DOI:10.16016/j.2097-0927.202309118

幽门螺杆菌感染胃上皮细胞诱导血管生成素样蛋白4表达的机制及其功能研究

陈婉燕[1],岳耕羽[2],徐小林[2],庄 园[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系微生物与生化药学教研室[1];563000 贵州 遵义,遵义医科大学附属医院消化内科[2]

[摘要] **目的** 探究血管生成素样蛋白4(angiopoietin-like 4,ANGPTL4)在幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,*H. pylori*)感染的胃上皮细胞中的表达调控及其功能机制。**方法** 收集2021年11月陆军军医大学第二附属医院消化内科胃镜室*H. pylori*阳性患者的胃镜标本以及*H. pylori*感染小鼠的胃组织,利用免疫荧光染色技术检测ANGPTL4在胃组织中的表达部位;用*H. pylori*感染胃上皮细胞和胃类器官,运用实时荧光定量PCR和Western blot等检测ANGPTL4的表达;探讨*H. pylori*感染诱导ANGPTL4表达的调控机制;利用ANGPTL4重组蛋白刺激胃上皮细胞,检测其对密封蛋白1(claudin 1,CLDN1)表达的影响。**结果** *H. pylori*感染能显著诱导胃上皮细胞ANGPTL4表达增加,且具有毒力因子CagA依赖性、细菌浓度依赖性和感染时间依赖性($P<0.05$);相对于未感染组和CagA敲除(△*cagA*)*H. pylori*感染组,野生型(wild-type,WT)*H. pylori*感染组的人和小鼠胃类器官ANGPTL4表达显著上调($P<0.05$);调控机制方面,阻断信号通路NF-κB可明显抑制胃上皮细胞ANGPTL4表达增加($P<0.05$);功能机制方面,ANGPTL4重组蛋白通过激活通路ERK下调胃上皮细胞CLDN1表达($P<0.05$)。**结论** *H. pylori*依赖毒力因子CagA通过激活NF-κB信号通路诱导胃上皮细胞表达ANGPTL4;ANGPTL4激活通路ERK下调胃上皮细胞CLDN1表达,从而影响*H. pylori*感染相关胃部疾病的发展。

[关键词] 幽门螺杆菌;血管生成素样蛋白4;NF-κB信号通路;密封蛋白1

[中图法分类号] R322.44;R378.99;R341 [文献标志码] A

Regulatory and functional mechanism of angiopoietin-like protein-4 in gastric epithelial cells with *Helicobacter pylori* infection

CHEN Wanyan[1], YUE Gengyu[2], XU Xiaolin[2], ZHUANG Yuan[1] [1]Department of Microbiology and Biochemical Pharmacy, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou Province, 563000, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the regulatory and functional mechanism of angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) expression in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). **Methods** *H. pylori*-positive gastric specimens from Department of Gastroenterology of second Affiliated Hospital of Army Medical University in November 2021 and the gastric tissues of *H. pylori*-infected mice were collected, and the expression locations of ANGPTL4 in these gastric tissues were detected by immunofluorescence assay. After gastric epithelial cells and gastric organoids were infected with *H. pylori*, the expression of ANGPTL4 was detected by real-time PCR and Western blotting. The regulatory mechanism of *H. pylori*-induced ANGPTL4 expression was investigated by cellular models above. Recombinant ANGPTL4 was used to stimulate gastric

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82070578)

[通信作者] 庄 园,E-mail:yuanzhuang1983@yahoo.com

2097-0927/Copyright © 2024,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

epithelial cells to investigate the effect of ANGPTL4 on the claudin 1 (CLDN1) expression. **Results** *H. pylori* infection significantly increased the expression of ANGPTL4 in gastric epithelial cells in a CagA-dependent, bacterial concentration-dependent and infection time-dependent manner ($P<0.05$). Compared to uninfected cells and CagA knockout (△cagA) *H. pylori*-induced ones, the ANGPTL4 expression was significantly increased in WT *H. pylori*-infected human and mouse gastric organoid ($P<0.05$). Blocking NF-κB signaling pathway significantly inhibited the enhanced ANGPTL4 expression in *H. pylori*-infected gastric epithelial cells ($P<0.05$). Recombinant ANGPTL4 activated ERK signaling pathway to down-regulate the CLDN1 expression in gastric epithelial cells ($P<0.05$). **Conclusion** *H. pylori* activates NF-κB signaling pathway to up-regulate ANGPTL4 expression in gastric epithelial cells in a CagA-dependent manner, and ANGPTL4 activates ERK signaling pathway to down-regulate the CLDN1 expression in gastric epithelial cells, which may contributes to the development of gastric diseases induced by *H. pylori* infection.

[**Key words**] *Helicobacter pylori*; angiopoietin-like 4; NF-κB; claudin 1

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82070578). Corresponding author: ZHUANG Yuan, E-mail: yuanzhuang1983@yahoo.com

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,*H. pylori*)是一种螺旋状、微需氧革兰阴性杆菌,主要定植于胃黏膜[1],全球有超过50%的人口感染[2],可导致慢性胃炎和消化性溃疡,甚至胃癌[3-5]。在2021年美国卫生及公共服务部发布的第15版致癌物报告中,*H. pylori*已被列为明确致癌物,并且*H. pylori*对临床一线使用的抗生素耐药性仍在逐年增加,使其越来越难被根除[6]。细胞毒素相关基因A(cytotoxin-associated gene A,CagA)是*H. pylori*最主要的毒力因子之一,与*H. pylori*感染相关胃炎的发生密切相关[7]。当CagA被注入细胞,其特征性序列谷氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-酪氨酸-丙氨酸(Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala,EPIYA)基序中的酪氨酸位点会被各种细胞激酶磷酸化,从而引发细胞信号通路活化和细胞病变过程[8]。*H. pylori*感染诱发的慢性炎症在胃黏膜相关疾病中的发展演变机制尚不十分清楚,但我们认为*H. pylori*感染引起的胃黏膜免疫反应是一个关键因素。胃上皮细胞是*H. pylori*感染胃黏膜后菌体最先接触的细胞类型[7],是宿主防御的第一道防线,它还可以通过产生某些炎症性的分子进一步激发免疫反应。本研究中的血管生成素样蛋白4(angiopoietin-like 4,ANGPTL4)就属于这类分子,其在慢性炎症中的免疫病理性功能也受到越来越多的关注。

ANGPTL4也被称为空腹诱导脂肪因子(fasting-induced adipose factor, FIAF)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ(peroxisome proliferator-activated receptor γ, PPARγ),是ANGPTL家族(ANGPTL1-8)的成员之一。ANGPTL4主要通过自分泌/旁分泌和内分泌过程发挥其生物学作用[9]。天然全长ANGPTL4(flANGPTL4)包含一个分泌信号肽(SP),一个N端卷曲螺旋结构域(CCD)和一个COOH端纤维蛋白原样结构域(FLD)。从细胞分泌后,ANGPTL4在连接区通过前蛋白转换酶(proprotein convertases,PCs)进行蛋白水解,从而释放N端区域(nANGPTL4)和C端部分(cANGPTL4)。cANGPTL4以单体形式存在,可以触发细胞内通路,帮助伤口愈合并支持肿瘤生长和转移。nANGPTL4组装成寡聚结构,这对其作为脂蛋白脂肪酶抑制剂的功能很重要[10-11]。

ANGPTL4蛋白片段的多样性决定了其功能的多样性,研究发现ANGPTL4在心血管疾病[12]、癌症转移[13]、肥胖[14]、糖尿病[15]、伤口修复[16]、炎症[17]等多种疾病中都发挥着作用。本研究旨在明确ANGPTL4在*H. pylori*感染中的表达情况,阐明*H. pylori*调控ANGPTL4表达的分子机制,探讨ANGPTL4在*H. pylori*感染中的潜在功能,为临床探索免疫学调控手段,缓解*H. pylori*感染引起的胃部病症提供新思路和新靶点。

1 材料与方法

1.1 临床胃镜标本及人体胃组织标本来源

*H. pylori*阳性临床胃镜标本取自陆军军医大学第二附属医院消化内科胃镜室进行胃镜检查的患者。人胃组织标本来自陆军军医大学第一附属医院普外科胃癌患者胃大部切除术取出的距离肿瘤部位至少5 cm处的正常胃组织。所有志愿者为成年,且在标本收集前均已知情同意。人体组织标本实验已经陆军军医大学第一附属医院伦理委员会批准[批件号:(A)KY202220]。

1.2 小鼠来源

C57BL/6 野生型小鼠购买于陆军军医大学实验动物中心,无病原体条件下饲养。所有动物实验符合陆军军医大学动物使用规范。

1.3 细胞、细菌来源及培养

细胞来源及培养:人胃腺癌细胞系(AGS)购自美国 ATCC,并于液氮中长期保存,细胞在含有 10%胎牛血清的完全 DMEM/F12 1∶1培养基中培养。培养条件为 37 ℃、5% CO_2。

细菌来源及培养:野生型 cagA 阳性幽门螺杆菌 NCTC 11637(WT *H. pylori*)购自美国 ATCC,cagA 敲除突变株幽门螺杆菌(△*cagA H. pylori*)菌种由 Chihiro Sasakawa 教授(日本东京大学)惠赠。菌种于-80 ℃超低温冰箱中长期保存,培养使用 Skirrow 血平板(含 1.75% 琼脂粉、0.5%葡萄糖、5%兔血),液体培养使用 Skirrow 液体培养基(含 0.5%葡萄糖、10%胎牛血清)。培养条件均为 37 ℃、85% N_2、10% CO_2、5% O_2。

1.4 胃类器官培养

取人胃组织标本或者小鼠胃体部,用预冷的 DPBS 清洗后剪碎,将组织碎片用预冷的 DPBS 吹打重悬,再使其自然沉降于管底,弃掉大部分上清,如此反复清洗 5~10 次至上清液清亮。加入组织消化液室温消化 60 min。清洗后将细胞悬液过滤,调整细胞悬液浓度约为 1.6×10^5/mL。吸取适量细胞悬液与等体积的基质胶混匀,接种到 24 孔板中心,待基质胶完全凝固向培养孔中加入 500 μL 培养基[培养基中含 50% Wnt3a、Noggin、R-spindin(1 μg/mL)、表皮生长因子(50 ng/mL)、成纤维细胞生长因子-10(100 ng/mL)、胃泌素Ⅰ(10 nmol/L)、1×N2 添加剂、10% GlutaMAX 添加剂、10 μmol/L Y-27632 二盐酸盐],培养条件为 37 ℃、5% CO_2。

1.5 主要试剂

重组人 flANGPTL4 蛋白(Cat:4487-AN)和 cANGPTL4 蛋白(Cat:3485-AN)均购自 R&D Systems 公司;兔抗人/小鼠 ANGPTL4 抗体(Cat:40-9800)、兔抗人 CLDN1 抗体(Cat:37-4900)、山羊抗兔 IgG(H+L)高度交叉吸附二抗 AF Plus 555(Cat:A32732)、山羊抗兔 IgG(H+L)高度交叉吸附二抗 AF Plus 488(Cat:A32731)均购自 Thermo Fisher Scientific 公司;兔抗人/小鼠 ANGPTL4 抗体(Cat:ab196746)、兔抗人/小鼠胃蛋白酶原Ⅱ/PGC 抗体(Cat:ab255826)均购自 Abcam 公司;兔抗人 NF-κB p65/RelA 抗体(Cat:8242)、兔抗人 p-NF-κB p65(Ser536)抗体(Cat:3033)、兔抗人/小鼠 GAPDH 抗体(Cat:5174)、兔抗人 Lamin B1 抗体(Cat:12586)、兔抗人 p-ERK1/2 抗体(Cat:4370)、兔抗人 ERK1/2 抗体(Cat:4695)均购自 Cell Signaling Technology 公司;辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(Cat:ZB-2301)、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)二抗(Cat:ZB-2305)均购自北京中杉金桥公司;细胞因子 Wnt3a、Noggin、R-Spindin-1、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子-10、胃泌素 I 均购自 PeproTech 公司;N2 添加剂、高级 DMEM/F12 均购自 Thermo Fisher Scientific 公司;GlutaMAX 添加剂购自 GIBCO 公司;Y-27632 二盐酸盐购自 Sigma-Aldrich 公司;Matrigel 基底膜基质购自 Corning 公司;荧光定量 PCR 试剂盒、逆转录试剂盒、总 RNA 提取试剂购自 TaKaRa 公司;ECL 显色液购自重庆葆光公司;蛋白提取液购自 Thermo Scientific 公司;BAY 11-7082、U0126、SB203580、JNK inhibitor Ⅱ、Wartmannin、AG490、FLLL32、GSK-3β inhibitor Ⅵ 均购自 Merck Millipore 公司。

1.6 方法

1.6.1 *H. pylori* 感染 AGS 细胞 细菌感染前 1 d 将 AGS 细胞按预设好的量铺于无菌细胞培养板中,待细胞充分贴壁(16~18 h)后将培养基更换为完全无抗培养基,待用。将培养在 Skirrow 血平板上的 *H. pylori* 用完全无抗培养基刮洗下来,调整细菌浓度,使用紫外分光光度计测定 600 nm 处光密度值(OD)。按照 1OD≈10^9 CFU/mL,计算细菌菌液的浓度。根据实验预设的感染复数(MOI=细菌数量∶细胞数,如 0、10、20、50、100;不同感染复数代表不同细菌浓度)计算出每孔需要的菌液体积,并加入到对应孔内,混匀,置于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中与细胞共同培养至预设的时长(如 3、6、12、24 h)。

1.6.2 *H. pylori* 感染胃类器官 根据 1.3 培养出胃类器官,在预冷 PBS 中收获类器官,并清洗以去除基质胶。用注射器大力吸取类器官以进行机械破坏。随后使用高级 DMEM/F12 洗涤,在 37 ℃条件下与 *H. pylori* 在 1 mL 培养基中共同孵育 2 h 后,用培养基洗涤 1 次,以去除未结合的细菌。然后将类器官细胞重新包埋在 24 孔组织培养板中的基质胶中,并在 37 ℃、5% CO_2、500 mL 培养基中孵育 24 h。共培养结束后,将基质胶融化并清洗,离心去上清后,用总 RNA 提取试剂或蛋白提取液提取胃类器官的总 mRNA 及总蛋白。

1.6.3 *H. pylori* 感染小鼠 用 WT *H. pylori* 菌液对雌性 C57BL/6 WT 小鼠连续灌胃 5 次,每半天 1 次,共 2.5 d。

1.6.4 重组 ANGPTL4 刺激 AGS 细胞 实验前 1 d 将 AGS 细胞铺至 24 孔细胞培养板中,实验时使用 PBS 清洗后,更换为新鲜完全无抗 DMEM/F12 1∶1培养基,加入人重组 flANGPTL4 和 cANGPTL4 蛋白(终浓度均为 1 μg/mL),混匀后继续培养 24 h,收集总 RNA 和总蛋白。

1.6.5 信号通路阻断实验 实验前 16~18 h 将 AGS 细胞铺至细胞培养板中,实验时使用 PBS 清洗细胞 3 遍,更换为新鲜无血清无抗生素的基础 DMEM/F12 1∶1 培养基,按实验预设加入对应信号通路阻断剂 BAY 11-7082、U0126、SB203580、JNK inhibitor Ⅱ、Wartmannin、AG490、FLLL32、GSK-3β inhibitor Ⅵ(10 nmol/L)以及等体积 DMSO(对照)处理 2 h(37 ℃,5% CO_2)。PBS 清洗 3 遍后更换为完全无抗培养基,加入 WT *H. pylori*(MOI=100)或人重组 ANGPTL4 蛋白(1 μg/mL)与细胞共培养 24 h,收集总 RNA 和总蛋白。

1.6.6 实时荧光定量 PCR(Real-Time PCR)实验 用 TRIzol 法提取出 *H. pylori* 感染或未感染的 AGS 细胞以及小鼠胃组织的总 RNA,用 SYBR Green 嵌合荧光法进行实时荧光定量 PCR 检测对应细胞或组织中 ANGPTL4 mRNA 的表达情况,引物序列见表 1。通过电泳检验抽提出的总 RNA 无降解后,使用 Nanodrop one 微量紫外可见分光光度计测定样本总 RNA 浓度。将总质量为 500 ng 的 RNA 按照逆转录试剂盒操作方法逆转录为 cDNA,逆转录体系为 10 μL。将获得的 cDNA 按照 SYBR Green 嵌合荧光法 Real-Time PCR 试剂说明进行定量 PCR 反应。每个样本设复孔取平均值,实验重复 3 次。使用 Bio-Rad CFX Manager、Excel 和 GraphPad Prism 等软件分析实验数据,得出实验结果。

表 1 实时荧光定量 PCR 分析引物序列

基因	引物序列(5′→3′)
人 GAPDH	上游 ACCCAGAAGACTGTGGATGG
	下游 CAGTGAGCTTCCCGTTCAG
人 ANGPTL4	上游 TGGTTTGGCACCTGCAGCCATTC
	下游 TGCTGCCATGGGCTGGATCAAC
人 CLDN1	上游 CCGTGCCTTGATGGTGGTTGG
	下游 CATCTTCTGCACCTCATCGTCTTCC
小鼠 Angptl4	上游 AAAAGATGCACCCTTCAAAGAC
	下游 CTTGAGCTGAGTCTGCAAACTC
小鼠 β-actin	上游 AGTGTGACGTTGACATCCGT
	下游 GCAGCTCAGTAACAGTCCGC

1.6.7 蛋白质免疫印迹(Western blot)实验 分别使用 RIPA 缓冲液和 T-PER 组织蛋白提取液提取细胞和组织总蛋白,BCA 法测定总蛋白浓度,调整样品总浓度一致,每条泳道取 10 μL 蛋白上样。将样品进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰(SDS-PAGE)凝胶电泳,随后利用湿法电转将蛋白转印至 PVDF 膜上。转膜结束后使用 PBST 缓冲液充分洗膜,脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,加入一抗(兔抗人/小鼠 GAPDH 抗体、兔抗人/小鼠 ANGPTL4 抗体均为 1∶1 000 稀释,兔抗人 CLDN1 抗体稀释浓度 1 μg/mL)4 ℃ 过夜。一抗孵育结束充分洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h。充分洗膜后在 Bio-Rad ChemiDoc Touch 型化学发光成像系统检测蛋白表达情况,并用 ImageLab 软件记录和分析成像结果。

1.6.8 免疫荧光(IF)染色实验 将石蜡切片 60 ℃ 烘烤脱蜡后恢复至室温,二甲苯中脱蜡。将切片放入浓度由高到低的乙醇溶液中水化,充分清洗后泡入柠檬酸盐缓冲液中加热进行抗原修复。在标本上滴加 H_2O_2 溶液封闭内源性过氧化物酶;滴加 0.5% Triton X-100-PBS 溶液进行固定通透;滴加山羊血清封闭后滴加一抗,切片放入孵育盒中 4 ℃ 过夜;滴加二抗 37 ℃孵育 1 h;滴加第 2 种一抗 37 ℃孵育 2 h 后,滴加第 2 种二抗 37 ℃孵育 1 h;滴加 DAPI 溶液进行细胞核染色后用封片液封片。随后置于 TCS SP8 共聚焦显微镜下观察、采图。

1.7 统计学分析

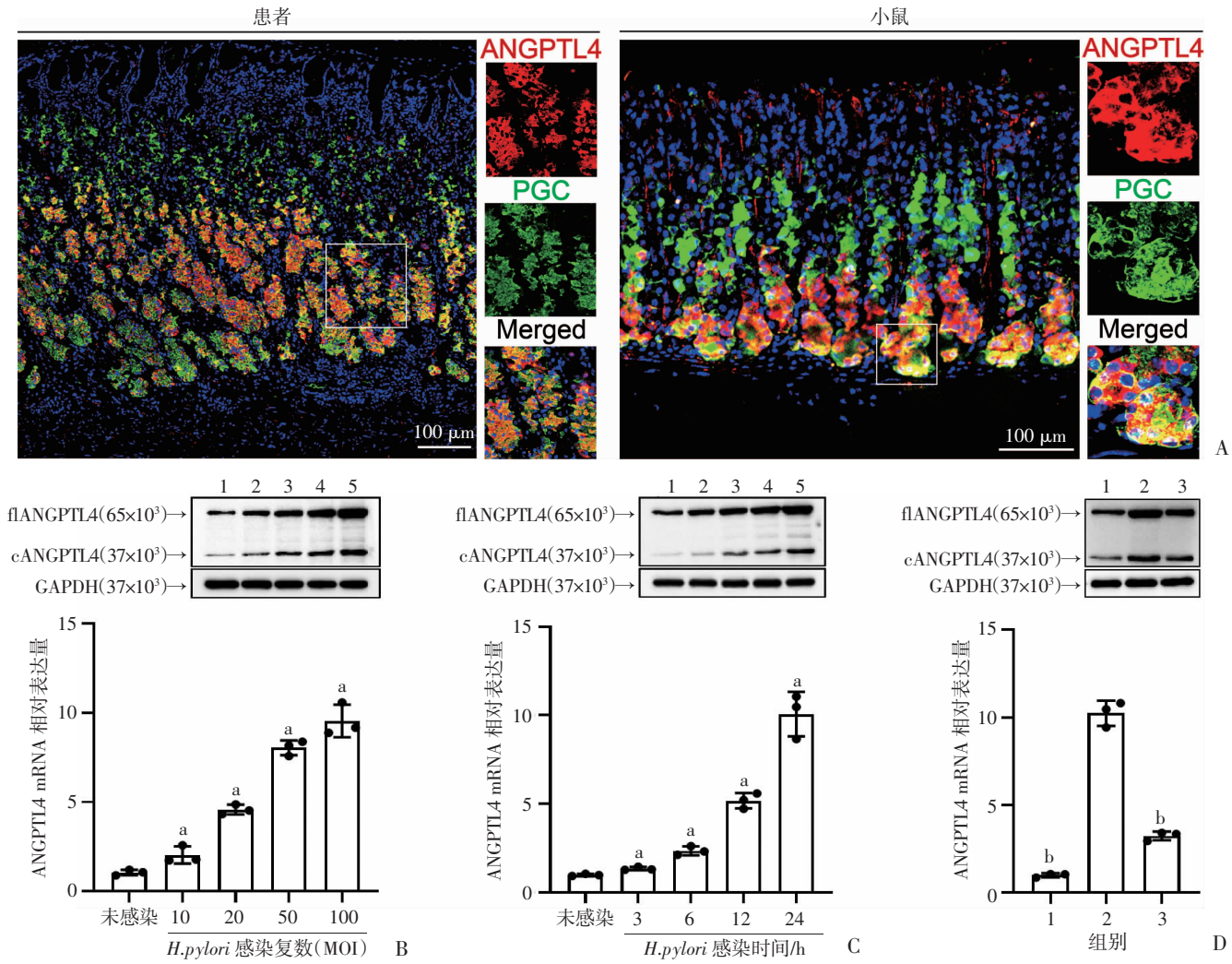
采用 SPSS 22.0 进行统计分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异用 t 检验比较,当方差不同时使用 *Mann-Whitney U* 检验进行分析,对于多组比较,采用单因素方差分析。数据分析使用 GraphPad Prism(version 5.0)软件,当 $P<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *H. pylori* 依赖毒力因子 CagA 诱导胃上皮细胞表达 ANGPTL4,并且具有细菌浓度和感染时间依赖性

通过免疫荧光染色实验发现在 *H. pylori* 感染的患者和小鼠胃黏膜中,ANGPTL4 主要在胃蛋白酶原Ⅱ阳性的胃上皮细胞中表达(图 1A)。表明在 *H. pylori* 感染的胃组织中,胃上皮细胞是 ANGPTL4 表达的来源细胞。随后用不同感染复数的 WT *H. pylori*(MOI=10,20,50,100)感染胃上皮细胞系 AGS,结果显示随

着细菌浓度增加,AGS 细胞内 ANGPTL4 在转录和翻译水平的表达量均逐渐增加($P<0.05$,图 1B),具有细菌浓度依赖性。*H. pylori* 诱导 AGS 细胞表达的 ANGPTL4 也随感染时间(3、6、12、24 h)的增加而逐渐升高($P<0.05$,图 1C),具有感染时间依赖性。用 WT *H. pylori* 菌株和△*cagA H. pylori* 菌株分别感染 AGS 细胞(MOI=100,24 h),与未感染组和△*cagA H. pylori* 感染组相比,WT *H. pylori* 感染的 AGS 细胞在转录和翻译水平的表达显著增加($P<0.05$,图 1D)。结果表明,*H. pylori* 依赖毒力因子 CagA 诱导胃上皮细胞表达 ANGPTL4,并且诱导程度与细菌浓度和感染时间相关。



a:$P<0.05$,与未感染组比较;b:$P<0.05$,与 WT *H. pylori* 感染组比较

A:免疫荧光染色图像显示 *H. pylori* 感染患者或 *H. pylori* 感染小鼠胃黏膜中表达 ANGPTL4(红色)的胃蛋白酶原Ⅱ阳性胃上皮细胞(绿色);B:WT *H. pylori* 感染 AGS 细胞在不同感染复数下(24 h)ANGPTL4 蛋白及 mRNA 表达水平($n=3$);1:未感染;2~5:分别为 MOI 10、20、50、100;C:WT *H. pylori* 感染 AGS 细胞在不同时间点(MOI=100)时 ANGPTL4 蛋白及 mRNA 表达水平($n=3$);1:未感染;2~5:分别为感染后 3、6、12、24 h;D:不同 *H. pylori* 菌株感染 AGS 细胞(MOI=100,24 h)的 ANGPTL4 蛋白及 mRNA 表达水平($n=3$);1:未感染;2:WT *H. pylori* 感染;3:△*cagA H. pylori* 感染

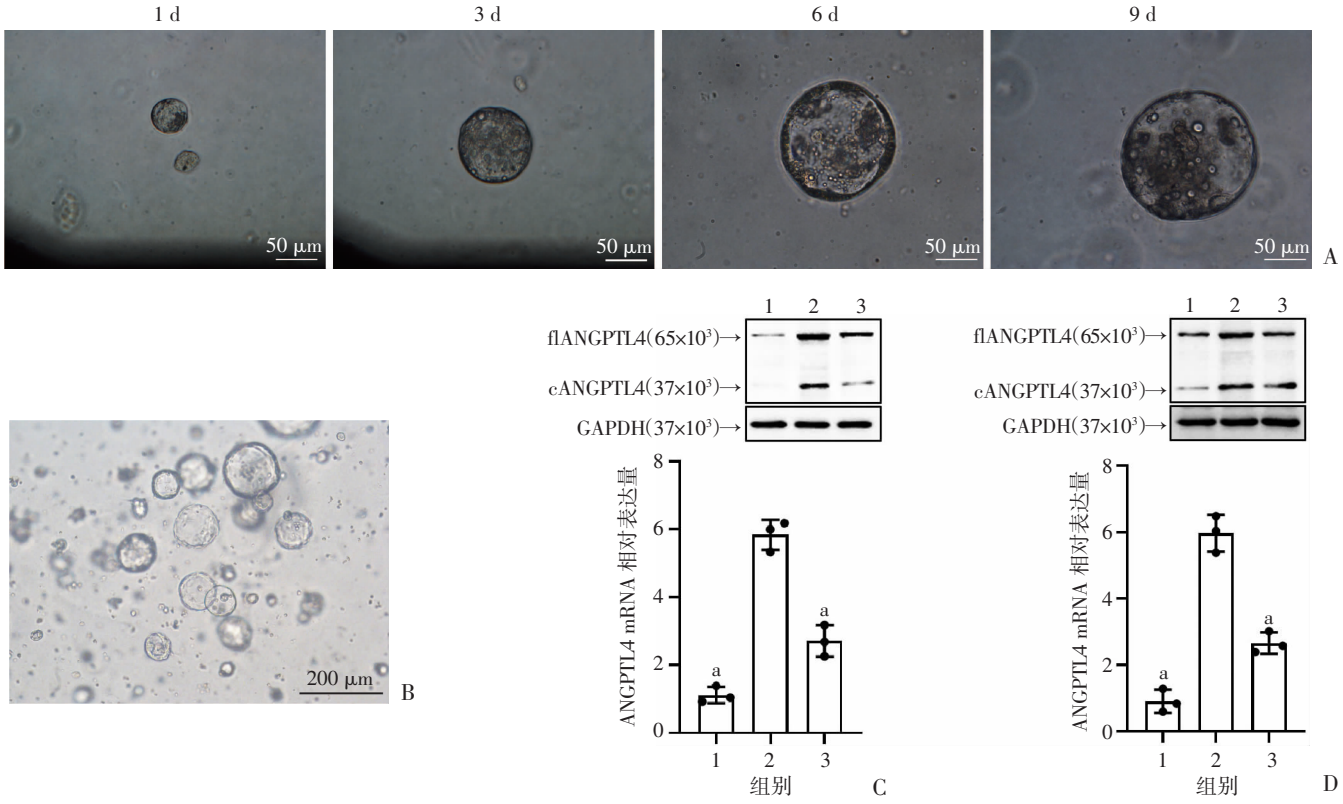
图 1 *H. pylori* 感染 AGS 细胞中 ANGPTL4 的表达水平

2.2 ANGPTL4 在 *H. pylori* 感染的胃类器官中表达增加

从人和小鼠胃黏膜组织中分离胃腺培养出胃类器官(图 2A、B),并用 *H. pylori*(包括 WT *H. pylori* 和 △*cagA H. pylori*)对小鼠和人胃类器官进行感染(24 h)。结果显示,相比于未感染组,WT *H. pylori* 感染组的人或小鼠胃类器官中 ANGPTL4 mRNA 和蛋白表达显著升高($P<0.05$),而 △*cagA H. pylori* 感染组 ANGPTL4 mRNA 和蛋白表达仅略有增加(图 2C、D)。以上结果从 3D 维度证明,*H. pylori* 依赖毒力因子 CagA 诱导胃类器官表达 ANGPTL4。

2.3 *H. pylori* 通过磷酸化 CagA 激活胃上皮细胞中 NF-κB 通路诱导 ANGPTL4 表达增加

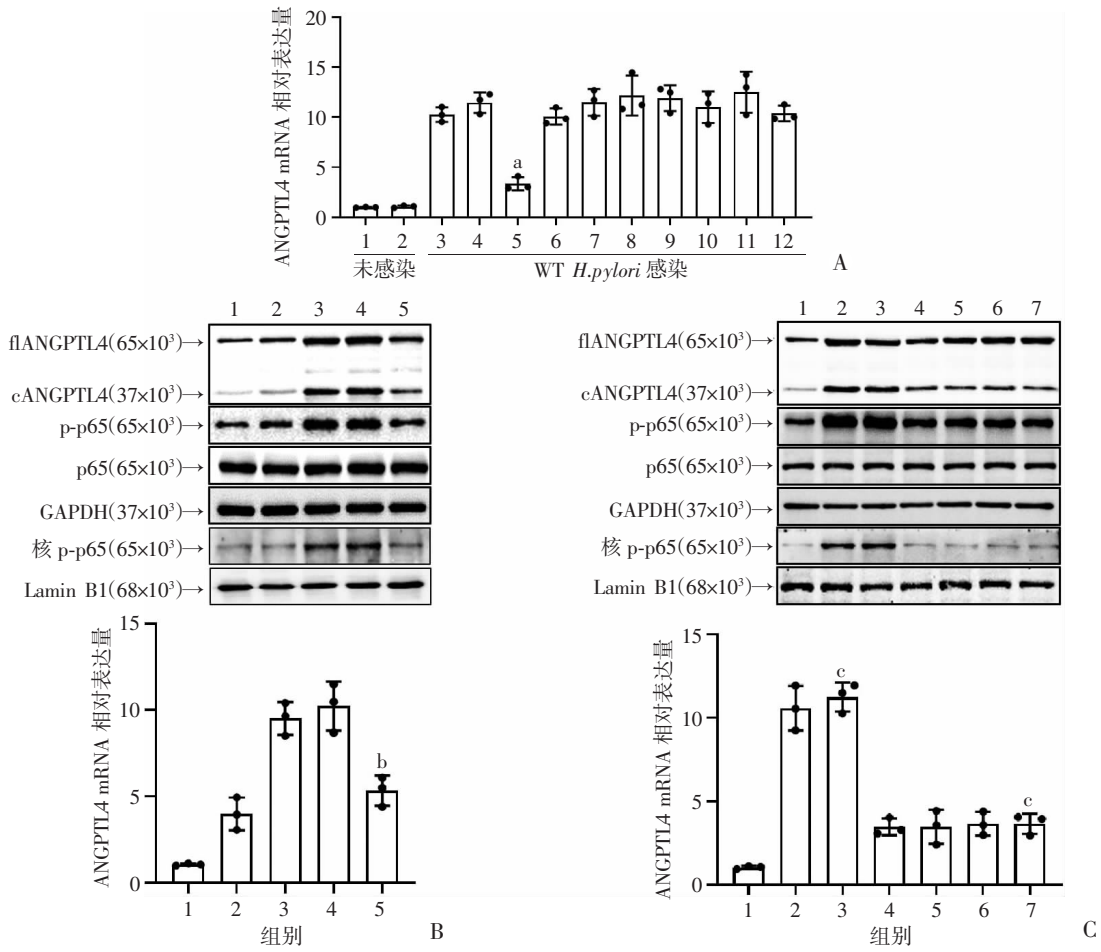
为了探讨 *H. pylori* 诱导胃上皮细胞表达 ANGPTL4 的潜在调控机制,本研究进行了信号通路阻断实验。结果显示,只有抑制剂 BAY 11-7082 阻断 NF-κB 通路的信号传递能有效降低 WT *H. pylori* 感染的 AGS 细胞中 ANGPTL4 表达($P<0.05$,图 3A)。进一步检测 CagA 作用缺失或者阻断 NF-κB 通路情况下细胞中 ANGPTL4 以及相关蛋白的表达情况。结果显示,WT *H. pylori* 感染的 AGS 细胞中,ANGPTL4 表达量和 NF-κB 通路直接下游底物 p65 的磷酸化显著增加,且细胞核内磷酸化 p65 水平也相应增高。但在 NF-κB 通路抑制剂 BAY 11-7082 或 CagA EPIYA 基序磷酸化抑制剂 PP2 预处理的 WT *H. pylori* 感染,以及 △*cagA H. pylori* 感染的 AGS 细胞中 ANGPTL4 表达、p65 的磷酸化以及核内 p65 的磷酸化均被显著抑制($P<0.05$,图 3B、C)。



1:未感染;2:WT *H. pylori* 感染;3:△*cagA H. pylori* 感染;a:$P<0.05$,与 WT *H. pylori* 感染组比较

A:小鼠胃类器官在培养第 1、3、6、9 天时的镜下形态;B:人胃类器官在培养第 7 天时的镜下形态;C、D:不同 *H. pylori* 菌株感染人和小鼠胃类器官(24 h)的 ANGPTL4 蛋白及 mRNA 表达水平($n=3$)

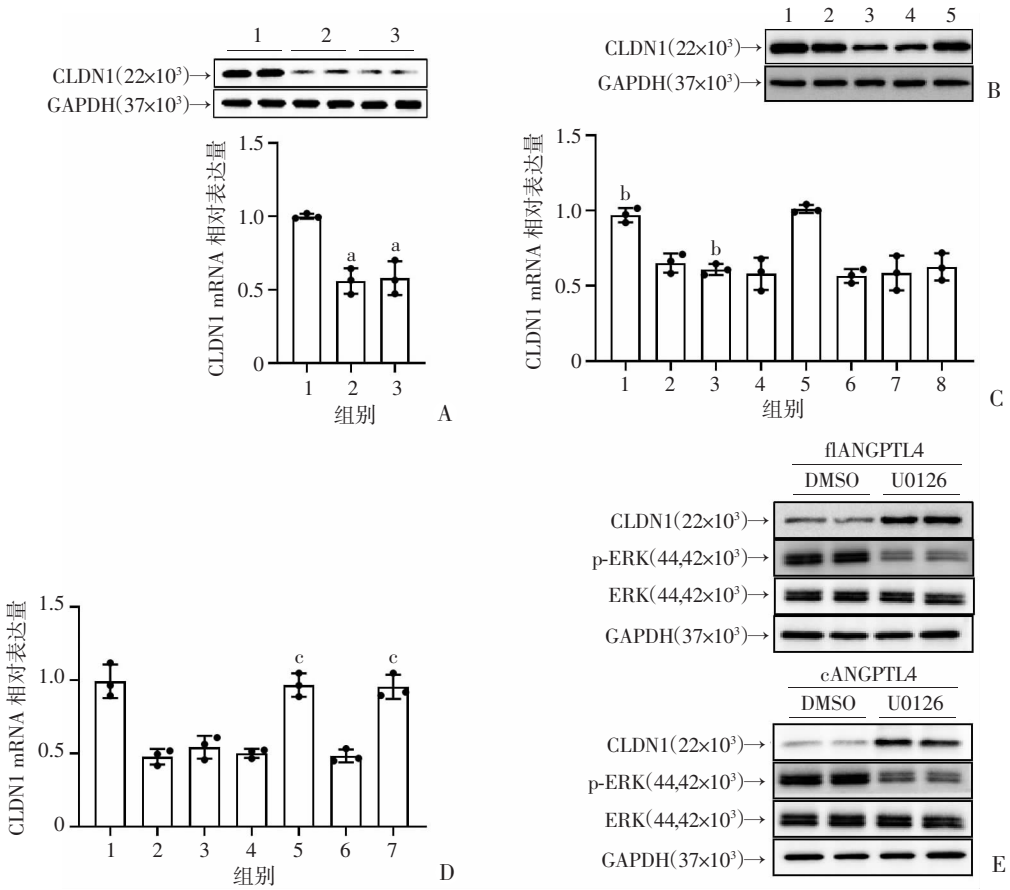
图 2 ANGPTL4 在 *H. pylori* 感染的人和小鼠胃类器官中表达水平



A:WT *H. pylori* 刺激的 AGS 细胞(预处理或未预处理)中 ANGPTL4 mRNA 表达水平(24 h,MOI=100,n=3);1:未处理;2:DMSO 处理;3:未处理;4:DMSO 处理;5:BAY 11-7082 处理;6:U0126 处理;7:SB203580 处理;8:JNK inhibitor Ⅱ处理;9:Wartmannin 处理;10:GSK-3β inhibitor Ⅵ处理;11:AG490 处理;12:Full32 处理;a:P<0.05,与 4 组比较;B:WT *H. pylori* 或△*cagA H. pylori* 刺激的 AGS 细胞(BAY 11-7082 预处理或未预处理)中 ANGPTL4 mRNA 表达水平(24 h,MOI=100,n=3)以及相关蛋白表达水平;1:未感染;2:△*cagA H. pylori* 感染;3:WT *H. pylori* 感染;4:WT *H. pylori*+DMSO;5:WT *H. pylori*+BAY 11-7082;b:P<0.05,与 4 组比较;C:WT *H. pylori* 或△*cagA H. pylori* 刺激的 AGS 细胞(PP2 预处理或未预处理)中 ANGPTL4 mRNA 表达水平(24 h,MOI=100,n=3)以及相关蛋白表达水平;1:未感染;2:WT *H. pylori* 感染;3:WT *H. pylori*+DMSO;4:WT *H. pylori*+PP2;5:△*cagA H. pylori* 感染;6:△*cagA H. pylori*+DMSO;7:△*cagA H. pylori*+PP2;c:P<0.05,与 4 组比较

图 3 *H. pylori* 诱导胃上皮细胞表达 ANGPTL4 的机制

2.4 ANGPTL4 下调胃上皮细胞密封蛋白 CLDN1 表达 用重组人 flANGPTL4 蛋白和 cANGPTL4 蛋白(1 μg/mL 终浓度)处理 AGS 细胞 24 h 后,检测胃上皮细胞中 CLDN1 表达情况。结果显示,相比于对照组,flANGPTL4 和 cANGPTL4 组 CLDN1 在转录和翻译水平表达减少(P<0.05,图 4A)。检测 WT *H. pylori* 感染、△*cagA H. pylori* 感染或使用 BAY 11-7082 预处理的 AGS 细胞中 CLDN1 蛋白的表达情况。相比于未感染组,WT *H. pylori* 感染能抑制 CLDN1 蛋白的表达,并且在毒力因子 CagA 缺失或阻断 NF-κB 信号通路的情况下,这种抑制作用明显减弱(图 4B)。用信号通路抑制剂实验研究 ANGPTL4 导致胃上皮细胞 CLDN1 表达下调的潜在机制,结果显示,只有 ERK 信号通路抑制剂 U0126 能抑制 flANGPTL4 蛋白对 CLDN1 的这种下调作用(P<0.05,图 4C),且 flANGPTL4 和 cANGPTL4 均能通过 ERK 磷酸化下调 CLDN1 mRNA 和蛋白的表达,并在使用 U0126 预处理 AGS 细胞后,这种作用被抑制(P<0.05,图 4D、E)。以上结果均提示,在 *H. pylori* 感染期间,表达上调的 ANGPTL4 是通过激活 ERK 通路来抑制胃上皮细胞中 CLDN1 的表达。



A:人重组 ANGPTL4 蛋白刺激后 AGS 细胞中 CLDN1 mRNA 和蛋白表达水平($n=3$);1:未刺激;2:flANGPTL4 刺激;3:cANGPTL4 刺激;a:$P<0.05$,与 1 组比较;B:WT *H. pylori* 或△*cagA H. pylori* 刺激的 AGS 细胞(预处理或未预处理)中 CLDN1 蛋白表达水平;1:未感染;2:△*cagA H. pylori* 感染;3:WT *H. pylori* 感染;4:WT *H. pylori*+DMSO;5:WT *H. pylori*+BAY-11-7082;C:重组 flANGPTL4 蛋白刺激的 AGS 细胞(预处理或未预处理)中 CLDN1 mRNA 表达水平(24 h,$n=3$);1:未刺激;2:flANGPTL4 刺激;3:DMSO 处理+flANGPTL4 刺激;4:SB203580 处理+flANGPTL4 刺激;5:U0126 处理+flANGPTL4 刺激;6:BAY-11-7082 处理+flANGPTL4 刺激;7:GSK-3β inhibitor Ⅵ处理+flANGPTL4 刺激;8:JNK inhibitor Ⅱ处理+flANGPTL4 刺激;b:$P<0.05$,与 5 组比较;D:重组 flANGPTL4 或 cANGPTL4 蛋白刺激的 AGS 细胞(预处理或未预处理)中 CLDN1 mRNA 表达水平(24 h,$n=3$);1:未刺激;2:flANGPTL4 刺激;3:cANGPTL4 刺激;4:DMSO 处理+flANGPTL4 刺激;5:U0126 处理+flANGPTL4 刺激;6:DMSO 处理+cANGPTL4 刺激;7:U0126 处理+cANGPTL4 刺激;c:$P<0.05$,与 1 组和 4 组比较;E:用 U0126 对 AGS 细胞预处理,再用重组 flANGPTL4 或者 cANGPTL4 蛋白刺激 24h 后 AGS 细胞中 CLDN1、p-ERK 蛋白表达水平

图 4 重组 ANGPTL4 对 AGS 细胞中 CLDN1 表达水平的影响

3 讨论

H. pylori 感染胃部后,通过粘附素/受体相互作用附着于宿主胃黏膜上皮细胞,并释放多种毒力因子,诱导胃上皮细胞表达炎症性分子,如基质金属蛋白酶 MMP10[18]、基质细胞蛋白 TINAGL1[19]、核细胞因子 ETS1[20]等。这些分子参与调控宿主胃黏膜微环境的免疫反应和慢性胃炎的发生发展,介导宿主防御"失能"及 *H. pylori* 感染慢性化。本研究发现 *H. pylori* 感染能显著诱导一种新的分泌性蛋白 ANGPTL4 在胃上皮细胞中表达增高。胃上皮细胞属于细胞单一的二维(2D)细胞模型,而哺乳动物的胃排列着有序的上皮,由内陷的胃单位组成,容纳各种类型的细胞(粘液细胞、泌酸壁细胞、产酶主细胞、增殖细胞和中间细胞群)。类器官是干细胞起源的、自组织的器官特异性细胞的 3D 集群,能够维持原始器官的功能、分子和细胞异质性[21]。在 *H. pylori* 感染机制和炎症的研究中,源自原代细胞的胃类器官在细胞种类和细胞自我组织方面更加贴近人的体内过程[22]。本研究中使用 *H. pylori* 感染胃类器官模型在 3D 层面进一步验证了

ANGPTL4 在 *H. pylori* 感染中的表达情况。以上结果均提示 ANGPTL4 在 *H. pylori* 感染相关胃部病中发挥着重要作用。

毒力因子 CagA 的细胞内易位是与细胞内各种蛋白相互作用的第一步,可能依赖于磷酸化,也可能独立于磷酸化。磷酸化的 CagA 可与多种细胞内蛋白相互结合,如 Shp-2、AbI 激酶等,从而改变宿主细胞内信号[23]。用 △*cagA H. pylori* 感染胃上皮细胞时,其 ANGPTL4 的表达水平显著低于 WT *H. pylori* 菌株感染组,这提示 *H. pylori* 主要是通过毒力因子 CagA 来诱导胃上皮细胞表达 ANGPTL4。进一步的抑制剂实验明确了 *H. pylori* 是依赖磷酸化的 CagA 激活 NF-κB 通路上调胃上皮细胞中 ANGPTL4 的表达。

H. pylori 可以通过破坏上皮细胞之间的紧密连接组分来破坏胃黏膜屏障的完整性,从而使更多菌体得以在宿主胃中停留,促进炎症慢性化[18]。CLDN1 是一种紧密连接蛋白,在合并 *H. pylori* 感染的胃癌中表达降低[24]。本研究发现 *H. pylori* 诱导产生的 ANGPTL4 能抑制胃上皮细胞中 CLDN1 的表达。以上研究结果提示,ANGPTL4 能通过抑制紧密连接蛋白 CLDN1 的表达,破坏胃上皮细胞间紧密连接的结构和功能,有助于细菌定植和炎症慢性化。ANGPTL4 可与整合素 αVβ3 结合减轻缺氧导致的血管通透性增加[25]。在 HUANG 等[26] 的一项研究中证明肿瘤组织产生的 ANGPTL4 与内皮中粘附蛋白和紧密连接蛋白的主要成分整合素 α5β1、VE-钙粘蛋白和 CLDN5 结合,导致内皮细胞的破坏。可见 ANGPTL4 对细胞间紧密连接的作用不同学者存在不同意见,这可能与 ANGPTL4 的片段多样性及其表达的组织差异性有关。

H. pylori 感染初期胃黏膜淋巴细胞和单核细胞浸润增多,相应的炎症因子 IL-1、IL-8 和 IL-6 的表达也显著升高,$CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞等 T 淋巴细胞亚群的数量也有所增加。进入持续感染阶段,胃黏膜活检显示各种类型白细胞的浸润都有所增加[27],可见 *H. pylori* 感染是一个细胞免疫反应和免疫分子活化的持续刺激的综合作用过程。ANGPTL4 起初被视为一种脂肪因子参与脂质代谢和影响葡萄糖稳态[28-30],近年越来越多研究表明 ANGPTL4 能作为炎症因子参与炎症信号通路的调控[31]。本研究阐明了 *H. pylori* 诱导胃上皮细胞表达 ANGPTL4 的表达调控机制以及 ANGPTL4 对紧密连接蛋白 CLDN1 的调控作用,而 ANGPTL4 在介导胃黏膜免疫反应中的调控机制和效应功能还需要进一步探究。

参考文献:

[1] MARSHALL B J, WARREN J R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration[J]. Lancet, 1984, 1(8390): 1311-1315. DOI: 10.1016/s0140-6736(84)91816-6.

[2] SALAMA N R, HARTUNG M L, MÜLLER A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*[J]. Nat Rev Microbiol, 2013, 11(6): 385-399. DOI: 10.1038/nrmicro3016.

[3] DOOLEY C P, COHEN H, FITZGIBBONS P L, *et al*. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons[J]. N Engl J Med, 1989, 321(23): 1562-1566. DOI: 10.1056/NEJM198912073212302.

[4] GOODWIN C S, ARMSTRONG J A, MARSHALL B J. *Campylobacter* pyloridis, gastritis, and peptic ulceration[J]. J Clin Pathol, 1986, 39(4): 353-365. DOI: 10.1136/jcp.39.4.353.

[5] PLUMMER M, FRANCESCHI S, VIGNAT J, *et al*. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*[J]. Int J Cancer, 2015, 136(2): 487-490. DOI: 10.1002/ijc.28999.

[6] BOYANOVA L, HADZHIYSKI P, GERGOVA R, *et al*. Evolution of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a topic of increasing concern[J]. Antibiotics, 2023, 12(2): 332. DOI: 10.3390/antibiotics12020332.

[7] AMIEVA M, JR PEEK R M. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer[J]. Gastroenterology, 2016, 150(1): 64-78. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.09.004.

[8] ANSARI S, YAMAOKA Y. *Helicobacter pylori* virulence factor cytotoxin-associated gene A (CagA)-mediated gastric pathogenicity[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(19): 7430. DOI: 10.3390/ijms21197430.

[9] SANTULLI G. Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look[J]. Front Endocrinol, 2014, 5: 4. DOI: 10.3389/fendo.2014.00004.

[10] YIN W, ROMEO S, CHANG S R, *et al*. Genetic variation in ANGPTL4 provides insights into protein processing and function[J]. J Biol Chem, 2009, 284(19): 13213-13222. DOI: 10.1074/jbc.M900553200.

[11] LEI X, SHI F J, BASU D, *et al*. Proteolytic processing of angiopoietin-like protein 4 by proprotein convertases modulates its inhibitory effects on lipoprotein lipase activity[J]. J Biol Chem, 2011, 286(18): 15747-15756. DOI: 10.1074/jbc.M110.217638.

[12] FOLSOM A R, PEACOCK J M, DEMERATH E, *et al*. Variation in ANGPTL4 and risk of coronary heart disease:

the atherosclerosis risk in communities study [J]. Metabolism, 2008, 57(11): 1591-1596. DOI: 10.1016/j.metabol.2008.06.016.

[13] PADUA D, ZHANG X H F, WANG Q Q, *et al*. TGFβ primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4[J]. Cell, 2008, 133(1): 66-77. DOI: 10.1016/j.cell.2008.01.046.

[14] KOREK E, KRAUSS H. Novel adipokines: their potential role in the pathogenesis of obesity and metabolic disorders [J]. Postepy Hig Med Dosw, 2015, 69: 799-810.

[15] SODHI A, MA T, MENON D, *et al*. Angiopoietin-like 4 binds neuropilins and cooperates with VEGF to induce diabetic macular edema [J]. J Clin Invest, 2019, 129(11): 4593-4608. DOI: 10.1172/JCI120879.

[16] GOH Y Y, PAL M, CHONG H C, *et al*. Angiopoietin-like 4 interacts with matrix proteins to modulate wound healing [J]. J Biol Chem, 2010, 285(43): 32999-33009. DOI: 10.1074/jbc.M110.108175.

[17] GUO L, LI S Y, JI F Y, *et al*. Role of Angptl4 in vascular permeability and inflammation[J]. Inflamm Res, 2014, 63(1): 13-22. DOI: 10.1007/s00011-013-0678-0.

[18] LV Y P, CHENG P, ZHANG J Y, *et al*. *Helicobacter pylori*-induced matrix metallopeptidase-10 promotes gastric bacterial colonization and gastritis[J]. Sci Adv, 2019, 5(4): eaau6547. DOI: 10.1126/sciadv.aau6547.

[19] TENG Y S, XIE R, XU J Y, *et al*. Tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 is a novel matricellular protein that promotes gastric bacterial colonization and gastritis in the setting of *Helicobacter pylori* infection [J]. Cell Mol Immunol, 2023, 20(8): 924-940. DOI: 10.1038/s41423-023-01055-4.

[20] TENG Y S, CANG B C, MAO F Y, *et al*. Expression of ETS1 in gastric epithelial cells positively regulate inflammatory response in *Helicobacter pylori*-associated gastritis[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(7): 498. DOI: 10.1038/s41419-020-2705-8.

[21] IDOWU S, BERTRAND P P, WALDUCK A K. Gastric organoids: advancing the study of *H. pylori* pathogenesis and inflammation[J]. Helicobacter, 2022, 27(3): e12891. DOI: 10.1111/hel.12891.

[22] LANCASTER M A, KNOBLICH J A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies[J]. Science, 2014, 345(6194): 1247125. DOI: 10.1126/science.1247125.

[23] TOHIDPOUR A. CagA-mediated pathogenesis of *Helicobacter pylori*[J]. Microb Pathog, 2016, 93: 44-55. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.01.005.

[24] CHOI S, KIM N, PARK J H, *et al*. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on the expression of tight junction proteins in the gastric epithelium in relation to gastric carcinogenesis [J]. Helicobacter, 2022, 27(6): e12929. DOI: 10.1111/hel.12929.

[25] GOMEZ PERDIGUERO E, LIABOTIS-FONTUGNE A, DURAND M, *et al*. ANGPTL4-αvβ3 interaction counteracts hypoxia-induced vascular permeability by modulating Src signalling downstream of vascular endothelial growth factor receptor 2[J]. J Pathol, 2016, 240(4): 461-471. DOI: 10.1002/path.4805.

[26] HUANG R L, TEO Z, CHONG H C, *et al*. ANGPTL4 modulates vascular junction integrity by integrin signaling and disruption of intercellular VE-cadherin and claudin-5 clusters[J]. Blood, 2011, 118(14): 3990-4002. DOI: 10.1182/blood-2011-01-328716.

[27] ALGOOD H M, COVER T L. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(4): 597-613. DOI: 10.1128/CMR.00006-06.

[28] KERSTEN S, MANDARD S, TAN N S, *et al*. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene [J]. J Biol Chem, 2000, 275(37): 28488-28493. DOI: 10.1074/jbc.M004029200.

[29] LIU D J, PELOSO G M, YU H J, *et al*. Exome-wide association study of plasma lipids in >300 000 individuals [J]. Nat Genet, 2017, 49: 1758-1766. DOI: 10.1038/ng.3977.

[30] GUSAROVA V, O'DUSHLAINE C, TESLOVICH T M, *et al*. Genetic inactivation of ANGPTL4 improves glucose homeostasis and is associated with reduced risk of diabetes [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2252. DOI: 10.1038/s41467-018-04611-z.

[31] ZUO Y, HE Z, CHEN Y, *et al*. Dual role of ANGPTL4 in inflammation[J]. Inflammation Res, 2023, 72(6): 1303-1313. DOI: 10.1007/s00011-023-01753-9.

(收稿:2023-09-21;修回:2023-12-27)

(编辑 邓强庭)