

· 药理 ·

健脾解毒方介导 p38MAPK 信号转导下调幽门螺杆菌 诱导的胃癌细胞环氧合酶 2 启动子活性

王炎¹, 刘宁宇², 周利红¹, 吴琼¹, 周宁¹, 孙珏², 范忠泽², 李琦^{1,2*}

(1. 上海中医药大学附属普陀医院实验中心, 上海 200062;

2. 上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科, 上海 200062)

[摘要] **目的:**探讨幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)对人胃癌 MKN45 细胞环氧合酶 2(Cyclooxygenase-2, COX-2)启动子荧光素酶报告基因重组质粒(pGL3-Basic-COX-2-promoter)活性的影响和健脾解毒方对其的调控作用及可能的机制。**方法:**将构建的 pGL3-Basic-COX-2-promoter 转染 MKN45 细胞, 观察 *H. pylori* 对其活性的影响。运用 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 阻断 p38MAPK 信号通路, 观察 *H. pylori* 对 MKN45 细胞 COX-2 启动子活性的影响。Western blot 法检测健脾解毒方对 *H. pylori* 感染的 MKN45 细胞 p38MAPK 信号通路及其下游激活转录因子-2(ATF-2)表达的影响。**结果:***H. pylori* 可增加 COX-2 启动子活性; 抑制 p38MAPK 信号通路后, COX-2 启动子活性明显下调; 健脾解毒方能够抑制 *H. pylori* 诱导的 p38MAPK 及 ATF-2 的活性。**结论:***H. pylori* 通过 p38MAPK 信号通路上调胃癌细胞 COX-2 启动子活性; 健脾解毒方通过调控 p38MAPK/ATF-2 信号通路, 抑制 COX-2 启动子活性, 是其防治 *H. pylori* 诱发胃癌的机制之一。

[关键词] 胃癌; 幽门螺杆菌; 环氧合酶 2; 启动子; 健脾解毒方; p38 促分裂素原活化蛋白激酶; 激活转录因子-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0105-05

Jianpi Jiedu Recipe Intervenes Signal Transduction of p38 Mitogen-activated Protein kinases and Inhibits Activity of Cyclooxygenase-2 Promoter Induced by *Helicobacter pylori* in Gastric Cancer Cell MKN45

WANG Yan¹, LIU Ning-ning¹, ZHOU Li-hong¹, WU Qiong¹, ZHOU Ning¹, SUN Yu², FAN Zhong-ze², LI Qi^{1,2*}

(1. Laboratory Center, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of

Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China;

2. Department of Oncology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of

Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of *Helicobacter pylori* on pGL3-Basic-COX-2-promoter transcriptional activity in gastric cancer MKN45 cells and the regulatory mechanism of Jianpi Jiedu Recipe on COX-2 promoter transcriptional activity. **Method:** The recombinant vector pGL3-Basic-COX-2-promoter was transiently co-transfected into MKN45 cells, then detected the effect of *H. pylori* on COX-2 promoter activity. The effect of *H. pylori* on COX-2 promoter activity in human gastric cancer cells after blocking p38MAPK signal transduction pathway with a specific inhibitor SB203580 was observed. The effect of Jianpi Jiedu Recipe on *H. pylori*-stimulated phosphorylation of p38MAPK and ATF-2, the downstream transcription factor of p38MAPK, was investigated. **Result:** *H. pylori* could increase COX-2 promoter activity. COX-2 promoter activity down-regulated significantly after

[收稿日期] 20100305(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30600844), (81072955); 上海市普陀区科委科技创新重大项目(2009-37-2); 上海市重点学科资助项目(S30302); 上海市教委青年基金(09JW44)

[通讯作者] * 李琦, Tel: 021-52665957, E-mail: Lzwf@hotmail.com

blocking p38MAPK signal transduction pathway. Jianpi Jiedu Recipe inhibited *H. pylori*-induced p38MAPK and ATF-2 activity. **Conclusion:** *H. pylori* infection increases COX-2 promoter transcriptional activity via p38MAPK signal transduction pathway, and Jianpi Jiedu Recipe inhibits *H. pylori*-induced COX-2 promoter transcriptional activity through regulating p38MAPK/ATF-2 signal transduction pathway, which may be one of the mechanisms of prevention and treatment of gastric cancer.

[**Key words**] gastric cancer; *Helicobacter pylori*; cyclooxygenase-2; promoter; Jianpi Jiedu Recipe; p38 mitogen-activated protein kinases; activating transcription factor-2

幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 感染是胃癌重要的致病因素之一,环氧合酶 2(COX-2)是花生四烯酸转化为前列腺素代谢中重要的限速酶,与胃癌的发生发展密切相关,但其表达的机制尚不清楚。我们前期研究发现 *H. pylori* 能通过 p38MAPK 信号转导上调胃癌细胞 COX-2 的表达,并已成功构建 pGL3-Basic-COX-2-promoter^[1-2]。已有既往的研究发现健脾解毒组方的中药对幽门螺杆菌相关胃病有良好的防治作用。本研究运用血清药理学的方法,旨在探讨 *H. pylori* 感染对 MKN45 细胞 COX-2 启动子转录活性的作用和健脾解毒方对其的调控作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠,清洁级,体重 200 ~ 250 g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司[生产许可证号 SCXK(沪)2003-0002]。

1.2 试剂与仪器 转染脂质体(Transfectam Reagent)、双荧光素酶检测试剂盒(Dual Luciferase Assay System),美国 Promega 公司;p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 为美国 Serologllcais 公司产品;RPM I 1640 培养基美国 Gibco;哥伦比亚琼脂培养基英国 OXOID 公司;蛋白质抽提试剂试剂盒(Sangon S-415)、BCA 蛋白质定量试剂 Merk 公司产品;SDS-PAGE 电泳试剂上海博彩生物技术有限公司;鼠抗人 COX-2 单克隆抗体购自 Merck 公司。健脾解毒方主要由生黄芪、白术、猪苓、八月札、野葡萄藤、石见穿等组成,由上海中医药大学附属普陀医院药剂科负责制剂和质量控制。

GalaxyS CO₂ 培养箱,英国 RS Biotech 公司;三气培养箱,美国 Thermo 公司;Chemidox 化学发光成像仪,Bio-Rad 公司。

1.3 细胞株与菌株 人胃癌 MKN45 细胞株、幽门螺杆菌 *H. pylori* 国际标准株 NCTC11637 由上海中医药大学附属普陀医院肿瘤实验室提供。

1.4 *H. pylori* 感染人胃癌 MKN45 细胞 MKN45 细胞在 37 °C,5% CO₂ 饱和湿度条件下置于含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 完全培养液中,常规培养;将冻存的 *H. pylori* 菌株复苏后,接种于含 10% 脱纤维羊血的哥伦比亚琼脂培养基,于 5% O₂,10% CO₂,85% N₂ 微需氧条件下培养 48 ~ 72 h,经尿素酶、氧化酶、过氧化氢酶试验及组织染色等证实为 *H. pylori*。

取增殖活跃的 MKN45 细胞以每板 4 × 10⁵ 接种于 6 孔板中,当细胞贴壁后,更换不含抗生素的细胞培养液,用接种环刮取培养基上的 *H. pylori* 活菌,悬于 PBS 中,生物分光光度计测其 A₆₀₀ (1 A = 1 × 10⁸ CFU · mL⁻¹),调整细菌密度,按细菌和细胞数量 100 : 1 的比例向细胞培养皿中加入菌液,继续培养一定时间。

1.5 药物血清的制备 雄性 SD 大鼠 40 只,随机分为 2 组,每组 20 只,中药血清组,将健脾解毒方按体表面积换算为等效剂量 6.8 g · kg⁻¹ 给大鼠 ig。空白对照组,ig 等体积的生理盐水。连续给药 3 d,末次给药前禁食 12 h,不禁水,给药后 2 h,3% 戊巴比妥钠(1.5 mL · kg⁻¹) ip 麻醉,常规消毒后打开腹腔,在无菌条件下行腹主动脉采血,离心,分离血清,56 °C 水浴 30 min 灭活,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌分装, -80 °C 冰箱保存备用。

1.6 pGL3-Basic-COX-2 质粒转染 我们已合成 pGL3-Basic-COX-2 质粒,合成方法见文献[1],将其和内参质粒 pRL-SV40 共转染人胃癌 MKN45 细胞:按 0.5 × 10⁵ 个细胞/孔密度在 24 孔板中接种指数生长期的细胞;吸弃培养液,添加 500 μL 无血清无抗生素的 RPMI-1640 培养基(RPMI-1640-FS)润洗细胞 2 ~ 3 次;取 2 个 1.5 mL 离心管,1 个按 50 μL/孔加入 RPMI-1640-FS,然后加入 pGL3-Basic-COX-2 和 pRL-SV40 质粒 DNA 共 0.8 μg/孔;另 1 个按 50 μL/孔加入 RPMI-1640-FS,按 2 μL/孔加入

Lipofectamine™ 2000 转染试剂;将 2 管液体混合,吸弃 24 孔板中的培养液,将离心管中的混合液滴加到各组细胞上;将细胞置于 37℃、恒湿的含 5% CO₂ 的培养箱中培养 3~5 h 后,吸去 DNA/脂质体/RPMI-1640 混合物,加入 500 μL 的完全培养基或含 100 倍细胞数量 *H. pylori* 的有血清无抗生素的 1640 培养基,分别加入不同质量分数(0%,5%,10%,20%)的健脾解毒含药血清处理,继续培养 24~48 h。然后对细胞进行双荧光素酶活性检测,记录发光值为 Ranilla luciferase 的发光单位(RLU)。

1.7 Western blot 检测蛋白的表达 细胞用预冷 PBS 洗 2 次,吸弃 PBS,加入预冷的含抑制剂的蛋白质抽提试剂,轻轻摇动 5 min;后用一预冷的橡胶和塑料细胞刮刮下培养瓶壁上细胞,转移细胞悬液到离心管中,冰浴 15 min 进行裂解。裂解液于预冷的离心机中 14 000 × *g* 离心 15 min,吸弃上清;BCA 分析试剂测定蛋白质浓度。50 μg 总蛋白质在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转移至 PVDF 膜,膜在 5% BSA 溶液中室温孵育 1 h 以封闭膜上的非特异结合。封闭过的膜加入一级抗体 4℃ 过夜,抗原抗体结合。TBS/T 洗膜 3 次,每次 5 min,再加入 HRP 标记的二级抗体以结合一级抗体及 HRP 标记的抗生物素抗体以结合分子量标准,室温孵育膜 1 h, TBS/T 洗膜 3 次,每次 5 min;同样方法标记鼠单克隆抗 GAPDH 作对照。洗完膜稍干后,按 1:1 加入 AB 显影液(与二抗 HRP 结合),在 Bio-Rad 的化学发光成像仪上显影。然后分析灰度值,再进行计算灰度系数比。

1.8 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 PEMS 3.1 统计软件包,两样本均数比较用 *t* 检验,多样本比较以单因素方差分析;各组两两比较采用 Newman-Keuls 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 *H. pylori* 对 MKN45 细胞 COX-2 启动子转录活性的影响 将载体质粒、重组质粒分别与内参质粒共转染胃癌 MKN45 细胞后,加入 *H. pylori* 感染 8, 16, 24, 32, 40, 48 h,进行双荧光素酶活性检测。结果显示 pGL3-Basic-COX-2 转染 MKN45 细胞后,COX-2 启动子的活性随时间的变化呈现明显的上升趋势,在转染 40 h 后达到最大值。经 *H. pylori* 感染 16 h 后,COX-2 启动子的活性明显增强,并随时间的变化呈上调趋势,40 h 达到最大值。同时,与未经

H. pylori 感染组相比,COX-2 启动子活性明显的上调($P < 0.05$, $P < 0.01$),特别是 32 h,两者 COX-2 启动子活性的比值达到最大($P < 0.01$),见图 1。

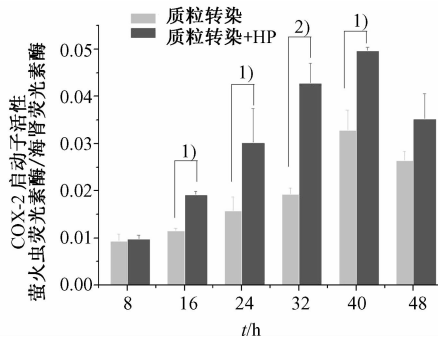


图 1 *H. pylori* 感染时间对 MKN45 细胞 COX-2 启动子活性的影响

与同期质粒转染组比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

2.2 p38MAPK 对 *H. pylori* 感染 MKN45 细胞 COX-2 启动子转录活性的影响 将 MKN45 细胞转染 pGL3-Basic-COX-2-promoter 后,加入 20 μmol·L⁻¹ 的 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 预处理 2 h,再加 *H. pylori* 感染,以常规培养的 MKN45 细胞为对照,检测荧光素酶活性。结果显示,p38MAPK 对正常细胞 COX-2 启动子转录活性无影响,*H. pylori* 感染后 COX-2 启动子转录活性显著升高($P < 0.01$),而抑制 p38MAPK 后 COX-2 启动活性明显降低($P < 0.05$),见图 2。

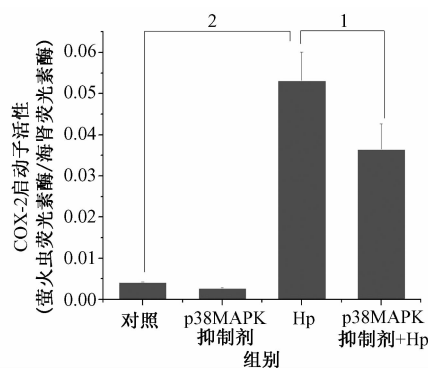


图 2 p38MAPK 对 *H. pylori* 感染 MKN45 细胞 COX-2 启动子转录活性的影响

与 Hp 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

2.3 健脾解毒方对 *H. pylori* 感染 MKN45 细胞 COX-2 启动子转录活性的影响 MKN45 细胞转染后分别加入不同浓度药物血清预处理 2 h,再用 *H. pylori* 感染细胞,作用 48 h 后进行荧光素酶活性的检测。与对照组比较,空白血清组(0% 含药血清组) COX-2 启动子活性无变化。5%,10%,20% 的药

物血清组 COX-2 启动子转录活性呈降低趋势,且随着药物剂量的增加抑制越明显,见图 3。

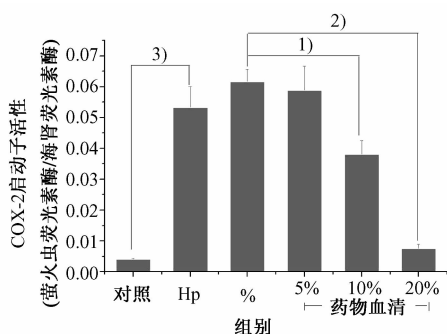


图 3 健脾解毒方对 *H. pylori* 感染 MKN45 细胞 COX-2 启动子转录活性影响

与不加药血清组比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;
与细胞对照组比³⁾ $P < 0.01$

2.4 健脾解毒方对 *H. pylori* 感染 MKN45 细胞 p38MAPK 磷酸化的影响 取对数生长期的 MKN45 细胞,药物血清预处理 2 h,再与 *H. pylori* 共培养 60 min,Western blot 检测 p38MAPK 的磷酸化。结果发现:与对照组比较,*H. pylori* 感染组 p38MAPK 的磷酸化水平明显增加 ($P < 0.01$);与 *H. pylori* 感染组比较,空白血清组 p38MAPK 的磷酸化无显著变化;5%,10%,20% 的药物血清能明显抑制 p38MAPK 的激活,与 *H. pylori* 组比较, $P < 0.01$,并随着药物浓度的增加,抑制效果越明显,见图 4。

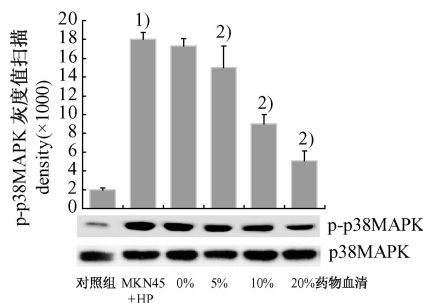


图 4 健脾解毒方对 *H. pylori* 感染 MKN45 细胞 p38MAPK 磷酸化影响

与 MKN45 组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 MKN45 + Hp 组比较²⁾ $P < 0.01$

2.5 健脾解毒方对 p38MAPK 下游因子 ATF-2 活性的影响 MKN45 细胞与 *H. pylori* 共培养,加入含药血清作用后,Western blot 检测 ATF-2 的磷酸化。结果发现与 *H. pylori* 组比较,空白血清(0% 含药血清)对 *H. pylori* 诱导的 ATF-2 磷酸化(p-ATF-2)无影响。5%,10%,20% 的药物血清组 p-ATF-2 的表达明显减低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),并随着药物浓度的增加,抑制效果越明显。提示健脾解毒方能够

抑制 *H. pylori* 诱导的 ATF-2 活性,并具有明显的量效关系,见图 5。

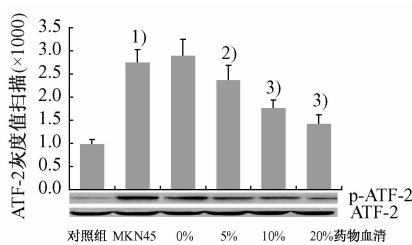


图 5 健脾解毒方对 *H. pylori* 感染 MKN45 细胞 p38MAPK 下游因子 ATF-2 活性的影响

与 MKN45 组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 Hp 组比较²⁾ $P < 0.05$; ³⁾ $P < 0.01$

3 讨论

现已证实 *H. pylori* 与胃癌的发病密切相关^[3,4],1994 年 WHO 将 *H. pylori* 列为 I 类致癌因子^[5]。*H. pylori* 感染引起胃癌的机制十分复杂,已证实与其诱导的 COX-2 的表达关系密切。COX-2 为诱导型基因,静息时不表达,当细胞受到各种诱导因子刺激时表达上调,迅速合成。研究表明 COX-2 在多种肿瘤组织中表达增强,与肿瘤的发生、发展及转移密切相关^[6]。检测 COX-2 的水平可能有助于肿瘤的早期诊断。

双荧光素酶报告基因法,首先构建以目的基因启动子为启动序列的荧光素酶报告基因载体。然后,将构建好的载体同参照载体同时转染进细胞中,通过检测荧光素酶的表达量反映启动序列的活性。该方法具有可信度高、操作简单的优点,而且还能够通过特异性的序列来靶向筛选抗肿瘤药物。我们前期研究中,建立了基于双荧光素酶报告基因法的 COX-2 筛选模型。该模型利用双报告基因检测系统测定荧光强度的变化,反映 COX-2 基因启动子的活性^[2]。

p38MAPK 是 MAPK 家族中一条重要的信号途径,在炎症、细胞生长、细胞分化、细胞周期及细胞凋亡等过程中均发挥重要的调控作用,能被多种细胞外刺激因素激活。p38MAPK 通过磷酸化 Thr-Gly-Tyr(TGY)位点中的苏氨酸和酪氨酸使其活化。活化的 p38MAPK 进一步活化下游的蛋白激酶和转录因子 ATF-2、CREB-1 等,调控多种基因的表达^[7-9]。但 p38MAPK 信号通路是否在 *H. pylori* 诱导的 COX-2 表达中起作用尚不完全清楚。

本研究证实经 *H. pylori* 感染后,COX-2 启动子的活性明显上调,从 COX-2 启动子的转录方面证实

H. pylori 感染能够上调胃癌 MKN45 细胞 COX-2 基因的表达。并发现抑制 p38MAPK 信号通路后, COX-2 启动子的活性明显下调,提示 *H. pylori* 可能通过 p38MAPK 信号通路上调 COX-2 基因的表达。

近年来中医药在幽门螺杆菌相关性胃癌的防治中取得了很大的进展。我们通过研究发现认为 *H. pylori* 属于中医邪气范畴,脾胃虚弱是幽门螺杆菌感染的病理基础。其病位在胃,病本在脾,以本虚标实为特点,本虚以脾气虚为主,标实为邪毒(湿、热毒邪)郁胃。并且我们通过大量临床和实验研究表明健脾解毒法在治疗 *H. pylori* 感染相关的胃病中有着重要的地位,以健脾解毒为主方的辨证治疗疗效优于其他治法。健脾解毒方是我院院内制剂,已获得国家发明专利。组方:生黄芪,白术,猪苓,八月札,石见穿,野葡萄藤等。方中黄芪健脾扶正为君;白术、薏苡仁、猪苓健脾化湿为臣;石见穿,野葡萄藤,八月札为佐使,解毒理气。全方有益气补脾、理气解毒功效。

我们在研究中采用了经典的血清药理学方法。该方法不仅能反映药物中可吸收部分的直接作用,而且能反映药物成分在机体作用下形成的代谢产物和药物诱生的机体内源性物质的间接效果,其实验条件可控性强,可深入揭示中药分子水平的作用机制,为中药更深一层次作用机制的研究开创了新的研究方法^[10]。

本研究发现,不含药的大鼠空白血清对 *H. pylori* 诱导的 COX-2 启动子的活性无影响。健脾解毒方含药血清对 *H. pylori* 诱导的 COX-2 启动子的活性具有下调作用,并随着药物浓度增加,抑制效果越明显,这可能是健脾解毒方防治 *H. pylori* 感染相关胃癌的重要机制之一。进一步研究发现,健脾解毒方药物血清能够抑制 *H. pylori* 诱导的 p38MAPK 磷酸化,并对其下游转录因子 ATF-2 的活性有明显抑制作用,且有剂量依赖关系。该研究结果提示健脾解毒方可能通过 p38MAPK/ATF-2 信号转导抑制 *H. pylori* 诱导的胃癌细胞 COX-2 启动子的活性,这

可能是健脾解毒方调控 COX-2 表达,防治幽门螺杆菌相关胃癌的重要机制之一。

[参考文献]

- [1] 李琦,范忠泽,孙珏,等. 幽门螺杆菌对人胃癌 MKN45 细胞 p38MAPK 信号通路激活作用的研究[J]. 中国癌症杂志,2008,18(1):801.
- [2] 李琦,周利红,范忠泽,等. pGL3-Basic-COX-2-promoter 报告基因重组质粒的构建及其功能鉴定[J]. 世界华人消化杂志,2008,16(31):3498.
- [3] Belair C, Darfeuille F, Staedel C. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: possible role of microRNAs in this intimate relationship [J]. Clin Microbiol Infect, 2009(9):806.
- [4] 李琦,范忠泽,孙珏,等. 幽门螺杆菌诱导人胃癌 MKN45 细胞 COX-2 表达的信号转导研究[J]. 肿瘤,2009,29(2):108.
- [5] Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France, 7 - 14 June 1994 [J], IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1994, 60: 1.
- [6] Sitarz R, Leguit R J, de Leng W W, et al. Cyclooxygenase-2 mediated regulation of E-cadherin occurs in conventional but not early-onset gastric cancer cell lines[J]. Cell Oncol, 2009,31(6):475.
- [7] 李琦,刘宁宁,范忠泽. p38 丝裂原活化蛋白激酶信号转导对肿瘤细胞凋亡的调控[J]. 国际肿瘤学杂志,2009,36(3):163.
- [8] Li Q, Liu N, Shen B, et al. *Helicobacter pylori* enhances cyclooxygenase 2 expression via p38MAPK/ATF-2 signaling pathway in MKN45 cells [J]. Cancer Lett, 2009, 278(1): 97.
- [9] 刘宁宁,王炎,刘宣,等. COX-2 介导幽门螺杆菌诱导的人胃癌细胞 VEGF 表达[J]. 中国癌症杂志,2010,20(1):1.
- [10] 刘成海. 中药复方体外药理研究思考[J]. 中药新药与临床药理,2000,11(1):53.

[责任编辑 聂淑琴]