415)6969998，E-mail：machunhua_012345@yahoo.com.cn

收稿日期：2005-09-19；修回日期：2005-11-20

1.2 临床表现

本组病例主要表现为发热和（或）脑膜刺激征等症状，全部患者均有发热，颈项强直24例，意识障碍9例，视乳头水肿、锥体束征阳性各7例，抽搐发作6例，偏瘫5例，双眼失明、耳聋各4例，精神或行为异常2例。

1.3 辅助检查

本组28例患者腰穿脑脊液墨汁染色涂片均检出隐球菌，其中15例第1次涂片阳性，7例于第2次，6例于第3次涂片阳性。脑脊液：压力>300 mmH$_2$O者7例；糖<2.5 mmol/L者22例；氯化物<119 mmol/L者21例。脑脊液白细胞数(12~392)×10^6/L，淋巴细胞比例>0.5者20例。

1.4 治疗及预后

14例用两性霉素B（AMB）联合5-氟胞嘧啶（5-FC）治疗（配合AMB鞘内注射），痊愈3例，好转6例，死亡5例。用药

（下转204页）