DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.035
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
578 2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)05-0578-03

CagA阳性Hp培养滤液诱导转化的胃上皮细胞表达泛素活化酶E1基因

陈洁平[1],沈鼎明[2],杨致邦[3] ([1]第三军医大学附属西南医院肿瘤血液科,重庆 400038;重庆医科大学;[2]第二临床学院消化内科,重庆 400011;[3]微生物学教研室,重庆 400046)

提 要:目的 研究CagA阳性Hp培养滤液对人胃粘膜上皮细胞(GES-1)作用的机制。方法 将CagA阳性Hp培养滤液诱导恶性转化的GES-1细胞与CagA阴性Hp培养滤液处理的GES-1细胞进行mRNA差异显示,以寻找Hp致胃癌发病的相关基因。结果 mRNA差异显示片断之一命名为PFN1,仅在Hp(CagA$^+$)培养滤液处理的GES-1细胞中表达,斑点杂交结果与之一致。与Gene Bank资料序列同源性比较分析提示PFN1与泛素活化酶E1同源性99%,即为人类泛素活化酶E1基因的一部分。结论 泛素-蛋白水解酶复合体通路中的泛素活化酶E1基因可能参与了Hp的CagA诱导的胃上皮细胞恶性转化过程。

关键词:幽门螺杆菌;cagA基因;胃粘膜上皮细胞;泛素-蛋白水解酶复合体通路
中图法分类号:R377;R394.2;R735.202 文献标识码:A

Expression of ubiquitin-activating enzyme E1 gene in human gastric epithelial cells induced by broth culture filtrates of CagA positive *Helicobacter pylori*

CHEN Jie-ping, SHEN Ding-ming, YANG Zhi-bang (Department of Oncology and Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of malignant transformation induced by cagA positive broth culture filtrates of *Helicobacter pylori* (Hp) on human gastric epithelial cell line GES-1. Methods CagA related-gene was searched with mRNA differential display technique by using GES-1 cells after they were treated with CagA positive and negative broth culture filtrates of Hp. Results The result of mRNA differential display showed that there were significant differences in gene expressions between GES-1 cells treated with CagA positive and negative filtrates of Hp. One fragment, *PFN1* as named, was only expressed in the GES-1 cells with the treatment of CagA positive Hp filtrates. Dot blotting analysis showed similar results. With aid of Genbank homology analysis program, the sequence of PFN1 had 99% homology with the homo sapiens ubiquitin-activating enzyme E1 gene. Conclusion Human ubiquitin-activating enzyme E1, a ligase in ubiquitin-proteasomes pathway, may be involved in the malignant transformation of gastric epithelial cells induced by CagA gene of Hp.

Key words: Helicobacter pylori; CagA gene; gastric epithelial cells; ubiquitin-proteasomes pathway

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,Hp)及其细胞毒素相关蛋白(CagA)与胃癌发生的密切关系已为许多研究所证实[1~6]。由于在Hp致胃癌发病过程中有引起癌基因活化及抑癌基因失活、细胞DNA损伤及胃粘膜细胞的恶性转化等可能性,推测在Hp致胃癌过程中存在相应的基因改变。我们以往的研究表明Hp的CagA可能与胃粘膜上皮细胞的恶性转化及DNA损伤有关[7,8]。本研究采用经CagA阳性Hp培养滤液诱导恶性转化的胃粘膜细胞,与CagA阴性Hp培养滤液处理的胃粘膜细胞进行mRNA差异显示,以寻找Hp致胃癌发生的相关基因,为深入研究Hp感染与胃癌发生的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系

GES-1为正常人胃粘膜上皮细胞系[9],MCDB151培养基(Sigma),补加营养成分,无血清培养。HeLa为人宫颈鳞癌上皮细胞系。培养条件为高糖DMEM培养基,10%胎牛血清。

1.2 Hp分离培养及空泡毒素(Vaculating cytotoxin, VCT)活性测定

按文献[10]方法进行,用HeLa细胞进行活性测定。

1.3 Hp培养滤液处理细胞方法

接种GES-1细胞24h内,分别以Hp(CagA$^+$)培养滤液或Hp(CagA$^-$)培养滤液处理GES-1细胞,置37 ℃ CO_2孵箱中1 h,后加入完全培养基培养。每次换液或传代后均加入Hp培养滤液,连续培养1个月。取(CagA$^+$)滤液处理后具有肿瘤细胞的形态学及生长特征的GES-1细胞称之为GES-1A,以及(CagA$^-$)滤液持续处理的GES-1细胞称之为GES-1D作为一对细胞模型[7,8]。

1.4 细胞总RNA的提取及cDNA第一链的合成

按试剂盒说明书进行。三种Anchor Primer:GT15G;GT15C;GT15A及Arbitary Primer:10对。

1.5 Polymerase Chain Reaction

10× PCR buffer 2.5 μl,25 mmol/L dNTP 0.1 μl,25 mmol/L $MgCl_2$ 1.4 μl,Tag DNA polymerase 0.2 μl,distlled water 16.8 μl。于每个Eppendorf管中加入相应的Arbitary Primer 1 μl,相应的Anchor Primer 1 μl,相应的cDNA 2 μl,PCR条件:94 ℃ 3 min,42 ℃ 5 min,72 ℃ 5 min;94 ℃ 15 s,42 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,26 Cycles;72 ℃ 5 min。

1.6 聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)及琼脂糖凝胶分离差异片断

按文献方法进行。制备6%非变性聚丙烯酰胺凝胶。取PCR产物10 μl上样,电泳分离。凝胶AgNO3染色,观察并拍照。按常规方法制备1.5%~2%琼脂糖凝胶。取PCR产物15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870046);国家博士后基金资助项目
作者简介:陈洁平(1963-),女,贵州省贵阳市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肿瘤诱导分化、基因治疗及幽门螺杆菌研究,发表论文41篇。电话:(023)68754129
收稿日期:2001-12-13;修回日期:2002-03-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

凹电泳。紫外灯下观察并拍照。

1.7　差异片断的回收、PCR 扩增、纯化及克隆

按试剂盒说明书进行。

1.8　克隆片断的序列测定

将含有差异片断的克隆送上海基康公司进行序列测定。

1.9　克隆片断的重复再鉴定

取原有相应的 Anchor 及 Arbitary Primer 进行 PCR 扩增, 与原来相应的 DD 指纹图进行比较。

1.10　斑点印迹杂交分析

以所获的 cDNA 克隆为探针, 按标准的斑点印迹杂交方法分析 GES-1 细胞系经 Hp($CagA^+$)及($CagA^-$)培养滤液处理后基因差异表达情况。按分子克隆实验指南方法进行。

1.11　差异表达基因序列分析

将得到的差异表达基因序列与 Gene Bank 中序列进行序列同源性比较分析。

2　结果

2.1　Hp($CagA^-$)及($CagA^+$)培养滤液处理 GES-1 细胞 mRNA 差异显示

选用 3 种 Anchor 引物进行 cDNA 第一链合成, 40 种 Arbitrary 引物进行差异显示。差异显示指纹图可见两种不同处理的细胞在基因表达上存在差异。对 Hp($CagA^-$)及($CagA^+$)培养滤液处理 GES-1 细胞中差异表达片断进行了回收和克隆 见图 1。



a: GES-1 cells treated by CagA negative filtrates of Hp; b: GES-1 cells treated by CagA positive filtrates of Hp; M: φx174/*Hae* Ⅲ DNA marker; Arrow: PFN1

图 1　**CagA** 基因阴性及阳性 **Hp** 滤液处理胃上皮细胞 **mRNA** 差异显示结果

Fig 1　mRNA differential display by 10 groups of different primers of GES-1 cells treated by CagA positive and negative filtrates of Hp

2.2　克隆质粒 PCR 鉴定结果

挑取菌落直接或提取质粒, 用相应的 Anchor 及 Arbitary Primer 进行 PCR 扩增鉴定, 证明克隆内含有目的基因片断, 命名为 PFN1, 见图 2。



PFN1 fragment (Arrow) is confirmed in the cloning by PCR with corresponding anchors and arbitary primers. M1: φx174/*Hae* Ⅲ marker; M2: λDNA/*Hind*Ⅲ+ *EcoR*Ⅰ DNA marker

图 2　**PCR** 鉴定 **PFN1** 克隆质粒

Fig 2　PCR analysis of PFN1 colony plasmid

2.3　克隆片断序列分析结果

PFN1 克隆片断经上海基康生物公司序列测定。

2.4　克隆片断的重复再鉴定结果

用原片断相应的 Anchor 及 Arbitary Primer 进行 PCR 扩增, 与原来相应的 DD 指纹图进行比较, 可见克隆片断大小与原有 DD 指纹图相应片断大小一致。

2.5　差异片断与 Gene Bank 资料序列同源性比较分析结果

通过与 Gene Bank 资料序列同源性比较分析, 结果提示 PFN1 与人类泛素活化酶 E1 基因(Homo sapiens ubiquitin-activating enzyme E1)同源性 99%, 即为人类泛素活化酶 E1 基因的一部分, PFN1 与泛素活化酶 E1 基因序列同源性比较如下。

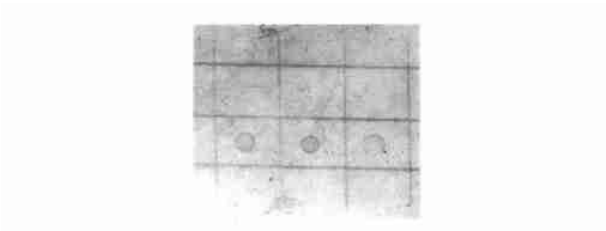
Query= (583 letters) Database: Non-redundant GenBank+ EMBL+ DDBJ+ PDB sequences 511,663 sequences; 1,472,322,882 total letters GenBank"> ref| NM-003334.1| | Homo sapiens ubiquitin-activating enzyme E1 (A1S9T and BN75 temperature sensitivity complementing) (UBE1) mRNA > gi| 35829| emb| X56976| HSQAE1 Human mRNA for ubiquitin activating enzyme E1 Length = 3419 > M58028 ID: HSUBIQAA standard; RNA; HUM; 3504 BP. DE: Human ubiquitin-activating enzyme E1 (UBE1) mRNA, complete cds. Length = 3504 Score = 1088 bits (549), Expect = 0.0 Identities = 556/559 (99%) Strand = Plus / Minus

```
Query: 21    ggagatattaattcttattaggattcagattcaacacaggtagaaggaggatggcaag  80
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3407   ggagatattaattcttattaggattcagattcaacacaggtagaaggaggatggcaag  3348
Query: 81    aggcttcaggtaggcggatgatgaggggaacaccagactggctagattggccactgcca  140
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3347   aggcttcaggtaggcggatgatgaggggaacaccagactggctagattggccactgcca  3288
Query: 141   gaagccaaatggcaaccctggctggaaggctgtgaggaggtggcaaggcggccagc  200
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3287   gaagccaaatggcaaccctggctggaaggctgtgaggaggtggcaaggcggccagc  3228
Query: 201   ctagaggaggcagacggctcagaggcatggctgtatcggcacatagggacactcgcacatctctc  260
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3227   ctagaggaggcagacggctcagaggcatggctgtatcggacatagggacactcgcacatctctc  3168
Query: 261   gcgctctcgtcgtacagacagctcaagcaccagcgccgcacgtgggggccagctt  320
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3167   gcgctctcgtcgtacagacagctcaagcaccagcgccgcacgtgggggccagctt  3108
Query: 321   tcgcttcgacacacggctcacaatctctgtcatcggctgatccaacgttccttgagctt  380
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3107   tcgcttcgacacacggctcacaatctctgtcatcggctgatccaacgttccttgagctt  3048
Query: 381   ggcgctggcatgaggaggcaatagaggcatggcacacgccctgggacagcatggtgatctc  440
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3047   ggcgctggcatgaggaggcaatagaggcatggcacacgccctgggacagcatggtgatctc  2988
Query: 441   taatttgtgctctgtcttaaaatagtcgaggaactgttgaggtcatctcctcacatt  500
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 2987   taatttgtgctctgtcttaaaatagtcgaggaactgttgaggtcatctcctcacatt  2928
Query: 501   aggctgcagccctgtacctcaaagcgatccacaatgtccactctggttatagtactg  560
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 2927   aggctgcagccctgtacctcaaagcgatccacaatgtccactctggttatagtactg  2868
Query: 561   gngacgtggngcgtcaagg  579
              |||||||  ||| |||||
Sbjct: 2867   gtgacgtggtgcggcaagg  2849
```

2.6　斑点杂交结果

以所获的 PFN1 片断作为探针, 用斑点印迹杂交方法分析 GES-1 细胞系经 Hp($CagA^+$)及($CagA^-$)培养滤液处理后 RNA 水平基因差异表达情况, 可见 PFN1 基因片断仅在 Hp($CagA^+$)培养滤液处理后的 GES-1 细胞中表达与差异显示分析的结果一致, 见图 3。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



Line 1: The groups of CagA negative Hp; Line 2: The groups of CagA positive Hp; Line 3: PFN1

图 3 PFN1 斑点印迹杂交分析

Fig 3 Dot blotting of PFN1

3 讨论

有关 CagA 与 Hp 相关胃癌发病的关系研究已得到越来越多研究工作的支持[3~6]。由于在 Hp 培养滤液处理 GES-1 细胞系过程中, CagA 基因参与了 GES-1 细胞的恶性转化过程[7,8], 以 CagA 阳性 Hp 培养滤液及相应量的 CagA 阴性 Hp 培养滤液分别处理人胃粘膜上皮细胞系进行的 mRNA 差异显示, 将有助于了解 CagA 参与细胞恶性转化的分子机制。

通过对 Hp 的 CagA 诱导恶性转化的人胃上皮细胞及相应对照细胞 mRNA 差异显示, 我们得到了在诱导转化细胞中表达, 而在 CagA 阴性 Hp 培养滤液处理的 GES-1 中不表达的人类泛素活化酶 E1 基因。该酶为泛素-蛋白水解酶复合体通路(Ubiquitin-proteasomes pathway, UPP)中的一个连接酶。它参与泛素-蛋白水解酶复合体通路对细胞的功能调节。

UPP 途径能高效及高度选择性地进行细胞内蛋白质的降解, 尤其是短命的功能蛋白、癌基因产物(如 c-Jun, c-Fos, c-Mos, 野生型 P53, Cyclins, P21, P27 及 PKCs 等)和变性变构蛋白。UPP 途径被认为是细胞恶性转化、细胞周期及免疫学研究的转折点, 是十分重要的细胞功能调节因素[11,12]。

泛素-蛋白水解酶复合体通路与肿瘤的发生关系密切[13~15]。本研究发现, 与泛素-蛋白水解酶复合体通路功能密切相关的泛素活化酶 E1 仅在经 CagA 诱导恶性转化的人胃上皮细胞中表达, 提示泛素-蛋白水解酶复合体通路可能参与了 CagA 诱导的胃上皮细胞恶性转化。

有关泛素-蛋白水解酶复合体通路参与肿瘤发病的研究不乏报道。Shkedy 等[13] 的研究表明, 泛素系统参与了 p53 的体内及体外降解过程。其中, E1、E2、E6-Ap、E6 和泛素对 p53 的降解尤为重要。而野生型 p53 在抑制肿瘤生长方面的作用已经得到了公认。Hermida Matsumoto 等[14] 的研究发现 c-Jun 及 c-Fos 的暂时控制可以通过泛素化途径调节, 而 c-Jun 及 c-Fos 的泛素化作用可依次被通过它们和 E220K 及 E3 合作介导的多泛素化作用之间的异源二聚体进行调节。Stancovski 等[15] 的研究也强烈支持 c-Fos 在细胞内的降解是通过泛素—蛋白酶体蛋白分解途径实现的, E1、E2、E3 参与了在这一过程。上述研究结果显示了泛素-蛋白水解酶复合体通路在肿瘤相关蛋白降解中的作用, 表明该系统通过干预肿瘤相关蛋白降解而参与了肿瘤的发生和发展。

根据上述研究中泛素—蛋白水解酶复合体通路与肿瘤的发生相关的理论, 我们推测 CagA 阳性 Hp 培养滤液可能通过诱导 GES-1 中泛素活化酶 E1 的表达, 促进某些与胃癌发生相关的抑癌蛋白在泛素-蛋白水解酶复合体通路中的降解, 从而参与胃粘膜上皮细胞的恶性转化。也可能是 agA 阳性 Hp 培养滤液直接诱导了 GES-1 的恶性转化。有关泛素活化酶系统在 Hp 诱导的胃上皮细胞恶性转化中的确切作用尚未阐明, 相关机制尚待深入研究。

参考文献:

[1] Meining A, Bayerdorffer E, Muller P, *et al*. Gastric carcinoma risk index in patients infected with Helicobacter pylori[J]. Virchows Arch, 1998, 432(4): 311—314.

[2] Tomaselli G, Citarda F, Crespi M. Helicobacter pylori and gastric cancer[J]. Clin Ter, 1999, 150(3): 221—224.

[3] Konturek P C, Konturek S J, Bielanski W, *et al*. Role of gastrin in gastric cancerogenesis in Helicobacter pylori infected humans[J]. J Physiol Pharmacol, 1999, 50(5): 857—873.

[4] Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, *et al*. Graham DY. Antibody against Helicobacter pylori CagA and VacA and the risk for gastric cancer[J]. J Clin Pathol, 1999, 52(3): 215—218.

[5] Kikuchi S, Crabtree J E, Forman D, *et al*. Association between infections with CagA-positive or-negative strains of Helicobacter pylori and risk for gastric cancer in young adults. Research Group on Prevention of Gastric Carcinoma Among Young Adults[J]. Am J Gastroenterol, 1999, 94(12): 3 455—3 459.

[6] Perez Perez G I, Peek R M, Legath A J, *et al*. The role of CagA status in gastric and extragastric complications of Helicobacter pylori[J]. J Physiol Pharmacol, 1999, 50(5): 833—845.

[7] 陈洁平, 沈鼎明, 杨致邦, 等. CagA 基因阳性 Hp 培养滤液对人胃粘膜上皮细胞系 DNA 损伤作用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(8): 928—930.

[8] 陈洁平, 沈鼎明, 杨致邦. CagA+ Hp 培养滤液对人胃上皮细胞的恶性转化作用[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(6): 617—621.

[9] 柯 杨, 宁 涛, 王 冰, 等. 人胃粘膜上皮细胞系 GES-1 的建立及其生物学特性[J]. 中华肿瘤杂志, 1994, 16(1): 7—10.

[10] 陈洁平, 沈鼎明, 杨致邦. 人类线粒体 tRNAs 基因在 CagA 阳性 Hp 培养滤液诱导转化的胃上皮细胞中表达[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(9): 1 039—1 042.

[11] Maki C G, Howley P M. Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(1): 355—363.

[12] Musti A M, Treier M, Bohmann D. Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases[J]. Science, 1997, 275(5 298): 400—402.

[13] Shkedy D, Gonen H, Bercovich B, *et al*. Complete reconstitution of conjugation and subsequent degradation of the tumor suppressor protein p53 by purified components of the ubiquitin proteolytic system[J]. FEBS Lett, 1994, 348(2): 126—130.

[14] Hermida Matsumoto M L, Chock P B, Curran T, *et al*. Ubiquitinylation of transcription factors c-Jun and c-Fos using reconstituted ubiquitinylating enzymes[J]. J Biol Chem, 1996, 271(9): 4 930—4 936.

[15] Stancovski I, Gonen H, Orian A, *et al*. Degradation of the proto-oncogene product c-Fos by the ubiquitin proteolytic system in vivo and *in vitro*: identification and characterization of the conjugating enzymes[J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(12): 7 106—7 116.

(编辑 谢义霞)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net