DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.025

论著

文章编号:1000-5404(2001)08-0928-03

CagA 基因阳性 Hp 培养滤液对人胃粘膜上皮细胞系 DNA 损伤作用

陈洁平[1],沈鼎明[2],杨致邦[3],高晋华[1] ([1]第三军医大学附属西南医院血液科,重庆 400038;[2]重庆医科大学第二临床学院消化内科,重庆 400011;[3]重庆医科大学微生物学教研室,重庆 400046)

提 要:目的 研究 *CagA* 阳性幽门螺杆菌(Hp)培养滤液对人胃粘膜上皮细胞(GES-1)DNA 的损伤作用。**方法** 制备 Hp 培养滤液,PCR 鉴定 *CagA* 基因。采用单细胞微凝胶电泳观察 Hp(*CagA* +)培养滤液对 GES-1 细胞 DNA 的损伤作用。**结果** Hp(*CagA* +)培养滤液可使 GES-1 细胞形成彗星现象。**结论** Hp(*CagA* +)培养滤液可以导致 GES-1 细胞的 DNA 损伤 DNA 损伤可能是 *CagA* 诱导 GES-1 细胞恶性转化的机制之一。

关键词:幽门螺杆菌;*CagA* 基因;胃粘膜上皮细胞

中图法分类号:R322.44;R377;R394.2 **文献标识码**:A

Effects of broth culture filtrates of *CagA* gene positive *Helicobacter pylori* on DNA damage of human gastric epithelial cell line

CHEN Jie-ping, SHEN Ding-ming, YANG Zhi-bang, GAO Jin-hua (Department of Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of broth culture filtrates of *CagA* gene positive *Helicobacter pylori* on DNA damage of human gastric epithelial cells line. **Methods** Broth culture filtrates of *Helicobacter pylori* was prepared. *CagA* gene were identified by PCR. GES-1 cells were treated with *CagA* gene positive broth culture filtrates of *Helicobacter pylori*. Single cell microgel electrophoresis were used to observe the damage of GES-1 cell DNA caused by the broth culture filtrates. **Results** Hp(*CagA* +) culture filtrates may cause comet phenomenon of GES-1 cells. **Conclusion** DNA damage can be induced by borth culture filtrates of *CagA* gene positive *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells GES-1 line. DNA damage may be one of the mechanism of malignant transformation induced by broth culture filtrates of *CagA* gene positive *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells.

Key words: *Helicobacter pylori*; *CagA* gene; gastric epithelial cell

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,Hp)感染与胃癌的发生密切相关[1]。研究显示:Hp 的细胞毒素相关蛋白(*CagA*)在 Hp 相关胃癌的发病中起着十分重要的作用[2]。Hp 的 *CagA* 与胃癌的关系以及 *CagA* 如何参与胃癌发病的机制是目前研究的热点及难点。本课题研究 *CagA* 基因阳性 Hp 培养滤液对人胃粘膜上皮细胞 DNA 损伤的影响,借此探讨 *CagA* 在 Hp 相关的胃癌发病中的作用,了解 Hp 致胃癌发病的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 GES-1 为人胃粘膜上皮细胞系,MCDB151 培养基(Sigma),补加营养成分,无血清培养。HeLa 为人宫颈鳞癌上皮细胞系。培养条件为高糖 DMEM 培养基、10%胎牛血清。

1.1.2 Hp 分离培养 采集经胃镜检查证实的慢性胃炎或胃十二指肠溃疡病人胃窦粘膜标本进行 Hp 分离及培养。采用 Skirrow 培养基,将钳取的胃窦粘膜活检标本一块直接接种于培养基上,置厌氧灌中,灌内气体比例为 CO_2 7%, N_2 80%, O_2 5%, H_2 8%,37 ℃温育 3~7 d。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870046)及国家博士后基金项目

作者简介:陈洁平(1963-),女,贵州省贵阳市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肿瘤诱导分化、分子治疗及幽门螺杆菌方面的研究。发表论文 36 篇。电话:(023)68754129

收稿日期:2001-01-04;修回日期:2001-03-28

1.2 实验方法

1.2.1 Hp 培养滤液的制备 参照 Leunk 的方法进行。

1.2.2 Hp 培养滤液空泡毒素活性测定 空泡毒素(Vacuolating cytotoxin A, VacA)活性检测按文献[3]方法进行。将 *CagA* 基因阳性及阴性 Hp 培养滤液以倍比稀释法分别加入贴覆有生长良好 HeLa 细胞的 24 孔细胞培养板培养液内。空泡毒结果判定:48 h 后,在倒置显微镜下观察,以 50%以上 HeLa 细胞出现空泡样变化,判断为空泡毒试验阳性,Hp 培养滤液含空泡毒素。Hp 为空泡毒阳性 Hp,出现阳性结果的最高稀释度即为其空泡毒作用滴度。

1.2.3 Hp 培养滤液处理细胞方法 按不同的实验需要接种一定量的细胞于培养皿中,24 h 以内用 Hp 培养滤液处理,以一定的滴度计算所需滤液量。分别以 Hp(*CagA* +)培养滤液、Hp(*CagA* -)培养滤液或布氏肉汤处理 GES-1 细胞,置 37 ℃ CO_2 孵箱中 1 h,后加入完全培养基培养。

1.2.4 实验分组 Hp(*CagA* +)培养滤液处理 GES-1 细胞组称实验组(Treatment),Hp(*CagA* -)培养滤液处理 GES-1 细胞组称对照组(Mock),布氏肉汤处理组称空白对照组(Control)。

1.3 检测方法

1.3.1 细菌基因组 DNA 的提取 取 Hp 培养菌苔,采用华舜 DNA 提取试剂盒,按说明书方法提取细菌基因组 DNA。

1.3.2 单细胞微凝胶电泳(Single cell microgel electrophoresis, SCGE)技术检测 GES-1 细胞 DNA 损伤 按文献[4]方法进行。取不同滴度 Hp(*CagA* +)滤液处理细胞,用 Hp(*CagA* -)滤液处理细胞作为对照,培养 8 h。于载玻片的磨砂面上制作三

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

层琼脂糖凝胶，中间一层为 0.5% 低熔点琼脂糖 75 μl 加 10 μl 含 1 000 个 GES-1 细胞。载玻片用细胞裂解液处理，电泳后经 Tris-HCl 缓冲液及无水乙醇处理。溴化乙锭染色 20 min，荧光显微镜下随机观测 20 个细胞，用目镜测微尺测定核 DNA 直径及迁移长度。

1.3.3　PCR 分析 Hp 的 *CagA* 基因　取细菌基因组 DNA，*CagA* 基因引物（上游：5'-ATAATGCTAAATTAGACAACTTGATCGA -3'；下游：5'-TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT-3'）PCR 分析。95 ℃ 预变性 5 min，95 ℃ 1 min，56 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，28～30 个循环后 72 ℃延伸 7 min。1.8% 琼脂糖凝胶电泳，在长波 UV 灯下观测并照相。

1.4　统计学分析

采用 *t* 检验。

2　结果

2.1　Hp 的 *CagA* 基因的鉴定

提取 Hp DNA，以 *CagA* 基因引物进行 PCR 鉴定，样本琼脂糖凝胶电泳，在 298 bp 处可见阳性扩增条带，结果见图 1。

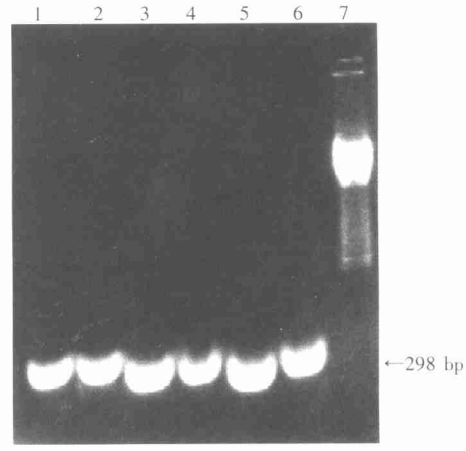


图 1　PCR 分析 Hp 的 *CagA* 基因

Fig 1　*CagA* gene of Hpanalyzed by PCR

1～6：Different Hp strains；7：DNA Marker

2:2　Hp 培养滤液 VacA 活性检测

Hp（*CagA* +）培养滤液处理 HeLa 细胞 8 h 后，部分 HeLa 细胞胞浆出现比较小的空泡，随培养时间延长，较大的 HeLa 细胞呈现空泡样变，而且空泡数目逐渐增多，体积逐渐增大。48 h 后空泡毒作用最明显，但 HeLa 细胞仍贴壁生长；4 d 后细胞变圆。而阴性对照组（*CagA* -），HeLa 细胞连续培养 4 d，HeLa 细胞形态无明显改变。Hp（*CagA* +）培养滤液 VacA 活性为1:400，Hp（*CagA* -）培养滤液无 VacA 活性。

2.3　SCGE 技术检测培养人胃粘膜上皮细胞 DNA 损伤

GES-1 细胞经 Hp（*CagA* +）培养滤液处理 8 h 后可引起细胞 DNA 链断裂和 DNA 碱易变性区段产生，在电泳电场作用下，DNA 断链离核迁移，形成拖尾（彗星现象），DNA 迁移长度与细胞 DNA 损伤成正比，DNA 迁移越长，表明细胞的 DNA 损伤程度越大，见图 2。DNA 迁移的长短与 Hp 培养滤液中 *CagA* 毒素的活力有关，随着毒素活力的增加，DNA 迁移的长度也增加，与对照组及空白对照组相比 $P<0.01$，见表 1。

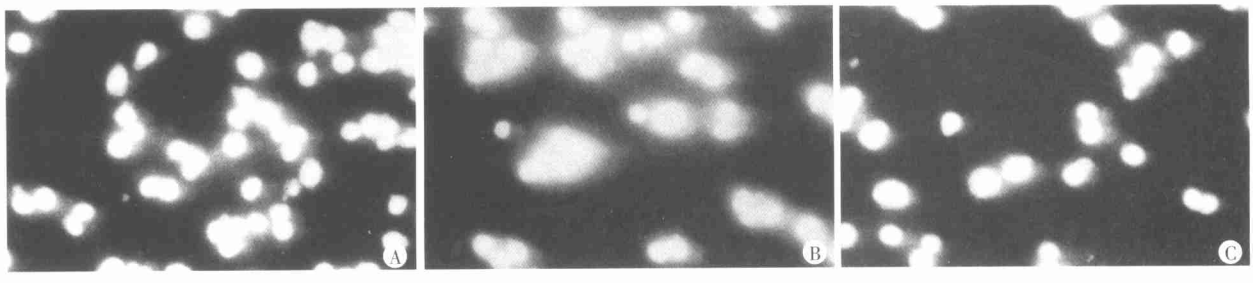


图 2　SCGE 显示 Hp（*CagA* +）培养滤液处理的 GES-1 细胞 DNA 损伤

Fig 2　DNA damage in GES-1 cells treated *CagA* positive filtrates demonstrated by SCGE

A：Mock；B：Treatment；C：Control

表 1　Hp（*CagA* +）培养滤液对 GES-1 细胞的 DNA 迁移的影响

Tab 1　Effects of broth culture filtrates of *CagA* gene positive Hp on DNA migration in GES-1 cells

DNA migration	Mock	Control	Treatment		
			1:10△	1:100△	1:200△
Length of DNA migration ($\mu m, \bar{x} \pm s$)	1.01 ± 1.49	1.29 ± 1.86	1.65 ± 2.01	2.55 ± 2.49**	10.70 ± 6.03**
Percentage of DNA migration (%)	29.3	31.7	32.8	59.2	87.4

△：Vacuolizing cytotoxin activity；** ：$P<0.01$ *vs* mock and control

3　讨论

所有的 Hp 都有 VacA 基因，而表现出毒素活性的菌为产毒菌，只有 60% 的 Hp 具有 *CagA* 基因，被称之为 *CagA* 阳性菌，所有的 *CagA* 阳性菌均为产毒菌。从我们对 VacA 活性的检测结果可以看出，Hp（*CagA* +）培养滤液具有 VacA 活性，而 Hp（*CagA* -）培养滤液则无 VacA 活性。表明 *CagA* 基因阳性菌具有毒素活性。*CagA* 基因编码分子量为（120～140）× 10^3 的细胞毒素相关蛋白，该基因总长约 5 925 bp，包含一个 3 440 bp 的开放阅读框架。*CagA* 基因作为评价 Hp 毒力的指标之一，与其它 Cag 族基因共同构成 Hp 的“致病岛”，

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

确切致病作用尚不清楚。本课题采用 *CagA* 基因阳性 Hp 培养滤液持续处理体外培养的胃粘膜上皮细胞，显示了彗星现象。表明 *CagA* 阳性 Hp 培养滤液可以导致胃粘膜上皮细胞的 DNA 损伤，提示 *CagA* 可能与胃癌的发生有关，与有关文献[2,5,6]报道一致。

细胞 DNA 损伤可以诱发细胞突变和癌变，这是不争的事实。*CagA* 阳性 Hp 培养滤液是否能引起胃粘膜细胞 DNA 损伤是值得探讨的问题。单细胞微凝胶电泳技术作为一项新技术，为研究单细胞 DNA 损伤带来了方便，它不仅快速、灵敏，且简单、易行。我们采用该方法进行研究，结果显示 *CagA* 基因阳性 Hp 培养滤液可使 GES-1 细胞形成彗星现象。表明 *CagA* 毒素可以引起 GES-1 细胞 DNA 链断裂，造成 GES-1 细胞 DNA 损伤，这可能是 *CagA* 诱导胃粘膜上皮细胞生长特性改变的机制之一。有研究显示 Hp 感染可以导致胃粘膜细胞 DNA 损伤，引起癌基因表达增加。认为 Hp 感染是通过改变胃内环境，增加胃内自由基，毒素作用等引起细胞 DNA 损伤、细胞过度增殖、癌基因表达增加而与胃癌相联系的[1]。有证据表明幽门螺杆菌感染及随后发生的炎症与增加胃上皮细胞的增殖及诱导凋亡有关[7]。这些细胞动力学的改变可以通过产生 DNA 损伤而促进有丝分裂细胞系的发展[8]。Yabuki 等[9]的研究了 35 例胃腺癌的胃切除标本细胞增殖及单双链 DNA 损害情况，表明 Hp 感染相关的慢性胃炎中的细胞损害可以增加细胞的增殖活性。这些临床研究结果显示了 Hp 与胃粘膜细胞 DNA 损伤的关系，本研究采用 *CagA* 阳性 Hp 培养滤液在体外直接诱导了胃粘膜上皮细胞 DNA 损伤，表明 Hp 的 *CagA* 可能与胃粘膜上皮细胞 DNA 损伤有关。*CagA* 可能通过对胃粘膜上皮细胞 DNA 损伤而参与胃癌的发病。

（致谢：感谢重庆医科大学任红、黄爱龙、徐波、曾艳、蒋代凤、凌宁、张霞、石晓峰、梁增伟、李勇国对本研究的大力支持。）

参考文献：

[1] Forman D. *Helicobacter pylori* and gastric cancer[J]. Scand J Gastroenterol Suppl, 1996, 220: 23 - 26.

[2] Yamaoka Y, Kodama T, Kashima Key, *et al*. Antibody against *Helicobacter pylori CagA* and VacA and the risk for gastric cancer[J]. J Clin Pathol, 1999, 52(3): 215 - 218.

[3] Cover T L, Dooley C P, Blaser M J. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity[J]. Infect Immun, 1990, 58(3): 603 - 610.

[4] 孟紫强，张连珍. 应用 SCGE 技术研究 DNA 损伤的原理与方法[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14(5): 604 - 609.

[5] Kuipers E J. Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer[J]. Aliment Pharmacol Ther, 1999, 13(Suppl 1): 3 - 11.

[6] Rudnicka W, Covacci A, Wadstrom T, *et al*. A recombinant fragment of *Helicobacter pylori CagA* affects proliferation of human cells[J]. J Physiol Pharmacol, 1998, 49(1): 111 - 119.

[7] Rokkas T, Ladas S, Liatsos C, *et al*. Relationship of *Helicobacter pylori CagA* status to gastric cell proliferation and apoptosis[J]. Dig Dis Sci, 1999, 44(3): 487 - 493.

[8] McNamara D, OMorain C. *Helicobacter pylori* and gastric cancer[J]. Ital J Gastroenterol Hepatol, 1998, 30(Suppl 3): S294 - S298.

[9] Yabuki N, Sasano H, Tobita M, *et al*. Analysis of cell damage and proliferation in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa from patients with gastric adenocarcinoma[J]. Am J Pathol, 1997, 151(3): 821 - 829.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)08-0930-01

保留脾脏胰尾切除术治疗胰管结石伴慢性胰腺炎1例

A case report of treating pancreatolithiasis combined with chronic pancreatitis by spleen-intact pancrea distal resection

刘宏鸣 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所肝胆外科，重庆 400042）

患者男，45岁，农民。反复上腹隐痛3年，食欲下降，进食脂肪餐后腹泻，2000年5月5日入院。查体剑突下轻压痛，未扪及腹部包块。既往有饮酒史，饮酒量150～250 ml/d。饮酒时间约20年。肝肾功能均正常，血、尿淀粉酶分别为250、1 260 U苏氏单位，血清脂肪酶195 U(国际单位)。B超、CT、ERCP均示"胰管结石伴慢性胰腺炎"。术中见胰腺萎缩，主胰管扩张，可扪及胰管内多发结石。沿主胰管走向切开主胰管6 cm，取出胰管内多发性、灰白色结石数10粒。胰腺尾部结石较多且严重纤维化，决定行胰尾切除，由于脾脏正常，故保留脾脏。先在胰腺上缘切开后腹膜，显露脾动静脉，再从胰尾下缘切开后腹膜，向上游离胰尾部，仔细分离结扎胰尾与脾动静脉之间的血管分支，将胰尾从脾门向右翻起保护好脾动静脉，切除胰尾约5 cm，胰腺断面细致缝扎止血，切断的胰管单独缝扎，断面以网膜覆盖，再行胰管空肠Roux-en-Y吻合术，胰管空肠吻合处置14号T形管引流。术后3周拔除T形管，恢复良好，随访已2月，B超、血、尿淀粉酶及血糖均正常。

讨论

胰管切开取石、保留脾脏胰尾切除、胰管空肠Roux-en-Y吻

（下转933页）

作者简介：刘宏鸣(1974-)，男，重庆市人，硕士研究生，医师，主要从事肝胆临床方面的研究。电话：(023)68757247

收稿日期：2000-09-13；修回日期：2001-01-06

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net