

# 幽门螺杆菌 *ureB* 基因转染胃上皮细胞及其对细胞的作用

张 静 余菲菲\* 陈月秀 陈 豪

(福建医科大学病原生物学系 福州 350004)

**摘 要** 研究幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *Hp*) *ureB* 基因重组子转染胃上皮细胞后对胃上皮细胞的作用。用 PCR 方法从 *Hp* 标准株 NCTC11637 中获取 *ureB* 全长基因, 将其开放读码框架定向克隆入真核表达载体 pcDNA3.1, 获得的重组子转染 SGC-7901 细胞, 筛选耐潮霉素的细胞克隆, 用 RT-PCR 方法检测细胞内 *ureB* 基因在转录水平的表达; 分别用荧光染色技术、MTT、流式细胞术检测 *UreB* 对细胞表型、增殖、凋亡及细胞周期的影响。*UreB* 阳性表达的细胞(*SureB*) 胞膜出芽、细胞皱缩, 用 MTT 法检测细胞增殖, 结果表明, *SureB* 细胞与 pcDNA3.1 细胞比较(*pcDNA3.1* 转染的细胞), 生长增殖无显著性差异( $P > 0.05$ ), 流式细胞术检测细胞凋亡结果显示, *SureB* 的凋亡率显著高于 *pcDNA3.1* ( $P$  值为 0.007) 细胞周期分析显示, *SureB* 细胞有 S 期比率增高、 $G_2$ -M、 $G_0$ - $G_1$  期比率下降的趋势。*ureB* 在培养细胞内的表达可促进细胞凋亡。

**关键词** 幽门螺杆菌, *ureB*, 细胞增殖, 细胞凋亡, 基因转染

中图分类号: Q939.93 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2005)01-0031-03

尿素酶是 *Hp* 的重要定居因子和毒力组分, 尿素酶分解尿素产生的氨有助于 *Hp* 在胃内的定植, 并对胃黏膜产生损伤作用。已知尿素酶是由 *UreA*、*UreB* 两个结构亚单位<sup>[1]</sup>和 *UreI*、*E*、*F*、*G*、*H* 5 个辅助蛋白构成。其中 *UreB* 是尿素酶重要的功能亚单位, 研究表明<sup>[2]</sup>, *UreB* 作为疫苗具有良好的抗 *Hp* 感染的免疫保护作用, 因而被认为是目前最有发展前景的组分疫苗。然而尿素酶亚单位 *UreB* 对细胞是否具有直接的作用呢? 目前国内外极少见此方面的报道。本实验拟通过培养细胞内稳定转染 *ureB* 重组质粒的方法, 研究 *Hp* *UreB* 对胃上皮细胞增殖与凋亡的影响, 旨在为寻找 *Hp* 的致癌组分奠定基础, 同时也为 *Hp* *UreB* 疫苗的研制提供安全性指标。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、细胞株和质粒:** *Hp* 国际标准株 NCTC11637 购于中国疾病预防控制中心传染病预防控制所; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) *Top10* 购于 Invitrogen 公司; 胃腺癌细胞系 SGC-7901(中国科学院上海细胞库); 质粒载体 pcDNA3.1 为 Invitrogen 公司产品。

**1.1.2 主要试剂:** *Xho* I、*Hind* III 购于 Biolab 公司,

高保真 *Taq* 酶购于 Roche 公司, Lipofectamine2000、Titan One Tube RT-PCR Kit、DNA 和 RNA TRIzol 试剂为 Invitrogen 公司产品。

### 1.2 *ureB* 基因扩增、重组质粒构建和鉴定

根据 NCTC11637 *ureB* 全长基因序列, 以 VectorNTI6.0 软件在开放读码框架两端设计一对引物, 5'端分别加上 *Xho* I 和 *Hind* III 限制性内切酶酶切位点, *ureBF*: 5'-CCGCTCGAGATGAAAAAGATTA GCAGAAAA- 3', *ureBR*: 5'-CCCAAGCTTCTAGAAA ATGCTAAAGAGTTG-3', 扩增片段为 1700bp。

用 DNA TRIzol 试剂提取 *Hp* NCTC11637 DNA, 以此为模板, 用高保真 *Taq* 酶进行 PCR 扩增, 反应体系: 10 × buffer 5 μL, dNTP(各 10 mmol/L) 1 μL, 模板 1 μL, 引物(4 pmol/μL) 各 3 μL, 酶 1 μL(3.5U), 加双蒸水至 50 μL。反应条件: 94℃ 3min; 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 2min, 共 30 个循环; 72℃ 7min。产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析并纯化, 纯化的产物与载体 pcDNA3.1 经 *Xho* I、*Hind* III 双酶切后连接, 转化 *Top10* 感受态细胞, 在含氨苄青霉素(100 μg/mL)的 LB 培养皿上培养, 挑取单菌落, 小量提取质粒, 重组质粒用 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 将经初步鉴定含阳性重组质粒的细菌克隆送上海博亚生物技术有限公司进行序列测定。测序结果与原始序列比较,

基金项目 福建省自然科学基金重大项目(2001F003)

\* 通讯作者。Tel 86-591-83569309; E-mail: Cylsff@163.net

作者简介 张 静(1978-), 女, 湖北人, 硕士研究生, 主要从事病原生物学的研究。E-mail: zj-78@sohu.com

收稿日期 2004-07-05, 修回日期 2004-11-08

将测序结果完全一致的重组子命名为 *pcureB*。

### 1.3 重组质粒 *pcureB* 转染 SGC-7901 细胞

用 Qiagen-TIP100 plasmid mid( Qiagen 公司 )试剂盒大量抽提重组质粒 *pcureB* 和 *pcDNA3.1* (对照) 转染前 1 天,以  $1 \times 10^5$ /孔密度接种细胞于 6 孔板中。转染混合液的配制及转染:*pcureB* 或 *pcDNA3.1* 2 $\mu$ g + 脂质体 4 $\mu$ L/200 $\mu$ L 无血清的培养液/孔,混匀,室温放置 20min 后,加入上述 6 孔板中,24h 后更换含有 200 $\mu$ g/mL 潮霉素 B 的培养液,根据细胞生长的状态,每 2~3d 换液,直至细胞克隆形成,挑取单克隆。将质粒 *pcDNA3.1*、*pcureB* 转染 SGC-7901 细胞后形成的克隆株分别命名为 *SpcDNA3.1*、*SureB*。

### 1.4 阳性克隆细胞株基因表达鉴定

用 RNA TRIzol 试剂分别提取阳性克隆株的总 RNA,以此为模板,Titan One Tube RT-PCR Kit 进行 RT-PCR。反应体系 2 $\times$  buffer mix 12.5 $\mu$ L,模板 1 $\mu$ L,引物(4pmol/ $\mu$ L)各 2.5 $\mu$ L,酶 0.5 $\mu$ L (2.0U),双蒸水 6 $\mu$ L。反应条件:50 $^{\circ}$ C 30min,94 $^{\circ}$ C 3min;94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 2min,共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 7min。

### 1.5 细胞形态学观察

*SpcDNA3.1*、*SureB* 细胞经胰酶消化制成单细胞悬液,接种于含有无菌盖玻片的 12 孔板内,培养 24h 后,加 5 $\mu$ L AO/EB(100 $\mu$ g/mL AO,100 $\mu$ g/mL EB)染色液染色,封片后立即于荧光显微镜下观察并拍照。

### 1.6 MTT 法检测细胞增殖

*SpcDNA3.1*、*SureB* 细胞分别用胰酶消化制成单细胞悬液,按  $1 \times 10^3$ /孔的密度接种于 96 孔板,复 3 孔,每间隔 24h 取一块板,各孔中加 MTT(5mg/mL)10 $\mu$ L,孵育 4h,加 MTT 裂解液(10% SDS 5% 异丙醇,0.012mmol/L HCl)100 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。测取  $OD_{550}$  的光密度值,连续检测 7d,取平均值。根据  $OD$  值绘制生长曲线。用重复测量方差分析比较 *SureB* 与 *SpcDNA3.1* 细胞的生长情况。

### 1.7 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期

*SpcDNA3.1*、*SureB* 细胞经过同步化后,用含 10% 血清的 1640 培养 3d,收集悬浮细胞及贴壁细胞,PBS 洗两遍,新鲜细胞经 700r/min 离心 5min,沉淀重悬于 1mL PBS 400 目筛网过滤,取 500 $\mu$ L 细胞悬液加 500 $\mu$ L DNA-PREP stain 和 100 $\mu$ L DNA-PREP LPR,避光染色 20min。用 Backman Coulter XL 流式细胞仪 488nm 激发,605nm 检测,每次检测  $10^4$  细胞。用 Multicycle 软件进行 DNA 含量和细胞凋亡率分析。用 DunettT3 法比较 *SureB* 与 *SpcDNA3.1* 细胞凋亡率。软件分析  $G_0$ - $G_1$  期、S 期、 $G_2$ -M 期细胞比率。

## 1.8 统计学分析

实验结果均重复 3 次以上,用 SPSS 软件包进行重复测量方差分析,DunettT3 检验, $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 目的基因的扩增、重组和鉴定

以 *Hp* NCTC11637 DNA 为模板,PCR 扩增出片段大小为 1.7kb 的 *ureB*,PCR 获取目的片段及重组质粒双酶切结果经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。将经初步鉴定含阳性重组质粒的细菌克隆送上海博亚生物技术有限公司进行序列测定,测序结果与原始序列比较,完全一致。

### 2.2 *ureB* 基因在 SGC-7901 细胞内的表达

将 RT-PCR 产物各取 5 $\mu$ L 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳,结果表明 *ureB* 基因在 SGC-7901 细胞内获得表达,而 *SpcDNA3.1* 细胞内没有扩增出 *ureB* 片段(图略)。

### 2.3 细胞形态学特征

荧光显微镜下可见 *SpcDNA3.1* 细胞呈多边形铺展状态,细胞膜完整,核膜界限清楚,核呈黄绿色近圆形,内有 3~5 个圆形的黄色核仁。*SureB* 细胞部分胞膜突起、出芽,细胞皱缩,坏死细胞较多(图版 III-A)。

### 2.4 MTT 法检测细胞增殖

MTT 法检测 *SpcDNA3.1*、*SureB* 细胞的增殖,以均值描绘细胞生长曲线(图版 III-B)。细胞培养的头两天内,由于开始接种的细胞数量较少,细胞增殖较为缓慢,但当培养进入第 3 天时,细胞进入对数生长期,细胞增殖加快。按重复测量试验的统计学方法进行分析,两株细胞随着培养时间的延长其  $OD_{550}$  均增加,*SureB* 与 *SpcDNA3.1* 细胞比较,生长增殖无显著性差异( $P > 0.05$ )。

### 2.5 细胞凋亡检测

流式细胞仪分析细胞 DNA 的含量,发现 *SpcDNA3.1* 未出现明显的亚二倍体峰,而 *SureB* 细胞出现明显的亚二倍体峰,并且较 *SpcDNA3.1* 细胞有更高的 4 倍体峰。

MultyCycle 软件分析细胞凋亡率,凋亡率以  $\bar{x} \pm s$  表示( $n = 3$ ),*SpcDNA3.1*、*SureB* 细胞的凋亡率分别为  $1.44 \pm 0.08$ 、 $3.78 \pm 0.23$ ,用 DunettT3 法比较 *SpcDNA3.1*、*SureB* 细胞的凋亡率,*SureB* 的凋亡率明显较 *SpcDNA3.1* 高( $P = 0.007$ )。

## 2.6 细胞周期分析

用 MultyCycle 软件对 SpcDNA3.1、SureB 进行细胞周期分析,  $G_0$ - $G_1$ 、S、 $G_2$ -M 期平均值(图版 III-C), 细胞周期分布趋势: SureB S 期比例较 SpcDNA3.1 高, 但  $G_2$ -M、 $G_0$ - $G_1$  期比例又较 SpcDNA3.1 低, SureB 细胞 DNA 复制旺盛, 但分裂受阻。

## 3 讨论

尿素酶分解尿素产生的氨有助于 Hp 在胃内的定植, Fan 等<sup>[3]</sup>研究发现 Hp 尿素酶还可以和胃上皮细胞表面 MHC-II 分子结合并诱导胃上皮细胞凋亡, Kitada<sup>[4]</sup>曾用重组的 UreB 亚单位作用于 MKN45 细胞, 发现 UreB 诱导了较低水平的细胞凋亡, 提出 UreB 可能是尿素酶诱导凋亡的调节点之一。有研究表明 Hp 进入机体后除主要定植于胃黏膜上皮细胞之外, 少数可侵入细胞而致病<sup>[5,6]</sup>, 那么 UreB 在细胞内是否具有影响细胞增殖与凋亡的作用呢? 弄清这一点, 对于了解 UreB 在细胞内的致病作用, 以及评价 *ureB* DNA 疫苗的安全性十分重要。

本研究首次将 *ureB* 基因稳定转染 SGC-7901 细胞并在胞内持续表达, 通过 MTT 法检测, 显示 UreB 对细胞的生长增殖无影响, 用流式细胞技术检测, 显示 UreB 具有促进细胞凋亡的作用, 细胞同步化后周

期分析显示, UreB 也具有使细胞 S 期比率增高、 $G_2$ -M 期比率下降的趋势, 即细胞的分裂受阻。该研究证实 UreB 在细胞内的表达以及作为尿素酶的亚单位之一有单独诱导细胞凋亡的作用。但完整的 *ureB* 基因可能不宜用于 DNA 疫苗的制备。

## 参 考 文 献

- [1] 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 2002: 56.
- [2] Lee M H, Roussel Y, Wilks M, et al. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice. *Vaccine*, 2001, **19**: 3927 - 3935.
- [3] Fan X, Gunasena H, Cheng Z, et al. *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J Immunol*, 2000, **165**: 1919 - 1924.
- [4] Igarashi M, Kitada Y, Yoshiyama H, et al. Ammonia an accelerator of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* infection. *Infection and Immunity*, 2001, **69**: 816 - 821.
- [5] Bjorkholm B, Zhukhovitsky V, Lofman C, et al. *Helicobacter pylori* entry into human gastric epithelial cells: A potential determinant of virulence, persistence, and treatment failures. *Helicobacter*, 2000, **5**: 148 - 154.
- [6] Petersen A M, Blom J, Andersen L P, et al. Role of strain type, AGS cells and fetal calf serum in *Helicobacter pylori* adhesion and invasion assays. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000, **29**: 59 - 67.

## Effect of recombinant plasmid of *Helicobacter pylori ureB* gene on gastric epithelial cell

ZHANG Jing SHE Fei-fei\* CHEN Yue-xiu CHEN Hao

(Fu Jian Medical University, Department of Etiological Biology, Fuzhou 350004, China)

**Abstract:** To investigate the effect of recombinant plasmid of *Helicobacter pylori ureB* gene on gastric epithelial cell. The full length sequence of *ureB* gene from NCTC11637 was amplified by PCR. The recombinant plasmid was constructed by cloning the open reading frame (ORF) of *ureB* into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1, and was transfected SGC-7901 cells, then the clones resisting Hygromacine were screened. mRNA expression of *ureB* of transfected cells was detected by RT-PCR. The effect of recombinant plasmid of *Hp ureB* gene on cell phenotype was observed by fluorescence strain, on proliferation by MTT, on apoptosis and cell cycles by flow cytometry, respectively. The positive clones of *ureB* (SureB) appeared cell membrane budding and cell shrinkage. MTT assay showed there was no statistic significance between the SureB and SpcDNA3.1 which were transfected only by pcDNA3.1 ( $P > 0.05$ ), suggesting that the growth of SureB were not inhibited. The apoptosis rate of SureB was higher than that of SpcDNA3.1 ( $P = 0.007$ ). Analysis for cell cycle showed that in SureB cells the proportion of S phase increased, the proportion of both  $G_2$ /M and  $G_0$ / $G_1$  phase decreased. Positive transfection of *ureB* gene into SGC-7901 can change cell phenotype and induce cell apoptosis.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, *ureB*, Proliferation, Apoptosis, Gene transfection