

國立台灣大學醫學院免疫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of immunology,

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

胃幽門螺旋桿菌 CagA 調控 Bcl-2、Bcl-xL 以及 Bcl-6

之研究

The role of *Helicobacter pylori* CagA in regulation of Bcl-2,

Bcl-xL and Bcl-6

研究生：黃立普

Graduate Student: Li-Pu Huang

指導老師：許秉寧 博士

Advisor: Ping-Ning Hsu, Ph.D.

中華民國 九十九 年 六 月

June, 2010

目錄

誌謝	iv
中文摘要	v
Abstract.....	vii
研究背景	1
1. 胃幽門螺旋桿菌與致病性之簡介	1
2. CagA.....	2
3. SHP-2	3
4. Bcl-2、Bcl-xL and Bcl-6.....	4
材料與方法	7
1. 實驗材料	7
2. 實驗方法	12
實驗結果	16
1. 胃幽門螺旋桿菌可直接將 CagA 送入人類 B 細胞株中	16
2. 胃幽門螺旋桿菌可藉由 CagA 引起 B 細胞表現較高量的 Bcl-2 及 Bcl-xL	17
3. 胃幽門螺旋桿菌可藉由 CagA 抑制 B 細胞 Bcl-6 的表現	18
4. SHP-2 在胃幽門螺旋桿菌 CagA 調控 Bcl-2, Bcl-xL 以及 Bcl-6 的角色	19
5. CagA 轉染於 B 細胞可引起較高的 Bcl-2 及 Bcl-xL.....	19
6. 胃幽門螺旋桿菌 CagA 可以減少 B 細胞進行細胞凋亡.....	20
結果討論	21
1. 胃幽門螺旋桿菌可以直接將 CagA 送入 B 細胞.....	21
2. 胃幽門螺旋桿菌透過 CagA 影響 B 細胞抗細胞凋亡分子.....	21
3. SHP-2 在胃幽門螺旋桿菌透過 CagA 影響 Bcl-2、Bcl-xL 以及 Bcl-6 表現 扮演之角色.....	22
4. 胃幽門螺旋桿菌 CagA 影響 B 細胞存活率.....	23
5. 結論	23
參考文獻	25

圖表說明	35
圖一、胃幽門螺旋桿菌可以將 CagA 送入 B 細胞。	35
圖二、胃幽門螺旋桿菌 CagA 可引起 B 細胞表現較高量的 Bcl-2 及 Bcl-xL。	36
圖三、胃幽門螺旋桿菌 CagA 引起 B 細胞的 Bcl-2 及 Bcl-xL mRNA 表現增加。	37
圖四、胃幽門螺旋桿菌 CagA 可抑制 B 細胞 Bcl-6 的表現。	38
圖五、胃幽門螺旋桿菌 CagA 可抑制 B 細胞 Bcl-6 mRNA 的表現。	39
圖六、SHP-2 在胃幽門螺旋桿菌 CagA 調控 Bcl-2, Bcl-xL 以及 Bcl-6 的角色。	40
圖七、CagA 轉染於 B 細胞增高 Bcl-2 及 Bcl-xL 的表現。	41
圖八、胃幽門螺旋桿菌 CagA 可減少 B 細胞對於 Etoposide 所引起之細胞 凋亡。	42



誌謝

兩年的時光真的讓人覺得很短暫，才剛考上研究所就已經要畢業了，而我也已經從懵懵懂懂的新生轉變為畢業生，其中遇到很多挫折也學到了很多寶貴的經驗，好在有身邊的朋友幫助，許多困難才能一一克服。

這一路有許多貴人幫忙著，讓我在崎嶇的路途上平穩走著。首先要先感謝指導教授許秉寧老師，老師在實驗方向與論文方面的指導讓我對於科學研究有更深一層的體會，也感謝老師平時教導我們如何克服所有困難，在人生的路上才能走得穩當，也感謝平時老師對於我們心智上的磨練以及鼓勵。感謝論文指導委員謝世良老師與林國儀老師，在每一次的進度報告時給予我許多實驗上的改進方法以及許多論文撰寫該注意的小地方，讓我受益良多。

此外也感謝實驗室的學長姐與學弟妹，感謝威成學長在實驗操作以及設計上不遺餘力教導我，讓我每次實驗遇到困難的時候總是看到一盞明燈，讓我對實驗更有信心。此外也要感謝世嘉學長以及鴻泰學長在實驗上的協助以及鼓勵。謝謝秀蓉學姐平時的關心，讓我在陷入低潮時給予我振作的力量。謝謝珮璇學姐常與我談天說地，讓我在實驗工作之外多了很多生活的調劑。謝謝玟安學妹以及逸霖學妹為實驗室帶來很多歡樂。也感謝許多其他實驗室的同學以及學長姐，在實驗材料以及方法上的幫助，使我能完成論文。

最後我要感謝我的媽媽、舅舅、舅媽以及阿姨在這兩年來生活上以及精神上的支持，總是在我需要幫助的時候不遺餘力，讓我能專心完成我的工作，也謝謝家人們常常鼓勵我，讓我總能從低潮中走出，若是沒有家人的幫忙，這兩年的工作我絕對無法完成。

中文摘要

胃幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*) 在分類上屬於革蘭氏陰性菌，病人感染胃幽門螺旋桿菌會造成胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃線癌以及胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤。胃幽門螺旋桿菌致病因子 CagA 是分子量 120~145 kD 的蛋白質，可經由第四型分泌系統(type IV secretion system)注入宿主細胞內。被送入宿主細胞的 CagA 會被宿主細胞內的磷酸酶所磷酸化。而磷酸化 CagA 可與 SHP-2 結合並活化 MAPK 訊息傳遞途徑。*cagA* 基因轉殖鼠內，發現除了有胃癌與胃腺癌形成外，有些小鼠會有 B 淋巴癌生成，但磷酸化耐受性 CagA(PR-CagA)的基因轉殖鼠內則觀察不到癌症生成，顯示 CagA 的磷酸化在 B 細胞轉型扮演重要角色。為了研究胃幽門螺旋桿菌 CagA 如何造成 B 細胞轉型的機制，我們假設胃幽門螺旋桿菌可以直接將 CagA 送入人類 B 細胞中，造成 B 細胞轉型的機率增加。首先我們利用胃幽門螺旋桿菌與 BJAB 細胞共同培養的系統，發現胃幽門螺旋桿菌能直接將 CagA 送入 B 細胞中，且隨著菌量以及時間的增加，可以偵測到磷酸化 CagA 的增加。為了進一步探討胃幽門螺旋桿菌是否透過 CagA 影響 B 細胞的存活，我們觀察 CagA 對抗細胞凋亡分子 Bcl-2 與 Bcl-xL 的影響，結果顯示胃幽門螺旋桿菌可誘導較高的 Bcl-2 與 Bcl-xL 表現量，然而在 *cagA* 基因剔除菌株中 Bcl-2 以及 Bcl-xL 表現量則並不會被誘導起來，因此在胃幽門螺旋桿菌 CagA 可影響 B 細胞抗細胞凋亡分子的表現。接著我們探討 CagA 是否會影響 B cell 的 Bcl-6。我們發現胃幽門螺旋桿菌會抑制 Bcl-6 蛋白質表現，但是在與 *cagA* 基因剔除菌株共同培養後，Bcl-6 表現量的抑制則不明顯。利用 real-time PCR 測量 Bcl-2、Bcl-xL 以及 Bcl-6 mRNA 表現，也發現到 Bcl-2 以及 Bcl-xL 的 mRNA 表現量會被胃幽門螺旋桿菌誘導起來，而 Bcl-6 的 mRNA 表現則會受到抑制，然而在 *cagA* 基因剔除菌株與 B 細胞共同培養的組別並沒有觀察到相同結果。為了觀察 SHP-2 在胃門幽桿菌調控 Bcl-2、Bcl-xL 以及 Bcl-6 的角色，我們利用 NSC-87877 抑制劑來抑制 SHP-2 的活性以及利用 SHP-2 siRNA 抑制 SHP-2 表

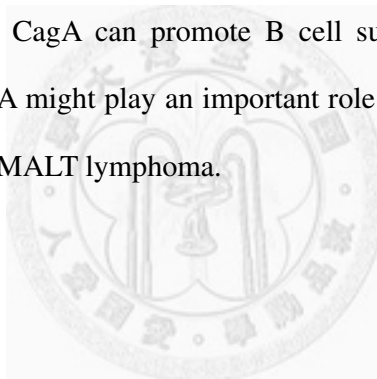
現。結果發現 Bcl-2, Bcl-xL 以及 Bcl-6 的調控並未受到影響。為了觀察是否 CagA 單獨存在於 B 細胞中即會影響 B 細胞的分子調控，因此我們將野生型 CagA 以及磷酸化耐受性 CagA (PR-CagA)轉染於 B 細胞中。我們發現在 B 細胞的 Bcl-2 以及 Bcl-xL 表現量在轉染野生型 CagA 或是磷酸化耐受性 CagA 的組別皆會被誘導，顯示 Bcl-2 以及 Bcl-xL 表現的調控為磷酸化 CagA 不依賴性。為了探討胃幽門螺旋桿菌是否會增加 B 細胞的存活，我們給予細胞 etoposide 測試細胞存活率。我們觀察到 B 細胞與野生型胃幽門螺旋桿菌共同培養的組別中，細胞的存活率在加入 etoposide 之後與控制組別差不多，然而在與 *cagA* 基因剔除胃幽門螺旋桿菌 HM-6 共同培養的組別中，細胞死亡情況嚴重。顯示野生型胃幽門螺旋桿菌 HM-6 可以增加 B 細胞的存活率。而在轉染 CagA 到 B 細胞之後，野生型 CagA 以及磷酸化耐受性 CagA，皆可增加 B 細胞的存活率。因此抗細胞凋亡分子的表現可能參與胃幽門螺旋桿菌造成胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤的形成機制之一。



Abstract

Helicobacter pylori is a Gram-negative bacteria. Infection with *Helicobacter pylori* leads to chronic gastritis, peptic ulcer disease, adenocarcinoma and gastric MALT lymphoma. CagA, a virulent factor of *Helicobacter pylori*, is an 120~145 kD bacteria protein. CagA could be translocated into the host cell via type IV secretion system. Within host cells, CagA is phosphorylated by protein kinase, and the phospho-CagA could bind to SHP-2, and to activate intracellular MAPK kinase signaling pathway. In *cagA* transgenic mice, gastric cancer and adenocarcinomas, as well as hematological malignancies were observed to develop in the CagA transgenic mice, but not in transgenic mice expressing phosphorylation-resistant CagA, suggesting that phosphorylation of CagA plays an important role in transformation of B cell. To study the mechanism of *Helicobacter pylori* CagA in B cell transformation, we proposed that *Helicobacter pylori* CagA could directly translocate into B cell, and increase the potential of B cell transformation. First, we found that *H. pylori* translocates CagA directly into B cell and undergoes phosphorylation in *H. pylori* and BJAB cell co-culture system in a dose- and time-dependent manner. To further examine whether *H. pylori* CagA could promote B cell survival via CagA, we investigate the effect of CagA on antiapoptotic molecules Bcl-2 and Bcl-xL. We demonstrated that *H. pylori* induced higher Bcl-2 and Bcl-xL expression, not in *cagA* knock-out *H. pylori* strain in human B cell lines, indicating *H. pylori* CagA may increase B cell survival. Next we investigated the effects of CagA on expression of Bcl-6. We found that *H. pylori* could repress Bcl-6 expression, but not in *cagA* knock-out *H. pylori* strain. Expression of Bcl-2 and Bcl-xL mRNA is up-regulated while expression of Bcl-6 mRNA is inhibited in wild type but not in *cagA* knock-out *H. pylori* strain in real-time PCR analysis. To further investigate the role of SHP-2 in the regulation of Bcl-2 Bcl-xL and Bcl-6 expression, we used SHP-2 inhibitor NSC-87877 to inhibit SHP-2 activity

and SHP-2 siRNA to knockdown SHP-2 expression. Our results demonstrated the effects on Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-6 is not affected by knocking down SHP-2. To further confirm whether CagA may directly regulate Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-6, we transfected WT-CagA or PR-CagA into B cell. The expression of Bcl-2 and Bcl-xL are induced in B cell transfected with either WT-CagA or PR-CagA, indicating that the expression of Bcl-2 and Bcl-xL are phospho-CagA independent. In order to examine whether *H. pylori* promote B cell survival, we treated B cell with etoposide after co-culture with *H. pylori*. The results showed that the survival of B cell after co-cultured with *cagA* knock-out strain was significantly decreased; in contrast, B cell transfected with WT-CagA or PR-CagA showed increased survival rate compare to vector control, suggesting CagA can promote B cell survival. Thus anti-apoptotic molecules induced by CagA might play an important role in transformation of B cell, and in the development of MALT lymphoma.



研究背景

1. 胃幽門螺旋桿菌之簡介

胃幽門桿菌為由 Barry Marshall 以及 Robin Warren 在 1983 年所分離出來。胃幽門螺旋桿菌(*H. pylori*)在分類上屬於革蘭氏陰性菌，長約 2-4 微米，寬為 0.5-1 微米，具有 2-6 個鞭毛，使胃幽門螺旋桿菌具有移動能力，而其基因體總長為 1.7 Mb，約含 1500 個基因。在形態上主要為桿狀型態，而有報導發現若是有抗生素存在下，胃幽門螺旋桿菌會形成球狀，為死亡狀態的胃幽門螺旋桿菌。傳播途徑在已開發國家中以嘔吐物、唾液及排洩物所傳染，而開發中國家可能主要以水為主要傳染途徑，而且多為孩童時期感染。人類胃幽門螺旋桿菌可生長在胃上皮細胞上的黏液層內，並且靠近胃黏膜層的部分，不直接侵犯胃黏膜組織(Marshall and Warren, 1984)，可藉由鞭毛附著於上皮細胞的表面，進而造成疾病。目前全世界約有 50%的人口感染過胃幽門螺旋桿菌，而感染胃幽門螺旋桿菌除了會造成胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍之外，更嚴重甚至引起胃線癌以及胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤 (Kusters, et al., 2006)。流行病學也發現長期感染胃幽門螺旋桿菌跟胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃線癌以及其他胃部癌症有極高的相關性(Blaser, et al., 1987; Blaser, et al., 2002; Crowe, 2005)。

目前認為胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤(gastric MALT lymphoma)的形成與胃幽門螺旋桿菌有關。在所有胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤的病人胃部檢體皆可分離出胃幽門螺旋桿菌，且利用而在臨床治療上發現若是利用抗生素將胃幽門螺旋桿菌完全清除，可以使病人的胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤完全消失 (Wotherspoon, et al., 1993)，顯示胃幽門螺旋桿菌和胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤的形成有強烈的關聯。在臨床上的研究，胃幽門螺旋桿菌的致病性的不同及菌種間的差異性，可以 *cagPAI* (cytotoxin associated gene pathogenicity island) 基因組的有無而分成兩大類，具有 *cagPAI* 的菌株會比沒有 *cagPAI* 的菌株有較強的發炎反應(Kusters, et al. 2006)。 *cagPAI* 基因組中所表現的蛋白質可構成第四型

分泌系統，有文獻發現 CagA 可以藉由細菌的第四型分泌系統將其送入宿主細胞中(Odenbreit et al., 2000)，而胃幽門螺旋桿菌可藉由此系統將 cagPAI 中表現的基因之一--CagA 送入胃上皮細胞中造成細胞形態改變(humming bird)。老鼠感染 *cagA*⁺ 胃幽門螺旋桿菌在胃部會造成嚴重的發炎和萎縮(Sheu, et al., 1999)，或是發展成胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤(Wang, et al., 2000)。根據以上實驗觀察提供證據說明 *cagA*⁺ 胃幽門螺旋桿菌在胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤生成或是維持扮演重要之角色。

2. CagA

CagA 為胃幽門螺旋桿菌的毒力因子之一，為 1990 年代利用胃潰瘍病人血清檢體所發現，其分子量約為 120~145 kDa (Covacci et al., 1993; Cover et al., 1990; Crabtree et al., 1991; Tummuru et al., 1993)。有文獻發現 CagA 可以藉由細菌的第四型分泌系統將其送入宿主細胞中(Odenbreit et al., 2000)，而送入宿主細胞中的 CagA 可以藉由在 C 端由 Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala 5 個胺基酸所組成的 EPIYA motif 結合於宿主細胞的細胞膜上(Higashi et al., 2005)，並且 CagA 的 EPIYA motif 會被宿主細胞內的 Src kinase 或是 C-Abl kinase 所磷酸化(Selbach et al., 2002; Stein et al., 2002; Tammer et al., 2007)。進入胃上皮細胞內的 CagA 會藉由 PAR1 與 Grb2 來影響 MAPK kinase，破壞上皮細胞之間的連結，並且使細胞形成蜂鳥(humming bird)的型態(Amieva et al., 2003; Mimuro et al., 2002; Saadat et al., 2007)。有文獻發現磷酸化的 CagA 在宿主上皮細胞內會與 SHP-2 結合(Higashi et al., 2002b)，且 CagA 的磷酸化程度會影響其與 SHP-2 結合能力以及其在細胞內的功能(Higashi et al., 2002a; Naito et al., 2006)。有文獻利用外源表現 CagA 於 BCL-1 細胞中發現其會抑制 B 細胞的生長且會抑制 p53 的累積而保護 B 細胞不會進行細胞凋亡(Umehara et al., 2003)，此外也有文獻發現轉染 CagA 於 B1 細胞中可以暫時活化 ERK1/2，而活化的 ERK1/2 可以造成促細胞凋亡分子 Bad 進行磷酸化而被分解(Zhu et al., 2007)，使得 B 細胞存活率增加而有機會

形成淋巴瘤。此外也有文獻發現 CagA⁺的胃幽門螺旋桿菌可以藉由 MAPK-AP1 的路徑引起較高的 Cyclin D1，促使胃上皮細胞可以從 G1 phase 進入 S phase 而增加細胞的生長速度(Chang et al., 2006)，顯示 CagA 除了可以抑制細胞進行細胞凋亡之外，也會藉由增加細胞的生長速度導致細胞有較高的機率轉型成癌細胞。而有團隊建立 *cagA* 基因轉殖鼠發現除了會有胃癌、胃腺癌以及白血球增加以外，在一定比例的小鼠身上也可以觀察到有 B 細胞淋巴瘤產生，但若是將 CagA 磷酸化位置全部進行點突變使其無法進行磷酸化，則胃上皮細胞的不正常生長現象消失，且小鼠也不會發展成胃癌、胃腺癌以及 B 細胞淋巴瘤(Ohnishi et al., 2008)，顯示 CagA 送入宿主細胞進行磷酸化對於癌症的形成有非常強烈的關係。

3. SHP-2

SHP-2 為 1990 年代初期由幾個獨立團隊同時發現，其具有 2 個 SH2 domain，1 個 PTP domain 以及 C 端的兩個磷酸化位置(Ahmad et al., 1993; Feng et al., 1993; Freeman et al., 1992; Vogel et al., 1993)，當有外來刺激時會造成 SH2 domain 結合於有磷酸根的 PDGF 或是 Grb2，使得 SHP-2 的去磷酸酶活性上升(Holgado-Madruga et al., 1996; Kazlauskas et al., 1993)。而 SHP-2 的去磷酸酶活性主要受到其 N 端的 SH2 domain 與 PTP domain 的結合，因此當 SH2 domain 與其他受質結合時，會造成 PTP domain 活性上升(Hof et al., 1998; Pluskey et al., 1995)。SHP-2 缺失的小鼠則會顯示較弱的 MAPK 活性，造成造血幹細胞的生長以及分化受到抑制(Qu et al., 1999)。SHP-2 除了被報導會影響細胞生長外，也會影響細胞之間的連接以及細胞的移動(Inagaki et al., 2000; Manes et al., 1999)。有文獻發現人類缺少 *PTPN11*(人類的 SHP-2 基因)會造成 Noonan syndrome(Tartaglia and Gelb, 2005; Tartaglia et al., 2001)，會影響多種器官發展以及造成白血病。有文獻發現胃幽門螺旋桿菌 CagA 可以和 SHP-2 結合，並且造成 SHP-2 的活性上升(Higashi et al., 2002)，而 CagA 會藉由 SHP-2 以及下游的

Grb2 來影響 MAPK kinase，破壞上皮細胞之間的連結，並且使細胞形成蜂鳥 (humming bird) 的型態 (Amieva et al., 2003; Mimuro et al., 2002; Saadat et al., 2007)。而 *cagA* 基因轉殖鼠發現會有胃癌、胃腺癌、白血球增加以及 B 細胞淋巴瘤產生，但若是將 CagA 磷酸化位置全部進行點突變，則 CagA 除了無法進行磷酸化也無法與 SHP-2 結合，這樣的磷酸化耐受性 CagA 基因轉殖鼠胃上皮細胞的不正常生長現象消失，且小鼠也不會發展成胃癌、胃腺癌以及 B 細胞淋巴瘤 (Ohnishi et al., 2008)，顯示 SHP-2 可能參與在癌症的形成機制中。

4. Bcl-2、Bcl-xL and Bcl-6

Bcl-2 首先在 1990 年代初期被發現，在全身性表現 Bcl-2 的小鼠中，可以發現許多源自造血性幹細胞的細胞種類在生長因子被移除之後，細胞生長情形不會受到太大影響，且存活率都較普通細胞來的高，且也發現 Pro-B 淋巴細胞的死亡大量減少 (Hockenbery et al., 1990)，進而發現 Bcl-2 可以阻斷細胞凋亡的進行 (Hockenbery et al., 1990; Nunez et al., 1989)，而也有文獻發現利用 IHC 分析胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤病人檢體都可以發現到 Bcl-2 的蛋白質訊號，推論 Bcl-2 可能參與在 B 細胞轉型的過程中 (Isaacson et al., 1991)。而 Bcl-xL 為 Bcl-2 family 的一員，有文獻報導 Bcl-2 以及 Bcl-xL 可以阻斷缺氧所造成的細胞凋亡，顯示 Bcl-xL 也具有阻斷細胞死亡的功能 (Shimizu et al., 1995)。有文獻發現在胃幽門螺旋桿菌感染胃上皮細胞時，會藉由 ERK 的活化來誘導 Bcl-2，若是利用抑制劑將 MAPK 中的 ERK1/2 活性抑制，則 Bcl-2 的誘導即消失 (Choi et al., 2003)，此外也發現胃幽門螺旋桿菌感染的胃癌病人檢體中可以偵測到高量的 Bcl-xL，而現今造成細胞轉型的因素中，其一為細胞逃脫細胞凋亡 (Hanahan and Weinberg, 2000)，顯示胃幽門桿菌可以藉由誘導高量的 Bcl-2 以及 Bcl-xL 使細胞有機會轉型成癌細胞。Bcl-6 為包含有 Zinc-finger 的轉錄抑制因子，可能參與在瀰漫性大細胞淋巴瘤生成中 (Ye et al., 1993)，也有文獻指出 Bcl-6 會高量表現在 Germinal center 的 B 細胞中 (Cattoretti et al., 1995)，而 Bcl-6 除了會影響發

炎反應、細胞素表現之外(Dent et al., 1997)，也發現會調控淋巴球的活化分子 CD69 以及細胞週期的 Cyclin D2(Shaffer et al., 2000)，也有報導指出 Bcl-6 可以直接結合在抗細胞凋亡分子 Bcl-xL 的啟動子上進而抑制 Bcl-xL 的表現(Tang et al., 2002)，顯示 Bcl-6 可能參與在 B 細胞淋巴瘤的生成過程中。



研究動機與目的

在流行病學上已發現病人被胃幽門螺旋桿菌感染可造成胃發炎、胃潰瘍、胃癌以及胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤等疾病。分析胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤病人的血清檢體皆可發現病人曾經被胃幽門螺旋桿菌感染(Eck, et al. 1997)，而在臨床治療上發現若是利用抗生素將胃幽門螺旋桿菌完全清除，可以使病人的胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤完全消失(Wotherspoon, et al., 1993)，顯示胃幽門螺旋桿菌和胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤的形成有強烈的關聯。而在 *cagA* 基因轉殖鼠內，發現 CagA 會在細胞內被磷酸化並且與 SHP-2 phosphatase 結合，而這樣的基因轉殖鼠除了有胃癌與胃腺癌形成外，也發現到有一定比例的小鼠會有 B 淋巴癌生成，而若是將 CagA 磷酸化位置突變使其無法被磷酸化，則這樣的基因轉殖鼠就不會有癌細胞生成，而 B 淋巴癌也完全消失(Ohnishi, et al., 2008)。顯示胃幽門螺旋桿菌 CagA 的磷酸化與 SHP-2 的結合與胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤的形成有一定關聯。然而胃幽門螺旋桿菌是否可以直接透過 CagA 來造成 B 細胞轉型仍不清楚。因此我們假設胃幽門螺旋桿菌能直接將 CagA 送入 B 細胞中，影響 B 細胞存活。我們利用臨床所分離的胃幽門螺旋桿菌與人類 B 細胞株共同培養的系統來探討 CagA 是否具有能力影響人類 B 細胞存活，我們同時利用表現載體將 CagA 過度表現於人類 B 細胞中，觀察是否單獨 CagA 即可影響 B 細胞表現抗細胞凋亡分子以及存活率。

材料與方法

1. 實驗材料

細胞株和菌種

人類 B 細胞株 BJAB 以及 L-428 培養在含有 10 %胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) RPMI 培養液中，培養箱溫度為 37°C、二氧化碳含量為 5%。胃幽門螺旋桿菌臨床菌株(HM-6)培養在含有 10% 的綿羊血的瓊脂盤(agar plate)中，瓊脂盤放置於 37°C 厭氧箱 2 天，之後將胃幽門螺旋桿菌從瓊脂盤上刮下，種至 20ml 含有 10 %胎牛血清的 Brucella broth 中，培養 15 小時後與 BJAB 細胞共同培養。

抗體

Goat anti-mouse IgG	Cell signaling, Danvers, MA
Goat anti-rabbit IgG	Cell signaling, Danvers, MA
Rabbit anti-Bcl-xL	Cell signaling, Danvers, MA
Rabbit anti-Bcl-2	Cell signaling, Danvers, MA
Rabbit anti-Bcl-6	Santa Cruz, Santa Cruz, CA
Rabbit anti-SHP-2	Santa Cruz, Santa Cruz, CA
Mouse anti-CagA	Santa Cruz, Santa Cruz, CA
Mouse anti-phospho-tyrosine	Santa Cruz, Santa Cruz, CA
Mouse anti-actin	Chemicon, Temecula, CA

培養液與緩衝液

RPMI1640 complete medium

RPMI1640 culture medium containing 10% FBS

LB medium

2.5 % Miller's LB broth dissolved in ddH₂O, autoclaved

Brucella broth

2.8 % Brucella broth powder dissolved in ddH₂O, autoclaved, and then add 10%

FBS

BHI based blood agar plate

Autoclaved 5.2 % BHI agar, 10 % sheep blood, 6 µg/ml Vancomycin and 2 µg/ml

Amphotericin B

1x PBS

100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄, 0.8 % NaCl, 0.02 % KCl, pH=7.4

4 × SDS sample buffer (Western blotting)

200 mM Tris-HCl (pH=6.8), 200mM DTT, 0.4 % Bromophenol blue, 40 % Glycerol,

8 % SDS

10 × Running buffer (Western blotting)

192 mM Glycine, 25 mM Tris-HCl, 1 % SDS, pH=8.3

10 × transfer buffer (Western blotting)

195 mM Glycine, 240 mM Tris-HCl, 1.185 % SDS, pH=8.4. Dilute before use

with ddH₂O and add 20 % Methanol

10 × wash buffer (Western blotting)

100mM Tris-Hcl (pH=7.4), 9 % NaCl, 2 % Tween-20

Lysis buffer

1 % Triton-X, 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA

化學藥品

Acetic acid	Merck, Darmstadt, Germany
Agarose	BMA, Rockland, ME
Ammonium persulfate (APS)	Fluka Biochemica, Buchs, Switzerland

Amphotericin B	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo
Acrylamide	USB, Cleveland, OH
β -mercaptoethanol (2-ME)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo
Brain Heart Infusion agar (BHI agar)	Becton Dickinson, Sparks, MD
Brucella broth	Becton Dickinson, Sparks, MD
Dimethyl sulfoxide	Merck, Darmstadt, Germany
Disodium hydrogenphosphate (Na_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Germany
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) concentrate $\times 10$	Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel
Fatal bovine serum (FBS)	Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel
Glycerol	Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden
Glycine	USB, Cleveland, OH
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo
Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo
Magnesium chloride (MgCl_2)	J.T.Backer, phillipsburg, NJ
Methanol	Merck, Darmstadt, Germany
Miller's LB broth	Becton Dickinson, Sparks, MD
N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethan Esulfonic acid (BES)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo
N,N,N,N-tetramethylene Diamine (TEMED)	Merck, Darmstadt, Germany
Potassium chloride (KCl)	Merck, Darmstadt, Germany

Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Germany
Sheep Blood	Becton Dickinson, San Diego, CA
Sodium bicarbonate (NaHCO_3)	USB, Cleveland, OH
Sodium chloride (NaCl)	USB, Cleveland, OH
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	USB, Cleveland, OH
Sodium phosphate, dibasic (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Germany
Sodium phosphate, monobasic (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Germany
Tris-base	USB, Cleveland, OH
Triton-X	USB, Cleveland, OH
Trypan blue	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo
Tween-20	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo
Vancomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo

實驗耗材

0.22 μM filter	Millipore, Bedford, MA
1.7 ml eppendorf	Axygen, Union City, CA
2 ml eppendorf	Axygen, Union City, CA
3 cm dish	Corning, Corning, NY
5 ml pipette	Caster, Corning, NY
6 cm dish	Corning, Corning, NY
10 cm dish	Corning, Corning, NY
10 ml pipette	Caster, Corning, NY
15 ml tube	Caster, Corning, NY

25 ml pipette	Caster, Corning, NY
50 ml tube	Caster, Corning, NY
FACSan staining tube	Becton Dickinson, San Diego, CA
PVDF transfer membrane	Perkinelmer, Boston, MA

實驗儀器

BH-230 water bath	YHI DER Instruments Co Ltd, Taiwan
CellQuest Ver. 1.1.2 software	Becton Dickinson, San Diego, CA
Centrifuge RC5C	Sorvall, Newtown, CT
CO ₂ incubator	Froma, Marietta, OH
ELISA reader	Labsystem multiscan, Finland
Firstek B205 Water Bath	Firstek Scientific, Taipei, Taiwan
Flow cytometry	Becton Dickinson, San Diego, CA
Kubota 2010 centrifuge	Kubota, Tokyo, Japan
Lamina flow hood	Dwyer, Michigan, IN
Microscopes	Olympus, Center Valley, PA
Neon™ Transfection System MPK5000	Invitrogen, Taiwan
OSP-135 power supply	OWL, Portsmouth, NH
Power PAC300p	Bio-Rad laboratories, Hercules, CA
Protein gel electrophoresis	OWL, Portsmouth, NH
Vortex-2-Genie	Scientific Industries, Bohemia, NY

2. 實驗方法

分離細胞萃取液(Isolation of cell extracts)

將 2×10^6 個 BJAB 細胞 與胃幽門螺旋桿菌共同培養在含有 10 %胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) RPMI 培養液中。分別於 2、4 及 6 小時，將細胞沖洗下，用 1300 轉的速度 3 分鐘將細胞離心收集。去除上清液後利用 $500 \mu\text{l}$ DPBS 重新懸浮細胞並再次將細胞離心收集，去除上清液之後加入 $80 \mu\text{l}$ 的均質緩衝液打破細胞。打破細胞後，將樣本 4°C 14000 轉離心 30 分鐘後，取上清液保存在 -80°C 中備用。

西方墨點法(Western blotting)

利用 SDS 膠體電泳樣本溶液使細胞萃取液變性，煮沸加熱 5 分鐘後靜置於冰上。利用 SDS-PAGE 電泳分離蛋白質，並轉漬於 PVDF 膜上。將轉漬後的 PVDF 膜以 Methanol 脫水固定，之後放入含有 5%脫脂牛奶或 5% BSA 的 TBST 緩衝液中 30 分鐘。於不同實驗中加入不同的一級抗體，包括以 5 % BSA 的 TBST 緩衝液稀釋的磷酸化 tyrosine 一級抗體，5 %脫脂牛奶稀釋的 CagA 一級抗體、SHP-2 一級抗體、Bcl-6 一級抗體、Bcl-2 一級抗體、actin 一級抗體、Bcl-xL 一級抗體搖晃 1 小時。利用 TBST 緩衝液清洗 3 次，每次 10 分鐘，之後加入 5 % 脫脂牛奶稀釋的二級抗體搖晃 1 小時，再次利用 TBST 緩衝液清洗 3 次，每次 10 分鐘，之後加入 ECL 試劑，利用 X 光片偵測目標訊號。

RNA 萃取及即時聚合酶連鎖反應(Real-time PCR)

將 TRIzol(Invitrogen)加入細胞中，重新懸浮細胞於室溫下 5 分鐘使細胞均質化，之後加入 chloroform 2 至 3 分鐘使蛋白質變性，於 4°C 下以 12,000 轉的速度離心 15 分鐘，將含有 RNA 的上層液體取出放置於乾淨的離心管，加入相同體積的異丙醇，放置於室溫 30 分鐘後，於 4°C 下以 12,000 轉的速度離心 10

分鐘，將所萃取出 RNA 以 75%酒精沖洗，離心之後以 ddH₂O 回溶，放置於 -80°C 中備用。將萃取出 RNA 用 SuperScript III reverse Transcriptase kit (Invitrogen) 轉成 cDNA。將 1 μl cDNA 稀釋 10 倍，取 4 μl 稀釋後的 cDNA 偵測目標 mRNA 的表現。即時聚合酶連鎖反應使用 iCycler PCR (BioRAD)，PCR 反應溶液的濃度如下：1× PCR 緩衝液、200 μM dNTP、1× SYBR Green I (Invitrogen)、3 mM MgCl₂ 以及 1 U Taq polymerase (Invitrogen)，總體積為 20 μl。PCR 條件：3 分鐘 95°C 變性，40 次循環：30 秒 95°C、30 秒 60°C、30 秒 72°C、10 秒 83°C。利用 actin 將目標 mRNA 的表現進行標準化。Primer：Bcl-2：TTCTTTGAGTTCGGTGGGGTC (Forward), TGCATATTTGTTTGGGG CAGG (Reverse). Bcl-xL：ATCAATGGCAACCCATCCTG (Forward), TTGTC TACGCTTTCCACGCA (Reverse). Bcl-6：GCAACATCTACTCGCCCAAG (Forward), CTTCTTCTTTGCTGGCTTTGT (Reverse). Actin：AGGGAAATCGT GCGTGAC (Forward), GCTCGTTGCCAATAGTGATG (Reverse)。

轉染(Transfection)

siRNA 轉染：將 BJAB 細胞收集後，以 1200 轉離心 5 分鐘，捨去上清液，用 DPBS 重新懸浮，取 4 x 10⁶ 個 BJAB 細胞至 1.7 ml 離心管中，以 5000 轉離心 2 分鐘，捨去上清液，用 solution kit (Digital Bio) 內的 R buffer 24 μl 小心懸浮細胞。SHP-2 siRNA (Dharmacon) 10 nmole 用 250 μl 的 DEPC 水溶解，取 2 μl 加入細胞懸浮液中混勻，放置於室溫 5 分鐘後，利用 microporator (invitrogen) 於電壓 1350V、電擊時間 40 ms，將 siRNA 送入細胞內，於 24 小時以及 48 小時收集細胞，並與胃幽門螺旋桿菌 HM-6 共同培養。

質體轉染：將 L-428 細胞收集後，以 1200 轉離心 5 分鐘，捨去上清液，用 DPBS 重新懸浮，取 8 x 10⁶ 個 L-428 細胞至 1.7 ml 離心管中，以 5000 轉離心 2 分鐘，捨去上清液，用 solution kit (Digital Bio) 內的 R buffer 96 μl 小心懸浮細胞。加入 12 μg 質體 DNA，放置於室溫下 10 分鐘後，利用 electroporation

於電壓 1350V、電擊時間 40 ms，將質體 DNA 送入細胞內，於 24 小時收集細胞，利用西方墨點法分析目標蛋白質表現量。

建構 CagA 磷酸化位置突變質體(Mutagenesis)

將野生型的 EGFP-CagA 送定序發現在 CagA 序列中一共有 3 個 EPIYA motif 可以進行磷酸化，分別是第 899 個胺基酸的 Tyr、第 918 個胺基酸的 Tyr 以及第 972 個胺基酸的 Tyr。利用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 將 WT-EGFP-CagA 質體進行磷酸化位置的突變 (stratagene)。

Mutagenesis PCR 反應溶液濃度如下：50 ng 野生型質體，1 × reaction buffer，125 ng 正向突變 primer，125 ng 反向突變 primer，1 μl dNTP mix，以及 1 μl PfuTurbo DNA polymerase (2.5 U/μl)，總體積 50μl。PCR 條件：30 秒鐘 95 °C 變性，16 次循環：30 秒 95°C、1 分鐘 55°C、8 分鐘 68°C，最後置於冰上 2 分鐘。加入 1 μl Dpn I 限制酶 (10 U/μl)於反應試管中，於 37°C 下作用 1 個小時。預先將 XL1-Blue 勝任細胞置於冰上，加入 10 μl 的反應完之樣本於勝任細胞中，溫和混勻。

細菌轉型 (transformation)：放置於冰上 30 分鐘，之後置於 42°C 作用 1 分鐘，最後放置於冰上 2 分鐘終止反應。加入 1 ml LB medium，於 37°C 及轉速 225-250rpm 下培養 30 分鐘，以 6000 轉將菌液離心 5 分鐘，塗佈於含有 30 μg kanamycin 的 LB 瓊脂盤上，於 16 小時之後觀察有無菌落生成。

細胞存活率測試 (MTS assay)

將 2×10^4 BJAB 細胞與旋桿菌 HM-6 (MOI=100) 共同培養 12 小時，之後給予細胞 100 μM Etoposide，於 12~16 小時之後加入 20 μl MTS，放置於 37 °C 培養箱，4 小時後利用 ELISA reader 偵測波長 490 nm 的讀值，細胞存活率以百分比表示之。利用 electroporation 將質體 DNA 送入 L-428 細胞內，於 24 小時收集細胞，之後給予細胞 100 μM Etoposide，於 12~16 小時之後加入 20

μl MTS，放置於 37°C 培養箱，4 小時後利用 ELISA reader 偵測波長 490 nm 的讀值，細胞存活率以百分比表示之。

統計分析

數據結果顯示為標準值 \pm 標準差，兩組別差異性的比較為利用 Student's test 進行分析，當 p value 小於 0.05 ($p < 0.05$) 時認定兩組數據之間有顯著差異。



實驗結果

1. 胃幽門螺旋桿菌可直接將 CagA 送入人類 B 細胞株中

在胃上皮細胞的研究中發現被 CagA⁺的胃幽門螺旋桿菌感染會有較高的機率形成胃腺癌 (Blaser et al., 1995)。而在 cagA 基因轉殖鼠除了會生成胃癌，胃腺癌以及白血球癌，在一定比例的小鼠上也可以發現有 B 細胞淋巴瘤的生成，顯示 CagA 具有使 B 細胞轉型成癌細胞的能力(Ohnishi et al., 2008)。為了測試胃幽門螺旋桿菌是否具有能力直接將 CagA 送入人類 B 細胞中，增進 B 細胞轉型的機率，我們利用從胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤病人身上所分離出的臨床菌株胃幽門螺旋桿菌菌株 HM-6 與人類 B 細胞株 BJAB 共同培養。由於 CagA 會被宿主細胞內的 Src kinase 或是 C-Abl kinase 所磷酸化(Selbach et al., 2002; Stein et al., 2002; Tammer et al., 2007)，因此只有磷酸化的 CagA 代表胃幽門螺旋桿菌確實將 CagA 送入人類 B 細胞中。我們利用在 MOI=25, 50, 100 的條件下，將胃幽門螺旋桿菌菌株 HM-6 與人類 B 細胞株 BJAB 共同培養 5 小時，在 5 小時的時間點將細胞收集下來，以及在 MOI=100 的條件下將胃幽門螺旋桿菌菌株 HM-6 與人類 B 細胞株 BJAB 共同培養，分別於 1 小時、3 小時以及 5 小時的時間點將細胞收集下來，利用西方墨點法偵測磷酸化 CagA 以及 CagA 的表現。我們發現磷酸化 CagA 會隨著胃幽門螺旋桿菌增加而漸漸增加(圖一(A))，且共同培養的時間增加也可以偵測到磷酸化 CagA 漸漸增加(圖一(B))，顯示 CagA 送入人類 B 細胞中是菌量以及時間依賴性。由於 CagA 可以藉由細菌的第四型分泌系統將其送入宿主細胞中(Odenbreit et al., 2000)，因此而為了確認 CagA 確實是送入到細胞中後被宿主細胞磷酸化，我們利用 HM-6 Δ cagA 以及將 HM-6 Δ cagE (第四型分泌系統中具有 ATPase 功能且負責注射 CagA 到宿主細胞的重要基因)的胃幽門螺旋桿菌與 BJAB 細胞共同培養 5 小時，在 5 小時的時間點將細胞收集下來，利用西方墨點法偵測中磷酸化 CagA 以及 CagA 的表現。我們發現在野生型 HM-6 與 BJAB 細胞共同培養 5 小時的組別可以偵測到

磷酸化 CagA 的表現，在 HM-6 Δ cagA 以及 HM-6 Δ cagE 的組別則無法觀察到磷酸化 CagA 的訊號，表示將第四型分泌系統破壞掉之後，胃幽門螺旋桿菌無法將 CagA 送入 B 細胞中，因此無法觀察到 CagA 的磷酸化(圖一(C))，顯示胃幽門螺旋桿菌確實可以直接將 CagA 送入到人類 B 細胞中。

2. 胃幽門螺旋桿菌可藉由 CagA 引起 B 細胞表現較高量的 Bcl-2 及 Bcl-xL

有文獻發現 CagA⁺的胃幽門螺旋桿菌可使胃上皮細胞維持較高量的 Bcl-2(Choi et al., 2003)，此外也有文獻發現低惡度性 B 細胞淋巴瘤都會表現一定量的 Bcl-2 (Ashton-Key et al., 1995)，在胃幽門螺旋桿菌感染的病人檢體也發現有較高的 Bcl-xL 產生(Nardone et al., 2004; Yang et al., 2004)。因此為了測試 CagA 是否能藉由影響抗細胞凋亡分子 Bcl-2 以及 Bcl-xL 而影響 B 細胞內的存活，我們利用 BJAB 細胞與野生型胃幽門螺旋桿菌 HM-6 或 *cagA* 基因剔除胃幽門螺旋桿菌 HM-6 共同培養 2、4 以及 6 小時後收集細胞，使用西方墨點法觀察 Bcl-2 及 Bcl-xL 在兩個組別的表現量。我們發現在共同培養 6 小時之後，野生型胃幽門螺旋桿菌 HM-6 可引起較高的 Bcl-2 及 Bcl-xL 的表現量，而在 *cagA* 基因剔除胃幽門螺旋桿菌 HM-6 組別 Bcl-2 及 Bcl-xL 表現上升較不明顯(圖二(A))。為了確認實驗的可信度，實驗進行三次重複，結果以長條圖表示，發現在共同培養 6 小時之後，與 *cagA* 基因剔除菌株比較起來野生型造成 B 細胞引起較高 Bcl-2 以及 Bcl-xL 在統計上有意義(圖二(B))。有文獻指出 Bcl-2 在 B 細胞中是以轉錄階層進行調控(Shen et al., 2004)，因此我們將 BJAB 細胞與胃幽門螺旋桿菌 HM-6 或 *cagA* 基因剔除胃幽門螺旋桿菌 HM-6 共同培養 2、4 以及 6 小時後收集細胞，用 TRIzol 萃取 RNA，利用即時聚合酶連鎖反應偵測 Bcl-2 以及 Bcl-xL mRNA 表現，可以觀察到在 2 小時以及 4 小時的時間點 Bcl-2 以及 Bcl-xL mRNA 表現量在各組別間並無明顯差異，而在 6 小時時間點野生型組別

Bcl-2 以及 Bcl-xL mRNA 表現量相較於 *cagA* 基因剔除菌株組別高出許多，且在統計上具有意義(圖三)。顯示 $CagA^+$ 的胃幽門螺旋桿菌引起較高的 Bcl-2 以及 Bcl-xL 是以轉錄階層進行調控。

3. 胃幽門螺旋桿菌可藉由 CagA 抑制 B 細胞 Bcl-6 的表現

有文獻發現 Bcl-6 不會表現在低惡性度胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤 (Omonishi et al., 1998)，且也有報導指出 Bcl-6 可以直接結合在 Bcl-xL 的啟動子上來抑制 Bcl-xL 的表現(Tang et al., 2002)，此外也有文獻發現 Bcl-6 會抑制淋巴球的 CD69 以及 Cyclin D2 表現進而抑制淋巴球的活化(Shaffer et al., 2000)。為了測試 CagA 是否會影響 B 細胞內的 Bcl-6，我們將 BJAB 細胞與野生型胃幽門螺旋桿菌 HM-6 或 *cagA* 基因剔除胃幽門螺旋桿菌 HM-6 共同培養 2、4 以及 6 小時後收集細胞，利用西方墨點法觀察 Bcl-6 的表現量。可以發現 BJAB 細胞與野生型共同培養的組別隨著時間的增加會使得 Bcl-6 降低，而 *cagA* 基因剔除胃幽門螺旋桿菌 HM-6 組別的 Bcl-6 則並無太大改變(圖四(A))。為了確認實驗的可信度，實驗進行三次重複，結果以長條圖表示，發現在共同培養 6 小時之後，與 *cagA* 基因剔除菌株比較起來野生型抑制 B 細胞 Bcl-6 表現在統計上有意義(圖四(B))。有文獻指出 Bcl-6 的調控是藉由 MAPK 以轉譯階層進行調控 (Moriyama et al., 1997)，我們將 BJAB 細胞與胃幽門螺旋桿菌 HM-6 或 *cagA* 基因剔除胃幽門螺旋桿菌 HM-6 共同培養 2、4 以及 6 小時後收集細胞，用 TRIzol 萃取 RNA，利用即時聚合酶連鎖反應偵測 Bcl-6 mRNA 表現，可以觀察到在 2 小時以及 4 小時的時間點 Bcl-6 mRNA 表現量在各組別間並無明顯差異，而在 6 小時時間點野生型組別 Bcl-6 mRNA 表現量相較於 *cagA* 基因剔除菌株組別降低許多，且在統計上具有意義(圖五)。顯示 $CagA^+$ 的胃幽門螺旋桿菌可藉由轉錄階層來調控 Bcl-6 的表現量。

4. SHP-2 在胃幽門螺旋桿菌 CagA 調控 Bcl-2, Bcl-xL 以及 Bcl-6 的角色

有文獻指出胃幽門螺旋桿菌 CagA 的磷酸化與 SHP-2 的結合與胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤的形成有一定關聯(Ohnishi, et al., 2008)，且有文獻指出 SHP-2 可以活化 MAPK kinase 訊息傳導路徑(Freearson and Alexander, 1998; Maroun et al., 2000)。而除了 Bcl-6 可以藉由活化 MAPK 來進行調控(Moriyama et al., 1997)，此外也有報導指出 Bcl-2 的表現可以被 ERK 的抑制劑所阻斷(Choi et al., 2003)，暗示 CagA 可能透過 SHP-2 調控 Bcl-2、Bcl-xL 以及 Bcl-6。因此我們利用抑制劑 NSC-87877 抑制 SHP-2 的活性，並且偵測 Bcl-2、Bcl-xL 以及 Bcl-6 是否表現量有上升。可以發現隨著 NSC-87877 濃度的增加，Bcl-6 表現量在與野生型胃幽門螺旋桿菌 HM-6 共同培養後有部分回升的現象(圖六(A))，暗示 CagA 調控 Bcl-6 可能是透過 SHP-2 來進行。然而觀察 SHP-2 是否能調控 Bcl-2 以及 Bcl-xL，我們發現不論是否有加抑制劑，Bcl-2 以及 Bcl-xL 都會被野生型胃幽門螺旋桿菌 HM-6 誘導而升高(圖六(A))，暗示 Bcl-2 以及 Bcl-xL 的調控並不是透過 SHP-2。我們也利用 siRNA 來抑制 SHP-2 表現(圖六(B))，觀察 Bcl-2、Bcl-xL 以及 Bcl-6 表現是否有受到影響。我們將 SHP-2 siRNA 送入 BJAB 細胞內，待 1 天後將 BJAB 細胞收集下來，並與胃幽門螺旋桿菌共同培養 8 小時，利用西方墨點法偵測 Bcl-2、Bcl-xL 以及 Bcl-6 表現。我們發現無論是否有抑制 SHP-2 表現，Bcl-2 以及 Bcl-xL 表現量在與野生型胃幽門螺旋桿菌 HM-6 共同培養後均有上升，而 Bcl-6 則仍然會被抑制(圖六(C))，暗示 Bcl-2, Bcl-6 以及 Bcl-xL 並不受到 SHP-2 調控。

5. CagA 轉染於 B 細胞可引起較高的 Bcl-2 及 Bcl-xL

為了排除胃幽門螺旋桿菌的其他因子，因此我們將 CagA 過度表現於人類 B 細胞株中，觀察 CagA 單獨存在下是否會影響 B 細胞表現 Bcl-2、Bcl-xL。此

外有文獻指出 CagA 的磷酸化程度會影響其功能(Higashi et al., 2002a; Naito et al., 2006)，且在 CagA 磷酸化位置突變的基因轉殖鼠中，不會有癌細胞生成，而 B 淋巴癌也完全消失(Ohnishi, et al., 2008)，顯示 CagA 的磷酸化與否對於宿主細胞的影響具有很大的差異，因此我們同時利用點突變的方法建構磷酸化耐受性 CagA，方法為將 CagA 上 3 個會被宿主細胞進行磷酸化的 EPIYA motif 置換成 EPIAA(圖七(A))，使其成為 phosphorylation-resistance CagA (PR-CagA)而無法進行磷酸化，同時將其轉染於人類 B 細胞株中，與野生型的進行比較。可以發現轉染野生型 CagA 以及 PR-CagA 於 L428 細胞中時，都可以偵測到 CagA 的表現，然而只有在轉染野生型的 CagA 才可觀察到磷酸化 CagA(圖七(B))，而我們發現野生型與磷酸化耐受性 CagA 皆可誘導 Bcl-2 以及 Bcl-xL，顯示 CagA 單獨存在於 B 細胞中即可誘導宿主細胞的抗細胞凋亡分子 Bcl-2 及 Bcl-xL 表現，然而 Bcl-2 以及 Bcl-xL 的調控則不依賴 CagA 的磷酸化(圖七(C))。

6. 胃幽門螺旋桿菌 CagA 可以減少 B 細胞進行細胞凋亡

有文獻發現 Bcl-2 以及 Bcl-xL 可以阻斷程式化細胞死亡(Hockenbery et al., 1990; Shimizu et al., 1995)，因此我們利用人類 B 細胞與胃幽門螺旋桿菌共同培養之後，加入 Etoposide 使宿主細胞進行 apoptosis，再利用 MTS assay 觀察宿主細胞存活情形。可以發現在與野生型胃幽門螺旋桿菌 HM-6 共同培養的組別中，細胞的存活率在加入 etoposide 之後與加入培養液的控制組別差不多，然而在與 *cagA* 基因剔除胃幽門螺旋桿菌 HM-6 共同培養的組別中，細胞死亡情況嚴重(圖八(A))。顯示野生型胃幽門螺旋桿菌 HM-6 可以保護人類 B 細胞使其不會進行細胞凋亡。而在轉染野生型 CagA 以及磷酸化耐受性 CagA 到 B 細胞之後，利用 Etoposide 處理轉染後的 B 細胞，結果發現 B 細胞無論是轉染野生型 CagA 或者磷酸化耐受性 CagA 皆可增加 B 細胞的存活率，顯示 CagA 單獨存在於 B 細胞中即可保護 B 細胞使其不會進行細胞凋亡，且 B 細胞受到 CagA 的保護不

依賴於 CagA 的磷酸化(圖八(B))。

結果討論

1. 胃幽門螺旋桿菌可以直接將 CagA 送入 B 細胞

感染胃幽門螺旋桿菌跟胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃線癌、萎縮性胃炎以及其他胃部癌症有極高的相關性。在臨床治療觀察，發現利用抗生素將胃幽門螺旋桿菌清除，可以完全治癒胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤(Wotherspoon, et al., 1993)。而之前的文獻認為胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤的形成是藉由輔助型 T 細胞提供表面 CD40 活化 B 細胞，在不斷刺激之下進而使 B 細胞轉型成胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤(Du and Isaccson, 2002)。而 cagA 基因轉殖鼠除了會生成胃癌、胃腺癌以及白血球癌，某些小鼠也可以發現有 B 細胞淋巴瘤的生成，顯示胃幽門桿菌的毒力因子 CagA 具有使 B 細胞轉型成癌細胞的能力(Ohnishi et al., 2008)。而最新文獻發現胃幽門螺旋桿菌可直接將 CagA 送入 B 細胞中(Lin et al., 2010)，顯示胃幽門螺旋桿菌造成胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤可能是藉由直接注入 CagA 到 B 細胞中，進而有潛力使 B 細胞轉型成癌細胞，而此論證則不同於以往文獻認為胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤為間接所導致。

由於 CagA 可以藉由細菌的第四型分泌系統將其送入宿主細胞中(Odenbreit et al., 2000)，因此我們利用將胃幽門螺旋桿菌與人類 B 細胞共同培養的系統，發現胃幽門螺旋桿菌 HM-6 可以將 CagA 直接送入 B 細胞中，提供了另一種胃幽門螺旋桿菌造成胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤可能的機制。我們認為胃幽門螺旋桿菌可能透過 CagA 在 B 細胞內影響細胞內分子表現，使得 B 細胞有較高的機率轉型成為癌細胞。

2. 胃幽門螺旋桿菌透過 CagA 影響 B 細胞抗細胞凋亡分子

有文獻發現 CagA⁺ 的胃幽門螺旋桿菌可使胃上皮細胞維持較高量的

Bcl-2(Choi et al., 2003)，此外也有文獻發現低惡度性B細胞淋巴瘤都會表現一定量的Bcl-2 (Ashton-Key et al., 1995)，在胃幽門螺旋桿菌感染的病人檢體也發現有較高的Bcl-xL產生(Nardone et al., 2004; Yang et al., 2004)。而從我們的結果發現了在B細胞與野生型的胃幽門螺旋桿菌共同培養後，Bcl-2以及Bcl-xL表現量皆有上升，且利用轉染將WT-CagA表現於B細胞時發現CagA單獨存在於B細胞中即可誘導較高量的Bcl-2以及Bcl-xL，而將PR-CagA表現於B細胞時，也可觀察到Bcl-2以及Bcl-xL表現增加，顯示Bcl-2以及Bcl-xL的調控可能不需要CagA的磷酸化。而現今造成細胞轉型的因素中，其一為細胞逃脫細胞凋亡(Hanahan and Weinberg, 2000)，顯示胃幽門桿菌可以藉由誘導高量的Bcl-2以及Bcl-xL使細胞有機會轉型成癌細胞。由於*cagA*基因轉殖鼠發現除了會有胃癌、胃腺癌以及白血球增加以外，在一定比例的小鼠身上也可以觀察到有B細胞淋巴瘤產生，但若是將CagA磷酸化位置全部進行點突變使其無法進行磷酸化，則胃上皮細胞的不正常生長現象消失，且小鼠也不會發展成胃癌、胃腺癌以及B細胞淋巴瘤(Ohnishi et al., 2008)，顯示CagA的磷酸化對於癌細胞的形成是重要的。而從我們的結果發現WT-CagA以及PR-CagA皆可誘導Bcl-2以及Bcl-xL，不同於文獻所述CagA磷酸化對於癌細胞的形成的的重要性。因此我們推論CagA進入細胞中即具有功能，在早期可以提供B細胞一個生存的訊號，使B細胞不容易進行細胞凋亡，因而有機會轉型成癌細胞，而細胞中磷酸化的CagA可能在晚期造成B細胞不正常生長，因而導致B細胞淋巴瘤的形成。

3. SHP-2 在胃幽門螺旋桿菌透過 CagA 影響 Bcl-2、 Bcl-xL 以及 Bcl-6 表現扮演之角色

文獻發現 CagA 能影響 B 細胞的抗細胞凋亡分子表現(Lin et al., 2010)，也有文獻發現磷酸化的 CagA 在宿主上皮細胞內會與 SHP-2 結合(Higashi et al., 2002)，此外有文獻發現 SHP-2 獲得功能突變會造成骨髓細胞不正常增生(Araki

et al., 2004; Schubbert et al., 2005), 而 *cagA* 基因轉殖鼠內可發現到 CagA 與 SHP-2 結合, 因此推論 SHP-2 可能參與在 B 細胞轉型的機制中。而我們利用抑制劑或是 siRNA 抑制 SHP-2 表現在 B 細胞, 並且將 B 細胞與胃幽門螺旋桿菌共同培養 8 小時, 利用西方墨點法偵測 Bcl-2、Bcl-xL 以及 Bcl-6 表現。我們發現無論是否有抑制 SHP-2 表現, Bcl-2 以及 Bcl-xL 表現量在與野生型胃幽門螺旋桿菌 HM-6 共同培養後均有上升, 因此我們推論 CagA 並不是透過 SHP-2 途徑來調控 Bcl-xL 以及 Bcl-2。而 Bcl-6 表現量在加入 SHP-2 抑制劑之後, 原本被抑制的現象有隨著 SHP-2 抑制劑的劑量而受到影響, 但利用 siRNA 抑制 SHP-2 的表現量之後, 原本會受到抑制的 Bcl-6 表現量並不受到影響, 顯示 CagA 並不是透過 SHP-2 途徑來調控 Bcl-6。

4. 胃幽門螺旋桿菌 CagA 影響 B 細胞存活率

有文獻發現 CagA 轉染於 B 細胞中可以藉由活化 Erk1/2 造成 Bad 的磷酸化而分解, 使得 B 細胞在有 Hydroxyurea 的刺激下, 不會進行細胞凋亡(Zhu, Y. et al., 2007), 此外也有文獻發現野生型胃幽門螺旋桿菌與 B 細胞共同培養時可以保護 B 細胞在有 Etoposide 的刺激下, 不進行細胞凋亡(Lin et al., 2010), 因此我們除了利用野生型胃幽門螺旋桿菌 HM-6 與 B 細胞共同培養外, 同時也利用外源轉染 CagA 到 B 細胞之後, 給予 B 細胞 Etoposide 的刺激使其進行細胞凋亡。而結果顯示野生型胃幽門螺旋桿菌 HM-6 可以保護人類 B 細胞使其不會進行細胞凋亡, 且野生型 CagA 以及磷酸化耐受性 CagA, 皆可增加 B 細胞的存活率, 表示 CagA 單獨存在於 B 細胞時, 即可誘導 B 細胞內 Bcl-2 以及 Bcl-xL 的表現, 使 B 細胞因此受到保護, 具有轉型成癌細胞的潛力。

5. 結論

在此研究中, 我們發現 CagA 可以直接被送入 B 細胞, 而 CagA 進入 B 細胞

胞後，可以誘導 Bcl-2 與 Bcl-xL 表現，並且抑制 Bcl-6 表現，暗示著 CagA 可增加 B 細胞的存活率，使其形成淋巴瘤的機率大大上升，但 Bcl-2, Bcl-xL 以及 Bcl-6 的調控並不是透過 SHP-2 。而 B 細胞轉染 CagA 或與 CagA⁺的胃幽門螺旋桿菌共同培養後利用 etoposide 處理皆可以增加 B 細胞的存活率，暗示 CagA 單獨存在於細胞中即可造成宿主細胞有較高的機率造成轉型。



參考文獻

Ahmad, S., Banville, D., Zhao, Z., Fischer, E.H., and Shen, S.H. (1993). A widely expressed human protein-tyrosine phosphatase containing src homology 2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2197-2201.

Amieva, M.R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L.S., Nelson, W.J., and Falkow, S. (2003). Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 300, 1430-1434.

Ashton-Key, M., Biddolph, S.C., Stein, H., Gatter, K.C., and Mason, D.Y. (1995). Heterogeneity of bcl-2 expression in MALT lymphoma. *Histopathology* 26, 75-78.

Blaser, M.J. (1987). Gastric *Campylobacter*-like organisms, gastritis, and peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 93, 371-383.

Blaser, M.J. (2002). Polymorphic bacteria persisting in polymorphic hosts: assessing *Helicobacter pylori*-related risks for gastric cancer. *J Natl Cancer Inst* 94, 1662-1663.

Cattoretti, G., Chang, C.C., Cechova, K., Zhang, J., Ye, B.H., Falini, B., Louie, D.C., Offit, K., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (1995). BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 86, 45-53.

Chang, Y.J., Wu, M.S., Lin, J.T., Pestell, R.G., Blaser, M.J., and Chen, C.C. (2006).

Mechanisms for *Helicobacter pylori* CagA-induced cyclin D1 expression that affect cell cycle. *Cell Microbiol* 8, 1740-1752.

Choi, I.J., Kim, J.S., Kim, J.M., Jung, H.C., and Song, I.S. (2003). Effect of inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 pathway on apoptosis and bcl-2 expression in *Helicobacter pylori*-infected AGS cells. *Infect Immun* 71, 830-837.

Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., *et al.* (1993). Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5791-5795.

Cover, T.L., Dooley, C.P., and Blaser, M.J. (1990). Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun* 58, 603-610.

Crabtree, J.E., Taylor, J.D., Wyatt, J.I., Heatley, R.V., Shallcross, T.M., Tompkins, D.S., and Rathbone, B.J. (1991). Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet* 338, 332-335.

Crowe, S.E. (2005). *Helicobacter* infection, chronic inflammation, and the development of malignancy. *Curr Opin Gastroenterol* 21, 32-38.

Dent, A.L., Shaffer, A.L., Yu, X., Allman, D., and Staudt, L.M. (1997). Control of

inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 276, 589-592.

Du, M.Q., and Isaccson, P.G. (2002). Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment. *Lancet Oncol* 3, 97-104.

Feng, G.S., Hui, C.C., and Pawson, T. (1993). SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science* 259, 1607-1611.

Frearson, J.A., and Alexander, D.R. (1998). The phosphotyrosine phosphatase SHP-2 participates in a multimeric signaling complex and regulates T cell receptor (TCR) coupling to the Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in Jurkat T cells. *J Exp Med* 187, 1417-1426.

Freeman, R.M., Jr., Plutzky, J., and Neel, B.G. (1992). Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of *Drosophila* corkscrew. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11239-11243.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Higashi, H., Tsutsumi, R., Fujita, A., Yamazaki, S., Asaka, M., Azuma, T., and Hatakeyama, M. (2002a). Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14428-14433.

Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., and

Hatakeyama, M. (2002b). SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 295, 683-686.

Higashi, H., Yokoyama, K., Fujii, Y., Ren, S., Yuasa, H., Saadat, I., Murata-Kamiya, N., Azuma, T., and Hatakeyama, M. (2005). EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol Chem* 280, 23130-23137.

Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., and Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334-336.

Hof, P., Pluskey, S., Dhe-Paganon, S., Eck, M.J., and Shoelson, S.E. (1998). Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell* 92, 441-450.

Holgado-Madruga, M., Emlet, D.R., Moscatello, D.K., Godwin, A.K., and Wong, A.J. (1996). A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* 379, 560-564.

Inagaki, K., Noguchi, T., Matozaki, T., Horikawa, T., Fukunaga, K., Tsuda, M., Ichihashi, M., and Kasuga, M. (2000). Roles for the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in cytoskeletal organization, cell adhesion and cell migration revealed by overexpression of a dominant negative mutant. *Oncogene* 19, 75-84.

Isaacson, P.G., Wotherspoon, A.C., Diss, T.C., and Pan, L.X. (1991). Bcl-2 expression in lymphomas. *Lancet* 337, 175-176.

Kazlauskas, A., Feng, G.S., Pawson, T., and Valius, M. (1993). The 64-kDa protein that associates with the platelet-derived growth factor receptor beta subunit via Tyr-1009 is the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 6939-6943.

Kusters, J.G., van Vliet, A.H., and Kuipers, E.J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* *19*, 449-490.

Lin, W.C., Tsai, H.F., Kuo, S.H., Wu, M.S., Lin, C.W., Hsu, P.I., Cheng, A.L., and Hsu, P.N. (2010). Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Human B lymphocytes, the origin of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer Res* *70*, 5740-5748.

Manes, S., Mira, E., Gomez-Mouton, C., Zhao, Z.J., Lacalle, R.A., and Martinez, A.C. (1999). Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility. *Mol Cell Biol* *19*, 3125-3135.

Maroun, C.R., Naujokas, M.A., Holgado-Madruga, M., Wong, A.J., and Park, M. (2000). The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* *20*, 8513-8525.

Marshall, B.J., and Warren, J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* *1*, 1311-1315.

Mimuro, H., Suzuki, T., Tanaka, J., Asahi, M., Haas, R., and Sasakawa, C. (2002). Grb2 is a key mediator of helicobacter pylori CagA protein activities. *Mol Cell* 10, 745-755.

Moriyama, M., Yamochi, T., Semba, K., Akiyama, T., and Mori, S. (1997). BCL-6 is phosphorylated at multiple sites in its serine- and proline-clustered region by mitogen-activated protein kinase (MAPK) in vivo. *Oncogene* 14, 2465-2474.

Naito, M., Yamazaki, T., Tsutsumi, R., Higashi, H., Onoe, K., Yamazaki, S., Azuma, T., and Hatakeyama, M. (2006). Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology* 130, 1181-1190.

Nardone, G., Rocco, A., Vaira, D., Staibano, S., Budillon, A., Tatangelo, F., Sciulli, M.G., Perna, F., Salvatore, G., Di Benedetto, M., *et al.* (2004). Expression of COX-2, mPGE-synthase1, MDR-1 (P-gp), and Bcl-xL: a molecular pathway of *H pylori*-related gastric carcinogenesis. *J Pathol* 202, 305-312.

Nunez, G., Seto, M., Seremetis, S., Ferrero, D., Grignani, F., Korsmeyer, S.J., and Dalla-Favera, R. (1989). Growth- and tumor-promoting effects of deregulated BCL2 in human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4589-4593.

Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., and Haas, R. (2000). Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287, 1497-1500.

Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., *et al.* (2008). Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 1003-1008.

Pluskey, S., Wandless, T.J., Walsh, C.T., and Shoelson, S.E. (1995). Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains. *J Biol Chem* *270*, 2897-2900.

Qu, C.K., Yu, W.M., Azzarelli, B., and Feng, G.S. (1999). Genetic evidence that Shp-2 tyrosine phosphatase is a signal enhancer of the epidermal growth factor receptor in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 8528-8533.

Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Saito, Y., Lu, H., Ohnishi, N., Azuma, T., Suzuki, A., *et al.* (2007). *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* *447*, 330-333.

Schubbert, S., Lieuw, K., Rowe, S.L., Lee, C.M., Li, X., Loh, M.L., Clapp, D.W., and Shannon, K.M. (2005). Functional analysis of leukemia-associated PTPN11 mutations in primary hematopoietic cells. *Blood* *106*, 311-317.

Selbach, M., Moese, S., Hauck, C.R., Meyer, T.F., and Backert, S. (2002). Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem* *277*, 6775-6778.

Shaffer, A.L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E.P., and Staudt, L.M. (2000).

BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* *13*, 199-212.

Shen, Y., Iqbal, J., Huang, J.Z., Zhou, G., and Chan, W.C. (2004). BCL2 protein expression parallels its mRNA level in normal and malignant B cells. *Blood* *104*, 2936-2939.

Sheu, B.S., Yang, H.B., Wu, J.J., Huang, A.H., Lin, X.Z., and Su, I.J. (1999). Development of *Helicobacter pylori* infection model in BALB/c mice with domestic cagA-positive and -negative strains in Taiwan. *Dig Dis Sci* *44*, 868-875.

Shimizu, S., Eguchi, Y., Kosaka, H., Kamiike, W., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1995). Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature* *374*, 811-813.

Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W.J., and Covacci, A. (2002). c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* *43*, 971-980.

Tammer, I., Brandt, S., Hartig, R., Konig, W., and Backert, S. (2007). Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology* *132*, 1309-1319.

Tang, T.T., Dowbenko, D., Jackson, A., Toney, L., Lewin, D.A., Dent, A.L., and Lasky, L.A. (2002). The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor. *J Biol Chem* *277*, 14255-14265.

Tartaglia, M., and Gelb, B.D. (2005). Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 45-68.

Tartaglia, M., Mehler, E.L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H.G., Kremer, H., van der Burgt, I., Crosby, A.H., Ion, A., Jeffery, S., *et al.* (2001). Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 29, 465-468.

Tummuru, M.K., Cover, T.L., and Blaser, M.J. (1993). Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 61, 1799-1809.

Umehara, S., Higashi, H., Ohnishi, N., Asaka, M., and Hatakeyama, M. (2003). Effects of *Helicobacter pylori* CagA protein on the growth and survival of B lymphocytes, the origin of MALT lymphoma. *Oncogene* 22, 8337-8342.

Vogel, W., Lammers, R., Huang, J., and Ullrich, A. (1993). Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science* 259, 1611-1614.

Wang, X., Willen, R., Andersson, C., and Wadstrom, T. (2000). Development of high-grade lymphoma in *Helicobacter pylori*-infected C57BL/6 mice. *APMIS* 108, 503-508.

Wotherspoon, A.C., Doglioni, C., Diss, T.C., Pan, L., Moschini, A., de Boni, M., and Isaacson, P.G. (1993). Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of

mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*.
Lancet 342, 575-577.

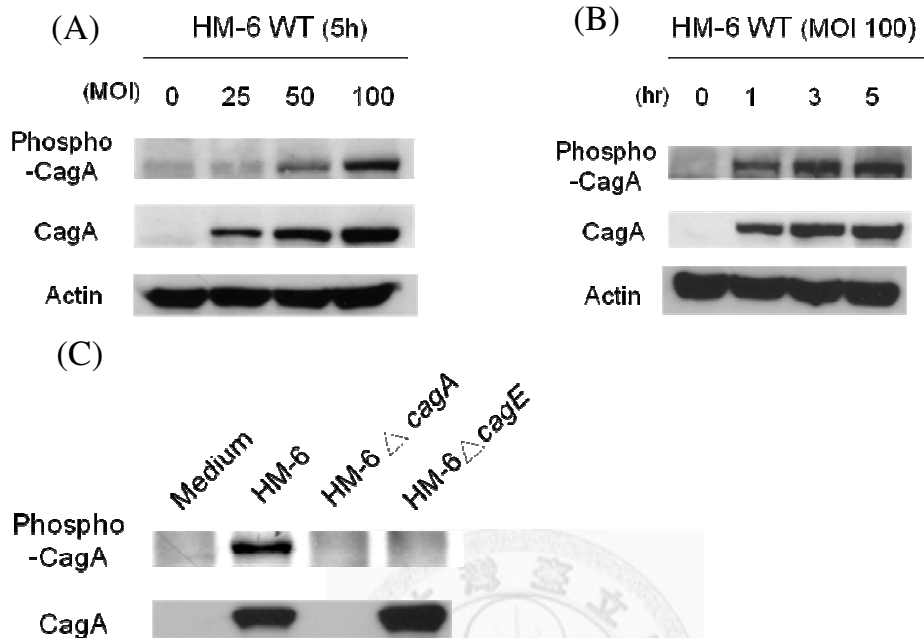
Yang, G.F., Deng, C.S., Xiong, Y.Y., Gong, L.L., Wang, B.C., and Luo, J. (2004).
Expression of nuclear factor-kappa B and target genes in gastric precancerous
lesions and adenocarcinoma: association with *Helicobacter pylori* cagA (+) infection.
World J Gastroenterol 10, 491-496.

Ye, B.H., Lista, F., Lo Coco, F., Knowles, D.M., Offit, K., Chaganti, R.S., and
Dalla-Favera, R. (1993). Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in
diffuse large-cell lymphoma. *Science* 262, 747-750.

Zhu, Y., Wang, C., Huang, J., Ge, Z., Dong, Q., Zhong, X., Su, Y., and Zheng, S.
(2007). The *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes Erk1/2-mediated
Bad phosphorylation in lymphocytes: a mechanism of CagA-inhibited lymphocyte
apoptosis. *Cell Microbiol* 9, 952-961.

圖表說明

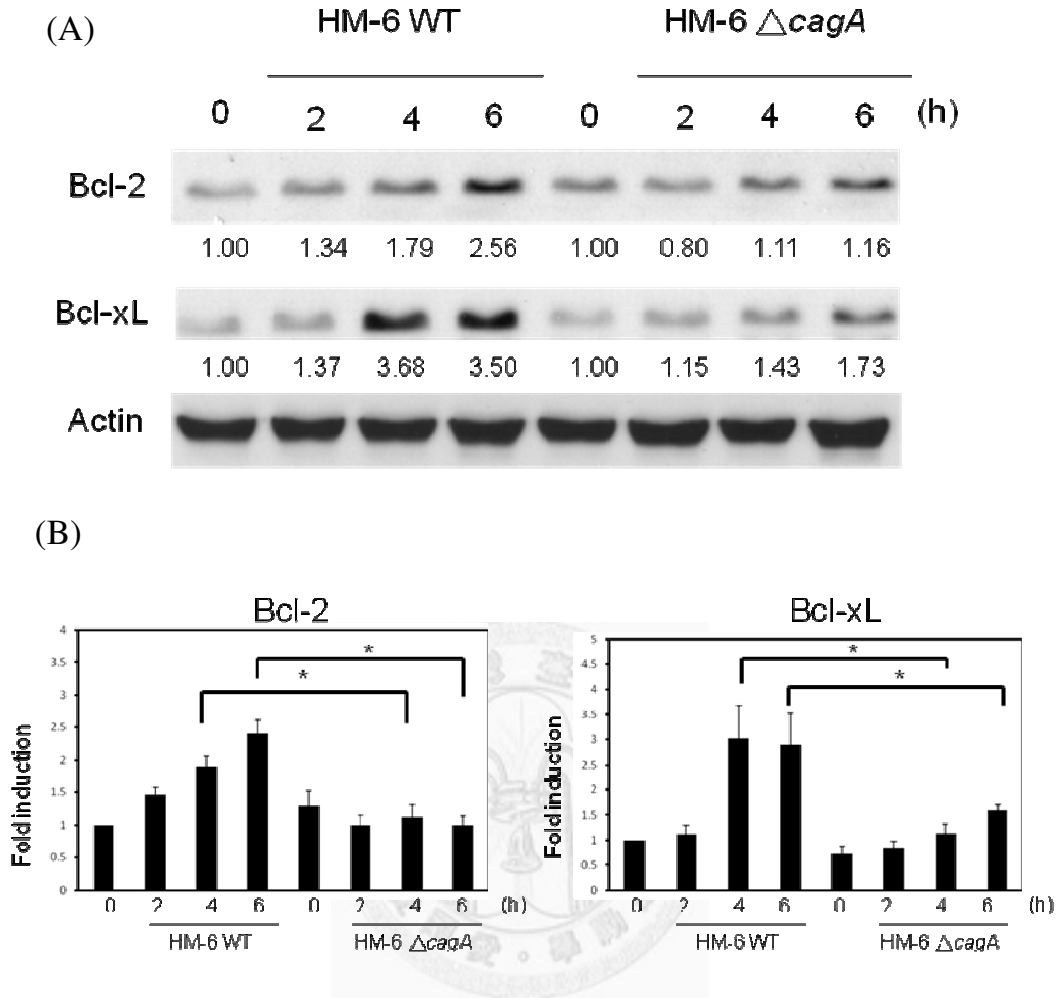
圖一



圖一、胃幽門螺旋桿菌可以將 CagA 送入 B 細胞。

(A) 將 2×10^6 個 BJAB 細胞分別加入 MOI=25, 50, 100 的胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤菌株(HM-6)進行共同培養(於 10 %胎牛血清 RPMI 培養液中), 5 小時後收集細胞萃取液跑 SDS 膠體電泳, 之後將膠體轉漬於 PVDF 膜上。利用 phospho-tyrosine 抗體(PY99)偵測磷酸化 CagA(p-CagA)以及 CagA 抗體偵測 CagA 的表現。(B) 將 2×10^6 個 BJAB 細胞與胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤菌株(HM-6)共同培養 1、3 及 5 小時, 收集細胞萃取液跑 SDS 膠體電泳, 之後將膠體轉漬於 PVDF 膜上。利用 phospho-tyrosine 抗體(PY99)偵測磷酸化 CagA(p-CagA)以及 CagA 抗體偵測 CagA 的表現。(C)將 2×10^6 個 BJAB 細胞與胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤菌株(HM-6 WT, Δ cagA, Δ cagE)共同培養 5 小時, 收集細胞萃取液跑 SDS 膠體電泳, 之後將膠體轉漬於 PVDF 膜上, 利用 phospho-tyrosine 抗體(PY99)偵測磷酸化 CagA(p-CagA)以及 CagA 抗體偵測 CagA 的表現。

圖二

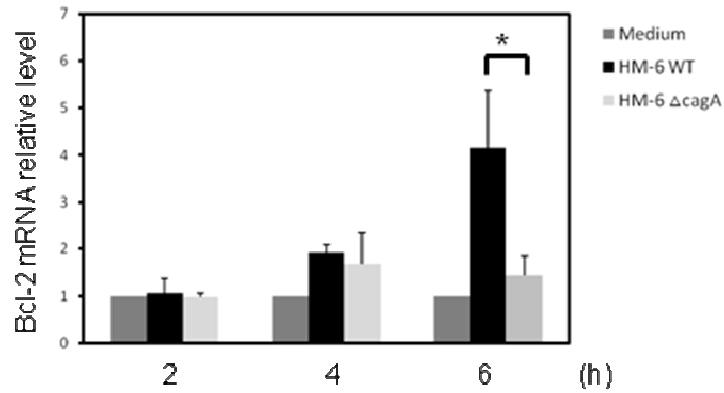


圖二、胃幽門螺旋桿菌 *CagA* 可引起 B 細胞表現較高量的 Bcl-2 及 Bcl-xL。

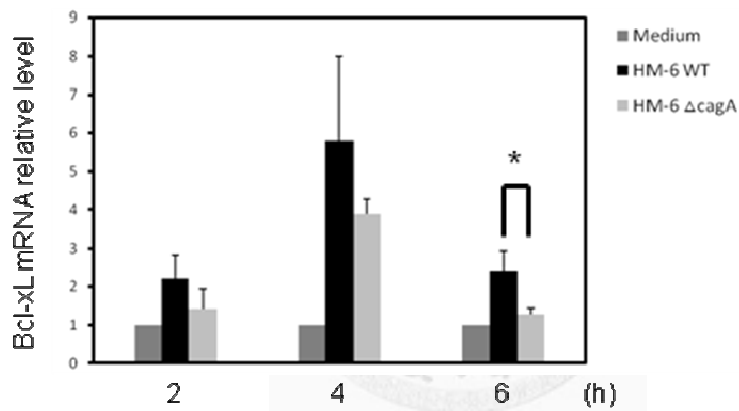
(A) 2×10^6 個 BJAB 細胞分別與胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤菌株(HM-6)、*cagA* 基因剔除菌株於 MOI=100 的情況下共同培養 2, 4, 6 小時，收集細胞萃取液跑 SDS 膠體電泳，之後將膠體轉漬於 PVDF 膜上。利用 anti- Bcl-xL 抗體偵測 Bcl-xL 表現、anti- Bcl-2 抗體偵測 Bcl-2 的表現。利用 ImageJ 量化 Bcl-2 及 Bcl-xL 的表現。(B) 2×10^6 個 BJAB 細胞分別與胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤菌株(HM-6)、*cagA* 基因剔除菌株於 MOI=100 的情況下共同培養 2, 4, 6 小時，利用 anti- Bcl-xL 抗體偵測 Bcl-xL 表現、anti- Bcl-2 抗體偵測 Bcl-2 的表現。實驗進行三重複，Bcl-2 及 Bcl-xL 表現量結果以長條圖表示。*, $P < 0.05$

圖三

(A)



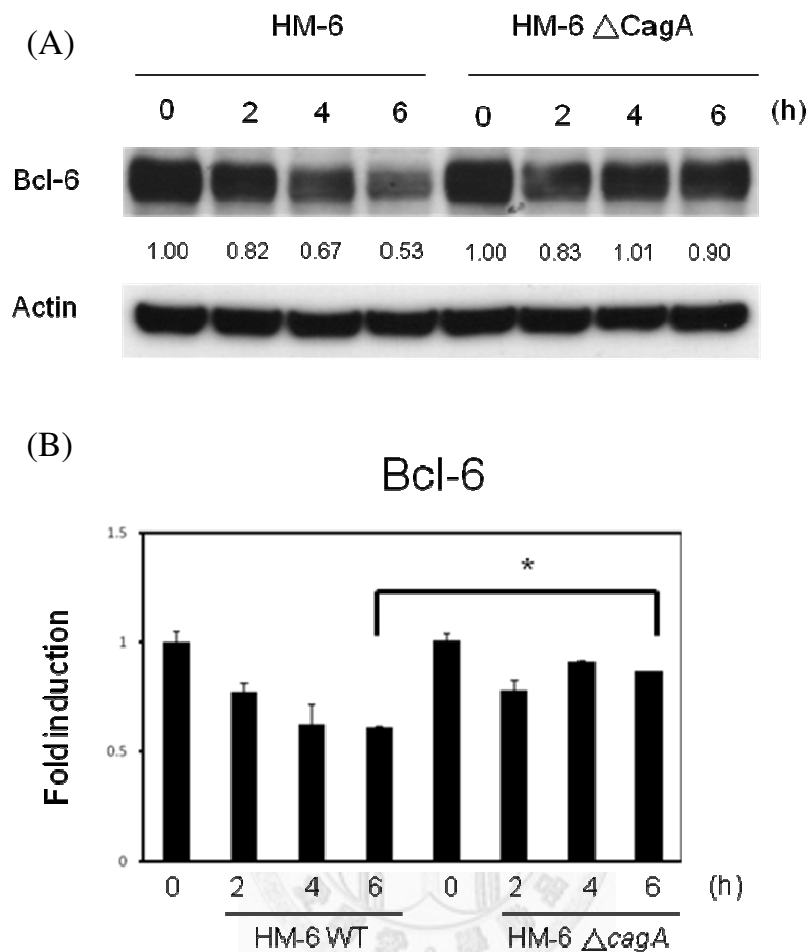
(B)



圖三、胃幽門螺旋桿菌 CagA 引起 B 細胞的 Bcl-2 及 Bcl-xL mRNA 表現增加。

(A)、(B) 2×10^6 個 BJAB 細胞分別與胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤菌株 (HM-6)、*cagA* 基因剔除菌株於 MOI=100 的情況下共同培養 2, 4, 6 小時，利用 Trizol 萃取細胞 total RNA 及轉成 cDNA，利用 Real-time PCR 分別分析細胞內 Bcl-2 及 Bcl-xL 相對含量。*, $P < 0.05$

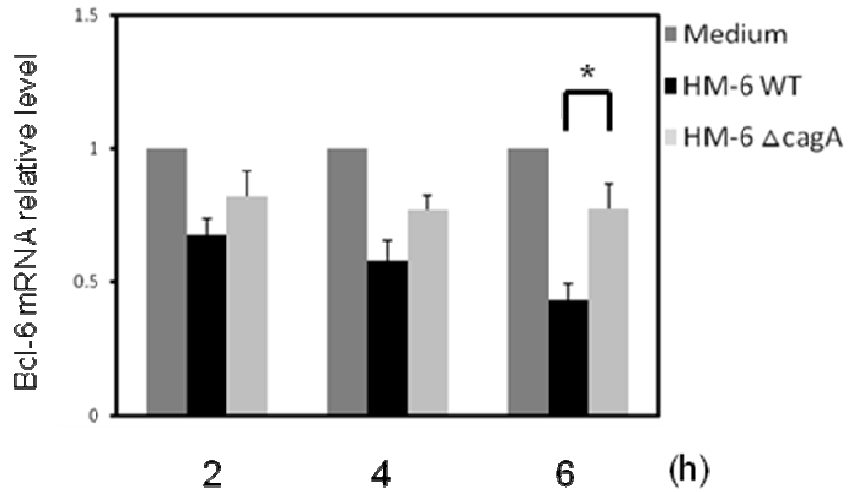
圖四



圖四、胃幽門螺旋桿菌 CagA 可抑制 B 細胞 Bcl-6 的表現。

(A) 2×10^6 個 BJAB 細胞分別與胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤菌株(HM-6)、*cagA* 基因剔除菌株於 MOI=100 的情況下共同培養 2, 4, 6 小時, 收集細胞萃取液跑 SDS 膠體電泳, 之後將膠體轉漬於 PVDF 膜上。利用 anti- Bcl-6 抗體偵測 Bcl-6 表現。利用 ImageJ 量化 Bcl-6 的表現。(B) 2×10^6 個 BJAB 細胞分別與胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤菌株(HM-6)、*cagA* 基因剔除菌株於 MOI=100 的情況下共同培養 2, 4, 6 小時, 實驗進行三重複, Bcl-6 表現量結果以長條圖表示。*, $P < 0.05$

圖五

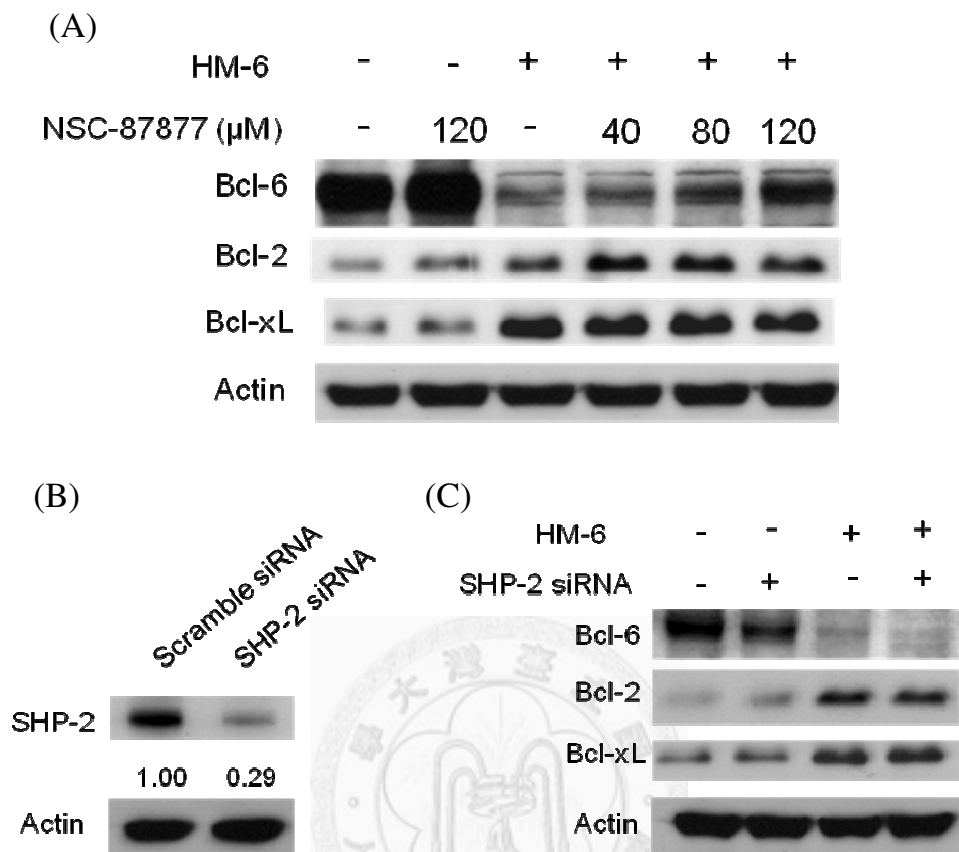


圖五、胃幽門螺旋桿菌 CagA 可抑制 B 細胞 Bcl-6 mRNA 的表現。

2×10^6 個 BJAB 細胞分別與胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤菌株(HM-6)、*cagA* 基因剔除菌株於 MOI=100 的情況下共同培養 2, 4, 6 小時，利用 Trizol 萃取細胞 total RNA 及轉成 cDNA，利用 Real-time PCR 分析細胞內 Bcl-6 相對含量。

*, P<0.05

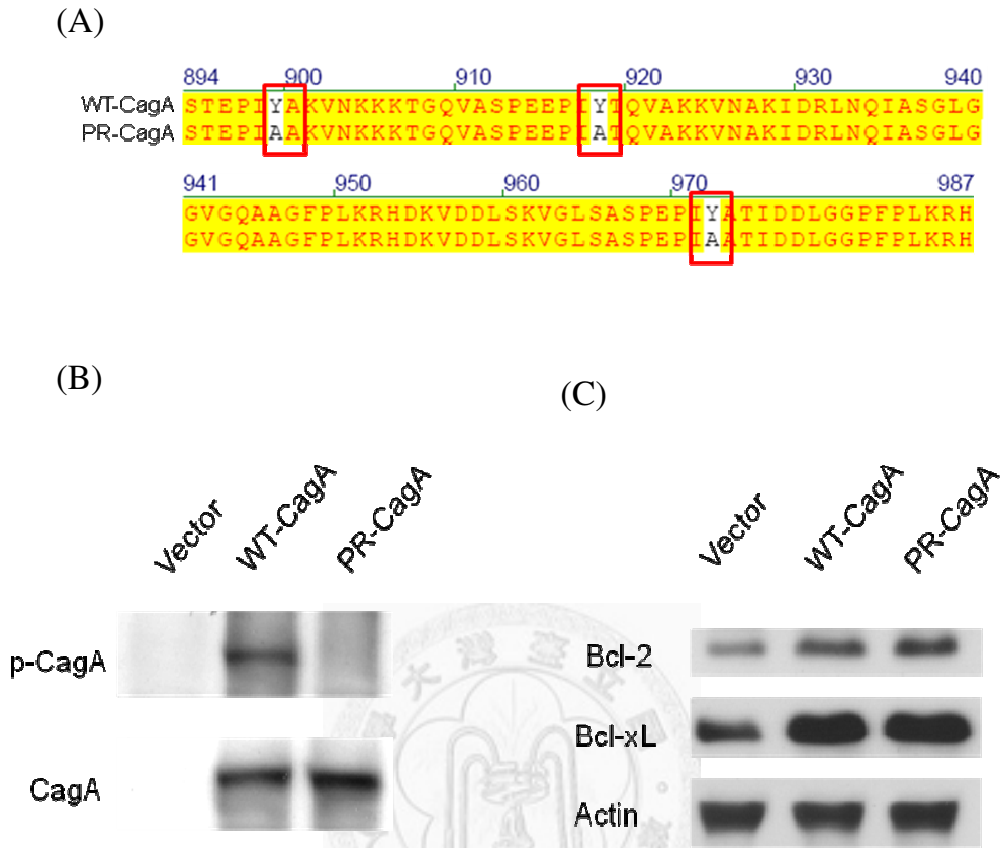
圖六



圖六、SHP-2 在胃幽門螺旋桿菌 CagA 調控 Bcl-2, Bcl-xL 以及 Bcl-6 的角色。

(A) B 細胞預先以 SHP-2 (NSC-87877) 抑制劑處理 1 小時之後，與胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤菌株(HM-6)共同培養 8 小時，收集細胞萃取液跑 SDS 膠體電泳，之後將膠體轉漬於 PVDF 膜上。利用 anti-Bcl-6 抗體偵測 Bcl-6 表現、anti-Bcl-2 抗體偵測 Bcl-2 表現以及 anti-Bcl-xL 抗體偵測 Bcl-xL 表現。(B) 利用電穿孔將 siRNA 送入 4×10^6 個 BJAB 細胞。一天後收集細胞萃取液跑 SDS 膠體電泳，之後將膠體轉漬於 PVDF 膜上，利用 anti-SHP-2 抗體偵測 SHP-2 表現。(C) 利用電穿孔將 siRNA 送入 4×10^6 個 BJAB 細胞。一天後將胃幽門螺旋桿菌與 BJAB 細胞共同培養 8 小時，收集細胞萃取液跑 SDS 膠體電泳，之後將膠體轉漬於 PVDF 膜上。利用 anti-Bcl-6 抗體偵測 Bcl-6 表現、anti-Bcl-2 抗體偵測 Bcl-2 表現以及 anti-Bcl-xL 抗體偵測 Bcl-xL 表現。

圖七

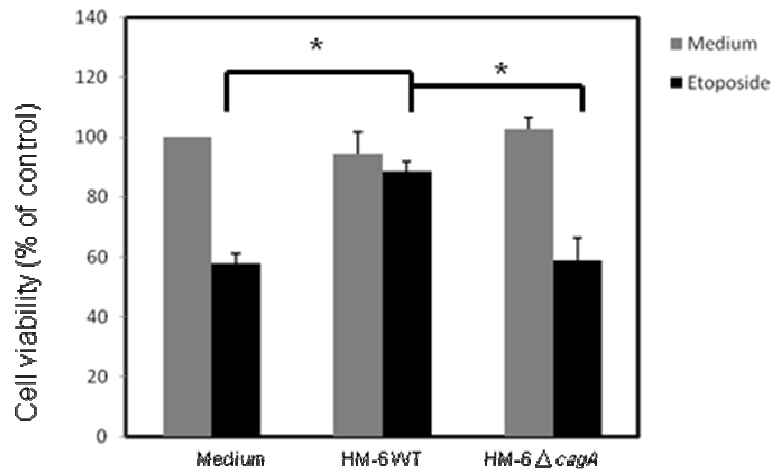


圖七、CagA 轉染於 B 細胞增高 Bcl-2 及 Bcl-xL 的表現。

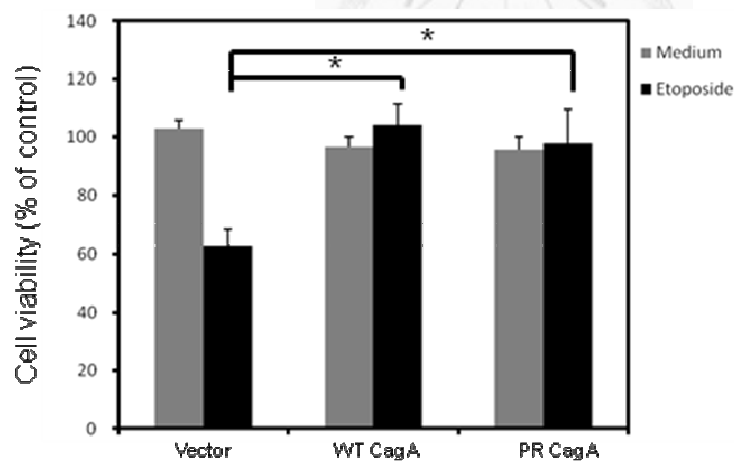
(A)野生型的 CagA 具有 3 個磷酸化位置，分別為第 899 個 Tyr、第 918 個 Tyr 以及第 972 個 Tyr，phosphorylation-resistant CagA(PR-EGFP-CagA)為將野生型 EGFP-CagA 利用 site-directed mutagenesis 將 3 個 Tyr 置換成 Ala，使得 CagA 無法被磷酸化。(B) 利用電穿孔 (electroporation)將 WT-EGFP-CagA 以及 PR-EGFP-CagA 過度表現在 L428 細胞中，在 24 小時收集細胞萃取液跑 SDS 膠體電泳，使用 Western transfer 至 PVDF 膜上，利用 phospho-tyrosine 抗體(PY99)偵測磷酸化 CagA(p-CagA)以及 CagA 抗體偵測 CagA 的表現。(C) 利用電穿孔 (electroporation)將 WT-EGFP-CagA 以及 PR-EGFP-CagA 過度表現在 L428 細胞中，在 24 小時收集細胞萃取液跑 SDS 膠體電泳，使用 Western transfer 至 PVDF 膜上，利用 anti-Bcl-2 抗體偵測 Bcl-2 表現以及 anti-Bcl-xL 抗體偵測 Bcl-xL 表現。

圖八

(A)



(B)



圖八、胃幽門螺旋桿菌 CagA 可減少 B 細胞對於 Etoposide 所引起之細胞凋亡。

(A)將 2×10^4 個 BJAB 細胞與胃黏膜相關淋巴組織淋巴瘤菌株(HM-6)、*cagA* 基因剔除菌株於 MOI=100 的情況下共同培養 12 小時，之後以 250 μ M 的 Etoposide 處理 12 小時，利用 MTT assay 偵測細胞死亡情形。(B) 利用電穿孔(electroporation) 將 WT-EGFP-CagA 以及 PR-EGFP-CagA 過度表現在 L428 細胞中，在 24 小時後收集細胞，以 100 μ M 的 Etoposide 處理 16 小時，利用 MTT assay 偵測細胞死亡情形。*, P<0.05