

胃癌高低发区差异基因型幽门螺杆菌菌株对人胃上皮细胞系GES-1的损伤作用

何红梅, 宫月华, 袁媛

何红梅, 宫月华, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室 辽宁省沈阳市 110001

国家“十五”科技攻关资助项目, No.2004BA703B04-02

通讯作者: 袁媛, 110001, 沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室: yyuan@mail.cmu.edu.cn

电话: 024-23256666-6153 传真: 024-22703576

收稿日期: 2005-08-01 接受日期: 2005-08-26

Damage effect of different genotype of *Helicobacter pylori* on human gastric epithelial cell line GES-1 in high- and low-risk areas of gastric cancer

Hong-Mei He, Yue-Hua Gong, Yuan Yuan

Hong-Mei He, Yue-Hua Gong, Yuan Yuan, the Third Department of Cancer Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by National Key Technologies Research and Development Program of China during the 10th Five-Year Plan Period, No.2004BA703B04-2

Correspondence to: Professor Yuan Yuan, the Third Department of Cancer Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 North Nanjing Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yyuan@mail.cmu.edu.cn

Received: 2005-08-01 Accepted: 2005-08-26

Abstract

AIM: To investigate the damage effect of the different genotypes of *Helicobacter pylori* on human gastric epithelial cell line GES-1 in high- and low-risk areas of gastric cancer, and to explore its related mechanism.

METHODS: *H. pylori* were identified by hematoxylin-eosin (HE) staining, Gimsa staining, and Warthin-Starry silver staining. The DNA was obtained by proteinase K and phenol-chloroform extraction method. The *cagA*, *vacAs1/s2*, *m1a*, *m1b*, and *m2* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The damage effects of *H. pylori* with differential sub-genotypes and 2 other non-differential genotypes on GES-1 cells were observed by cell and *H. pylori* co-culture. The expression of 8-OHdG in GES-1 cells was detected by S-P immunohistochemistry.

RESULTS: GES-1 cells were seriously damaged by *H. pylori*. With the prolongation of the co-culture time, the morphology of GES-1 cells were changed from

spindle to round, and the nuclei showed chromatin pyknosis and clustered on the inner border of karyon. The cytoplasm condensed and blebbing appeared. The numbers of the dead and damaged cells were increasing. The damage effect of *H. pylori* with differential genotypes on GES-1 cells was more serious than that of the non-differential genotypes. The expression of 8-OHdG were almost all negative (0.5% positive) in GES-1 cells of the normal controls, while the positive rate was 98.5% in the *H. pylori* treatment cells ($P < 0.01$).

CONCLUSION: *H. pylori* with *cagA*⁺, *vacAs1*⁺*lm1b*⁺ genotypes in the high-risk area of gastric cancer have more serious damage effects on gastric cancer cell line GES-1, and they can promote the transformation of normal gastric epithelial cells to malignant cells by up-regulation of 8-OHdG expression.

Key Words: Gastric cancer; *Helicobacter pylori*; Differential genotype; Gastric epithelial cell; Co-culture; 8-OHdG

He HM, Gong YH, Yuan Y. Damage effect of different genotype of *Helicobacter pylori* on human gastric epithelial cell line GES-1 in high- and low-risk areas of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2681-2684

摘要

目的: 研究胃癌高、低发区差异基因型幽门螺杆菌(*H. pylori*)菌株对永生化的非肿瘤胃上皮细胞GES-1的损伤作用;并阐明*H. pylori*致细胞损伤的分子机制。

方法: 通过常规HE染色、Gimsa染色、W-S银染色鉴定*H. pylori*菌株,采用蛋白酶K及酚-氯仿抽提法提取DNA,PCR法扩增*cagA*、*vacAs1*、*s2*、*m1a*、*m1b*、*m2*基因,对*H. pylori*基因型进行检测。利用细胞和幽门螺杆菌共培养技术,观察胃癌高低发区差异基因型*H. pylori*以及其他两种非差异基因型*H. pylori*对胃上皮细胞系GES-1的损伤作用,并通过免疫细胞化学方法检测GES-1细胞8-OHdG的表达。

结果: 幽门螺杆菌对GES-1细胞具有损伤作用,随着作用时间的延长,GES-1细胞形态由贴壁的梭形变为圆形,细胞核染色质浓缩,呈新月形聚集于核缘,细胞质浓缩,可见空泡变性,死亡细胞逐渐增多。差异基因型*H. pylori*对GES-1细胞的损伤程度比非差异基因型的损伤作用重。正常对照组

8-OHdG表达基本阴性(0.5%), 而*H pylori*处理组GES-1细胞8-OHdG表达阳性达98.5%, 二者差异显著($P < 0.01$), 有统计学意义。

结论: 胃癌高发区差异基因型*H pylori*即*cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*mlb*⁺对胃上皮细胞GES-1具有更强损伤作用, 其损伤具有时间依赖关系; *H pylori*可能通过增加胃上皮细胞8-OHdG表达而导致正常胃黏膜上皮细胞恶性转化。

关键词: 胃癌; 幽门螺杆菌; 差异基因型; 胃黏膜上皮细胞; 共培养; 8-OHdG

何红梅, 宫月华, 袁媛. 胃癌高低发区差异基因型幽门螺杆菌菌株对人胃上皮细胞系GES-1的损伤作用. 世界华人消化杂志 2005;13(22):2681-2684
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2681.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)是慢性胃炎、消化性溃疡的病因, 并与胃腺癌和黏膜相关性淋巴瘤等疾病密切相关^[1-5]. 但*H pylori*致癌的机制目前还不是很清楚, 目前研究也不足以解释*H pylori*感染后发生胃癌的差异性, 有人认为这可能与研究中所应用的菌株或细胞系不同有关。

有证据表明, *H pylori*基因亚型的遗传学差别对产生不同的临床结局具有重要作用, 特别是致病相关基因如: *cagA*、*vacA*和*iceA*等的差异, 与感染的临床结局密切相关^[6]. 辽宁庄河是我国北方胃癌高发区, 胃癌死亡率为50/10万, 本室前期工作发现当地*H pylori*检出率高达79.3%^[7], 明显高于胃癌低发区沈阳, 胃癌高低发区*H pylori*菌株基因型的分布存在明显差异, 其差异基因型组合为*cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*mlb*⁺^[8].

研究提示, 庄河胃癌高发区的胃癌高发与*H pylori*感染有密切关系, 是否是由于差异基因型*H pylori*是庄河地区胃癌高发的重要危险因素, 还不清楚. 我们通过比较胃癌高低发区差异基因型*H pylori*菌株对永生化的非肿瘤胃上皮细胞GES-1的损伤作用, 以明确差异基因型*H pylori*的致病能力; 检测共培养后GES-1细胞8-OHdG的表达, 以阐明其损伤的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌高发区高危人群胃黏膜培养出的不同基因亚型*H pylori*(中国医科大学肿瘤研究所第三研究室提供), 胃黏膜上皮细胞系GES-1(北京市肿瘤防治研究所细胞研究室提供)。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 我们在微需氧的条件下, 把本室菌库中的菌株接种于含70 mL/L羊血的脑心浸液琼脂培养基上, 置于37℃, 50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂, 相对湿度为97%的三气细菌培养箱内培养, 3-4 d后挑取阳性菌落传代, 涂于新

板上, 48 h后收集。

1.2.2 幽门螺杆菌菌株鉴定 形态学观察: 用常规HE染色、Gimsa染色、W-S银染色鉴定菌株. 用接种环挑取一个菌落, 涂片, 火焰固定细菌. 光学显微镜下观察, HE染色呈蓝色, Gimsa染色呈蓝紫色, W-S银染色见棕黑色或黑色的“S”型、弯曲状、海鸥状、杆状细菌者为*H pylori*阳性. 聚合酶链反应: 采用蛋白酶K及酚-氯仿抽提法提取DNA, PCR法扩增*cagA*、*vacAsI*、*s2*、*mla*、*mlb*、*m2*基因, 对*H pylori*基因亚型进行检测. PCR反应条件如下: *cagA*: 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 72℃ 5 min; *vacA*: 94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min, 72℃ 5 min; PCR扩增产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳分析, 紫外凝胶成像系统观察, 照相。

1.2.3 胃黏膜上皮细胞GES-1培养 采用胃上皮永生化非肿瘤细胞系GES-1置于细胞培养箱, 于37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度的环境培养, 用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基, 每周更换3次营养液, 并于细胞生长约80%融合时, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化并以1:3传代。

1.2.4 *H pylori*与GES-1细胞共培养 细胞处于对数生长期时, 用PBS调节*H pylori*浓度 6×10^8 CFU/mL, 按细胞/细菌(1:200)比例加入不同亚型*H pylori*, 共同孵育. 实验分组根据PCR结果进行: A组细胞加*cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*mlb*⁺型*H pylori*, B组细胞加*cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*mlb*⁺型*H pylori*, C组细胞加*cagA*⁻, *vacAsI*⁺/*mlb*⁺型*H pylori*, D组细胞只加PBS空白对照。

1.2.5 S-P免疫组化法检测GES-1细胞8-OHdG表达 细胞爬片后用冰丙酮固定15 min, 4℃ PBS冲洗3遍后, 利用S-P免疫组化法检测各组细胞8-OHdG表达. 经DAB显色, 细胞质内出现棕黄色为阳性。

统计学处理 用SPSS软件进行统计学处理: χ^2 检验, $P < 0.05$, 认为8-OHdG在*H pylori*阳性和阴性组细胞间表达差别有统计学意义。

2 结果

2.1 *H pylori*及其基因亚型的鉴定 细菌培养和形态学染色结果证实, 培养细菌为*H pylori*, 基因亚型A组菌: *cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*mlb*⁺, B组菌, *cagA*⁺, *vacAsI*⁻/*mlb*⁻, C组菌*H pylori*即*cagA*⁻, *vacAsI*⁺/*mlb*⁺。

2.2 共培养GES-1细胞损伤的形态学观察

2.2.1 幽门螺杆菌对GES-1细胞的损伤作用 正常情况下, GES-1细胞在倒置显微镜下观察呈菱形或多边形等不规则形状, 贴壁, 生长旺盛, 偶见漂浮细胞. 随着作用时间的延长, GES-1细胞形态由正常贴壁的多角形、梭形变为圆形, 贴壁细胞减少, 悬浮细胞增多, 并且细胞周围出现碎片; 细胞核染色质浓缩, 呈新月形聚集于核缘, 细胞质浓缩, 可见空泡变性, 死亡细胞逐渐增多; 死亡和受损伤的细胞逐渐增多; 随着时间的延长, 细胞培养液颜色变黄,

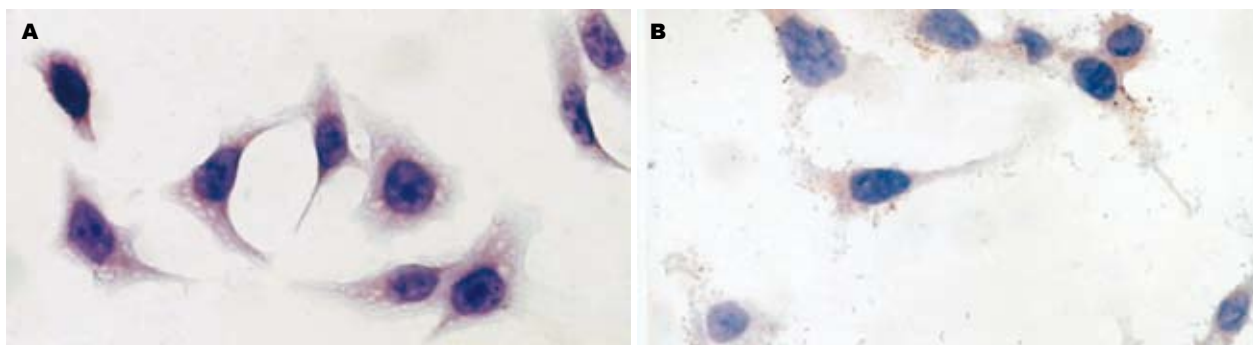


图1 免疫组化8-OHdG表达。A: 无*H. pylori*细胞8-OHdG表达阴性; B: *H. pylori*作用细胞8-OHdG表达阳性。

变混。

2.2.2 高低发区差异基因型*H. pylori*与非差异基因型*H. pylori*致损伤作用的比较 倒置显微镜下,观察到A组细胞加入高低发区差异基因型*H. pylori*后,随着时间的变化,细胞数明显减少,细胞折光性减弱,变圆,与培养瓶附着没有以前紧密,部分细胞脱离瓶壁,悬浮细胞逐渐增多,最后大多数细胞悬浮、死亡,生长液中有大量的死细胞及细胞碎片悬浮;存活细胞贴壁状态也不佳,细胞轮廓变粗,细胞中出现黑色颗粒,空泡变性,老化细胞增多,细胞培养液变黄,变浑。A组、B组、C组、D组细胞损伤程度比较,以A组(差异基因型*H. pylori*)对GES-1细胞的损伤程度最重,而非差异基因型的损伤作用较轻。

2.2.3 免疫组化8-OHdG表达的改变 阴性对照组8-OHdG表达基本阴性,阳性率0.5%(图1A),而*H. pylori*处理组8-OHdG表达阳性率达98.5%,二者差别有统计学意义($P<0.05$,图1B)。

3 讨论

GES-1是胎儿胃黏膜上皮细胞经SV40转化而建立的人胃黏膜上皮细胞永生细胞株,现已证明GES-1为一基本的胃黏膜细胞株^[9-11]。GES-1是了解正常胃黏膜细胞离体特征以及胃癌致病机制的良好细胞株。以往对*H. pylori*致病性研究多使用胃癌细胞系,本研究使用接近正常胃上皮细胞的GES-1,更能了解*H. pylori*的体内致病性。

*H. pylori*的DNA指纹图和限制性片段长度多肽等方法研究表明在*H. pylori*不同分离株间存在巨大的遗传变异,其遗传异质性大于多种细菌^[7,8]。这种遗传学的差别产生不同的临床结局,特别是*H. pylori*致病相关基因如:*cagA*、*vacA*和*iceA*等的差异,与感染的临床结局密切相关^[9]。来自中国胃癌高发区研究发现*cagA*⁺菌株感染与各型胃疾病、胃癌前病变等均呈明显正相关^[10]。流行病学结果分析,*vacA*等位基因各种组合的产毒能力不同:s1m1型*vacA*基因的菌株产生高水平毒素;s1m2型菌株产生低至中等水平的毒素;而s2m2型菌株不产生有活性的毒素^[11]。

中国医科大学肿瘤研究所第三研究室在十五期间的分析发现庄河地区*H. pylori*感染率高达79.3%,差异基因

型为*cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*m1b*⁺,与沈阳低发区的*H. pylori*菌株类型差异显著;*vacA*基因亚型两地具有显著性差异。本研究通过*H. pylori*对体外人胃黏膜细胞作用发现,胃癌高低发区差异基因型*H. pylori* *cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*m1b*⁺,对非肿瘤细胞GES-1具有明显的DNA损伤作用,而且比非差异基因型*H. pylori*损伤强度更大,结果提示,在胃癌高发区,*cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*m1b*⁺型*H. pylori*可能具有更大的细胞毒性,从而导致胃癌的发生,庄河地区的*cagA*⁺, *vacAsI*⁺/*m1b*⁺型*H. pylori*可能为辽宁庄河地区胃癌高发的环境致癌因素。

研究认为,*H. pylori*代谢产物对胃上皮的基因毒性作用在*H. pylori*致癌作用中占重要地位,特别是在由多因素多步骤参与的致癌始动阶段^[12,13]。机体内细胞的氧化损伤广泛存在,8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanine, 8-OHdG)是活性氧代谢产物之一,目前已成为DNA氧化损伤中最常采用的生物标志物。8-OHdG通过改变碱基配对的性质,导致抑癌基因p53基因和ras原癌基因等基因发生难以修复的DNA G→T或A→C碱基颠换,导致DNA误读,突变,从而启动细胞突变,是癌变过程中的重要事件。*H. pylori*对胃上皮的基因毒性作用在致癌过程中占重要地位,特别是在由多因素多步骤参与的致癌始动阶段^[14,15]。我们的研究表明,胃上皮8-OHdG在*H. pylori*处理组明显高于无*H. pylori*组,提示*H. pylori*使胃上皮细胞8-OHdG表达增加,引起细胞DNA损伤,这可能是*H. pylori*导致胃黏膜上皮细胞恶性转化的机制之一。

致谢:本研究GES-1细胞系由北京市肿瘤所遗传研究室柯杨教授提供。

4 参考文献

- 1 Graham DY. *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model. *Gastroenterology* 1997; 113: 1983-1991
- 2 Graham DY, Yamaoka Y. *H. pylori* and *cagA*: relationships with gastric cancer, duodenal ulcer, and reflux esophagitis and its complications. *Helicobacter* 1998; 3: 145-151
- 3 Isaacson PG, Spencer J. Is gastric lymphoma an infectious disease? *Hum Pathol* 1993; 24: 569-570
- 4 Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991; 325: 1132-1136
- 5 Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogel-

- man JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127-1131
- 6 Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2274-2279
- 7 袁媛. 辽宁省庄河地区胃癌高发人群综合防治研究. *中国肿瘤* 2005; 14: 307-311
- 8 Gong YH, Wang Y, Yuan Y. Distribution of *Helicobacter pylori* in north China. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3523-3527
- 9 Ke Y, Ning T, Wang B. Establishment and characterization of a SV40 transformed human fetal gastric epithelial cell line-GES-1. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1994; 16: 7-10
- 10 Zhang J, Ke Y, Ning T. Glucocorticoid-induced apoptosis of human gastric epithelial cells transfected with p53 genes. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1996; 18: 328-330
- 11 Zheng S, Ke Y. Study of APC, Rb, c-met gene copy numbers of human gastric mucosa epithelial cell line GES-1. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1999; 21: 409-411
- 12 Baik SC, Youn HS, Chung MH, Lee WK, Cho MJ, Ko GH, Park CK, Kasai H, Rhee KH. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Res* 1996; 56: 1279-1282
- 13 Farinati F, Cardin R, Degan P, Rugge M, Mario FD, Bonvicini P, Naccarato R. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 1998; 42: 351-356
- 14 Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 5137-5142
- 15 Marshall DG, Coleman DC, Sullivan DJ, Xia H, O'Morain CA, Smyth CJ. Genomic DNA fingerprinting of clinical isolates of *Helicobacter pylori* using short oligonucleotide probes containing repetitive sequences. *J Appl Bacteriol* 1996; 81: 509-517

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

●消息●

第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知

本刊讯 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议定于2006-03在广东省深圳市召开, 本次会议由中国中西医结合学会主办, 现将有关征文事项通知如下。

1 征文内容

本次会议的征文内容包括: (1)介绍结直肠肛门基础研究的新动态、新进展、新成果; (2)结直肠肛门肿瘤疾病的诊断及治疗的新技术、新成果, 直肠癌扩大根治术式和疗效, 中低位直肠癌保肛手术方法、适应证和效果, 肛管直肠癌会阴肛门重建术的术式、方法、效果; (3)中西医结合治疗结肠慢传输型、出口梗阻型及结肠、直肠、盆腔、盆底解剖生理功能异常等便秘疾病的诊断治疗方法、适应证、临床疗效和经验教训; (4)中西医结合治疗炎症性肠病的经验及手术方式选择; (5)中西医结合预防、治疗肛肠常见疾病的新方法、新经验; (6)采用中西医结合治疗结直肠肛门疾病的临床护理及造口护理的新方法、新经验; (7)肛门、结直肠损伤及异物处理的经验; (8)介绍国内外肛肠疾病检查、治疗的新器械、新设备、新药物。

2 征文要求

文章应有临床实用性, 基础研究应具有科学性和先进性; 全文4000字以内, 要求寄打印稿(欢迎用软盘或电子信箱投稿), 并附500字以内的摘要一份, 关键词3-5个; 征文稿件请寄: (1)广东省公安边防总队医院(深圳武警医院)肛肠外科柯玮收, 邮编518029, 电话: 0755-82699768, 手机: 13714327555, Email: kewei1968@126.com; (2)深圳市第二人民医院肛肠科舒洪权收, 邮编: 518039, 电话: 0755-26250353, 手机: 13923803457, Email: ssshhhqqq66@163.com。

3 其他

本次会议可授予国家级继续教育I类学分6分, 会议具体日期及详细地址另行通知. 欢迎广大相关领域工作及研究人员参加。