文章编号:1000-5404(2009)05-0375-04

论著

线粒体途径在幽门螺杆菌诱导胃癌细胞凋亡中的作用

张 浩,房殿春,罗元辉,兰春慧 (第三军医大学西南医院全军消化病研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨线粒体途径在幽门螺杆菌(*H. pylori*)诱导胃癌细胞凋亡中的作用。**方法** 采用流式细胞术检测 *H. pylori* NCTC 11637 诱导的 SGC-7901 细胞凋亡,RT-PCR 和 Western blot 法检测 *H. pylori* 感染对线粒体途径相关基因和蛋白表达的影响,并观察 Caspase 抑制剂对 *H. pylori* 所致 SGC-7901 细胞凋亡的影响。**结果** *H. pylori* 能够在体外直接诱导 SGC-7901 细胞凋亡,6、12、24 h 和 48 h 的凋亡率分别为 6.30%、11.57%、8.63% 和 7.22%;*H. pylori* 能够呈时间依赖性地上调 SGC-7901 细胞的 Bax 蛋白表达,并促进 Caspase-9 和 3 的激活;Caspase-9 和 3 抑制剂能够显著抑制 NCTC 11637 所致的 SGC-7901 凋亡,而 Caspase-8 抑制剂仅能部分抑制约 20% NCTC 11637 所致的 SGC-7901 凋亡。**结论** *H. pylori* 可引起 SGC-7901 细胞 Bax 基因和蛋白表达升高,激活 Caspase-9 和 Caspase-3,且主要通过线粒体途径诱导细胞凋亡。

关键词: 螺杆菌,幽门;凋亡;线粒体途径;Caspase
中图法分类号: R377; R394.3; R735.2 **文献标识码:** A

Role of mitochondrial pathway in apoptosis of gastric cancer cell line SGC-7901 induced by *Helicobacter pylori*

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

Abstract: Objective To evaluate the role of mitochondrial pathway in apoptosis of gastric cancer cell line SGC-7901 induced by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). **Methods** Apoptosis was evaluated in SGC-7901 cells by flow cytometry. RT-PCR and Western blotting were used to measure the expressions of genes and proteins associated with mitochondrial pathway. Effect of caspase inhibitors on apoptosis induced by *H. pylori* strain NCTC11637 was investigated. **Results** NCTC11637 directly induced apoptosis in SGC-7901 cells. Apoptotic rate was 6.30%, 11.57%, 8.63% and 7.22% respectively at 6, 12, 24 and 48 h after coculture with *H. pylori*. *H. pylori* upregulated the expression of Bax, and induced a time-dependent activation of caspase-9 and -3. Apoptosis was inhibited significantly by pre-incubation with the inhibitors of caspase-9 and -3. Caspase-8 inhibitor reduced *H. pylori*-induced apoptosis by 20%. **Conclusion** *H. pylori* infection upregulates the expressions of Bax mRNA and protein in gastric cancer cell line SGC-7901, and induces activation of caspase-9 and -3. Mitochondrial pathway may be the major one in *H. pylori*-induced apoptosis in SGC-7901.

Key words: *Helicobacter pylori*; apoptosis; mitochondrial pathway; Caspase

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染是慢性胃炎的常见病因。许多研究表明 *H. pylori* 感染会引起胃黏膜上皮细胞凋亡异常,这可能与消化性溃疡、胃癌等上消化道疾病的发病有关,但 *H. pylori* 导致胃上皮细胞凋亡的具体机制还不甚明了。细胞凋亡的信号转导存在2个主要途径——死亡受体途径和线粒体途径。目前已有研究表明,*H. pylori* 能够在体内通过促进胃黏膜中的淋巴细胞浸润和增加 TNF 等细胞因子的表达激活死亡受体途径,从而诱导胃上皮细胞发生凋亡[1],但在没有细胞因子存在的情况下,*H. pylori* 能够在体外直接诱导胃上皮细胞发生凋亡的机制尚不清楚。因此,我们观察了 *H. pylori* 感染对 SGC-7901 细胞线粒体途径相关蛋白表达的影响,并观察了 Caspase 抑制剂对 *H. pylori* 所致 SGC-7901 细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和细菌 人胃腺癌细胞系 SGC-7901 和 *H. pylori* 国际标准菌株 NCTC11637 均为本室保存。

1.1.2 试剂 山羊抗 Actin(sc-1616)购自 Santa Cruz 公司;

基金项目: 国家自然科学基金(30070043);全军医学科学技术研究"十五"计划基金重点课题(01Z075)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30070043) and the Key Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" for Medical Sci & Tech Research of PLA (01Z075)

作者简介: 张 浩,男,河北省石家庄市人,博士,主治医师,主要从事胃黏膜癌变机制方面的研究。E-mail: side000231@sina.com
通信作者: 房殿春,电话:(023)68754480

收稿日期: 2008-07-04;**修回日期:** 2008-10-15

兔抗 Bax(sc-493)购自 Santa Cruz 公司;兔抗 Bcl-2(sc-492)购自 Santa Cruz 公司;小鼠抗细胞色素 C(sc-13561)购自 Santa Cruz 公司;兔抗 Caspase-3 Antibody(No. 9662)购自 Cell Signaling 公司;兔抗 Caspase-9(sc-8355)购自 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记兔抗山羊 IgG(ZB-2306)购自北京中山生物公司;辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(BA1050)购自武汉博士德生物公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(ZB-2305)购自北京中山生物公司。

1.2 方法

1.2.1 *H. pylori* 活菌悬液的制备 *H. pylori* 国际标准菌株 NCTC 11637 接种于 *H. pylori* 分离平板上,置于 37 ℃微需氧环境中(5% O_2、10% CO_2、85% N_2)培养,2 ~ 3 d 后收集细菌,用 RPMI1640 培养液制成细菌悬液,在分光光度计上确定 *H. pylori* 的浓度[1 D(660) = 1×10^8 CFU/ml]。

1.2.2 人胃腺癌细胞系 SGC-7901 的培养 人胃腺癌细胞系 SGC-7901 为本室保存,细胞培养在 RPMI1640 培养液中(含 10% 胎牛血清、1×10^5 U/L 青霉素、1×10^5 U/L 链霉素),置于 37℃含 5% CO_2 的培养箱内培养,每 3 ~ 4 天传代 1 次。

1.2.3 NCTC 11637 与 SGC-7901 细胞共同培养 细胞传代后,调整培养瓶中的细胞数为 $2 \times 10^5 ml^{-1}$,加入与细胞浓度之比为 50∶1的 NCTC 11637,与细胞共同培养,取 0、6、12、24、48 h 的细胞用于流式细胞检测,以不加 NCTC 11637 细胞为对照。

1.2.4 RT-PCR 法检测 Bax 和 Bcl-2 mRNA 的表达 RT-PCR 引物根据文献[2,3]设计合成(表 1)。

表 1 RT-PCR 引物及反应条件

基因	引物序列	退火温度	循环数	片段大小
Bax	正义 5′-ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTC-3′	58 ℃	33	332 bp
	反义 5′-ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC-3′			
Bcl-2	正义 5′-TGCACCTGACGCCCTTCAC-3′	58 ℃	33	293 bp
	反义 5′-AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3′			
β-actin	正义 5′-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3′	58℃	33	540 bp
	反义 5′-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3′			

采用 TriPure isolation reagent(Roche 公司)提取不同时相的细胞总 RNA。采用 20 μl 逆转录反应体系:含待测总 RNA 2 μg,AMV 反转录酶 5 U,RNA 酶抑制剂 20 U,4 种 dNTP 各 0.5 mmol/L,5 × 逆转录缓冲液 4 μl,Oligo(dt)18 1 μl。42 ℃反应 60 min 合成 cDNA 第 1 链。

PCR 反应体系为 20 μl,内含 10 × PCR 缓冲液 2 μl,4 种 dNTP 各 0.25 mmol/L,*Taq* 酶 1.5 U,cDNA 2 μl,上下游引物各 0.5 μmol/L。PCR 反应在 0.5 ml 的 Ep 管中进行,用 GeneAmp® PCR System 2700 扩增。PCR 反应参数为 94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 1 min,58 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,33 个循环。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳。对扩增产物用凝胶成像系统进行定量分析。

1.2.5 Bax、Bcl-2、Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白的表达检测 采用 Western blot 方法。用蛋白质提取液(Pierce 公司)提取不同时相的细胞总蛋白,Lowry 法进行蛋白质定量,以 80 μg/孔上样,在 12% SDS-PAGE 凝胶中进行电泳分离,电转移法将蛋白质从 SDS-PAGE 凝胶转移至硝酸纤维素膜,室温下,在含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 溶液中封闭 1 h,加入一抗(1∶1 000)共同孵育 1 h,TBS-T 溶液洗膜(15 min × 3 次),加入二抗(1∶1000)共同孵育 1 h,TBS-T 溶液洗膜(15 min × 3 次),化学发光法(ECL)显色,观察结果。

1.2.6 Caspase 抑制剂对 NCTC 11637 所致 SGC-7901 细胞凋亡的影响 细胞传代后,分别加入 50 μmol/L Caspase-8 抑制剂 Z-IETD-FMK、Caspase-9 抑制剂 Z-LEHD-FMK 和 Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK,调整 NCTC 11637 与细胞浓度之比为 50∶1,将 NCTC 11637 与细胞共同培养,同时取 6、12、24、48 h 的细胞用于流式细胞检测。

1.2.7 NCTC 11637 所致 SGC-7901 细胞凋亡的超微结构观察 SGC-7901 细胞与 NCTC 11637 共同培养 6 h 后,消化,用预冷 PBS 洗 2 次并调整细胞数为 $1 \times 10^9 L^{-1}$,离心弃上清后,常规固定,送第三军医大学电镜室脱水、包埋、制作超薄切片,铅-铀双染,PECNAR-10 透射电镜观察。

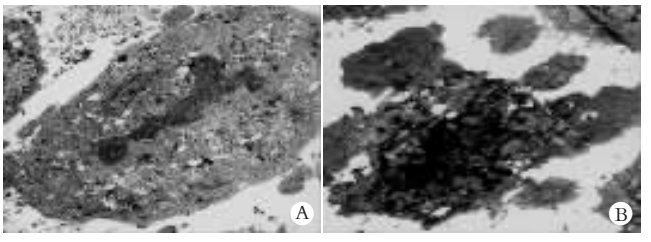
1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,通过 SPSS 10.0 进行 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 NCTC 11637 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

NCTC 11637 能够直接诱导 SGC-7901 细胞凋亡,电镜下观察,与对照组相比,NCTC 11637 对 SGC-7901 细胞作用 6 h 后,可见细胞核膜及质膜皱缩,染色质聚集、成团,呈早期凋亡表现(图 1),6、12、24 h 和 48 h 的细胞凋亡率分别为(6.30 ± 0.40)%、(11.57 ± 0.78)%、(8.63 ± 0.67)% 和(7.22 ± 0.97)%,高于对照组(1.54 ± 0.58)%、(2.66 ± 0.59)%、(2.34 ± 0.85)% 和(1.66 ± 0.66)%,细胞凋亡发生的高峰时间出现在 12 ~ 24 h。



A:对照组 (×2 900);B:NCTC 11637 处理组 (×4 200)

图 1 NCTC 11637 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响 (TEM)

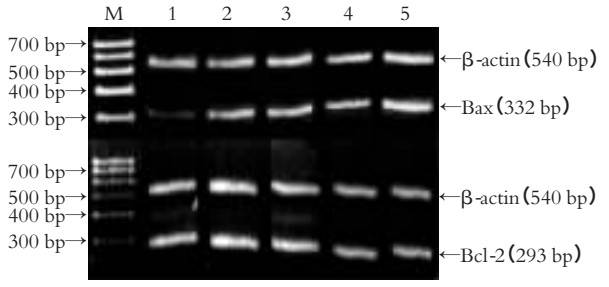
2.2 NCTC 11637 对 SGC-7901 细胞 Bax、Bcl-2 mRNA 和蛋白表达的影响

NCTC 11637 呈时间依赖性地上调 SGC-7901 细胞 Bax mRNA 和蛋白表达,但对 Bcl-2 表达则无明显影响(表 2,图 2,3)。

表 2 NCTC 11637 对 SGC-7901 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响

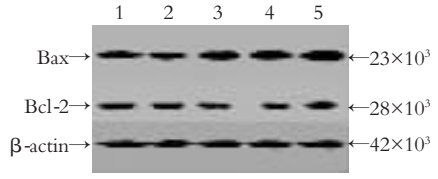
时相点	Bax	Bcl-2
0 h	0.57 ± 0.32	1.03 ± 0.90
6 h	0.67 ± 0.34	0.92 ± 0.51
12 h	0.79 ± 0.20 [a]	1.06 ± 0.90
24 h	0.97 ± 0.49 [a]	1.27 ± 0.52
48 h	0.89 ± 0.51 [a]	1.09 ± 0.73

a: $P < 0.05$, 与 0 h. 比较



M:标准; 1 -5: 分别为共培养 0、6、12、24、48 h

图 2　NCTC 11637 对 SGC-7901 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响

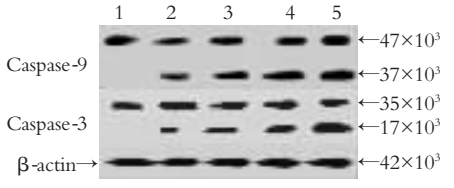


1 -5: 分别为共培养 0、6、12、24、48 h

图 3　NCTC 11637 对 SGC-7901 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

2.3　NCTC 11637 对 SGC-7901 细胞 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白激活的影响

以 Caspase 酶原被激活时形成的亚单位代表 Caspase 的激活程度,NCTC 11637 呈时间依赖性地促进 SGC-7901 细胞的 Caspase-9 及 Caspase-3 激活(图 4)。



1 -5: 分别为共培养 0、6、12、24、48 h

图 4　NCTC 11637 对 SGC-7901 Caspase-9 和 Caspase-3 激活的影响

2.4　Caspase 抑制剂对 NCTC 11637 所致 SGC-7901 细胞凋亡的影响

Caspase-3 和 Caspase-9 的抑制剂能够显著抑制 NCTC 11637 所致的 SGC-7901 细胞凋亡,加入 Caspase-3 抑制剂后的 6、12、24、48 h 细胞凋亡率分别为:(1.72 ± 0.59)%、(2.97 ± 0.55)%、(4.38 ± 1.56)% 和(3.29 ± 0.83)%,加入 Caspase-9 抑制剂后的 6、12、24、48 h 细胞凋亡率分别为:(2.47 ± 0.53)%、(6.68 ± 0.47)%、(5.97 ± 0.46)% 和(5.43 ± 0.15)%,Caspase-8 抑制剂仅能抑制约 20% 由 NCTC 11637 所致的 SGC-7901 细胞凋亡,6、12、24、48 h 细胞凋亡率分别为:(5.65 ± 0.65)%、(9.48 ± 0.85)%、(6.70 ± 1.30)% 和(6.47 ± 1.55)% 。

3　讨论

目前认为细胞凋亡的途径主要有 2 条:死亡受体途径和线粒体途径。死亡受体途径是指细胞膜上的死亡受体 Fas、TNFR 和 TRAILR 等,与相应的配体 FasL、TNF-α 和 TRAIL 等结合后,通过接头蛋白招募并激活 Caspase-8,并依次激活其他的 Caspase,最终使细胞凋亡;线粒体途径则是指细胞在诸如 DNA 损伤、缺氧或细胞毒性药物等凋亡刺激信号作用下,线粒体释放细胞色素 C 到细胞质中,并激活 Caspase-9 来引起细胞凋亡[4]。我们以往的研究发现,胃黏膜线粒体 DNA 不稳定及核内整合与幽门螺杆菌感染有关[5],而且在*H. pylori*诱发 SGC-7901 胃癌细胞凋亡的过程中,伴有线粒体膜电位的下降以及线粒体编码蛋白表达的下调[6],提示 *H. pylori*可能通过线粒体途径诱导了细胞凋亡。

Bcl-2 家族蛋白 Bax 和 Bcl-2 与线粒体途径关系密切,Bcl-2 通过其 BH3 结构域与 Bax 等促凋亡分子形成异源二聚体,维持促凋亡蛋白在细胞内的分布,抑制线粒体释放细胞色素 C,从而抑制细胞凋亡。Bax 在正常情况下定位于细胞质,细胞内 Bcl-2 较多时,Bcl-2 和 Bax 主要形成异源二聚体,细胞不易凋亡,而当 Bax 较多时,Bax 本身形成的同源二聚体占主导,则细胞易于凋亡。有效的死亡信号刺激后,Bax 会从细胞质转移到线粒体膜上形成同源二聚体,通过线粒体通透性改变、破坏氧化磷酸化和 ATP 的合成功能,使线粒体释放 Apaf-1 和细胞色素 C,从而促进凋亡[7]。本研究表明,SGC-7901 细胞与 *H. pylori* 共同培养后,*H. pylori* 还能够呈时间依赖性地上调 Bax mRNA 和蛋白水平,但对 Bcl-2 表达则无明显影响,提示与 *H. pylori* 慢性感染的情况不同,在 *H. pylori* 急性感染诱导胃癌细胞凋亡的机制中,*H. pylori* 可能主要通过上调促凋亡基因 Bax 的表达诱导细胞凋亡,而抗凋亡基因 Bcl-2 等可能并不是主要的调节因素。

线粒体途径主要通过激活 Caspase-9 来引起细胞凋亡,而死亡受体途径主要依靠 Caspase-8 的激活引发凋亡。本研究表明,*H. pylori* 能够呈时间依赖性地激活 SGC-7901 细胞的 Caspase-9 和 Caspase-3,而且 Caspase-9 和 3 抑制剂能显著抑制 *H. pylori* 所致的凋亡,而 Caspase-8 抑制剂仅能起部分抑制作用,提示 *H. pylori*可能主要通过 Caspase-9,即线粒体途径来诱导细胞凋亡。关于 Caspase 如何在凋亡诱导中发挥作用仍存在不同意见,虽然以 Caspase-8 为代表的死亡受体途径和以 Caspase-9 为代表的线粒体途径均参与其中[8],但以何途径为主尚不明确,Potthoff 等[9]将 *H. pylori* 与 AGS 细胞共同培养,发现尽管 *H. pylori* 依次激活 Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-3,但 Caspase-9 和 3 抑制剂能够几乎抑制所有凋亡的发生,而 Caspase-8 抑制剂只能部分抑制凋亡;最近 Kim 等[10]的研究也发现 *H. pylori* 的 γ-谷氨酰转肽酶可通过线粒体途径直接诱导 AGS 细胞发生凋亡,且这一过程不伴有 Caspase-8 的激活,这与本研究的结果相一致,提示

H. pylori 可能主要通过线粒体途径来诱导细胞凋亡。

综上所述，我们认为 *H. pylori* 可引起 SGC-7901 细胞 Bax 基因和蛋白表达升高，激活 Caspase-9 和 Caspase-3，且主要通过线粒体途径诱导细胞凋亡。

参考文献：

[1] Neu B, Rad R, Reindl W, *et al*. Expression of tumor necrosis factor-alpha -related apoptosis-inducing ligand and its proapoptotic receptors is down-regulated during gastric infection with virulent cagA +/vacAs1 + *Helicobacter pylori* strains[J]. J Infect Dis, 2005, 191(4): 571 - 578.

[2] Lee E H, Wan X H, Song J, *et al*. Lens epithelial cell death and reduction of anti-apoptotic protein Bcl-2 in human anterior polar cataracts [J]. Mol Vis, 2002, 8: 235 - 240.

[3] 沈锡中. Heme Oxygenase-1 对乙酸诱导大鼠胃溃疡的保护作用[J]. 世界华人消化杂志, 2000, 8(9): 979 - 982.

[4] Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death[J]. Toxicol Lett, 2004, 149(1 - 3): 19 - 23.

[5] 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.

[6] 兰春慧，房殿春，樊丽琳，等. 线粒体损伤在幽门螺杆菌诱导胃癌细胞凋亡中的作用[J]. 中华内科杂志, 2005, 44(10): 748 - 750.

[7] Uren R T, Dewson G, Chen L, *et al*. Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple prosurvival Bcl-2 relatives, not Bak[J]. J Cell Biol, 2007, 177(2): 277 - 287.

[8] Manente L, Perna A, Buommino E, *et al*. The *Helicobacter pylori's* protein VacA has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells[J]. J Cell Physiol, 2008, 214(3): 582 - 587.

[9] Potthoff A, Ledig S, Martin J, *et al*. Significance of the caspase family in *Helicobacter pylori* induced gastric epithelial apoptosis[J]. Helicobacter, 2002, 7(6): 367 - 377.

[10] Kim K M, Lee S G, Park M G, *et al*. Gamma-glutamyltranspeptidase of *Helicobacter pylori* induces mitochondria-mediated apoptosis in AGS cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 355(2): 562 - 567.

（编辑　王小寒）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2009)05-0378-01

四肢主干血管损伤术后护理

肖尔婵，唐修俊，李　艳，税　兰　（遵义医学院附属医院烧伤整形科，贵州 遵义，563003）

本科 2005 年 10 月至 2008 年 6 月期间收治 32 例四肢主干血管损伤的患者，通过积极的治疗、严密的观察和精心的护理，提高了治愈率、降低了截肢率。现将护理总结如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料

本组患者男性 30 例，女性 2 例。年龄 5 ~ 56 岁。受伤肢体缺血时间 1 ~ 22 h。损伤股动脉 18 例，腘动脉 4 例，腋动脉 2 例，肱动脉 8 例；其中刀刺伤 22 例，枪击伤 2 例，压榨伤 8 例；完全断裂 28 例，部分断裂 4 例；合并神经损伤 22 例，合并骨折 8 例。

1.2　治疗及预后

32 例患者均运用显微外科技术进行血管吻合手术。8 例采取了健侧下肢大隐静脉游离移植桥接吻合，22 例修整断端并游离后直接端端吻合，2 例直接缝合修补。其中有 5 例进行了切开减张术，2 期行游离植皮修复创面。32 例中，28 例术后肢体成活，血液循环良好，肢体远端可触及动脉搏动，无肌肉坏死及缺血性挛缩，肢体运动功能良好；2 例肢体成活，肢体远端血液循环差，动脉搏动未触及，有部分肌肉坏死及缺血性挛缩，经积极治疗处理及康复性功能锻炼后运动功能满意，其中 1 例手术后并发急性肾功能衰竭，经过血透治疗痊愈；2 例下肢远端血循环差，动脉搏动未触及，有大部分肌肉软组织坏死，并出现肾功能减退，无法保留肢体，给予截肢。

2　护理

2.1　体位与活动

术后绝对卧床 1 ~ 2 周，伤肢制动、适当抬高，指导患者床上适当活动；协助患者翻身，避免局部长期受压，禁止患侧卧位。

2.2　术后观察

2.2.1　全身情况　严密监测体温、血压、脉搏、呼吸、血氧饱和度及中心静脉压，准确记录 24 h 尿量，定期监测血常规、电解质及肾功能，如使用抗凝药物的要注意观察全身有无出血，并定期监测凝血功能。

2.2.2　局部情况　术后要严密观察伤肢皮肤颜色、温度、感觉、毛细血管充盈反应、远端动脉搏动、肿胀等血液循环情况。如肢体或肢端苍白、冰凉、动脉搏动减弱或消失提示动脉危象；如肢体肿胀明显、发紫提示有静脉危象。注意观察伤肢疼痛的性质及严重程度。密切观察术区吻合口部位有无包块（血肿）、渗血，如切开减压的要注意观察伤口渗出液的性质、颜色及量。

（下转 386 页）

作者简介：肖尔婵，女，贵州省遵义市人，土家族，主管护师，主要从事烧伤整形外科（包括血管外科）临床护理方面的研究，发表论文 6 篇。电话：(0852)8608887，E-mail：xiaoerchan6688@163.com

收稿日期：2008-09-21；修回日期：2008-10-10