

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2009. 02. 0013

IL-1 基因多态性对胃粘膜 TNF- α 、NF- κ B 的表达和活性的影响

陈焕朝¹, 冯觉平², 魏少忠¹, 张克亮¹, 李广灿¹, 胡德胜¹, 胡艳萍¹, 胡 胜¹

Enhanced NF- κ B Activity and TNF- α Transcript in *h. pylori* (+) Individuals Are Associated with IL-1b Gene Polymorphisms

CHENG Huan-chao¹, FENG Jue-ping², WEI Shao-zhong¹, ZHANG Ke-liang¹, LI Guang-can¹, HU De-sheng¹, HU Yan-ping¹, HU Sheng¹

1. The Department of Oncology, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China; 2. The Fourth Hospital of Wuhan City

Corresponding Author: HU Sheng, E-mail: ehusmn@yahoo. com. cn

Abstract: Objective IL-1 β gene polymorphisms affect the expression of IL-1 β . The induction of IL-1 β by *H. pylori* strongly inhibited acid secretion, which has been supposed to contribute to a high incidence of gastric cancer. However, IL-1B-511 T allele has no influence in gastric acid output according to our recent study. We hypothesized that the expression of proinflammatory cytokine such as IL-1B and TNF- α and activation of NF- κ B may be involved in IL-1B-511 T allele associated gastric cancerogenesis. **Methods** One hundred and five healthy samples from the regions with low incidence of gastric cancer were genotyped for IL-1Beta 511 polymorphisms by PCR-RFLP. The expression of IL-1 β , NF- κ B and TNF- α were measured using RT-PCR, and NF- κ B activity were detected by EMSA. **Results** In gastric corpus of *H. pylori*(-) Individuals, the expression of NF- κ B and TNF- α were similar and remarkably lower than *H. pylori*(+) group. In addition, T/T genotype of IL-1B-511 among the *H. pylori* infected individuals, expressed higher level of NF- κ B and TNF- α (1. 20 $\pm$ 0. 17 vs. 0. 87 $\pm$ 0. 18 and 0. 94 $\pm$ 0. 16; 1. 10 $\pm$ 0. 16 vs. 0. 90 $\pm$ 0. 15 and 0. 97 $\pm$ 0. 17, F = 33. 4 and 12. 9, P = 0. 0001 and 0. 001, respectively) and induced the strongest NF- κ B activity (0. 99 $\pm$ 0. 12 vs. 0. 89 $\pm$ 0. 15 and 0. 90 $\pm$ 0. 14, F = 5. 6, P = 0. 005) than that of other two genotypes. Whereas, *H. pylori*(-) Individuals showed attenuated activity of NF- κ B. **Conclusion** Chronic *H. pylori* infection induced expression of IL-1 β , TNF- α and activate NF- κ B activity, which predisposed individuals with IL-1B-511T/T genotype. Our findings suggested TNF- α and NF- κ B signaling play crucial role in the relationship between IL-1B gene polymorphism and gastric cancerogenesis.

Key words: Gastric cancer; IL-1B; Polymorphism; TNF- α ; NF- κ B; Inflammatory

摘要:目的 探讨 IL-1 的基因多态性影响 *H. pylori* 感染后胃癌发生的机制。**方法** 通过多态性分析和血清 *H. pylori* 抗体测定,收集 105 例癌低发区的学生作为研究对象,其中 IL-1-511T/T 基因型 32 名(13 名 *H. pylori* +),C/C 基因型 36 名(15 名 *H. pylori* +),C/T 基因型 37 名(14 名 *H. pylori* +)。**结果** 在胃体组织,*H. pylori* 阴性个体 TNF- α 和 NF- κ B 表达量极少,而且 IL-1B-511 各基因型间也无显著差异。在 *H. pylori* 阳性个体,胃体部 TNF- α 和 NF- κ B mRNA 有较为明显的表达,IL-1B-511T/T 基因型个体比 C/T 和 C/C 基因型明显增加,分别为 1. 20 $\pm$ 0. 17 vs. 0. 87 $\pm$ 0. 18 和 0. 94 $\pm$ 0. 16; 1. 10 $\pm$ 0. 16 vs 0. 90 $\pm$ 0. 15 和 0. 97 $\pm$ 0. 17, F = 33. 4 和 12. 9, P = 0. 0001 和 0. 001。 *H. pylori* 阴性的 NF- κ B mRNA 活性很低。在 *H. pylori* 阳性个体, NF- κ B 活性显著增加。而且 IL-1B-511T/T 基因型个体比 C/T 和 C/C 基因型明显增加,分别为 0. 99 $\pm$ 0. 12 vs 0. 89 $\pm$ 0. 15 和 0. 90 $\pm$ 0. 14, F = 5. 6, P = 0. 005。**结论** *H. pylori* 感染促进 TNF- α 和 NF- κ B mRNA 表达,上调 NF- κ B 活性,在 IL-1B-511T/T 基因型个体更明显。提示 *H. pylori* 感染后,存在 IL-1B

基因多态性 $\rightarrow$ IL-1 β $\uparrow$ $\rightarrow$ 炎症细胞因子 $\uparrow$ $\rightarrow$ 胃癌发生的完整通路。

关键词: 胃癌; IL-1B; 多态性; TNF- α ; NF- κ B; 炎症

中图分类号: R735. 7 **文献标识码:** A
文章编号: 1000-8578(2009)02-0130-04

收稿日期: 2008-10-27; **修回日期:** 2008-12-12
作者单位: 1. 430079 武汉,湖北省肿瘤医院; 2. 武汉市第四医院
通信作者: 胡胜, E-mail: ehusmn@yahoo. com. cn
作者简介: 陈焕朝 (1951-), 男, 学士, 主任医师, 主要从事癌症的致病机制研究和综合治疗

0 引言

研究已经发现 IL-1B-511T/T 基因型与胃癌发病有关^[1-3],El-Omar 等推测这与 IL-1B 基因多态性影响胃粘膜感染 *H. pylori* 后的 IL-1 β 分泌量有关,而高水平 IL-1 β 可导致局部胃酸分泌下降,进而影响慢性胃炎的发展模式,增加胃粘膜萎缩和胃癌的危险性^[4]。然而此过程仅是推论,缺乏充足的依据。我们进一步胃液分析发现,无论 *H. pylori* 感染还是 IL-1B-511 基因多态性均不影响胃酸分泌,不支持低胃酸分泌导致胃癌发生的观点^[5]。因此,推测 IL-1 的基因多态性影响 *H. pylori* 感染后胃癌发生的机制可能是通过上调慢性炎症过程达到的。

H. pylori 感染诱导大量前炎症因子的表达,如 TNF- α 、IL-1、IL-6 和 IL-8 和 STAT3^[1]。而受 IL-1 激活的 NF- κ B 是启动炎症相关的癌症发生的关键分子,通过抑制凋亡,上调 TNF- α 等细胞炎症或趋化因子导致细胞转化^[6]。

所以本研究检测 IL-1B 基因多态性影响 *H. pylori* 感染后胃粘膜 TNF- α 、NF- κ B 的表达和活性,探讨 IL-1B 基因多态性增加胃癌发病危险性的可能机理。

1 资料与方法

1.1 研究对象

通过多态性分析和血清抗体测定,收集胃癌低发区(广东籍贯)的 105 例健康学生作为研究对象,无胃病史、无系统性红斑狼疮、糖尿病、类风湿性关节炎、炎症性肠病病史、无胃癌家族史。其中 IL-1-511T/T 基因型 32 名(13 名 *H. pylori* +),C/C 基因型 36 名(15 名 *H. pylori* +),C/T 基因型 37 名(14 名 *H. pylori* +)。具体资料见表 1。

表 1 所有研究对象的一般资料

Tab 1 Common materials of 105 subjects

	IL-1-511 基因型(IL-1-511genotype)		
	T/T(<i>n</i> = 32)	C/T(<i>n</i> = 36)	C/C(<i>n</i> = 37)
<i>H. pylori</i> +	13	15	14 ¹
Sex(F/M)	14/18	16/20	18/19 ²
Age(years)	22.6 $\pm$ 1.6	22.7 $\pm$ 1.5	22.0 $\pm$ 1.6 ³

1; χ^2 = 0.7;2; χ^2 = 0.3, P > 0.05;3; F = 0.2, P > 0.05

IL-1B-511 基因多态型分析(使用 *Ava*I 核酸内切酶,识别序列为 C $\blacktriangle$ (T/C)CG(A/G)G)和 *H. pylori* 抗体测定(ELISA 方法,试剂盒为 Bio-Check 公司产品,IgG > 20 U/ml 为阳性),具体见文献^[5]。在各基因型之间,*H. pylori* 感染率、性别构成和年龄均无明显差异,提示各基因型间的一般资料具有可比性。

1.2 组织标本的采集

所有入选对象均进行胃镜检查。胃镜检查取胃粘膜组织如下:胃窦 2 块(1 块供病理检测,1 块快速尿毒酶实验),胃体 2 块,供 mRNA 测定和核蛋白测定。

1.3 IL-1 β 、TNF- α 和 NF- κ B mRNA 表达的检测

1.3.1 RNA 的提取 取将称量后的新鲜胃粘膜组织标本放入 1 000 μ l 玻璃匀浆器中。加预冷的 Trizol 1 000 μ l 充分混匀,反复冰上碾磨,在 15 $^{\circ}$ C ~ 30 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 使核蛋白复合物完全解离。加入氯仿 200 μ l 反复混匀 30 秒,离心(12 000 $\times g$)15 min。取上清离心(12 000 $\times g$)10 min,加入 75%乙醇、室温干燥。加入 40 μ l TE 缓冲液(pH = 8.0)4 $^{\circ}$ C 过夜溶解 RNA(具体见文献 5)。

1.3.2 mRNA 的定量 首先对组织标本进行重量测定,依据组织重量加 RNA 溶解 TE 缓冲液。然后在 Lambda10 型分光光度计(PE 公司)测定溶液 A260/280,A260 为 1 时相当于 40 μ g/ml RNA,最后依据如下公式计算 mRNA 浓度(N 为稀释倍数)。

$$RNA_{total} = A_{260} \times 40 \times N$$

1.3.3 RT-PCR 扩增 IL-1 β 的扩增产物为 480 bp^[4]。扩增 TNF- α 的引物序列为,P₁:gagt gacaag cctgtagccc atgtt;P₂:aagccctggt atgagcccat ctatct,扩增产物为 336 bp。扩增 NF- κ B 的引物序列为:P₁:aagtgcgagg ggcgtccgc gggcag;P₂:gagcagcgtg gggactacga cctga;扩增产物为 403 bp。

RT-PCR 反应体系为 50 μ l,使用 Promega 公司 AccessquickTMRT-PCR 系统。具体 PCR 的循环次数由 IL-1 β 、TNF- α 和 NF- κ B 和 GAPDH(为内参,引物序列为 P₁:5'cacagtccatgccatcactg'3,P₂:5'tactccttgaggccat-gtg'3,扩增产物为 480 bp)的扩增量决定,每次采用循环次数梯度递减的方法,直到找出最少的必需循环次数。

IL-1B RT-PCR 产物 8 μ l 以 2.0%琼脂糖凝胶电泳,100 V 25 min,然后 0.5 μ g/mL 溴乙锭染色,紫外灯下观察结果,并在凝胶成像系统(Gel Doc 100 System, Bio-Rad 公司)扫描电泳结果,计算 IL-1mRNA 与 GAPDH mRNA 的光密度(OD)的比值。

1.4 NF- κ B 活性的凝胶电泳迁移实验检测

1.4.1 胃粘膜核蛋白提取 使用核蛋白抽提试剂盒(Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, USA),按产品说明书操作(稍有改变,http://www.piercenet.com);将称量后的胃粘膜组织的置于冰上碾碎,在匀浆中匀浆并 500 $\times g$ 离心,弃上清后干燥细胞团,加 0.2 ml 冰冷的胞浆蛋白裂解液 I,冰上

孵育 10 min。加 11 μ l 冰冷的胞浆蛋白裂解液 II，冰上孵育 1 min。再振荡 5 sec，离心 1 6 000g 离心 5 min。迅速移出上清，上清液即为胞浆蛋白液，于 - 80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1. 4. 2 NF- κ B 凝胶电泳迁移实验 按照说明书进行 NF- κ B 探针 (5'-AGTTGAGGGGACTTTAG-GC-3', Promega) 标记。配制 20 ml 4% 的聚丙烯酰胺凝胶。设置 EMSA 结合阴性对照反应体系, 阳性对照反应体系, 特异性冷竞争反应, 非特异性竞争反应, NF- κ B(p49 或 p50) 反应体系。按照顺序依次加入各种试剂, 混匀后立即上样。4% 非变性丙烯酰胺凝胶电泳, 用 0.5 $\times$ TBE 作为电泳液。按照 10 V/cm 的电压预电泳 10 min。电泳结束后, 干胶仪器上干燥 EMSA 胶。然后用 X 光片压片, 然后检测光密度值。

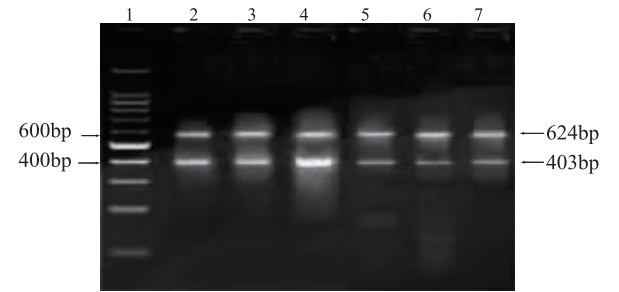
1. 5 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料的比较采用 χ^2 检验和精确概率法。均数的比较采用 t 检验或 ANOVA。风险因素 OR 值及 95% 的可信区间采用 Logistic 回归分析。多因素分析使用 Cox 回归模型。数据处理采用 SPSS13. 0 for Windows 统计软件 (SSPS Inc)。

2 结果

2. 1 IL-1-511 基因多态性与 TNF- α 和 NF- κ B mRNA 表达量的关系

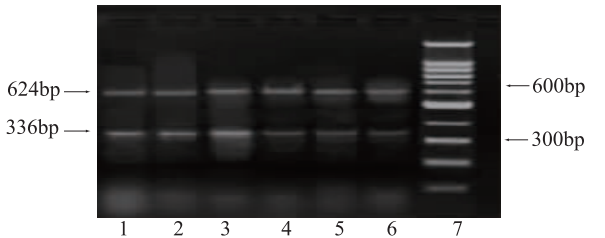
在 *H. pylori* 阴性的个体, TNF- α 和 NF- κ B mRNA 的表达量极少, 在 IL-1B-511 各基因型间 IL-1 β mRNA 的表达也无显著差异; 在 *H. pylori* 阳性个体, TNF- α 和 NF- κ B mRNA 有较为明显的表达, 而且 IL-1B-511T/T 基因型个体更明显; 如图 1、2 所示。



Lane 1: a standard DNA ladder; lane 2: C/C genotype with *H. pylori* infection; lane 3: C/T genotype with *H. pylori* infection; lane 4: T/T genotype with *H. pylori* infection; lane 5: C/C genotype without *H. pylori* infection; lane 6: C/T genotype without *H. pylori* infection; lane 7: T/T genotype without *H. pylori* infection

图 1 胃体部 NF- κ B mRNA 的表达

Fig 1 Expressions of NF- κ B mRNA in corpus



Lane 1: C/C genotype with *H. pylori* infection; lane 2: C/T genotype with *H. pylori* infection; lane 3: T/T genotype with *H. pylori* infection; lane 4: C/C genotype without *H. pylori* infection; lane 5: C/T genotype without *H. pylori* infection; lane 6: T/T genotype without *H. pylori* infection; lane 7: a standard DNA ladder

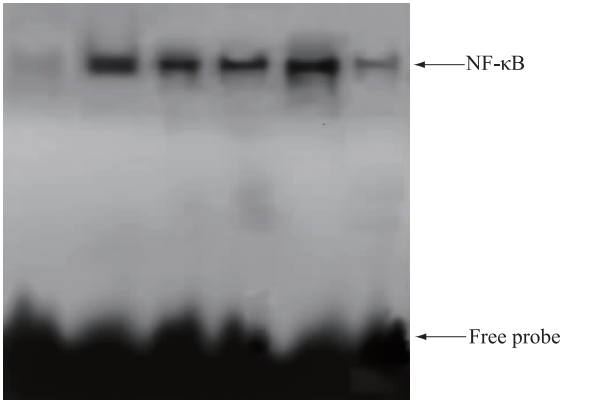
图 2 胃体部 TNF- α mRNA 的表达

Fig 2 Expression of TNF- α mRNA in corpus

对胃体组织检查发现, *H. pylori* 阴性者的胃体组织 TNF- α 和 NF- κ B mRNA 无明显表达, 在 IL-1B-511 各基因型之间也无明显差异。然而, 在 *H. pylori* 阳性个体, TNF- α 和 NF- κ B mRNA 表达显著增加。而且 *H. pylori* 阳性 IL-1B-511T/T 基因型个体 TNF- α 和 NF- κ B mRNA 表达比 C/T 和 C/C 基因型明显增加, 分别为 1.20 ± 0.17 vs 0.87 ± 0.18 和 0.94 ± 0.16 ; 1.10 ± 0.16 vs 0.90 ± 0.15 和 0.97 ± 0.17 , $F = 33.4$ 和 12.9 , $P = 0.0001$ 和 0.001 , 见图 1、2。

2. 2 NF- κ B 活性检测

进一步分析胃体组织 NF- κ B 的活性发现, *H. pylori* 阴性的 NF- κ B mRNA 活性很低, IL-1B-511 各基因型之间也无明显差异。然而, 在 *H. pylori* 阳性个体, NF- κ B 活性显著增加。而且 *H. pylori* 阳性, IL-1B-511T/T 基因型个体 NF- κ B 活性比 C/T 和 C/C 基因型明显增加, 分别为 0.99 ± 0.12 vs 0.89 ± 0.15 和 0.90 ± 0.14 , $F = 5.6$, $P = 0.005$, 见图 3。



Lane 1: negative control; lane 2: positive control; lane 3: C/C genotype with *H. pylori* infection; lane 4: C/T genotype with *H. pylori* infection; lane 5: T/T genotype with *H. pylori* infection; lane 6: T/T genotype without *H. pylori* infection; lane 7: a standard DNA ladder. Exposure time was 30 seconds with X-ray film

图 3 NF- κ B 活性 EMSA 结果

Fig 3 EMSA results for NF- κ B activity

3 讨论

癌症与炎症的联系首先由 Virchow1863 年假设提出^[7],近来逐渐得到了大量研究的支持。流行病学研究已经发现,慢性炎症患者对多种癌症易感,据估计,全世界范围内,感染和炎症反应与 15%~20% 的癌症死亡存在联系^[1]。有很多慢性炎症的启动因素,包括微生物感染(如 *H. pylori* 感染与胃癌和胃粘膜淋巴瘤)、自身免疫疾病(炎症性肠病与结肠癌)和不知原因的炎症状态(前列腺炎和前列腺癌)都会增加癌症危险性。

然而,感染 *H. pylori* 后的临床后果差异甚大,近年较普通接受的假说认为,宿主局部酸分泌状态是决定 *H. pylori* 感染后慢性胃炎类型的主要因素。当酸分泌处于较低水平,易发生全胃炎,有发展为胃粘膜萎缩和肠化的倾向,进而发生胃溃疡和胃癌的危险性较大^[8-9]。El-Omar 等^[1]认为,IL-1B 基因多态性与胃粘膜感染 *H. pylori* 时 IL-1B 的产生量有关,而后者具有很强的抑制胃酸分泌作用,但是,我们以前的研究未能发现 IL-1B 基因多态性→IL-1β↑→胃酸分泌↓的通路。

所以,IL-1B 基因多态性中,感染后的大量炎症信号的激活可能与胃癌发生有关。NF-κB 是刺激抗凋亡基因表达的主要转录因子,在静息的细胞中,NF-κB 被阻隔在细胞浆内,与 IκBs 等抑制性蛋白形成复合体,处于无活性状态,可以由活性氧化物、蛋白水解酶、透明质酸 IL-1 和 TNF-α 等诱导活化 NF-κB^[6]。

目前已经发现,*H. pylori* 感染后的胃粘膜微环境中,存在大量的前炎症因子的表达,如 TNF-α,IL-1β,IL-8 和 IL-6。虽然还不十分准确地知道前炎症因子如何在 *H. pylori* 感染后的胃癌发生中的机制,但我们知道 TNF-α 也是一个关键的因素。主要的依据有:TNF-α 本身是很强的肿瘤启动因子,在体外可以诱导细胞发生转化^[10]。在 TNF-α 缺陷小鼠,佛波酯和冈田酸难以诱导皮肤癌的发生。

已经有研究发现,在慢性炎症中 IL-1β 是诱导 NF-κB 上调的原因,而 NF-κB 激活是诱导 TNF-α 表达的关键因素;当然,TNF-α 也可促进 NF-κB 的激活。提示 IL-1β,TNF-α 和 NF-κB 之间并不是只有单向调节作用,还存在复杂的相互调节。本课题

进一步对胃黏膜 TNF-α 和 NF-κB mRNA 表达研究发现,在 *H. pylori* 阳性胃体粘膜,TNF-α 和 NF-κB mRNA,以及 NF-κB 的活化存在明显上调,而且 IL-1B-511T/T 基因型的表达比其他基因型要高($P<0.05$)。说明 *H. pylori* 感染后,存在 IL-1B 基因多态性→IL-1β↑→炎症细胞因子↑→胃癌发生的完整通路。

值得提出的是,我们研究结果将来对胃癌预防有提示作用,即 *H. pylori* 感染后使用抑酸药物不一定不安全,而抗炎药物可能会减少胃癌的危险性^[11]。

参考文献:

- [1] El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer [S]. *Nature*, 2000, 404: 398-402.
- [2] Hwang IR, Kodama T, Kikuchi S, et al. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1 beta production in *Helicobacter pylori* infection [J]. *Gastroenterology*, 2002, 123(6): 1793-1803.
- [3] Zeng ZR, Hu PJ, Hu S, et al. Association of interleukin 1B gene polymorphism and gastric cancers in high and low prevalence regions in China [J]. *Gut*, 2003, 52(12): 1684-1689.
- [4] El-Omar EM, Eien K, El Nujumi A, et al. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastric and hyposereton [J]. *Gastroenterology*, 1997, 113: 15-24.
- [5] Hu S, Song QB, Yao PF, et al. No relationship between IL-1B gene polymorphism and gastric acid secretion in younger healthy volunteers. *World J Gastroenterol*. 2005, 11 (41): 6549-6553.
- [6] Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 436-444.
- [7] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer [J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 860-867.
- [8] Takashima M, Furuta T, Hanai H, et al. Effects of *Helicobacter pylori* infection of gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils [J]. *Gut*, 2001, 48: 765-773.
- [9] Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(15): 1175-1186.
- [10] Kulbe H, Thompson R, Wilson JL, et al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(2): 585-592.
- [11] Kuipers EJ, Lundell L, Klinkenberg-Knol EC, et al. Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux esophagitis treated with omeprazole or fundoplication [J]. *N Engl J Med*, 1996, 344: 1018-1022.

[编辑:贺文;校对:安凤]