

DOI:10.13350/j.cjpb.250711

• 论著 •

幽门螺杆菌调节新肿瘤接头分子 ARRDC3 表达 对胃癌细胞增殖的影响^{*}

吕潇倩¹, 张念莉², 熊利欣¹, 吴怡¹, 张文凤¹, 赵英会¹, 郭蓬勃¹, 王玉¹, 吕刚^{1*}, 张念华^{3**}

(1. 山东第一医科大学临床与基础医学院, 山东济南 250001; 2. 潍坊市人民医院麻醉一科; 3. 山东第一医科大学教务部)

【摘要】 目的 了解幽门螺杆菌调节胃癌细胞 ARRDC3 的表达及其对胃癌细胞增殖的影响。 **方法** 通过生物信息学分析临床标本 ARRDC3 表达变化; 幽门螺杆菌感染胃癌细胞, 幽门螺杆菌 CagA 转染胃癌细胞, 实时荧光定量 PCR 检测胃癌细胞中 ARRDC3 mRNA 的表达变化, Western Blot 检测 ARRDC3 蛋白的表达变化; 转染高表达 ARRDC3 质粒后, 细胞克隆形成实验检测细胞增殖能力。 **结果** 临床标本生物信息学分析发现胃癌中 ARRDC3 表达升高, 且升高与低生存率相关 ($P < 0.05$), 幽门螺杆菌感染、幽门螺杆菌 CagA 转染后的胃癌细胞 ARRDC3 mRNA 的表达量显著高于对照细胞 ($P < 0.05$), ARRDC3 蛋白表达显著高于对照细胞 ($P < 0.05$), 过表达 ARRDC3 的胃癌细胞克隆数增多 ($P < 0.01$)。 **结论** 幽门螺杆菌的感染会诱导胃癌细胞 ARRDC3 mRNA 表达和蛋白表达升高, 幽门螺杆菌 CagA 会诱导胃癌细胞高表达 ARRDC3 mRNA 表达和蛋白表达升高, 过表达 ARRDC3 后细胞增殖能力增强, 可为幽门螺杆菌参与胃癌的发生发展的机制提供理论基础。

【关键词】 幽门螺杆菌; 细胞毒素相关蛋白 A; ARRDC3; 胃癌

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2025)07-0880-05

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Jul.; 20(07):880-884.]

The effect of *Helicobacter pylori* on the expression of a novel tumor adaptor molecule ARRDC3 and its effect on the proliferation of gastric cancer cells

LV Xiaoqian¹, ZHANG Nianli², XIONG Lixin¹, WU Yi¹, ZHANG Wenfeng¹, ZHAO Yinghui¹, GUO Pengbo¹, WANG Yu¹, LV Gang¹, ZHANG Nianhua³ (1. School of Clinical and Basic Medicine, Shandong First Medical University, Jinan 250001, China; 2. Department of Anesthesiology, Weifang People's Hospital; 3. Academic Affairs Department, Shandong First Medical University) ***

【Abstract】 Objective To investigate the regulation of ARRDC3 expression by *Helicobacter pylori* in gastric cancer cells and its effect on the proliferation of gastric cancer cells. **Methods** The expression changes of ARRDC3 in clinical specimens were analyzed using bioinformatics approaches. Gastric cancer cells were infected with *H. pylori* or transfected with a *H. pylori* CagA expression plasmid. The mRNA expression of ARRDC3 in gastric cancer cells were determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), and the protein expression were assessed by Western blot. Furthermore, following transfection with an ARRDC3 overexpression plasmid, cell proliferation ability was evaluated by a colony formation assay. **Results** Bioinformatics analysis of clinical specimens revealed that ARRDC3 expression was elevated in gastric cancer tissues, and its upregulation was associated with poor overall survival ($P < 0.05$). The mRNA expression of ARRDC3 was significantly higher in gastric cancer cells infected with *H. pylori* or transfected with *H. pylori* CagA compared to control cells ($P < 0.05$). Consistently, ARRDC3 protein expression was also markedly increased in these cells ($P < 0.05$). Furthermore, overexpression of ARRDC3 significantly enhanced the clonogenic ability of gastric cancer cells, as evidenced by an increased number of colonies ($P < 0.01$). **Conclusion** *H. pylori* induces ARRDC3 mRNA and protein expression elevation in gastric cancer cells. Similarly, transfection with *H. pylori* CagA promotes the upregulation of ARRDC3 at both the mRNA and protein. Overexpression of ARRDC3 enhances the proliferative capacity of gastric cancer cells. These findings provide a theoretical basis for understanding the role of *H. pylori*, particularly its CagA protein, in promoting the development and progression of gastric cancer.

【Keywords】 *Helicobacter pylori*; cytotoxin-associated protein A; ARRDC3; gastric cancer

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82402627), 山东省自然科学基金青年基金项目(No. ZR2022QH039), 泰安市科研课题(No. 2020NS136, 2021NS406)。

** **【通信作者】** 张念华, E-mail: nhzhang@sdfmu.edu.cn; 吕刚, E-mail: lvgang700@126.com

【作者简介】 吕潇倩(2000-), 女, 陕西人, 硕士在读, 主要从事致癌致畸病原体感染与检测方面的研究。E-mail: lxqcmc@163.com

胃癌是世界上常发的恶性肿瘤之一,每年新增发病例超过108万,每年约有77万人死亡^[1]。胃癌的发病因素包括细菌感染、饮酒、吸烟、饮食不当、遗传等诸多因素,其中幽门螺杆菌感染是引发胃癌的首要的生物学因素^[2],虽然研究者对幽门螺杆菌感染引发胃癌的致病机制进行了大量的研究,但是致病机制尚未完全清楚。

α -arrestins 是最近发现的一种哺乳动物抑制素家族,这个家族包含6个成员,分别是硫氧还蛋白相互作用蛋白(Thioredoxin-interacting protein, Txnip)和含抑制蛋白结构域蛋白(Arrestin domain contain, ARRDC),后者含有5个成员,尤其是ARRDC3 现已确定作为一种新兴的肿瘤接头分子,可以影响肿瘤细胞的信号传导,进而影响良恶性肿瘤的发生和发展^[3]。ARRDC3 在结构上和多功能的 β -arrestin 支架蛋白相似,具有类似抑制蛋白的氮末端和碳末端结构域,可参与多种病理性的过程^[4],其在胃癌发生和发展中的作用鲜有报道。

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是感染胃部最常见的病原体,细胞毒素相关蛋白A(CagA)是其主要毒力因子。CagA 通过IV型分泌系统注到细胞内部^[5-6],干扰细胞内信号途径,调节细胞内炎症因子表达,从而影响细胞的正常增殖,使细胞转化,引发胃癌。但是CagA 影响ARRDC3 表达引发胃癌机制研究鲜有报道,本研究拟探讨幽门螺杆菌调节ARRDC3 的表达及其在胃癌发生发展中的作用。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞、细菌和质粒 人胃癌细胞AGS、人胃癌细胞BGC-823、幽门螺杆菌26695菌株、CagA质粒本室保存。

1.2 试剂转染 试剂Lipofectamine™ 3000试剂购自赛默飞世尔科技有限公司。RNA提取试剂盒、cDNA逆转录试剂、MagicSYBR荧光定量试剂购自康为世纪生物科技有限公司。引物ARRDC3-F: 5'-ATGCAAGAGGACATGCGAAAG-3'; ARRDC3-R: 5'-GTGGAAGCCTTCTTCGGAATTAT-3' 购自青岛生物工程有限公司(Sangon Biotech)。ARRDC3一抗二抗购自江苏亲科生物研究中心有限公司。ARRDC3表达质粒购自Affnity江苏亲科生物研究中心有限公司。

2 方法

2.1 生物信息学分析 ARRDC3在临床标本的表达GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis, 基因表达谱交互式分析)是一种基于网络的

工具,可根据TCGA和GTEx数据提供快速分析。通过GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>)鉴定了不同肿瘤中肿瘤接头分子ARRDC3的表达。阈值是P值0.01和基因排名的2倍变化。数据与TCGA正常数据和GTEx数据匹配。通过GEPIA分析生存图,采用总体生存法、中位数组截止值和95%置信区间。

2.2 幽门螺杆菌 感染细胞 接种细胞至6孔板,37℃、5% CO₂的培养箱内培养过夜。第2d胰酶消化六孔板一个孔的细胞,离心去上清,PBS重悬细胞,计数。收集卵黄琼脂培养基上的幽门螺杆菌,重悬。使用紫外分光光度计测定 $\lambda=600$ 时菌液A值,以PBS作为空白对照调零,按照 $A_{600}=2.0 \times 10^8$ CFU/mL计算细菌数。将细菌以感染比例(MOI=1:100)加入六孔板中的细胞,加入无血清无双抗培养基,每孔补齐至2 mL,对照组中加入等量的无血清无抗生素的培养基补齐至2 mL。

2.3 CagA质粒转染细胞 将细胞铺到6孔板中,使细胞在转染时密度达到75%,在50 μ L的MEM中稀释3 μ L Lipofectamine3000试剂,孵育5 min;在50 μ L的MEM中稀释1 μ g DNA。1:1的比例混合脂质体与DNA,室温孵育20 min。向细胞中添加DNA-脂类化合物。更换培养基进行培养,并进行观察。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达 提取总RNA,反转录为cDNA。实时荧光定量PCR体系:2 $\times$ SYBR Green PCR minx, 12.5 μ L; Primer 1(10 μ mol/ μ L), 2 μ L; Primer 2(10 μ mol/ μ L), 2 μ L; DNA模板, 5 μ L; ddH₂O, 3.5 μ L; 总体积25 μ L。反应程序:95℃, 3 min; 95℃, 15 s; 60℃, 退火20 s; 72℃, 延伸50 s; 共40个循环。

2.5 Western blot 检测蛋白表达 蛋白定量2 μ g/ μ L取5 μ L上样,80V恒压电泳30 min,110 V继续跑胶60 min,300 mA转膜40 min,10%脱脂奶粉封闭2 h; 1:1000一抗孵育过夜。1:5000二抗室温下孵育1 h。1 $\times$ TBST清洗;超敏ECL发光试剂显影,显影仪拍照。

2.6 克隆形成实验检测增殖能力 细胞培养至75%融合,转染ARRDC3慢病毒表达质粒24 h。用含嘌呤霉素的培养液进行维持培养。转染好的细胞胰酶消化,1 mL PBS重悬,计数,用培养液将细胞稀释至浓度约100个/mL。吸取2 mL稀释过的单细胞悬液添加到6孔板中。在37℃、5% CO₂培养箱中,进行10 d的连续培养,每3 d更换养液。培养至底部肉眼可见细胞团块后,4%的多聚甲醛固定20 min,每孔添加2 mL的0.1%结晶紫染液,室温下染色20 min,拍照,用Image JV1.8.0.112进行统计。

3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 9.0 软件分析实验数据,用 Mean±SD 来表示实验结果。检验方式采用 *t* 检验分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 生物学信息学分析 ARRDC3 在临床标本的表达

通过 GEPIA 在线分析发现 ARRDC3 在多种肿瘤中表达升高,如结肠癌、部分肺癌、胰腺癌、部分肾癌、甲状腺癌等临床标本中表达高于正常组织($t=11.98, P<0.05$)(图 1),其中在胃癌亦升高($t=10.22, P<0.05$),且伴随其升高,胃癌生存率呈现降低趋势($t=17.99, P<0.05$),其升高与胃癌患者生存率呈现负相关(图 2)。

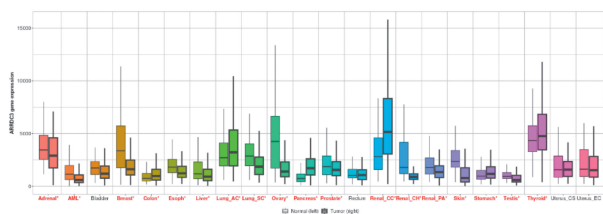


图 1 生物学信息学分析临床标本 ARRDC3 在胃癌标本中表达升高
Fig. 1 Bioinformatics analysis showing elevated expression of ARRDC3 in gastric cancer specimens

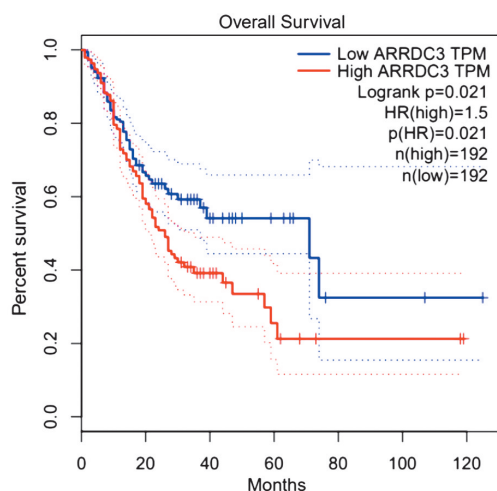
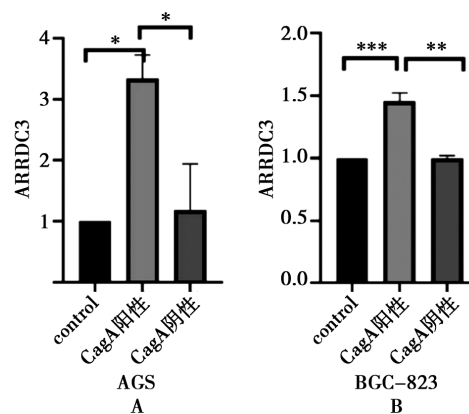


图 2 生物信息学分析临床标本中胃癌中 ARRDC3 表达升高与生存率相关
Fig. 2 Bioinformatics analysis of the correlation between upregulation of ARRDC3 expression and survival rate in gastric cancer clinical specimens

2 幽门螺杆菌感染细胞后 ARRDC3 mRNA 表达

细胞 AGS、BGC-823 分别感染幽门螺杆菌后,通过 qRT-PCR 检测 ARRDC3 mRNA 的表达,发现幽门螺杆菌 CagA + 菌株感染细胞 AGS 后 ARRDC3 mRNA 表达升高($t=11.32, P<0.05$)(图 3A),幽门螺杆菌 CagA + 菌株感染细胞 BGC-823 后 ARRDC3 mRNA 表达亦升高($t=13.64, P<0.001$)(图 3B)。

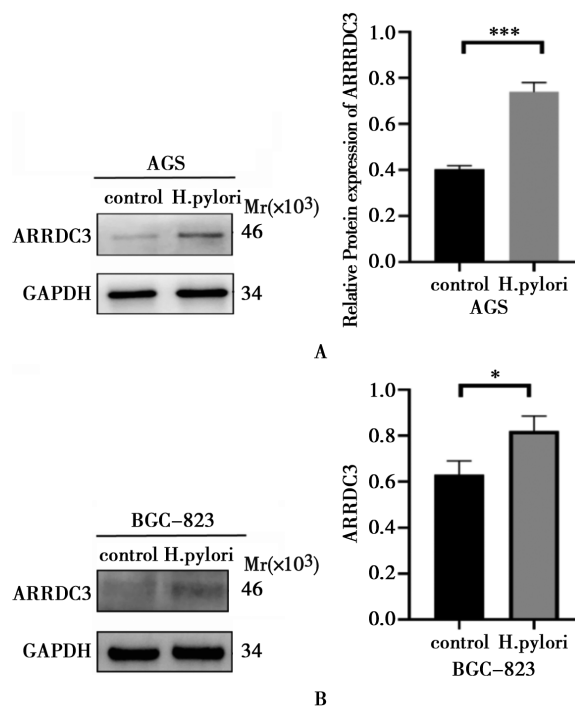


A 幽门螺杆菌 CagA + 菌株感染细胞 AGS 后 ARRDC3 mRNA 表达升高($P<0.05$) B 幽门螺杆菌 CagA + 菌株感染细胞 BGC-823 后 ARRDC3 mRNA 表达升高($P<0.001$)

图 3 幽门螺杆菌感染细胞 AGS、BGC-823 后 ARRDC3 mRNA 表达
Fig. 3 ARRDC3 mRNA expression in AGS and BGC-823 cells after infection with *H. pylori*

3 幽门螺杆菌 CagA + 菌株感染细胞后 ARRDC3 蛋白表达

幽门螺杆菌感染细胞 AGS 和 BGC-823 后,Western blot 检测 ARRDC3 蛋白表达,发现细胞 AGS 感染幽门螺杆菌 CagA + 菌株后,ARRDC3 蛋白表达升高($t=9.342, P<0.001$)(图 4A),细胞 BGC-823 感染幽门螺杆菌 CagA + 菌株后,ARRDC3 蛋白表达升高($t=11.98, P<0.05$)(图 4B)。

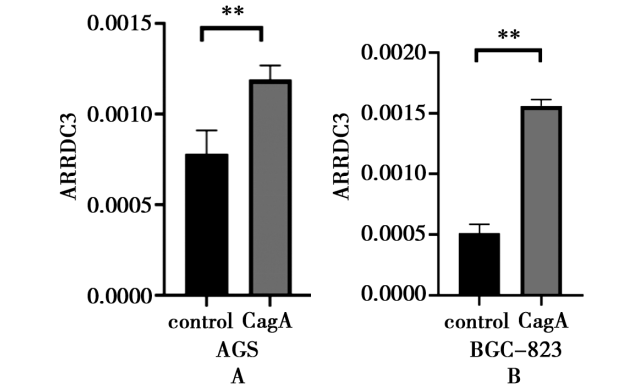


A 细胞 AGS 感染幽门螺杆菌 CagA + 菌株后 ARRDC3 蛋白表达升高($P<0.001$) B 细胞 BGC-823 细胞感染幽门螺杆菌 CagA + 菌株后 ARRDC3 蛋白表达升高($P<0.05$)

图 4 幽门螺杆菌感染细胞后 ARRDC3 蛋白表达
Fig. 4 ARRDC3 protein expression in gastric epithelial cells after *H. pylori* infection

4 CagA 质粒转染细胞 ARRDC3 mRNA 表达

CagA 质粒转染胃癌细胞 AGS、BGC-823, qRT-PCR 检测 ARRDC3 mRNA 表达,发现 AGS 细胞转染 CagA 质粒后,ARRDC3 mRNA 表达升高($t = 13.62, P < 0.01$)(图 5A),BGC-823 细胞转染 CagA 质粒后,ARRDC3 mRNA 表达升高($t = 8.22, P < 0.01$)(图 5B)。



A AGS 细胞转染后 ARRDC3 mRNA 表达升高($P < 0.01$) B BGC 细胞转染后 ARRDC3 mRNA 表达升高($P < 0.01$)

图 5 CagA 质粒转染 AGS、BGC 细胞后 ARRDC3 mRNA 表达
Fig. 5 ARRDC3 mRNA expression in AGS and BGC cells after transfection with CagA plasmid

5 胃癌细胞转染 CagA 质粒后 ARRDC3 蛋白表达

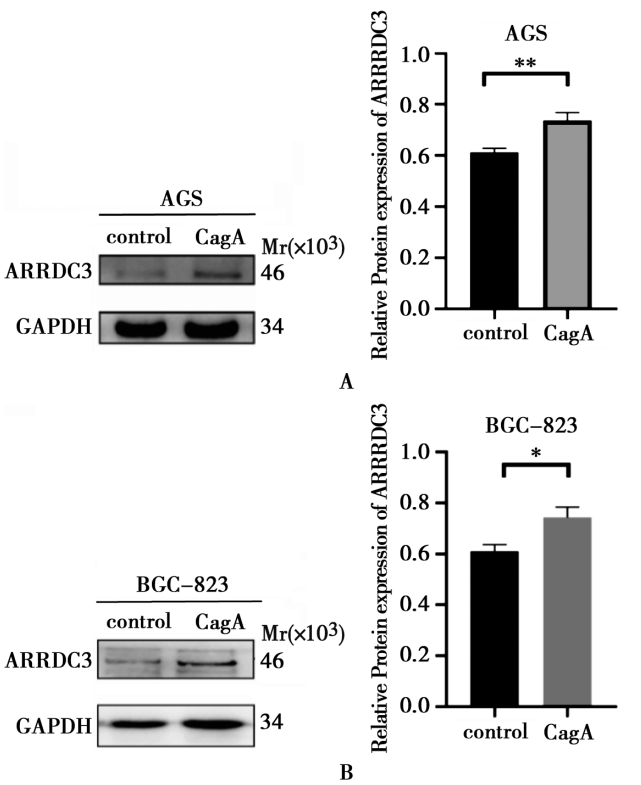
细胞 AGS 和 GBC-823 分别转染 CagA 质粒后,Western blot 检测 ARRDC3 蛋白表达,发现细胞 AGS 转染 CagA 质粒后 ARRDC3 蛋白表达升高($t = 6.002, P < 0.01$)(图 6A),细胞 GBC-823 转染 CagA 质粒后 ARRDC3 蛋白表达亦升高($t = 4.781, P < 0.01$)(图 6B)。

6 细胞转染 ARRDC3 表达质粒后细胞克隆形成能力

细胞 AGS 转染 ARRDC3 高表达质粒后,ARRDC3 高表达,胃癌细胞的克隆形成能力增强($t = 8.483, P < 0.01$)(图 7A);细胞 BGC-823 转染 ARRDC3 高表达质粒后,ARRDC3 高表达,胃癌细胞的克隆形成能力亦增强($t = 14.91, P < 0.001$)(图 7B)。

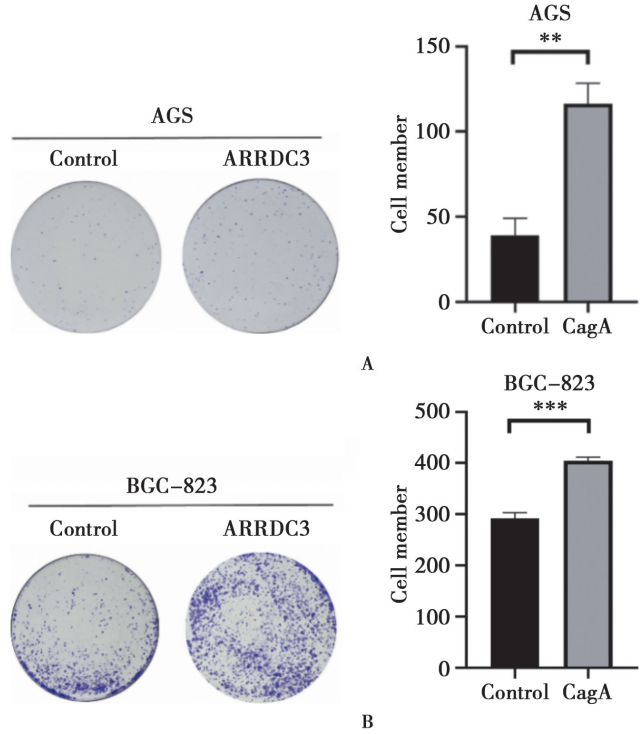
讨 论

胃癌是常见的消化系统恶性肿瘤,早期诊断难,复发率高,5 年存活率低。幽门螺杆菌是感染胃粘膜最常见的病原体,研究发现胃癌的发生和发展与幽门螺杆菌的感染密切相关,该菌感染会提升胃癌发生的风险^[7]。该菌具有有各种毒力因子,其中 CagA(细胞毒素相关蛋白 A)是其主要毒力因子,在细胞转化中起着重要的作用^[8]。研究表明,CagA 通过 IV 型分泌系统进入细胞后,会干扰细胞的信号通路,如 Wnt- β -catenin、PI3K-AKT 和 JAK-STAT3 等,进而影响特



A AGS 胃癌细胞转染后 ARRDC3 表达升高($P < 0.01$) B BGC-823 转染后 ARRDC3 表达升高($P < 0.01$)

图 6 胃癌细胞转染 CagA 质粒后 ARRDC3 蛋白表达变化
Fig. 6 Changes in ARRDC3 protein expression in gastric cancer cells after transfection with CagA plasmid



A 细胞 AGS 转染 ARRDC3 高表达质粒后,克隆形成能力增强($P < 0.01$) B 细胞 BGC-823 转染 ARRDC3 高表达质粒后,克隆形成能力增强($P < 0.001$)

图 7 细胞转染 ARRDC3 后胃癌细胞克隆形成能力变化
Fig. 7 Changes in clone formation ability of gastric cancer cells after transfection with ARRDC3

定蛋白或基因的表达水平,从而导致细胞的异常增殖,而诱发胃癌^[9]。

肿瘤接头分子是在肿瘤细胞表面或内部发挥重要作用的分子,能够与其他分子相互作用,从而影响肿瘤的生长、侵袭和转移。这些分子在肿瘤发生发展中具有关键作用,是药物研发的重要靶点。通过生物信息学分析发现新的肿瘤接头分子 ARRDC3 在不同肿瘤中表达不同,在结肠癌、部分肺癌、胰腺癌、部分肾癌、胃癌、甲状腺癌等临床标本中表达升高,但是在急性髓性白血病、膀胱癌、食管癌、肝癌、部分肺癌、卵巢癌、前列腺癌、部分肾癌、皮肤癌、睾丸癌、尤文氏肉瘤中表达降低,ARRDC3 在不同肿瘤中可能发挥不同的作用,流行病学研究发现 ARRDC3 可能参与肿瘤的发生发展,如前列腺癌^[10];但研究发现其在肾癌中是肿瘤抑制分子^[11]。本研究通过对临床标本的生物信息学分析,发现 ARRDC3 在胃癌临床标本升高,且其升高与胃癌患者生存率呈现负相关,推测其在胃癌中可能促进胃癌的发生发展,胃癌中导致 ARRDC3 升高的因素值得研究。

与胃癌发生相关的首要因素是幽门螺杆菌感染,该菌感染胃粘膜后引发胃炎胃溃疡,慢性胃炎经过浅表性胃炎、萎缩性胃炎、肠化生进展为胃癌。研究发现幽门螺杆菌感染患者和小鼠的胃黏膜 ARRDC3 增加,ARRDC3 在幽门螺杆菌相关性胃炎中起促炎作用,ARRDC3 表达升高与胃炎的严重程度相关^[12]。本研究用幽门螺杆菌感染胃癌细胞,检测 ARRDC3 表达,发现 CagA+菌株使 ARRDC3 mRNA 和蛋白表达升高;幽门螺杆菌 CagA 质粒转染胃癌细胞,经转染后的细胞 ARRDC3 mRNA 和蛋白表达升高。本研究通过转染 ARRDC3 高表达质粒,使其在胃癌细胞高表达,观察胃癌细胞的增殖能力,发现 ARRDC3 高表达后,胃癌细胞的克隆形成能力增强,与 Huang 等^[13]的研究一致。

综上,本研究发现胃癌中 ARRDC3 表达升高,幽门螺杆菌引发 ARRDC3 表达升高,幽门螺杆菌 CagA 诱发 ARRDC3 表达升高,ARRDC3 表达升高增强胃癌细胞的增殖能力,为进一步揭示幽门螺杆菌的致癌机制奠定理论基础,也为胃癌的治疗和诊断提供了新

的候选靶点。

【参考文献】

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] Wang F, Meng W, Wang B, et al. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer[J]. Cancer Lett, 2014, 345(2):196-202.
- [3] Wedegaertner H, Pan WA, Gonzalez CC, et al. The α -arrestin ARRDC3 is an emerging multifunctional adaptor protein in cancer[J]. Antioxid Redox Signal, 2022, 36(13-15):1066-1079.
- [4] Nabhan JF, Hui P, Lu Q. Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the beta2-adrenergic receptor[J]. EMBO Rep, 2010, 11(8):605-611.
- [5] Tegtmeyer N, Wessler S, Backert S. Role of the cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis[J]. FEBS J, 2011, 278(8):1190-1202.
- [6] Backert S, Meyer TF. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis[J]. Curr Opin Microbiol, 2006, 9(2):207-217.
- [7] Vogelmann R, Amieva MR. The role of bacterial pathogens in cancer[J]. Curr Opin Microbiol, 2007, 10(1):76-81.
- [8] Alfarouk KO, Bashir AHH, Aljarbou AN, et al. The possible role of *Helicobacter pylori* in gastric cancer and its management[J]. Front Oncol, 2019, 9:75.
- [9] Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, et al. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion[J]. Science, 2000, 287(5457):1497-1500.
- [10] 郑煜, 林卓远, 陈潮江, 等. ARRDC3 预测人类前列腺癌进展和预后的相关性研究[J]. 新医学, 2018, 49(8):7.
- [11] Xiao J, Shi Q, Li W, et al. ARRDC1 and ARRDC3 act as tumor suppressors in renal cell carcinoma by facilitating YAP1 degradation[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(1):132-143.
- [12] Liu YG, Teng YS, Shan ZG, et al. Arrestin domain containing 3 promotes *Helicobacter pylori*-associated gastritis by regulating protease-activated receptor 1[J]. JCI Insight, 2020, 5(15):e135849.
- [13] Huang ZX, Li Y, Zhao ZY, et al. Enhanced ZBTB10 expression induced by betulinic acid inhibits gastric cancer progression by inactivating the ARRDC3/ITGB4/PI3K/AKT pathway[J]. Cell Oncol, 2025:1-18.

【收稿日期】 2025-02-04 【修回日期】 2025-04-30