

PGRN在幽门螺杆菌诱导胃黏膜上皮细胞分泌IL-8中的作用及机制

李家仪^{1*}, 管福来², 史文静³, 刘春霄¹, 任宗娇¹, 章浏佳⁴, 王红艳^{1,5#}

¹潍坊医学院基础医学院病原生物学教研室, 山东 潍坊

²潍坊医学院形态实验室, 山东 潍坊

³潍坊医学院附属医院妇产科, 山东 潍坊

⁴潍坊医学院临床医学院, 山东 潍坊

⁵潍坊医学院临床医学院山东省高校免疫学重点实验室, 山东 潍坊

Email: 18369611061 @163.com, #wanghy@wfm.edu.cn

收稿日期: 2021年5月10日; 录用日期: 2021年5月29日; 发布日期: 2021年6月11日

摘要

目的: 幽门螺杆菌(*H. pylori*, HP)感染是胃炎发病率和胃癌死亡率逐年增长的主要原因之一。我们前期研究表明PGRN在胃炎组织中的表达增加, HP感染可促进胃黏膜上皮细胞PGRN的表达。因此, 本研究旨在探讨HP感染诱导胃黏膜上皮细胞白细胞介素-8 (IL-8)表达变化中PGRN表达的作用及机制, 以阐明PGRN在相关炎症反应中的作用。方法与结果: 采用实时荧光定量PCR (qRT-PCR)法和ELISA法检测HP26695感染胃上皮细胞中IL-8的表达水平, 该作用是通过NF- κ B通路介导的。采用qRT-PCR和western blot (WB)检测慢病毒干扰载体PLKO.1-PGRN shRNA-GFP诱导的IL-8在胃上皮细胞中的表达变化。通过干扰PGRN的表达, HP可以诱导胃黏膜上皮细胞P65的磷酸化水平, 进而促进胃黏膜上皮细胞中IL-8 mRNA和蛋白的表达。进一步加入NF- κ B通路信号抑制剂BAY11-7082, 可干扰PGRN对胃黏膜上皮细胞P65磷酸化的影响, 并显著抑制HP感染后IL-8的变化。结论: PGRN通过NF- κ B信号通路抑制HP感染诱导的IL-8表达上调, 在胃炎的发生发展中起重要的抗炎和保护作用。

关键词

胃炎, 幽门螺杆菌, PGRN, IL-8

Role and Mechanism of PGRN in the Secretion of IL-8 by Gastric Mucosal Epithelial Cells Induced by *Helicobacter pylori*

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 李家仪, 管福来, 史文静, 刘春霄, 任宗娇, 章浏佳, 王红艳. PGRN 在幽门螺杆菌诱导胃黏膜上皮细胞分泌 IL-8 中的作用及机制[J]. 临床医学进展, 2021, 11(6): 2616-2627. DOI: 10.12677/acm.2021.116378

Jiayi Li^{1*}, Fulai Guan², Wenjing Shi³, Chunxiao Liu¹, Zongjiao Ren¹, Liujia Zhang⁴,
Hongyan Wang^{1,5#}

¹Department of Pathogenic Biology, Basic Medicine College, Weifang Medical University, Weifang Shandong

²Morphological Laboratory, Weifang Medical University, Weifang Shandong

³Department of Gynecology, Weifang Medical University Affiliated Hospital, Weifang Shandong

⁴Clinical Medical College, Weifang Medical University, Weifang Shandong

⁵Key Laboratory for Immunology in Universities of Shandong Province, Clinical Medical College, Weifang Medical University, Weifang Shandong

Email: 18369611061 @163.com, #wanghy@wfmw.edu.cn

Received: May 10th, 2021; accepted: May 29th, 2021; published: Jun. 11th, 2021

Abstract

Objective: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*, *HP*) infection is one of the main causes of annual growth in the incidence and mortality of gastritis. Our previous study demonstrated increased expression of PGRN in gastritis tissues, and *HP* infection could promote the expression of PGRN in gastric mucosal epithelial cells. Therefore, the present study is to investigate the role and mechanism of PGRN expression changes in interleukin-8 (IL-8) expression in gastric mucosa epithelial cells induced by *HP* infection, with the aim to elucidate the role of PGRN in the associated inflammatory response. **Methods and Results:** The expression levels of IL-8 in gastric epithelial cells infected with *H. pylori* 26695 were detected by qRT-PCR and ELISA, and this effect was mediated through the NF- κ B pathway. Furthermore, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and western blot (WB) were used to measure the expression changes of IL-8 induced by lentivirus interference vector PLKO.1-PGRN shRNA-GFP in gastric epithelial cells in the control group. The expression of IL-8 mRNA and protein in gastric mucosal epithelial cells induced by *HP* was significantly increased through interference with PGRN expression, which significantly increased P65 phosphorylation induced by *HP* in gastric epithelial cells. The further addition of BAY11-7082, a signal inhibitor of the NF- κ B pathway, could significantly inhibit the *HP* infection and interfere with the effect of PGRN on P65 phosphorylation in gastric mucosa epithelial cells. **Conclusions:** PGRN inhibits the elevated expression of IL-8 induced by *HP* infection through the NF- κ B signaling pathway, and thus plays an important anti-inflammatory and protective role in the occurrence and development of gastritis.

Keywords

Gastritis, *H. pylori*, PGRN, IL-8

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 介绍

在中国, 胃炎的发病率高达 50%~80%, 80%的成年人出现不同程度的胃炎。此外, 随着老年人口增多、城市工业化进程加快、环境污染严重、人们生活习惯和饮食结构的改变, 其发病率进一步上升; 受影响的人口也趋于年轻化[1] [2] [3]。如果不积极治疗, 胃炎就会由急性转为慢性、慢性浅表性胃炎、慢

性萎缩性胃炎,甚至肠上皮化生、异型增生,最终导致胃癌。目前最常见的胃炎治疗方案是根除 *HP* 的同时对症治疗,即三联疗法、胃酸抑制剂和胃黏膜保护剂[4] [5] [6]。

胃炎是多种因素共同作用的结果,其中,*HP* 感染是主要原因。*HP* 目前被世界卫生组织列为一类致癌物。全球有一半的人口感染了 *HP*,几乎所有被感染的患者都可以发展为慢性胃炎。*HP* 与宿主相互作用,介导体对细菌的免疫反应,导致白细胞介素 8 (IL-8)、环氧合酶-2 (COX-2)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ) 等因子的上调。这些细胞因子通过多种渠道产生免疫反应,损害局部组织,导致胃炎。其中,IL-8 在炎症的发生发展中尤为重要。IL-8 又称炎性趋化因子或促炎性趋化因子,是中性粒细胞的趋化剂,主要由 IL-1、TNF、受脂多糖刺激的单核细胞、内皮细胞、成纤维细胞和 T 淋巴细胞产生[7]。由于 IL-8 能够刺激趋化因子的释放,吸引免疫细胞到炎症部位,对细菌感染做出反应,进行免疫监测,控制免疫细胞趋化,因此 IL-8 又称为中性粒细胞趋化因子[8] [9] [10]。

颗粒蛋白前体(PGRN,也称为 GEP [Granulin-Epithelial Protein Precursor]),是通过连接区(P1-7)连接 7 个保守谷蛋白(A、B、C、D、F、G)单元而形成的功能前体[11]。PGRN 是一种分泌型糖蛋白,具有非常广泛的生理功能。作为介导细胞周期过程和细胞运动的多功能生长因子,在细胞生长、转化、促进细胞周期、伤口愈合和细胞毒性耐药性等方面具有普遍的调节作用。我们前期研究发现,胃炎时,胃黏膜上皮细胞中 PGRN 的表达增加。此外,PGRN 可诱导多种炎性细胞因子的分泌,如 IL-8、IL-6、IL-10、TNF- α 等[11] [12] [13]。同时,PGRN 可促进肾损伤、神经退行性变等多种相关疾病的发展,与神经炎症、人动脉粥样硬化斑块、急性肾损伤、肌萎缩性侧索硬化症、阿尔茨海默病、帕金森病等相关。总之,PGRN 在损伤修复和免疫调节中发挥着重要作用,为临床诊断和治疗提供了新的方向,是未来研究的目标。然而,PGRN 在 *HP* 感染引起的胃炎中的作用尚不清楚。本文就其在胃炎中的作用机制及潜在的治疗价值进行了讨论。

本研究以 *HP*26695 株和胃黏膜上皮 GES-1、SGC7901 细胞为模型,探讨 PGRN 对 *HP* 诱导 IL-8 表达的影响,以及二者在蛋白和 mRNA 水平上的相关性。探讨 *HP* 感染在胃炎发生发展中可能的机制,为其临床诊断和治疗提供新的靶点。

2. 材料和方法

2.1. 细胞培养和试剂

人胃黏膜上皮 GES-1 细胞和胃癌细胞 SGC7901 在 RPMI 1640 培养基中培养(Invitrogen, Carlsbad, CA),添加 10% 胎牛血清(Hyclone, Logan, UT),青霉素/链霉素(1:100 稀释; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),在 37°C, 5% CO₂ 的气体环境中培养。

特异性抑制剂 PI3k/AKT 抑制剂 UO126、MEK1/2 抑制剂 LY294002 和核因子- κ B (NF- κ B)抑制剂 bay11-7082 从 Invitrogen 公司购入。在二甲亚砜(DMSO)溶液中制备储备溶液。在 *HP* 刺激后用上述抑制剂处理细胞。没有抑制剂的对照组用培养基和相同浓度的 DMSO 单独处理。

2.2. 动物饲养

将 SPF 级 C57BL/6 雄性 6 周龄小鼠 40 只,在相对湿度 40%~60%、室温 23.2°C、噪音 < 60 dB、光-暗循环 12 小时的标准实验室条件下观察驯养 7 d。动物由潍坊医学院实验动物中心提供的水和营养完整的饲料(高压蒸汽灭菌)饲养。

2.3. 幽门螺杆菌培养

本研究使用的幽门螺杆菌菌株为实验室保存的标准菌株(NCTC26695、NCTC11637、Sydney 菌株 1

或 SS1)。所有菌株的培养基均为含 5% 胎牛血清的布氏肉汤培养基, 在 37°C, 低氧环境(5% 氧气、10% 二氧化碳、85% 氮气)下培养。收集时以 6000 rpm 离心 3 分钟。感染细胞时按照荷菌量 MOI 为 100:1。

2.4. 免疫组织化学

取新鲜小鼠胃黏膜上皮, 在低温恒温器中切成 5 μm 厚。石蜡固定切片。将切片置于烘箱中化蜡。然后置于玻片架上分别浸入, 二甲苯 I 15 min, 二甲苯 II 15 min, 100% 乙醇 10 min, 95% 乙醇 6 min, 80% 乙醇 min, 75% 乙醇 2 min, 单蒸水 1 min。然后进行抗原修复。滴加适量内源性过氧化物酶阻断试剂, 后用山羊血清封闭, 并洗涤。滴加一抗后置于避光湿盒内 4°C 孵育过夜或 37°C 孵育 60 分钟, 后用 PBS 洗涤。滴加生物素标记山羊抗兔 IgG 并置于避光湿盒内室温孵育 10~15 分钟。最后用 DAB 法显色并拍照。

2.5. RNA 提取与实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

用 TRIzol (Invitrogen)按照制造商的方案提取细胞总 RNA。使用 Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)随机引物进行逆转录。从 1 μg 总细胞 RNA 中合成第一链 cDNA。然后, 扩增 PGRN 和 β -actin 的 cDNA。使用的特异性引物为:

PGRN 正向引物 5'-GGACAGTACTGAAGACTCTG-3', 反向引物
5'-GGATGGCAGCTTGTAATGTG-3';

β -actin 正向引物 5'-AGTTGCGTTACACCCTTTCTTG-3', 反向引物
5'-CACCTTACCGTTCCAGTTTT-3';

IL-8 正向引物 5'-ACACTGCGCCAACACAGAAATTA-3', 反向引物
5'-TTTGCTTGAAGTTTCACTGGCATC-3'。

实时 PCR 反应包括 ABI7000 快速实时 PCR 系统与 SYBR®预混 ExTaq™根据规定的程序。

HP 与 GES-1 和 SGC7901 细胞在培养基中孵育达 6、12 和 24 h。菌/细胞比例为 100:1。然后用 PBS 洗涤细胞两次, 在无血清的 RPMI-1640 培养基中培养。分别于 0、6、12、24 h 后收集培养上清液进行蛋白检测。IL-8 的表达采用酶联免疫吸附试验(中国南京森贝佳生物技术有限公司), 按照生产厂家的方案进行检测。各组在 450 nm 处测定吸光度, 用分光光度法测定 IL-8 浓度。每个实验至少重复三次。

2.6. Western Blot

用细胞裂解缓冲液裂解细胞, 用 BCA 法测定蛋白含量。每孔加入 40 μg 蛋白, 后进行 SDS-PAGE 电泳, 再转移到 PVDF 膜上。室温下用 5% 脱脂牛奶封闭膜 1.5 h, 用 TBST 洗脱 3 \times 10 min。一抗孵育过夜, 洗涤后与二抗室温孵育 2 小时。 β -actin 作为内参。

2.7. 慢病毒载体转染的干扰

成功构建的 PLKO.1-PGRN shRNA-GFP 干扰慢病毒能有效抑制胃黏膜上皮细胞中 PGRN mRNA 和蛋白的表达。GES-1 和 SGC-7901 细胞在 6 孔板上传代, 2 \times 10⁵ 细胞/孔, 培养过夜。PGRN shRNA 组和对照组均以 Lipofectamine 2000 作为转染剂。PGRN shRNA 的干扰序列为: PGRN shRNA 正向序列为: 5'-CCGGGGCCACTCCTGCATCTTTACTCGAGTAAAGATGCAGGAGTGGCCTTTTTG-3', 反向序列为: 5'-AATTCAAAAAGAGGCCACTCCTGCATCTTTACTCGAGTAAAGATGCAGGAGTGGCC-3'。它们均由上海生物工程技术有限公司合成。Lipofectamine™2000 试剂(Invitrogen)用于脂质体细胞感染。这一步采用 60% 感染浓度的慢病毒载体。

2.8. 裸鼠成瘤实验

选用适龄裸鼠，将裸鼠固定后，选择腋下为成瘤位置。用 75% 乙醇消毒裸鼠背部，侧腰部及腋下皮肤，用无菌的一次性注射器吸取细胞悬液，接种细胞时选择裸鼠侧腰部以上部位进针，在皮肤和肌肉层时间穿行一段距离后在目标注射点注射。每个部位约注射 0.2 mL。然后将裸鼠放适宜的饲养环境。每日观察成瘤情况并记录。

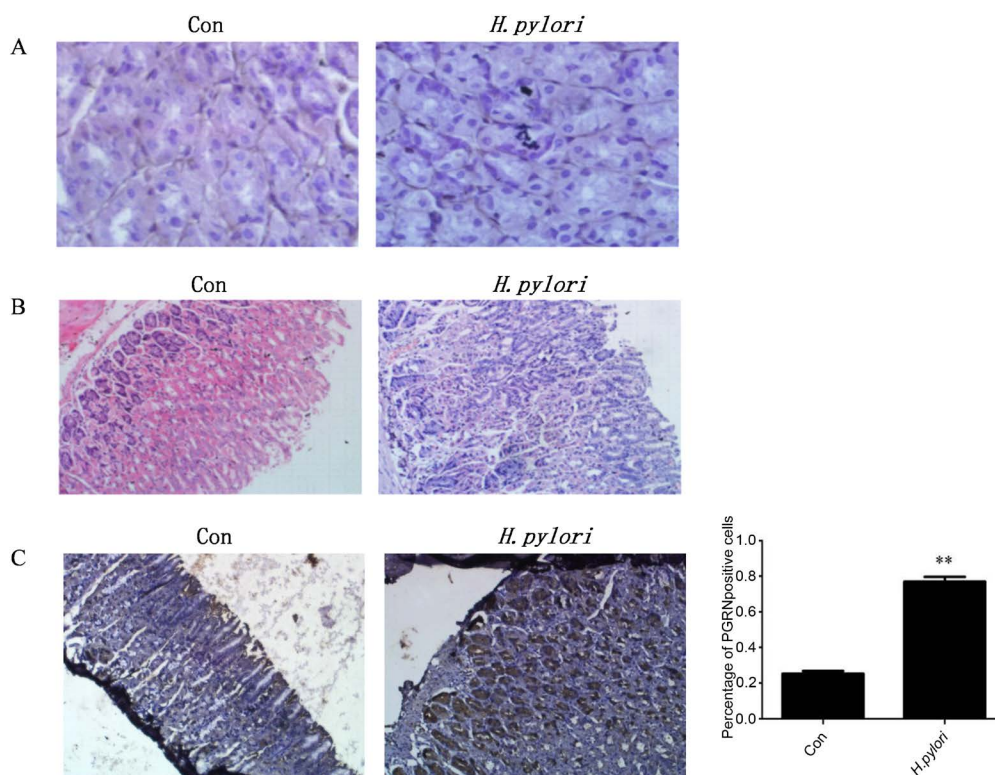
2.9. 统计数据分析

所有实验数据均采用 SPSS 软件进行统计分析，采用 T 检验确定统计学意义，以 $P < 0.05$ 为标准。

3. 结果

3.1. 幽门螺杆菌感染致胃炎小鼠胃黏膜中 PGRN 的表达明显升高

为了探讨 *HP* 感染对 PGRN 表达的影响，本研究建立了小鼠 *HP* 感染模型。用 *HP* SS1 株感染小鼠 48 周后，W-S 银染结果显示，所有小鼠均成功定植(如图 1(A))。免疫组织化学染色结果显示，小鼠模型中出现 *HP* 相关性胃炎(图 1(B))。病理改变早期，淋巴细胞和嗜酸性粒细胞浸润，主要位于腺下区。随着感染时间的延长，细胞浸润的范围和程度扩大，嗜中性粒细胞浸润，可通过固有层扩散至腺腔。*HP* 自然感染动物的胃黏膜中常可见嗜酸性粒细胞浸润，正常人和动物均无嗜酸性粒细胞浸润。免疫组织化学染色结果显示，正常小鼠胃黏膜中 PGRN 表达较低，而 *HP* 导致的慢性炎症后 PGRN 表达明显升高(图 1(C))。

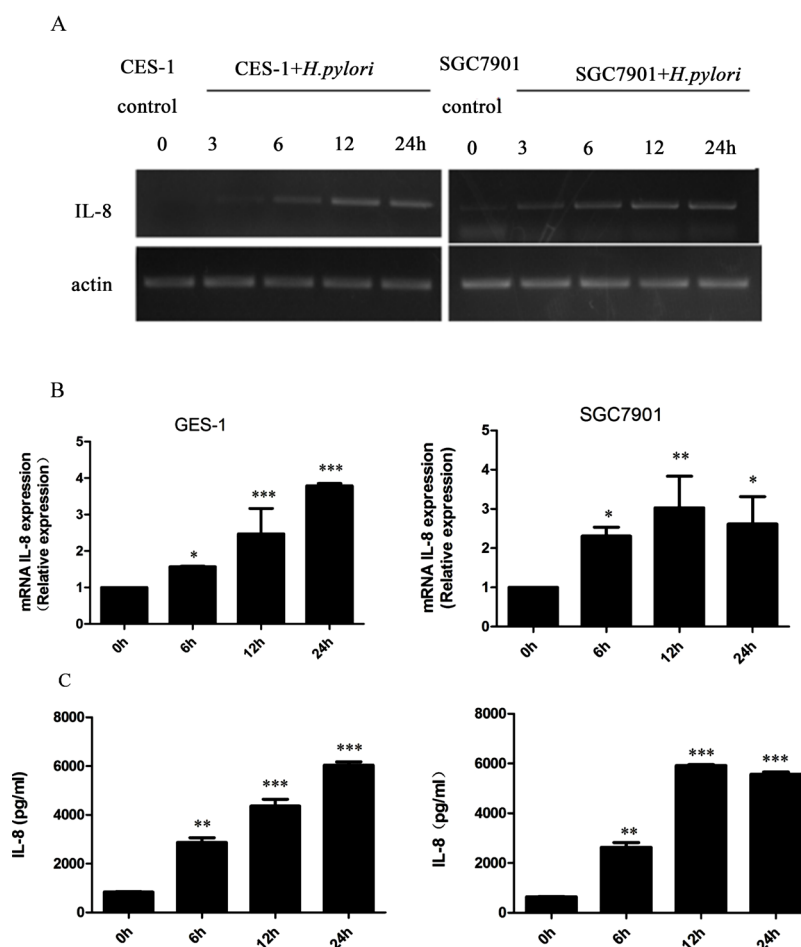


A: 小鼠胃黏膜上皮细胞 *HP* W-S 银染色(200×)。B: 胃黏膜的组织病理学表现。*HP* 感染引起固有层内炎症细胞的浸润，包括中性粒细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞(200×)。C: 小鼠新鲜胃黏膜上皮标本的组织化学染色中(200×) PGRN 的表达。数据以三次重复实验的均数±标准误差(SEM)表示。con: 对照组; *H. pylori*: 幽门螺杆菌定植组。 $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$ 。

Figure 1. Stain and immunohistochemical staining of gastric mucosa of *HP* infected mice and control mice
图 1. 幽门螺杆菌感染小鼠和对照组小鼠胃黏膜的组织染色和免疫组织化学染色

3.2. 幽门螺杆菌感染诱导胃上皮细胞中 IL-8 的表达呈时间依赖性

采用琼脂糖凝胶电泳、实时荧光定量 PCR、ELISA 检测 *HP* 感染胃黏膜上皮细胞 GES-1 和胃癌细胞 SGC7901 中 IL-8 的表达变化。分别用 *HP26695* 株感染细胞 0、6、12、24 小时，MOI 为 100:1。如图 2(A) 所示，琼脂糖凝胶电泳结果显示，*HP* 与胃黏膜上皮细胞相互作用时间延长，IL-8 mRNA 表达量增加。也就是说，*HP26695* 株的感染可以诱导胃上皮细胞 GES-1 和 SGC7901 中 IL-8 的表达上调，且这种诱导与 *HP* 感染的时间呈正相关。实时荧光定量 PCR 检测结果与 ELISA 检测结果一致(图 2(B)、图 2(C))。



A: *HP* 感染人胃黏膜细胞 GES-1 和胃癌细胞 SGC7901 后，PCR 检测 IL-8 的表达。B: 人胃黏膜细胞 GES-1 和胃癌细胞 SGC7901 感染 *HP* 后，通过实时荧光定量 PCR 检测 IL-8 的表达。C: 人胃黏膜细胞 GES-1 和胃癌细胞 SGC7901 感染 *HP* 后，ELISA 检测 IL-8 的表达。数据以三次重复实验的均数±标准误差(SEM)表示。con: 对照组; *H. pylori*: 幽门螺杆菌定植组。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

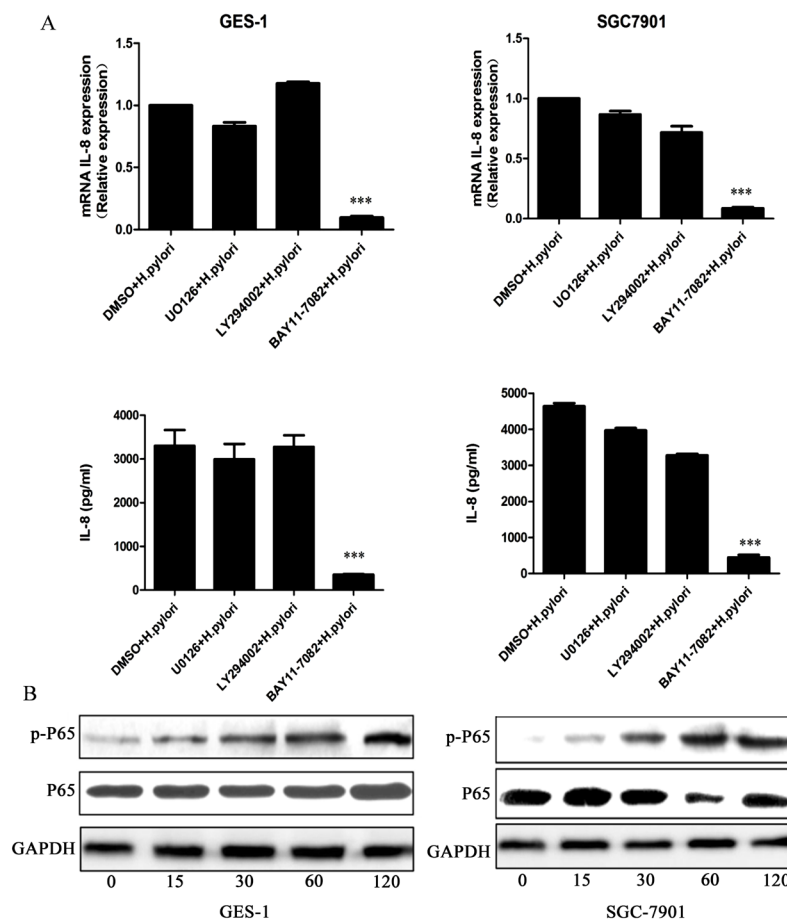
Figure 2. Relationship between *HP* infection duration and IL-8 expression in human gastric mucosa epithelial cells

图 2. 人胃黏膜上皮细胞中 *HP* 感染时间与 IL-8 表达的关系

3.3. 幽门螺杆菌通过 NF- κ b 通路调控 IL-8 在胃黏膜上皮细胞中的表达

为探究 *HP* 感染对胃上皮细胞 GES-1 和 SGC7901 诱导 IL-8 表达的调控作用，当细胞融合度达到 70% 时，分别加入 PI3K/AKT、MEK 和 NF- κ b 信号抑制剂 LY2940021、U0126 和 BAY11-7082 作用 2 小时。前期结果显示，将 *HP* 按 MOI 为 100:1 感染细胞 12 小时后，IL-8 mRNA 表达量应明显增加。qRT-PCR 结果显示，将 NF- κ b 抑制剂 BAY11-7082 提前 2 小时作用于细胞再加菌作用，可显著抑制胃黏膜上皮细胞 GES-1

和胃癌细胞 SGC7901 中 *HP* 对 IL-8 的诱导表达(图 3(A))。ELISA 检测结果与检测 mRNA 水平一致(图 3(A))。此外, 分别用 *HP*26695 株感染 GES-1 和 SGC7901 细胞 0 分钟, 15 分钟, 30 分钟, 60 分钟和 120 分钟。结果表明, *HP* 感染可能大大增加细胞 P65 磷酸化水平, 并且, 在 *HP* 感染胃黏膜上皮细胞 2 小时的时候, P65 的磷酸化最为显著, 进一步证实 *HP* 感染诱导 IL-8 的产生可能受 NF- κ b 通路的调控。



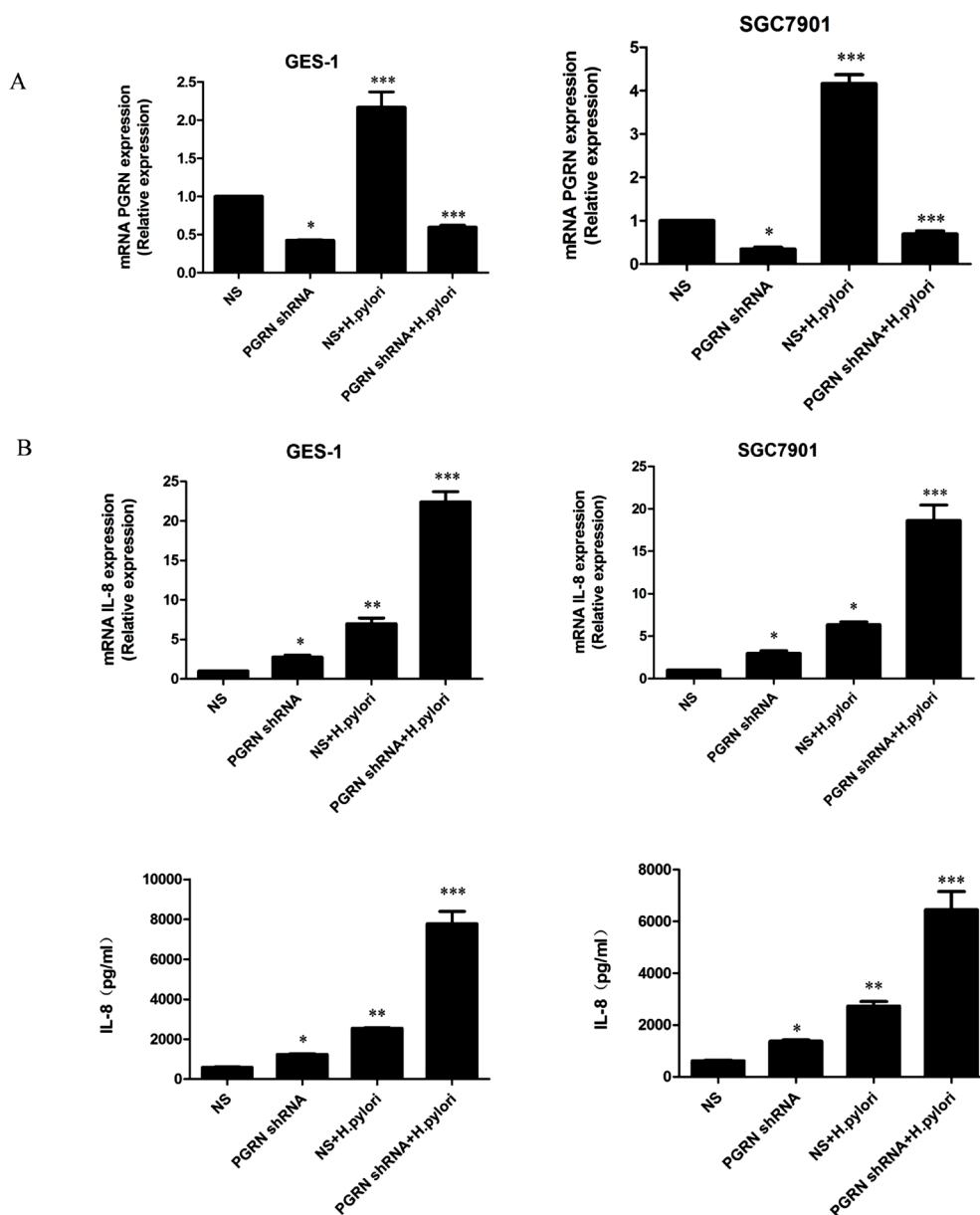
A: 加入信号抑制剂后 *HP* 感染胃黏膜上皮 GES-1 和胃癌细胞 SGC7901 中 IL-8 表达的变化。NF- κ b 抑制剂 BAY11-7082 能显著抑制 *HP* 感染胃黏膜上皮 GES-1 和 SGC7901 细胞中 IL-8 的表达, 在蛋白水平和 mRNA 水平上结果一致。B: WB 结果显示, *HP* 感染促进 P65 的磷酸化。数据以三次重复实验的均数 \pm 标准误差(SEM)表示。con: 对照组; *H. pylori*: 幽门螺杆菌定植组。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

Figure 3. Regulation of IL-8 signaling pathway in gastric mucosal epithelial cells infected by *HP* strain 26695

图 3. *HP* 菌株 26695 感染胃黏膜上皮细胞后 IL-8 信号通路的变化

3.4. PGRN 对慢病毒感染的干扰可增加 *HP* 诱导的胃黏膜上皮细胞 IL-8 的表达

为验证 PGRN 在 *HP* 感染诱导胃黏膜上皮细胞中 IL-8 变化中的作用, 我们还成功构建了 PLKO.1-PGRN shRNA-GFP 干扰慢病毒, 并成功感染细胞, 该慢病毒能有效抑制 PGRN mRNA 和蛋白在细胞中的表达。慢病毒感染后, PGRN 表达降低后, 胃黏膜上皮细胞中 IL-8 mRNA 的表达明显增加(图 4(A))。qRT-PCR 和 ELISA 结果显示, 慢病毒感染的胃黏膜上皮细胞与 *HP* (MOI = 100:1) 相互作用 12 小时后, 可以诱导 IL-8 mRNA 和蛋白的表达(图 4(B))。此外, 用 *HP* 感染慢病毒 PLKO.1-PGRN shRNA-GFP 的胃黏膜上皮细胞 GES-1 和胃癌细胞 SGC7901, 与对照组相比, PGRN 表达降低后, IL-8 mRNA 表达明显升高, 在蛋白水平上也有相同的结果。



A: mRNA 水平检测显示, PGRN 干扰后, 胃黏膜上皮细胞 GES-1 和胃癌细胞 SGC7901 中 PGRN 的表达下降, 表明 PGRN 干扰成功。B: 采用 qPCR 和 ELISA 检测 PGRN 干扰诱导 *HP* 感染胃黏膜上皮细胞中 IL-8 表达的变化。数据以三次重复实验的均数±标准误差(SEM)表示。con: 对照组; *H. pylori*: 幽门螺杆菌定植组。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

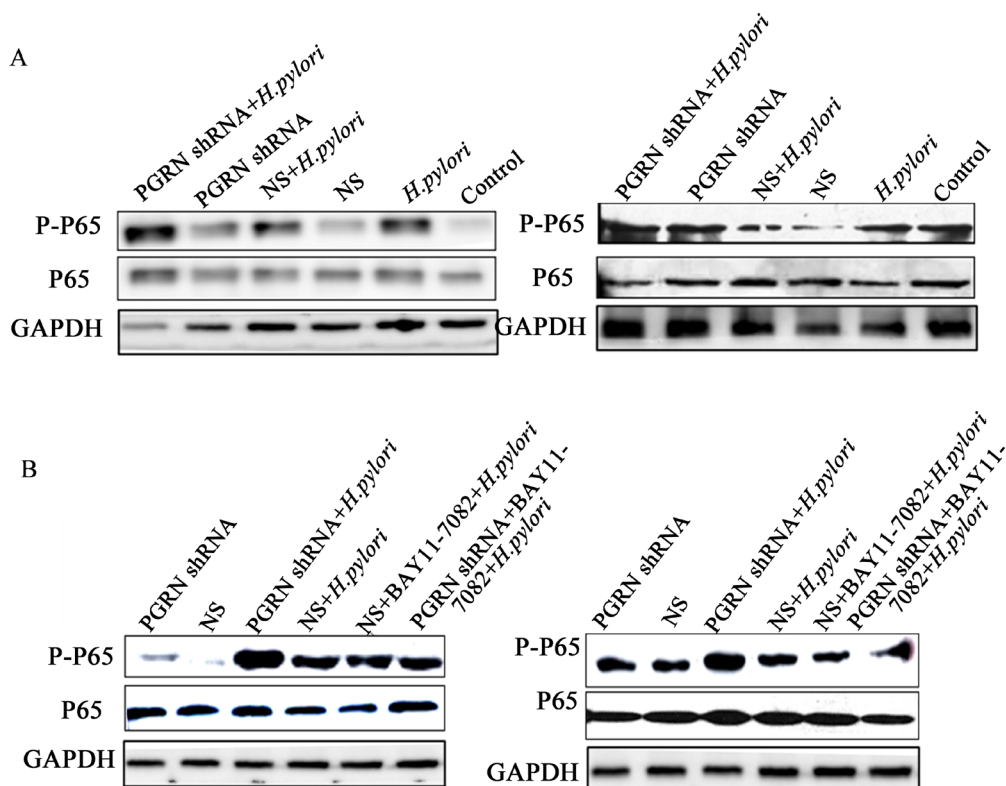
Figure 4. The effect of lentivirus infection on IL-8 changes in gastric mucosal epithelial cells induced by *HP* infection

图 4. 慢病毒感染干扰 PGRN 在 *HP* 感染诱导胃黏膜上皮细胞中 IL-8 变化中的作用

3.5. PGRN 通过 NF- κ B 通路对 *HP* 感染胃黏膜上皮细胞 P65 磷酸化的影响

为了进一步分析 *HP* 是否通过 PGRN 对 NF- κ B 信号通路产生影响, 用 PLKO.1-PGRN shRNA-GFP 转染细胞 72 小时后, 与 *HP26695* 共孵育 2 小时。如图 5(A)所示, 与 *HP* 感染相比, PGRN shRNA 感染可以激活 P65。与病毒对照组相比, PGRN shRNA 组的 P65 磷酸化水平升高, 与 *HP* 合并感染后 P65 磷酸化水平上调更加明显。然而, 同时感染 *HP* 的 PGRN shRNA 组的磷酸化水平明显高于对照组, 这些结果在两种胃黏膜上皮细胞中都是一致的。提示 PGRN 可能通过上调 P65 的磷酸化来影响 *HP* 感染后 IL-8 的表达。

为了进一步阐明 *HP* 介导的胃上皮细胞中 IL-8 的产生是否是通过 PGRN 通过 NF- κ B 信号通路调控, 我们采用了该通路的抑制剂 BAY11-7082 进行治疗。如图 5(B) 所示, 与未感染细胞相比, *HP* 感染可通过 NF- κ B 信号通路促进 P65 磷酸化。NF- κ B 信号通路抑制剂 BAY11-7082 能显著降低 *HP* 感染后 P65 磷酸化的增强的水平。在 PGRN 干扰慢病毒的作用下, *HP* 感染后 P65 的磷酸化水平明显高于对照组。然而, 在 BAY11-7082 的作用下, 慢病毒感染干扰 PGRN 与 *HP* 相互作用导致的 P65 磷酸化被明显抑制, 在两种胃黏膜上皮细胞系中均得到了相同的结果。因此, PGRN 慢病毒通过 NF- κ B 信号通路干扰胃黏膜上皮细胞 IL-8 的产生。



A: 慢病毒感染可干扰 PGRN, PGRN 可显著增强 *HP* 感染胃黏膜上皮细胞 P65 的磷酸化。B: WB 结果显示, NF- κ B 抑制剂 BAY11-7082 能显著降低 *HP* 感染和 PGRN 干扰引起的 P65 磷酸化。

Figure 5. The effect of PGRN on phosphorylation of GES-1 and SGC7901 P65 in *HP*-infected gastric mucosa epithelial cells
图 5. PGRN 对 *HP* 感染胃黏膜上皮细胞 GES-1 和 SGC7901 P65 磷酸化的影响

4. 讨论

胃炎的发生和发展是由多种因素引起的, 其中感染是最常见的原因。*HP* 引起的疾病的特征包括胃黏膜炎症、胃酸生成的变化和组织损伤。此外, 持续性 *HP* 感染可导致胃黏膜的慢性炎症。在易感人群中, 胃黏膜上皮的 *HP* 感染与胃炎、胃溃疡、胃腺癌和胃黏膜相关 B 细胞淋巴瘤(MALT)的发生密切相关[6]。*HP* 的致病潜能是由细胞毒素相关抗原 A (CagA) 和空泡细胞毒素(VacA)等毒性因子提供的。*HP* 成功地在严苛的胃内环境中定植需要特殊的机制[11] [14]。外膜蛋白(OMPs)被认为是 *HP* 适应宿主的关键蛋白。OMP 家族中一些被广泛研究的成员如 BabA、SabA、HopZ 在 *HP* 感染的致病过程中发挥粘附作用, 而外膜炎症蛋白 A (The outer membrane inflammatory protein A, OipA) 对炎症因子 IL-8 的诱导和胃黏膜上皮细胞的粘附是必不可少的[15]。

细胞内和细胞外 PAMPS 受体或免疫效应物在 *HP* 感染的发病机制中发挥不同的作用。NOD1 驱动的 IL-33 可能阻止 *HP* 介导的炎症反应, 对人体来说是有益的, 因为细菌在胃内的持续存在。TH-17^t 辅助细胞亚型通过分泌细胞因子和激活效应细胞来预防 *HP* 菌血症; Th1 和 Th-17 反应是在 *HP* 感染期间引起的。例如, 有相关研究显示, 瑞典 *HP* 感染患者体部和胃窦中 Th-17 细胞因子 IL-17A 和 Th1 淋巴因子 IFN- γ 编码基因表达水平升高[16]。更重要的是, *HP* 感染患者的 IL-17A⁺和 IFN- γ ⁺细胞数量也增加。此外, 伊朗和法国 *HP* 感染患者胃组织中 IL-17A mRNA 也显著增加[17]。在斯里兰卡一个研究中显示, *HP* 感染与 IL-17 血清浓度的增加相关。Sutton 等人发现, MUC1 通过抑制 TLR/NF- κ B 通路的激活, 调控 NLRP3 的表达, 作用于免疫细胞(可能是巨噬细胞), 从而防止 IL-1 β 的过度产生和胃发育不良的发生。IL-1B-511T/P 基因型或 IL-1RN 2 等位基因携带者感染 *HP* 后黏膜 IL-1 β 水平高于非携带者[18]。因此, 白细胞介素-1 基因多态性可能影响 *HP* 相关白细胞介素-1 β 在 *HP* 感染的胃中的水平, 而 *HP* 相关白细胞介素-1 β 又与胃炎和萎缩有关[19]。

HP 感染的临床结果取决于感染株、宿主免疫应答和环境之间复杂的相互作用, 其特征是产生大量炎症细胞因子, 包括 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8 和 IL-17 [17]。这些炎症细胞因子水平的升高在胃炎的发生发展中起着关键作用。其中最重要的是第一个特征化因子 IL-8, 也称为促炎趋化因子, 诱导中性粒细胞沿着血管壁积累[7]。该细胞因子的释放是由不同细胞类型的特定炎症信号触发的, 通过对中性粒细胞活性的影响, 在防御机制中发挥关键作用。然而, 在炎症刺激下, IL-8 在循环中持续、长期存在可能导致不同程度的组织损伤。由于 IL-8 具有刺激丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和细胞蛋白酪氨酸磷酸化的作用, 因此被认为不适合用于治疗目的[8] [9]。IL-8 的主要受体结合于所有趋化因子 NH₂ 端附近的结构域, 其拮抗剂可通过截断或取代这一区域获得[10] [20]。作为促进血管生成的趋化因子, CXCL8/IL8 与 CXCR2 受体相互作用, 而作为抗血管生成的趋化因子, 干扰素诱导蛋白相关的 IL-10 (CXCL10/IP10)与 CXCR3 受体相互作用[21]。*HP* 感染过程中产生的促炎细胞因子 IL-6、IL-8 和 TNF 依赖于 AQP3 的水平[22]。在 *HP* 感染的 AGS 细胞中, α -硫辛酸激活 NRF2/HO-1 通路, 抑制促炎细胞因子 IL-8 的产生, 减少活性氧(ROS)。因此, 食用富含 α -硫辛酸的食物可以通过降低活性氧诱导的胃黏膜上皮细胞中 IL-8 的表达水平来预防 *HP* 相关胃病的发生[23]。

HP 感染可显著增加胃黏膜 PGRN 的表达, 但 PGRN 在 *HP* 引起胃炎中的作用尚不清楚。PGRN 是一种表达于内皮细胞、免疫细胞、神经元和脂肪细胞的富含半胱氨酸的分泌糖蛋白, 具有抗炎和免疫调节活性, 可间接调节细胞周期进程和细胞运动。因此, 它是细胞生长、迁移和转化、伤口愈合、炎症和细胞毒性抵抗的重要调节因子。它最初被认为具有生长因子样特征, 与组织重塑、发育、炎症和蛋白稳态有关[24] [25]。PGRN 水平升高与许多炎症疾病密切相关, 如慢性阻塞性肺气肿(COPD) [26]、胰岛素抵抗[27]、哮喘[28]、关节炎[29]、II 型糖尿病[30]、骨坏死[31]和其他疾病。程序素具有抗炎特性, 是一种有用的预后生物标志物。在流感病毒感染过程中, PGRN 的体内外表达水平显著升高。通过 PGRN 敲除试验和 PGRN 缺陷小鼠模型, 证实流感病毒诱导的 PGRN 通过抑制 NF- κ B 和 IRF3 信号的激活负调控 I 型干扰素的产生[32]。此外, PGRN 通过其 Gm CDE 结构域直接与 NF- κ B 调控因子相互作用[33]。

考虑到 PGRN 在各种炎症中具有重要的抗炎和保护作用, 本研究旨在通过成功构建 PLKO.1-PGRN shRNA-GFP 慢病毒来阐明其在胃炎中的作用, 该慢病毒能有效抑制 PGRN 感染胃黏膜上皮细胞后的表达。并在感染细胞中持续表达, 以便日后研究 PGRN 影响的机制。我们的研究发现 PGRN 可以显著降低 *HP* 感染引起的胃炎中炎症因子 IL-8 的表达水平, 从而抑制胃炎的发生发展。因此, *HP* 感染促进胃黏膜上皮细胞 PGRN 的表达是一种保护性反应, PGRN 减少了相应的炎症反应。

5. 结论

综上所述, PGRN 可能通过 NF- κ B 信号通路调控 HP26695 株感染的胃黏膜上皮细胞中 IL-8 的分泌和表达, 调控胃炎的发生发展。在此过程中, PGRN 诱导某些下游基因通过 NF- κ B 调控 IL-8 的表达, 进而发挥抗炎和保护作用, 从而影响胃炎的病理生理变化。这一过程的确切机理值得进一步探讨。总体而言, PGRN 在胃病损伤修复和炎症过程中起着关键作用, 可作为临床诊断和治疗的新靶点, 为胃炎的后续研究提供新的方向。

基金项目

国家自然科学基金项目(No. 81201262); 国家自然科学基金项目(No. 32000495); 山东省医疗卫生技术发展计划项目(No. 2017WS246)。

参考文献

- [1] Miftahussurur, M., Doohan, D., Nusi, I.A., *et al.* (2018) Gastroesophageal Reflux Disease in an Area with Low *Helicobacter pylori* Infection Prevalence. *PLoS ONE*, **13**, e0205644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205644>
- [2] Boukthir, S., Aouididi, F., Mazigh Mrad, S., *et al.* (2007) Chronic Gastritis in Children. *La Tunisie medicale*, **85**, 756-760.
- [3] Bacha, D., Walha, M., Ben Slama, S., *et al.* (2018) Chronic Gastritis Classifications. *La Tunisie Medicale*, **96**, 405-410.
- [4] Mihaly, E., Micsik, T., Juhasz, M., *et al.* (2014) Gastritis and Gastropathy. *Orvosi Hetilap*, **155**, 43-61. <https://doi.org/10.1556/OH.2014.29807>
- [5] Tsimmerman, Y.S. and Zakharova, Y.A. (2017) Topical Problems of Chronic Gastritis. *Klinicheskaia Meditsina (Mosk)*, **95**, 8-14. <https://doi.org/10.18821/0023-2149-2017-95-1-8-14>
- [6] Camilo, V., Sugiyama, T. and Touati, E. (2017) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, **22**, e12405. <https://doi.org/10.1111/hel.12405>
- [7] Uotani, T., Murakami, K., Uchida, T., *et al.* (2019) Changes of Tight Junction and Interleukin-8 Expression Using a Human Gastric Monolayer Model of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, **24**, e12583. <https://doi.org/10.1111/hel.12583>
- [8] Bartchewsky, W., Martini, M.R., Masiero, M., *et al.* (2009) Effect of *Helicobacter pylori* Infection on IL-8, IL-1 β and COX-2 Expression in Patients with Chronic Gastritis and Gastric Cancer. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **44**, 153-161. <https://doi.org/10.1080/00365520802530853>
- [9] Ghasemi, H., Ghazanfari, T., Yaraee, R., *et al.* (2011) Roles of IL-8 in Ocular Inflammations: A Review. *Ocular Immunology and Inflammation*, **19**, 401-412. <https://doi.org/10.3109/09273948.2011.618902>
- [10] Xuan, J., Deguchi, R., Yanagi, H., *et al.* (2005) Relationship between Gastric Mucosal IL-8 Levels and Histological Gastritis in Patients with *Helicobacter pylori* Infection. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, **30**, 83-88.
- [11] Wang, H., Sun, Y., Liu, S., *et al.* (2011) Upregulation of Progranulin by *Helicobacter pylori* in Human Gastric Epithelial Cells via p38MAPK and MEK1/2 Signaling Pathway: Role in Epithelial Cell Proliferation and Migration. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **63**, 82-92. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00833.x>
- [12] Xie, W., Lu, Q., Wang, K., *et al.* (2018) miR-34b-5p Inhibition Attenuates Lung Inflammation and Apoptosis in an LPS-Induced Acute Lung Injury Mouse Model by Targeting Progranulin. *Journal of Cellular Physiology*, **233**, 6615-6631. <https://doi.org/10.1002/jcp.26274>
- [13] Yoo, W., Lee, J., Noh, K.H., *et al.* (2019) Progranulin Attenuates Liver Fibrosis by Downregulating the Inflammatory Response. *Cell Death & Disease*, **10**, 758. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1994-2>
- [14] Liu, C., Li, J., Shi, W., *et al.* (2020) Progranulin Regulates Inflammation and Tumor. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, **19**, 88-102. <https://doi.org/10.2174/1871523018666190724124214>
- [15] Lehours, P. and Ferrero, R.L. (2019) Review: Helicobacter: Inflammation, Immunology, and Vaccines. *Helicobacter*, **24**, e12644. <https://doi.org/10.1111/hel.12644>
- [16] Lizza, F., Parrello, T., Monteleone, G., *et al.* (2000) Up-Regulation of IL-17 Is Associated with Bioactive IL-8 Expression in *Helicobacter pylori*-Infected Human Gastric Mucosa. *The Journal of Immunology*, **165**, 5332-5337. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.9.5332>

- [17] Li, N., Wang, J., Yu, W., *et al.* (2019) MicroRNA-146a Inhibits the Inflammatory Responses Induced by Interleukin-17A during the Infection of *Helicobacter pylori*. *Molecular Medicine Reports*, **19**, 1388-1395. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9725>
- [18] Outlioua, A., Badre, W., Desterke, C., *et al.* (2020) Gastric IL-1 β , IL-8, and IL-17A Expression in Moroccan Patients Infected with *Helicobacter pylori* May Be a Predictive Signature of Severe Pathological Stages. *Cytokine*, **126**, Article ID: 154893. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154893>
- [19] Ramis, I.B., Vianna, J.S., Halicki, P.C., *et al.* (2015) Relationship of Interleukin-1B Gene Promoter Region Polymorphism with *Helicobacter pylori* Infection and Gastritis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, **9**, 1108-1116. <https://doi.org/10.3855/jidc.6123>
- [20] Siregar, G.A., Halim, S. and Sitepu, V.R. (2015) Serum TNF-a, IL-8, VEGF Levels in *Helicobacter pylori* Infection and Their Association with Degree of Gastritis. *Acta Medica Indonesiana*, **47**, 120-126.
- [21] Wei, F., Jiang, Z., Sun, H., *et al.* (2020) Correction: Induction of PGRN by Influenza Virus Inhibits the Antiviral Immune Responses through Downregulation of Type I Interferons Signaling. *PLOS Pathogens*, **16**, e1008321. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008321>
- [22] Wen, J., Wang, Y., Gao, C., *et al.* (2018) *Helicobacter pylori* Infection Promotes Aquaporin 3 Expression via the ROS-HIF-1 α -AQP3-ROS Loop in Stomach Mucosa: A Potential Novel Mechanism for Cancer Pathogenesis. *Oncogene*, **37**, 3549-3561. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0208-1>
- [23] Kyung, S., Lim, J.W. and Kim, H. (2019) α -Lipoic Acid Inhibits IL-8 Expression by Activating Nrf2 Signaling in *Helicobacter pylori*-Infected Gastric Epithelial Cells. *Nutrients*, **11**, 2524. <https://doi.org/10.3390/nu11102524>
- [24] Chen, Y.Q., Wang, C.J., Xie, K., *et al.* (2020) Progranulin Improves Acute Lung Injury through Regulating the Differentiation of Regulatory T Cells and Interleukin-10 Immunomodulation to Promote Macrophage Polarization. *Mediators of Inflammation*, **2020**, Article ID: 9704327. <https://doi.org/10.1155/2020/9704327>
- [25] Kojima, Y., Ono, K., Inoue, K., *et al.* (2009) Progranulin Expression in Advanced Human Atherosclerotic Plaque. *Atherosclerosis*, **206**, 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.02.017>
- [26] Ungurs, M.J., Sinden, N.J. and Stockley, R.A. (2014) Progranulin Is a Substrate for Neutrophil-Elastase and Proteinase-3 in the Airway and Its Concentration Correlates with Mediators of Airway Inflammation in COPD. *The American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology*, **306**, L80-L87. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00221.2013>
- [27] Li, H., Zhou, B., Xu, L., *et al.* (2014) Circulating PGRN Is Significantly Associated with Systemic Insulin Sensitivity and Autophagic Activity in Metabolic Syndrome. *Endocrinology*, **155**, 3493-3507. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1058>
- [28] Pogonowska, M., Poniatowski, L.A., Wawrzyniak, A., *et al.* (2019) The Role of Progranulin (PGRN) in the Modulation of Anti-Inflammatory Response in Asthma. *Central European Journal of Immunology*, **44**, 97-101. <https://doi.org/10.5114/ceji.2019.83267>
- [29] Shao, L. and Hou, C. (2019) miR-138 Activates NF- κ B Signaling and PGRN to Promote Rheumatoid Arthritis via Regulating HDAC4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **519**, 166-171. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.092>
- [30] Zhou, D., Zhou, M., Wang, Z., *et al.* (2019) PGRN Acts as a Novel Regulator of Mitochondrial Homeostasis by Facilitating Mitophagy and Mitochondrial Biogenesis to Prevent Podocyte Injury in Diabetic Nephropathy. *Cell Death & Disease*, **10**, 524. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1754-3>
- [31] Han, Y., Si, M., Zhao, Y., *et al.* (2017) Progranulin Protects against Osteonecrosis of the Femoral Head by Activating ERK1/2 Pathway. *Inflammation*, **40**, 946-955. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0539-z>
- [32] Wei, F., Jiang, Z., Sun, H., *et al.* (2019) Induction of PGRN by Influenza Virus Inhibits the Antiviral Immune Responses through Downregulation of Type I Interferons Signaling. *PLOS Pathogens*, **15**, e1008062. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008062>
- [33] Zhou, X., Kukar, T. and Rademakers, R. (2021) Lysosomal Dysfunction and Other Pathomechanisms in FTLD: Evidence from Progranulin Genetics and Biology. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1281**, 219-242. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51140-1_14