

幽门螺杆菌通过 NF- κ B 信号通路调控胃上皮细胞自噬及凋亡的机制研究

沈书旭

(营口市中心医院医务部, 辽宁 营口 115001)

摘要:目的 研究幽门螺杆菌通过 NF- κ B 信号通路调控胃上皮细胞自噬及凋亡的机制。方法 体外培养幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 及人胃上皮 AGS 细胞株, 收集 Hp 处理 0 h、3 h、6 h、9 h 及对照组、18 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NF- κ B 特异性抑制剂 SN50 处理 6 h、18 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SN50 + Hp 处理 6 h 的 AGS 细胞, 利用流式细胞仪分别检测各组细胞的自噬率及凋亡率; 收集 Hp 梯度时间处理后的 AGS 细胞, 提取各组总蛋白, 蛋白质印迹法 (Western Blot) 检测自噬相关蛋白 Beclin1、微管相关蛋白 1 轻链 3 I (LC3 I)、微管相关蛋白 1 轻链 3 II (LC3 II)、凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 及 NF- κ B 通路相关蛋白 p65、p-p65 的表达。结果 AGS 细胞的自噬率与凋亡率均随着 Hp 作用时间的延长逐渐升高, 各时间点与 0 h 相比均差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 II、凋亡相关蛋白 Bax 及 NF- κ B 通路相关蛋白 p-p65 的表达随着 Hp 作用时间的延长逐渐增高, 自噬相关蛋白 LC3 I 及凋亡相关蛋白 Bcl-2 蛋白表达随着 Hp 作用时间的延长逐渐降低, 与 0 h 相比, 各检测时间点蛋白表达差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。NF- κ B 通路相关蛋白 p65 的表达未出现显著性变化 ($P > 0.05$)。与对照组相比 [$(6.56 \pm 1.40)\%$ 、 $(11.76 \pm 1.70)\%$], Hp 处理后, AGS 细胞自噬率 $(9.86 \pm 1.78)\%$ 与凋亡率 $(13.25 \pm 1.56)\%$ 显著增强 ($t_1 = 11.054, P_1 = 0.000; t_2 = 10.456, P_2 = 0.000$); SN50 处理后, AGS 细胞自噬率 $(19.65 \pm 2.14)\%$ 与凋亡率 $(28.65 \pm 2.14)\%$ 显著减弱 ($t_1 = 3.403, P_1 = 0.009; t_2 = 2.799, P_2 = 0.023$); Hp 与 SN50 联合处理后, AGS 细胞自噬率 $(20.65 \pm 2.14)\%$ 与凋亡率 $(29.65 \pm 2.14)\%$ 显著高于对照组, 但低于 Hp 单独处理组, 差异有统计学意义 ($t_1 = 5.164, P_1 = 0.001; t_2 = 5.890, P_2 = 0.000; t_3 = 4.718, P_3 = 0.002; t_4 = 5.738, P_4 = 0.000$)。结论 Hp 刺激显著促进 AGS 细胞的自噬与凋亡, 作用机制可能与 NF- κ B 通路的活化有关。

关键词: 幽门螺杆菌; 上皮细胞; 自噬; 细胞凋亡; NF- κ B

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2018.06.014

Regulation of autophagy and apoptosis of gastric epithelial cells by helicobacter pylori through NF- κ B signaling pathway

SHEN Shuxu

(Department of Medical Administration, The Central Hospital of Yingkou, Yingkou, Liaoning 115001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of the regulation of autophagy and apoptosis of gastric epithelial cells by helicobacter pylori (Hp) through NF- κ B signaling pathway. **Methods** Hp and human gastric epithelial cell lines AGS were cultivated in vitro, AGS cells were assigned into the control group, Hp treatment 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 18 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SN50 treatment 6 h, 18 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SN50 + Hp treatment 6 h. Flow cytometry was used to detect autophagy and apoptosis of cells in each group. AGS cells treated with Hp gradient time were collected and total protein was extracted from each group. Western blot was used to detect the expression of autophagy-related protein Beclin 1, microtubule-associated protein 1 light chain 3 I (LC3 I), microtubule-associated protein 1 light chain 3 II (LC3 II), apoptosis related protein B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) and NF- κ B pathway related proteins p65, p-p65. **Results** AGS cells autophagy and apoptosis rate increased gradually with prolonged duration of action of Hp; Hp treatment 3 h, 6 h, 9 h had significant differences compared with 0 h ($P < 0.01$). The expression of autophagy-related protein Beclin1, LC3 II, apoptosis-related protein Bax and NF- κ B pathway-associated protein p-p65 were gradually increased with Hp treatment prolongation. The expression of autophagy-related protein LC3 I and apoptosis-related protein Bcl-2 protein expression were gradually decreased with Hp treatment prolongation, the protein expressions at 3 h, 6 h, 9 h were significantly different compared with 0 h ($P < 0.01$). The expression of NF- κ B pathway-associated protein p65 had no significant change ($P > 0.05$). Compared with the control group [$(6.56 \pm 1.40)\%$, $(11.76 \pm 1.70)\%$], the autophagy $(9.86 \pm 1.78)\%$ and apoptosis $(13.25 \pm 1.56)\%$ of AGS cells were significantly enhanced after Hp treatment ($t_1 = 11.054, P_1 = 0.000; t_2 = 10.456, P_2 = 0.000$); after SN50 treatment, AGS autophagy $(19.65 \pm 2.14)\%$ and apoptosis $(28.65 \pm 2.14)\%$ were significantly attenuated ($t_1 = 3.403, P_1 = 0.009; t_2 = 2.799, P_2 = 0.023$). After combined treatment of Hp and SN50, AGS autophagy $(20.65 \pm 2.14)\%$ and apoptosis $(29.65 \pm 2.14)\%$ were significantly higher than those in the control group, but were lower than those in the Hp alone treatment group; the difference was significant ($t_1 =$

5.164, $P_1 = 0.001$; $t_2 = 5.890$, $P_2 = 0.000$; $t_3 = 4.718$, $P_3 = 0.002$; $t_4 = 5.738$, $P_4 = 0.000$). **Conclusions** Hp stimulation significantly promotes autophagy and apoptosis of AGS cells, the mechanism of which may be related to the activation of NF- κ B pathway.

Keywords: Helicobacter; Epithelial cells; Autophagy; Apoptosis; NF-kappa B

幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, Hp)感染是导致慢性胃炎及胃溃疡的主要因素,胃黏膜相关的淋巴组织癌变及胃癌的发生也与其息息相关,幽门螺杆菌已成为 I 类致癌因子^[1-2]。我国 Hp 感染率约为 53%,且呈上升趋势^[3],Hp 感染已严重威胁着人类的健康,目前尚未发现有效的、彻底清除 Hp 的方法,而且关于 Hp 的致病机制目前还不明确,因此深入探究 Hp 感染机制,揭示致病机制,对于找到有效治疗 Hp 感染的方法具有重要意义。

自噬是机体自我保护的免疫防御机制,参与调控机体的生长、分化、发育过程及多种疾病的发生过程,对抵抗病原体感染具有重要作用^[4-5]。凋亡是受基因调控的细胞程序性死亡进程,研究发现, Hp 感染阳性患者中胃黏膜细胞的凋亡率显著高于感染阴性的患者^[6]。细菌感染导致的自噬与凋亡可作为宿主细胞炎症发生的触发开关,但是关于 Hp 感染所致胃上皮细胞自噬与凋亡的机制还不清楚,本研究通过 Hp 体外感染人胃上皮细胞 AGS,研究了 Hp 感染对 AGS 细胞自噬与凋亡的关系,并结合 NF- κ B 特异性抑制剂 SN50 探讨了可能的作用机制,以期临床预防和治疗 Hp 感染提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 Hp 菌株购自美国 ATCC;人胃上皮细胞株 AGS 购自中国科学院上海细胞所;F12 培养基、胰蛋白酶购自美国 Hyclone;胎牛血清购自美国 Gibco;万古霉素(K0059)、多黏菌素(P1004)、吡啶橙(BNN2017)购自美国 Sigma;Beclin1、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 Associated X Protein, Bax)、p65、p-p65、 β -actin 单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的二抗均购自美国 Santa Cruz;Annexin V-FITC/PI 双染凋亡检测试剂盒购于 Biouniquer Technology;FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD;Sorcere Sorcere 全自动菌落计数仪购自英国 Sorcere;GDS7500 紫外凝胶成像分析系统购自美国 UVP。

1.2 方法

1.2.1 Hp 菌株培养 自液氮罐中取出冻存的 Hp 菌种,迅速置于 37℃ 水浴锅中轻轻震荡使其充分融化。3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后,吸取 50 μ L 后

弃去上清液,吹打混匀后划线将 Hp 接种至脑心浸液血琼脂平板,置于 37℃,微需氧(10% 二氧化碳、5% 氧气、85% 氮气)培养条件下培养 48 h。挑取菌落至 20 mL 无菌 Hp 液体培养基中,置于三气培养箱的摇床上,微需氧条件,37℃,100 r·min⁻¹ 培养 24~30 h。

1.2.2 胃上皮细胞 AGS 培养 自液氮罐中取出冻存的 AGS 细胞,迅速放入 37℃ 水浴锅中轻轻震荡使其充分融化,转移至离心管中与 F12 培养基混匀后离心收集细胞沉淀,使用新鲜的细胞培养基重悬沉淀,取重悬液加入含 10% 胎牛血清的 F12 细胞培养液中,置于 37℃,5% 二氧化碳培养箱中培养。待细胞贴壁生长至皿底 80% 时,弃去旧培养液,磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗后,0.25% 的胰蛋白酶消化并收集细胞,细胞培养液重悬后按 1:4 进行传代培养。

1.2.3 Hp 感染 AGS 细胞方法 取对数生长期的 AGS 细胞,0.25% 胰酶消化后离心收集细胞,细胞培养液重悬后显微镜下调整细胞浓度为 2×10^5 个/毫升,每孔 2 mL 接种于 6 孔板中,置于 37℃,5% 二氧化碳培养箱中培养。液体培养 Hp 24 h,紫外分光光度计检测细菌浓度($1A_{600} = 1 \times 10^8$ CFU·mL⁻¹)。待 AGS 细胞生长至皿底 80% 时,更换新鲜培养基,并按照细菌数:细胞数 = 100:1 加入 Hp 菌悬液,置于 37℃,5% 二氧化碳条件下共培养 0 h、3 h、6 h、9 h。

1.2.4 流式细胞仪检测 AGS 细胞自噬 分别向 Hp 时间梯度处理的 AGS 细胞、对照组 AGS 细胞、18 μ mol·L⁻¹ SN50 处理 6 h 的 AGS 细胞、18 μ mol·L⁻¹ SN50 + Hp 共处理 6 h 的 AGS 细胞中加入终浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的吡啶橙溶液,37℃ 避光孵育 15 min 后,0.25% 胰蛋白酶消化后收集细胞,PBS 清洗 1~2 次,向细胞中加入 100 μ L 预冷的 PBS 溶液重悬沉淀,流式细胞仪检测阳性荧光细胞率。

1.2.5 流式细胞仪检测 AGS 细胞凋亡 分别取 Hp 时间梯度处理的 AGS 细胞、对照组 AGS 细胞、18 μ mol·L⁻¹ SN50 处理 6 h 的 AGS 细胞、18 μ mol·L⁻¹ SN50 + Hp 共处理 6 h 的 AGS 细胞,0.25% 胰酶消化后显微镜下调整细胞浓度为 2×10^6 个/毫升,取 1 mL 细胞悬液离心并收集沉淀,PBS 清洗 2 次后,加入 500 μ L 结合缓冲液重悬细胞,加入 10

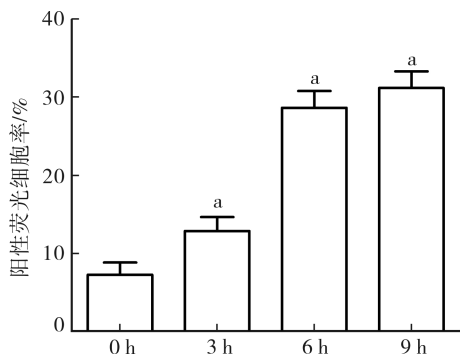
μL 磷脂结合蛋白 Annexin V-FITC 和 $5\ \mu\text{L}$ 碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 混匀, 室温避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.6 蛋白质印迹法检测蛋白表达 取 Hp 时间梯度处理的 AGS 细胞, 0.25% 胰酶消化后收集细胞沉淀, 加入细胞裂解液后冰上放置 30 min, $4\ ^\circ\text{C}$, $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 取上清液, BCA 法检测上清中的蛋白浓度。取 $50\ \mu\text{g}$ 蛋白按照体积比 4:1 加入 $5 \times$ 上样缓冲液, $100\ ^\circ\text{C}$ 煮沸 5 min 制备蛋白样品。蛋白上样后竖直电泳, $80\ \text{V}$ 电泳 30 min 后, 换用 $120\ \text{V}$ 继续电泳, 直至溴酚蓝跑出玻璃板。取出蛋白胶, 冰浴条件下 $100\ \text{V}$ 转膜, 5% 脱脂奶粉室温孵育 6 h, 分别加入相应的一抗 ($1:500$) $4\ ^\circ\text{C}$ 震荡培养过夜, TBST 洗涤液清洗后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 ($1:1\ 000$) $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 洗涤液清洗后加入 ECL 发光剂进行显影, 利用自动凝胶成像系统采集图像。

1.3 统计学方法 数据采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

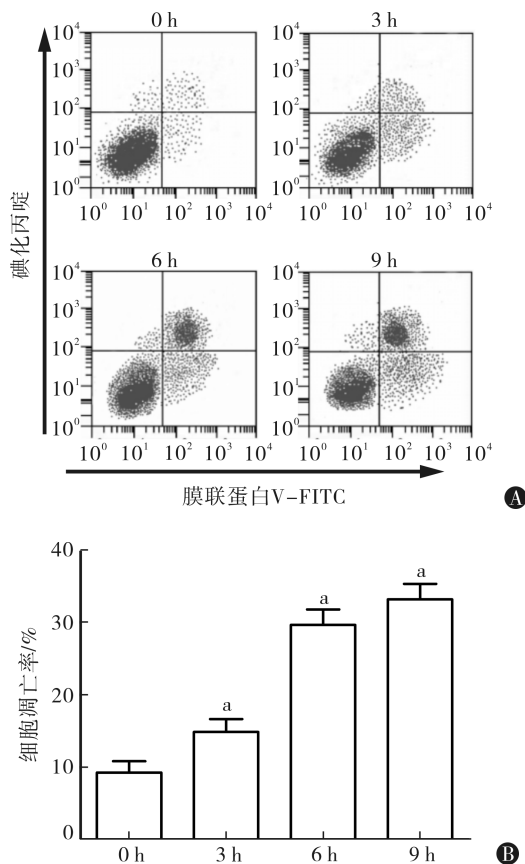
2.1 Hp 感染对 AGS 细胞自噬的影响 利用吖啶橙标记 Hp 刺激 0 h、3 h、6 h、9 h 的胃上皮 AGS 细胞, 流式细胞仪检测阳性荧光细胞率分别为 0 h (7.25 ± 1.56)%、3 h (12.86 ± 1.78)%、6 h (28.65 ± 2.14)%、9 h (31.19 ± 2.12)%, 统计结果如图 1 所示。4 个时间段整体比较差异有统计学意义 ($F = 112.723$, $P = 0.000$), Hp 刺激后 AGS 细胞自噬率随着 Hp 作用时间的延长逐渐升高, Hp 刺激 3 h、6 h、9 h 与 0 h 相比均差异有统计学意义 ($t_1 = 3.587$, $P_1 = 0.007$; $t_2 = 13.683$, $P_2 = 0.000$; $t_3 = 15.307$, $P_3 = 0.000$)。



注: 与 0 h 相比, $^a P < 0.05$

图 1 流式细胞仪检测 AGS 细胞自噬率

2.2 Hp 感染对 AGS 细胞凋亡的影响 收集 Hp 刺激 0、3、6、9 h 的 AGS 细胞, 流式细胞仪检测各时间点 AGS 细胞凋亡率分别为 0 h (9.25 ± 1.56)%、3 h (14.86 ± 1.78)%、6 h (29.65 ± 2.14)%、9 h (33.19 ± 2.12)%, 结果如图 2 所示。4 个时间段整体比较差异有统计学意义 ($F = 108.205$, $P = 0.000$), Hp 刺激后 AGS 细胞凋亡率随着 Hp 作用时间的延长逐渐增加, Hp 刺激 3 h、6 h、9 h 与 0 h 相比均差异有统计学意义 ($t_1 = 3.587$, $P_1 = 0.007$; $t_2 = 13.044$, $P_2 = 0.000$; $t_3 = 15.307$, $P_3 = 0.000$)。



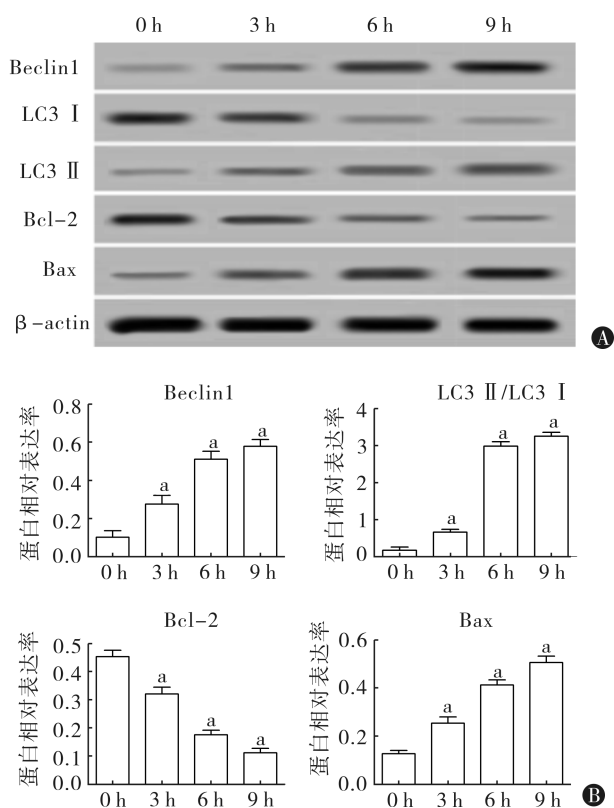
注: 与 0 h 相比, $^a t = 4.53 \sim 8.22$, $P = 0.001 \sim 0.004$

图 2 流式细胞仪检测 AGS 细胞凋亡率: A 为流式细胞仪检测 AGS 细胞凋亡; B 为细胞凋亡率统计

2.3 Hp 感染对自噬及凋亡相关蛋白表达的影响

收集 Hp 处理 0 h、3 h、6 h、9 h 的 AGS 细胞, 提取各组细胞总蛋白, 蛋白质印迹法检测各组细胞自噬及凋亡蛋白表达情况, 结果如图 3 所示。自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 II 及凋亡相关蛋白 Bax 的表达随着 Hp 刺激时间的延长逐渐增高, 其中 Hp 处理 0 h、3 h、6 h、9 h 时 Beclin1 的蛋白表达分别为 (0.103 ± 0.034)%、(0.276 ± 0.046)%、(0.512 ± 0.041)%、(0.579 ± 0.036)%, LC3 II/LC3 I 蛋白表达分别为 (0.179 ± 0.084)%、(0.667 ± 0.076)%、($2.987 \pm$

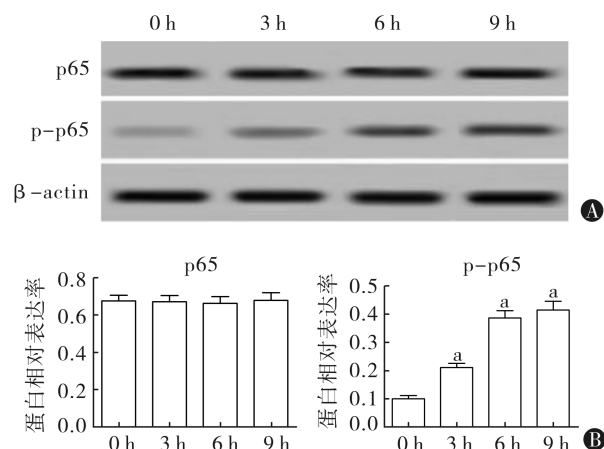
0.120)%、(3.253 ± 0.109)% , Bax 蛋白表达分别为(0.127 ± 0.014)%、(0.254 ± 0.026)%、(0.413 ± 0.021)%、(0.506 ± 0.026)% , Bcl-2 蛋白表达分别为0 h(0.453 ± 0.023)%、3h(0.321 ± 0.024)%、6 h(0.176 ± 0.016)%、9 h(0.112 ± 0.016)%。Hp 处理 3 h、6 h、9 h 时 Beclin1 的蛋白表达、LC3 II/LC3 I 蛋白表达、Bax 蛋白表达和 Bcl-2 蛋白表达分别整体比较均差异有统计学意义($F_1 = 92.140, P_1 = 0.000; F_2 = 759.672, P_2 = 0.000; F_3 = 170.437, P_3 = 0.000; F_4 = 172.688, P_4 = 0.000$)。三者表达均显著高于 0 h 时 Beclin1、LC3 II/LC3 I、Bax 的蛋白表达($t_{\text{Beclin1 } 3 \text{ h}} = 5.361, P_{\text{Beclin1 } 3 \text{ h}} = 0.001; t_{\text{Beclin1 } 6 \text{ h}} = 12.673, P_{\text{Beclin1 } 6 \text{ h}} = 0.000; t_{\text{Beclin1 } 9 \text{ h}} = 14.750, P_{\text{Beclin1 } 9 \text{ h}} = 0.000; t_{\text{LC3 II } 3 \text{ h}} = 6.044, P_{\text{LC3 II } 3 \text{ h}} = 0.000; t_{\text{LC3 II } 6 \text{ h}} = 34.779, P_{\text{LC3 II } 6 \text{ h}} = 0.000; t_{\text{LC3 II } 9 \text{ h}} = 38.073, P_{\text{LC3 II } 9 \text{ h}} = 0.000; t_{\text{Bax } 3 \text{ h}} = 6.975, P_{\text{Bax } 3 \text{ h}} = 0.000; t_{\text{Bax } 6 \text{ h}} = 15.708, P_{\text{Bax } 6 \text{ h}} = 0.000; t_{\text{Bax } 9 \text{ h}} = 20.816, P_{\text{Bax } 9 \text{ h}} = 0.000$), 而凋亡相关蛋白 Bcl-2 蛋白表达随着 Hp 作用时间的延长逐渐降低, 在 3 h、6 h、9 h 蛋白表达显著低于与 0 h 蛋白表达($t_{\text{Bcl-2 } 3 \text{ h}} = 8.041, P_{\text{Bcl-2 } 3 \text{ h}} = 0.000; t_{\text{Bcl-2 } 6 \text{ h}} = 16.873, P_{\text{Bcl-2 } 6 \text{ h}} = 0.000; t_{\text{Bcl-2 } 9 \text{ h}} = 20.772, P_{\text{Bcl-2 } 9 \text{ h}} = 0.000$)。



注:与 0 h 相比, $^a P < 0.05$

图3 蛋白质印迹法检测自噬及凋亡相关蛋白表达:A 为蛋白质印迹法检测蛋白表达;B 为蛋白相对表达统计

2.4 Hp 感染对 NF- κ B 通路蛋白表达的影响 Hp 作用于 AGS 细胞 0 h、3 h、6 h、9 h 后, 收集各组细胞提取各组总蛋白, 蛋白质印迹法检测各个时间点 p65、p-p65 蛋白表达变化, 并进行统计, 0 h、3 h、6 h、9 h 四个时间段内 p65 和 p-p65 的蛋白表达分别为(0.678 ± 0.030)%、(0.673 ± 0.034)%、(0.664 ± 0.037)%、(0.681 ± 0.041)%、(0.100 ± 0.011)%、(0.211 ± 0.015)%、(0.387 ± 0.026)%、(0.415 ± 0.031)% , 结果如图 4 所示。p65 蛋白表达在 0 h、3 h、6 h、9 h 间差异无统计学意义($F = 0.130, P = 0.940$), p-p65 蛋白表达在 0 h、3 h、6 h、9 h 蛋白表达具有明显变化, 整体比较差异有统计学意义($F = 134.791, P = 0.000$), 其中 Hp 作用 3 h 时即开始显著增高($t = 6.109, P = 0.000$), 其表达随着 Hp 作用时间的延长明显增强。

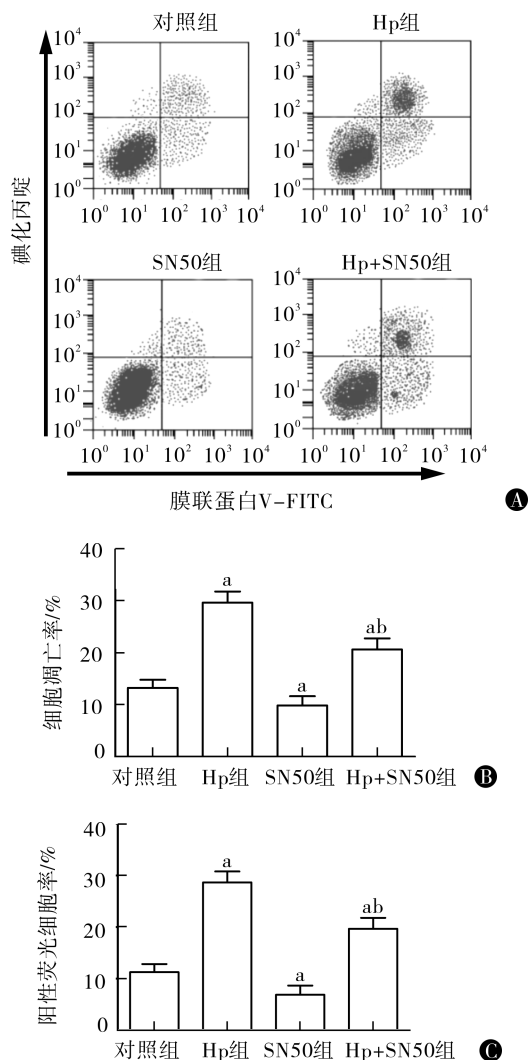


注:与 0 h 相比, $^a P < 0.05$

图4 蛋白质印迹法检测 NF- κ B 通路蛋白表达:A 为蛋白印迹法检测蛋白表达;B 为蛋白相对表达统计

2.5 Hp 感染联合 NF- κ B 抑制剂对 AGS 细胞自噬及凋亡的影响 为了检测 Hp 感染是否通过 NF- κ B 信号通路促进 AGS 细胞自噬与凋亡, 利用 NF- κ B 通路抑制剂 SN50 与 Hp 共处理 AGS 细胞 6 h, 并检测各组细胞的自噬及凋亡情况, 结果如图 5 所示。对照组、Hp、SN50 处理后以及 Hp 与 SN50 联合处理后 AGS 细胞自噬与凋亡率分别为(11.76 ± 1.70)%、(13.25 ± 1.56)%、(28.65 ± 2.14)%、(29.65 ± 2.14)%、(6.56 ± 1.40)%、(9.86 ± 1.78)%、(19.65 ± 2.14)%、(20.65 ± 2.14)% , 4 组 AGS 细胞自噬与凋亡率分别整体比较差异有统计学意义($F_1 = 79.582, P_1 = 0.000, F_2 = 67.421, P_2 = 0.000$)。与对照组 AGS 细胞自噬与凋亡相比, Hp 处理 AGS 细胞自噬与凋亡显著增强($t_1 = 11.054, P_1 = 0.000; t_2 = 10.456, P_2 = 0.000$); SN50 处理后,

AGS 细胞自噬与凋亡显著减弱 ($t_1 = 3.403, P_1 = 0.009; t_2 = 2.799, P_2 = 0.023$); Hp 与 SN50 联合处理后, AGS 细胞自噬与凋亡显著高于对照组, 但低于 Hp 单独处理组, 差异有统计学意义 ($t_1 = 5.164, P_1 = 0.001; t_2 = 5.890, P_2 = 0.000; t_3 = 4.718, P_3 = 0.002; t_4 = 5.738, P_4 = 0.000$)。



注: 与对照组相比, ^a $t = 5.46 \sim 8.34, P = 0.001 \sim 0.003$; 与 Hp 组相比, ^b $t = 4.23 \sim 8.56, P = 0.001 \sim 0.004$

图5 Hp 与 SN50 处理对细胞自噬与凋亡的影响: A 为流式细胞仪检测细胞凋亡; B 为细胞凋亡率统计; C 为细胞自噬率统计

3 讨论

自噬是在真核细胞中普遍存在的一种现象, 依赖于溶酶体的自我消化及再循环机制, 进化过程中高度保守^[7]。自噬的发生起始于自噬体的形成, 自噬体由细胞双层膜包裹待降解物形成, 自噬体形成后与溶酶体融合后被消化降解^[8]。自噬能平衡细胞合成和代谢, 起到稳定细胞内环境的作用, 自噬还参与调控细胞的固有免疫及获得性免疫应答过

程^[9-10]。

Hp 感染胃上皮细胞后, 细胞为了清除病原菌会诱发自噬的产生, 以降解病原体及其所分泌的毒性物质, 保护胃上皮细胞^[11]。吖啶橙能进入溶酶体和自噬体中并能发生质子化, 经吖啶橙标记的细胞无自噬溶酶体产生时呈现绿色, 反之则呈现红色, 流式细胞仪用于定量检测吖啶橙标记的阳性荧光细胞率, 即为细胞的自噬率^[12]。本研究通过吖啶橙标记 Hp 感染 0 h、3 h、6 h、9 h 的胃上皮 AGS 细胞, 流式细胞仪检测自噬细胞率, 结果显示, Hp 刺激 3 h 后, AGS 细胞即出现自噬现象, 细胞自噬率随着 Hp 作用时间的延长逐渐升高, 6 h 时细胞自噬率达到高峰, 随后开始下降, 说明细胞感染 Hp 早期即可快速启动自噬的发生, 以促进对病原菌的清除。Beclin 1 蛋白参与形成自噬前体, 引导与自噬相关的蛋白定位于自噬体膜上, 从而促进自噬的进行, 是调节自噬发生的重要因子, 其表达在一定程度上反应了自噬的活性^[13-14]。微管相关蛋白 (microtubule associate protein 1 light chain 3, MAP1-LC3) 主要定位于前自噬泡及自噬泡膜的表面, 参与形成自噬体, 是自噬体特异性标记蛋白^[15], LC3 分为 I 型和 II 型, 自噬发生时, LC3 蛋白主要以 I 型状态存在, 自噬发生时 I 型蛋白与自噬泡膜表面的 PE 结合形成 II 型蛋白, 结合到自噬体膜上^[16]。本研究结果显示自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 II 的表达逐渐随着 Hp 刺激时间的延长逐渐增高, LC3 I 蛋白表达随着 Hp 作用时间的延长逐渐降低, Hp 处理 6 h 对蛋白表达作用效果最显著。说明 Hp 感染 AGS 细胞后促进了自噬的发生。

细胞凋亡是细胞受基因调控的主动性死亡过程, 机体通过凋亡清除掉机体内衰老及畸形细胞^[17]。Hp 感染胃上皮细胞后, 会诱使凋亡的产生以清除病变细胞。利用 Annexin V-FITC/PI 双染色标记 Hp 感染 0 h、3 h、6 h、9 h 细胞, 流式细胞仪检测凋亡细胞, 结果显示, Hp 感染 3 h 细胞凋亡率出现显著增加, 6 h 时凋亡率变化最显著。Bcl-2 家族是调节细胞凋亡的关键原件, 其家族成员 Bcl-2 和 Bax 与细胞凋亡密切相关。Bcl-2 蛋白可能通过阻断细胞程序性死亡的一个早期环节阻遏细胞凋亡。Bax 蛋白在细胞中通过与 Bcl-2 蛋白形成二聚体, 使 Bcl-2 蛋白失活, 从而调控细胞凋亡^[18]。本研究结果显示, Hp 感染 3 h 后 Bax 的表达显著增加, 6 h 时变化最显著, Bcl-2 蛋白表达则随着 Hp 作用时间的延长逐渐降低。说明 Hp 感染 AGS 细胞后促进了凋亡的发生。

NF- κ B 信号通路广泛参与机体的感染、免疫及凋亡进程,被认为在慢性炎症转变为癌症的进程中具有重要作用^[19]。在未受到刺激时,NF- κ B 二聚体 p50/p65 与其抑制蛋白 I κ B α 形成多聚体,处于失活状态,细胞受到病原菌感染等刺激时,IKK 活化,使 I κ B α 发生磷酸化,无活性的多聚体降解,暴露出 NF- κ B 二聚体的核定位序列,二聚体进入核内,与靶蛋白结合,促进下游基因的表达^[20]。检测 Hp 感染对 NF- κ B 信号通路蛋白的影响,发现 Hp 感染能显著促进 p-p65 蛋白的表达,且随着刺激时间的延长蛋白表达也随之增强。说明 Hp 感染能影响 NF- κ B 信号通路蛋白的表达,为了进一步验证 Hp 感染是否通过 NF- κ B 信号通路调控 AGS 细胞的自噬与凋亡,本研究利用 NF- κ B 抑制剂 SN50 与 Hp 共同作用于 AGS 细胞,检测 AGS 细胞的凋亡与自噬的发生;结果发现,与对照组相比,Hp 处理 AGS 细胞自噬与凋亡显著增强;SN50 处理后,AGS 细胞自噬与凋亡显著减弱;Hp 与 SN50 联合处理后,AGS 细胞自噬与凋亡显著高于对照组,但低于 Hp 单独处理组,说明 Hp 感染导致的 AGS 细胞自噬与凋亡的增强与 NF- κ B 通路的活化有关。

综上所述,Hp 感染促进胃上皮细胞 AGS 的自噬与凋亡的发生,其作用机制与 NF- κ B 通路的活化有关,上述结果可能为临床开发新的预防与治疗 Hp 感染的药物提供理论依据。

参考文献

- [1] 吴善斌,于晓岩.幽门螺杆菌感染对老年患者胃部黏膜病理学的影响[J].中国老年学杂志,2016,36(13):3227-3228.
- [2] PLUMMER M,FRANCESCHI S,VIGNAT J,et al. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori* [J]. International Journal of Cancer,2015,136(2):487-490.
- [3] 项利娟,朱新建,黄德富,等.幽门螺杆菌感染调查与耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2015,25(8):1710-1711,1727.
- [4] KLIONSKY DJ,ABDELMOHSEN K,ABE A,et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. Autophagy,2016,12(1):1-222.
- [5] SHIBUTANI ST,SAITOH T,NOWAG H,et al. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system[J]. Nature Immunology,2015,16(10):1014-1024.
- [6] BOBBA A,AMADORO G,LA PIANA G,et al. Glycolytic enzyme upregulation and numbness of mitochondrial activity characterize the early phase of apoptosis in cerebellar granule cells[J]. Apoptosis,2015,20(1):10-28.
- [7] 王贇士,陈德喜,郭洪亮.自噬与肿瘤的研究现状[J].中华肿瘤防治杂志,2014,21(8):637-640.
- [8] MARIÑO G,NISO-SANTANO M,BAEHRECKE EH,et al. Self-consumption;the interplay of autophagy and apoptosis[J]. Nature reviews Molecular Cell Biology,2014,15(2):81-94.
- [9] ABDELAZIZ DH,KHALIL H,CORMET-BOYAKA E,et al. The cooperation between the autophagy machinery and the inflammasome to implement an appropriate innate immune response;do they regulate each other? [J]. Immunol Rev,2015,265(1):194-204.
- [10] OWCZARCYK AB,SCHALLER MA,REED M,et al. Sirtuin 1 regulates dendritic cell activation and autophagy during respiratory syncytial virus-induced immune responses[J]. The Journal of Immunology,2015,195(4):1637-1646.
- [11] CASTAÑO-RODRÍGUEZ N,KAAKOUSH NO,GOH KL,et al. Autophagy in *Helicobacter pylori* infection and related gastric cancer [J]. Helicobacter,2015,20(5):353-369.
- [12] 冯晓兰,王攀,王筱冰.通过抑制自噬作用增强声动力学疗法诱导的肿瘤细胞凋亡研究[J].中国生物医学工程学报,2015,34(1):62-69.
- [13] 李良庆,潘敦,林振孟.自噬相关基因 Beclin1 和微管相关蛋白轻链 3 在胃癌组织中的表达及临床意义[J].中华实验外科杂志,2014,31(3):508-510.
- [14] 张雨晴,张丽慧,魏尔清,等. Beclin 1 在凋亡和自噬中的调节作用[J].中国生物化学与分子生物学报,2015,31(4):331-338.
- [15] HUANG R,XU Y,WAN W,et al. Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation[J]. Mol Cell,2015,57(3):456-466.
- [16] SHARIFI MN,MOWERS EE,DRAKE LE,et al. Autophagy promotes focal adhesion disassembly and cell motility of metastatic tumor cells through the direct interaction of paxillin with LC3[J]. Cell Rep,2016,15(8):1660-1672.
- [17] 高薇,侯微,李伟,等.细胞凋亡机制研究进展[J].中国畜牧兽医,2014,41(10):150-156.
- [18] ZHAO B,HE T. Chidamide,a histone deacetylase inhibitor,functions as a tumor inhibitor by modulating the ratio of Bax/Bcl-2 and P21 in pancreatic cancer[J]. Oncol Rep,2015,33(1):304-310.
- [19] ZhONG Z,UMEMURA A,SANCHEZ-LOPEZ E,et al. NF- κ B restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria[J]. Cell,2016,164(5):896-910.
- [20] FANG L,CHOUDHARY S,TIAN B,et al. Ataxia telangiectasia mutated kinase mediates NF- κ B serine 276 phosphorylation and interferon expression via the IRF7-RIG-I amplification loop in paramyxovirus infection[J]. J Vir,2015,89(5):2628-2642.

(收稿日期:2016-10-08,修回日期:2018-03-19)