

幽门螺杆菌感染细胞模型的建立及感染相关 microRNAs 的筛选鉴定 *

刘 真¹ 贾赤宇¹ 肖 斌² 唐 彬² 黎伯胜² 毛旭虎² 邹全明^{2△}

(1 解放军 309 医院整形美容烧伤修复中心 北京 100091 2 第三军医大学临床微生物及免疫学教研室 重庆 400038)

摘要 目的:建立稳定的幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染人胃上皮细胞模型,筛选并鉴定 *H. pylori* 感染相关 microRNAs(miRNAs)的表达,为深入研究感染相关 miRNAs 的调控作用机制奠定基础。方法:将 *H. pylori* 标准株按 MOI=100:1 感染人胃上皮细胞,通过检测炎症细胞因子及炎症反应关键酶的表达综合评价感染模型;采用博奥公司 miRNAs V3.0 芯片分析细胞感染前后 miRNAs 表达谱变化,运用实时定量 PCR 技术和 Northern 杂交对表达显著差异的 miRNAs 进行分析鉴定。结果:*H. pylori* 感染细胞 24 h 后,细胞分泌促炎细胞因子 IL-8 显著升高($P<0.01$);启动炎症反应的关键酶 COX-2 的表达明显增加。芯片数据显示:*H. pylori* 感染引起超过 2 倍显著差异表达的 miRNAs 包括:表达上调的 PREDICTED-MIR191、miR-155、miR-92b、miR-30b、miR-146a、miR-16 等,和表达降低的 miR-181b、miR-324。实时定量 PCR 和 Northern 杂交结果显示感染相关 miR-155 和 miR-146a 在 *H. pylori* 感染细胞模型中表达均显著增加($P<0.01$)。结论:miR-155 和 miR-146a 在感染细胞模型中的表达增加提示二者可能参与 *H. pylori* 感染的免疫调控过程。

关键词 幽门螺杆菌;胃上皮细胞;microRNAs;感染

中图分类号 R373 Q75 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)01-18-04

Establishment of helicobacter pylori infection cell model and identification of infection-associated microRNAs*

LIU Zhen¹, JIA Chi-yu¹, XIAO Bin², TANG Bin², LI Bo-sheng², MAO Xu-hu², ZOU Quan-ming^{2△}

(1 Center of Plastic Surgery and Burn Repair, The 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China;

2 Department of Clinical Microbiology and Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT Objective: To establish stable gastric epithelium cells model infected by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), and to screen and identify *H. pylori* infection-related microRNAs (miRNAs) so as to investigate the regulatory mechanism of miRNAs. **Methods:** *H. pylori* were added to cells at a multiplicity of infection of 100:1. The infection model was monitored by the release of interleukin-8(IL-8) and the expression of COX-2. The expression profile of cellular miRNAs during *H. pylori* infection were analyzed by microarray (CapitalBio, Beijing). The significantly altered miRNAs were identified by the quantitative RT-PCR and Northern blot assays. **Results:** After the incubation of *H. pylori* with the gastric epithelium cells for 24h, IL-8 release and COX-2 protein expression in cells were detected. The expression of miRNAs could be significantly altered during *H. pylori* infection by microarray, including the up-regulation of PREDICTED-MIR191, miR-155, miR-92b, miR-30b, miR-146a, miR-16 and the down-regulation of miR-181b and miR-324. In consensus with the findings from microarray, miR-155 and miR-146a in infection models increased significantly ($P<0.01$). **Conclusion:** The upregulation of miR-155 and miR-146a in infection models implied that they may be involved in the immune regulation of *H. pylori* infection.

Key words: *Helicobacter pylori*; Gastric epithelium cells; MicroRNAs; Infection

Chinese Library Classification(CLC): R373, Q75 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)01-18-04

前言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤(MALT)等疾病的重要致病因子,与胃癌发生密切相关,现已造成全球 50%以上人口感染^[1]。*H. pylori* 感染能够引发足够的细胞免疫和体液免疫,但机体并不能有效清除它,感染状态常常持续存在,其免疫调控机制仍不甚清楚。新近发现的 microRNAs(miRNAs)是一类内源性非编码 RNA 分子,通过与靶 mRNA 3'-非翻译区(UTR)

互补结合或部分结合,诱导靶 mRNA 降解或抑制其翻译,从而实现转录后基因调控作用^[2]。miRNAs-mRNA 的全新基因调控网络为阐明病原体的感染机制提供了新的线索和方向。

作为机体抵抗病原微生物感染的一种重要防卫机制,由胃上皮细胞等固有免疫细胞产生的固有免疫应答在 *H. pylori* 感染早期开始执行防卫功能。本研究旨在建立稳定的 *H. pylori* 感染人胃上皮细胞模型,利用 miRNAs 芯片检测 *H. pylori* 感染后胃上皮细胞的 miRNAs 表达谱变化,筛选出表达明显差异的 miRNAs;采用实时定量 PCR 技术和 Northern 杂交对其在 *H.*

* 基金项目 国家自然科学基金(30770113)

作者简介:刘真(1979-),女,博士,主管技师,主要研究方向:感染与免疫。E-mail: lzdmd329@126.com

△通讯作者:邹全明 E-mail: xqmzoutmmu@163.com

(收稿日期:2010-10-07 接受日期:2010-10-31)

pylori 感染胃上皮细胞模型中的表达进行鉴定,为深入研究 *H. pylori* 感染相关 miRNAs 的免疫调控作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞与细菌来源 正常人胃上皮细胞株 GES-1 购自中国科学院上海细胞所, *H. pylori* 26695 菌株购自 ATCC。

1.1.2 主要试剂 Human IL-8 ELISA KIT(武汉博士德公司);抗 COX-2 一抗(美国 Santa Cruz 公司);抗 β -actin 一抗(美国 R&D 公司);酶标二抗(北京中衫公司);ECL Western blotting substrate(美国 Pierce 公司);miRNA reverse transcription Kit、TaqMan miRNA Assay(美国 Applied Biosystems);MiRNA Northern Blot Assay Kit、Hsa-miR-155 antisense probe、Hsa-miR-146a antisense probe、Hsa-U6 antisense probe(美国 Signosis 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 感染细胞模型的建立 *H. pylori* 26695 标准菌株液体培养至对数生长期,离心收集细菌,用无抗生素 RPMI 1640 培养基制备 *H. pylori* 细菌悬液,通过测定 A600 吸光度值调整细菌浓度($1A_{600}=1 \times 10^8$ cfu/ml)。以含 10% 小牛血清的 RPMI 1640(青霉素 100 U/ml,链霉素 100 U/ml)为完全培养基,培养人胃上皮细胞株 GES-1。待 GES-1 细胞贴壁生长至 80% 时,弃掉培养基。按照感染复数(multiplicity of infection, MOI=细菌数/细胞数)为 100:1 加入 *H. pylori* 菌悬液,37℃、5% CO₂ 的条件下共培养。

1.2.2 炎症因子水平的检测 GES-1 细胞与 *H. pylori* 共培养 24 h 后,收集感染组与对照组细胞培养上清,离心取上清,ELISA 检测炎症因子白细胞介素 8(Interleukin-8, IL-8)的表达水平,按试剂盒说明书操作。

1.2.3 COX-2 蛋白水平的检测 GES-1 细胞与 *H. pylori* 共培养 24 h 后,制备蛋白样本,BCA 法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳分离目的蛋白,经过电转移蛋白质、染色、封闭、洗涤、与一抗、二抗分别反应,最终显色。按 1:1 混合 Substrate A and B,将 1.8 ml 混合液滴加在膜上反应 5 min,置于化学发光仪器上检测。

1.2.4 芯片检测 *H. pylori* 感染 GES-1 细胞前后 miRNAs 表达谱检测由北京博奥生物有限公司提供芯片技术, GenePix Pro 5.0 和 BIOCONDUCTOR 软件进行数据归一化处理, SAM 2.1 软件进行统计学分析。

1.2.5 Real-time PCR 检测 miRNAs 的表达 用 Trizol 试剂提取总 RNA,调整 RNA 浓度至 10 ng/ul,经 miRNA reverse transcription Kit 逆转录成 cDNA,根据 miRNAs 的特异引物和反向引物进行 TaqMan 探针定量 PCR,95℃ 反应 2 min,95℃ 15 sec,60℃ 30 sec 反应 40 个循环,以 U6 小 RNA 为内参对照,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法处理数据。

1.2.6 Northern blot 鉴定 miRNAs 的表达 用 Trizol 试剂提取总 RNA,经聚丙烯酰胺凝胶电泳、RNA 转膜、固定,与生物素标记探针杂交(探针序列: Hsa-miR-155 5'-ACCCCTATCAC-GATTAGCATTA-3'; Hsa-mi R-146a 5'-AACCCATGGAATT-CAGTTCTCA-3'; Hsa-U6 5'-ATATGGAACGCTTCACGAATT

-3',参考 miRBase 数据库 <http://www.mirbase.org>)。经封闭、与 Streptavidin-HRP、1× Detection wash buffer 反应;最终检测按 1:1 混合 Substrate A and B,将 1.8 ml 混合液滴加在膜上反应 5 min,置于化学发光仪器上检测。

2 结果

2.1 *H. pylori* 感染 GES-1 细胞前后 IL-8 的水平检测

为评价模型的感染效率,我们采用 Human IL-8 ELISA KIT 检测感染细胞前后培养上清 IL-8 的浓度。结果表明 *H. pylori* 感染明显诱导 GES-1 细胞分泌促炎细胞因子 IL-8 ($P<0.01$) (图 1)。

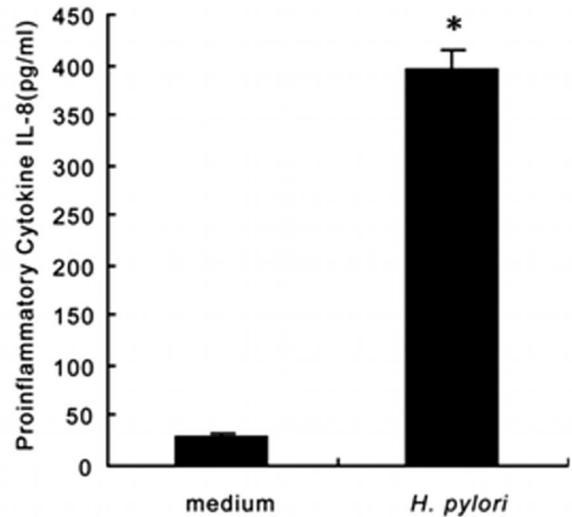


图 1 *H. pylori* 感染 GES-1 24h 前后 IL-8 的分泌

Fig.1 Increased IL-8 release of GES-1 cells infected with *H. pylori* for 24 h

2.2 *H. pylori* 感染 GES-1 细胞前后 COX-2 的表达分析

为进一步验证感染细胞模型的成功建立,我们采用 Western blot 方法检测模型中启动炎症反应的关键酶 COX-2 的表达。结果表明,COX-2 在对照组细胞中无表达,而 *H. pylori* 感染则明显增加 GES-1 细胞 COX-2 表达(图 2)。

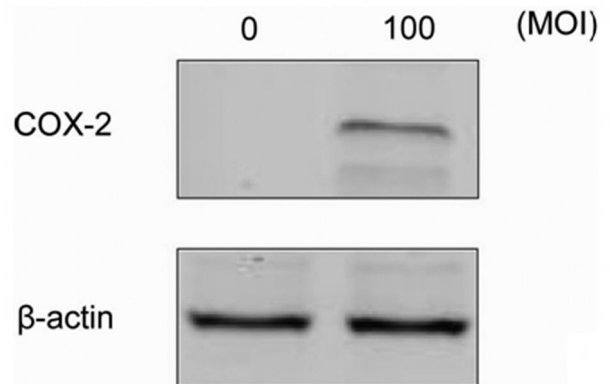


图 2 *H. pylori* 感染 GES-1 24h 前后 COX-2 的表达

Fig.2 Expression of COX-2 of GES-1 cells infected with *H. pylori* for 24 h

2.3 *H. pylori* 感染后胃上皮细胞 miRNAs 表达谱的变化

我们采用博奥公司的 miRNAs V3.0 芯片,其共含有 924 条探针,包括人、大鼠和小鼠的成熟 miRNAs 的互补序列,同时

还包括 122 条预测的人 miRNAs 探针。我们以 GES-1 细胞感染 H. pylori 24 h 为实验组 ,GES-1 细胞设为对照组 ,分析二者 microRNA 表达谱的变化 ,寻找显著上调或下调的 miRNAs。对 5 组样品的芯片检测数据进行聚类分析 ,结果表明 H. pylori 感

染引起了一系列的 miRNAs 的表达改变 ,上调或下调超过 2 倍显著差异表达的 miRNAs 包括 :表达上调的 PREDICT-ED-MIR191、miR-155、miR-92b、miR-30b、miR-146a、miR-16 等 ,和表达降低的 miR-181b、miR-324(表 1)。

表 1 H. pylori 感染 GES-1 细胞后差异表达的 miRNAs
Table 1 miRNAs expressed differentially in GES-1 cells infected with H. pylori

miRNA	Fold change	Chromosome location
Increased expression >2 fold		
PREDICTED_MIR191	16.8	chr 13
miR-155	2.81	chr 21
miR-92b	2.56	chr 1
miR-30b	2.52	chr 8
miR-146a	2.46	chr 5
miR-16	2.37	chr 13
Decreased expression <0.5 fold		
miR-181b	0.48	chr 1
miR-324	0.39	chr 17

2.4 miR-155 和 miR-146a 的差异表达鉴定

为了验证 miRNAs 芯片结果的可靠性 ,我们选取用于芯片分析的部分 RNA 样品 ,利用 miRNAs 特异性逆转录试剂盒及 Taqman 探针荧光定量 PCR 试剂盒 ,进行 miR-155 和 miR-146a 的定量检测。采用 2-△△CT 相对定量方法分析所得数据 ,Real-time PCR 结果与芯片结果一致 ,miR-155 和 miR-146a 分别上调了 3.0 和 2.5 倍(P<0.01)(图 3)。我们还利用 Northern blot 技术对感染模型中两种 miRNA 的表达进行分析 ,结果显示 H. pylori 感染能够诱导 miR-155 和 miR-146a 的表达上调 ,其结果与芯片结果、Real-time PCR 结果相一致(图 4)。

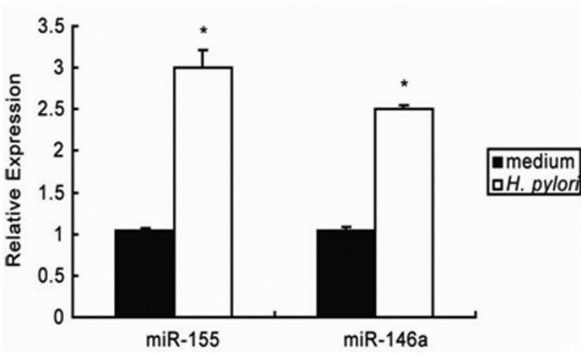


图 3 Real-time PCR 鉴定差异表达的 miRNAs
Fig.3 Identification of altered miRNAs by Real-time PCR

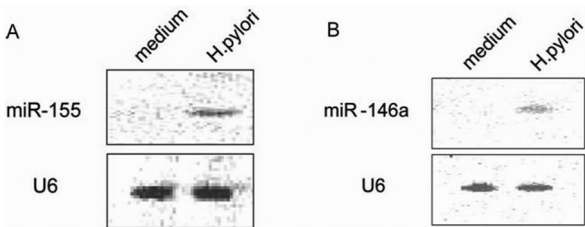


图 4 Northern blot 鉴定差异表达的 miRNAs
Fig.4 Identification of altered miRNAs by Northern blot

3 讨论

3.1 感染模型的建立

建立 H. pylori 感染人胃上皮细胞体外模型是研究感染相关免疫学及细胞生物学特性的重要前提 ,研究人员目前研究 H. pylori 与胃黏膜上皮细胞相互作用关系的体外模型 ,普遍运用胃腺癌细胞系 ,如 AGS、MKN-45、HGC-27、MCG-823 和 SGC-7901 等^[3] ,这些细胞系在进化过程中形成了自身的受体系统 ,其遗传学背景与胃黏膜上皮细胞存在差异 ,而在受体配体相互作用、细胞信号转导等方面很可能出现调节失常 ,很难真实模拟 H. pylori 与胃黏膜上皮细胞间的相互作用过程。人永生 化胃上皮细胞系 GES-1 ,是 1992 年柯杨等^[4-5]以原代培养的胎 儿正常胃黏膜上皮细胞为基础 ,用 SV40 病毒感染转化而建立 的永生 化细胞系 ,该细胞无成瘤性 ,为深入研究胃上皮细胞相 关生物学特性提供重要的模式系统。

本研究中 ,我们以 GES-1 为靶细胞 ,与 H. pylori 26695 标 准株共同培养 24 h ,以 H. pylori 感染为选择压力 ,分析比较感 染细胞与平行对照细胞的生物学特征 ,为深入研究 H. pylori 感 染与免疫的调控机制提供可靠前提。我们分别从炎性因子分 泌、炎症反应关键酶表达等方面评价感染模型。分析胃上皮细 胞的生物学行为发现 ,与对照组比较 ,细胞分泌大量炎性细胞 因子 IL-8 ,且炎症反应关键酶 COX-2 表达明显增加。研究报 道 ,H. pylori 感染能使胃黏膜中 IL-8 及 COX-2 的 mRNA 和蛋 白表达均明显增强^[6-9]。我们的结果与之相符 ,证实模型成功建 立。

3.2 microRNA 与免疫

microRNA(miRNA)是近年来在多种真核细胞及病毒中发 现的一类来自内源性染色体上的非编码单链 RNA ,在进化上 具有高度的保守性 ,能够通过与靶 mRNA 特异性的碱基互补 配对 ,引起靶 mRNA 降解或者翻译抑制 ,从而对基因进行转录

后的表达调控。miRNA 表达具有空间和时间上的特异性,是调控其他功能基因表达的重要分子,在各种生物学行为中发挥十分重要的作用。近年来,miRNAs 在免疫系统的作用被人们逐步认识。区别于其他免疫调节因素"有"或"无"的特点,miRNAs 在复杂系统中发挥重要作用主要表现在数量和程度上影响其靶基因,进而在免疫应答各个水平执行精细的微调功能。

固有免疫是机体在长期的种系发育与进化过程中逐渐形成的一种天然免疫防御功能,是宿主抵御病原微生物入侵的第一道防线。研究表明,miRNAs 的表达作为细胞接收外源或内源压力信号后的一种早期反应,参与了固有免疫应答过程。miRNAs 与固有免疫应答的关系大致分为三类:其一,TLRs 及相关细胞信号通路对 miRNAs 的表达具有调节作用。其二,miRNAs 参与对 TLR 信号通路的调节。其三,miRNAs 可直接调控炎症介质的表达。因此,miRNAs 的发现为我们展示了一个全新的免疫调控机制。

3.3 microRNA 与 H. pylori 感染

H. pylori 感染引起的炎症反应虽然是其重要致病因素之一,但是很多感染者却没有明显的临床症状。在 H. pylori 与人类长期共存的过程中,相互构成了一个复杂的网络,以精细调控 H. pylori 感染的免疫反应,目前已发现的免疫调控因素有:调节性 T 细胞、抑制型细胞因子、交叉抗原的免疫逃避等,但是确切的免疫调控机制仍不清楚^[10]。我们采用 miRNAs 芯片筛选 H. pylori 感染胃上皮细胞前后表达变化的 miRNAs,为阐明其在感染炎症反应中的调控作用奠定基础。芯片结果显示,一系列 miRNAs 表达在感染前后出现明显变化,其中包括 miR-155 和 miR-146a。研究报道,miR-155 和 miR-146a 参与了机体免疫反应调控,如 T、B 淋巴细胞分化、正常免疫功能维持等^[11-12],我们决定以 miR-155 和 miR-146a 为研究对象,深入探讨其在 H. pylori 感染中的调控机制。通过 Realtime-PCR 和 Northern blot 两大 miRNAs 鉴定的金标准,我们对感染模型中的 miR-155 和 miR-146a 表达进行鉴定,其结果均与芯片结果一致,二者在 H. pylori 感染后被诱导上调,提示 miR-155、miR-146a 可能参与了 H. pylori 感染的免疫调控过程,为进一步探讨 H. pylori 感染的免疫调控机制提供新的思路。

参考文献(References)

- [1] Cover TL, Blaser MJ. Helicobacter pylori infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implications for eradication and prevention[J]. Adv Intern Med, 1996;41:85-117
- [2] Du T, Zamore PD. Microprimer: the biogenesis and function of microRNA[J]. Development, 2005, 132(21): 4645-4652
- [3] Odenbreit S, Puls J, Sedimaier B, et al. Translocation of Helicobacter pylori CagA protein in gastric epithelial cells by type IV secretion[J]. Science, 2000, 287:1497-1500
- [4] 柯杨,宁涛,高燕等,人胃粘膜上皮细胞原代培养及其生物学鉴定[J]. 解剖学报,1992,23(4):384-389
Ke Yang, Ning Tao, Gao Yan, et al. Primary culture and biological identification of human gastric epithelial cells [J]. Acta Anatomica Sinica, 1992,23(4):384-389(In Chinese)
- [5] 柯杨,宁涛,王冰等,人胃粘膜上皮细胞系 GES-1 的建立及其生物学特性[J]. 中华肿瘤杂志,1994,16(1):7-10
Ke Yang, Ning Tao, Wang Bing, et al. Establishment of human gastric epithelial cells GES-1 and its biological characteristics [J]. Chinese Journal of Oncology, 1994,16(1):7-10(In Chinese)
- [6] Fan XG, Chua A, Fan SJ, et al. Increased gastric production of interleukin-8 and tumour necrosis factor in patients with helicobacter pylori infection[J]. J Clin Pathol, 1995;48: 133
- [7] Uefuji K, Ichikura T, Schinomiya N, et al. Induction of apoptosis by JTE2522, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, in human gastric cancer cell lines[J]. Anticancer Res, 2000,20 (5):4279 - 4284
- [8] Guo XL, Wang LE, Du SY, et al. Association of cyclooxygenase-2 expression with Hp cagA infection in gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2003,9 (4): 246 - 249
- [9] Sung JJ, Leung WK, Go MY, et al. Cyclooxygenase-2 expression in Hp associated premalignant and malignant gastric lesions [J]. Am J Pathol, 2000,157 (3): 729 - 735
- [10] D'Elia MM, Andersen LP. Helicobacter pylori inflammation, immunity, and vaccines[J]. Helicobacter, 2007, 12 (1):15-19
- [11] Taganov KD, Boldin MP, Baltimore D. MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field[J]. Immunity, 2007, 26:133-137
- [12] Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation[J]. Semin Cancer Biol, 2008,18:131-140