

# 蛋白质二硫键异构酶在幽门螺杆菌感染者胃黏膜中的表达及意义

王孟春, 郭静波, 刘明华, 方文刚, 李岩

## ■背景资料

人胃黏膜感染幽门螺杆菌后发生热休克反应, 产生许多热休克蛋白。蛋白质二硫键异构酶为热休克蛋白, 同时是内质网分子伴侣家族重要成员, 有关幽门螺杆菌感染胃黏膜后的热休克反应中是否有蛋白质二硫键异构酶参与及其作用机制如何尚未见研究报道。

王孟春, 郭静波, 刘明华, 李岩, 中国医科大学附属第二医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004

方文刚, 中国医科大学发育生物教研室 辽宁省沈阳市 110001

辽宁省教育厅基金资助项目, No. 202010794

通讯作者: 王孟春, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第二医院消化内科. wangmc@cmu2h.com

电话: 024-83956416 传真: 024-23892617

收稿日期: 2006-06-20 接受日期: 2006-08-14

## Expression of protein disulfide isomerase in gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*

Meng-Chun Wang, Jing-Bo Guo, Ming-Hua Liu, Wen-Gang Fang, Yan Li

Meng-Chun Wang, Jing-Bo Guo, Ming-Hua Liu, Yan Li, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Wen-Gang Fang, Department of Developmental Biology, College of Basic Medical Science, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Meng-Chun Wang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. wangmc@cmu2h.com

Received: 2006-06-20 Accepted: 2006-08-14

## Abstract

**AIM:** To study the expression of protein disulfide isomerase (PDI) in gastric mucosa infected with *H pylori*.

**METHODS:** Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to examine the mRNA and protein expression of PDI, respectively, in human gastric mucosa with or without *H pylori* infection ( $n = 32$  or  $28$ ).

**RESULTS:** The expression amounts of PDI mRNA and protein were  $0.5704 \pm 0.0794$  and  $0.5198 \pm 0.0379$  in the mucosa without *H pylori* infection, which were significantly lower than those in the ones with *H pylori* infection ( $1.0642 \pm 0.1533$ ,  $0.8252 \pm 0.0321$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** *H pylori* infection can increase the transcription of PDI mRNA and synthesis of PDI protein in gastric mucosa.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; Protein disulfide isomerase

Wang MC, Guo JB, Liu MH, Fang WG, Li Y. Expression of protein disulfide isomerase in gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(29):2880-2882

## 摘要

**目的:** 了解蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)在幽门螺杆菌(*H pylori*)感染人胃黏膜组织中的表达情况。

**方法:** 分别应用半定量RT-PCR方法及Western blot方法检测感染( $n = 32$ )与未感染( $n = 28$ )*H pylori*的人胃黏膜组织中PDI mRNA及蛋白的表达情况。

**结果:** 未感染组PDI mRNA及蛋白表达量分别为 $0.5704 \pm 0.0794$ ,  $0.5198 \pm 0.0379$ , 感染组PDI mRNA及蛋白表达量分别为 $1.0642 \pm 0.1533$ ,  $0.8252 \pm 0.0321$ ; 两组相比差异显著( $P < 0.01$ )。

**结论:** 正常情况下胃黏膜组织有PDI mRNA的表达及蛋白的合成, *H pylori*感染可使胃黏膜增加PDI mRNA的表达及蛋白的合成。

**关键词:** 幽门螺杆菌; 蛋白质二硫键异构酶

王孟春, 郭静波, 刘明华, 方文刚, 李岩. 蛋白质二硫键异构酶在幽门螺杆菌感染者胃黏膜中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2880-2882

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2880.asp>

## 0 引言

生物细胞在受热和其他许多损害因素如缺血、缺氧、感染等作用后发生热休克反应, 可以抑制一些正常蛋白质的合成, 同时启动一类新的

表 1 *H pylori*对胃黏膜组织PDI mRNA及蛋白表达的影响 (mean  $\pm$  SD)

分组	PDI mRNA				PDI蛋白			
	<i>n</i>	<i>H pylori</i> 阳性	<i>n</i>	<i>H pylori</i> 阴性	<i>n</i>	<i>H pylori</i> 阳性	<i>n</i>	<i>H pylori</i> 阴性
基本正常胃黏膜			10	0.5789 $\pm$ 0.0706			10	0.5160 $\pm$ 0.0447
浅表胃炎(中-重度)	12	1.0683 $\pm$ 0.1397	8	0.5716 $\pm$ 0.0581	12	0.8160 $\pm$ 0.0249	8	0.5222 $\pm$ 0.0293
胃溃疡	10	1.0734 $\pm$ 0.1617	5	0.5441 $\pm$ 0.0565	10	0.8381 $\pm$ 0.0339	5	0.5290 $\pm$ 0.0437
十二指肠溃疡	10	1.0499 $\pm$ 0.1590	5	0.5779 $\pm$ 0.0565	10	0.8233 $\pm$ 0.0337	5	0.5207 $\pm$ 0.0267

蛋白质合成基因-热休克蛋白基因, 合成热休克蛋白(heat shock protein, HSP). 人胃黏膜感染幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, *H pylori*)后同样可发生热休克反应, 产生许多HSP. 蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)为热休克蛋白, 又是内质网分子伴侣家族重要成员, 作为酶PDI可催化蛋白质分子中二硫键的形成, 作为分子伴侣PDI在蛋白质的翻译及翻译后进行的转运过程中起着重要作用. 有关*H pylori*感染胃黏膜后的热休克反应中是否有PDI参与及其作用如何尚未见研究报道. 本文以RT-PCR方法及Western blot方法分别检测了*H pylori*感染后胃黏膜组织中PDI mRNA及蛋白的表达状况.

## 1 材料和方法

1.1 材料 胃镜检查时将除外心脑血管、肝肾疾病, 检查前2 wk未用抗生素及铋剂的患者列入本实验. 于胃镜检查时取胃窦黏膜6块, 分别用于快速尿素酶试验、Giemsa染色、RNA提取、蛋白提取. 快速尿素酶试验、Giemsa染色同时阳性为*H pylori*感染组, 共32例, 其中浅表性胃炎12例, 胃溃疡10例, 十二指肠溃疡10例. 2项检测同时阴性为*H pylori*未感染组, 共28例, 其中基本正常胃黏膜10例, 浅表性胃炎8例, 胃溃疡5例, 十二指肠溃疡5例. 所需试剂为TRIzol试剂, Gibco BRL; AMV逆转录酶, 5 $\times$ buffer, RNAsin, Promega; Taq酶, dNTP, 10 $\times$ buffer, MgCl<sub>2</sub>, Takara公司; 50 $\times$  TAE 琼脂糖, 上海生工生物制品公司; ECL试剂盒, Amerham Pharmacia; 一抗、二抗分别为小鼠抗羊PDI多克隆抗体, Santa Cruz; HRP标记羊抗小鼠二抗, 中山公司.

### 1.2 方法

1.2.1 PDI mRNA表达的检测 胃镜下于胃窦大弯、小弯各取黏膜1块, 置于预冷的装有200  $\mu$ L TRIzol的EP管中, 用TRIzol试剂盒提取总RNA, 用紫外分光光度计测定RNA的纯度及浓度, 两步法RT-PCR扩增, 为校正逆转录效率及不同样品间的差异, 以 $\beta$ -actin为内部参照物, 在同一

表 2 *H pylori*感染与未感染胃黏膜组织中PDI mRNA及蛋白的表达(mean  $\pm$  SD)

分组	<i>n</i>	PDI mRNA	PDI蛋白
<i>H pylori</i> 阴性	28	0.5704 $\pm$ 0.0794	0.5198 $\pm$ 0.0379
<i>H pylori</i> 阳性	32	1.0642 $\pm$ 0.1533 <sup>b</sup>	0.8252 $\pm$ 0.0321 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>*P*<0.01 vs *H pylori*阴性组.

反应体系中与PDI同时扩增, 以定量PDI mRNA的表达量, 与 $\beta$ -actin的比值作为校正后的PDI mRNA表达量. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 10 min后, 94 $^{\circ}$ C 变性1 min、58 $^{\circ}$ C复性45 s、72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 进行30循环后, 72 $^{\circ}$ C进行10 min延伸反应. 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外灯下确认电泳带, PDI为478 bp,  $\beta$ -actin为750 bp. 在凝胶成像系统分别扫描PDI与 $\beta$ -actin电泳带密度, 求出二者比值, 即为PDI表达的相对水平.

1.2.2 PDI蛋白表达 胃镜检查时于胃窦大弯、小弯各取黏膜1块, 裂解液中匀浆、低温离心, 考马斯亮蓝法定量. 含15  $\mu$ g蛋白的样品在80 g/L SDS-PAGE进行电泳, 半干转印至PVDF膜, 将PVDF膜浸入封闭液中室温过夜, 加入用杂交液按1:1000稀释的一抗, 摇床上室温杂交30 min至2 h或过夜. 加入用杂交液按1:5000稀释的二抗, 摇床杂交30 min. 将ECL试剂盒内的detection reagent 1与detection reagent 2等体积混合后, 均匀滴在PVDF膜上, 固定于暗盒中, 曝光、洗片. 电脑扫描, Kodak1D软件系统计算PDI的密度值及 $\beta$ -actin的密度值, 二者比值作为该样品PDI蛋白的表达量.

统计学处理 数据经SPSS 10.0软件 $t$ 检验处理, 以mean  $\pm$  SD表示, *P*<0.05为有显著差异.

## 2 结果

2.1 PDI mRNA表达的检测结果 *H pylori*阳性组不同病变胃黏膜PDI mRNA表达量无差异, *H pylori*阴性组不同病变胃黏膜PDI mRNA表达量无差异(表1). *H pylori*阳性组胃黏膜PDI mRNA

### ■同行评价

本文反映了目前幽门螺杆菌感染的基础研究进展, 证实了蛋白质二硫键异构酶在幽门螺杆菌感染者胃黏膜中的表达及意义. 方法得当, 具有科学价值.

表达量明显高于*H pylori*阴性组( $P<0.01$ , 表2)。

**2.2 PDI蛋白表达结果** *H pylori*阳性组不同病变胃黏膜PDI蛋白表达量无差异, *H pylori*阴性组不同病变胃黏膜PDI蛋白表达量无差异(表1)。 *H pylori*阳性组PDI蛋白表达量明显高于*H pylori*阴性组( $P<0.01$ , 表2)。

### 3 讨论

胃黏膜是热休克反应的代表, 无论是离体培养的胃黏膜细胞还是动物实验、人胃黏膜均有HSP的多量表达<sup>[1-5]</sup>。而感染*H pylori*后更增加了某些热休克蛋白的合成<sup>[6-7]</sup>, 如HSP70, HSP72, HSP90等, 我们曾报道胃黏膜感染*H pylori*后可增加内质网分子伴侣Grp94、Grp78的合成<sup>[8-9]</sup>, 可能与*H pylori*感染后胃黏膜合成的一些细胞因子、激素等有关, 也可能在维持胃黏膜细胞正常形态及功能上起重要作用。本实验检测了另一个内质网分子伴侣PDI的表达情况, 同样发现PDI在胃黏膜有基础表达, *H pylori*感染组PDI mRNA及蛋白的表达均明显高于*H pylori*未感染组, *H pylori*感染组与未感染组不同胃黏膜病变中的表达无差异性, 提示*H pylori*感染后胃黏膜也增加了PDI的合成。PDI是一种多功能分子伴侣存在于内质网管腔中, 含量丰富, 占细胞总蛋白的0.4%。作为折叠酶PDI能催化蛋白质分子中二硫键的形成<sup>[10]</sup>, 作为分子伴侣PDI能识别未折叠好的或部分折叠的新生肽折叠中间物的非天然结构, 或变性蛋白在重折叠过程中形成的折叠中间物的非天然结构, 通过其多肽结合部位与之结合, 从而防止靶蛋白或底物蛋白之间错误的结合和聚合。目前的研究表明, 在蛋白质折叠过程的早期, PDI可能是作为分子伴侣防止部分折叠的肽链由于错误相互作用导致的聚合; 在后期, 当多肽链已经折叠到一定程度, PDI的基本功能则表现为异构酶, 即催化配对巯基的氧化联接或错接二硫键的异构。像内质网中的其他分子伴侣一样, PDI也会因为分泌蛋白的过量合成或未折叠好的和错误折叠的蛋白在内质网中的积聚, 而被诱导表达<sup>[11]</sup>。

*H pylori*是一种革兰氏阴性杆菌, 本身所具有的毒素、尿素酶、脂多糖等对胃黏膜有损害作用<sup>[12-14]</sup>, 胃黏膜感染*H pylori*后上皮细胞发生空泡变性、G细胞、D细胞等也受到影

响, 细胞内聚集未折叠好的或错误折叠的蛋白, 就可能激发热休克反应, 激活热休克因子, 使PDI的合成增多, 增多的PDI能防止蛋白错误折叠, 催化二硫键的形成, 从而维持胃黏膜细胞的正常功能。PDI的增多到底与哪些胃肠激素的合成分泌有关, 这也是我们感兴趣的问题, 有待今后进一步探讨。

### 4 参考文献

- 1 Rokutan K. Molecular stress response in the stomach. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1999; 114: 265-272
- 2 Rokutan K. Significance of heat shock protein in gastric lesions--gastric mucosal cells culture. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1995; 92: 1-6
- 3 Rokutan K, Hirakawa T, Teshima S, Honda S, Kishi K. Glutathione depletion impairs transcriptional activation of heat shock genes in primary cultures of guinea pig gastric mucosal cells. *J Clin Invest* 1996; 97: 2242-2250
- 4 Rokutan K, Teshima S, Miyoshi M, Kawai T, Nikawa T, Kishi K. Glutathione depletion inhibits oxidant-induced activation of nuclear factor-kappa B, AP-1, and c-Jun/ATF-2 in cultured guinea-pig gastric epithelial cells. *J Gastroenterol* 1998; 33: 646-655
- 5 Nakamura K, Rokutan K, Marui N, Aoiike A, Kawai K. Induction of heat shock proteins and their implication in protection against ethanol-induced damage in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Gastroenterology* 1991; 101: 161-166
- 6 Leri O, Teichner A, Sinopoli MT, Abbolito MR, Pustorino R, Nicosia R, Paparo Barbaro S. Heat-shock-proteins-antibodies in patients with *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 1996; 18: 45-47
- 7 易屏, 李国成, 刘胜洪, 罗树星, 陶秀良. HSP72、HSP B在幽门螺杆菌感染的十二指肠球部溃疡患者胃黏膜中的表达. *中国中西医结合脾胃杂志* 2001; 8: 336-338
- 8 王孟春, 方文刚, 陈澄, 李岩. 葡萄糖调节蛋白GRP78在幽门螺杆菌感染者胃黏膜中的表达和意义. *中国医科大学学报* 2004; 33: 70-71, 74
- 9 王孟春, 方文刚, 顾金歌, 李岩. 幽门螺杆菌感染者胃黏膜中内质网分子伴侣Grp94的表达. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 551-553
- 10 Freedman RB, Hirst TR, Tuite MF. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 331-336
- 11 Lodish HF, Kong N, Wikstrom L. Calcium is required for folding of newly made subunits of the asialoglycoprotein receptor within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1992; 267: 12753-12760
- 12 Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: S116-S128
- 13 Hazell SL, Lee A. *Campylobacter pyloridis*, urease, and gastric ulcers. *Lancet* 1986; 2: 626
- 14 Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14648-14653