

江苏不同地区胃疾病相关幽门螺杆菌差异蛋白质的比较

叶振宇, 李军成, 邢春根

叶振宇, 李军成, 邢春根, 苏州大学附属第二医院普通外科
江苏省苏州市 215004

叶振宇, 主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤与胰腺疾病的研究。

作者贡献分布: 本文由叶振宇撰写; 实验由叶振宇、李军成及邢春根共同完成。

通讯作者: 李军成, 主任医师, 215004, 江苏省苏州市姑苏区三香路1055号, 苏州大学附属第二医院普通外科。

jchenglee@sina.com

电话: 0512-67784796

收稿日期: 2013-11-18 修回日期: 2013-12-02

接受日期: 2013-12-04 在线出版日期: 2014-01-28

Proteomic analysis of *Helicobacter pylori* from patients with different gastric diseases in different regions of Jiangsu

Zhen-Yu Ye, Jun-Cheng Li, Chun-Gen Xing

Zhen-Yu Ye, Jun-Cheng Li, Chun-Gen Xing, Department of Surgery, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Jun-Cheng Li, Chief Physician, Department of Surgery, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, 1055 Sanxiang Road, Gusu District, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China. Jchenglee@sina.com

Received: 2013-11-18 Revised: 2013-12-02

Accepted: 2013-12-04 Published online: 2014-01-28

Abstract

AIM: To perform a proteomic analysis of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) from patients with different gastric diseases in different regions of Jiangsu.

METHODS: *H. pylori* strains were isolated from the endoscopic biopsy specimens of gastric mucosa of patients with gastritis or gastric cancer from areas of high (Taizhou) and low (Suzhou) incidence of gastric cancer, and whole-cell proteins of *H. pylori* were extracted and characterized by 2-dimensional electrophoresis (DE). Different protein spots were analyzed using PDQuest analysis software, identified by electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (ESI-Q-TOF-MS), and searched using the Mascot database.

RESULTS: Nine differentially expressed pro-

teins were identified, including four up-regulated in gastric cancer (superoxide dismutase, urease subunit alpha, chaperone protein dnaK and DNA-directed RNA polymerase subunit alpha), two up-regulated in chronic gastritis (urease subunit alpha and nucleoside diphosphate kinase), and three only expressed in strains from one region (S-ribosyl homocysteine lyase, inorganic pyrophosphatase and 60×10^3 chaperonin).

CONCLUSION: There are proteomic differences between *H. pylori* isolates from patients with gastritis and gastric cancer in areas of high and low incidents of gastric cancer. The protein spots overexpressed in gastric cancer in the area with high incidence of gastric cancer are more than those in the area with low incidence of gastric cancer.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Gastric cancer; Chronic gastritis; *Helicobacter pylori*; Protein

Ye ZY, Li JC, Xing CG. Proteomic analysis of *Helicobacter pylori* from patients with different gastric diseases in different regions of Jiangsu. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(3): 389-393 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/389.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i3.389>

摘要

目的: 鉴定、比较江苏地区胃癌高、低发区胃癌与慢性胃炎相关幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)差异表达蛋白质。

方法: 选取江苏省泰州市(胃癌高发区)和苏州市(胃癌低发区)胃癌和慢性胃炎患者胃镜下胃黏膜活检组织分离培养出的*H. pylori*, 提取蛋白质后通过双向凝胶电泳进行分离, 使用PDQuest软件对蛋白质点进行分析和比较, 通过四极杆飞行时间电喷雾串联质谱对差异蛋白质点进行鉴定, 并通过Mascot数据库检索。

结果: 所选*H. pylori*菌株总蛋白进行双向凝胶

■背景资料

幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染与胃癌和慢性胃炎等的发病与病情进展过程有紧密联系, 不同地区人群差异和*H. pylori*菌株差异均为导致*H. pylori*感染致病结局不同的主要因素。已有文献报道分析, 胃癌和慢性胃炎发病的相关*H. pylori*菌株蛋白也有一定的差异。

■同行评议者

李瑜元, 教授, 广州市第一人民医院内科

■ 研发前沿

现阶段, 多个资料研究结果显示, *H. pylori*与胃癌、慢性胃炎、消化性溃疡等胃肠道疾病的发病及病情进展有密切相关性。然而, 关于该方面的明确的致病机制还没有准确报道。

电泳后获得优质2-DE图谱, 经Q-TOP鉴定为1号(巯基过氧化物酶)、3号(超氧化物歧化酶)、4号(尿素酶 α)、5号(核苷二磷酸激酶)、8号(分子伴侣dnaK)、9号(S-核糖基同型半胱氨酸裂解酶)、13号(无机焦磷酸酶)、14号(DNA引导的RNA聚合酶 α)和16号(分子伴侣 60×10^3)9个差异蛋白质点, 其中3号、4号、8号和14号蛋白质点在胃癌菌株中均为高表达, 1号和5号蛋白质点在慢性胃炎菌株中均为高表达, 9号、13号和16号蛋白质点仅在一个地区存在差异表达。

结论: 胃癌高、低发区胃癌及相应地区慢性胃炎*H. pylori*蛋白质比较存在一定差异, 但其中2/3的差异蛋白质是一致的, 胃癌高发区*H. pylori*差异蛋白质高表达多于低发区, 表明*H. pylori*在不同胃癌发病区致病机制相似, 但在胃癌高发区作用强于低发区。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胃癌; 慢性胃炎; 幽门螺杆菌; 蛋白质

核心提示: 本研究以我国江苏省泰州市(胃癌高发区)和苏州市(胃癌低发区)胃癌和慢性胃炎患者胃镜下胃黏膜活检组织分离培养出的幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)菌株作为研究对象, 通过蛋白质组学分析比较两地区差异蛋白质表达。

叶振宇, 李军成, 邢春根. 江苏不同地区胃疾病相关幽门螺杆菌差异蛋白质的比较. 世界华人消化杂志 2014; 22(3): 389-393
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/389.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i3.389>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)由Marshall等^[1]首次从胃黏膜中分离出, 并开展了关于*H. pylori*基因组成等方面的研究。现阶段, 多个资料研究结果显示, *H. pylori*与胃癌、慢性胃炎、消化性溃疡等胃肠道疾病的发病及病情进展有密切相关性。然而, 关于该方面的明确的致病机制还没有准确报道^[2]。蛋白质组学技术在该方面, 有着自己的独特优势^[3]。我院采用该技术对江苏地区胃炎患者的*H. pylori*临床菌株差异蛋白进行比较研究, 为*H. pylori*致胃癌的致病机制及胃癌防治提供理论依据, 报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究所采用的*H. pylori*菌株来自2012-08/2013-08江苏省泰州市(胃癌高发区)和

苏州市(胃癌低发区)胃癌和慢性胃炎患者胃镜下胃黏膜活检组织分离培养。

1.2 方法

1.2.1 样本*H. pylori*分离培养: 将胃黏膜活检组织进行充分的研磨, 制备得到匀浆, 然后将其进行接种, 所选培养基为哥伦比亚琼脂培养基, 培养条件选取为5%O₂、10%CO₂、85%N₂(微需氧环境), 经培养72 h后, 进行形态学、快速尿素酶以及革兰染色油镜观察鉴定, 确定为符合本研究所需*H. pylori*菌株后, 于-80 °C低温保存待检^[4]。

1.2.2 蛋白提取: 在室温下将待检*H. pylori*菌株进行解冻, 混匀保存液。取500 μ L *H. pylori*菌株, 由接种环进行均匀接种, 所选培养基为固体选择性培养基。所选培养条件为37 °C微需氧环境, 培养时间为72 h。将菌苔刮下使用PBS洗涤, 将洗涤悬浮液离心后弃去上清液。将沉淀置于EP管中, 并加入细菌裂解液(尿素8 mol/L、DTT 65 mmol/L、PMSF 1 mmol、CHAPS 4%、两性电解质0.2%)混匀, 混合液在冰浴环境下超声破碎, 在室温下放置0.5 h后离心1 h, 取上清液分装入EP管^[5]。取其中1管采用BCA方法使用蛋白质定量试剂盒进行蛋白质定量。

1.2.3 双向凝胶电泳: 等电聚焦: 使用17 cm线性胶条, 上样量: 每胶120 μ g, 聚焦仪程序设置为: 50 V, 12 h; 250 V, 30 min; 1000 V, 1 h; 10000 V, 5 h; 10000 V, 70000伏小时; 500 V, 1 h。取出胶条, 将其放于平衡缓冲液 I (含DTT0.02 g/mL)和平衡缓冲液 II (含碘乙酰胺0.025 g/mL)中, 分别进行震荡平衡, 时间为15 min, 转至浓度为12%的聚丙烯酰胺凝胶^[6]。电泳: 每胶10 mA, 30 min; 每胶30 mA, 5 h。银染后使用DUOSCANT 1200扫描仪进行扫描, 使用ImageMaster 5.0版图像分析软件与手工操作结合进行分析, 得到差异表达蛋白质点, 经胰酶将切取的蛋白质点进行胶内酶解^[7]。

1.2.4 质谱鉴定: 经四极杆飞行时间电喷雾串联质谱对差异蛋白质点进行鉴定, 经毛细管液相色谱梯度洗脱进行脱盐, 然后进行上样分析, 上样量为1.4 μ L^[8]。二级质谱获得的图谱采用Max-Ent3软件处理, 对该肽段氨基酸序列进行鉴定。从Mascot细菌数据库中得到检索结果^[9]。

统计学处理 从Mascot细菌数据库中得出检索结果。

2 结果

2.1 *H. pylori*菌株蛋白质双向凝胶电泳(two-

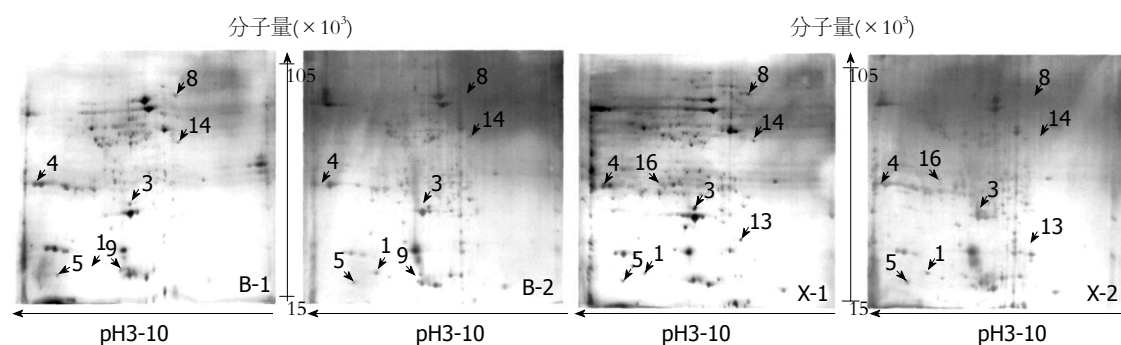


图1 有代表性的总蛋白2-DE图谱. 箭头表示差异表达的蛋白质点.

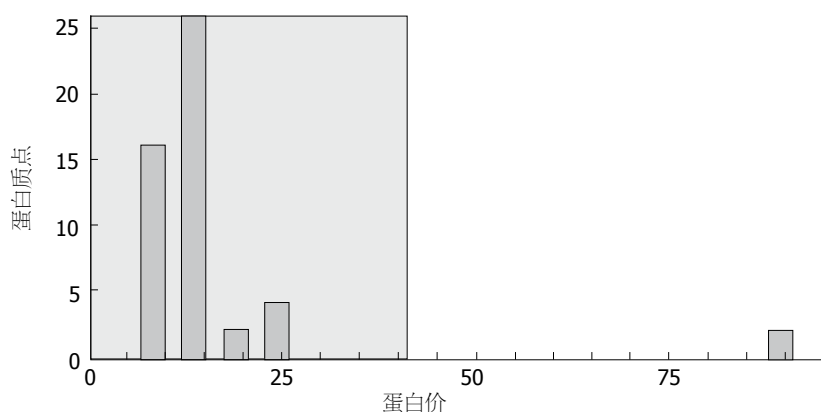


图2 13号蛋白质点的Mascot搜索结果.

dimensional gel electrophoresis, 2-DE)图谱的建立. 在同一条件下对本组胃癌和慢性胃炎患者*H. pylori*菌株总蛋白进行双向凝胶电泳分离, 在银染显色后可以得到背景清晰、分辨率高及重复性良好的2-DE图谱. 经PDQuest软件分析显示, 获得的每张2-DE图谱有蛋白质点300个左右, 多数蛋白质点位置和丰度具有一致性, 主要分布于pH4-8范围内. 经PDQuest软件结合手工进行成组分析比较可选出差异表达的蛋白质点(图1), 将这些蛋白质点进行质谱分析.

图1中显示图谱中共有9个差异蛋白质点, 包括1、3、4、5、8、9、13、14和16号. 9个差异蛋白质点中1、3、4、5、8和14号蛋白质点在泰州和苏州均存在一致性差异表达, 其中3、4、8和14号蛋白质点在胃癌菌株中均为高表达, 但在相应地区慢性胃炎菌株中4、8和14号蛋白质点均不表达, 3号蛋白质点低表达; 1和5号蛋白质点再慢性胃炎菌株中均为高表达, 但在相应地区胃癌菌株中1号蛋白质点不表达或低表达, 5号蛋白质点低表达. 9个差异蛋白质点中9、13和16号蛋白质点仅在一个地区存在差异表达. 其中9号蛋白质点胃癌菌株高表达仅呈现

在苏州地区, 13和16号蛋白质点胃癌菌株高表达仅呈现在泰州地区; 在相应地区慢性胃炎菌株中9和13号蛋白质点不表达, 16号蛋白质点低表达.

2.2 蛋白质鉴定 经Q-TOP对差异蛋白质进行鉴定, 检索SWISS-PROT和NCBI蛋白质数据库(表1). 1号蛋白质点为巯基过氧化物酶, 3号蛋白质点为超氧化物歧化酶, 4号蛋白质点为尿素酶 α , 5号蛋白质点为核苷二磷酸激酶, 8号蛋白质点为分子伴侣dnaK, 9号蛋白质点为S-核糖基同型半胱氨酸裂解酶, 13号蛋白质点为无机焦磷酸酶, 14号蛋白质点为DNA引导的RNA聚合酶 α , 16号蛋白质点为分子伴侣 60×10^3 . 以13号蛋白质点为例, 其Mascot搜索结果截面图如图2, 其Q-TOP质谱图如图3.

3 讨论

*H. pylori*感染与胃癌和慢性胃炎等的发病与病情进展过程有紧密联系, 不同地区人群差异和*H. pylori*菌株差异均为导致*H. pylori*感染致病结局不同的主要因素^[10]. 已有文献报道分析, 胃癌和慢性胃炎发病的相关*H. pylori*菌株蛋白也

■ 相关报道

1号蛋白质点巯基过氧化物酶相关报道较少, 其本身参与氧化还原反应, 而关于其具体的致病机制还没有明确.

■应用要点

胃癌高、低发区胃癌及相应地区慢性胃炎 *H. pylori* 蛋白质比较存在一定差异,但其中2/3的差异蛋白质是一致的,胃癌高发区 *H. pylori* 差异蛋白质高表达多于低发区,表明 *H. pylori* 在不同胃癌发病区致病机制相似,但在胃癌高发区作用强于低发区。

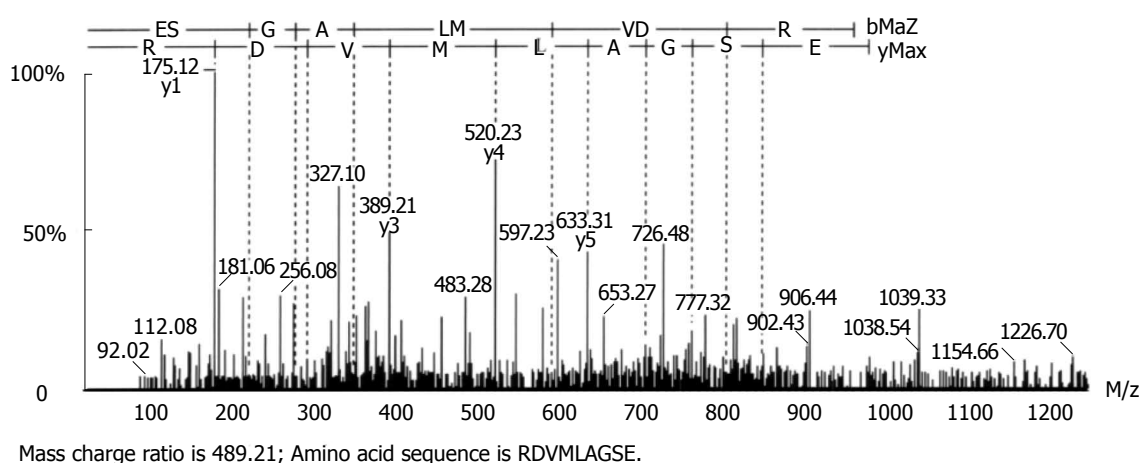


图3 13号点的Q-TOP质谱图。配比: 489.21; 氨基酸序列: RDVMLAGSE。

表1 Q-TOP鉴定的9个差异蛋白质点

序号	名称	蛋白序号	表达水平		蛋白质分子量/等电点	北京	沈阳
			胃癌	胃炎			
1	巯基过氧化物酶	gi 297380240	↓	↑	18365/7.86	+	+
3	超氧化物歧化酶	gi 188527846	↑	↓	24616/6.04	+	+
4	尿素酶 α	gi 14583017	↑	↓	26608/8.47	+	+
5	核苷二磷酸激酶	gi 108562617	↓	↑	15368/7.98	+	+
8	分子伴侣dnaK	gi 188526913	↑	↓	67136/4.99	+	+
9	S-核糖基同型半胱氨酸裂解酶	gi 7387850	↑	↓	17799/6.37	+	-
13	无机焦磷酸酶	gi 4467573	↑	↓	19303/4.90	-	+
14	DNA引导的RNA聚合酶 α	gi 15612278	↑	↓	38570/4.97	+	+
16	分子伴侣60 × 10 ³	gi 54299868	↑	↓	58245/5.55	-	+

+: 蛋白在该区域差异表达; -: 蛋白在该区域无差异表达。

有一定的差异^[11]。在我国,胃癌高、低发区胃癌患者 *H. pylori* 感染率存在较大的差异,其中,高发区感染率约为50.97%,低发区感染率约为41.30%^[12],目前还没有关于胃癌高、低发区胃癌与慢性胃炎相关幽门螺旋杆菌差异表达蛋白质的相关报道。

本研究以我国江苏省泰州市(胃癌高发区)和苏州市(胃癌低发区)胃癌和慢性胃炎患者胃镜下胃黏膜活检组织分离培养出的 *H. pylori* 菌株作为研究对象,通过蛋白质组学分析比较两地区差异蛋白质表达。研究结果显示,共发现9差异蛋白质点,分别为1号(巯基过氧化物酶)、3号(超氧化物歧化酶)、4号(尿素酶 α)、5号(核苷二磷酸激酶)、8号(分子伴侣dnaK)、9号(S-核糖基同型半胱氨酸裂解酶)、13号(无机焦磷酸酶)、14号(DNA引导的RNA聚合酶 α)和16号(分子伴侣60 × 10³)。其中3、4、8和14号蛋白质点在胃癌菌株中均为高表达,1和5号蛋白质点在慢性

胃炎菌株中均为高表达,9、13和16号蛋白质点仅在一个地区存在差异表达,9号蛋白质点胃癌菌株高表达仅呈现在苏州地区,13和16号蛋白质点胃癌菌株高表达仅呈现在泰州地区;在相应地区慢性胃炎菌株中9号和13号蛋白质点不表达,16号蛋白质点低表达。

1号蛋白质点巯基过氧化物酶相关报道较少,其本身参与氧化还原反应,而关于其具体的致病机制还没有明确;3号蛋白质点超氧化物歧化酶对机体中性粒细胞和巨噬细胞氧自由基杀伤细菌的效果有抑制作用,减轻了免疫系统对 *H. pylori* 的损伤,增强了 *H. pylori* 的定植力和侵袭力;4号蛋白质点尿素酶 α 在胃癌高、低发区胃癌菌株中均为高表达,其亚单位能够刺激尿素反应生成NH₄⁺,导致细菌外环境pH升高,促进细菌定植和增值,同时也大大削弱了胃黏膜的屏障功能,促进空泡毒素发挥毒性作用^[13],参与胃黏膜发病及病情进展过程;5号蛋白质点核

苷二磷酸激酶具有调节细胞增殖、分化以及抑制细胞生长和运动等多方面的作用^[1], 同时也是抑制肿瘤转移的管家酶; 8号蛋白质点分子伴侣dnaK参与肿瘤免疫过程, 有助于提高细胞应激耐受性和增值速度, 对肿瘤细胞凋亡有抑制作用^[14]; 9号蛋白质点S-核糖基同型半胱氨酸裂解酶能够催化S-核糖基同型半胱氨酸转变为同型半胱氨酸, 引起细胞内叶酸水平降低、同型半胱氨酸水平升高, 最终导致胃上皮细胞周围正常微环境发生改变^[15]; 13号蛋白质点无机焦磷酸酶能够催化焦磷酸, 焦磷酸在*H. pylori*新陈代谢过程中参与细胞质合成反应, 有平衡能量的作用, 是*H. pylori*新陈代谢旺盛的重要因素; 14号蛋白质点DNA引导的RNA聚合酶 α 与Hp的DNA转录功能相关, 参与*H. pylori*的新陈代谢过程; 16号蛋白质点分子伴侣 60×10^3 属于Hsp60家族, 与*H. pylori*产生Hsp60抗体, 与机体胃黏膜产生的Hsp60发生交叉反应, 抑制了Hsp60对胃黏膜的保护作用, 同时也增强了尿素酶的毒力, 其在*H. pylori*菌体尿素酶的细胞外装配以及保持尿素酶的稳定性上具有重要作用^[16]。

总之, 胃癌高、低发区胃癌及相应地区慢性胃炎*H. pylori*蛋白质比较存在一定差异, 但其中2/3的差异蛋白质是一致的, 胃癌高发区*H. pylori*差异蛋白质高表达多于低发区, 表明*H. pylori*在不同胃癌发病区致病机制相似, 但在胃癌高发区作用强于低发区。

4 参考文献

- 1 Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315 [PMID: 6145023]
- 2 时昭红, 刘浩. 幽门螺杆菌感染与胃癌. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3327-3331
- 3 闫伟, 曹建彪. 胃幽门螺杆菌检测技术进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1527-1533
- 4 刘琳娜, 丁士刚, 钟丽君, 张静, 曲恒怡, 李曙光. 胃癌和慢性胃炎患者幽门螺杆菌蛋白质组学分析. 胃肠病学 2011; 16: 409-413
- 5 游运辉. 胃炎与胃癌相关幽门螺杆菌差异蛋白质组学的研究. 中南大学, 2007
- 6 刘琳娜, 张静, 丁士刚, 钟丽君, 李广川, 石岩岩, 王晔. 胃癌高、低发区胃癌与慢性胃炎患者幽门螺杆菌差异蛋白质的比较. 北京大学学报(医学版) 2011; 43: 827-832
- 7 Lee JS, Choe YH, Lee JH, Lee HJ, Lee JH, Choi YO. *Helicobacter pylori* urease activity is influenced by ferric uptake regulator. *Yonsei Med J* 2010; 51: 39-44 [PMID: 20046512 DOI: 10.3349/ymj.2010.51.1.39]
- 8 游运辉, 范学工, 刘萍, 刘洪波, 田雪飞, 颜雪梅. 胃癌及慢性胃炎幽门螺杆菌的蛋白质组学研究. 中南大学学报(医学版) 2008; 33: 384-390
- 9 Hong SJ, Oh JH, Jeon EJ, Min KO, Kang MI, Choi SW, Rhyu MG. The overmethylated genes in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa are demethylated in gastric cancers. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 137 [PMID: 21092120 DOI: 10.1186/1471-230X-10-137]
- 10 钟晓刚, 殷舞, 黄顺荣. 幽门螺旋杆菌与残胃癌发生的研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 3200-3203
- 11 刘延兰, 刘小荣, 李晓琴. 幽门螺旋杆菌感染与慢性胃炎相关性研究. 甘肃医药 2010; 29: 662-663
- 12 宫月华. 胃癌高、低发区幽门螺杆菌基因型的差异分布及其与胃疾病的相关性. 中国医科大学, 2003
- 13 Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, Ichinose M, Tatematsu M, Ushijima T. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res* 2010; 70: 1430-1440 [PMID: 20124475 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2755]
- 14 王建旭, 冯义朝. 幽门螺杆菌感染与胃癌局部浸润的相关性. 世界华人消化杂志 2010; 18: 268-271
- 15 赵丹云. 幽门螺杆菌感染与慢性胃炎的相关性研究. 求医问药(下半月) 2012; 10: 8-9
- 16 刘延兰, 刘小荣, 李晓琴. 幽门螺旋杆菌感染与慢性胃炎相关性研究. 甘肃医药 2010; 29: 662-663

同行评价

本文内容实用, 讨论全面, 具有一定的学术价值。

编辑 田滢 电编 鲁亚静





Published by **Baishideng Publishing Group Co., Limited**
Flat C, 23/F., Lucky Plaza,
315-321 Lockhart Road, Wan Chai, Hong Kong, China
Fax: +852-3177-9906
Telephone: +852-6555-7188
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

