

幽门螺杆菌对人肝细胞系 HepG2 细胞蛋白质组的影响

张 艳, 范学工, 陈 仁, 刘健平, 李 宁

张艳, 范学工, 陈仁, 李宁, 中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008
刘健平, 中南大学湘雅医学院分析测试中心 湖南省长沙市 410078
张艳, 女, 1969-08-18 生, 湖南省衡阳市人, 汉族. 1999 年南华大学医学微生物学硕士, 现为湘雅医院传染病学 2001 级博士, 副教授. 主要从事幽门螺杆菌方面的研究.

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: 0731-4327392 传真: 0731-4327332

收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-03-04

Effect of *Helicobacter pylori* on HepG2 proteome

Yan Zhang, Xue-Gong Fan, Ren Chen, Jian-Ping Liu, Ning Li

Yan Zhang, Xue-Gong Fan, Ren Chen, Ning Li, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Jian-Ping Liu, Analytical Testing Center, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China

Correspondence to: Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. xgfan@hotmail.com

Received: 2004-01-15 Accepted: 2004-03-04

Abstract

AIM: To further explore the pathological effect mechanism of *H pylori* on human hepatoma cells, and to analyze the differences on the protein expression in HepG2 induced by *H pylori* preliminarily.

METHODS: *H pylori* was co-cultured with HepG2 for 6 h. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) was used to screen protein patterns of control and *H pylori*-treated HepG2 for quantitative and qualitative analyses in protein expression.

RESULTS: 988 ± 94 spots were detected in control HepG2 cells and 996 ± 68 spots were detected in *H pylori*-treated HepG2 cells. A match rate 86.4% was achieved. The results also showed that 18 proteins spots displayed quantitative changes in expression after *H pylori* treatment ($P < 0.05$), of which, 10 (M_r/pI : 91 326/6.21, 90 640/6.68, 87 833/5.65, 81 139 /6.55, 63 805/6.24, 60 445/7.38, 47 592/5.28, 46 293/7.21, 43 415/7.64, 21 704/5.66) were enhanced in abundance and 8 (M_r/pI : 70 839/7.02, 56 403/6.58, 44 076/6.86, 43 744/7.21, 42 497/6.64, 37 567/7.17, 22 342/7.49, 21 112/5.63) showed lower expression.

CONCLUSION: There is a significant difference at protein level between control and *H pylori*-treated HepG2. These proteins may be involved in the pathological process of *H pylori* on HepG2. It suggests that the differential expression analysis of proteomes may be useful to further study of the relation of *H pylori* and human liver diseases.

Zhang Y, Fan XG, Chen R, Liu JP, Li N. Effect of *Helicobacter pylori* on HepG2 proteome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1325-1328

摘要

目的: 初步观察 *H pylori* 对人肝细胞系 HepG2 蛋白质的差异表达, 为进一步探讨 *H pylori* 对肝细胞的病理作用机制奠定基础.

方法: 将 *H pylori* 与 HepG2 共同培养 6 h, 采用双向电泳技术, 对 *H pylori* 处理和未处理 HepG2 细胞蛋白质进行分离和比较分析.

结果: 图像分析检测到 *H pylori* 处理前后 HepG2 2-DE 图谱的平均蛋白质点数分别为 988 ± 94 个、 996 ± 68 个, 蛋白质点的匹配率为 86.4%. 发现对照和 *H pylori* 处理 HepG2 蛋白表达有明显差异, 主要是蛋白表达量的增加和减少, 其中在 *H pylori* 处理后有 10 种蛋白(M_r/pI : 91 326/6.21, 90 640/6.68, 87 833/5.65, 81 139 /6.55, 63 805/6.24, 60 445/7.38, 47 592/5.28, 46 293/7.21, 43 415/7.64, 21 704/5.66) 表达增强, 8 种蛋白(M_r/pI : 70 839/7.02, 56 403/6.58, 44 076/6.86, 43 744/7.21, 42 497/6.64, 37 567/7.17, 22 342/7.49, 21 112/5.63) 表达降低.

结论: *H pylori* 处理前后 HepG2 的蛋白质组具有差异, 这些差异表达的蛋白质可能参与了 *H pylori* 对肝细胞的病理作用过程, 这种蛋白质组的差异分析有助于进一步研究 *H pylori* 与人类肝脏疾病的关系.

张艳, 范学工, 陈仁, 刘健平, 李宁. 幽门螺杆菌对人肝细胞系 HepG2 细胞蛋白质组的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1325-1328

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1325.asp>

0 引言

近年的许多研究表明, 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)除引起胃肠疾病外, 还与人类某些肝脏疾病的发生相关^[1-22]. 本课题组前期的研究工作证实, 肝癌患者肝组织存在螺杆菌感染, 通过测序表明, 该螺杆菌 16S rDNA 与 *H pylori* 16S rDNA 具有 99% 的同源性^[23-25]. 我们近期的研究结果亦表明, *cagA*⁺*H pylori* 与体外肝细胞共培养时可引起肝细胞系 HepG2 细胞周期素 D1 (cyclin D1)、增生细胞核抗原(PCNA)和 *c-fos* 原癌基因的表达增加. 为了进一步探讨 *H pylori* 对肝细胞的病理作用, 我们应用高信息量、高分辨率的蛋白质组学技术, 观察 *H pylori* 处理后 HepG2 细胞蛋白质表达谱的

变化,通过对差异表达蛋白质的分析,为进一步阐明 *H pylori* 在肝脏疾病发生、发展中的可能作用提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝细胞系 HepG2 购自上海细胞生物研究所, *H pylori* 标准株 ATCC49503(cagA⁺)为本室保存^[26]。固相 pH 梯度干胶条(IPGstrip pH3-10L, 18 cm)、IPG 缓冲液(pH3-10L)、覆盖液均为 Pharmacia 公司产品;二硫苏糖醇(DTT)、硫脲、碘乙酰胺均为 Sigma 公司产品;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素、甘氨酸、Tris、CHAPS、SDS、硝酸银、硫代硫酸钠均为 Amresco 公司产品;低M_r标准蛋白质购自上海伯奥生物制品公司。所有溶液均用双蒸水配制。IPGphor 等电聚焦仪(Pharmacia 公司);ProTEAN II 垂直电泳槽、MODEL 1000/5000 电泳仪、GelDoc2000 凝胶扫描仪(Bio-Rad 公司);ImageMaster 2D Elite(3.01 版)分析软件(Pharmacia 公司)。

1.2 方法 HepG2 细胞采用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 °C, 50 mL/L CO₂ 温箱传代培养,取对数生长期细胞进行实验。*H pylori* 菌株按我室建立的方法进行培养^[27]。3 d 后收集细菌,用 0.01 mol/L PBS 洗下菌落,4 000 r/min × 10 min 离心沉淀,沉淀重悬于含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基(不加双抗),调 *H pylori* 终浓度为 1 × 10¹¹ CFU/L。*H pylori* (2 × 10⁸ CFU)加入细胞(2 × 10⁶)中,使细菌与细胞数之比为 100:1。空白对照孔不加细菌,只加含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM,共培养 6 h 后用胰酶消化收集细胞。细胞沉淀中加入 200 μL 细胞裂解液(8 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 40 g/L CHAPS, 40 mmol/L Tris, 65 mmol/L DTT, 5 mmol/L PMSF),静置 30 min,15 000 r/min 4 °C 离心 30 min,上清液即为细胞总蛋白。取少量上清液用 Bradford 法测定总蛋白质浓度,其余样品冻存于 -80 °C 备用。IPG-DALT 主要按 Gorg et al^[28] 的方法和 IPGphor 等电聚焦系统指南进行。细胞总蛋白提取物(300 μg)与水化液(8 mol/L urea, 20 g/L CHAPS, 18 mmol/L DTT, 5 mL/L IPG 缓冲液 pH3-10 L, 痕量溴酚蓝)充分混合,总体积 350 μL 吸入 IPGstrip 持胶槽,加入 IPG 干胶条,覆盖一层矿物油以防样品液蒸发,水化和等电聚焦在 20 °C 自动进行,总电压时间积为 41 920 Vh。等电聚焦结束后,IPG 胶条在平衡液 A (50 mmol/L Tris-HCL pH8.8, 6 mol/L urea, 300 mL/L 甘油, 20 g/L SDS, 2 g/L DTT, 痕量溴酚蓝)中平衡 15 min,后于平衡液 B (以 30 g/L 碘乙酰胺替换 2 g/L DTT)中平衡 15 min。平衡好的胶条转移至 0.75 mm 厚的 125 g/L 的 SDS-PAGE 均匀分离胶顶端,排除气泡后用 10 g/L 琼脂糖封固,15 °C 循环水冷却,先以 20 mA/2 块胶恒流电泳,20 min 后换用 40 mA/2 块胶恒流电泳,溴酚蓝到达距胶底边 1 cm 处停止电泳。银染按蛋白质银染操作手册进行^[29]。银染显色的凝胶通过 GelDoc 2000 凝胶成像系统获取图像,用 ImageMaster2D

Elite(3.01 版)分析软件对图像进行消减、斑点检测、匹配、量化、获取斑点位置坐标等分析。斑点位置的重复性按 Corbett et al^[30] 的方法进行计算。

统计学处理 所有数据的统计分析在 SPSS for Windows 10.0 软件和 Excel 上进行。

2 结果

2.1 双向电泳图谱及分辨率 3 次重复结果统计显示,对照可分辨蛋白质点为 988 ± 94 个(图 1A),*H pylori* 处理组可分辨蛋白质点为 996 ± 68 个(图 1B)。这些蛋白质等电点和 M_r 分布范围较广,但主要分布在等电点为 4-8, M_r 为 31 000-97 000 道尔顿(Da)的范围。以 A 胶为参考胶, B 胶与之匹配,其匹配率为 86.4%,图 2 为 A, B 胶的匹配图。任意选取 20 个在对照和 *H pylori* 处理组凝胶图谱中相互匹配、分辨清楚的蛋白质点进行位置重复性分析,发现 IEF 方向的平均偏差为 (2.82 ± 0.13 mm), SDS-PAGE 方向的平均偏差为 (2.97 ± 0.34 mm),表明蛋白质点在位置上具有较好的重复性。以上条件能满足两组细胞间的差异蛋白质分析。

2.2 蛋白质组的表达变化 通过 ImageMaster2D Elite 软件匹配分析,发现 10 种蛋白在 *H pylori* 处理后表达水平明显升高(图 1A 中标号为 1-10 的蛋白质点),8 种蛋白在 *H pylori* 处理后表达水平明显下降(图 1A 中标号为 A-H 的蛋白质点),部分差异蛋白点的放大图谱如图 3;差异蛋白点的等电点、M_r 和蛋白增减量详见表 1, 2。

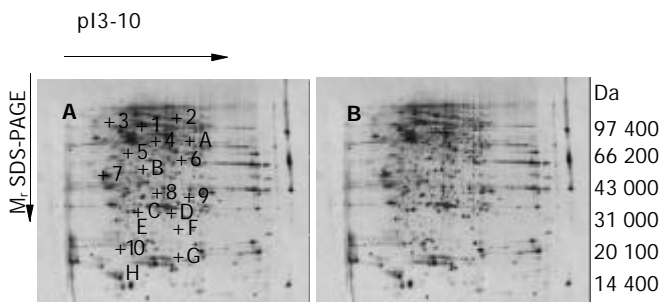


图 1 对照 HepG2. A: 与 *H pylori* 处理 HepG2; B: 蛋白双向电泳图。

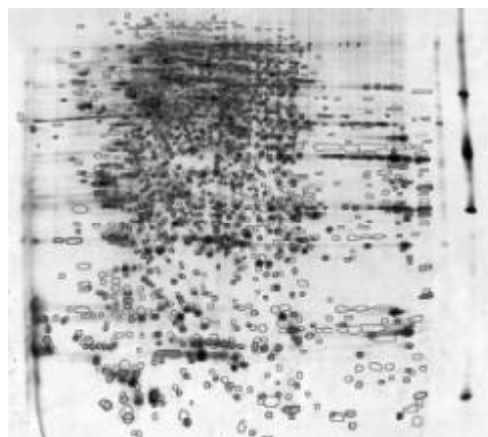


图 2 A, B 胶匹配图(红色和蓝色圆圈分别代表图 1A 和图 1B 上的蛋白质点)。

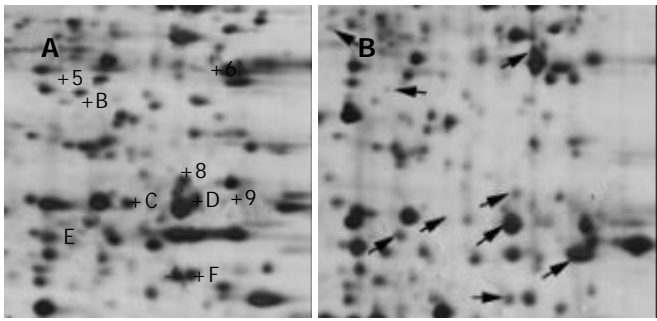


图3 部分差异蛋白质点的放大图谱. A: 对照 HepG2; B: H pylori 处理 HepG2(箭头所示为与 A 图中相对应的蛋白质点).

表1 H pylori 处理后表达增强的蛋白质点

点号	等电点(pI)	分子量(M _r /Da)	增加量(%)
1	6.21	91 326	158.42
2	6.68	90 640	437.10
3	5.65	87 833	211.37
4	6.55	81 139	30.62
5	6.24	63 805	161.79
6	7.38	60 445	720.60
7	5.28	47 592	135.66
8	7.21	46 293	136.23
9	7.64	43 415	1 177.77
10	5.66	21 704	209.68

表2 H pylori 处理后表达减弱的蛋白质点

点号	等电点(pI)	分子量(M _r /Da)	减少量(%)
A	7.02	70 839	86.15
B	6.58	56 403	90.31
C	6.86	44 076	77.92
D	7.21	43 744	70.37
E	6.64	42 497	70.95
F	7.17	37 567	74.19
G	7.49	22 342	70.23
H	5.63	21 112	83.56

3 讨论

HepG2 细胞来源于人肝胚胎瘤细胞, 具备人肝细胞绝大多数的生物学功能和生化功能特征. 与人肝细胞相比, HepG2细胞更容易获得, 并能传代培养, 因此常用其替代肝细胞作相关研究^[31].

近年来蛋白质组学技术飞速发展, 高通量、高灵敏性和高分辨率的分离与分离后鉴定技术, 加之准确而全面的数据库, 使蛋白质组学技术在生物医学的研究中发挥着十分重要的作用^[32]. 运用蛋白质组的研究手段, 通过比较正常、病理状态下和给予药物后组织或细胞中蛋白质在表达数量、表达位置和修饰状态上的差异, 则可发现与这种病理状态相关的蛋白质、疾病的

特异蛋白质, 探索药物作用的蛋白靶点^[33-37].

当今用于蛋白质组研究的主要技术是固相 pH 梯度等电聚焦双向凝胶电泳技术^[28, 38]. 重复性问题是双向凝胶电泳中的关键问题, 从细胞培养、样品制备、双向电泳到染色显影, 其中任何一个环节都有可能造成蛋白斑点的量及其在胶中位置的变化, 从而可能造成一些蛋白斑点的不匹配, 因而在这些过程中应尽量保持其同一性. 我们通过反复实践与摸索, 已成功地建立了分辨率高、重复性好的固相 pH 梯度双向凝胶电泳方法^[39], 为本实验进行 H pylori 处理 HepG2 与对照 HepG2 细胞间的蛋白质组差异分析提供了有利的条件. 通过对银染图像严格的图像分析及处理(图像获取、背景消减、斑点识别及斑点匹配等), ImageMaster2D Elite 软件匹配分析显示, 两组细胞的蛋白质谱中大部分的蛋白质表达无明显差异, 其匹配率平均为 86.4%, 尚有 14% 左右的点不能匹配. 我们发现 HepG2 细胞在用 H pylori 处理后其蛋白表达有不少差异点出现, 其中至少有 18 种蛋白质发生了明显和稳定的量的改变(P < 0.05). 这些差异蛋白质可能参与了 H pylori 对肝细胞的病理作用过程. 这些蛋白的 M_r 和等电点已经初步确定, 但他们是已知结构蛋白还是尚未发现的新蛋白, 还需进行进一步地识别和确认, 包括质谱鉴定、氨基酸序列分析以及上网数据库查询等.

我们前期的研究表明, cagA⁺ H pylori 可以引起 HepG2 细胞细胞周期素 D1(cyclin D1)、增生细胞核抗原(PCNA)和原癌基因 c-fos 的表达异常, 此项实验中所呈现的差异蛋白是否为上述与细胞周期、细胞增生以及细胞癌变有关的蛋白, 以及 H pylori 作用于细胞后怎样导致这些蛋白质的改变尚有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Solnick JV, Schauer DB. Emergence of diverse Helicobacter species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:59-97
- 2 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
- 3 Avenaud P, Marais A, Monteiro L, Le Bail B, Bioulac Sage P, Balabaud C, Megraud F. Detection of Helicobacter species in the liver of patients with and without primary liver carcinoma. *Cancer* 2000;89:1431-1439
- 4 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
- 5 Nilsson HO, Mulchandani R, Tranberg KG, Wadstrom T. Helicobacter species identified in liver from patients with cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2001;120:323-324
- 6 Fox JG, Dewhirst FE, Shen Z, Feng Y, Taylor NS, Paster BJ, Ericson RL, Lau CN, Correa P, Araya JC, Roa I. Hepatic Helicobacter species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology* 1998; 114:755-763

- 7 Wadstrom T. Helicobacter in extragastric intestinal and liver disease. *Acta Gastroenterol Belg* 2000;63:393-394
- 8 Fallone CA, Tran S, Semret M, Discepolo F, Behr M, Barkun AN. Helicobacter DNA in bile: correlation with hepato-biliary diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:453-458
- 9 de Magalhaes Queiroz DM, Santos A. Isolation of a Helicobacter strain from the human liver. *Gastroenterology* 2001;121:1023-1024
- 10 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
- 11 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
- 12 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
- 13 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
- 14 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
- 15 Wadstrom T, Ljungh A, Willen R. Primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis are of infectious origin. *Gut* 2001;49:454
- 16 Lin TT, Yeh CT, Wu CS, Liaw YF. Detection and partial sequence analysis of *Helicobacter pylori* DNA in the bile samples. *Dig Dis Sci* 1995;40:2214-2219
- 17 Kawaguchi M, Saito T, Ohno H, Midorikawa S, Sanji T, Handa Y, Morita S, Yoshida H, Tsurui M, Misaka R, Hirota T, Saito M, Minami K. Bacteria closely resembling *Helicobacter pylori* detected immunohistologically and genetically in resected gallbladder mucosa. *J Gastroenterol* 1996;31:294-298
- 18 Myung SJ, Kim MH, Shim KN, Kim YS, Kim EO, Kim HJ, Park ET, Yoo KS, Lim BC, Seo DW, Lee SK, Min YI, Kim JY. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human biliary tree and its association with hepatolithiasis. *Dig Dis Sci* 2000;45:1405-1412
- 19 Pellicano R, Mazzaferro V, Grigioni WF, Cutufia MA, Fagoonee S, Silengo L, Rizzetto M, Ponzetto A. Helicobacter species sequences in liver samples from patients with and without hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:598-601
- 20 Ito K, Nakamura M, Toda G, Negishi M, Torii A, Ohno T. Potential role of *Helicobacter pylori* in hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Med* 2004;13:221-227
- 21 Chen W, Li D, Cannan RJ, Stubbs RS. Common presence of Helicobacter DNA in the gallbladder of patients with gallstone diseases and controls. *Dig Liver Dis* 2003;35:237-243
- 22 Silva CP, Pereira-Lima JC, Oliveira AG, Guerra JB, Marques DL, Sarmanho L, Cabral MM, Queiroz DM. Association of the presence of Helicobacter in gallbladder tissue with cholelithiasis and cholecystitis. *J Clin Microbiol* 2003;41:5615-5618
- 23 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
- 24 彭小宁, 范学工, 黄燕, 王志明, 陈永平. 螺杆菌感染与肝癌关系的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:902-906
- 25 黄燕, 范学工, 陈永平, 李宁, 汤立军. 肝癌组织中螺杆菌16SrRNA基因的检测. *世界华人消化杂志* 2002;10:877-882
- 26 陈仁, 范学工, 李宁, 黄燕, 陈朝晖. CagA(+)幽门螺杆菌体外诱导肝细胞凋亡的观察. *中国人兽共患病杂志* 2003;19:69-71
- 27 Fan XG, Chua A, Li TG, Zeng QS. Survival of *Helicobacter pylori* in milk and tap water. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:1096-1098
- 28 Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000;21:1037-1053
- 29 陈主初, 梁宋平. 肿瘤蛋白质组学. 2002年9月第1版. 湖南: 湖南科学技术出版社, 2002:33-34
- 30 Corbett JM, Dunn MJ, Posch A, Gorg A. Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis* 1994;15:1205-1211
- 31 Uhl M, Helma C, Knasmüller S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. *Mutat Res* 2000;468:213-225
- 32 Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000;405:837-846
- 33 Dean PM, Zanders ED. The use of chemical design tools to transform proteomics data into drug candidates. *Biotechniques* 2002;(Suppl):28-33
- 34 Helfrich JP. Raw data to knowledge warehouse in proteomic-based drug discovery: a scientific data management issue. *Biotechniques* 2002;(Suppl):48-50
- 35 Kim HJ, Song EJ, Lee KJ. Proteomic analysis of protein phosphorylations in heat shock response and thermotolerance. *J Biol Chem* 2002;277:23193-23207
- 36 Smith RD, Anderson GA, Lipton MS, Masselon C, Pasa-Tolic L, Shen Y, Udseth HR. The use of accurate mass tags for high-throughput microbial proteomics. *OMICS* 2002;6:61-90
- 37 Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 1999;17:121-127
- 38 Hanash SM. Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: current status. *Electrophoresis* 2000;21:1202-1209
- 39 龙云铸, 范学工, 李宁, 黄宇琨. 应用双向电泳对HBV相关性肝细胞癌肝组织蛋白质组的初步研究. *中国医师杂志* 2003;5:731-732