论著

文章编号:1000-5404(2010)19-2094-04

幽门螺杆菌 *iceA* 基因对 SGC7901 细胞生长的影响

马一君[1],段广才[1,2],张荣光[1],张卫东[1],郝园林[1] (450001 郑州,郑州大学公共卫生学院流行病学教研室[1];450052 郑州,河南省分子医学重点学科开放实验室[2])

【摘要】 目的 观察幽门螺杆菌(Hp)野生株与 *iceA* 基因插入失活突变株对人胃上皮细胞株 SGC7901 细胞生长的影响,研究 Hp 毒力基因 *iceA* 相关的细胞毒性效应。方法 分别将幽门螺杆菌野生株与 *iceA* 基因插入失活突变株与 SGC7901 细胞共培养 48 h,观察比较细胞形态学变化;用 MTT 法检测分析共培养 12~36 h 细胞增殖活性;流式细胞仪分析 48 h 细胞周期和 24、48 h 细胞凋亡。结果 Hp 野生株组和突变株组引起相似的细胞形态学改变;30 h 和 36 h 时各组细胞的增殖活性表现出明显差异($P<0.05$),培养 30 h 时突变株组(0.745±0.006)的细胞增殖活性高于野生株组(0.728±0.017)($P<0.05$);细胞周期结果显示,野生株组 G_2 期阻滞,而突变株组为 S 期阻滞;培养 24、48 h 野生株组[(33.04±10.69)%、(52.28±3.41)%]和突变株组[(44.23±11.34)%、(57.32±0.88)%]均可以诱导细胞产生明显凋亡($P<0.05$),但二者在诱导细胞凋亡的能力方面差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 幽门螺杆菌对于 SGC7901 细胞生长状态产生明显的影响,*iceA* 基因的插入失活突变对于 SGC 细胞的形态变化和凋亡的影响无明显差异,对细胞增殖和细胞周期影响差异较明显。

【关键词】 幽门螺杆菌;*iceA* 基因;细胞;生长
【中图法分类号】 R322.44;R329.28;R378 【文献标志码】 A

Effect of *Helicobacter pylori iceA* gene on growth of SGC7901 cells

Ma Yijun[1], Duan Guangcai[1,2], Zhang Rongguang[1], Zhang Weidong[1], Xi Yuanlin[1] ([1]Department of Epidemiology, School of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450001; [2]Henan Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China)

【Abstract】 Objective To observe the effect of a Chinese *Helicobacter pylori* (Hp) *iceA* mutant strain on growth of gastric epithelial SGC7901 cells *in vitro* and study the *iceA*-related cytotoxicity. Methods Morphological changes of cells were observed and compared after the wild or mutant strains of Hp were co-cultured for 48 h. Cell proliferation was detected and analyzed by methyl thiazoly1 tetrazolium (MTT) assay when the cells were co-cultured for 12 – 36 h. Cell cycle and apoptosis of SGC7901 cells were determined by flow cytometry when the cells were co-cultured for 24 and 48h, respectively. Results The morphological changes of cells were similar in wild and mutant strains groups. The cell proliferation was significantly different among different groups after the cells were co-cultured for 30 and 36 h, respectively ($P<0.05$). The cell proliferation activity was significantly higher in mutant strain group (0.745±0.006) than in wild strain group (0.728±0.017) when the cells were co-cultured for 30 h ($P<0.05$). The cell cycle was arrested at G_2 phase and S phase in wild strain group and mutant strain group, respectively. Significant apoptosis was observed both in wild strain group (33.04%±10.69%, 52.28%±3.41%) and in mutant strain group (44.23%±11.34%, 57.32%±0.88%) when the cells were cultured for 24 h and 48 h, respectively ($P<0.05$). However, no significant difference was found in the ability of the two strains to induce apoptosis ($P>0.05$). Conclusion Hp can significantly affect the growth of SGC7901 cells. The mutant of *iceA* gene has no important effect on the morphological changes and apoptosis of SGC7901 cells but can significantly affect their proliferation and cell cycle.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; *iceA* gene; cell; growth

Corresponding author: Duan Guangcai, Tel: 86-371-67781964, E-mail: gcduan@public.zz.ha.cn

【通信作者】 段广才,电话:(0371)67781964,E-mail:gcduan@public.zz.ha.cn

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,*H. pylori*)是一种专寄生于人胃黏膜的革兰阴性微需氧菌,是最常见的感染性病原之一。幽门螺杆菌致病过程中涉及多种致病因子,其致病机制是国内外的研究热点[1-4]。Hp 接触胃黏膜上皮后可诱导表达一种毒力相关因子——黏膜接触诱导因子,是独立于 *cagA* 和 *vacA* 之外的又一毒力相关基因,由 *iceA*(induced by contact with epithelium)基因编码[5,6]。根据各国学者的流行病学研究,*iceA* 基因与 *H. pylori* 感染引起的胃黏膜炎症和溃疡具有明显的相关性[7-10]。但研究报道均是利用 *iceA* 基因的阳性菌株进行的相关性研究,而在自然条件下 *iceA* 基因阳性菌株与阴性菌株之间缺乏相同的遗传背景,菌株间各种因素的差异均可能影响对该基因功能的判断。而且不同菌株基因分子特征均存在一定的差异,可能会导致其致病性和临床表现的不同,利用西方国家分离的菌株研究结果也不能准确反映中国地区临床分离菌株该基因的特征和作用。本室利用自行构建的幽门螺杆菌 *iceA* 插入失活突变株[11],探讨中国郑州市慢性胃炎临床分离株 MEL-Hp27 野生株和突变株对 SGC7901 细胞生长的影响,分析中国临床分离菌株 Hp 的毒力基因 *iceA* 在细胞水平的毒性效应,旨在对阐明 *iceA* 基因参与 Hp 致病的分子机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 幽门螺杆菌分离株 MEL-*H. pylori* 27(Hp27),从郑州市慢性萎缩性胃炎患者体内分离并由本教研室保种;*iceA* 基因突变株 MEL-Hp27△*iceA* 由本室自行构建,为卡那霉素插入失活突变株。Hp 菌株接种于含 10% 羊血的布氏平板,37 ℃微需氧条件下培养。

1.1.2 细胞 胃上皮细胞株 SGC7901 细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所,在含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,37 ℃细胞培养箱中常规培养,2~3 d 传代 1 次。

1.1.3 主要试剂 四甲基偶氮噻哇蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、碘化吡啶(PI)和 AnnexinV-FITC Kit 均为美国 SIGMA 公司产品,RPMI1640 培养基为美国 HYCLONE 公司产品,Hp 抗血清为本研究室制备并保存。

1.2 方法

1.2.1 菌株与细胞共培养后的形态观察 按常规培养 Hp 菌株和 SGC7901 细胞。取对数生长期 SGC7901 细胞,胰酶消化后制备成单细胞悬液并计数,以 5×10^5/孔接种于 6 孔板,置细胞培养箱中培养 24 h 后,分别换用含野生株 Hp27 和突变株 Hp27△*iceA* 的 1640 完全培养基(细菌与细胞的比例为 100∶1),继续培养并连续观察。空白组为相同密度不加菌液的正常培养细胞。共培养 48 h 后在倒置显微镜下对细胞形态进行观察并照相。

1.2.2 菌株与细胞的粘附现象观察[12] 常规培养胃癌细胞株 SGC7901,收集处于对数生长期的细胞,同时分别培养并收集生长良好的 Hp27 菌株。Hp27 野生株与突变株(5×10^8/ml)分别与细胞 SGC7901(5×10^6/ml)共培养,在 37 ℃细胞培养箱内微需氧条件下 30 min。用 10 ml 的 15% 蔗糖溶液洗去未粘附在细胞上的细菌,洗 3 遍。用 PBS 洗 1 遍。加入 1∶5稀释的 Hp 抗血清,冰上孵育 30 min。用 15 ml 的 PBS 洗 3 遍。加入 FITC-羊抗鼠抗体,冰上孵育 30 min。用 PBS 洗 3 遍。在荧光倒置显微镜下观察并照相。

1.2.3 细胞增殖情况[13] 制备单细胞悬液并计数,以 5×10^3/孔接种于 96 孔板上,于培养箱中培养 24 h;野生株和突变株 2 个实验组,每孔内分别加入 200 μl 含相同细菌数 *H. pylori*(5×10^5/孔)的各组菌液。空白组为含相同细胞数但不加菌液的 SGC7901 细胞。每组各 6 个复孔。共培养 12、18、24、30、36 h 加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl,继续培养 4 h,弃去培养液后每孔加入 DMSO 150 μl,充分振荡 10 min,在酶标仪 492 nm 波长下测定光密度值[*D*(492)]。上述实验重复 3 次。

1.2.4 细胞周期分析 制备单细胞菌液并计数,按照 5×10^5/ml 接种细胞于 100 ml 细胞培养瓶中,常规培养 24 h,野生株组和突变株组分别加入含相同细菌数的培养基(细菌与细胞的比例为 100∶1),空白组加不含细菌的培养基,继续培养 48 h,收集细胞,PBS 洗 3 次,加入冰预冷的 70% 的乙醇固定,4 ℃避光过夜;800×*g* 离心 10 min,去上清,PBS 洗 2 次,加 2 mg/ml PI 至终浓度为 50 μg/ml,孵育 30 min 后用流式细胞仪测定细胞 DNA 含量,分析细胞周期。

1.2.5 细胞凋亡分析[14] 实验分组及方法同 1.2.3,收集共培养 24、48 h 的各实验组和空白组细胞,调整细胞数为 1×10^6/ml。取 0.5 ml 细胞悬液,1000 r/min 4 min 离心弃上清,加 0.5 ml Binding Buffer 重悬。加 1 μl 荧光标记的 Annexin V 试剂,孵育 30 min,加入 5 μl PI 混匀后 4 ℃孵育 5 min,加入 500 μl Binding Buffer,立即上流式细胞仪检测。上述实验各重复 3 次。

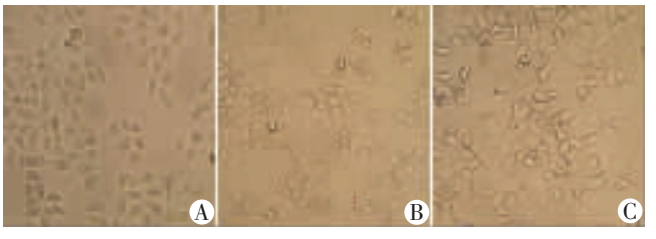
1.3 统计学分析

应用 SPSS 11.0 软件,两组之间比较采用 *t* 检验,多组之间的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 细胞形态观察

空白组生长状态良好,轮廓清晰;共培养组数小时后细菌附着于细胞周边。培养 48 h 后,空白组细胞贴壁生长,细胞透明,而共培养组细胞拉伸,出现蜂鸟样改变。Hp27 野生株组和突变株组引起相似的细胞形态改变。见图 1。

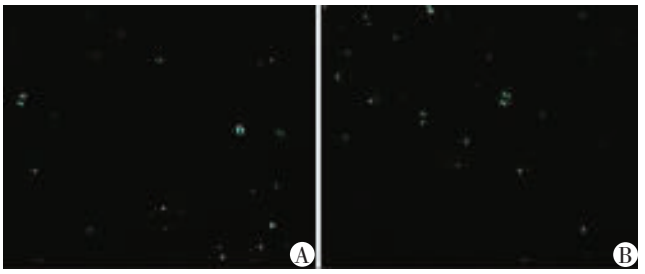


A:空白组 无 Hp 感染;B:野生株组 Hp27 感染;C:突变株组 Hp27 突变株感染

图 1 倒置显微镜观察各组 48 h SGC7901 细胞形态 (×100)

2.2 菌株与细胞的粘附现象

将Hp27野生株和突变株分别与SGC细胞共培养，荧光显微镜下显示野生株和突变株均迅速粘附在SGC7901细胞表面（图2）。



A：野生株组；B：突变株组

图2 荧光染色观察Hp27对SGC7901细胞的粘附作用 （×400）

2.3 细胞增殖

共培养12 h和18 h，与空白组相比细胞活力轻度增加。共培养24 h后，细胞活力下降。共培养12、18、24 h时，野生株组和突变株组的细胞增殖活性与空白组相比无明显差别；培养30 h和36 h时各组细胞的增殖活性表现出明显差异（$P<0.05$），其中，培养30 h时突变株组的细胞增殖活性高于野生株组（$P<0.05$）。见表1。

表1 3组SGC7901细胞不同时间的MTT值（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h
空白组	0.402±0.046	0.441±0.015	0.726±0.032	0.832±0.034	0.908±0.016
Hp27野生株组	0.419±0.003	0.466±0.036	0.713±0.009	0.728±0.017	0.812±0.025[b]
Hp27突变株组	0.408±0.023	0.449±0.012	0.701±0.019	0.745±0.006[ab]	0.833±0.032[b]

a：$P<0.05$，与野生株组相比；b：$P<0.05$，与空白组相比

2.4 细胞周期检测

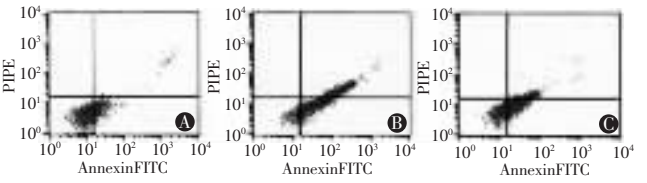
与空白组相比，Hp27野生株对细胞周期的影响主要表现为G_2期比例增加，G_1期和S期比例下降，即G_2期阻滞；而Hp27突变株组对细胞周期的影响主要表现为S期比例增加，G_1、G_2期比例下降，即S期阻滞（表2）。

表2 各组细胞培养48 h后细胞周期的分布（%）

组别	S期	G_1期	G_2期
空白组	37.4	56.2	6.4
Hp27野生株组	35.8	40.3	23.9
Hp27突变株组	63.5	27.3	7.2

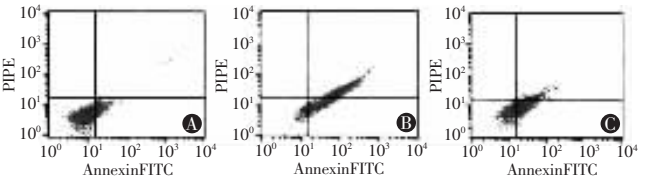
2.5 细胞凋亡检测

野生株组和突变株组均可以诱导细胞产生明显凋亡，共培养24 h的凋亡率分别为（33.04±10.69）%、（44.23±11.34）%，均高于空白组凋亡率（13.65±6.11）%（$P<0.05$）（图3）；共培养48 h的凋亡率分别为（52.28±3.41）%、（57.32±0.88）%，均高于空白组凋亡率（22.04±5.78）%（$P<0.05$）（图4）。但野生株组和突变株组之间24 h及48 h的凋亡率均无明显差别（$P>0.05$）。



A：空白组（SGC7901细胞）；B：Hp野生株组；C：突变株组

图3 SGC7901细胞与Hp共培养24 h流式细胞术凋亡检测



A：空白组（SGC7901细胞）；B：Hp野生株组；C：突变株组

图4 SGC7901细胞与Hp共培养48 h流式细胞术凋亡检测

3 讨论

为了研究*iceA*基因对细胞生长的影响，本实验首先分别将Hp27野生株和构建的突变株与细胞共培养，观察其形态的变化。48 h后SGC7901细胞空白组生长状态良好，共培养组细胞拉伸，出现蜂鸟样改变。但是*H. pylori*突变株组和野生株组引起细胞形态学改变很相似，从形态上没有明显的区别，说明Hp27与细胞共培养后细胞的形态学变化不是*iceA*基因相关的特有的细胞学效应。我们又分别将Hp27野生株和突变株与细胞共培养后观察细胞增殖特性，发现与空白组相比，共培养的12 h和18 h实验组细胞活力均轻度增加，说明在细菌作用早期，Hp27菌株对细胞SGC7901具有短暂促增殖的作用，这一现象可能是细胞在培养早期的一种应激反应[15]。而共培养24 h后，与空白组相比细胞活力均出现下降，尤其在培养36 h后，实验组与空白组差异明显（$P<0.05$），提示随着时间的延长，应激反应会减弱或消失，细胞的活力下降，尤其是在Hp感染细胞的后期，可以导致细胞数量的减少，对细胞增殖表现为明显的抑制作用。为了分析*iceA*基因的突变对Hp菌株感染细胞后细胞增殖情况的影响，本研究分别对野生株和突变株在不同的时间点进行对比分析，结果表明仅在培养30 h时二者的差异具有统计学意义，突变株组的细胞增殖活性明显高于野生株组（$P<0.05$），说明*iceA*基因在Hp与细胞共培养时可能参与改变细胞增殖活性。

由于细胞周期与细胞的生长和增殖密切相关，因此本课题检测了细菌对共培养细胞细胞周期的影响。

结果表明 Hp27 野生株和突变株都能改变共培养后 SGC7901 细胞的细胞周期，但二者对细胞周期中各期的影响比例不同。推测该基因的改变可以导致菌株对细胞周期的影响产生差异，而且这可能是导致对细胞增殖抑制作用不同的原因之一，其间的关系及其分子机制尚待进一步的研究。

Hp 感染引起胃上皮细胞凋亡的机制仍不清楚，目前发现很多毒力因子与 Hp 诱导的上皮细胞凋亡相关[16,17]。尽管 *iceA* 一直被作为毒力因子进行研究，但它在 Hp 诱导的上皮细胞凋亡过程中的作用并不清楚。为了研究 *iceA* 在 Hp 诱导的上皮细胞凋亡中的角色，从而进一步分析其和炎症的关系，我们分别将 Hp27 野生株及构建的突变株与 SGC7901 细胞共培养，检测其凋亡率。结果表明，野生株组和突变株组均可以诱导细胞产生明显凋亡，共培养 24、48 h 的凋亡率均明显高于空白组凋亡率（$P<0.05$），这一结果与 Hp 及其毒力因子可以诱导细胞凋亡的相关报道一致[18]。但在本研究中，不管是培养 24 h 还是 48 h，Hp 的野生株与突变株在诱导细胞凋亡的能力方面均不存在明显的差异（$P>0.05$）。因此，根据我们的实验结果，*iceA* 基因的突变并不会对 Hp 诱导细胞凋亡产生明显的数量影响，即 Hp 的 *iceA* 基因在 Hp 诱导上皮细胞凋亡的过程中可能不是一个关键基因。

本研究通过将遗传背景相同的野生株和构建的 *iceA* 基因突变株分别与细胞体外共培养，比较 *iceA* 基因突变对胃黏膜上皮细胞的形态、粘附、细胞周期及增殖和凋亡特性的影响，初步探讨该基因的生物学功能，将有助于阐明 *iceA* 基因参与幽门螺杆菌致病的分子机制，为揭示其复杂的致病机制奠定实验基础。

参考文献：

[1] Costa A C, Figueiredo C, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection[J]. Helicobacter, 2009, 14(Suppl 1): 15-20.

[2] Uchida T, Nguyen L T, Takayama A, *et al*. Analysis of virulence factors of *Helicobacter pylori* isolated from a Vietnamese population[J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 175.

[3] 蒲瑞雪，郭红，廖亚玲，等. 幽门螺杆菌感染对胃内正常菌群结构的影响[J]. 第三军医大学学报，2010，32(5)：450-453.

[4] 葛迪，郭刚，毛旭虎，等. 幽门螺杆菌 UreB414-OMP18-LTB 融合蛋白的构建及免疫原性初步研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(12)：1107-1110.

[5] Figueiredo C, Quint W G, Sanna R, *et al*. Genetic organization and heterogeneity of the *iceA* locus of *Helicobacter pylori*[J]. Gene, 2000, 246(1/2): 59-68.

[6] Caner V, Yilmaz M, Yonetci N, *et al*. H pylori *iceA* alleles are disease-specific Virulence factors[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(18): 2581-2585.

[7] Ko J S, Kim K M, Oh Y L, *et al*. cagA, vacA, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Korean children[J]. Pediatr Int, 2008, 50(5): 628-631.

[8] Homan M, Luzar B, Kocjan B J, *et al*. Prevalence and clinical relevance of cagA, vacA, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* isolated from Slovenian children[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2009, 49(3): 289-296.

[9] 张茂俊，何利华，王振宇，等. 幽门螺杆菌中国菌株致病相关基因 cagA、*iceA*、vacA 及 HP0519 分布分析[J]. 中华流行病学杂志，2006，27(6)：508-512.

[10] Ben-Mansour K, Fendri C, Zribi M, *et al*. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, *iceA* and oipA genotypes in Tunisian patients[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2010, 9: 10.

[11] 马一君，段广才，张荣光，等. 幽门螺杆菌中国临床分离株 *iceA* 基因突变株的构建和鉴定[J]. 世界华人消化杂志，2009，17(11)：1098-1102.

[12] Weydig C, Starzinski-Powitz A, Carra G, *et al*. CagA-independent disruption of adherence junction complexes involves E-cadherin shedding and implies multiple steps in *Helicobacter pylori* pathogenicity[J]. Exp Cell Res, 2007, 313(16): 3459-3471.

[13] 郑爱华，易永芬，周文文. MASPIN 真核表达载体的构建及其对胃癌细胞株 SGC7901 增殖的影响[J]. 第三军医大学学报，2009，31(4)：326-329.

[14] Cha B, Kim K H, Kim H. 15-Deoxy-delta 12, 14, -prostaglandin J2 suppresses nuclear factor-kappaB-mediated apoptosis of *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1171: 457-463.

[15] Abdel-Latif M M, Windle H J, Fitzgerald K A, *et al*. *Helicobacter pylori* activates the early growth response 1 protein in gastric epithelial cells[J]. Infect Immun, 2004, 72(6): 3549-3560.

[16] Ki M R, Lee H R, Goo M J, *et al*. Differential regulation of ERK1/2 and p38 MAP kinases in VacA-induced apoptosis of gastric epithelial cells[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(3): G635-G647.

[17] Ding S Z, Smith M F Jr, Goldberg J B. *Helicobacter pylori* and mitogen-activated protein kinases regulate the cell cycle, proliferation and apoptosis in gastric epithelial cells[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(7 Pt 2): e67-e78.

[18] Shibayama K. Molecular mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated pathogenesis[J]. Nippon Saikingaku Zasshi, 2008, 63(2/4): 387-390.

（收稿 2010-04-13 修回 2010-05-10）

（编辑 汪勤俭）