

幽门螺杆菌对肝细胞系 HepG2 cyclinD1, PCNA mRNA 表达的影响

张 艳, 范学工, 田雪飞, 黄 燕

张艳, 范学工, 田雪飞, 黄燕, 中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008
张艳, 女, 1969-08-18 生, 湖南衡阳人, 汉族. 1992 年衡阳医学院本科毕业, 1999 年南华大学(原衡阳医学院)微生物学硕士研究生毕业, 现为湘雅医院传染病学 2001 级博士研究生. 主要从事幽门螺杆菌方面的研究.
国家自然科学基金资助项目, No.30271171
湖南省自然科学基金资助项目, No.01jyy2114
湖南省卫生厅科研基金资助项目, No.00022
项目负责人: 范学工, 410008, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院传染科.
xgfan@hotmail.com
电话: 0731-4328926 传真: 0731-4127332
收稿日期: 2003-04-15 接受日期: 2003-06-02

Influence of *H pylori* on cyclinD1 and PCNA mRNA expression in HepG2 cell line

Yan Zhang, Xue-Gong Fan, Xue-Fei Tian, Yan Huang

Yan Zhang, Xue-Gong Fan, Xue-Fei Tian, Yan Huang, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No.30271171, Nature Scientific Foundation of Hunan Province, No.01jyy2114, and the Scientific Research foundation of Health Department, Hunan Province, No.00022
Correspondence to: Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. xgfan@hotmail.com
Received: 2003-04-15 Accepted: 2003-06-20

Abstract

AIM: To observe the effects of *H pylori* on cyclinD1 and PCNA mRNA expression in a human hepatoma cell line HepG2.

METHODS: *H pylori* was co-cultured with HepG2 for 1, 3, 6, 12 and 24 hours. The cyclinD1 and PCNA mRNA expression was detected by semi-quantitative RT-PCR.

RESULTS: When HepG2 cells were cocultured with *H pylori* CagA⁺ strain, the amount of cyclinD1 mRNA was increased 4.0-fold by 3 hours and PCNA mRNA was increased 2.0-fold by 6 hours, compared with that of uninfected control. Neither cyclinD1 mRNA nor PCNA mRNA of the HepG2 cells was increased after incubation with *H pylori* CagA⁻ strain.

CONCLUSION: *H pylori* can induce increasing expression of cyclinD1 and PCNA mRNA in HepG2, which may play some roles in the development of hepatocellular carcinoma.

Zhang Y, Fan XG, Tian XF, Huang Y. Influence of *H pylori* on cyclinD1 and PCNA mRNA expression in HepG2 cell line. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(1):93-96

摘要

目的: 研究幽门螺杆菌(*H pylori*)处理对肝细胞系 HepG2

cyclinD1, PCNA mRNA 表达的影响.

方法: 将 *H pylori* 与 HepG2 共同培养 1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h, 采用半定量 RT-PCR 方法分析共培养不同时间后 HepG2 cyclinD1, PCNA mRNA 的表达水平.

结果: CagA⁺ *H pylori* 与 HepG2 细胞共同孵育 1 h 后, 即可见 cyclinD1 mRNA 表达升高, 3h 达高峰, 约为对照的 4.0 倍($P < 0.01$); 共同孵育 3 h 后即可见 PCNA mRNA 表达升高, 6 h 达高峰, 约为对照的 2.0 倍($P < 0.05$). 而 CagA⁻ *H pylori* 和 HepG2 细胞共同孵育后, 未见两基因的表达升高.

结论: CagA⁺ *H pylori* 能诱导 HepG2 cyclinD1, PCNA mRNA 表达升高, 提示其在肝癌的发生中起一定作用.

张艳, 范学工, 田雪飞, 黄燕. 幽门螺杆菌对肝细胞系 HepG2 cyclinD1, PCNA mRNA 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(1):93-96
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/93.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)在胃十二指肠疾病中的病因作用已得到人们的广泛共识^[1-17]. 近年的若干研究发现, *H pylori* 与某些肝脏疾病的发生相关^[18-23]. 我们新近的工作证实, 肝癌患者肝组织存在螺杆菌感染, 通过测序表明, 该螺杆菌 16SrDNA 与 *H pylori* 16SrDNA 具有 99% 的同源性^[24]. 我们采用体外肝细胞和 *H pylori* 共培养, 并测定 *H pylori* 作用后肝细胞系细胞周期素 D1(cyclinD1)和增生细胞核抗原(PCNA)mRNA 的表达, 以进一步探讨 *H pylori* 在肝癌发生中的可能作用.

1 材料和方法

1.1 材料 ATCC49503(CagA⁺)为本室保存的 *H pylori* 国际标准株, CC020821 为临床株, 由本室鉴定为 CagA⁺. 人肝细胞系 HepG2 购自上海细胞生物研究所. *H pylori* 菌株培养按我室建立的 *H pylori* 培养方法进行^[25]. 3 d 后收集细菌, 用 0.01 mol/L PBS 洗下菌落, 紫外分光光度仪测定细菌浓度($1A_{660} \approx 1 \times 10^{11}$ CFU/L), 用含 20 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基(不加双抗)调 *H pylori* 终浓度为 1×10^{11} CFU/L. HepG2 采用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 °C、50 mL/L CO₂ 温箱培养, 2-4 d 更换培养基 1 次, 1:3 常规传代培养, 取对数生长期细胞进行实验.

1.2 方法 *H pylori* 与 HepG2 的共同孵育. 细胞以 1×10^6 /孔密度接种至 6 孔细胞培养板, 置于 37 °C, 50 mL/L CO₂ 环境中培养 24 h, 弃去原有细胞培养液, 加入 DMEM 培养基稀释的 *H pylori* 菌液, 使细菌与细胞数之比为 100 : 1. 对照孔不加细菌, 只加含 20 mL/L 胎牛血清的 DMEM. 分别于 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h 收集细胞, 收集之前用预冷 PBS 洗 3 次. 每个时间点重复 4 孔. 细胞总 RNA 的提取按 Trizol(Gibco)RNA 提取试剂盒说明进行操作, 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, A260/A280 比值均在 1.8-2.0 之间, -70 °C 冰箱保存. PCR 引物根据 GenBank 中人 cyclinD1, PCNA, β -actin cDNA 序列进行设计, 由上海 Sangon 生物工程公司合成(表 1). 逆转录合成 cDNA 第一链: 每个反应管加 2 μ g 总 RNA, Oligo(dT)₁₅ 1 μ L, 用 DEPC 水补至总体积 12 μ L 后, 70 °C 5 min, 冰上骤冷后加入 5 \times buffer 4 μ L, 20 MU/L RNA 酶抑制剂 1 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, 200 MU/L M-MuLV 1 μ L 200MU/L, 37 °C 保温 1 h 后, 94 °C 灭活 5 min,

冰上骤冷后进行 PCR 或 -20 °C 保存. PCR 扩增反应总体积 50 μ L, 其中 10 \times Buffer 5 μ L, 4 种 dNTP 各 200 μ mol/L, Tag 酶 1 U, cyclinD1 及 β -actin, PCNA 及 β -actin 引物各 0.5 μ mol/L, 模板 cDNA 5 μ L, 余下体积用无菌双蒸水补足. 在 DNA 扩增仪(PE480)上 94 °C 预变性 4 min 后进行扩增, 最后 72 °C 延伸 5 min. 取 PCR 产物 5 μ L 在 15 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 溴化乙锭)上电泳, 紫外照相, 应用美国 Stralagene 公司 Eagle Eye II 图像分析处理系统对电泳带密度进行扫描, 获各条带光密度, 然后算出每一种基因的相对表达水平. 计算式如下: 某基因的相对表达水平 = 该基因 RT-PCR 产物电泳条带的密度 / β -actin RT-PCR 产物电泳条带的密度.

统计学处理 实验数据 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数比较用单因素方差分析(one-way ANOVA), 多个实验组与一个对照组的两两比较用最小显著差法(the least significant difference, LSD)分析. 全部资料上机经 SPSS 软件包处理, $P < 0.05$ 为统计学上差异有显著性.

表 1 PCR 引物序列、反应条件及扩增的目的片段大小

基因	引物序列	PCR 反应条件	目的片段大小
cyclinD1	TGGATGCTGGAGGTCTGCGAGGAA	94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min 35 cycle	573 bp
	GGCTTCGATCTGCTCCTGGCAGGC		
PCNA	GCTGACATGGGACACTTA	94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min 35 cycle	610 bp
	CTCAGGTACAACTTGGTG		
β -actin	CCAGCCATGTACGTTGCTATC	94 °C 1 min, 55 °C 或 56 °C 1 min, 72 °C 1 min 35 cycle	150 bp
	CAGGTCCAGACGCAGGATGGC		

2 结果

2.1 cyclinD1 mRNA 表达 未经 *H pylori* 处理时, HepG2 cyclinD1 mRNA 有较弱表达. 将每一泳道中 cyclinD1 及 β -actin 基因 PCR 扩增条带进行凝胶扫描后图像分析发现, 加入 CagA⁺ *H pylori* 与细胞共同孵育 1 h 后, 即可见 cyclinD1 mRNA 表达升高, 3 h 达高峰, 约为对照的 4.0 倍($\bar{x} \pm s$ 分别为 0.98 ± 0.04 , 0.24 ± 0.02 , $P < 0.01$). 而 CagA⁻ *H pylori* 菌液和 HepG2 细胞共同孵育后, 未见 cyclinD1 mRNA 表达升高(图 1, 3).

2.2 PCNA mRNA 表达 未经 *H pylori* 处理时, HepG2 PCNA mRNA 有表达. 将每一泳道中 PCNA 及 β -actin 基因 PCR 扩增条带进行凝胶扫描后图像分析发现, 加入 CagA⁺ *H pylori* 与细胞共同孵育 3 h 后, 即可见 PCNA mRNA 表达升高, 6 h 达高峰, 约为对照的 2.0 倍($\bar{x} \pm s$ 分别为 1.04 ± 0.06 , 0.54 ± 0.02 , $P < 0.05$). 用 CagA⁻ *H pylori* 处理后未见 PCNA mRNA 表达升高(图 2, 4).

随着处理时间的延长, cyclinD1、PCNA mRNA 表达量呈一下降趋势.

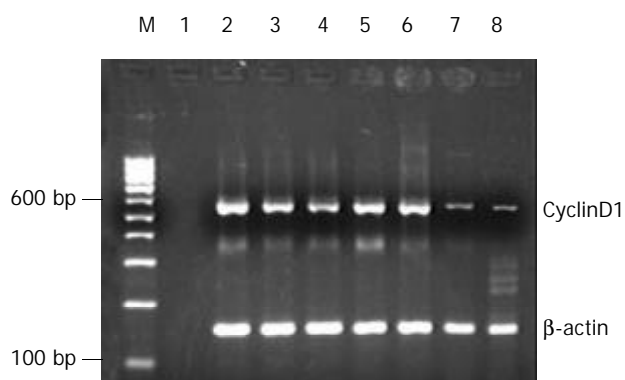


图 1 RT-PCR 扩增 HepG2 cyclinD1 mRNA 表达结果. M: 100 bp 相对分子质量参照标准; 1: 阴性对照; 2-6: CagA⁺ *H pylori* 处理后 24 h, 12 h, 6 h, 3 h, 1 h; 7: CagA⁻ *H pylori* 处理; 8: 未处理 HepG2 细胞.

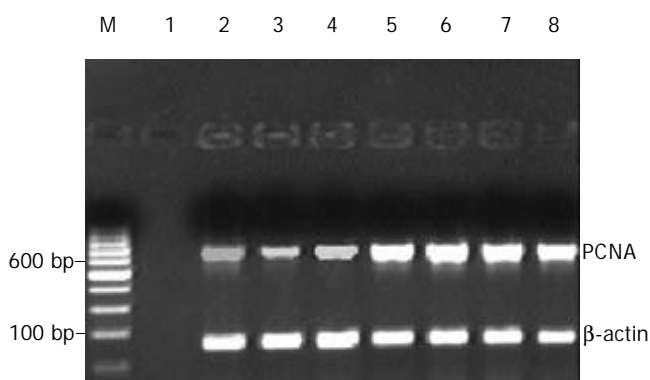


图 2 RT-PCR 扩增 HepG2 PCNA mRNA 表达结果. M: 100 bp 相对分子质量参照标准; 1: 阴性对照; 2: 未处理 HepG2 细胞; 3: CagA⁺ *H pylori* 处理; 4-8: CagA⁺ *H pylori* 处理后 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h,

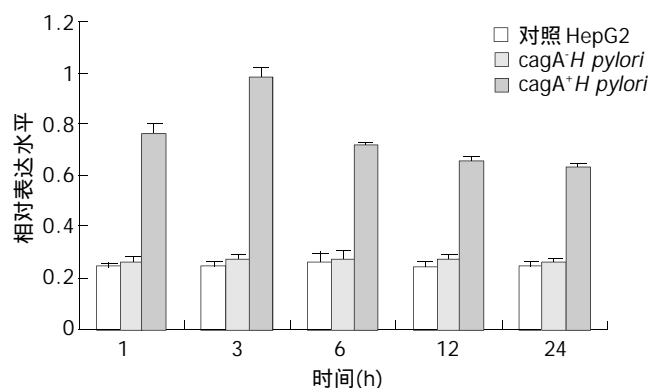


图3 H pylori 对 HepG2 cyclinD1 mRNA 表达的影响.

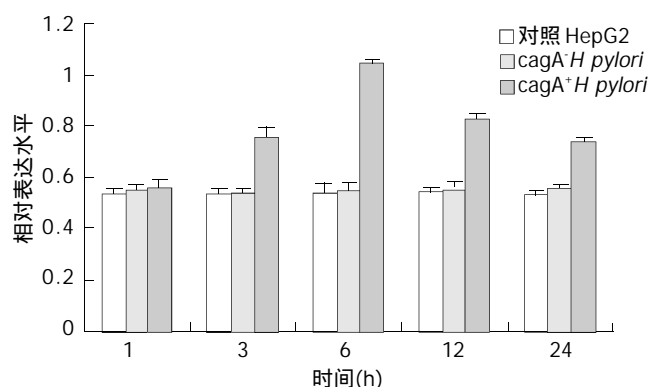


图4 H pylori 对 HepG2 PCNA mRNA 表达的影响.

3 讨论

近年来, 螺杆菌感染与人和动物胃、肝、肠疾病的关系愈来愈引起相关领域学者们的兴趣和重视. H pylori 作为人消化性溃疡、慢性胃炎的主要病因已被确认, 其与胃癌的密切关系亦为许多研究所肯定. H pylori 与肝脏疾病是否有关以及是否引起肝细胞损伤亦引起了研究者的关注. Ponzetto et al^[20, 26]研究发现, HBV, HCV 感染者 H pylori IgG 抗体阳性率明显高于对照组. Dore et al^[27]报道肝硬化患者 H pylori 血清 IgG 阳性率比无症状的献血者要高. 我们曾报道, 慢性乙型肝炎患者的 H pylori 感染率要显著高于一般人群, 且感染 H pylori 的乙肝患者 HBV DNA 复制水平明显增高^[28]. 国外学者在慢性胆囊炎、原发性硬化性胆管炎(PSC)、原发性胆汁性肝硬化(PBS)、原发性胆管癌和原发性肝癌患者的胆汁、胆囊和肝组织中均检测到了螺杆菌 16SrDNA, 测序证明与 H pylori 有 97-99% 同源性^[18-23]. 新近, 我们亦从 9 例(9/15)原发性肝癌患者的肝组织中发现了螺杆菌 16SrDNA, 测序证明与 H pylori 16SrRNA 有 99% 同源性^[24]. Wadstrom et al^[29]还用电子镜和免疫组化方法在原发性硬化性胆管炎(PSC)患者的肝组织中观察到似 H pylori 形态的弯曲状细菌. de Magalhães Queiroz et al^[30]从 1 例肝豆状核变性患者的肝硬化标本中分离出的 1 株螺杆菌菌株的 16SrRNA 与 H pylori 有 99.38% 的同源性, 并且经过形态特征、生化反应等鉴定认为该菌株就是 H pylori, 推测定植于胃部的 H pylori 可能会从十二指肠逆行转移

到肝脏或从肠腔迁移到门脉循环. 新近, 瑞典学者在用 3 种不同的 H pylori 菌株感染 C57BL/6 和 Balb/cA 小鼠诱发胃 MALT 淋巴瘤的同时, 发现感染后 23 mo 有 1 例 C57BL/6 小鼠诱发出了肝癌^[31]. 肝组织螺杆菌感染是部分病因不明慢性肝病患者的病因亦或重叠螺杆菌感染? 迄今为止, 有关人类螺杆菌感染与肝胆疾病的因果关系尚缺乏系统和肯定的报道.

cyclinD1 是细胞周期 G1/S 期监控点重要的正向调控因子, cyclinD1 的作用是使 Rb 蛋白磷酸化而导致他与转录因子 E2F 的解离, 而发挥 E2F 转录因子的作用, 使细胞周期通过 G1 限制点进入 S 期, 导致细胞增生. 近年来, 有不少研究表明 cyclinD1 基因参与肿瘤的发生、发展, 并认为是一种原癌基因, 在进展期肝癌中发现有 cyclinD1 的过量表达, 提示 cyclinD1 的过量表达与肝癌进展有关. PCNA 是 DNA 多聚酶的一种辅助蛋白, 在静止期细胞中, 其量很少, 于 G1 晚期开始增加, S 期达到高峰, G2, M 期明显下降, 他的出现与细胞增生有关, 是反映细胞增生状态、评价肿瘤恶性潜能的主要生物学指标. 我们发现, CagA⁺ H pylori 对 HepG2 细胞的 cyclinD1 和 PCNA mRNA 的表达有明显的上调作用. CagA⁺ H pylori 作用 1 h 后, HepG2 cyclinD1 mRNA 表达升高, 3 h 达高峰, 约为正常的 4.0 倍; 在 CagA⁺ H pylori 作用 3 h 后 HepG2 PCNA mRNA 表达增加, 6 h 达表达高峰, 约为正常的 2.0 倍, 而 CagA⁻ H pylori 未显示这一作用. 这些结果表明, CagA⁺ H pylori 确能促进 HepG2 cyclinD1 和 PCNA mRNA 的表达. 由于 cyclinD1 和 PCNA 是肿瘤发生、发展的重要生物学指标, 因而我们认为 H pylori 的 CagA 毒力因子在肝癌的发生上可能起一定作用.

4 参考文献

- Wang RT, Wang T, Chen K, Wang JY, Zhang JP, Lin SR, Zhu YM, Zhang WM, Cao YX, Zhu CW, Yu H, Cong YJ, Zheng S, Wu BQ. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: evidence from a retrospective cohort study and nested case-control study in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:1103-1107
- Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
- Miehlke S, Kirsch C, Dragosics B, Gschwantler M, Oberhuber G, Antos D, Dite P, Lauter J, Labenz J, Leodolter A, Malfertheiner P, Neubauer A, Ehninger G, Stolte M, Bayerdorffer E. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: current status of the Austrain Czech German gastric cancer prevention trial (PRISMA Study). *World J Gastroenterol* 2001;7:243-247
- Hobsley M, Tovey FI. *Helicobacter pylori*: the primary cause of duodenal ulceration or a secondary infection? *World J Gastroenterol* 2001;7:149-151
- Gao HJ, Yu LZ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Miu K, Lü XZ, Zhang XY, Zhao ZQ. Multiple genetic alterations and behavior of cellular biology in gastric cancer and other gastric mucosal lesions: *H pylori* infection, histological types and staging. *World J Gastroenterol* 2000;6:848-854
- Gao H, Wang JY, Shen XZ, Liu JJ. Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric epithelial cell proliferation. *World J Gastroenterol* 2000;6:442-444
- Zhuang XQ, Lin SR. Research of *Helicobacter pylori* infection in precancerous gastric lesions. *World J Gastroenterol* 2000;6:428-429

8

Cai L, Yu SZ, Zhang ZF. *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer in Changle County, Fujian Province, China. *World J Gastroenterol* 2000;6:374-376

9

Pace F, Porro GB. Gastroesophageal reflux and *Helicobacter pylori*: a review. *World J Gastroenterol* 2000;6:311-314

10

Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000;6:20-31

11

Zhang H, Jiang SL, Yao XX. Study of T-lymphocyte subsets, nitric oxide, hexosamine and *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic gastric diseases. *World J Gastroenterol* 2000;6:601-604

12

Lu XL, Qian KD, Tang XQ, Zhu YL, Du Q. Detection of *H pylori* DNA in gastric epithelial cells by in situ hybridization. *World J Gastroenterol* 2002;8:305-307

13

Lai YC, Wang TH, Huang SH, Yang SS, Wu CH, Chen TK, Lee CL. Density of *Helicobacter pylori* may affect the efficacy of eradication therapy and ulcer healing in patients with active duodenal ulcers. *World J Gastroenterol* 2003;9:1537-1540

14

Xia HH, Lam SK, Wong WM, Hu WH, Lai KC, Wong SH, Leung SY, Yuen ST, Wright NA, Wong BC. Antralization at the edge of proximal gastric ulcers: does *Helicobacter pylori* infection play a role? *World J Gastroenterol* 2003;9:1265-1269

15

Hu GY, Yu BP, Dong WG, Li MQ, Yu JP, Luo HS, Rang ZX. Expression of TFF2 and *Helicobacter pylori* infection in carcinogenesis of gastric mucosa. *World J Gastroenterol* 2003;9:910-914

16

Guo XL, Wang LE, Du SY, Fan CL, Li L, Wang P, Yuan Y. Association of cyclooxygenase-2 expression with Hp-cagA infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:246-249

17

Lan J, Xiong YY, Lin YX, Wang BC, Gong LL, Xu HS, Guo GS. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. *World J Gastroenterol* 2003;9:54-58

18

Nilsson HO, Taneera J, Castedal M, Glatz E, Olsson R, Wadstrom T. Identification of *Helicobacter pylori* and other *Helicobacter* species by PCR, hybridization, and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis. *J Clin Microbiol* 2000;38:1072-1076

19

Avenaud P, Marais A, Monteiro L, Le Bail B, Bioulac Sage P, Balabaud C, Mégraud F. Detection of *Helicobacter* species in the liver of patients with and without primary liver carcinoma. *Cancer* 2000;89:1431-1439

20

Ponzetto A, Pellicano R, Leone N, Cutufia MA, Turrini F, Grigioni WF, D' Errico A, Mortimer P, Rizzetto M, Silengo L. *Helicobacter* infection and cirrhosis in hepatitis C virus carriage: is it an innocent bystander or a troublemaker? *Med Hypotheses* 2000;54:275-277

21

Nilsson HO, Mulchandani R, Tranberg K, Wadstrom T. *Helicobacter* species identified in liver from patients with cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2000;120:323-324

22

Nilsson HO, Castedal M, Olsson R, Wadstrom T. Detection of *Helicobacter* in the liver of patients with chronic cholestatic liver diseases. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:875-882

23

Fallone CA, Tran S, Semret M, Discepola F, Behr M, Barkun AN. *Helicobacter* DNA in bile: correlation with hepato-biliary diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:453-458

24

Fan XG, Peng XN, Huang Y, Yakoob J, Wang ZM, Chen YP. *Helicobacter* species ribosomal DNA recovered from the liver tissue of chinese patients with primary hepatocellular carcinoma. *Clin Infect Dis* 2002;35:1555-1557

25

Fan XG, Chua A, Li TG, Zeng QS. Survival of *Helicobacter pylori* in milk and tap water. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:1096-1098

26

Ponzetto A, Pellicano R, Leone N, Berrutti M, Turrini F, Rizzetto M. *Helicobacter pylori* seroprevalence in cirrhotic patients with hepatitis B virus infection. *Neth J Med* 2000;56:206-210

27

Dore MP, Realdi G, Mura D, Graham DY, Sepulveda AR. *Helicobacter* infection in patients with HCV-related chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2002;47:1638-1643

28

Fan XG, Zou YY, Wu AH, Li TG, Hu GL, Zhang Z. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with hepatitis B. *Br J Biomed Sci* 1998;55:176-178

29

Wadstrom T, Ljungh A, Willen R. Primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis are of infectious origin. *Gut* 2001;49:454

30

de Magalhaes Queiroz DM, Santos A. Isolation of a *Helicobacter* strain from the human liver. *Gastroenterology* 2001;121:1023-1024

31

Wang X, Willen R, Svensson M, Ljungh A, Wadstrom T. Two-year follow-up of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 and Balb/cA mice. *APMIS* 2003;111:514-522

2002 年度医学 SCI 论文的高产机构

排名	单位	论文篇数	排名	单位	论文篇数
1	北京大学	108	11	中山大学	38
2	复旦大学	86	12	第四军医大学西京医院	37
3	中科院上海生命科学院	79	13	第二军医大学	33
4	浙江大学	61	14	中南大学	32
5	中山大学附 1 院	52	15	北京大学附 1 院	30
6	解放军总医院	50	15	沈阳药科大学	30
7	上海第二医科大学瑞金医院	46	15	四川大学	30
8	中国药科大学	44	18	复旦大学中山医院	29
9	第四军医大学	39	19	四川大学华西医院	28
9	华中科技大学同济医院	39	20	第一军医大学南方医院	26