

· 基础研究 ·

幽门螺杆菌对胃癌 BGC-823 细胞中 Bcl-xl 基因表达的影响及作用*

吴 莺¹, 孙海波¹, 艾宽宽¹, 何亚龙¹, 魏金文¹, 徐 岷¹, 周 红²

(1. 江苏大学附属医院消化科, 江苏镇江 212001; 2. 江苏大学医学基础与医学技术学院, 江苏镇江 212001)

摘要:目的 探讨幽门螺杆菌超声裂解液对胃癌 BGC-823 细胞中 Bcl-xl 基因表达的影响, 以及 Bcl-xl 基因在胃癌 BGC-823 细胞增殖中所起的作用。方法 分别用东亚型和西方型幽门螺杆菌超声裂解液处理胃癌 BGC-823 细胞 24 h, MTT 法检测细胞增殖情况, 荧光定量 PCR 法检测胃癌 BGC-823 细胞中 Bcl-xl 基因 mRNA 水平的表达情况。设计特异的 Bcl-xl shRNA 阻断 Bcl-xl 基因的表达, 抑制胃癌 BGC-823 细胞增殖。结果 螺杆菌超声裂解液处理胃癌 BGC-823 细胞 24 h 后, 与对照组相比, 处理组 BGC-823 细胞出现增殖 ($P < 0.01$), BGC-823 细胞中 Bcl-xl 基因 mRNA 水平的表达也出现上调; 并且东亚型螺杆菌超声裂解液处理组的促增殖作用强于西方型处理组 ($P < 0.01$), 东亚型螺杆菌超声裂解液处理组细胞中 Bcl-xl 基因 mRNA 的表达水平也高于西方型处理组 ($P < 0.01$)。Bcl-xl shRNA 可以下调 Bcl-xl 基因 mRNA 及蛋白水平的表达, 同时抑制胃癌 BGC-823 细胞的增殖。结论 Bcl-xl 基因对幽门杆菌感染相关性胃癌中癌细胞的增殖起了促进作用。

关键词: 螺杆菌; 幽门; 胃肿瘤; 细胞增殖; Bcl-xl; 基因表达

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.32.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)32-3404-04

The impact and role of the expression of Bcl-xl gene in gastric cancer BGC-823 cells treated with helicobacter pylori*

Wu Ying¹, Sun Haibo¹, Ai Kuankuan¹, He Yalong¹, Wei Jingwen¹, Xu Min¹, Zhou Hong²

(1. Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China;

2. College of Basic Medicine and Medicine Technology, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of helicobacter pylori (Hp) extract on cellular proliferation and the expression of Bcl-xl mRNA in human gastric cancer BGC-823 cell lines, and to investigate the role of Bcl-xl expression on the proliferation of BGC-823 cells. **Methods** Human gastric cancer BGC-823 cell lines were treated with extracts from the East Asia type and Western type of Hp for 24 h. Cell proliferation were evaluated by MTT. The mRNA levels of Bcl-xl in BGC-823 cell were detected by real-time quantitative PCR (RT-PCR). Bcl-xl-mediated RNA interference technique was employed to inhibit the expression of Bcl-xl gene and the proliferation of BGC-823 cells, the levels of Bcl-xl gene was inhibited by Bcl-xl shRNA. **Results** The proliferation of BGC-823 cell treated with Hp extract was observed 24 hours later, magnitude of enhancement of cellular proliferation in the East Asia type was higher than that in the Western type ($P < 0.01$). The levels of Bcl-xl mRNA showed higher in human gastric cancer BGC-823 handled with Hp extract ($P < 0.01$), compared to the control group. Statistical significance of the expression of Bcl-xl mRNA was also found between the East Asia type group and the Western type group ($P < 0.01$). Bcl-xl shRNA could significantly reduced the expression of Bcl-xl mRNA and protein and the proliferation of BGC-823 cells. **Conclusion** It indicated that the proliferation of Hp-related gastric cancer was promoted by Bcl-xl gene.

Key words: helicobacter pylori; stomach neoplasms; cell proliferation; Bcl-xl; gene expression

幽门螺杆菌(helicobacter pylori, Hp)与胃癌的发生密切相关, 其致癌机制仍不十分明确^[1]。体内及体外的研究显示, Hp 可以刺激胃上皮细胞的增殖^[2]。Bcl-xl 基因是一种抗凋亡基因, 研究显示, Bcl-xl 基因在肿瘤的发生发展中扮演着重要的作用^[3-4]。RNA 干扰技术是与靶基因同源的双链 RNA 诱导的特异转录后基因沉默现象。本研究用东亚型(W24)及西方型(11637)[两种菌株均为 cagA 阳性(+)菌株]Hp 超声裂解液处理胃癌 BGC-823 细胞, 探讨 Hp 超声裂解液对胃癌 BGC-823 细胞增殖以及胃癌 BGC-823 细胞中 Bcl-xl 基因 mRNA 表达水平的影响, 设计 Bcl-xl 基因特异性 shRNA 沉默 Bcl-xl 基因的表达, 从而抑制胃癌 BGC-823 细胞增殖, 现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 材料 人胃上皮细胞 BGC-823 细胞由江苏大学生理教研室提供; 东西方型 Hp(均为 cagA+菌株)来源于江苏大学附

属医院消化科^[5]。Hp 培养相关材料试剂购于德国 Merck 公司; Bcl-xl shRNA Plasmid(h)以及 Bcl-xl 单克隆抗体购于 Santa Cruz Biotechnology, Inc。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 BGC-823 于含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养基, 37 °C、5%CO₂ 温箱中培养。

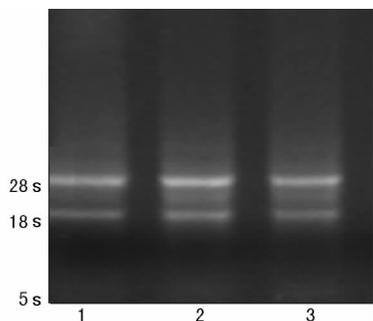
1.2.2 Hp 培养及菌体超声裂解液的制备 将 Hp 接种于哥伦比亚固体琼脂培养基, 加入 10% 的新鲜羊血, 在微需氧环境, 37 °C 下培养, 3 d 后收集细菌, 经鉴定为 Hp 菌株, 然后将 Hp 刮下后用 PBS 漂洗 2 次, 悬于不含血清的 DMEM 培养液中, 菌体悬液经超声裂解后浓度调整为 (1 g/L), -20 °C 保存备用^[6]。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖 取 1×10³/mL 细胞悬液接种于 96 孔培养板内, 待细胞贴壁后吸去培养基, 实验组分别加入

* 基金项目: 江苏省研究生培养创新计划项目(1221270009); 镇江市科技局计划项目(SH2007025)。

含 10% 的东亚型和 10% 的西方型 Hp 超声裂解液的培养基, 并设置 5 个平行孔; 对照组为不含 Hp 的裂解液成分培养基, 并设置 5 个平行孔; 继续培养 24 h。参照 MTT 步骤, 于 490 nm 波长测定吸光度值(OD 值)。细胞的增值率(%) = OD(实验组 - 对照组) / OD 对照组 × 100%。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测 Bcl-xl mRNA 水平表达 取 1×10^5 /mL 细胞悬液接种于 6 孔培养板内, 37 °C、5% CO₂ 温箱中培养, 待细胞贴壁后, 吸去培养基, 实验组分别加入含 10% 的东亚型和 10% 的西方型 Hp 超声裂解液的培养基, 对照组为不含 Hp 的裂解液成分培养基, 继续培养 24 h。提取胃癌 BGC-823 细胞总 RNA, 证实提取的总 RNA 可用(图 1)。按照逆转录试剂盒说明书, 将细胞的总 RNA 逆转录成 cDNA。引物的设计与合成: 上游引物 P1: 5'-TGG CAG CAG TAA AGC AAG-3'; 下游引物 P2: 5'-CAT TTC CGA CTG AAG AGT GA-3'(GenBank 登录号: NM_138578.1), 引物由公司合成。引物的长度为 137 bp。反应体系参照说明书。内参为 GAPDH, 引物长度为 496 bp。每个反应至少重复 3 次。



1: 对照组; 2: 东亚型处理组; 3: 西方型处理组。

图 1 Hp 超声裂解液处理胃癌 BGC-823 细胞 24 h 后, 细胞总 RNA 的凝胶电泳图

1.2.5 细胞转染 取每毫升 3×10^5 细胞悬液接种于 6 孔培养板内, 培养使细胞达到 90%~95% 的融合。溶液 1: 在 6 孔培养板每孔加入无血清 DMEM 培养基 240 μ L 和 10 μ L 的脂质体 2000(总体积 250 μ L, 温育 5 min); 溶液 2: Bcl-xl shRNA Plasmid DNA 2 μ g 溶于 250 μ L 的无血清 DMEM 培养基中; 空白照为 250 μ L 的无血清 DMEM 培养基; 阴性对照为 2 μ g Control shRNA Plasmid DNA 溶于 250 μ L 的无血清 DMEM 培养基中。参照说明书转染。转染后继续培养 24~72 h 检测转染水平。

1.2.6 转染水平检测

1.2.6.1 荧光定量 PCR 检测 Bcl-xl mRNA 水平表达 转染后 24 h, 提取细胞总 RNA, 反转录成 cDNA 进行荧光定量 PCR 检测(方法如 1.2.4)。

1.2.6.2 蛋白印迹法 提取转染后 72 h 的细胞的总蛋白, 蛋白上样量为 10 μ L, 将蛋白于 Bio-Rad 标记的转印仪上转移至 PVDF 膜上, BSA 封闭, Bcl-xl 单抗、山羊抗鼠 IgG 孵育, 发光剂孵育 5 min 后于成像系统上扫描, 以 β -actin 为内参, 测定其比值。

1.2.6.3 转染后 MTT 法检测细胞增殖 转染 24 h 后以每孔 1×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板, 每孔终体积为 200 μ L。培养 24 h 后换液开始实验。分别在 24、48 h 和 72 h 3 个时间段测 OD。

1.3 统计学处理 用 SPSS16.0 统计软件进行检验, 实验数

据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多个均数间比较, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hp 超声裂解液促进胃癌 BGC-823 细胞增殖 与对照组相比, 东亚型处理组细胞增值率为 29.7% ($P < 0.01$), 西方型处理组细胞增值率为 18.7% ($P < 0.01$); 与西方型处理组相比, 东亚型处理组细胞增值率为 11% ($P < 0.01$)。见图 2。

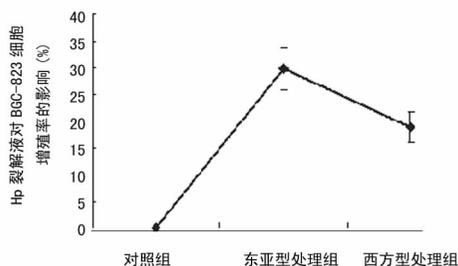
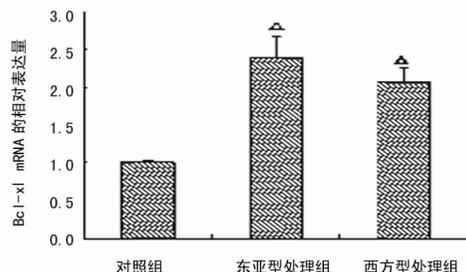


图 2 Hp 超声裂解液处理胃癌 BGC-823 细胞 24 h 后, MTT 法检测细胞增殖情况



Δ : $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 3 Hp 超声裂解液处理胃癌 BGC-823 细胞 24 h 后, 荧光定量 PCR 检测细胞中 Bcl-xl mRNA 水平的表达

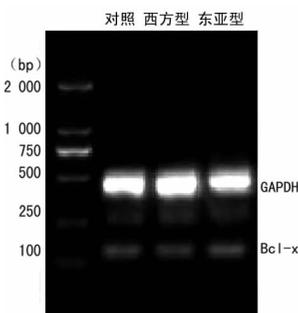
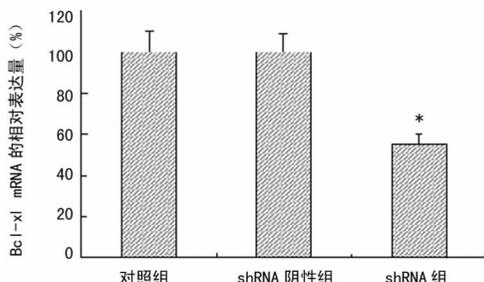


图 4 Bcl-xl 基因 RT-PCR 后的 2% 凝胶电泳图



*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 5 Bcl-xl shRNA 转染 BGC-823 细胞 24 h 后, Bcl-xl mRNA 的相对表达量 (%)

2.2 Hp 超声裂解液可以上调 BGC-823 细胞中 Bcl-xl mRNA

水平的表达 与对照组相比,东亚型处理组细胞中 Bcl-xl mRNA 水平上调了 2.39 倍($P < 0.01$),西方型处理组细胞中 Bcl-xl mRNA 水平上调了 2.06 倍($P < 0.01$);与西方型处理组相比,东亚型处理组细胞中 Bcl-xl mRNA 水平表达量更高($P < 0.05$).见图 3、4。

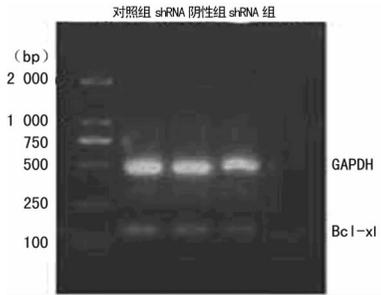


图 6 Bcl-xl 基因 RT-PCR 后的 2%凝胶电泳图

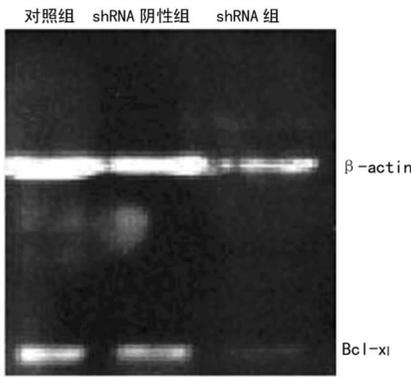
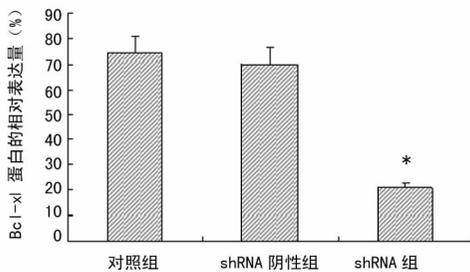
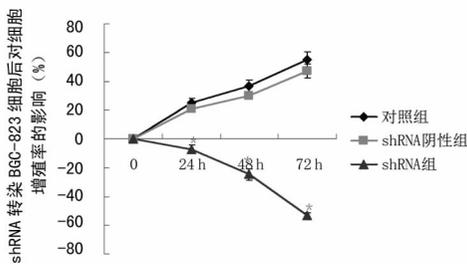


图 7 Bcl-xl shRNA 转染 BGC-823 细胞 72 h 后, Bcl-xl 蛋白的相对表达量的变化



*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 8 Bcl-xl shRNA 转染 BGC-823 细胞 72 h 后, Bcl-xl 蛋白的相对表达量的变化



*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 9 Bcl-xl shRNA 分别转染 BGC-823 细胞 24、48 h 及 72 h 后, MTT 法检测 BGC-823 细胞的增殖情况

2.3 Bcl-xl shRNA 可以沉默 Bcl-xl mRNA、蛋白的表达,并抑制 BGC-823 细胞的增殖 转染 24 h 后, Bcl-xl mRNA 水平明显的下调(图 5、6)。转染 72 h 后, Bcl-xl 蛋白表达水平也明显下调(图 7、8)。转染 24、48 h 和 72 h 后, BGC-823 细胞的增殖抑制率分别为 7.5%、24.7%、53%(均为 $P < 0.01$),见图 9。

3 讨论

Hp 的毒力因子 CagA 蛋白与胃癌的发生密切相关^[7-8]。CagA 蛋白主要有东亚型和西方型 2 种类型。研究显示,东亚型 CagA+Hp 与胃癌的发生关系更密切^[9]。在本研究中,分别用东亚型和西方型 CagA+Hp 超声裂解液处理胃癌 BGC-823 细胞,与对照组相比,处理组细胞均出现增殖,且东亚型处理组细胞增殖更显著,提示东亚型 CagA+Hp 比西方型 CagA+Hp 具有更强的生物活性。Bcl-xl 是一种抗凋亡基因,在肿瘤的发生发展过程中起着重要的作用。在线粒体凋亡途径中, Bcl-xl 通过抑制线粒体细胞色素 C 的释放,从而影响凋亡复合体的组装而发挥抗凋亡作用;在细胞表面的死亡受体介导的凋亡途径中, Bcl-xl 通过阻碍死亡复合体(DISC)的组装而发挥抗凋亡作用。Nardone 等^[10]临床标本研究发现, Hp 阳性患者中 Bcl-xl 基因的表达显著高于 Hp 阴性的患者中 Bcl-xl 基因的表达。Yang 等^[11]临床标本研究发现, CagA+Hp 患者中 Bcl-xl 基因的表达显著高于 CagA-Hp 的患者中 Bcl-xl 基因的表达。这说明 Hp 与 Bcl-xl 基因的表达有一定的相关性,且与 CagA 毒力因子有关。本研究分别用东亚型和西方型 CagA+Hp 超声裂解液处理胃癌 BGC-823 细胞,与对照组相比,处理组细胞均出现增殖,细胞中 Bcl-xl mRNA 的表达均出现上调,这提示 Bcl-xl 与胃癌 BGC-823 细胞的增殖有一定相关性。RNA 干扰技术已广泛应用于肿瘤的治疗研究中^[12-13]。许多体外研究也表明, Bcl-xl 特异性干扰 RNA 可以抑制人类肿瘤细胞的增殖^[14-15]。因此本研究用 Bcl-xl 特异性干扰 RNA 转染胃癌 BGC-823 细胞,观察其对胃癌 BGC-823 细胞的增殖的影响。将特异性 Bcl-xl shRNA 质粒转染胃癌 BGC-823 细胞,结果胃癌 BGC-823 细胞中 Bcl-xl mRNA 的表达以及蛋白的表达均显著降低,并且胃癌 BGC-823 细胞的增殖作用也有不同程度的降低。这说明胃癌 BGC-823 细胞的增殖与 Bcl-xl 基因的表达确有一定相关性。

本研究结果显示, Bcl-xl 基因在 Hp 感染相关性胃癌中扮演着重要的作用,尤其在 CagA+Hp 感染相关性胃癌中所起的作用更显著, Bcl-xl 特异的干扰 RNA 可以抑制胃癌 shRNA 细胞的增殖。因此, Bcl-xl 特异的干扰 RNA 或许可以作为治疗胃癌的方法。

参考文献:

- [1] Nagy TA, Wroblewski LE, Wang D, et al. β -Catenin and p120 mediate PPAR δ -dependent proliferation induced by Helicobacter pylori in human and rodent epithelia [J]. Gastroenterology, 2011, 141(2):553-564.
- [2] Wang F, Pan J, Luo L, et al. Chronic Helicobacter pylori infection induces the proliferation and apoptosis in gastric epithelial cells and gastric precancerosis in Mongolian gerbils [J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao; Yi Xue Ban, 2011, 36(9):865-871.
- [3] Chan SL, Yu VC. Proteins of the bcl-2 family in apoptosis

- signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, 31(3): 119-128.
- [4] Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(4): 1126-1132.
- [5] 吴莺, 张允历, 王文兵, 等. 不同地区幽门螺杆菌 *cagA* 基因羧基端可变区及其蛋白 EPIYA 基序的研究[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(27): 746-749.
- [6] Chen YC, Wang Y, Li JY, et al. *H. pylori* stimulates proliferation of gastric cancer cells through activating mitogen-activated protein kinase cascade[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(37): 5972-5977.
- [7] Tanaka H, Yoshida M, Azuma T. The role of *CagA* in *H. pylori* infection[J]. *Nihon Rinsho*, 2009, 67(12): 2245-2249.
- [8] Murata-Kamiya N. Pathophysiological functions of the *CagA* oncoprotein during infection by *Helicobacter pylori* [J]. *Microbes Infect*, 2011, 13(10): 799-807.
- [9] Yamaoka Y, Osato MS, Sepulveda AR, et al. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori*: separation of *H. pylori* from East Asian and non-Asian countries[J]. *Epidemiol Infect*, 2000, 124(1): 91-96.
- [10] Nardone G, Rocco A, Vaira D et al. Expression of COX-2, mPGE-synthase1, MDR-1(P-gp), and Bcl-xL: a molecular pathway of *H. pylori*-related gastric carcinogenesis [J]. *J Pathol*, 2004, 202(3): 305-312.
- [11] Yang GF, Deng CS, Xiong YY, et al. Expression of nuclear factor-kappa B and target genes in gastric precancerous lesions and adenocarcinoma: association with *Helicobacter pylori cagA*(+) infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(4): 491-496.
- [12] Uprichard SL. The therapeutic potential of RNA interference[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(26): 5996-6007.
- [13] Campeau E, Gobeil S. RNA interference in mammals: behind the screen[J]. *Brief Funct Genomics*, 2011, 10(4): 215-226.
- [14] Yang J, Sun M, Zhang A, et al. Adenovirus-mediated siRNA targeting Bcl-xL inhibits proliferation, reduces invasion and enhances radiosensitivity of human colorectal cancer cells[J]. *World J Surg Oncol*, 2011, 9: 117.
- [15] Mu P, Nagahara S, Makita N, et al. Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(12): 2978-2990.
- (收稿日期: 2012-03-19 修回日期: 2012-08-02)
-
- (上接第 3403 页)
- signal transduction: molecular specificity and functional flexibility[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(12): 970-982.
- [5] Bottinger EP, Bitzer M. TGF2beta signaling in renal disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(2): 2600-2610.
- [6] Phanish MK, Winn SK, Dockrell ME. Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2)-a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis [J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2010, 114(3): 83-92.
- [7] Chen XM, Qi W, Pollock CA. CTGF and chronic kidney fibrosis[M]. *Front Biosci: Schol Ed*, 2009: 132-141.
- [8] Kang DH, Kanellis J, Hugo C, et al. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(3): 806-816.
- [9] Maharaj AS, Saint-Geniez M, Maldonado AE, et al. Vascular endothelial growth factor localization in the adult [J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(2): 639-648.
- [10] Wang L, Kwak JH, Kim SI, et al. Transforming growth factor-beta1 stimulates vascular endothelial growth factor 164 via 3-p38alpha mitogen-activated protein kinase and p38delta mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in murine mesangial cells[J]. *Biol Chem*, 2004, 279(32): 33213-33219.
- [11] Chen S, Kasama Y, Lee JS, et al. Podocyte-derived vascular endothelial growth factor mediates the stimulation of alpha3(IV) collagen production by transforming growth factor-1 in mouse podocytes [J]. *Diabetes*, 2004, 53(11): 2939-2949.
- [12] Kim NH, Oh JH, Se JA, et al. Vascular endothelial growth factor(VEGF) and soluble VEGF receptor FLT-1 in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2005, 67(1): 167-171.
- [13] Affleck DG, Bull DA, Bailey SH, et al. PDGF(BB) increases myocardial production of VEGF: shift in VEGF mRNA splice variants after direct injection of bFGF, PDGF(BB), and PDGF(AB)[J]. *J Surg Res*, 2002, 107(2): 203-209.
- [14] Kang DH, Joly AH, Oh SW, et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model(I): Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin211[J]. *Am Soc Nephrol*, 2001, 12(7): 1434-1447.
- [15] 田河林, 韦立顺, 许忠新, 等. 糖尿病小鼠肾小球微血管密度与 VEGF 表达的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(2): 358-361.
- (收稿日期: 2012-04-07 修回日期: 2012-08-13)