

幽门螺杆菌新毒素 Tip- α 对 IL-8、TNF- α 、IL-1 β 表达的影响

陈王凯,郝波,张国新,施瑞华,程文芳*

(南京医科大学第一附属医院消化科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究幽门螺杆菌(*H.pylori*,HP)毒素肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白(Tip- α)对细胞因子白介素(IL)-8、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-1 β 表达的影响及其意义。方法:从HP的26695菌株扩增位于*H.pylori*0596的Tip- α 基因,重组载体转化至大肠杆菌表达并纯化Tip- α 蛋白,用Western blot方法进行鉴定。以不同浓度的Tip- α 作用于胃上皮细胞GES-1,用ELISA方法检测不同时间点GES-1细胞中IL-8、TNF- α 、IL-1 β 表达变化。以四氢吡咯烷(PDTC,NF- κ B特异性的抑制剂)阻断NF- κ B信号通路后,检测Tip- α 作用GES-1后IL-8、TNF- α 、IL-1 β 的表达变化。结果:用Western blot检测纯化蛋白,抗Tip- α 抗体可与纯化蛋白特异性结合。Tip- α 刺激细胞后细胞因子IL-8、TNF- α 、IL-1 β 的表达水平较刺激前明显升高,刺激前后差别具有统计学意义($P < 0.05$)。PDTC作用后再给予Tip- α 刺激,细胞中IL-8、TNF- α 、IL-1 β 的表达水平与无PDTC作用组相比明显下降($P < 0.05$)。结论:Tip- α 可使细胞因子IL-8、TNF- α 、IL-1 β 表达明显升高,在HP致炎中起重要作用,这种作用可能通过NF- κ B途径。

[关键词] 幽门螺杆菌;Tip- α ;白介素-8;白介素-1 β ;肿瘤坏死因子- α ;核因子- κ B

[中图分类号] R573.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)10-1373-04

doi:10.7655/NYDXBNS20131008

Effects of tumor necrosis factor- α inducing protein on cytokines expression in *H.pylori*

Chen Wangkai, Hao Bo, Zhang Guoxin, Shi Ruihua, Cheng Wenfang*

(Department of Gastroenterology, the First Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of new tumor necrosis factor- α -inducing protein (Tip- α) on the expression of cytokines and its significance. **Methods:** Tip- α were amplified from genome sequence of *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) strain 26695. The recombinant plasmid was transformed into *E.coli*. The expression product was purified and confirmed by Western blot. After treated by different concentrations of Tip- α in different times, the level of cytokines (IL-8, TNF- α , IL-1 β) in GES-1 were detected by ELISA. They were also detected after NF- κ B was inhibited by pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC, the special inhibitor of NF- κ B). **Results:** It was confirmed by Western blot analysis that Tip- α antibody combined with purified proteins specifically. When the cells were treated with Tip- α , the levels of cytokines significant increased ($P < 0.05$). After NF- κ B was inhibited by PDTC, the levels of cytokines significant decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tip- α can promote the expression of cytokines(IL-8, TNF- α , IL-1 β), it may play an important role in the phlogogenic effect of HP, this effect may be NF- κ B signal pathway dependent.

[Key words] *H.pylori*; Tip- α ; interleukin-8; interleukin-1 β ; tumor necrosis factor- α ; nuclear factor- κ B

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(10): 1373-1376]

幽门螺杆菌(*H.pylori*,HP)已被认为是慢性胃炎、消化性溃疡、胃淋巴瘤的重要致病因子,并且被证实与胃癌有关^[1],国际癌症研究机构(IARC)已将HP列为人类 I 类致癌源^[2]。研究表明 HP 具有多种毒力因子,包括溶血素、脂多糖、CagA 及 VacA 等毒力因

子。这些毒素在 HP 持续感染过程中,可刺激胃上皮细胞产生大量细胞因子如肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白介素(IL)-1、IL-6、IL-8 等引起炎症反应,在 HP 致病过程中起重要作用^[3]。肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白(tumor necrosis factor- α inducing protein, Tip- α)是最近研究发现的一种新的 HP 毒素,可能参与了肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白致炎、致癌的过程^[4],但目前其参与的方式和作用机制仍不十分明了。本实验主要观察重组 Tip- α 对人胃上皮细胞GES-1 细胞因子表达

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金项目(08KJ3320003)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: chengwenfang@yahoo.com.cn

的影响,探讨其相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

*H.pylori*26695 菌株由上海市消化疾病研究所惠赠;Dual Promoter TA Cloning® Kit pCR® II vector 和载体 pET28a 质粒(Invitrogen 公司,美国);兔抗 Tip- α 单抗(北京奥维亚公司);限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 及蛋白预染 Marker (Fermentas 公司,美国);DNA 及质粒凝胶回收试剂盒(北京天根生物技术公司);DNA Marker (TaKaRa 公司,日本);His Trap™ *H.pylori* 亲和层析柱 (GE Healthcare 公司,美国);ECL 化学发光试剂盒(Pierce 公司,美国)。PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成:5'-TTG-GATCCATGCTGCAGGCTTG-3'(含 *Xho* I 酶切位点)和 5'-GGCTCGAGCTACATGGCTATAG-3'(含 *Bam*H I 酶切位点)。人胃黏膜上皮细胞株 GES-1(上海肿瘤细胞研究所);ELISA 试剂盒(上海联科生物有限公司);抗氧化剂四氢化吡咯二硫代氨基甲酸酯(pyrrolidine dithiocarbamate,PDTC,上海晶美生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 Tip- α 蛋白表达、纯化和鉴定

从 *H.pylori* 26695 菌株扩增位于 *H.pylori* 0596 的 Tip- α 基因,将 Tip- α 基因与 pET28a 载体(His 标签)同时经 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切、纯化及连接后,构建含有 Tip- α 的重组载体 pET28a-Tip- α , 重组载体转化至大肠杆菌并表达,表达产物以 Ni-NTA 亲和层析纯化,Western blot 进一步鉴定。

1.2.2 细胞复苏、培养和传代

冻存的 GES-1 细胞以 1 000 r/min 离心 5 min,去除上清后,种植在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,大小约 60 mm \times 60 mm 的培养皿中。

1.2.3 rTip- α 刺激 GES-1 细胞不同时间后细胞因子的表达变化

培养 GES-1 细胞达到对数生长期,用无血清培养液饥饿 24 h,给予 12.5 μ g/ml rTip- α 刺激 0、1、2、4、8 h,用 ELISA 方法分别检测 GES-1 细胞中 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 的表达,观察其有无时间依赖性。

1.2.4 不同浓度 rTip- α 刺激 GES-1 细胞后细胞因子表达变化

培养 GES-1 细胞达到对数生长期,用无血清培养液饥饿 24 h,分别以 0、12.5、25.0、50.0 μ g/ml 的

rTip- α 刺激细胞 2 h,然后用 ELISA 方法检测细胞因子 IL-8、TNF- α 、IL-1 β 的表达,观察有无浓度依赖性。

1.2.5 PDTC 阻断 NF- κ B 后,rTip- α 对 GES-1 细胞因子表达的影响

GES-1 细胞无血清培养液饥饿 24 h 后,分 4 组进行如下实验:A 组仅给予 rTip- α (12.5 μ g/ml 作用 2 h);B 组加入 PDTC 阻断 4 h 后,给予 rTip- α (12.5 μ g/ml 作用 2 h);C 组仅加入无血清培养液;D 组加入二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO,即 PDTC 的稀释液)。用 ELISA 分别检测 4 组细胞中细胞因子 IL-8、TNF- α 、IL-1 β 的表达。

1.3 统计学方法

计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS17.0 进行统计学处理,两组间比较用 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rTip- α 表达、纯化及 Western blot 鉴定

Western blot 结果显示,Tip- α 重组蛋白与抗人 Tip- α 单克隆抗体能特异结合,显示有特异性条带(23 000)和分子量为 46 000 的活性二聚体条带(图 1)。

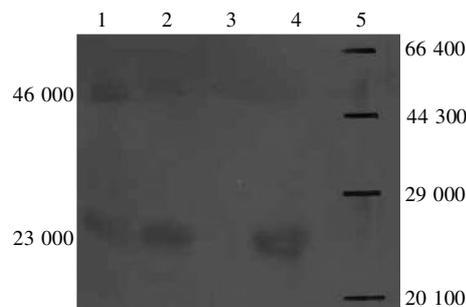


图 1 Western blot 鉴定 rTip- α 蛋白

Figure 1 Identification of rTip- α by Western blot

2.2 rTip- α 刺激 GES-1 细胞不同时间后细胞因子 IL-8、TNF- α 、IL-1 β 的表达变化

rTip- α (以同一浓度 12.5 μ g/ml)作用 GES-1 细胞 0、1、2、4、8 h 后,细胞中的细胞因子均在 2 h 时分泌达到最高峰,无时间依赖性(表 1)。

2.3 以不同浓度的 rTip- α 分别刺激 GES-1 细胞 2 h,检测细胞因子 IL-8、TNF- α 、IL-1 β 的表达变化

rTip- α 以不同的浓度(12.5、25.0、50.0 μ g/ml)作用 GES-1 细胞 2 h 后,与空白对照组相比 IL-8、TNF- α 、IL-1 β 的表达均明显增高,差异具有统计学意义

表 1 以 12.5 $\mu\text{g/ml}$ rTip- α 作用 GES-1 不同时间细胞因子的表达

Table 1 Cytokine levels after interferenced of GES-1 cells with 12.5 $\mu\text{g/ml}$ rTip- α for different times ($\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm s$)

细胞因子	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h
IL-1 β	0.34 \pm 0.04	0.88 \pm 0.09	2.07 \pm 0.30*	1.35 \pm 0.20	1.41 \pm 0.15
IL-8	0.35 \pm 0.05	0.60 \pm 0.12	0.84 \pm 0.11*	0.64 \pm 0.06	0.50 \pm 0.07
TNF- α	0.39 \pm 0.06	0.39 \pm 0.07	0.72 \pm 0.08*	0.53 \pm 0.03	0.51 \pm 0.14

与 rTip- α 作用 0 h 组比较, * $P < 0.05$ 。

($P < 0.05$)。以 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 浓度作用细胞时,细胞因子分泌达峰值,不随作用浓度增大而升高,无浓度依赖性(表 2)。

2.4 PDTC 阻断 NF- κ B 后, rTip- α 对 GES-1 细胞中细胞因子 IL-8、TNF- α 、IL-1 β 表达的影响

PDTC 阻断 NF- κ B 后的再加用 rTip- α 的 B 组 GES-1 细胞中细胞因子 IL-8、TNF- α 、IL-1 β 表达虽高于对照组(C、D 组),但明显低于 A 组(无 PDTC 处理仅加用 rTip- α), 差别具有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 3)。

表 2 不同浓度 rTip- α 刺激 GES-1 细胞 2 h 后细胞因子的表达

Table 2 Cytokine levels in GES-1 cells after interferenced with different concentrations of rTip- α for 2 h ($\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm s$)

细胞因子	rTip- α			
	0	12.5 $\mu\text{g/ml}$	25.0 $\mu\text{g/ml}$	50.0 $\mu\text{g/ml}$
IL-1 β	0.59 \pm 0.11	2.07 \pm 0.30*	2.00 \pm 0.09*	1.23 \pm 0.13*
IL-8	0.39 \pm 0.08	0.84 \pm 0.11*	0.75 \pm 0.09*	0.61 \pm 0.15*
TNF- α	0.30 \pm 0.06	0.72 \pm 0.08*	0.54 \pm 0.13*	0.63 \pm 0.10*

与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

表 3 不同处理组 rTip- α 对 GES-1 细胞因子 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 表达的影响

Table 3 Effects of rTip- α on the levels of IL-1 β , IL-8 and TNF- α in GES-1 cells under different conditions ($\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm s$)

细胞因子	A	B	C	D
IL-1 β	2.07 \pm 0.30 Δ	0.98 \pm 0.34* Δ	0.51 \pm 0.06	0.53 \pm 0.07
IL-8	0.84 \pm 0.11 Δ	0.59 \pm 0.08* Δ	0.38 \pm 0.08	0.39 \pm 0.07
TNF- α	0.78 \pm 0.08 Δ	0.46 \pm 0.03* Δ	0.27 \pm 0.03	0.29 \pm 0.04

与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 C、D 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

3 讨论

Tip- α 基因是近年发现 *H.pylori* 又一新的特有基因,它位于 *H.pylori* 26695 菌株的 0596 开放读码框,因此 Tip- α 又称 *H.pylori* 0596 蛋白。其开放阅读框有 519 bp,表达 173 个氨基酸,分子量为 19 000,通过二硫键形成有活性的同源二聚体^[4]。本研究中构建的 pET28a-Tip- α 载体中自带的标签部分有 34 个氨基酸,分子量约为 3 740,所以重组的 Tip- α 蛋白约 23 000,通过二硫键形成的同源二聚体约 46 000,具有生物活性。

目前研究发现 Tip- α 与 *H.pylori* 与胃黏膜吸附和定植有关^[5]。有人用基因芯片技术检测到:Tip- α 作用胃上皮细胞后,趋化因子 Cc12、Cc17、Cc120、Cx11、Cx15 的表达均增强^[6],这些趋化因子具有趋化作用,能吸引免疫细胞引起局部免疫,产生免疫调节和免疫病理作用,产生炎症反应^[7]。本实验研究结果显示 rTip- α 作用于胃上皮细胞,促进细胞因子

(包括 IL-8、TNF- α 、IL-1 β)的表达。

IL-8 可诱导中性粒细胞迁徙并穿过胃上皮细胞,明显增加钠离子的逆向扩散,并与组织基质中的糖原氨基聚糖相结合,形成并保持具有生物活性的浓度梯度,从而招致被趋化及活化的、以中性粒细胞为主的炎症细胞在局部聚集,引起粒细胞呼吸爆发,生成活性氧,造成组织炎症。

TNF- α 作为一种多功能的细胞因子,在正常情况下,具有抗肿瘤、抗感染等作用,对机体产生保护作用。但过量也可引起机体发热、休克、恶液质、组织器官出血性坏死等反应,参与一些疾病的发病机制, TNF- α 可通过对血管内皮细胞黏附分子 ICAM-1、ELAM-1、VCAM-a 等的表达上调,诱导内皮细胞产生血小板活化因子和趋化性细胞因子的功能。这些因素致使循环中淋巴细胞、单核巨噬细胞及中性粒细胞等与血管内皮细胞黏附,引起炎症反应。

IL-1 β 可以由多种细胞产生,是一个潜在的致炎细胞因子,参与宿主对多种抗原的反应^[8]。Ya-

maoka 等^[9]研究发现,HP 阳性者胃黏膜的 IL-1 β 含量显著高于 HP 阴性者,同时还发现 IL-1 β 含量与 HP 密度、黏膜中单核细胞、多核细胞浸润度呈显著正相关。IL-1 β 受体多位于胃壁细胞内,推测 IL-1 β 与其受体结合抑制胃酸分泌可能与 HP 急性感染和长期定居于胃黏膜的慢性感染时的低酸分泌有关。

IL-8 可活化中性粒细胞,活化的中性粒细胞又可分泌 IL-8、IL-1、IL-6、TNF- α 等细胞因子,此外 TNF- α 尚能协同 IL-1 β 、 γ -干扰素诱导 IL-8 产生^[10]。这样幽门螺杆菌新毒素 Tip- α 通过刺激 IL-8、TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子的产生,构成复杂的“细胞因子网络”,参与 HP 在胃黏膜的定植以及定植后对胃黏膜的炎症损伤^[11]。

在本实验中还发现 rTip- α 作用于细胞 2 h 后细胞因子表达最高,且以 12.5 μ g/ml 为最佳干预浓度,显示 rTip- α 促进细胞因子的表达无明显的时间依赖性和浓度依赖性。这提示 Tip- α 作用宿主的方式可能是通过 II 型分泌系统将毒素排泌于细菌的外环境,再以受体介导内吞方式进入宿主细胞而起作用,而不是通过 IV 型分泌系统将毒素注入宿主细胞内^[12-13]。也有学者观察到同样的现象,认为 Tip- α 是通过受体进入细胞而起作用的^[14]。最新研究表明,这个受体可能是核仁素^[15]。

PDTC 是 NF- κ B 特异性的抑制剂,主要通过抑制 NF- κ B p65 亚单位或抑制 I κ B 的降解,减少 NF- κ B 的核移位来抑制 NF- κ B 的活性^[16]。本实验以 PDTC 预处理胃上皮细胞后,再给予 rTip- α 刺激细胞,则细胞因子 IL-8、TNF- α 、IL-1 β 的表达无明显增加。这说明 Tip- α 促进细胞因子的表达受 NF- κ B 的调控,但明确的调控机制尚需进一步研究。

综上所述,Tip- α 能够促进炎症细胞因子的表达,在 *H.pylori* 的致病中起重要作用,其作用机制可能与 NF- κ B 有关。

[参考文献]

- [1] Correa P, Fox J, Fontham E, et al. Helicobacter pylori and gastric carcinoma. Serum antibody prevalence in population with contrasting cancer risks [J]. J Cancer, 1990, 66(12):2569-2574
- [2] International agency for research on cancer. Schistosomes, live flukes and Helicobacter pylori: IARC monographs on the evaluation on carcinogenic risks to humans [M]. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1994, 61:45-177
- [3] Crabtree J, Court M, Aboshkiwa M, et al. Gastric mucosal cytokine and epithelial cell responses to Helicobacter pylori infection in Mongolian gerbils [J]. J Pathol, 2004, 202(2):197-207
- [4] Suganuma M, Kurusu M, Suzuki K, et al. New tumor necrosis factor- α -inducing protein released from Helicobacter pylori for gastric cancer progression [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2005, 131(5):305-313
- [5] Ostrowski J, Drela N, Elzbieta K, et al. Tip-alpha (hp0596 gene product) is a highly immunogenic Helicobacter pylori protein involved in colonization of mouse gastric mucosa [J]. Curr Microbiol, 2008, 56(3):279-286
- [6] Kuzuhara T, Suganuma M, Kurusu M, et al. Helicobacter pylori-secreting protein Tip- α is a potent inducer of chemokine gene expression in stomach cancer cells [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2007, 133(5):287-296
- [7] Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors [J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18:217-242
- [8] Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease [J]. Blood, 87(6):2095-2147
- [9] Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, et al. Relation between clinical presentation, Helicobacter pylori density, interleukin 1beta and 8 production, and cagA status [J]. Gut, 1999, 45(6):804-811
- [10] van Deventer SJ, Hart M, van der Poll T, et al. Endotoxin and tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 release in humans [J]. J Infect Dis, 1993, 167(2):461-454
- [11] Suganuma M, Kuzuhara T, Yamaguchi K, et al. Carcinogenic role of tumor necrosis factor- α inducing protein of Helicobacter pylori in human stomach [J]. J Biochem Mol Biol, 2006, 39(1):1-8
- [12] Massari P, Manetti R, Burroni D, et al. Binding of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin to target cells [J]. Infect Immun, 1998, 66(8):3891-3984
- [13] Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, et al. Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion [J]. Science, 2000, 287(5457):1497-1500
- [14] Suganuma M, Yamaguchi K, Ono Y, et al. TNF- α -inducing protein, a carcinogenic factor secreted from H. pylori, enters gastric cancer cells [J]. Int J Cancer, 2008, 123(1):117-122
- [15] Watanabe T, Tsuge H, Imagawa T, et al. Nucleolin as cell surface receptor for tumor necrosis factor- α inducing protein; a carcinogenic factor of Helicobacter pylori [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(6):911-921
- [16] Liu SF, Ye X, Malik AB. Inhibition of NF- κ B activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents in vivo expression of proinflammatory genes [J]. Circulation, 1999, 100(12):1330-1337