

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.004

· 研究快报 ·

## 细胞毒力因子 *CagA* 上调人胃黏膜上皮 GES-1 细胞 TET2 蛋白的表达

张昕,付华林,邹晓,金卫林,崔大祥(上海交通大学微纳科学技术研究院生物纳米工程研究室微纳制造技术国家重点实验室薄膜与微细技术教育部重点实验室,上海200240)

**[摘要]** **目的:**探讨幽门螺旋杆菌细胞毒素相关基因 A (cytotoxin associated gene A, *CagA*)与胃黏膜中 TET2 (ten-eleven translocation 2)蛋白表达的关系,以及 TET2 在 *CagA* 致癌过程中可能的作用。**方法:**Real-time PCR 检测人胃黏膜上皮细胞株 GES-1 和胃癌细胞株 MGC-803 中 *TET2* mRNA 的表达水平,细胞免疫染色法检测 TET2 蛋白的细胞定位及表达。将 pEGFP-*CagA*通过脂质体介导转染 GES-1 细胞,用 200  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 GES-1 细胞建立氧化应激模型,流式细胞仪检测细胞中活性氧 (reactive oxygen species, ROS)和细胞周期的变化。**结果:***TET2* mRNA 在 GES-1 细胞的表达水平低于胃癌 MGC-803 细胞 ( $1.00 \pm 0.08$  vs  $1.68 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ), TET2 蛋白在 GES-1 细胞表达水平低于胃癌 MGC-803 细胞 ( $8.09 \pm 3.57$  vs  $14.60 \pm 2.31$ ,  $P < 0.05$ )。与阴性对照组 pEGFP-N1 相比, pEGFP-*CagA* 转染组 GES-1 细胞中 *TET2* mRNA 表达水平升高 ( $1.00 \pm 0.04$  vs  $0.06 \pm 0.00$ ,  $P < 0.05$ ), TET2 蛋白表达水平也升高 ( $16.45 \pm 4.40$  vs  $10.82 \pm 3.39$ ,  $P < 0.05$ ), ROS 积累水平升高 ( $18.39 \pm 4.52$  vs  $15.31 \pm 4.40$ ,  $P < 0.05$ ), 细胞周期检测出现明显的凋亡峰。氧化应激 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  处理)模型中 GES-1 细胞与空白对照 GES-1 细胞相比, *TET2* mRNA 水平升高 ( $1.44 \pm 0.02$  vs  $1.00 \pm 0.04$ ,  $P < 0.05$ ), TET2 蛋白表达水平增高 ( $15.72 \pm 4.52$  vs  $11.74 \pm 4.34$ ,  $P < 0.05$ )。**结论:**幽门螺旋杆菌毒力因子 *CagA* 可诱导 GES-1 细胞 ROS 增高和细胞周期的失衡,氧化应激可以诱导 TET2 表达上调, TET2 可能参与 *CagA* 的致癌过程。

**[关键词]** 细胞毒素相关基因 A (*CagA*); 幽门螺旋杆菌; TET2 蛋白; 胃癌; MGC-803 细胞株; GES-1 细胞株; 活性氧

**[中图分类号]** R735.2; R730.2; R377

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)02-0153-06

## Virulence factor *CagA* upregulates TET2 protein expression in human gastric mucosa epithelial GES-1 cells

Zhang Xin, Fu Hualin, Zhi Xiao, Jin Weilin, Cui Daxiang (National Key Laboratory of Nano/Micro Fabrication Technology, Key Laboratory for Thin Film and Microfabrication of Ministry of Education, Department of Bio-Nano Science and Engineering, Institute of Micro/Nano Science and Technology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the association between the expression of the ten-eleven translocation 2 (TET2) protein and the cytotoxin associated gene A (*CagA*) of *Helicobacter pylori* (*Hp*), and to explore the possible mechanisms of *CagA* in the process of gastric carcinogenesis. **Methods:** Real-time PCR was used to detect *TET2* mRNA level in human gastric epithelial GES-1 cells and gastric cancer MGC-803 cells. Immunocytochemistry was used to detect the TET2 protein localization and expression in GES-1 and MGC-803 cells. GES-1 cells were transfected with pEGFP-*CagA* and a cell oxidative stress model was constructed with 200  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Flow cytometry was used to analyze cell cycle and ROS in GES-1 cells. **Results:** The mean expression level of *TET2* mRNA in GES-1 cells was lower than that in MGC-803 cells ( $1.00 \pm 0.08$  vs  $1.68 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ). TET2 protein expression in GES-1 cells was lower than that in MGC-803 cells ( $8.09 \pm 3.57$  vs  $14.60 \pm 2.31$ ,  $P < 0.05$ ). Compared with the negative control pEGFP-N1 group, the mean expression level of *TET2* mRNA in pEGFP-*CagA*-transfected GES-1 cells was increased ( $1.00 \pm 0.04$  vs  $0.06 \pm 0.00$ ,  $P <$

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(No. 2010CB933901), 国家杰出青年基金资助项目(No. 81225010)。Project supported by the National Key Basic Research and Development Program (973 Program) of China (No. 2010CB933901), and the National Science Foundation for Distinguished Young Scholar of China (No. 81225010)

**[作者简介]** 张昕(1987-),女,山东淄博人,硕士生,主要从事胃癌防治的基础和临床研究工作。E-mail: zbhyn123@126.com

**[通信作者]** 崔大祥(Cui Daxiang, corresponding author), E-mail: dx cui@sjtu.edu.cn

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130424.1310.004.html>

0.05), and TET2 protein expression in pEGFP-CagA-transfected GES-1 cells was also increased ( $10.82 \pm 3.39$  vs  $16.45 \pm 4.40$ ,  $P < 0.05$ ), and a higher level of ROS production was observed in pEGFP-CagA-transfected GES-1 cells ( $69 \pm 9.0$  vs  $91 \pm 16.8$ ,  $P < 0.05$ ), which significantly displayed the cell apoptosis in cycle analysis. In the cell oxidative stress model, *TET2* mRNA level in  $H_2O_2$  treated cells was higher than that in normal GES-1 cells ( $1.44 \pm 0.02$  vs  $1.00 \pm 0.04$ ,  $P < 0.05$ ) and TET2 protein expression level was higher than that in normal GES-1 cells ( $11.74 \pm 4.34$  vs  $15.72 \pm 4.52$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** CagA factor can induce ROS accumulation and cell cycle disruption of GES-1, indicating that TET2 can be upregulated by oxidative stress and may be involved in the progress of CagA-induced carcinogenesis.

[ **Key words** ] cytotoxin associated gene A (*CagA*); *Helicobacter pylori*; ten-eleven translocation 2 protein; gastric cancer; MGC-803 cell; GES-1 cell; reactive oxygen species

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(2): 153-158 ]

全世界约有一半人口感染幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp),其感染与胃癌、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的发生密切相关<sup>[1-3]</sup>。细胞毒素相关基因A(cytotoxin-associated gene A, *CagA*)是重要的毒力基因, Cag毒力岛(Cag pathogenicity island, *CagPAI*)是一个由27~31个基因组成的约40 000 bp的DNA片段,编码功能性IV型分泌系统(type IV secretion system, T4SS)作为CagA的运输通道。CagA经T4SS进入宿主细胞,通过依赖磷酸化和(或)独立于磷酸化的机制,与宿主细胞多种蛋白相互作用,导致细胞功能异常<sup>[2, 4-6]</sup>。有报道<sup>[1-3, 7, 8]</sup>称, CagA阳性的Hp感染者罹患癌症的风险更大。活性氧(reactive oxygen species, ROS)一直在促癌过程中起重要作用, ROS水平过高易引起DNA氧化性损伤<sup>[1, 6, 9]</sup>,使得细胞在分化过程中产生不可修复或错误修复的变化。*TET2*(ten-eleven translocation 2)是在髓系肿瘤中新近发现的抑癌基因,位于染色体4q24上,缺失或者突变会引起骨髓细胞的恶性增生<sup>[10-11]</sup>。*TET2*蛋白属于 $\alpha$ -酮戊二酸(alpha-ketoglutaric acid,  $\alpha$ -KG)和 $Fe^{2+}$ 依赖的双加氧酶,可氧化5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)生成5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC),在DNA主动去甲基化中扮演重要角色<sup>[12-15]</sup>。本研究试图探讨*TET2*的表达与毒力因子CagA在胃癌发生中的相互作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及主要试剂

人类胃黏膜上皮细胞系GES-1、胃腺癌细胞系MGC-803由中科院上海细胞库提供。常规复苏GES-1与MGC-803细胞,接种于含有100 U/ml青霉素、100  $\mu$ g/ml链霉素(Invitrogen公司)、10%胎牛血清(Gibco公司)的RPMI 1640(Hyclone公司)培养液,37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$ 、饱和湿度条件下传代培养,取对数生长期的细胞进行实验。

重组质粒pEGFP-CagA由浙江大学朱永良教授馈赠。兔抗人TET2单克隆抗体购自pTGLab公司,兔抗人5hmC单克隆抗体购自Active Motif公司,细胞骨架标志物乙酰化 $\alpha$ -Tubulin购自Santa Cruz公司,荧光二抗AlexaFluor 594和AlexaFluor 488购自Molecular Probes公司,辣根过氧化物酶标记链霉亲和素购自Pierce公司。亚细胞蛋白组抽提试剂盒、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II购自TaKaRa公司,DAPI试剂、超氧化物阴离子荧光探针二氢乙锭(dihydroethidium, DHE)购自上海碧云天公司,多聚甲醛购于国药集团化学试剂有限公司,无血清培养基Opti-MEM、胰酶(Trypsin-EDTA)、Lipofectamine<sup>™</sup> 2000、RNA TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司。逆转录试剂盒购自Toyobo公司,碘化丙啶(propidium iodide, PI)购自Sigma-Aldrich公司。细胞培养箱购自Thermo公司,流式细胞仪购自Beckman Coulter公司,PCR仪购自Eppendorf公司,共聚焦激光扫描显微镜购自Leica公司。

### 1.2 pEGFP-CagA转染GES-1细胞

适量密度GES-1细胞接种于24孔板,培养过夜,80%汇合时进行转染。转染前,先用Opti-MEM处理细胞30 min,转染步骤按Lipofectamin<sup>™</sup>2000操作手册进行,报告基因质粒pEGFP-CagA和内参质粒pEGFP-N1与转染试剂的比例是2.5  $\mu$ g:4  $\mu$ l,实验分pEGFP-CagA转染组、pEGFP-N1阴性对照组。

### 1.3 Real-time PCR检测GES-1和MGC-803细胞中TET2 mRNA的表达

利用TRIzol试剂分别提取GES-1和MGC-803细胞的总RNA,按照Invitrogen公司逆转录试剂盒合成cDNA,反应条件为:42  $^{\circ}$ C 30 min、99  $^{\circ}$ C 5 min,所得cDNA产物保存于-20  $^{\circ}$ C冰箱待用。采用SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II试剂盒以已合成cDNA为模板进行real-time PCR反应。*TET2* mRNA的引物序列:上游5'-TTCTTCCCCATGACCAC-3',下游5'-ACGCTTGAAGCAGGAGAT-3'。PCR循环条件为

变性 94 °C 30 s,退火 55 °C 45 s,延伸 65 °C 45 s,30 个循环;最后再 72 °C 延伸 5 min。PCR 完成后,软件分析基因的扩增情况,得到相应 Ct 值,以 *GAPDH* 作为内参照,每组设 3 个复孔,基因相对表达量(RQ)采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算。

#### 1.4 细胞免疫化学染色检测 GES-1 和 MGC-803 细胞中 TET 及 5hmC 表达

GES-1 和 MGC-803 细胞去除培养基后迅速用 PBS 冲洗 2 ~ 3 次,用 4% 的多聚甲醛室温固定 15 min,PBS 洗 3 ~ 4 次。加入 -20 °C 预冷的甲醇处理 10 min,再用 PBS 洗 3 ~ 4 次。用含 10% ~ 20% 驴血清的抗体稀释液室温封闭 30 ~ 40 min,用抗体稀释液稀释的一抗(抗体稀释度:TET2 为 1:200;5hmC 为 1:500;乙酰化  $\alpha$ -Tubulin 为 1:200)于 4°C 孵育过夜。次日用 PBS 洗涤,每次 5 min,洗 2 ~ 3 次后加入用 PBS 稀释的荧光二抗(抗体稀释度:AlexaFluor594 为 1:800;AlexaFluor488 为 1:400),在室温孵育 45 min 至 1 h,PBS 洗 4 次。用 50% 甘油/PBS(含 DAPI)封片。细胞爬片用荧光显微镜进行观察,采集图片,主要包括各荧光通道图片、荧光叠加图片(Merge)、微分干涉图片(differential interference contrast, DIC)。荧光结果由 Image ProPlus Version4.0 软件分析,检测细胞的荧光密度值。每张爬片检测 2 ~ 3 个非边缘视野,每个视野纪录一组数据。

#### 1.5 流式细胞术检测 GES-1 细胞的 ROS

用 DHE 储存母液以 10  $\mu$ mol/L 的终浓度加入细胞培养基,GES-1 细胞在 37 °C 避光孵育 30 min 装载,随后用 PBS 快速清洗 3 次,用胰酶将其消化成单个细胞进行流式细胞仪检测,对 pEGFP-CagA 转染组与 pEGFP-N1 阴性对照组数据进行分析处理。

#### 1.6 流式细胞术检测 GES-1 细胞的细胞周期

用胰酶消化收集 pEGFP-CagA 转染组和 pEGFP-N1 阴性对照组的 GES-1, PBS 洗 2 遍,弃上清,加入 70% 冰乙醇吹打均匀, -20 °C 过夜保存。次日用 PBS 洗去乙醇,1 000  $\times$  g 离心 3 min,洗 2 遍。PBS 重悬细胞,用 0.5  $\mu$ g/ml PI 对细胞进行染色,避光 37 °C 培养,进行流式细胞仪检测,对 pEGFP-CagA 转染组与 pEGFP-N1 对照组数据进行分析处理。

#### 1.7 统计学分析

以上实验均重复 3 次以上。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,SPSS 统计软件进行重复测量方差分析,多组间比较用单因素方差分析,两两比较采用 *LSD-t* 检验,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TET2 在 GES-1 和 MGC-803 细胞中的分布

本研究利用细胞骨架标记物乙酰化  $\alpha$ -tubulin 和 TET2 抗体进行免疫细胞化学双标染色,考察 TET2 在 GES-1 和 MGC-803 细胞中的分布情况。结果显示:在 GES-1 细胞中,TET2 定位于细胞核和细胞质中,在核内呈颗粒状,而胞质中 TET2 分布则较弥散(图 1A);在 MGC-803 细胞中,TET2 在核内表达量明显高于胞质部分(图 1A)。在同一曝光时间条件下,由平均荧光强度值比较得知,GES-1 细胞组为(8.09  $\pm$  3.57),MGC-803 细胞组为(14.60  $\pm$  2.31),后者细胞 TET2 表达有明显增强( $P < 0.05$ )。

进一步使用 Real-time PCR 对 GES-1 和 MGC-803 细胞内的 *TET2* mRNA 水平进行检测,结果显示,GES-1 细胞组的 RQ 值为(1.00  $\pm$  0.08),MGC-803 细胞组的 RQ 值为(1.68  $\pm$  0.07),*TET2* mRNA 在 MGC-803 细胞中的表达水平较高( $P < 0.05$ )。

5hmC 主要是 TET 蛋白氧化 5mC 的产物,本研究同时对 5hmC 进行免疫细胞化学检测。图 1B 显示 5hmC 均定位于细胞核内,GES-1 细胞组平均荧光强度为(13.73  $\pm$  3.09),MGC-803 细胞组为(7.50  $\pm$  2.89)。在 GES-1 细胞中 5hmC 的表达量明显高于 MGC-803 细胞( $P < 0.05$ )。

### 2.2 pEGFP-CagA 转染促进 GES-1 细胞中 TET2 的表达

目前多数研究人员认为胃组织癌变的起始阶段主要是 Hp 感染发生作用,白细胞介素 8(interleukin-8, IL-8)、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )等细胞因子水平是反映 Hp 感染的重要指标。已知在 Hp 相关胃癌发病机制中,CagA 为主的毒力因子可进入胃黏膜上皮细胞引起强烈的细胞炎症反应,引起氧自由基明显增加,促进细胞因子如 IL-8、TNF- $\alpha$  的释放和组织损害,而 CagA 阴性的 Hp 无此作用,这都说明 CagA 在引起炎症反应及进一步病理损害的过程中可能起到重要的作用。利用 GFP 标记的 CagA 表达质粒 pEGFP-CagA 瞬时转染入 GES-1 细胞中,用共聚焦显微镜检测 GFP 表达情况以保证转染效率。

细胞免疫染色图片(图 2)显示,pEGFP-CagA 转染细胞与阴性对照细胞相比,转染组 TET2 平均荧光强度(16.45  $\pm$  4.40)强于对照组 TET2 平均荧光强度(10.82  $\pm$  3.39)( $P < 0.05$ );转染组 5hmC 平均荧光强度(13.38  $\pm$  3.00)强于对照组 5hmC 平均荧光强度(11.97  $\pm$  3.39)( $P < 0.05$ )。结果提示,pEGFP-CagA 转染后细胞中 TET2 和 5hmC 表达均有所增高。

同时 RT-PCR 检测结果显示,pEGFP-CagA 转染组 *TET2* mRNA 的 RQ 值为(1.00  $\pm$  0.04),阴性对照组 *TET2* mRNA 的 RQ 值为(0.60  $\pm$  0.00),两组相比

较, 转染组 *TET2* mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.05$ )。

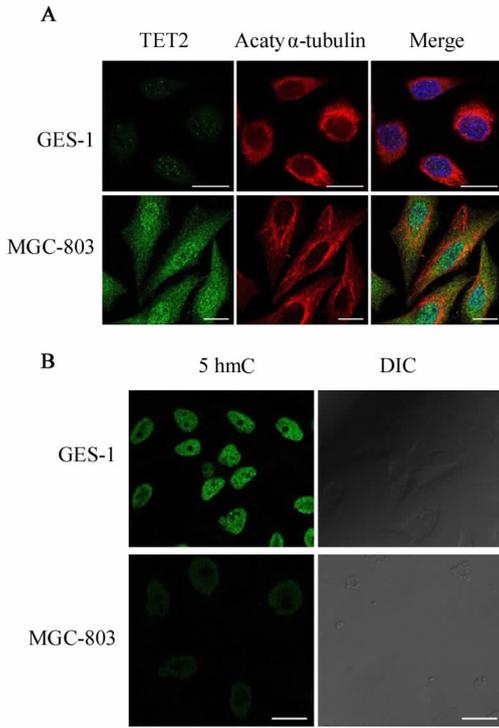


图 1 GES-1 和 MGC-803 细胞中 *TET2* ( A ) 和 5hmC ( B ) 的表达 ( bar : 20  $\mu\text{m}$  )

Fig. 1 Expressions of *TET2* ( A ) and 5hmC ( B ) in GES-1 and MGC-803 cells ( bar : 20  $\mu\text{m}$  )

### 2.3 pEGFP-CagA 转染后 GES-1 细胞大量凋亡和 ROS 水平升高

$\text{O}_2^-$  是生物体内重要的自由基之一, 也是所有 ROS 自由基的前体。为了解 ROS 是否是 *TET2* 高表达的直接诱因, 本研究进一步对 pEGFP-CagA 转染的 GES-1 细胞与对照细胞进行 ROS 检测, 用 PI 染色对细胞周期进行检测。结果表明 pEGFP-CagA 转染组 GES-1 细胞出现大量凋亡、 $G_1$  期延长 ( 图 3A、3B )。用超氧化物离子光探针 DHE 对细胞进行荧光染色标记, 流式细胞仪检测结果表明: pEGFP-CagA 转染细胞受到激发后比对照组细胞的荧光强度有明显加强 ( $15.31 \pm 4.40$  vs  $18.39 \pm 4.52$ ,  $P < 0.05$ )。结果说明, pEGFP-CagA 转染后 GES-1 细胞 ROS 积累水平升高。

### 2.4 *TET2* 蛋白在氧化应激条件下表达水平升高

利用  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 GES-1 细胞模拟上述转染实验的氧化应激模型。对 GES-1 细胞用  $200 \mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 12 h 后, 其形态学变化 ( 图 4 ) 明显, 细胞胞膜出现皱缩, 胞核浓缩或碎裂; 未处理细胞呈多边形铺展状态, 细胞膜完整, 核膜界限清楚, 胞核近圆形。细胞免疫荧光染色 ( 图 4 ) 结果表明, 与无任何处理的 GES-1 细胞

( 平均荧光强度值为  $11.74 \pm 4.34$  ) 相比, *TET2* 在  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后的 GES-1 细胞中表达明显增强 ( 平均荧光强度值为  $15.72 \pm 4.52$  ) ( $P < 0.05$ )。同时, 用 real-time PCR 实验检测 *TET2* mRNA 水平变化,  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 GES-1 细胞的 RQ 值为 ( $1.44 \pm 0.02$ ), 而空白对照即未处理 GES-1 细胞的 RQ 值为 ( $1.00 \pm 0.06$ ), 说明  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理使 *TET2* mRNA 水平升高 ( $P < 0.05$ )。

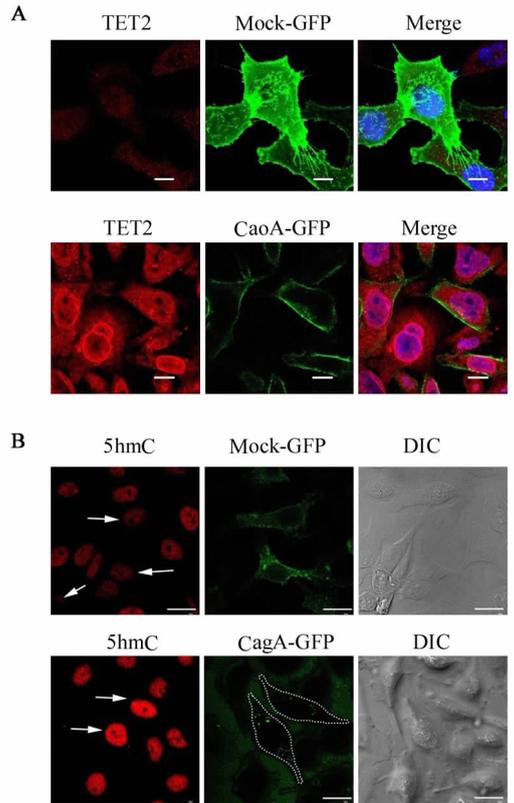


图 2 *TET2* ( A ) 和 5hmC ( B ) 在 pEGFP-CagA 转染 GES-1 细胞中的表达 ( bar : 20  $\mu\text{m}$  )

Fig. 2 Expressions of *TET2* ( A ) and 5hmC ( B ) in pEGFP-CagA transfected GES-1 cells ( bar : 20  $\mu\text{m}$  )

Up: pEGFP-CagA; Bottom: pEGFP-N1  
White arrow: The cell was successfully transfected

## 3 讨论

*TET2* 蛋白是肿瘤细胞表观修饰机制中新近的研究热点之一, 目前其研究方向主要在急性髓系白血病 ( acute myeloid leukemia, AML )、慢性粒-单核细胞性白血病 ( chronic granulocyte-monocyte leukemia, CMML ) 和不能分类的骨髓增殖性肿瘤 ( unclassified myeloproliferative neoplasm, MPN )<sup>[16-18]</sup> 等髓系肿瘤中, 研究<sup>[10-11, 17, 19-20]</sup> 发现, *TET2* 基因在大部分恶性血液病患者中突变或缺失, 因此确定 *TET2* 基因是

这些疾病产生的一种癌基因,但 TET2 在胃癌中的研究相对较少。本研究致力于对 TET2 蛋白在 *CagA* 诱导胃癌发生早期所扮演角色进行初步探讨。多项研究<sup>[1-3, 8, 21]</sup>表明, *CagA* 阳性 Hp 株有更高的毒力, *CagA* 进入胃黏膜上皮细胞引起的长期炎症可造成细胞损伤,进而引起萎缩及肠上皮化生,乃至最终的细胞癌变。

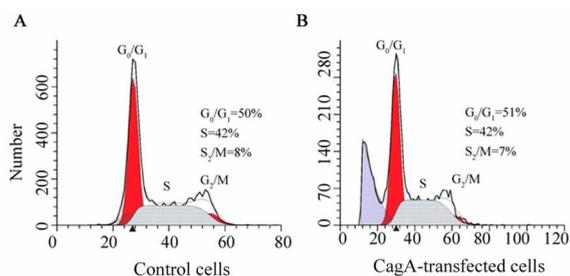


图3 pEGFP-CagA 转染后 GES-1 细胞的细胞周期分析

Fig. 3 Cell-cycle analysis in pEGFP-CagA transfected GES-1 cells

A: Control cells; B: pEGFP-CagA transfected GES-1 cells

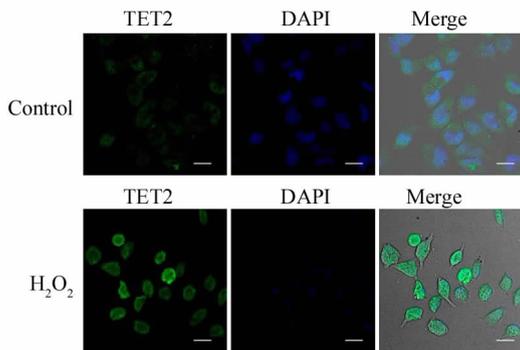


图4  $H_2O_2$  处理后 GES-1 细胞的形态学特征和 TET2 表达( bar: 30  $\mu m$  )

Fig. 4 TET2 expression and morphology of GES-1 cells exposed to  $H_2O_2$  ( bar: 30  $\mu m$  )

为了检测 *CagA* 蛋白在寄主细胞的作用,有研究人员<sup>[22]</sup>将 Hp 菌株分离得到 *CagA* 基因利用表达载体转染进入胃黏膜上皮细胞中,结果证明载体表达的 *CagA* 也会在磷酸化后与酪氨酸激酶发生作用,同样引起宿主细胞出现标志性的蜂鸟表型,后者以细胞伸长和扩散为主要特征。另发现 Hp 主要在黏着斑处进行局部 *CagA* 表达,而载体表达的 *CagA* 则在整个胞膜上表达。本研究同样利用 *CagA* 转染实验来模拟 *CagA* 诱导的细胞癌变前期过程,检测 TET2 蛋白在其中发挥的作用。

Real-time PCR 结果表明, *TET2* mRNA 在正常细胞 GES-1、pEGFP-CagA 转染 GES-1 细胞和胃癌 MGC-803 细胞中的表达各不相同。细胞免疫染色结果表明, TET2 蛋白在胃癌 MGC-803 细胞中入核趋势明显,但产物 5hmC 的表达量却下降,同时 pEGFP-CagA 转染细胞中的 TET2 表达量也有增高, 5hmC 的水平却相应增高。这些结果都与髓系肿瘤中 TET2 的表现不同。已知 TET 蛋白参与的动物细胞 DNA 主动去甲基化过程主要如下: 某些 5mC 被 TET 氧化成 5hmC,接着 5hmC 被 AID/APOBEC 脱氨酶脱氨基生成 5 羟基尿嘧啶( 5-hydroxy methyluracil, 5hmU ),进一步被氧化成 5-醛基胞嘧啶( 5-formylcytosine, 5fC )、5-羧基胞嘧啶( 5-carboxylcytosine, 5caC ), 5hmU 或 5caC 被 DNA 糖苷酶切除,空缺随后通过碱基切除修复途径( base-excision-repair pathway, BER )填补为未甲基化 C。考虑到 DNA 甲基化模式紊乱是肿瘤细胞的明显特征之一,肿瘤细胞常表现出 DNA 总体低甲基化和抑癌基因启动子高甲基化现象。另有多个研究<sup>[10, 16-18, 23]</sup>指出,仅 TET2 蛋白单方面过表达并不影响体内 5hmC 的整体水平,此处 5hmC 积累水平的差异现象正可说明细胞去甲基化过程的复杂性。不同肿瘤中, TET2 发挥的作用可能也不尽相同,或可以通过其他途径来实现其调控胃癌的作用,这需进一步探讨。

后续实验中 ROS 检测和细胞周期分析都表明 *CagA* 因子引起细胞内 ROS 增加,发生炎症反应,导致大量细胞出现凋亡。这些都与之前的研究<sup>[6, 24-31]</sup>一致: Hp 感染和癌变原因与炎症反应和宿主细胞失衡相关。 *CagA* 直接引起的 ROS 暴发是细胞炎症反应的最主要诱因之一,而 TET2 蛋白在表观遗传学的重要意义不言而喻。细胞氧化应激模型的结果表明, TET2 蛋白的增高是 ROS 诱导的结果。本研究推测胃黏膜上皮细胞内早期发生的 ROS 水平增高和细胞周期失衡,可能增加了 DNA 损伤、复制错误及突变的可能性,引起 TET2 的高表达,某些局部 5hmC 水平发生变化导致细胞恶变。而长期的细胞炎症反应可能引起整体 DNA 去甲基化与甲基化平衡打破,使肿瘤细胞逃避了凋亡机制,反过来进一步促进寄主细胞代谢失衡、生命活动紊乱等不正常的表现,引起了胃癌的发生。但与实际 Hp 感染上皮细胞过程相比, pEGFP-CagA 转染对 TET2 蛋白的作用只能得出一个初步的结论。胃癌发生是一个多因素、多步骤的过程,由胃炎发展成胃癌是一个较漫长的阶段, TET2 仅是其中一个因素,还有很多其他因素影响胃癌的发生、发展,值得进一步的深入研究。

## [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Farinati F, Cardin R, Bortolami M, et al. Oxidative DNA damage in gastric cancer: CagA status and OGG1 gene polymorphism [ J ]. Int J Cancer, 2008, 123( 1 ): 51-55.
- [ 2 ] Graham DY, Yamaoka Y. *H. pylori* and cagA: Relationships with gastric cancer, duodenal ulcer, and reflux esophagitis and its complications [ J ]. Helicobacter, 2001, 3( 3 ): 145-151.
- [ 3 ] Khodaii Z, Ghaderian SM, Akbarzadeh Najari R, et al. CagA and VacA status and influence of *Helicobacter pylori* infection on serum oxidative DNA damage in Iranian patients with peptic ulcer disease [ J ]. Ir J Med Sci, 2011, 180( 1 ): 155-161.
- [ 4 ] Mao ZJ, Tang QJ, Zhang CA, et al. Anti-proliferation and anti-invasion effects of diosgenin on gastric cancer BGC-823 cells with HIF-1 $\alpha$  shRNAs [ J ]. Int J Mol Sci, 2012, 13( 5 ): 6521-6533.
- [ 5 ] Liu Z, Xu X, Chen L, et al. *Helicobacter pylori* CagA inhibits the expression of Runx3 via Src/MEK/ERK and p38 MAPK pathways in gastric epithelial cell [ J ]. J Cell Biochem, 2012, 113( 3 ): 1080-1086.
- [ 6 ] Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. *Helicobacter pylori*: A ROS-inducing bacterial species in the stomach [ J ]. Inflamm Res, 2010, 59( 12 ): 997-1003.
- [ 7 ] Ekström AM, Held M, Hansson LE, et al. *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection [ J ]. Gastroenterology, 2001, 121( 4 ): 784-791.
- [ 8 ] Parsonnet J, Friedman G, Orentreich N, et al. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection [ J ]. Gut, 1997, 40( 3 ): 297-301.
- [ 9 ] Hileman EO, Liu J, Albitar M, et al. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: A biochemical basis for therapeutic selectivity [ J ]. Cancer Chemoth Pharm, 2004, 53( 3 ): 209-219.
- [ 10 ] Mullighan CG. TET2 mutations in myelodysplasia and myeloid malignancies [ J ]. Nat Genet, 2009, 41( 7 ): 766-767.
- [ 11 ] Kim YH, Pierscianek D, Mittelbronn M, et al. TET2 promoter methylation in low-grade diffuse gliomas lacking IDH1/2 mutations [ J ]. J Clin Pathol, 2011, 64( 10 ): 850-852.
- [ 12 ] Ito Shinsuke, S, D'Alessio AC, Taranova OV, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification [ J ]. Nature, 2010, 466( 7310 ): 1129-1133.
- [ 13 ] Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, et al. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells [ J ]. Cell Stem Cell, 2011, 8( 2 ): 200-213.
- [ 14 ] Cimmino L, Abdel-Wahab O, Levine Ross L, et al. TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation [ J ]. Cell Stem Cell, 2011, 9( 3 ): 193-204.
- [ 15 ] Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine [ J ]. Science, 2011, 333( 6047 ): 1300-1303.
- [ 16 ] Li Z, Cai X, Cai CL, et al. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies [ J ]. Blood, 2011, 118( 17 ): 4509-4518.
- [ 17 ] Ko M, Huang Y, Jankowska AM, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2 [ J ]. Nature, 2010, 468( 7325 ): 839-843.
- [ 18 ] Pronier E, Almire C, Mokrani H, et al. Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors [ J ]. Blood, 2011, 118( 9 ): 2551-2555.
- [ 19 ] Delhommeau F, Dupont S, Valle VD, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers [ J ]. New Engl Med, 2009, 360( 22 ): 2289-2301.
- [ 20 ] Langemeijer SMC, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes [ J ]. Nat Genet, 2009, 41( 7 ): 838-842.
- [ 21 ] Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach [ J ]. Cancer Res, 1995, 55( 10 ): 2111-2115.
- [ 22 ] Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, et al. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein [ J ]. Science, 2002, 295( 5555 ): 683-686.
- [ 23 ] Williams K, Christensen J, Helin K. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? [ J ]. EMBO reports, 2011, 13( 1 ): 28-35.
- [ 24 ] Forman D, Newell D, Fullerton F, et al. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: Evidence from a prospective investigation [ J ]. Brit Med J, 1991, 302( 6788 ): 1302-1305.
- [ 25 ] Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer [ J ]. J Clin Invest, 2007, 117( 1 ): 60-69.
- [ 26 ] Guilford P, Hopkins J, Harraway J, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer [ J ]. Nature, 1998, 392( 6674 ): 402-405.
- [ 27 ] Khanzode SS, Khanzode SD, Dakhale GN. Serum and plasma concentration of oxidant and antioxidants in patients of *Helicobacter pylori* gastritis and its correlation with gastric cancer [ J ]. Cancer Lett, 2003, 195( 1 ): 27-31.
- [ 28 ] Maeda K, Chung Y, Ogawa Y, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma [ J ]. Cancer, 1996, 77( 5 ): 858-863.
- [ 29 ] Oh JD, Karam SM, Gordon JI. Intracellular *Helicobacter pylori* in gastric epithelial progenitors [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102( 14 ): 5186-5191.
- [ 30 ] Ono H, Kondo H, Gotoda T, et al. Endoscopic mucosal resection for treatment of early gastric cancer [ J ]. Gut, 2001, 48( 2 ): 225-229.
- [ 31 ] Suzuki H, Mori M, Seto K, et al. Polaprezinc attenuates the *Helicobacter pylori*-induced gastric mucosal leucocyte activation in mongolian gerbils—a study using intravital videomicroscopy [ J ]. Aliment Pharm Therap, 2002, 15( 5 ): 715-725.

[ 收稿日期 ] 2013-01-05

[ 修回日期 ] 2013-03-10

[ 本文编辑 ] 王莹, 黄静怡