

DEC205 在幽门螺杆菌感染胃上皮细胞中的表达 *

魏晓晴¹ 吕广艳¹ 金海威² 崔颖¹ 赵莹^{1△}

(1 辽宁省医学细胞分子生物学重点实验室 辽宁 大连 116044; 2 大连医科大学口腔医学院基础教研室 辽宁 大连 116044)

摘要 目的:探讨幽门螺杆菌及其热休克蛋白 60 (H. pylori-HSP60) 感染与胃上皮细胞表面 DEC205 受体的关系。**方法:**分别用 H. pylori、H. pylori-HSP60 及 E.coli LPS 刺激胃上皮细胞 KATO III, 利用免疫荧光染色技术观察 KATO III 细胞表面 DEC205 蛋白的表达变化, 再利用 RT-PCR 技术, 观察细胞中 DEC205 mRNA 对上述抗原刺激后的变化。**结果:** H. pylori、H. pylori-HSP60 及 E. coli LPS 的刺激明显引起细胞表面 DEC205 蛋白的表达以及细胞内 DEC205 mRNA 的产生。**结论:** H. pylori 感染与胃上皮细胞表面的胞吞受体 DEC205 有着密切的关系。

关键词: H. pylori; DEC205; 胃上皮细胞

中图分类号: R378.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273 (2011) 21-4033-03

Expression of DEC205 in Helicobacter pylori-Infected Human Gastric Epithelial Cells *

WEI Xiao-qing¹, LV Guang-yan¹, JIN Hai-wei², CUI Ying¹, ZHAO Ying^{1△}

(1 Provincial Key Laboratory of Cell and Molecular Biology, Dalian, Liaoning, 116044, China;

2 Department of Basic, Stomatology of College, Dalian Medical University, Dalian, 116044, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between Helicobacter pylori and its heat shock protein 60 (H. pylori-HSP60) infection and human gastric epithelial cells of DEC205. **Methods:** After human gastric epithelial cells (KATO III cells line) were infected with H. pylori, H. pylori-HSP60 and E.coli LPS. The expression of DEC205 protein on the surface of KATO III cells was observed by immunofluorescence staining. The expression of DEC205 mRNA in KATO III cells was observed by RT-PCR. **Results:** The expression of DEC205 protein and mRNA were markedly increased following H. pylori, H. pylori-HSP60 and E.coli LPS stimulation in KATO III cells. **Conclusion:** H. pylori infection may be closely related with the expression of DEC205 in human gastric epithelial cells.

Key words: H. pylori-HSP60; DEC205; Gastric epithelial cells

Chinese Library Classification: R378.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)21-4033-03

前言

幽门螺杆菌 (Helicobacter pylori, H. pylori) 的慢性感染是慢性活动性十二指肠溃疡、胃十二指肠溃疡、胃淋巴瘤以及胃癌发生发展的重要致病因子^[1]。但是通过胃上皮细胞引起的细菌局部获得性免疫机制至今还不是很清楚。DEC205 属于甘露糖家族中 C 型凝集素超家族中的一个亚族, 与 B 细胞一样存在于巨噬、胸腺、肺及肠上皮细胞表面^[2]。DEC205 作为树枝状细胞表面的膜糖蛋白, 具有抗原提呈作用, 能够诱导抗原特异性 T 细胞免疫^[3]。人类的 DEC205 是一个 200kDa 的糖蛋白, 表达于胸腺、树突状细胞及少量 T 细胞中^[4]。然而, DEC205 在胃粘膜的分布仍然不清楚。Yamasaki 等^[5]曾报道 H pylori-HSP60 刺激外周血单核细胞后, 胃炎患者的 DEC205 的 mRNA 的表达明显增高。我们也已经报道了 H pylori 的刺激能够明显增强 DEC205 在单核细胞中的表达, 而 H pylori 和 H pylori-HSP60 的刺激能够明显增强 DEC205 在巨噬细胞中的表达^[6]。本研究调查了胃上皮细胞中 H pylori 感染与 DEC205 表达的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

H. pylori (ATCC 43504) 购于美国标准菌库, 细菌培养使用含有 7% 无菌、不含纤维蛋白的马血脑心浸液琼脂培养基, 在含有 10% CO₂, 5% O₂ 和 85% N₂ 的微需氧培养箱中培养。经过 3 天的培养, H. pylori 以 OD₆₀₀=1.0 (相当于 1×10⁸ 个细菌/mL) 数量移至不含胎牛血清的 RPMI1640 (GIBCO 公司) 培养液中。细胞培养在含有 10% 胎牛血清, 50U/mL 青霉素, 50U/L 链霉素和 2.5μg/mL 两性霉素 B 的 RPMI 1640 培养液中, 在 37℃、50mL/L CO₂ 和 99% 湿度的温箱中。在每次实验之前, 细胞被不含任何抗体的 RPMI1640 培养液清洗 3 次, 并将细胞数量维持在 2×10⁶ cells/mL。DEC205 抗体购于 BD 公司。TRITC-IgG 购于 MP Biomedicals 公司。逆转录分析使用 SuperScript™ III First-Strand Synthesis System。LAS-1000 mini 图像分析系统为 Fuji 公司。Image Gauge Ver. 4.0 软件为 Fuji 公司。

1.2 方法

* 基金项目: 辽宁省教育厅 2009 年度高等学校科研项目计划资助项目 (2009A195)

作者简介: 魏晓晴 (1981-), 女, 硕士, 助教, 研究方向: 幽门螺杆菌与胃疾病关系的研究

△通讯作者: 赵莹, Email: zhaoying2000@yahoo.com.cn, Tel: 0411-86110291-603

(收稿日期: 2011-06-07 接受日期: 2011-06-30)

1.2.1 蛋白纯化 通过 PCR 技术构建 *H. pylori*-HSP60 基因重组表达载体 pEGX-5X3, 经大肠杆菌 DH5 α 表达得到可溶性 GST 融合蛋白, 采用谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 进行分离与纯化, 经氨基酸序列测序确定其蛋白的一源性。

1.2.2 免疫荧光细胞染色 细胞爬片首先用 4 C 丙酮固定 15 分钟, 置 PBS 中浸泡 10 分钟后, 用含有 10%BSA 的 PBS 室温封闭 30 分钟。然后分别加入鼠抗人的 DEC205 抗体 37 C 下孵育 1 小时, PBS 洗 3 次, 每次 10 分钟, 加入 TRITC 标记的牛抗鼠的 IgG 二抗室温下孵育 1 小时, PBS 洗 3 次, 每次 15 分钟。DAPI 染色 30 分钟后, PBS 洗涤, 用抗荧光猝灭剂封片后, 荧光显微镜观察结果并拍照。

1.2.3 RT-PCR 用 *H. pylori*、*H. pylori*-HSP60 及 *E.coli* LPS 刺激 KATO III 细胞。利用 RNeasy Mini kit 从 3 106 KATO III 细胞中进行总 RNA 提取。RNA 的浓度, 通过 A₂₆₀ 值测定, 根据 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值, 推测 RNA 纯度。提取的 RNA 保存于 -80℃ 直至使用。在确认 RNA 提取过程中没有 DNA 的污染后, 利用逆转

录酶, 进行逆转录分析, 然后实行 PCR。DEC205 引物序列为 5'-CAAATTCCAAAAGGCCGTACTC-3'; 5'-CACCACCTTCTGTCCATCACCA-3'。G3PDH 引物序列为 5'-CAACG-GATTTGGTCGTATTGG-3'; 5'-CTGGAAGATGGTGATGGGA-TTT-3'。DEC205 或 G3PDH 的条带灰度值分析于 Image Gauge Ver. 4.0 软件。

2 结果

2.1 *H. pylori*、*H. pylori*-HSP60 和 *E.coli* LPS 诱导了上皮细胞表面 DEC205 蛋白的表达

2 $\times$ 10⁶/mL KATO III 细胞经 5 $\times$ 10⁷/mL *H. pylori*、100 g/mL *H. pylori*-HSP60 或 10 g/mL *E. coli*-LPS 刺激后过夜培养, 细胞爬片用 DEC205 抗体进行免疫荧光染色分析。H *pylori*、H *pylori*-HSP60 和 *E. coli*-LPS 的刺激明显引起了细胞表面 DEC205 蛋白的表达 (图 1)。

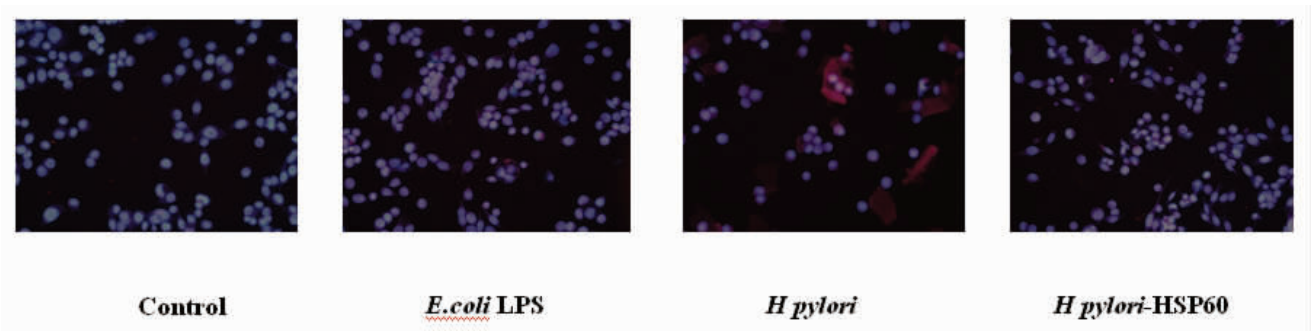


图 1 *H. pylori*、*H. pylori*-HSP60 及 *E.coli* LPS 的刺激明显引起了细胞表面 DEC205 蛋白的表达

Fig. 1 The expression of DEC205 protein was markedly induced following *H. pylori*, *H. pylori*-HSP60 and *E.coli* LPS stimulation in KATO III cells

2.2 *H. pylori*、*H. pylori*-HSP60 和 *E.coli* LPS 诱导了上皮细胞中 DEC205mRNA 的表达

3 $\times$ 10⁶/mL KATO III 细胞经 5 $\times$ 10⁷/mL *H. pylori*、100 g/mL *H. pylori*-HSP60 或 10 g/mL *E. coli*-LPS 刺激后过夜培养, 利用 RT-PCR 技术对 DEC205 mRNA 的表达进行分析。H *pylori*、H *pylori*-HSP60 和 *E. coli*-LPS 的刺激明显引起了细胞中 DEC205mRNA 的表达 (图 2)。

3 讨论

自从 80 年代初 Warren 和 Marshall 发现 *H. pylori* 以来, *H. pylori* 感染已被公认为世界范围性疾病, 人群中感染率高, 几乎 50% 的人终生感染 *H. pylori*^[7]。近年来, 从致病因素和机制方面探讨 *H. pylori* 在消化系统疾病中的作用已经成为研究的热点。*H. pylori* 作为非细胞侵入性细菌, 能够引起胃的各种病变, 这主要是因为此菌表面能够产生鞭毛、尿素酶、热休克蛋白、空泡毒素 (VacA) 和细胞毒素 (CagA) 等病原因子, 这些因素突破了胃壁的天然保护屏障, 构成了 *H. pylori* 感染的病理变化。其中热休克蛋白作为受到外界不良刺激时被释放出来的应激蛋白, 已经被报道与原始适应性免疫系统有着紧密地联系, 能够诱导细胞产生炎症因子等物质来帮助宿主抵御外界刺激和损伤, 其功能与作用正被国内外学者所认知和密切关注^[8]。

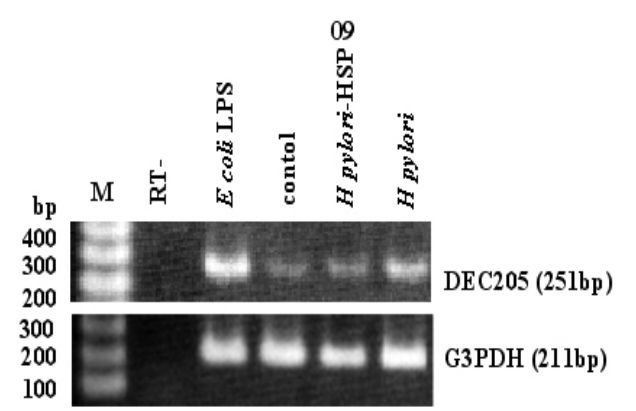


图 1 *H. pylori*、*H. pylori*-HSP60 及 *E.coli* LPS 的刺激明显增加了细胞中 DEC205mRNA 的表达

Fig. 1 The expression of DEC205mRNA was markedly increased following *H. pylori*, *H. pylori*-HSP60 and *E.coli* LPS stimulation in KATO III cells

甘露糖受体(MR)家族广泛地分布于巨噬细胞或树枝状细胞表面。MR 与白色念珠菌、卡氏肺囊虫、结核分支杆菌、克雷白(氏)杆菌属等的各种微生物结合后表达于巨噬细胞^[10-14]。以前

的研究,我们显示了甘露糖受体 (MR) 家族其中成员之一的 DEC205 因为 *H pylori* 的感染使之表达于巨噬细胞表面,表明 DEC205 表达阳性的巨噬细胞可能在 *H pylori* 感染的胃粘膜上也有着重要的免疫作用^[6]。此次研究,我们又显示了 DEC205 因为 *H pylori* 的感染使之表达于胃上皮细胞表面,表明 DEC205 可能在 *H pylori* 感染的胃粘膜上也有着重要的免疫作用。DEC205 的表达与 IL4 受体的信号传导相关,阻断 DEC205 可以减少 IL4 从淋巴细胞中的分泌^[15]。Yamasaki 曾报道胃 MALT 淋巴瘤患者的淋巴细胞中 IL4 的分泌产物增多,而胃炎的患者却没有增多。此外,胃 MALT 淋巴瘤中,外周血单核细胞的 DEC205 表达明显减少。DEC205 可能与胃 MALT 淋巴瘤中 B 细胞增殖有关。另一方面,在肿瘤的发展中,DEC205 与 IL4 受体紧密相关^[16]。在一些病例中,DEC205 表达缺失与乳腺和直肠浸润性癌有关^[17]。我们的研究已经调查了 *H pylori* 与巨噬细胞^[6]、胃上皮细胞的关系。因此,DEC205 通过胞吞作用引起的抗原提呈效应和 T 细胞特殊免疫反应也可能占据于胃粘膜。在今后的工作中进一步调查胃炎患者胃粘膜活检中 DEC205 的表达是非常有必要的。我们认为目前探讨 DEC205 在胃炎中的角色只是第一步,在今后的研究中我们还将继续探讨更深更广的 *H pylori* 病理过程。

参考文献 (References)

- [1] Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, et al. Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma [J]. New England Journal of Medicine, 1994, 330, 1297-1271
- [2] East L, Isacke CM. The mannose receptor family [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1572, 364-386
- [3] Heath WR, Belz GT, Behrens GM, et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens [J]. Immunol Rev, 2004, 199, 9-26
- [4] Shimizu K, Fujii S. An adjuvant role of in situ dendritic cells (DCs) in linking innate and adaptive immunity [J]. Front Biosci, 2008, 13, 6193-201
- [5] Yamasaki R, Yokota K, Okada H, et al. Immune response in Helicobacter pylori-induced low-grade gastric-mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma [J]. J Med Microbiol, 2004, 53, 21-29
- [6] 赵莹,魏晓晴,崔颖,高颖。DEC205 在幽门螺杆菌感染的巨噬细胞中的表达[J].世界华人消化杂志, 2009, 17(20),2037-2041
- [7] Zhao Y, Wei XQ, Cui Y, Gao Y. Expression of DEC205 in Helicobacter pylori-infected macrophages [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2009, 17(20),2037-2204
- [7] Takenaka R, Yokota K, Ayada K, et al. Helicobacter pylori heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells [J]. Microbiology, 2004, 150, 3913-3922
- [8] Ellis RJ. The molecular chaperone concept [J]. Seminars in Cell Biology, 1990, 1-9
- [9] Zhao Y, Yokota K, Ayada K, et al. Helicobacter pylori heat-shock protein 60 induces interleukin-8 via a Toll-like receptor (TLR)2 and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway in human monocytes [J]. J Med Microbiol, 2007, 56, 154-164
- [10] van de Veerdonk FL, Marijnissen RJ, Kullberg BJ, et al. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to Candida albicans [J]. Cell Host Microbe, 2009, 5(4), 329-340
- [11] Swain SD, Lee SJ, Nussenzweig MC, Harmsen AG. Absence of the macrophage mannose receptor in mice does not increase susceptibility to Pneumocystis carinii infection in vivo [J]. Infect Immun, 2003, 71 (11), 6213-6221
- [12] Torrelles JB, Azad AK, Henning LN, et al. Role of C-type lectins in mycobacterial infections [J]. Curr Drug Targets, 2008, 9(2), 102-112
- [13] Barton E, Flanagan P, Hill S. Spinal infection caused by ESBL-producing Klebsiella pneumoniae treated with temocillin [J]. J Infect, 2008, 57(4), 347-349
- [14] McKay PF, Imami N, Johns M, et al. The gp200-MR6 molecule which is functionally associated with the IL-4 receptor modulates B cell phenotype and is a novel member of the human macrophage mannose receptor family [J]. Eur J Immunol, 1998, 28, 4071-4083
- [15] Al-Tubuly AA, Spijker R, Pignatelli M, et al. Inhibition of growth and enhancement of differentiation of colorectal carcinoma cell lines by MAb MR6 and IL-4 [J]. Int J Cancer, 1997, 71, 605-611
- [16] Tungekar MF, Gatter KC, Ritter MA. Bladder carcinomas and normal urothelium universally express gp200-MR6, a molecule functionally associated with the interleukin 4 receptor (CD 124) [J]. Br J Cancer, 1996, 73, 429-432