

幽门螺杆菌 L 型感染与胃癌 BGC-823 细胞侵袭、转移关系的研究

魏 军¹, 于东红²

[摘要] 目的:研究幽门螺杆菌 L 型(*Helicobacter pylori* L-form, Hp-L 型)感染对胃癌 BGC-823 细胞浸润、转移能力的影响,探讨 Hp-L 型在胃癌发展中的作用和可能机制。**方法:**将 Hp-L 型与胃癌 BGC-823 细胞按不同比例混合培养 24 h,并设置空白对照组,进行 Transwell 小室细胞侵袭实验,观察胃癌 BGC-823 细胞的侵袭能力。应用 Western-blotting 实验测定胃癌 BGC-823 细胞中 ezrin 的表达情况。**结果:**随胃癌 BGC-823 细胞与细菌共培养细菌含量增大,穿透重建基底膜的细胞数目明显增多($P < 0.05 \sim P < 0.01$),胃癌 BGC-823 细胞中 ezrin 表达量逐渐增加($P < 0.01$)。**结论:**Hp-L 型感染增强了胃癌细胞的侵袭和转移能力,其机制可能与胃癌细胞的 ezrin 表达量增加有关。

[关键词] 幽门螺杆菌 L 型;胃肿瘤;侵袭;转移

[中国图书资料分类法分类号] R 378.99;R 735.2

[文献标识码] A

Research on the relationships between the infections of *Helicobacter pylori* L-forms and the invasion and metastasis of gastric carcinoma BGC-823 cells

WEI Jun¹, YU Dong-hong²

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou Anhui 234000;

2. Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] Objective: To study the relationships between *Helicobacter pylori* L-form (Hp-L) infection and the invasion and metastasis of gastric carcinoma BGC-823 cells. Further to explore the probable mechanism between Hp-L infection and the progression of gastric carcinoma. **Methods:** Hp were incubated and induced into Hp-L. Then gastric cancer BGC-823 cells were co-incubated with them for 24 hours in different ratio and a control group was set. The ability of invasion and metastasis of BGC-823 cells were evaluated by using Transwell chambers. The expression of ezrin in BGC-823 cells was assessed by Western-blotting. **Results:** With the increasing of the concentrations of Hp-L forms, the cells which permeated the membrane were increased ($P < 0.05$ to $P < 0.01$), and the expression of ezrin in gastric carcinoma BGC-823 cells was risen ($P < 0.01$). **Conclusions:** The infection of Hp-L form can increase the invasion and metastasis ability of gastric carcinoma cells. The mechanism may have relationship with the over-expression of ezrin.

[Key words] *Helicobacter pylori* L-forms; gastric carcinoma; invasion; metastasis

1983 年,澳大利亚科学家 Warren 和 Marshall 首先报道从慢性活动性胃炎患者的胃窦活检标本中分离培养出幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp)。至今,科学家们对 Hp 进行了广泛而深入的研究, Hp 被公认为慢性胃炎、胃溃疡、胃癌等病变的致病因子。随着人们对 Hp 研究的深入,发现 Hp 在胃液、胆汁、溶菌酶、抗生素、环境中氧浓度改变等条件下,易发生细胞壁缺陷而形成 Hp-L 型^[1],而 Hp-L 型是 Hp 存在于胃内的主要形式。Hp-L 型长期的慢性感染,以及病情反复恶化或复发,逐步形成慢性浅表性胃炎→慢性萎缩性胃炎→肠上皮化生→非典型增生→胃癌的病理过程。目前, Hp 在胃癌中的致病作用

已得到公认。Hp-L 感染与胃癌发生、发展之间的关系亦有报道,本实验着重探讨 Hp-L 感染与胃癌侵袭、转移的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 胃癌 BGC-823 细胞株, Hp (NCTC11638 国际标准株), RPMI-1640 培养基, 新生牛血清, 细菌培养基, 严格按照一定比例 (85% N₂、10% CO₂、5% O₂) 配制的混合气体, 基质胶 (matrigel), Transwell 小室, ezrin 鼠抗人单克隆浓缩型抗体, Tri-base 碱购等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 胃癌 BGC-823 细胞用加入 10% 的小牛血清 RPMI-1640 培养液培养。置于 37.5 °C 的 CO₂ 培养箱中, 每天换液, 观察细胞的生长状态。当细胞覆盖瓶底面积的 80% 时用 0.25% 胰蛋白酶消化后分瓶传代。

1.2.2 细菌培养 (1) 于超净台内, 取处于对数生

[收稿日期] 2009-01-06

[作者单位] 1. 安徽省宿州市立医院 心胸外科, 安徽 宿州 234000;

2. 蚌埠医学院 病理学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 魏 军(1981-), 男, 硕士, 住院医师。

[通讯作者] 于东红, 研究生导师, 教授。

长期细菌,以分离划线法接种在预先准备好的细菌培养基上;(2)把细菌放入微需氧培养罐内,充入混合气体(85% N₂、10% CO₂、5% O₂);(3)置 37.5 °C 的 CO₂ 恒温培养箱中培养;(4)每隔 1 天取细菌做革兰染色,观察细菌的生长情况,一般情况下,接种的第 3 天细菌的生长状态最佳,此时处于对数生长期,适合接种传代、冻存保种或诱导为 Hp-L 型。

1.2.3 细胞与细菌混合培养 (1)把处于对数生长期的细胞用胰蛋白酶消化,用细胞培养液重悬,计数调整浓度后接种到 6 孔板内;(2)取 Hp-L 型细菌,用 PBS 洗涤 3 遍,用分光光度计计数;(3)按细胞与细菌为 1:20、1:100 和 1:500 的比例取细菌加入培养板内;(4)把培养板放入恒温培养箱内,培养 24 h,分离细胞,用于做侵袭试验或提取蛋白做 Western-blotting 实验。

1.2.4 侵袭实验 将 Transwell 小室的膜内表面涂基底膜成分 matrigel,使之干燥,形成人工重建基底膜。在 24 孔板下室加入 500 μl 含有 20% 小牛血清的细胞培养液。将 4 组中的细胞分离出来,用 RPMI-1640 培养液重悬为每毫升 1 × 10⁶ 个,取 100 μl 加入 Transwell 小室的上室。37 °C、5% CO₂ 培养箱内孵育 16 h,将 Transwell 小室取出,滤膜用甲醇固定、HE 染色(浸湿的棉签擦去滤膜内表面的细胞,用封片胶将滤膜封于载玻片上,于 400 倍显微镜下计数穿过滤膜的细胞数)。

1.2.5 Western-blotting 实验 收集各组的胃癌细胞,调整至相同细胞浓度,取相同体积的细胞悬液(即保证用于提取蛋白的细胞量相同)。用预冷的 PBS 漂洗细胞 2 次。用预冷的裂解液裂解,按说明书操作提取蛋白。取上清液 16 μl,加 4 μl 5 × 上样缓冲液混匀煮沸 5 min 后上样。进行 SDS-PAGE 电泳,电压 100 V。待酚溴蓝到达凝胶底部,将凝胶中的蛋白质湿转至硝酸纤维素膜(PVDF)上。丽春红染膜,考马斯亮蓝染胶,通过与蛋白 Marker 比较,确定目的条带的位置。将 PVDF 膜置于含 5% 脱脂奶

粉的 TBST 中,室温下摇床轻摇 2 h 进行封闭。然后将膜置于 TBST 1:200 稀释的一抗中 4 °C 冰箱孵育过夜,TBST 充分洗膜;TBST 1:2 000 稀释的辣根酶标记的二抗,37 °C 孵育 1 h,TBST 充分洗膜。ECL 显色,暗室曝光,凝胶成像系统扫描成像。

1.3 统计学方法 采用单因素方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 Transwell 侵袭实验结果 采用 Transwell 侵袭实验显示,随着胃癌细胞与 Hp-L 型比例的增加,穿透基底膜的胃癌细胞数增加,各组穿透基底膜的细胞数之间差异均有统计学意义($P < 0.05 \sim P < 0.01$),表示胃癌细胞的侵袭力增强(见表 1,图 1~4)。

2.2 Western-blotting 结果 显示与 Hp-L 型共培养 24 h 之后胃癌 BGC-823 细胞中 ezrin 的表达随胃癌呈剂量依赖性增加。经 Smart-view 图像软件分析,各实验组条带灰度与 β-actin 条带灰度的比值作为 ezrin 表达的相对值,对照组、1:20、1:100、1:500 各组之间的差异均有统计学意义($P < 0.01$)(见表 2、图 5)。

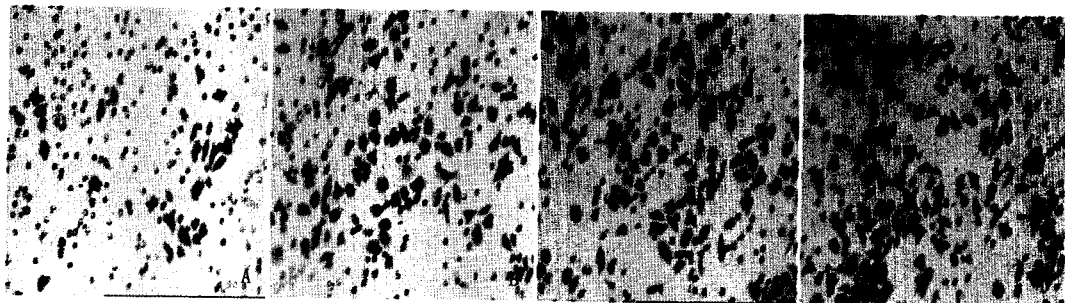
表 1 Hp-L 型感染和穿透基底膜的胃癌细胞数的关系 ($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

分组	穿透基底膜的细胞数	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> _{组内}
空白对照组	37.7 ± 4.9			
1:20 组	45.3 ± 5.9*	29.73	<0.01	24.235
1:100 组	56.0 ± 5.6*ΔΔ			
1:500 组	62.3 ± 2.6*ΔΔ#			

q 检验:与空白对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 1:20 组比较 ΔΔ $P < 0.01$;与 1:100 组比较 # $P < 0.05$

3 讨论

胃癌是一种常见的恶性肿瘤,致死率在癌症中占第 2 位。Hp 感染是胃癌发病的重要原因^[2-3],近



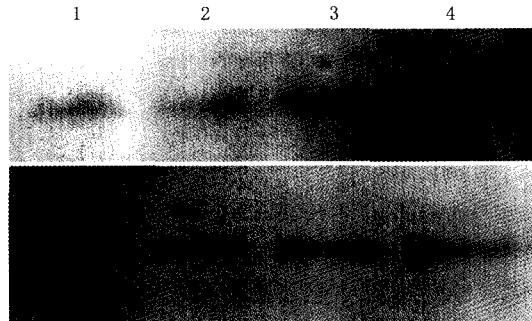
A: 空白对照组; B、C、D 分别为 1:20、1:100、1:500 组

图 1 transwell 侵袭实验结果

表2 与 Hp-L 型共培养 24 h 后胃癌 BGC-823 细胞中 ezrin 的表达关系 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	ezrin 表达 (%)	F	P	MS _{组内}
空白对照组	13.20 ± 0.78			
1:20 组	16.40 ± 0.85 **	120.90	<0.01	0.878
1:100 组	22.03 ± 0.55 * _{△△}			
1:500 组	26.60 ± 1.37 ** _{△△}			

q 检验:与空白对照组比较 * $P < 0.01$; 与 1:20 组比较 $\Delta \Delta$ $P < 0.01$; 与 1:100 组比较 ## $P < 0.01$



1: 空白对照组; 2: 1:20组; 3: 1:100组; 4: 1:500组
图2 ezrin 在BGC-823细胞中的表达

年的研究发现, Hp-L 型在胃癌的发生、发展过程中扮演着重要角色。胃癌侵袭和转移是一个复杂的多步骤过程, 往往伴有细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的降解, 使癌细胞与细胞间黏附松解而解脱出来, 通过溶蛋白过程而进入周围的 ECM, 再进入血管和淋巴管。肿瘤转移始于恶性侵袭, 侵袭贯穿在肿瘤转移的全部过程中。大量研究表明, 肿瘤细胞首先通过细胞膜表面的受体与基底膜、基质成分层黏连蛋白、纤维黏连蛋白和胶原蛋白结合; 然后肿瘤细胞分泌或利用细胞膜上的多种蛋白水解酶降解基底膜和基质; 最后, 肿瘤细胞定向运动穿越破损的基底膜和基质部位实现转移。抗肿瘤侵袭和转移的措施一般是通过抑制上述各个步骤来实现的。

为了检测 Hp-L 对胃癌细胞侵袭能力的影响, 我们进行了 Transwell 侵袭实验。本实验中, 先把胃癌细胞和 Hp-L 型按 1:20、1:100、1:500 的比例共同培养, 并设立空白对照组, 分别测定各组细胞的侵袭力。检测结果表明, 随着细胞和细菌培养比例的增加, 穿透重建基底膜的数目增多。空白对照组和不同培养比例组穿透重建基底膜的数目差异均有统计学意义 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 提示 Hp-L 会增强胃癌细胞侵袭能力。

ezrin 是 ERM (ezrin-radixin-moesin) 家族的成员之一。主要参与上皮细胞中细胞骨架与胞膜之间的连接, 具有维持细胞形态和运动、连接黏附分子及调节信号转导等功能。近年研究发现, ezrin 在肿瘤细

胞转移过程中扮演重要角色, ezrin 通过调节黏附分子和信号转导等途径, 参与细胞与细胞、细胞与基质之间的相互作用, 从而在肿瘤发展、浸润和转移过程中起着重要作用。

Ohtani 等^[4-5] 分别报道 ezrin 的表达在儿童横纹肌肉瘤和骨肉瘤转移过程中起重要作用, 提示 ezrin 是儿童肿瘤转移的关键因素, 并且 ezrin 的表达与肿瘤的预后密切相关。在子宫内膜的腺癌细胞与正常子宫内膜细胞和子宫内膜增生的细胞相比较中发现^[6], 肿瘤细胞中 ezrin 水平显著增高, 定位于胞膜和胞质中, 而在正常及增生的细胞中, ezrin 仅在胞质中有表达。CD44 为细胞表面的单链跨膜糖蛋白, 具有高度异质性, 可作为受体, 识别透明质酸和胶原蛋白等, 介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的黏附作用, 同时具有激活淋巴细胞、参与信号转导等多种生物学功能。CD44 分子的胞质区尾部存在一个结构域与 ezrin 的 N 端结合。有研究^[7] 已证实, CD44 及其变异体 CD44v 在肿瘤的发生、发展中起重要作用, 尤其是 CD44v6 与肿瘤细胞的浸润、转移更加密切相关。他们还发现, ezrin 与 CD44 及其变异体形成复合物, 在肿瘤细胞中有共同表达。提示 ezrin 与肿瘤的浸润、转移密切相关。

ezrin 参与细胞-细胞、细胞-细胞外基质之间的相互作用, 还与其和黏附分子 E-钙黏蛋白相互作用有关。E-钙黏蛋白能够反相调节 CD44 的活性, 抑制 CD44 介导的肿瘤转移。E-钙黏蛋白的丢失或调节功能降低将破坏下游的信号转导, 进而促进肿瘤的转移扩散。ezrin 在 E-钙黏蛋白的膜定位上起着重要作用, 具有活化 ezrin 结构的细胞能够使细胞内的 E-钙黏蛋白发生聚集, 从而破坏细胞间接触, 而 ezrin 的过度表达同样导致细胞间黏附作用减弱, 进而介导肿瘤的浸润和转移。ezrin 还通过协同和放大细胞表面的肿瘤转移相关信号, 改变细胞内信号转导平衡, 参与肿瘤的转移机制。本实验 Western-blotting 结果显示, 随着细胞与细菌比例的增加, ezrin 的表达量增加。说明 Hp-L 型可能是通过影响肿瘤细胞中 ezrin 的表达, 而增强肿瘤细胞的侵袭转移能力。

本文研究发现, Hp-L 型在胃癌的发生、发展过程中起着重要的作用, 可以促进胃癌的侵袭和转移, 其机制可能为 Hp-L 感染可以增强某些和肿瘤侵袭转移相关的蛋白表达有关, 如 ezrin。但其具体机制需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Del Giudice G, Covacci A, Telford JL, et al. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development [J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19:523-563.

[文章编号] 1000-2200(2010)03-0229-02

· 临床医学 ·

羟基磷灰石义眼座植入术后暴露原因分析及处理措施

代应辉¹, 尚平², 周琦¹, 刘应凌¹

[摘要] 目的: 探讨羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)义眼座植入术后暴露的原因及处理措施。方法: 对 9 例 HA 植入术后发生义眼座暴露者进行回顾性分析, 针对不同的原因予以相应的治疗方法, 其中 5 例应用羊膜修补。结果: 9 例义眼座暴露均愈合良好, 未再复发。结论: 羟基磷灰石义眼座植入术后暴露的原因与多种因素有关, 恰当的处理如羊膜移植等可以使之恢复。

[关键词] 羟基磷灰石类; 暴露; 羊膜移植

[中国图书资料分类法分类号] R 779.64 [文献标识码] A

Causes and management of exposed hydroxyapatite artificial eye pedestal after implantation

DAI Ying-hui¹, SHANG-Ping², ZHOU-Qi¹, LIU Ying-ling¹

(1. Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;

2. Department of Ophthalmology, Xinzhuangzi Hospital, Huainan Dongfang Hospital Company, Huainan Anhui 232072, China)

[Abstract] Objective: To analyze the causes and management of exposed hydroxyapatite (HA) artificial eyes after implantation.

Methods: Nine cases of exposed orbital implant were analyzed retrospectively. Different therapies were applied to different cases in accordance to the causes. Amniotic membrane transplantation was performed in 5 cases. Results: All the 9 exposure cases healed well and no recurrence was observed. Conclusions: Several factors may contribute to the implant exposure; proper management and amniotic membrane implantation are effective for the exposure of hydroxyapatite.

[Key words] hydroxyapatite; exposure; amniotic membrane transplantation

羟基磷灰石义眼座(hydroxyapatite, HA)以其良好的性能广泛应用于临床, 但其并发症也逐步受到关注, 义眼座暴露是其并发症中最常见的一种。2002 年 6 月至 2007 年 12 月, 我院共行 HA 义眼座植入术 78 例(78 眼), 术后随访观察 9 例(9 眼)出现球结膜裂开、糜烂, HA 义眼座暴露。本文总结 9 例义眼座暴露的原因, 针对不同的原因予以相应的治疗方法, 取得较好效果, 现作报道。

1 资料与方法

1.1 一般资料 9 例中男 6 例, 女 3 例; 年龄 18 ~ 62 岁。术前病因: 眼外伤 3 眼, 化脓性眼内炎 1 眼, 眼球摘除术后 3 眼, 眼球萎缩 2 眼。所采用术式: 眼内容剜出术后义眼台植入自体巩膜壳后肌锥内 4 例, 直接肌圆锥内植入法 5 例。6 眼为 HA 义眼座 I 期植入, 3 眼为 HA 义眼座 II 期植入, II 期植入术者眼球摘除术后至行义眼座植入术间隔时间为 3 个月至 16 年。义眼座暴露发生于术后 7 天至 6 个月, 其中 2 眼于术后第 7 天拆线时见球结膜切口裂开, 4 周后义眼座外露, 2 眼发生于术后 4 ~ 8 周, 2 眼发生于术后 9 周, 3 眼发生于术后 12 周以上。义眼座暴露直径为 3 ~ 12 mm, 其中直径 ≤ 5 mm 者 3 眼, 直径在 6 ~ 12 mm 者 6 眼。

[收稿日期] 2008-11-20

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第一附属医院 眼科, 安徽 蚌埠 233004;

2. 淮南东方医院集团新庄孜医院 眼科, 安徽 淮南 232072

[作者简介] 代应辉(1969-), 男, 硕士, 副主任医师。

[2] Yu Y, Khan J, Khanna C, et al. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein six-1 as key metastatic regulators [J]. Nat Med, 2004, 10(2): 175-181.

[3] Khanna C, Wan X, Bose S, et al. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis [J]. Nat Med, 2004, 10(2): 182-186.

[4] Ohtani K, Sakamoto H, Rutherford T, et al. Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is highly expressed in atypical endometrial hyperplasia and uterine endometrioid adenocarcinoma [J]. Cancer Lett, 2002, 179(1): 79-86.

[5] Martin TA, Harrison G, Mansel RE, et al. The role of the CD44/

ezrin complex in cancer metastasis [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2003, 46(2): 165-186.

[6] Morgner A, Miehke S, Fischbach W, et al. Complete remission of primary high-grade B-cell gastric lymphoma after cure of *Helicobacter pylori* infection [J]. J Clin Oncol, 2001, 19(7): 2041-2048.

[7] Kate V, Ananthkrishnan N, Badrinath S. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on the ulcer recurrence rate after simple closure of perforated duodenal ulcer: retrospective and prospective randomized controlled studies [J]. Br J Surg, 2001, 88(8): 1054-1058.