

109-112

# 幽门螺杆菌对人和大鼠胃上皮细胞 细胞外信号调节激酶活性的影响

R573.02

陈永昌<sup>1</sup>, 张建中<sup>2</sup>, 李 铁<sup>1</sup>, 盛 涛<sup>2</sup>, 朱文玉<sup>1</sup>

(1. 北京医科大学生理学系, 北京 100083; 2. 中国预防医学科学院流行病学研究所)

[关键词] 螺杆菌, 幽门; 蛋白激酶类/代谢; 上皮细胞; 胃酶学; 信号调节激酶

[摘要] **目的:** 研究幽门螺杆菌提取物对人胃上皮细胞株 BGC-823 和大鼠胃上皮细胞株 RGM1 的细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 活性的影响。 **方法:** 采用蛋白质免疫印迹法测定 ERK 酶蛋白含量和活性。 **结果:** 在各观察时间点, 两种细胞 ERK 酶蛋白含量无明显差异。在无血清存在情况下, 幽门螺杆菌提取物使 BGC-823 细胞 ERK 活性持续增加而对 RGM1 细胞 ERK 活性几乎没有影响; 在有血清存在情况下, Hp 提取物使 BGC-823 细胞 ERK 活性持续增加而使 RGM1 细胞 ERK 活性一过性增加。 **结论:** 幽门螺杆菌提取物对胃上皮细胞株 BGC-823 和 RGM1 的 ERK 活性的影响不同。

[中图分类号] R573.3 [文献标识码] A [文章编号] 1000-1530(2000)02-0109-04

## The effect of *Helicobacter pylori* on the activity of extracellular signal regulated kinase in human and rat gastric epithelial cells

CHEN Yong-Chang<sup>1</sup>, ZHANG Jian-Zhong<sup>2</sup>, LI Tie<sup>1</sup>, SHENG Tao<sup>2</sup>, ZHU Wen-Yu<sup>1</sup>

(1. Department of Physiology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China;

2. Institute of Epidemiology Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine)

**KEY WORDS** *Helicobacter pylori*; Protein kinases/metab; Epithelial cells; Stomach/enzymol; Signal-regulated kinase

**ABSTRACT Objective:** To study the effects of the extract of *Helicobacter pylori* (Hp) on the activities of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in human gastric epithelial cell line BGC-823 and rat gastric epithelial cell line RGM1. **Methods:** Western blotting was applied to detect the existence and activity of ERK. **Results:** On all observing time points, the protein content of ERK was not different in BGC-823 and RGM1 cells. With the absence of serum, Hp extract increased the activity of ERK continuously in BGC-823 cells whereas it had nearly no effect on ERK activity in RGM1 cells. With the presence of serum, Hp extract increased the activity of ERK in a sustained way in BGC-823 cells whereas it caused a transient increase of ERK activity in RGM1 cells. **Conclusion:** The effects of Hp extract on ERK activities in BGC-823 and RGM1 cells were different.

(J Beijing Med Univ, 2000, 32:109-112)

近来研究表明幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 对胃上皮细胞的增殖有促进作用<sup>[1~3]</sup>。然而, Hp 引起胃上皮细胞增殖的机制尚不清楚。由丝裂素活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 介导的信号转导通路在细胞外信号传导至细胞核内, 调节细胞生物学活性的过程中具有重要作用。细胞外信号调节激酶 (extracellular

signal-regulated kinase, ERK) 是 MAPK 系统的重要成员, 通过 ERK 的信号转导通路是细胞增殖和分化调控的基本信号传导通路<sup>[4]</sup>。Hp 促进细胞增殖是否与 ERK 信号转导通路有关, 尚未见报道。本实验的目的是研究 Hp 菌体提取物对胃上皮细胞 ERK 活性的影响, 分析其对细胞增殖产生作用的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

大鼠胃上皮细胞株 RGMI 系美国 Texas 大学医学院郭燕世教授馈赠,人胃上皮细胞株 BGC-823 从北京肿瘤防治所引进。RGMI 细胞选用 DMEM/F-12 培养基, BGC-823 细胞选用 RPMI-1640 培养基,两者均添加 10% (体积分数) 小牛血清。培养在 37℃、5% (体积分数) CO<sub>2</sub> 孵箱中进行。

### 1.2 Hp 培养及菌体提取物的制备

将 Cag A(+) 和 Vac A(+) 的国际标准 Hp 菌株 NCTC11637 接种于含有 10% (体积分数) 小牛血清的布氏肉汤培养液,在微氧环境中于 37℃ 震荡水浴培养 24 h,至细菌密度达到约  $2 \times 10^8 \sim 4 \times 10^8$  ml<sup>-1</sup>。菌体经离心沉淀,按序用 PBS 和细胞培养液漂洗,再悬于细胞培养液中。菌体悬液经超声(100 W, 15 s × 6, 间隔 30 s, 冰浴冷却)作用后,离心取上清,置 -20℃ 待用。

### 1.3 蛋白样品制备

细胞在培养瓶中培养 24 h 后,更换含有 10% (体积分数) 小牛血清的培养液并加 5% (体积分数) Hp 提取物;或更换不含血清的培养液,孵育 4 h (血清饥饿)后再加 5% (体积分数) Hp 提取物。细胞继续培养至不同时间点后停止培养,提取蛋白,置 -20℃ 待测。

### 1.4 电泳和电转移

蛋白样品以每泳道 50 μg 量上样,先经过 50 g·L<sup>-1</sup> 聚丙烯酰胺积层胶 80 V, 1 h 积层,再经 100 g·L<sup>-1</sup> 聚丙烯酰胺分离胶 150 V, 3 h 分离蛋白质分子,然后经 0.2 A, 4℃ 过夜转移至硝酸纤维素膜上。

### 1.5 蛋白质免疫印迹分析(Western blotting)

为检测 ERK 活性,先将硝酸纤维素膜在含有 50 g·L<sup>-1</sup> 脱脂奶粉的 TBS-T [20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris, 137 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.1% (体积分数) Tween-20, pH 7.6] 中于室温孵育 1 h 以阻断非特异性结合。一抗为单克隆抗活性型 ERK (anti active-ERK, Sigma), 体积比 1:10 000 稀释,室温孵育 1 h。二抗为辣根酶连接的山羊抗鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories 提供), 按照体积比 1:10 000 稀释,室温孵育 50 min。每步孵育后均用 TBS-T 漂洗 3 次。最后,用 ECL (Amasham) 发光显示剂显示阳性条带,用 X 光胶片记录结果。

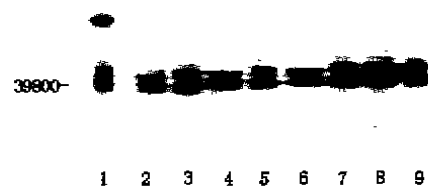
为检测 ERK 酶含量,同一硝酸纤维素膜在脱结合缓冲液 (100 mmol·L<sup>-1</sup> mercaptoethanol, 200

g·L<sup>-1</sup> SDS, 62.5 mmol·L<sup>-1</sup> Tris, pH 6.7), 中于 50℃ 孵育 30 min, 脱去结合的抗体。再杂交所用的一抗和二抗分别为兔多克隆抗 ERK2 (Santa Cruz Biotechnology) 和辣根酶连接的山羊抗兔 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories 提供), 前者的稀释度 (体积比) 为 1:1 000, 后者的稀释度 (体积比) 为 1:10 000。操作步骤与上述相同。

## 2 结果

### 2.1 BGC-823 和 RGMI 细胞 ERK 酶蛋白含量的比较

由于所用的抗 ERK2 抗体与 ERK1 和 ERK2 均能反应,所以显示的阳性条带为两条。根据分子量标准判断,两条带的相对分子质量与 ERK1 和 ERK2 的相对分子质量相符。在培养的各时间点,两种细胞的 ERK 酶蛋白含量均无明显差异 (图 1)。



Lane 1, protein molecular marker; Lane 2, 4, 6 and 8, BGC-823 cells cultured in RPMI-1640 containing 10% (volume fraction) calf serum for 20 min, 1 h, 6 h and 24 h respectively; Lane 3, 5, 7 and 9, RGMI cells cultured in DMEM/F-12 containing 10% (volume fraction) calf serum for 20 min, 60 min, 6 h and 24 h respectively.

图 1 BGC-823 细胞和 RGMI 细胞 ERK 蛋白含量  
Figure 1 The protein content of ERK in BGC-823 and RGMI cells

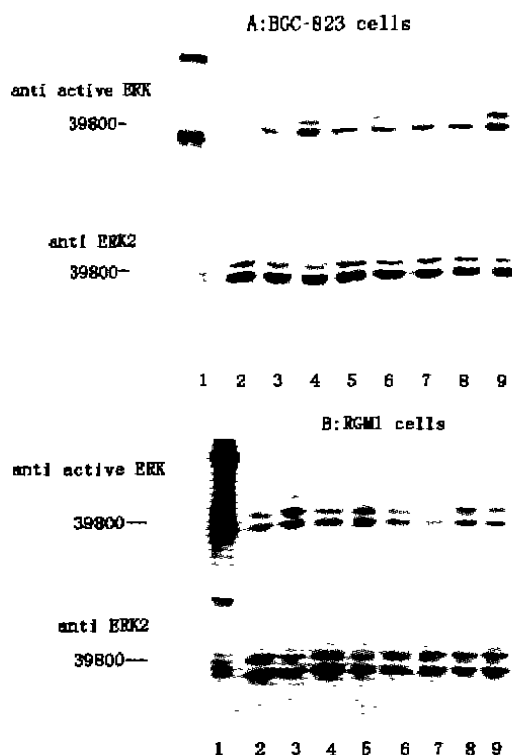
### 2.2 有血清存在情况下 Hp 提取物对细胞 ERK 活性的影响

在 BGC-823 细胞,对照组细胞 ERK 有活性,但比较低。Hp 提取物作用后 20 min 即可见 ERK 活性明显升高,并一直持续至培养结束。在 RGMI 细胞, Hp 提取物作用前亦可见 ERK 有低水平的活性。Hp 提取物作用 20 min 后 ERK 活性有一短暂的升高,1 h 后与对照组相比已无明显差异。两种细胞的 ERK 酶蛋白含量在各时间点均无明显差异 (图 2)。

### 2.3 无血清存在情况下 Hp 提取物对细胞 ERK 活性的影响

在 BGC-823 细胞,经血清饥饿 4 h 后, ERK 活性极低; Hp 提取物作用后 20 min, ERK 活性大大升高,持续 6 h 后有一相对降低,然后在稍低水平上持续至培养结束。在 RGMI 细胞, Hp 提取物作用

后,ERK 活性只在 1 h 时有所升高,其余各时间点均未见有明显升高。两种细胞的 ERK 酶蛋白含量在各时间点均无明显差异(图 3)。



A. BGC-823 cells; B. RGM1 cells. Lane 1, protein molecular marker; Lane 2, control; Lane 3, through 9, incubation with 5% (v/v) *H. pylori* extract for different times; Lane 3, 20 min; Lane 4, 40 min; Lane 5, 60 min; Lane 6, 3 h; Lane 7, 6 h; Lane 8, 12 h; Lane 9, 24 h. The blot was representative of 2-3 similar experiments.

图 2 有血清情况下 Hp 提取物作用后细胞 ERK 活性的变化

Figure 2 The change of ERK activity in serum-fed cells after treatment with Hp extract

### 3 讨论

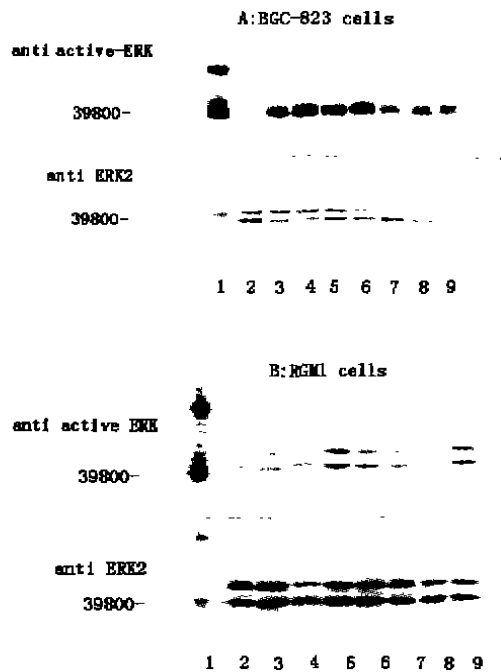
调节蛋白质磷酸化的蛋白激酶在细胞生物学活性的调控中具有重要作用。MAPK 作为最重要的蛋白激酶之一,是细胞增生的胞内关键酶。目前已发现 3 条与 MAPK 有关的信号传导通路,其中以 ERK 介导的通路最为清楚。生长因子、激素和神经递质等的信号传递过程都与 ERK 有关<sup>[4]</sup>。ERK 有两种分子形式,相对分子质量分别为 44 000 和 42 000,分别称为 ERK1 和 ERK2。ERK 肽链的 183 位苏氨酸和 185 位酪氨酸均发生磷酸化为该激酶活性所必需。抗活性型 ERK 抗体能够特异地识别在 183 位苏氨酸和 185 位酪氨酸发生双磷酸化的 ERK,可用于检测 ERK 的活性。在同一张杂交膜上先后分别检测 ERK 双位磷酸化和酶蛋白含量,

是有效的检测 ERK 活性的方法<sup>[5]</sup>。

Hp 感染是人类最常见的感染之一。大量的研究证明 Hp 是引起人类慢性胃炎的主要因素,它与消化性溃疡亦密切相关。另外,人们观察到 Hp 与人类胃癌的发生也有相关性。它的致病机制,是当前的研究热点之一。在整体水平,文献[1,2]报道 Hp 感染患者胃粘膜细胞增殖增加;消除 Hp 感染,能使增殖增加现象消失,表明 Hp 在体内能促进胃粘膜细胞的增殖。Fan 等<sup>[3]</sup>则发现 Hp 在体外亦能促进胃上皮细胞株 AGS 的增殖,进一步提示 Hp 对胃粘膜细胞的增殖可能有直接的刺激作用。我们先前的研究(另文发表)在证实 Hp 对人胃上皮细胞株 BGC-823 增殖亦有促进作用的同时,还发现它对大鼠胃上皮细胞株 RGM1 的增殖有抑制作用。本实验的结果则进一步证实了两种细胞 ERK 活性在 Hp 提取物作用时的变化亦存在着差异:BGC-823 细胞 ERK 活性增高幅度大且持续时间长;RGM1 细胞 ERK 活性增高幅度小且持续时间短。ERK 被促进细胞增殖的信号激活后,可移位至细胞核,激活转录调节因子,启动基因转录,导致细胞的增殖<sup>[6]</sup>。经 ERK 转导的促进细胞增殖的效应与持续性的 ERK 活性增高有关<sup>[7,8]</sup>。由此可以认为,Hp 提取物的生物活性成分可能通过 ERK 信号转导通路导致细胞增殖;而它对 BGC-823 和 RGM1 细胞 ERK 活性影响不同,可能是导致其对两者增殖的效应不同的原因。

在我们所观察的两株细胞中,RGM1 来自未经转化的大鼠胚胎胃上皮细胞,带有较多正常细胞的特性<sup>[9]</sup>;而 BGC-823 细胞来自人胃腺癌细胞,更具恶性细胞的特征,两者的状态明显不同。两种细胞受 Hp 提取物作用时 ERK 活性变化的差异很可能与两者状态的不同有关。这提示 Hp 有可能在胃粘膜细胞恶变过程的一定阶段起作用,即 Hp 对正常的胃粘膜细胞的增殖没有明显的促进作用,而对在其它致突变因素作用下已发生一定程度变化的细胞则具有促增殖作用,加速它向恶性细胞的转变。

本实验结果还显示,在 BGC-823 和 RGM1 细胞,均有 Hp 提取物对 ERK 活性的影响因血清的存在而有所不同的现象。表现为有血清存在时 Hp 提取物引起的 ERK 活性增高持续时间更长一些。这提示血清中的成分可能加强 Hp 的生物活性成分对 ERK 的活性的影响。Hp 提取物中对 ERK 活性产生影响的生物活性成分是什么?它的作用又受到血清中哪些成分的影响?均有待于进一步的研究。弄清这些问题,将有助于了解 Hp 的致病机制。



A, BGC-823 cells; B, RGM1 cells. Lane 1, protein molecular marker; Lane 2, control; Lane 3 through 9, incubation with 5% (volume fraction) *H. pylori* extract for different times; Lane 3, 20 min; Lane 4, 40 min; Lane 5, 60 min; Lane 6, 3 h; Lane 7, 6 h; Lane 8, 12 h; Lane 9, 24 h. The blot was representative of 2-3 similar experiments.

图3 无血清存在情况下经 Hp 提取物作用后细胞 EPK 活性的变化

Figure 3 The change of ERK activity in serum-starved cells after treatment with Hp extract

### 参考文献

- Brenes F, Correa P, Hunter F, et al. *Helicobacter pylori* causes hyperproliferation of the gastric epithelium; pre-and post eradication indices of proliferation cell nuclear antigen[J]. Am J Gastroenterol, 1993, 88:1870-1875
- Bechi P, Balzi M, Becciolini A. *Helicobacter pylori* and cell proliferation of the gastric mucosa; possible implications for gastric carcinogenesis[J]. Am J Gastroenterol, 1996, 91:271-276
- Fan XG, Kelleher D, Fan XJ, et al. *Helicobacter pylori* increases proliferation of gastric epithelial cells[J]. Gut, 1996, 38:19-22
- Forre T, Bonventre JV. Growth factors and mitogen-activated protein kinases[J]. Hypertension, 1998, 31[part 2]:152-161
- Sun QY, Luria AL, Rubenstein S, et al. Protein kinase inhibitors induce the interphase transition by inactivating mitogen-activated protein kinase in mouse eggs[J]. Zygote, 1998, 6:277-284
- Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades [J]. Curr Opin Cell Biol. 1996, 8:205-215
- Pages G, Lenormand P, L'Alleman G, et al. Mitogen-activated protein kinases: p-42mapk and p-44 mapk are required for fibroblast proliferation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90:8319-8323
- Marshall C. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation[J]. Cell, 1995, 80:179-185
- Sawaoka H, Tsujii M, Nakama A, et al. Expression of the cyclooxygenase-2 gene in gastric epithelium[J]. J Clin Gastroenterol, 1997, 25:S105-S110

(1999-05-05 收稿)

(本文编辑:王 蕾)

## 人类 DNA 修复蛋白 hR24Lp 具有转录激活作用

李平法<sup>1△</sup>, 傅 欣<sup>1</sup>, 梁崇凤<sup>1</sup>, 朱应葆<sup>1△△</sup>, 童坦君<sup>2</sup>

(1. 北京医科大学第三医学院中心实验室 2. 基础医学院生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

hR24L 是本实验室首次用遗传互补法克隆出的人类 DNA 修复基因, 它与酵母 RAD24L (又称 RAD24) 基因同源。人类 hR24L 基因能校正酵母 RAD24L 突变株的紫外线敏感表型和 X 线敏感表型, 参与 DNA 切除修复和重组修复。功能互补测验表明, 该基因尚参与细胞周期检定点调控。为探讨该基因产物的作用机制, 研究与 hR24Lp 相互作用的蛋白

质, 我们将该基因的开放阅读框与酵母双杂合系统的 pAS2-1 的 DNA 结合结构域融合转化报告株 CG-1945, 试图从文库中筛选出与 hR24Lp 相互作用的蛋白质基因。有趣的是, DNA-BD-hR24L 融合蛋白能激活报告基因 (SD/-His), 阳性克隆在 45 mmol·L<sup>-1</sup> 的 3-AT 作用下仍然大而饱满, 而其余对照质粒转化的 CG-1945 则无此现象, 说明 hR24Lp 具有转录激活作用。这一现象的机制研究目前仍在进行中。

(2000-01-25 收稿)

(本文编辑:王 蕾)

基金项目: 国家自然科学基金 (39770409) 及国家高技术发展计划生物技术领域青年基金 (1998) 资助课题;

△ 进修生; △△ 通讯联系人。