

铁离子对幽门螺杆菌感染的胃上皮细胞 LncRNA 的影响^①

韦红玉, 黄干荣, 覃艳春, 唐华英, 韦连登, 谢振锋, 赵丽娟^②

(右江民族医学院, 广西 百色 533000 E-mail: why-825@163.com)

摘要:目的 探讨铁离子对幽门螺杆菌(Hp)感染的胃上皮细胞(GES-1)长非编码 RNA(LncRNA)的影响。方法 以胃上皮细胞作为对照 A 组, Hp 感染胃上皮细胞作为 B 组, 硫酸铁与胃上皮细胞共培养为 C 组, 硫酸铁与 Hp 和胃上皮细胞共培养为 D 组, 采用表达谱基因芯片检测各组 GES-1 细胞的 LncRNA 和 mRNA 基因差异表达。结果 与 A 组 LncRNA 基因数相比: B 组上调 76 个 LncRNA 基因, 下调 45 个基因; C 组上调 40 个基因, 下调 123 个基因; D 组上调 124 个基因, 下调 159 个基因。各组间差异基因主成分分析显示 B 组比 C 组和 D 组的离散程度高。在功能富集分析显示, TNF 信号通路中, C 组和 D 组与 B 组比较, 相关 mRNA 基因多数下调。结论 铁离子可能影响胃上皮细胞 LncRNA 调控作用进而影响 Hp 感染的发病情况。

关键词: 铁离子; 胃上皮细胞; LncRNA; 幽门螺杆菌

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1001-5817(2018)02-0099-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.02.001

The effect of iron ion on LncRNA of gastric epithelial cells with *Helicobacter pylori* infection

Wei Hongyu, Huang Ganrong, Qin Yanchun, Tang Huaying,

Wei Liandeng, Xie Zhenfeng, Zhao Lijuan

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi)

E-mail: why-825@163.com)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of iron ion on LncRNA of gastric epithelial cells (GES-1) with *Helicobacter pylori* (Hp) infection. **Methods** Group A was gastric epithelial cells as controls, group B was gastric epithelial cells with Hp infection, group C was ferric sulfate with gastric epithelial cells (cultured together), group D was gastric epithelial cells induced by ferric sulfate after infected by Hp (cultured epithelial cells, ferric sulfate and Hp together). The differential expressions profile of LncRNA and mRNA were detected by Microarray. **Results** Comparison of LncRNA gene number of group A with the other groups showed: 76 LncRNA genes were up-regulated and 45 genes were down-regulated in group B; 40 genes were up-regulated and 123 genes were down-regulated in group C; 124 genes were up-regulated and 159 genes were down-regulated in group D. The main components of the difference genes in each group were analyzed and results showed that the dispersion degree of group B was higher than those of group C and group D. The function enrichment analysis of TNF signaling pathway showed that the expression of associated mRNA genes in group C and group D were mostly down-regulated compared with group B. **Conclusion** Iron ion may affect the regulation of LncRNA in gastric epithelial cells and then affect the incidence of Hp infection.

Key words: iron ions; gastric epithelial cells; LncDNA; *Helicobacter pylori*

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染与胃炎、消化性溃疡、胃癌和胃黏膜相关淋巴组织

(MALT)淋巴瘤的发生密切相关, 1994 年 WHO 已将 Hp 列为 I 类致癌物。根据世界卫生组织 2014 年的统

① 基金项目: 国家自然科学基金项目(31460023); 广西自然科学基金项目(2015GXNSFAA139165); 广西重点实验室培育基地(桂教科研[2014]6)

② 通信作者, E-mail: zhaolijuan@126.com

计资料,我国胃癌死亡人数占全球胃癌死亡人数的比例高达47%^[1],目前Hp在全世界感染率超过50%,一些不发达地区Hp感染率可超过80%^[2],研究^[3]发现Hp感染后,并不是全部引发疾病,有20%~30%的感染者不发病但终身携带Hp;50%以上Hp感染者引发慢性炎症,并且程度不等;10%~15%Hp感染者引发消化性溃疡;只有极少数的感染者出现了胃部恶性肿瘤,以上结果表明只有部分Hp引起疾病产生,且Hp引起疾病的严重程度不同、结局状态不同。因此提出Hp感染疾病与环境密切相关,已有报道称影响Hp致病的环境因素包含饮食、肥胖、高盐、微量元素如维生素C和硒、铁、锌等^[4-7],但Hp的感染及致病机制与环境及宿主的相关性尚未清楚,且这些环境因素影响机体对Hp的调控机制,特别对Hp感染的胃上皮细胞长非编码RNA(long noncoding RNA, LncRNA)调控还未见报道。因此本研究通过铁离子诱导Hp感染的胃上皮细胞,检测相关LncRNA基因表达量的变化,分析Hp菌株与LncRNA基因及环境因素的相关性,进一步阐明Hp菌株致病机制,为防治Hp感染提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株及材料来源

胃上皮细胞GES-1(复旦IBS细胞资源中心),幽门螺杆菌26695(ATCC),DMEM高糖培养基(Gibco),胎牛血清(以色列BI),厌氧产气袋(日本三菱),幽门螺杆菌选择添加剂SR0147E、哥伦比亚血琼脂培养基CM0331B及脑心浸液(Oxoid),硫酸铁(SIGMA),Trizol(Invitrogen)。

1.2 方法

1.2.1 Hp菌株培养

Hp菌株26695接种于哥伦比亚血琼脂培养基(含5%胎牛血清),随即放入培养罐中,加入微需氧产气袋(5% O₂、10% CO₂、85% N₂),37℃培养2~3 d。

1.2.2 GES-1细胞培养

使用DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清)于CO₂培养箱37℃培养胃上皮细胞GES-1。

1.2.3 分组培养

将胃上皮细胞GES-1培养至6孔板于第2 d获80%汇合度单层细胞,PBS清洗换液,A组细胞作为空白对照,B组用Hp菌株26695以MOI=100的比例感染GES-1细胞,C组细胞加入5 μl硫酸铁(100 μM)培养4 h,D组在细胞感染Hp后4 h加入5 μl硫酸铁(100 μM)再培养4 h。

1.2.4 基因芯片检测

采用基因芯片检测A、B、C、D各组LncRNA和mRNA变化情况(每组两个生物重复),通过Gene Ontology(GO)和Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)分析异常表达的mRNA(数据检测均由华大基因公司完成)。

2 结果

2.1 LncRNA和mRNA差异基因

基因芯片检测结果显示,与A组(非感染组)相比较,B组(Hp感染组)上调LncRNAs 76个基因数,下调45个基因数,铁诱导非感染细胞组(C)上调40个基因数,下调123个基因数,铁诱导感染细胞组(D)上调124个基因数,下调159个基因数,LncRNAs及mRNAs差异基因数量显示见表1。

表1 LncRNA基因及mRNA基因的各組差异数

组别	上调基因数	下调基因数
B组		
mRNA	584	419
LncRNA	76	45
C组		
mRNA	96	1041
LncRNA	40	123
D组		
mRNA	382	1326
LncRNA	124	159

2.2 各组间差异基因主成分分析

使用差异基因在所有芯片间的讯号最大值与讯号最小值的差异,筛选出前250基因探针进行主成分分析。各组比较,硫酸铁与Hp和胃上皮细胞共培养组(D1、D2)与胃上皮细胞组(A1、A2)最相似,硫酸铁与胃上皮细胞共培养组(C1、C2)与胃上皮细胞组(A1、A2)比较接近,Hp感染胃上皮细胞组(B1、B2)离散程度最高(见图1)。

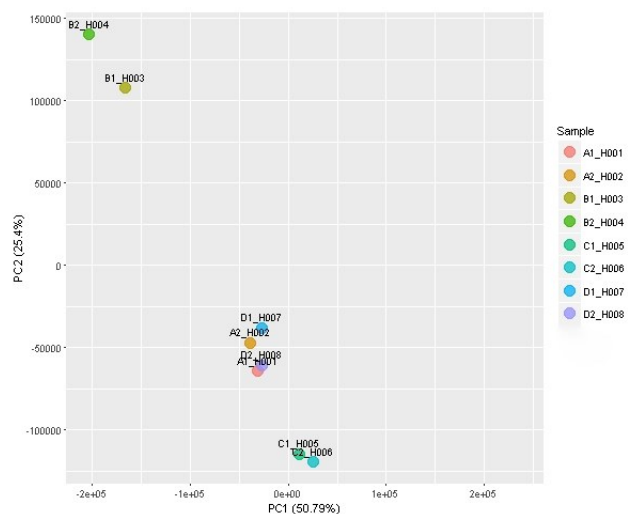


图1 各组间主成分分析

2.3 功能富集分析

以mRNA差异基因进行生物途径富集分析,肿瘤坏死因子(TNF)信号通路是排序前十位的生物途径富集结果,在该途径上各组共表达

基因数见表 2。B 组在该途径多数基因上调表达,C 组则多数基因下调表达,D 组相比 B 组部分基因下调表达(见图 2)。

表 2 TNF 信号通路 LncRNA 和 mRNA 共表达情况

组别	TNF 信号通路 基因集合数(K)	共表达 基因数(k)	k/K
B	106	31	0.29245283
C	106	19	0.179245283
D	106	24	0.226415094

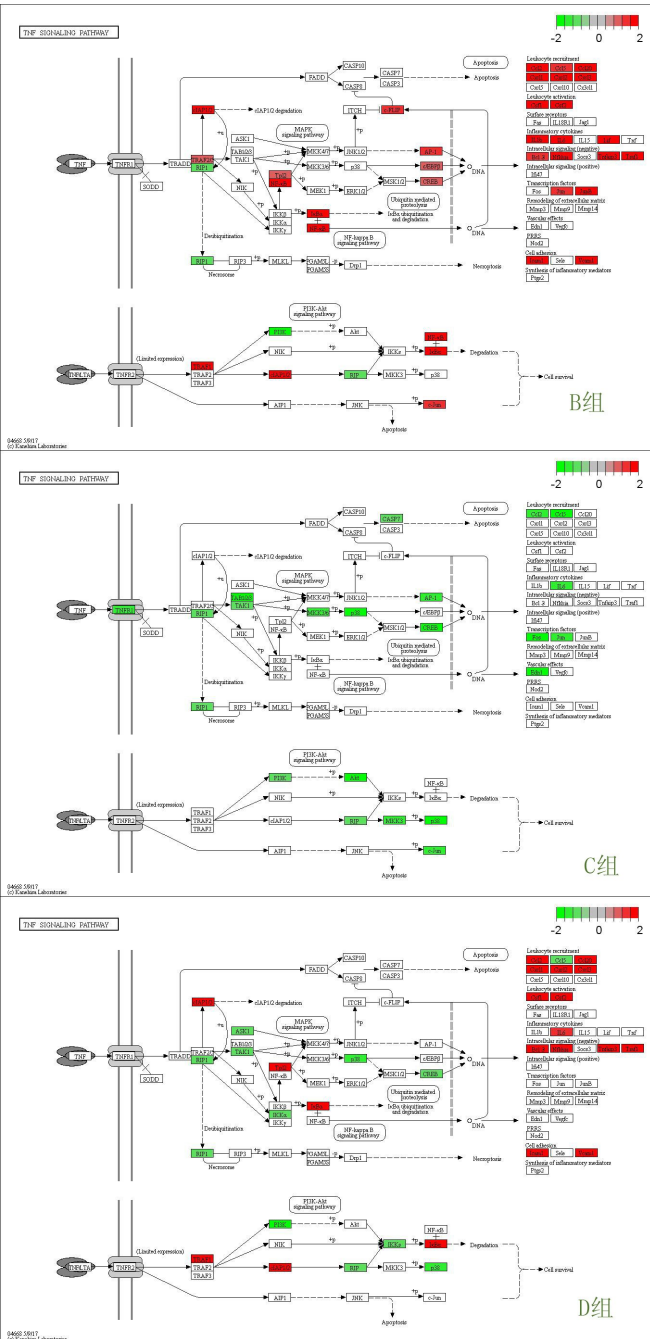


图 2 TNF 信号通路 mRNA 上调或下调表达情况(红色上调,绿色下调)

3 讨论

Hp 感染后临床结局的多样性提示其致病机制的复杂性。对于幽门螺杆菌的感染及致病机制已从基因多态性、基因分型、蛋白质组学等方面进行了研究。近几年已有研究通过分析 Hp 感染的胃上皮细胞中长非编码 RNA 基因组及基因表达量,探讨长非编码 RNA 在机体对幽门螺杆菌免疫应答中的作用,以期阐明 Hp 感染机制及获得对 Hp 感染的相关治疗方法。长非编码 RNA 是指一类长度大于 200 个核苷酸、不编码蛋白质的非编码 RNA,针对长非编码 RNA 的功能研究表明,其在转录起始的调控、转录及转录后的调控中均发挥着重要作用,因而影响着各种各样的生物学过程。最新研究表明,LncRNA 作为基因调控网络中的主要参与者可促进基因的转录调控,与各种疾病机制密切相关。LncRNA 基因参与胃癌疾病的调控等作用已被相继报道^[8-9],Lin XC 等^[10]用微阵列技术证明 LncRNA 在胃癌中的致病作用,发现 10 种不同的 LncRNA 可能参与调控 p53 信号通路。Liu L 等^[11]发现一个新的 LncRNA 基因 ncRuPAR 可能过抑制蛋白酶激活受体-1 而阻止胃癌的发展。在 Liu Yang 等^[12]的研究中鉴定出两个新的在机体对 Hp 的反应中起重要作用的 XLOC_004122 和 XLOC_014388 基因,Hong Zhu 等^[13]的研究中也发现几个与 Hp 感染相关的 LncRNA。李凌雪等^[14]的研究证明 LINC00260 能抑制幽门螺杆菌感染胃上皮细胞系引起的炎症反应和细胞迁移。

Hp 在人类胃部长期感染定植的过程中,菌体、环境因素和宿主共同组成一个复杂的网络而精确地调节机体的免疫反应,如果能通过研究复杂的网络调节机制可更好地获得诊断和治疗方法。研究表明,儿童感染 Hp 会影响铁元素吸收的平衡^[15-16],Noto JM 等^[17]研究表明缺铁可加快 Hp 诱发癌症,那么环境中的铁离子是否会影响宿主细胞 LncRNA 调控机体对 Hp 感染的致病作用,从而影响发病情况? 本研究通过基因芯片检测 Hp 感染的胃上皮细胞 GES-1(B 组)、铁诱导的非 Hp 感染胃上皮细胞 GES-1(C 组)和铁诱导的 Hp 感染胃上皮细胞 GES-1(D 组)LncRNA 和 mRNA 基因差异表达,发现每组都出现一定数量的基因上调和下调表达,各组间差异基因主成分分析显示 C 组和 D 组离散程度接近,而与 B 组离散程度大,提示可能铁在其中影响 LncRNA 的表达;GO 和 KEGG 富集分析显示在 TNF 信号通路中,Hp 感染的胃上皮细胞 mRNA 多数上调表达,而铁诱导的非 Hp 感染胃上皮细胞多数 mRNA 下调表达,铁诱导的感染胃上皮细胞 mRNA 相比之下部分下调表达,如 Cc15、CREB 的表达在铁离子诱导的分组中是下调,而在非诱导的

Hp感染组是上调。提示铁元素在Hp感染中可能诱导LncRNA调控以阻断或延缓Hp的毒力损伤作用,或激活机体的免疫调控机制以抗Hp感染,从而影响Hp感染后的发病情况。

随着LncRNA的广泛研究,其在疾病中所发挥的作用备受关注,本研究拟从环境方面将其与Hp感染发病相关联,从全新的角度去阐明Hp致病机制,提供新的治疗理念依据。还有尚未阐明的LncRNA调控机制需进一步补充研究。

参考文献:

- [1] Malferteiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the masstricht V/Florence Consensus Report[M]. Gut, 2017, 66(1): 6-30.
- [2] Nagy P, Johansson S, Molloy-Bland M. Systematic review of time trends in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in china and the USA [J]. Gut Pathog, 2016, 8: 8.
- [3] 许庆党, 段广才, 郑鹏远, 等. 幽门螺杆菌基因型与慢性胃炎和消化性溃疡的相关性[J]. 中国热带医学, 2007, 7(5): 704-706.
- [4] NeginRaei, BahadorBehrouz, Saber Zahri, et al. The Effect of *Helicobacter pylori* Eradication on the Levels of Essential Trace Elements [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 17(3): 917-921.
- [5] Nakaji S, Fukuda S, Sakamoto J, et al. Relationship between mineral and trace element concentrations in drinking water and gastric cancer mortality in Japan [J]. Nutr Cancer, 2001, 40(2): 99-102.
- [6] Loh JT, Beckett AC, Scholz MB, et al. High-Salt Conditions Alter Transcription of *Helicobacter pylori* Genes Encoding Outer Membrane Proteins [J]. Infect Immun, 2018, 86(3): e00626-17.
- [7] Yao Y, Jiang Q, Jiang L, et al. Lnc-SGK1 induced by *Helicobacter pylori* infection and high salt diet promote Th2 and Th17 differentiation in human gastric cancer by SGK1/Jun B signaling [J]. Oncotarget, 2016, 7(15): 20549-20560.
- [8] Shafiee M, Aleyasin SA, Mowla SJ, et al. The Effect of MicroRNA-375 Overexpression, an Inhibitor of *Helicobacter pylori*-Induced Carcinogenesis, on lncRNA SOX2OT [J]. Jundishapur J Microbiol, 2016, 9(9): e23464.
- [9] Bang-Shun He, Hui-Ling Sun, Tao Xu, et al. Association of Genetic Polymorphisms in the LncRNAs with Gastric Cancer Risk in a Chinese Population [J]. Journal of Cancer, 2017, 8(4): 531-536.
- [10] Lin XC, Zhu Y, Chen WB, et al. Integrated analysis of long non-coding RNAs and mRNA expression profiles reveals the potential role of lncRNAs in gastric cancer pathogenesis [J]. Int J Oncol, 2014, 45(2): 619-628.
- [11] Liu L, Yan B, Yang Z, et al. ncRuPAR inhibits gastric cancer progression by down-regulating protease-activated receptor-1 [J]. Tumour Biol, 2014, 35(8): 7821-7829.
- [12] Liu Yang, Yupeng Long, Cong Li, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA profile in human gastric epithelial cell response to *Helicobacter pylori* [J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2015, 68(1): 63-66.
- [13] Hong Zhu, Qiang Wang, Yizheng Yao, et al. Microarray analysis of Long non-coding RNA expression profiles in human gastric cells and tissues with *Helicobacter pylori* Infection [J]. BMC Medical Genomics, 2015, 8: 84.
- [14] 李凌雪, 韩涛涛, 刘彦信, 等. 长链非编码 RNA LINC00260 抑制幽门螺杆菌感染胃上皮细胞系引起的炎症反应和细胞迁移 [J]. 基础医学与临床, 2016, 36(4): 480-485.
- [15] Serrano CA, Villagrán A, Toledo H, et al. Iron Deficiency and IL1 β Polymorphisms in *Helicobacter pylori*-infected Children [J]. Helicobacter, 2016, 21(2): 124-130.
- [16] Chen ST, Ni YH, Liu SH. Potential Association of IL1B Polymorphism with Iron Deficiency Risk in Childhood *Helicobacter pylori* Infection [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2018, 66(2): e36-e40.
- [17] Noto JM, Gaddy JA, Lee JY, et al. Iron deficiency accelerates *Helicobacter pylori*-induced carcinogenesis in rodents and humans [J]. J Clin Invest. 2013, 123(1): 479-492.

收稿日期: 2018-02-01; 修回日期: 2018-04-15