

Khảo sát tác động của chủng *Helicobacter pylori* DN18 phân lập tại Việt Nam lên sự hoạt hóa con đường NF- κ B và H2AX trên dòng tế bào AGS

Phạm Thị Hồng Đào*, Hồ Thị Mỹ Trang, Nguyễn Thụy Vy*



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

Bộ môn Di truyền, Khoa Sinh học – Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Liên hệ

Phạm Thị Hồng Đào, Bộ môn Di truyền, Khoa Sinh học – Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Email: pthdao@hcmus.edu.vn

Liên hệ

Nguyễn Thụy Vy, Bộ môn Di truyền, Khoa Sinh học – Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Email: ntv@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 19-3-2020
- Ngày chấp nhận: 18-5-2020
- Ngày đăng: 15-6-2020

DOI: 10.32508/stdjns.v4i2.898



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



TÓM TẮT

Nhiễm *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) là một trong những yếu tố chính gây tăng nguy cơ phát triển ung thư dạ dày (UTDD). Cơ chế phân tử hình thành UTDD gây ra bởi *H. pylori* vẫn chưa được hiểu một cách rõ ràng. Những nghiên cứu gần đây cho thấy sự nhiễm *H. pylori* thúc đẩy quá trình ung thư thông qua kích thích quá trình viêm và gây mất ổn định bộ gene tế bào biểu mô dạ dày. Bên cạnh đó, tác động của *H. pylori* lên tế bào chủ liên quan đến các độc tố của vi khuẩn và các độc tố này có sự đa dạng giữa các vùng địa lý và dân tộc. Vì vậy, nghiên cứu này hướng tới khảo sát tác động của chủng *H. pylori* DN18 phân lập từ bệnh nhân Việt Nam lên sự hoạt động của nhân tố phiên mã NF- κ B, một tác nhân điều hòa then chốt của quá trình viêm và sự biểu hiện của các gene đích của nó. Hơn nữa, tác động mất ổn định bộ gene cũng được nghiên cứu thông qua sự tích lũy các đứt gãy mạch đôi DNA (DSB), sử dụng chỉ thị là sự phosphoryl hóa protein histone H2AX (γ H2AX). Kết quả cho thấy chủng DN18 cảm ứng gây viêm trong tế bào biểu mô dạ dày AGS, thông qua gia tăng hoạt động NF- κ B và biểu hiện ở mức phiên mã các chất trung gian gây viêm như IL-8, COX-2. Nhiễm chủng DN18 cũng làm tăng sự phosphoryl hóa γ H2AX trong tế bào AGS. Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi bước đầu cho thấy khả năng gây viêm và gây tổn thương DNA tế bào chủ của vi khuẩn *H. pylori* phân lập từ bệnh nhân Việt Nam.

Từ khóa: *Helicobacter pylori*, ung thư dạ dày, viêm, đứt gãy mạch đôi DNA, bất ổn định bộ gen

MỞ ĐẦU

Ung thư dạ dày (UTDD) là một trong những bệnh lý gây tử vong hàng đầu ở người. Theo thống kê của Tổ Chức Y Tế Thế Giới (WHO), UTDD đứng thứ ba về tỷ lệ tử vong trong các bệnh ung thư và gây ra cái chết cho hơn 700.000 người mỗi năm¹. Trong các yếu tố nguy cơ dẫn đến UTDD, nhiễm vi khuẩn *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) được WHO xác định là yếu tố gây ung thư nhóm I. Vi khuẩn *H. pylori* thúc đẩy tế bào biểu mô hình thành khối u thông qua nhiều tác động khác nhau. Trong đó, tác động gây viêm và gây mất ổn định bộ gene của *H. pylori* là hai tác động then chốt và được nghiên cứu nhiều, điều hòa nhiều nhân tố quan trọng trong quá trình hình thành và phát triển khối u^{2,3}.

Tác động quan trọng nhất của *H. pylori* dẫn tới phản ứng viêm là sự hoạt hóa quá mức nhân tố phiên mã NF- κ B, dẫn đến tăng biểu hiện bất thường các chất trung gian gây viêm ở cả tế bào biểu mô và tế bào miễn dịch⁴. Ở tế bào biểu mô, IL-8 và COX-2 là hai protein quan trọng đóng vai trò điều biến quá trình viêm khi nhiễm *H. pylori* và cytokine IL-6 cũng đã được chứng minh liên quan đến tiến trình hình thành UTDD gây ra bởi *H. pylori*^{5,6}. Bên cạnh đó, đặc trưng của tế bào

UTDD khi nhiễm *H. pylori* là sự bất ổn định bộ gene. Đặc biệt, một số nghiên cứu gần đây cho thấy có sự gia tăng đáng kể các đứt gãy DNA mạch đôi (DSB), một trong những nguyên nhân chính dẫn đến bất ổn định NST trong các tế bào biểu mô dạ dày nhiễm *H. pylori*⁷⁻⁹.

Hơn nữa, các chủng *H. pylori* thuộc các vùng địa lý khác nhau có đặc điểm kiểu gene khác nhau và sự đa dạng di truyền này đã dẫn đến sự đa dạng trong độc lực hay khả năng tác động lên tế bào chủ của các chủng *H. pylori*¹⁰. Cho tới hiện nay, các chủng *H. pylori* Việt Nam chủ yếu được nghiên cứu về dịch tễ học và có rất ít công trình cho thấy tác động của các chủng này lên tế bào chủ. Vì vậy, nghiên cứu này hướng tới mục tiêu khảo sát tác động gây viêm thông qua hoạt hóa NF- κ B, dẫn đến cảm ứng biểu hiện các chất trung gian gây viêm IL-8, IL-6 và COX-2 ở mức độ phiên mã của một chủng *H. pylori* Việt Nam trên mô hình dòng tế bào biểu mô dạ dày người AGS. Đồng thời, nghiên cứu cũng khảo sát tác động gây đứt gãy mạch đôi DNA thông qua hoạt hóa H2AX trong tế bào này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Trích dẫn bài báo này: Đào P T H, Trang H T M, Vy N T. **Khảo sát tác động của chủng *Helicobacter pylori* DN18 phân lập tại Việt Nam lên sự hoạt hóa con đường NF- κ B và H2AX trên dòng tế bào AGS.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(2):547-555.

Vật liệu

- Dòng tế bào ung thư biểu mô dạ dày người AGS (ATCC CRL 1739)
- Chủng *H. pylori* phân lập từ mẫu sinh thiết dạ dày của bệnh nhân viêm dạ dày Việt Nam: DN18.

Phương pháp

Phân lập và xác định kiểu gene *cagA*, *vacA* của *H. pylori*

Mẫu sinh thiết dạ dày được nghiền trong 100 μ l môi trường Brain Heart Infusion (BHI)(BD), trải trên đĩa môi trường thạch chọn lọc Columbia (BD) bổ sung 10% máu cừu, 1% iso vitalex (BD) và hỗn hợp kháng sinh Skirrow's selective supplement (SR96) gồm các kháng sinh amphotericin, trimethoprim, polymyxin B và vancomycin (Sigma Aldrich). Sau 4 - 7 ngày ủ, các khuẩn lạc thu được sẽ được định danh thông qua quan sát hình thái và thử nghiệm sinh hóa urease. Đồng thời, sử dụng phương pháp Multiplex PCR trên khuẩn lạc *H. pylori* để xác định các kiểu gene *cagA*, *vacA*. Qui trình PCR và cặp mồi *cagA*, *vacA* *s1/s2* được công bố trong bài báo của Nguyễn Tuấn Anh và cộng sự năm 2010¹¹ kết hợp với cặp mồi *vacA* *m1/m2*¹². Chúng tôi chọn chủng dương là DNA bộ gene chủng *H. pylori* 26695 (ATCC 700392, *cagA+*, *s1m1*) và Tx30A (ATCC 51932, *cagA-*, *s2m2*), chứng âm là mẫu không chứa *H. pylori*. Kết quả được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel 5%. Các gene độc tố được xác định của *H. pylori* lần lượt có kích thước như sau: *cagA* – 349 bp, *vacA* *s1/s2* – 259 bp/286 bp, *vacA* *m1/m2* – 401 bp/476 bp.

Nuôi cấy *H. pylori*

H. pylori được nuôi trên đĩa thạch bổ sung 5% máu cừu và hỗn hợp kháng sinh SR96, ở 37°C trong điều kiện vi hiếu khí, sử dụng hệ thống hộp khí (BD Gas-Pak EZ standard incubation container - 260002) và túi khí (BD gaspak ez campy container system sachets - 260680) trong 4 ngày và được cấy chuyển qua một đĩa thạch máu khác nuôi trong 2 ngày. Cuối cùng, vi khuẩn được nuôi lỏng trong môi trường BHI, bổ sung 10% FBS (Sigma Aldrich) đã bất hoạt nhiệt 56°C trong 30 phút và hỗn hợp kháng sinh SR96, nuôi lắc 130 vòng/phút trong 16 giờ ở 37°C điều kiện vi hiếu khí. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 600nm ($OD_{600} = 2 \times 10^8$ CFU/ml).

Nuôi cấy AGS

Dòng tế bào AGS được nuôi cấy bám dính trong môi trường RPMI 1640 (Hyclone) bổ sung 10% FBS đã bất hoạt nhiệt, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin

và 100 μ g/ml treptomycin, 0,5 μ g/ml amphotericin trong điều kiện 5% CO₂ ở 37°C. Tất cả các hóa chất pha môi trường nuôi cấy tế bào đều được cung cấp bởi hãng Sigma Aldrich.

Phương pháp nhiễm *H. pylori* vào tế bào AGS

Tế bào AGS được cấy vào đĩa nuôi cấy 6 giếng với mật độ 2×10^5 tế bào/giếng trước khi nhiễm 24h. Dịch vi khuẩn sau khi nuôi lỏng được ly tâm 3200 g trong 10 phút, 4°C, loại bỏ môi trường BHI, rửa với PBS 1X và vi khuẩn được hòa trong môi trường RPMI 1640 có bổ sung 10% FBS, 2 mM glutamine, không có kháng sinh. Nhiễm vi khuẩn vào tế bào với MOI 100 ở tất cả các thử nghiệm.

Phương pháp biến nạp và thử nghiệm luciferase reporter

Tế bào AGS được cấy trên đĩa 96 giếng và cấy $0,5 \times 10^4$ tế bào/giếng. Sau 24 giờ, chúng tôi sử dụng phương pháp hóa biến nạp, sử dụng 0,2 μ l hóa chất TurboFect Transfection Reagent (Thermo) biến nạp hai plasmid pGL4.32 (50 ng) và pRL-SV40 (5 ng) cho mỗi giếng. Sau khi biến nạp 24h, chúng tôi tiến hành nhiễm vi khuẩn vào tế bào. Plasmid pGL4.32 mang gene mã hóa cho enzyme firefly luciferase (luc2P) và sự biểu hiện của gene này chịu sự điều khiển của nhân tố phiên mã NF- κ B thông qua yếu tố đáp ứng với NF- κ B nằm ở thượng nguồn gene. Plasmid pRL-SV40 mang gene mã hóa enzyme Renilla luciferase (Rluc), có promoter cho phép biểu hiện gene *Renilla* luciferase như nhau giữa các tế bào.

Chúng tôi sử dụng hệ thống Dual-Glo Luciferase Assay (Promega) để phân tích hoạt động luciferase. Kết quả hiển thị sẽ là cường độ ánh sáng phát ra trong các mẫu thí nghiệm được đo bằng máy Synergy HT Multi-Detection Reader. Trong mỗi mẫu sẽ có hai giá trị: giá trị tương ứng với luciferase firefly (LF) biểu thị cho hoạt động của NF- κ B và giá trị tương ứng với luciferase *Renilla* (LR) được xem như là chứng nội dùng để chuẩn hóa hiệu suất biến nạp và số lượng tế bào giữa các mẫu. Số lần thay đổi (n) mức độ hoạt hóa NF- κ B trong các mẫu nhiễm *H. pylori* được tính theo công thức:

$$n = \frac{LF}{LR} \quad (1)$$

$$\frac{LF}{LR} \quad (2)$$

Trong đó: (1): Mẫu nhiễm; (2): Mẫu không nhiễm.

Real-time RT PCR

Tế bào AGS được thu sau khi nhiễm 12 và 24 giờ, sau đó tách chiết thu RNA tổng số bằng kit RNeasy Mini

Kit (GE Healthcare). mRNA sau khi tách chiết được phiên mã ngược thành cDNA, sử dụng mỗi hexamer, kit Affinity Script RT (Agilent). Phản ứng real-time PCR sử dụng cặp mỗi đặc hiệu cho IL-8, IL-6, COX-2 và GAPDH, chất phát huỳnh quang là EvaGreen (Biotium). Kết quả thay đổi biểu hiện gene được thể hiện qua sự khác biệt giá trị Ct (threshold Cycle) – là chu kỳ phản ánh số bản sao DNA hiện diện trong mẫu ở thời điểm đó. GAPDH được sử dụng làm chứng nội, thông tin các cặp mỗi được thể hiện ở Bảng 1.

Giá trị Ct của mẫu nhiễm và mẫu không nhiễm được sử dụng để tính tỷ lệ thay đổi biểu hiện gene. Mức độ thay đổi biểu hiện gene được tính theo công thức:

$$\text{Mức độ thay đổi biểu hiện gene} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Trong đó: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{nhiễm}) - \Delta Ct(\text{không nhiễm})$

$\Delta Ct = Ct(\text{gene mục tiêu}) - Ct(\text{gene chứng nội})$

Kết quả là số lần thay đổi biểu hiện gene (tăng/giảm) của gene mục tiêu ở mẫu nhiễm so với mẫu không nhiễm đã được chuẩn hóa với biểu hiện của GAPDH.

Phương pháp Western Blot

Sau khi nhiễm 12, 24 và 48 giờ, tế bào được thu và ly giải thu nhận protein tổng rồi được biến tính và phân tách kích thước trên gel polyacrilamide. Sau đó, protein này được chuyển lên màng lai và cuối cùng được phát hiện bởi các kháng thể chuyên biệt, sử dụng các kháng thể sơ cấp anti- γ -H2AX (sc-517348) và anti- β -actin (sc-81178), kháng thể thứ cấp anti-mouse-HRP (P0260), sử dụng phần mềm ImageJ để phân tích hình ảnh. Nghiên cứu này sử dụng protein “giữ nhà” β -actin để làm chứng nội chuẩn hóa lượng protein tổng trong các mẫu.

Công thức định lượng tương đối sự biểu hiện của protein mục tiêu ở tế bào nhiễm *H. pylori* với tế bào chứng không nhiễm, thu ngay ở thời điểm 0 giờ:

Số lần thay đổi biểu hiện protein

$$\frac{\gamma - H2AX}{\beta - actin} \quad (1)$$

$$= \frac{\gamma - H2AX}{\beta - actin} \quad (2)$$

Với (1): Mẫu nhiễm; (2): Mẫu không nhiễm.

Xử lý và phân tích thống kê

Các thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần độc lập. Xử lý thống kê bằng phần mềm Prism5Graph, phương pháp thống kê Student's t-test 2 chiều, với (*) p-value < 0,05; (**) p-value < 0,01; (***) p-value < 0,001. Số liệu thí nghiệm được trình bày ở dạng: Trung bình \pm Độ lệch chuẩn (Mean \pm SD).



Hình 1: Kết quả thử nghiệm sinh hóa urease (A) và xác định kiểu gene *cagA*, *vacA* của chủng DN18 (B). Giếng 1: chứng âm, giếng 2: chủng Tx30a (*cagA*-*vacA* s2m2), giếng 3: chủng 26695 (*cagA*+ *vacA* s1m1), giếng 4: chủng DN18, giếng 5: thang DNA 100bp

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và xác định kiểu gene *cagA*, *vacA* của chủng DN18

Mẫu sinh thiết sau khi nghiên và cấy trải trên môi trường chọn lọc thu được các khuẩn lạc đơn. Sau đó, chúng tôi chọn một khuẩn lạc để nuôi tăng sinh và thử nghiệm sinh hóa urease. Kết quả cho thấy khuẩn lạc được chọn thể hiện đặc tính phân huỷ urea thành amoniac của *H. pylori*, dung dịch chuyển từ màu vàng sang hồng (Hình 1 A). Đồng thời, chúng tôi cũng tiến hành xác định kiểu gene *cagA*, *vacA* của chủng phân lập DN18 bằng phương pháp PCR điện di với các cặp mỗi chuyên biệt^{11,12}. Các gene *cagA* và *vacA* là những gene độc tố điển hình và được nghiên cứu nhiều ở *H. pylori*¹³. Việc định type hai gene gây độc này bên cạnh việc chứng minh các chủng phân lập thực sự là *H. pylori* còn giúp có cái nhìn sơ bộ về gene gây độc của các chủng *H. pylori*. Chúng tôi chọn chứng dương là chủng *H. pylori* 26695 (*cagA*+, *s1m1*) và Tx30A (*cagA*-, *s2m2*), chứng âm là mẫu không chứa *H. pylori*. Kết quả điện di cho thấy, mẫu DN18 cho 3 vạch tương ứng với các kích thước 349 bp (*cagA*), 259 bp (*vacA* s1) và 401 bp (*vacA* m1) (Hình 1 B). Như vậy, chủng DN18 phân lập từ bệnh nhân Việt Nam có kiểu gene *cagA*+ và *vacA* kiểu *s1m1* giống với kiểu gene của chủng chuẩn 26695.

Mức độ hoạt hóa NF- κ B trong tế bào AGS nhiễm chủng DN18

NF- κ B đã được chứng minh là một nhân tố phiên mã đóng vai trò then chốt điều hòa phiên mã nhiều gene quan trọng trong tế bào người⁴. Sự nhiễm *H. pylori* làm mất kiểm soát hoạt động của con đường NF- κ B có thể dẫn đến ung thư thông qua các quá trình điều hòa sự sống sót, tăng trưởng, di căn của các tế bào ung thư. Một số nhóm nghiên cứu trước sử dụng phương pháp electrophoretic mobility shift analyses (EMSA) để phân tích mức độ hoạt hóa NF- κ B bằng việc xác

Bảng 1: Thông tin các cặp mồi

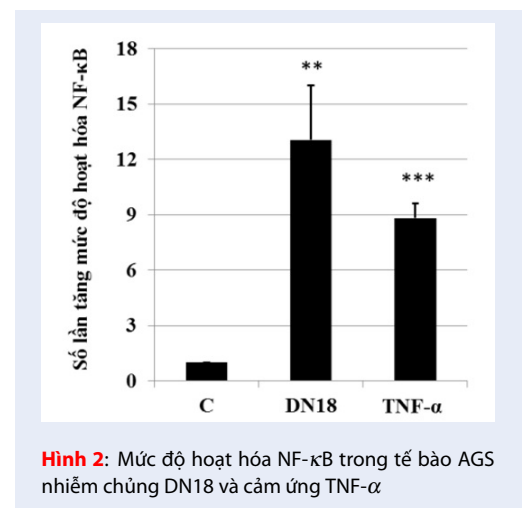
Gene	Trình tự mồi (5'-3')	Kích thước (bp)	
IL-8	Mồi xuôi	ATACTCCAAACCTTTCACCC	143
	Mồi ngược	TCTGCACCCAGTTTTCCTTG	
COX-2	Mồi xuôi	ACAGGCTTCCATTGACCAG	147
	Mồi ngược	TCACCATAGAGTGCTTCCAAC	
IL-6	Mồi xuôi	CCACTCACCTCTTCAGAACG	150
	Mồi ngược	CATCTTTGGAAGGTCAGGTTG	
GADPH	Mồi xuôi	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	226
	Mồi ngược	GAAGATGGTGATGGGATTTTC	

định mức độ NF- κ B trong dịch tách chiết nhân tế bào AGS. Nghiên cứu cho thấy *H. pylori* gây ra sự hoạt hóa NF- κ B nhanh chóng, bắt đầu hoạt hóa 30 phút sau khi nhiễm và gia tăng cao từ 2 đến 4 giờ^{14,15}. Bên cạnh đó, các nghiên cứu sử dụng phương pháp luciferase reporter lại thực hiện ở các thời điểm nhiễm trễ hơn bởi vì gene reporter cần một khoảng thời gian để biểu hiện^{15,16}. Vì vậy, chúng tôi thực hiện phân tích hoạt hóa NF- κ B ở tế bào AGS nhiễm chủng DN18 sau 6 giờ nhiễm. Bên cạnh đó, các nghiên cứu cho thấy mức độ hoạt hóa NF- κ B trong tế bào ung thư biểu mô dạ dày AGS gia tăng khi cảm ứng với tác nhân gây viêm TNF- α ^{15,16}. Do đó, chúng tôi cảm ứng TNF- α (50 ng/ml) để kiểm tra khả năng hoạt hóa NF- κ B trong tế bào AGS cũng như mức độ ổn định của quy trình thử nghiệm luciferase reporter.

Kết quả cho thấy, tế bào cảm ứng TNF- α làm tăng mức độ hoạt hóa NF- κ B $8,82 \pm 0,79$ lần so với tế bào không cảm ứng, chứng tỏ khả năng hoạt hóa NF- κ B trong tế bào AGS và thử nghiệm luciferase reporter ổn định qua các lần. Đối với chủng DN18, mức độ hoạt hóa NF- κ B trong tế bào AGS sau khi nhiễm tăng rõ rệt, tăng $13,06 \pm 2,96$ lần so với tế bào không nhiễm (Hình 2). Như vậy, kết quả trên cho thấy chủng *H. pylori* DN18 có tác động làm tăng mức độ hoạt hóa NF- κ B, phù hợp với các nghiên cứu trước về tác động của *H. pylori* lên sự hoạt hóa NF- κ B¹⁴⁻¹⁶.

Tác động làm thay đổi biểu hiện ở mức phiên mã các gene IL-8, IL-6 và COX-2 trong tế bào AGS của chủng DN18

Sự tăng mức độ hoạt hóa nhân tố phiên mã NF- κ B trong trong tế bào biểu mô khi nhiễm *H. pylori* dẫn đến phản ứng viêm thông qua cảm ứng tăng biểu hiện chemokine tiền viêm IL-8 là một trong những cơ chế quyết định cho quá trình viêm đặc trưng ở tế bào biểu mô khi đáp ứng với sự nhiễm *H. pylori* và trong tiến



trình dẫn tới UTDD. Bên cạnh IL-8, sự hoạt hóa NF- κ B trong tế bào biểu mô còn thúc đẩy biểu hiện COX-2 và IL-6, có vai trò quan trọng trong nhiều giai đoạn khác nhau trong hình thành và phát triển UTDD. Do đó, chúng tôi thu tế bào sau khi nhiễm 12 và 24 giờ và thực hiện định lượng mRNA IL-8, IL-6 và COX-2 bằng phương pháp real-time RT-PCR.

Các nghiên cứu cho thấy mức độ biểu hiện cao IL-8 trong biểu mô dạ dày tương quan chặt chẽ với nguy cơ UTDD và mức độ IL-8 cao trong huyết thanh đóng vai trò là chỉ thị cho UTDD^{17,18}. Các nghiên cứu cho thấy *H. pylori* cảm ứng biểu hiện IL-8 trong tế bào biểu mô dạ dày, tương quan mạnh mẽ với chức năng của protein CagA và liên quan tới nhiều độc tố khác của vi khuẩn như peptidoglycan, DupA, lipopolysaccharide,...^{15,19}. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy chủng DN18 sau 12 giờ nhiễm làm gia tăng mức độ biểu hiện mRNA IL-8 trong tế bào AGS lên cao đến $29,4 \pm 2,7$ lần so với tế bào không nhiễm và tiếp tục

tăng lên $136,1 \pm 25,7$ lần sau 24 giờ nhiễm (Hình 3 A).

Bên cạnh IL-8, IL-6 là yếu tố trung gian gây viêm đã được báo cáo có vai trò trong sự viêm liên quan đến sự phát triển ung thư. Sự tiết IL-6 khi nhiễm *H. pylori* gây ra bởi sự hoạt hóa NF- κ B, dẫn đến sự tăng trưởng và phân chia tế bào, ức chế apoptosis, giải phóng các nhân tố tăng trưởng khác. Tuy nhiên, cho tới hiện tại, tác động của *H. pylori* lên biểu hiện IL-6 ở tế bào biểu mô vẫn chưa được hiểu rõ ràng. Trong một số nghiên cứu, một số dòng tế bào biểu mô dạ dày đều tăng tiết protein IL-6 sau khi nhiễm các chủng *H. pylori* lâm sàng và chủng TN2GF4²⁰, sự biểu hiện IL-6 ở cả mức độ phiên mã và dịch mã trong tế bào AGS đều tăng khi nhiễm chủng ATCC 43504²¹. Tuy nhiên, trong một nghiên cứu khác, chủng *H. pylori* 60190 không cảm ứng tiết IL-6 trong tế bào AGS²². Kết quả của chúng tôi cho thấy sau 12 giờ nhiễm, chủng DN18 có xu hướng không làm thay đổi biểu hiện mRNA IL-6 trong tế bào AGS ($1,32 \pm 0,66$ lần) và có xu hướng tăng mức độ biểu hiện khoảng $2,34 \pm 1,00$ lần sau 24 giờ nhiễm nhưng chưa có ý nghĩa thống kê (Hình 3 B).

Đối với COX-2, các nghiên cứu cho thấy mô ung thư dạ dày có biểu hiện mRNA và protein COX-2 cao hơn rõ rệt so với các mẫu niêm mạc dạ dày không ung thư và biểu hiện vượt mức ở 50 – 80% các bệnh nhân UTDD¹⁹. COX-2 biểu hiện vượt mức trong các trường hợp viêm dạ dày dương tính với *H. pylori* so với viêm dạ dày âm tính với *H. pylori*^{19,23}. Một nghiên cứu khác cho thấy sau khi nhiễm *H. pylori* vào mô hình chuột có sự gia tăng biểu hiện COX-2 rõ rệt²⁴. Sau khi nuôi tế bào biểu mô dạ dày với *H. pylori* có sự gia tăng biểu hiện mRNA COX-2 cho thấy vai trò của COX-2 trong UTDD liên quan tới sự nhiễm *H. pylori*²⁵. Kết quả cho thấy chủng DN18 sau 12 giờ nhiễm tế bào AGS không làm gia tăng mức độ biểu hiện mRNA COX-2 ($1,09 \pm 0,23$ lần), nhưng tăng đến $9,26 \pm 3,13$ lần sau 24 giờ nhiễm (Hình 3 C)

Tác động gây đứt gãy mạch đôi DNA (DSB) trong tế bào AGS của chủng DN18

Các nghiên cứu gần đây chứng minh rằng sự phosphoryl hóa protein histon H2AX tạo thành γ -H2AX là một chỉ thị (marker) đặc trưng cho DSB và không tạo thành trong các tổn thương DNA khác^{9,26}. Xie và cộng sự (2014) đã nghiên cứu sự biểu hiện γ -H2AX trong các mẫu mô dạ dày người đã nhận thấy mức độ γ -H2AX gia tăng dần từ giai đoạn viêm dạ dày mạn tính, chuyển sản ruột, loạn sản và nhận thấy mức độ γ -H2AX cao hơn khi có sự hiện diện của *H. pylori*²⁷. Toller và cộng sự (2011) kiểm tra sự hoạt hóa của con

đường sửa sai DNA trong các tế bào AGS nhiễm *H. pylori* và kết luận rằng, sự nhiễm *H. pylori* cảm ứng sự hình thành của DSB thông qua sự tương tác trực tiếp giữa tác nhân gây bệnh với tế bào chủ, được đánh giá thông qua sự phosphoryl hóa của H2AX và ức chế các con đường sửa sai DSB⁹. Mặc dù cho tới nay các nghiên cứu về tác động của *H. pylori* còn nhiều hạn chế nhưng các bằng chứng trên cho thấy sự nhiễm *H. pylori* thúc đẩy hình thành DSB qua nhiều con đường khác nhau, góp phần vào sự mất ổn định bộ gene của tế bào và dẫn tới ung thư.

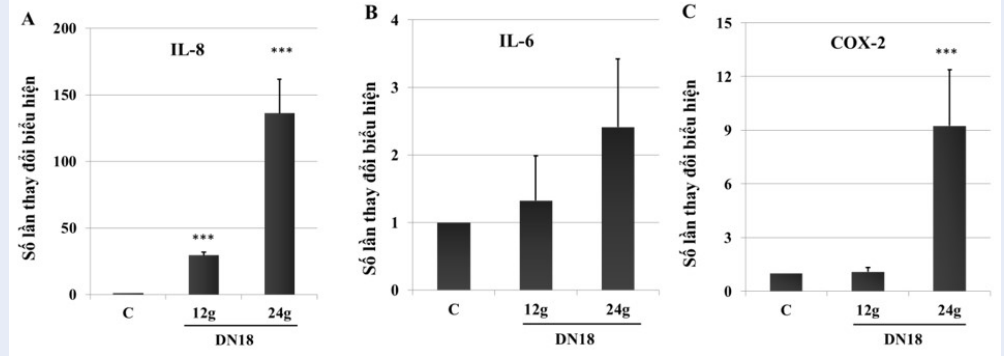
Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát sự biểu hiện γ -H2AX để đánh giá mức độ DSB của tế bào AGS nhiễm bởi các chủng *H. pylori* sau 12 giờ, 24 giờ và 48 giờ bằng thử nghiệm Western Blot. Bên cạnh đó, camptothecin đã được chứng minh cảm ứng DSB trong tế bào^{28,29} nên camptothecin ($0,01 \mu\text{g/ml}$) được sử dụng để kiểm tra khả năng tạo DSB trong tế bào AGS. Kết quả cho thấy sau khi cảm ứng camptothecin sau 48 giờ, mức độ hoạt hóa γ -H2AX tăng lên $3,08 \pm 0,53$ lần trong tế bào AGS so với tế bào không cảm ứng, chứng tỏ camptothecin có thể tạo DSB trong tế bào AGS và quy trình nghiên cứu có thể xác định được mức độ hình thành γ -H2AX và quy trình ổn định giữ các lần. Đối với tế bào nhiễm chủng DN18, sau 12 giờ nhiễm, mức độ hình thành γ -H2AX trong tế bào AGS bằng $0,98 \pm 0,48$ lần so với tế bào không nhiễm, bắt đầu có xu hướng tăng lên $1,27 \pm 0,27$ lần tại 24 giờ và lên cao nhất đạt $2,44 \pm 0,96$ lần tại 48h (Hình 4). Như vậy, kết quả của nghiên cứu cho thấy chủng Việt Nam DN18 có khả năng gây DSB thông qua sự tăng phosphoryl hóa H2AX.

KẾT LUẬN

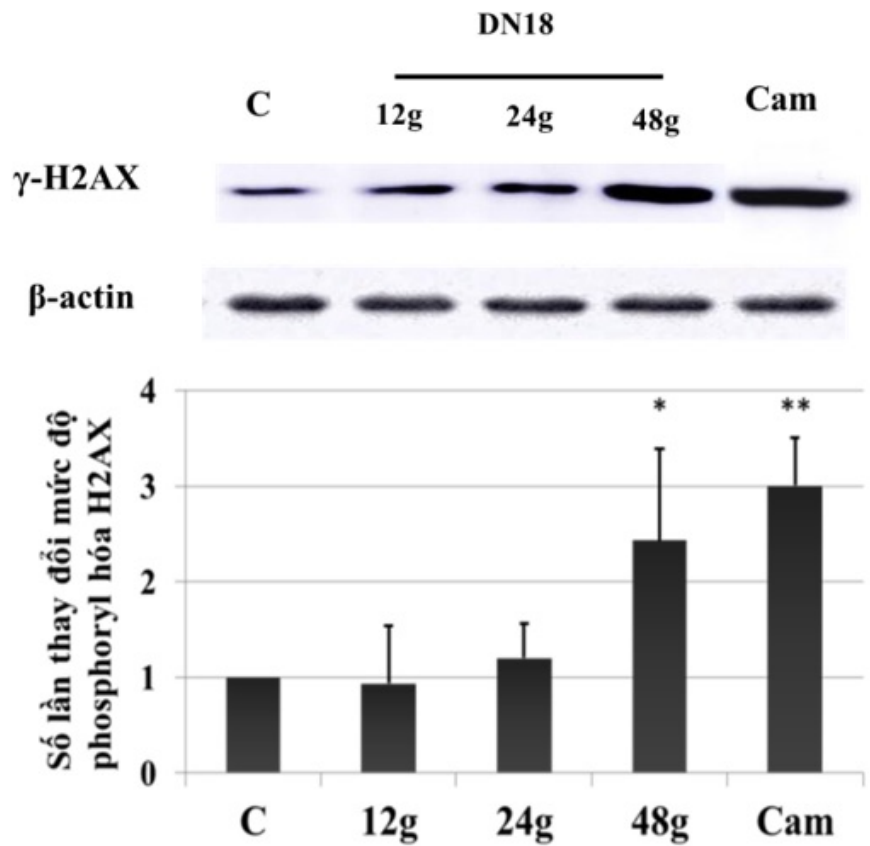
Như vậy, nghiên cứu này đã phân lập chủng *H. pylori* Việt Nam DN18 mang kiểu gene *cagA+*, *vacA sim1* và khảo sát một số tác động quan trọng lên tế bào AGS. Kết quả cho thấy chủng DN18 có khả năng gây viêm thông qua hoạt hóa NF- κ B và làm tăng rõ rệt biểu hiện ở mức phiên mã các chất trung gian gây viêm chịu điều hòa bởi NF- κ B gồm IL-8 và COX-2, có xu hướng tăng biểu hiện IL-6. Đồng thời chủng DN18 có khả năng gây mất ổn định bộ gene thông qua đứt gãy DNA mạch đôi. Tuy nhiên, nghiên cứu này mới chỉ được thực hiện trên một chủng Việt Nam và trên mô hình tế bào nuôi cấy *in vitro* nên cần có những nghiên cứu trên nhiều chủng hơn, ở mức độ sâu hơn và mô hình *in vivo* để phân tích tác động của các chủng *H. pylori* Việt Nam lên khả năng gây ung thư.

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

CagA : Cytotoxin-associated gene A
cagPAI : Cag pathogenicity island



Hình 3: Mức độ biểu hiện mRNA của IL-8 (A), IL-6(B) và COX-2 (C) trong tế bào AGS nhiễm chủng DN18. Tế bào không nhiễm (C) và nhiễm chủng DN18 trong 12 giờ và 24 giờ.



Hình 4: Kết quả Western blot biểu thị mức độ hình thành γ -H2AX trong tế bào AGS khi nhiễm chủng *H. pylori* DN18. Tế bào không nhiễm (C) và nhiễm chủng *H. pylori* DN18 trong 12 giờ, 24g và 48g; cảm ứng camptothecin trong 48h.

COX-2 : Cyclooxygenase-2
Ct : Threshold cycle
DSB : Double-strand break
FBS : Fetal bovine serum
GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
LF : Luciferase firefly
LR : Luciferase Renilla
IL-8 : Interleukine 8
NF- κ B : Nuclear factor kappa B
PCR : Polymerase Chain Reaction
UTDD : ung thư dạ dày
VacA : Vacuolating cytotoxin A

TUYÊN BỐ XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Nhóm tác giả cam kết không mâu thuẫn quyền lợi và nghĩa vụ của các thành viên.

TUYÊN BỐ ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Tác giả Phạm Thị Hồng Đào và Hồ Thị Mỹ Trang: thu mẫu, thực hiện thí nghiệm, thu thập và xử lý số liệu.
Tác giả Phạm Thị Hồng Đào và Nguyễn Thụy Vy: phân tích, giải thích kết quả và viết bản thảo.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.01-2018.17 và Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM trong khuôn khổ đề tài mã số T2018-21.

ĐẠO ĐỨC TRONG CÔNG BỐ

Nghiên cứu đã được Hội đồng Đạo đức nghiên cứu Y sinh học thông qua, số 702/ĐHQG-KHCN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of gastric cancer : global trends , risk factors and prevention. 2019;14;PMID: 30944675. Available from: <https://doi.org/10.5114/pg.2018.80001>.
2. Wang W, Mani AM, Wu ZH. DNA damage-induced nuclear factor-kappa B activation and its roles in cancer progression. J Cancer Metastasis Treat. 2017;3(3):45. PMID: 28626800. Available from: <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2017.03>.
3. Kalisperati P, Spanou E, Pateras IS, Korkolopoulou P, Varvarigou A, Karavokyros I, et al. Inflammation, DNA damage, Helicobacter pylori and gastric tumorigenesis. Vol. 8. Frontiers in Genetics;2017. Available from: <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00020>.
4. Lamb A, Chen LF. The many roads traveled by Helicobacter pylori to NF κ B activation. Gut Microbes. 2010;1(2):109–113. PMID: 21326919. Available from: <https://doi.org/10.4161/gmic.1.2.11587>.
5. Brandt S, Kwok T, Hartig R, König W, Backert S. NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the Helicobacter pylori CagA protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(26):9300–9305. PMID: 15972330. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.0409873102>.
6. Sepulveda AR. Helicobacter, Inflammation, and Gastric Cancer. Curr Pathobiol Rep. 2013;1(1):9–18. PMID: 23687623. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40139-013-0009-8>.
7. Koeppel M, Garcia-Alcalde F, Glowinski F, Schlaermann P, Meyer TF. Helicobacter pylori Infection Causes Characteristic DNA Damage Patterns in Human Cells. Cell Rep. 2015;11(11):1703–1713. PMID: 26074077. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.030>.
8. Hanada K, Uchida T, Tsukamoto Y, Watada M, Yamaguchi N, Yamamoto, et al. Helicobacter pylori infection introduces DNA double-strand breaks in host cells. Infect Immun. 2014;82(10):4182–4189. PMID: 25069978. Available from: <https://doi.org/10.1128/IAI.02368-14>.
9. Toller IM, Neelsen KJ, Steger M, Hartung ML, Hottiger MO, Stucki M. Carcinogenic bacterial pathogen Helicobacter pylori triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. PNAS. 2011;108(36):14944–14949. PMID: 21896770. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1100959108>.
10. Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. Molecular epidemiology , population genetics , and pathogenic role of Helicobacter pylori. Infect Genet Evol [Internet]. 2012;12(2):203–213. PMID: 22197766. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.002>.
11. Nguyen TA, Tran TT, Ho HTD. Xây dựng quy trình định typ gen cagA và vacA của helicobacter pylori bằng phương pháp multiplex PCR. Tạp chí Khoa học Tiêu hóa Việt Nam. 2010;p. 1443–1448.
12. Sicinschi LA, Correa P, Peek RM, Camargo MC, Delgado A, Piazuelo MB, et al. Helicobacter pylori genotyping and sequencing using paraffin-embedded biopsies from residents of Colombian areas with contrasting gastric cancer risks. Helicobacter. 2008;13(2):135–145. PMID: 18321303. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2008.00554.x>.
13. Argent RH, Thomas RJ, Letley DP, Rittig MG, Hardie KR, Atherton JC. Functional association between the Helicobacter pylori virulence factors VacA and CagA. J Med Microbiol. 2008;57(2):145–150. PMID: 18201978. Available from: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47465-0>.
14. Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. Helicobacter pylori Infection Activates NF- κ B in Gastric Epithelial Cells. Gastroenterology. 1997;113(4):1099–109. PMID: 9322504. Available from: <https://doi.org/10.1053/gast.1997.v113.pm9322504>.
15. Philpott DJ, Belaid D, Troubadour P, Thiherge JM, Tankovic J, Labigne A, et al. Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted Helicobacter pylori isolates. Cell Microbiol. 2002;4(5):285–296. PMID: 12064285. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00189.x>.
16. Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T, Morisawa T, et al. Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. Nat Med. 2007;13(4):470–476. PMID: 17401375. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm1566>.
17. Lee KE, Khoi PN, Xia Y, Park JS, Joo YE, Kim KK, et al. Helicobacter pylori and interleukin-8 in gastric cancer. Gastroenterol WJG. 2013;19(45):8192–8202. PMID: 24363509. Available from: <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i45.8192>.
18. Macri A, Versaci A, Loddo S, Scuderi G, Travagliante M, Trimarchi G, et al. Serum levels of interleukin 1beta, interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha as markers of gastric cancer. Biomarkers. 2006;11(2):184–193. PMID: 16766394. Available from: <https://doi.org/10.1080/13547500600565677>.
19. Fu S, Ramanujam KS, Wong A, Fantry GT, Drachenberg CB, James SP, et al. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in Helicobacter pylori gastritis. Gastroenterology. 1999;116(6):1319–1329. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(99\)70496-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(99)70496-8).

20. Lu H, Wu JY, Kudo T, Ohno T, Graham DY, Yamaoka Y, et al. Regulation of Interleukin-6 Promoter Activation in Gastric Epithelial Cells Infected with *Helicobacter pylori*. 2005;16:4954–4966. PMID: 16030249. Available from: <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-05-0426>.
21. Piao J, Lee HG, Kim S, Kim D, Han H, Ngo H, et al. *Helicobacter pylori* Activates IL-6-STAT3 Signaling in Human Gastric Cancer Cells : Potential Roles for Reactive Oxygen Species. 2016;3:1–12. PMID: 26910614. Available from: <https://doi.org/10.1111/hel.12298>.
22. Crawford HC, Krishna US, Israel DA, Matrisian LM, Washington MK, Peek RM. *Helicobacter pylori* strain-selective induction of matrix metalloproteinase-7 in vitro and within gastric mucosa. Vol. 125. Gastroenterology. 2003;p. 1125–1136. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)01206-X](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)01206-X).
23. Cheng J, Fan X. Role of cyclooxygenase-2 in gastric cancer development and progression. World J Gastroenterol WJG. 2013;19(42):7361–7368. PMID: 24259966. Available from: <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i42.7361>.
24. Wang Z, Chen J, Liu J. COX-2 Inhibitors and Gastric Cancer. Gastroenterol Res Pract. 2014;PMID: 25371669. Available from: <https://doi.org/10.1155/2014/132320>.
25. Romano M, Ricci V, Memoli A, Tuccillo C, Popolo AD, Sommi P, et al. *Helicobacter pylori* Up-regulates Expression and Prostaglandin E 2 Synthesis in MKN 28 Gastric Mucosal Cells in Vitro. J Biol Chem. 1998;273(44). PMID: 9786845. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.44.28560>.
26. Georgoulis A, Vorgias CE, Chrousos GP, Rogakou EP. Genome instability and γ H2AX. Vol. 18. International Journal of Molecular Sciences. 2017;PMID: 28914798. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms18091979>.
27. Xie C, Xu LY, Yang Z, Cao XM, Li W, Lu NH. Expression of H2AX in various gastric pathologies and its association with *Helicobacter pylori* infection. Oncol Lett. 2014;7(1):159–163. PMID: 24348841. Available from: <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1693>.
28. Jacob S, Miquel C, Sarasin A, Praz F. Effects of camptothecin on double-strand break repair by non-homologous end-joining in DNA mismatch repair-deficient human colorectal cancer cell lines. Nucleic Acids Res. 2005;33(1):106–113. PMID: 15642697. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gki154>.
29. Kawashima Y, Yamaguchi N, Teshima R, Narahara H, Yamaoka Y, Anai H, et al. Detection of DNA double-strand breaks by pulsed-field gel electrophoresis. Genes to Cells. 2017;22(1):84–93. PMID: 27976495. Available from: <https://doi.org/10.1111/gtc.12457>.

Effect of Vietnamese *Helicobacter pylori* strain DN18 on the NF- κ B pathway and H2AX activation of the AGS cell line

Pham Thi Hong Dao*, Ho Thi My Trang, Nguyen Thuy Vy*



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

Department of Genetics, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, VNU-HCM, Vietnam

Correspondence

Pham Thi Hong Dao, Department of Genetics, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, VNU-HCM, Vietnam

Email: pthdao@hcmus.edu.vn

Correspondence

Nguyen Thuy Vy, Department of Genetics, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, VNU-HCM, Vietnam

Email: ntvy@hcmus.edu.vn

History

- Received: 19-3-2020
- Accepted: 18-5-2020
- Published: 15-6-2020

DOI :10.32508/stdjns.v4i2.898



Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



ABSTRACT

Infection with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is the strongest known risk factor for gastric cancer. The molecular mechanisms of *H. pylori*-associated gastric carcinogenesis remain not elucidated. Recent findings indicate that *H. pylori* infection may promote gastric carcinogenesis by inducing inflammation and genetic instability in gastric epithelial cells. In addition, it is shown that the impact of *H. pylori* on infected cells is associated with bacterial virulence that is diverse among geographical regions as well as populations. Therefore, we aimed to investigate the effect of *H. pylori* strain DN18 from Vietnamese subject on the in vitro activity of NF- κ B transcription factor, a key regulator of inflammation, and expression of its target genes in this study. Moreover, host genomic instabilities were studied through examining the formation of DNA double-strand break (DSB) by using phosphorylated histone H2AX (γ H2AX) as a DSB marker. Our results showed that *H. pylori* strain DN18 induced activation of NF- κ B pathway and increased transcriptional expression of inflammatory mediators in human gastric mucosal cell AGS. We also provided evidence that the *H. pylori* infection triggered accumulation of DSBs marker γ H2AX. In summary, our study showed the potential ability to cause inflammation and DNA damage to infected cells of *H. pylori* strains isolated from Vietnamese patients.

Key words: *Helicobacter pylori*, gastric cancer, inflammation, DNA double-strand break (DSB), genomic instabilities.

Cite this article : Dao P T H, Trang H T M, Vy N T. Effect of Vietnamese *Helicobacter pylori* strain DN18 on the NF- κ B pathway and H2AX activation of the AGS cell line . *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(2):547-555.