

- Yang L J, Bai C L, Li R Z, *et al.* Science in China B, 1998, **28** (1): 65~ 70
- 10 Lee I, Bai C L, Wang C, *et al.* Computational analysis of triplex formation of oligonucleotides: protonated and 5'-methylated Py-Py motif. Science in China B, 1997, **40** (2): 113~ 119
- 11 Yang J, Hua W Y. Basic pharmacophore for some antithrombotic agents with combined thromboxane receptor antagonists (TXRA) /thromboxane synthase inhibitor (TXSI) activities. Drug Dev Res, 1996, **39** (2): 197~ 200
- 12 Saenger W. Principles of Nucleic Acid Structure. New York: Academic Press, 1983. 376
- 13 Weiner S J, Kollman P A, Nguyen D T, *et al.* An all atom force-field for simulations of proteins and nucleic acid. J Comp Chem, 1986, **7** (3): 765
- 14 Zhang P, Raney K, McLachlan A. Characterization of functional SP1 transcription factor binding sites in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. J Virol, 1993, **67** (3): 1472~ 1481

Stability and Molecular Modeling of Triplex DNA Inhibiting DNA Binding Protein Binding to the Core Promoter of Hepatitis B Virus. YANG Jie, LIU Ci-Quan (*Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China*).

Abstract Two three-dimensional structure models of the 21nt oligodeoxyribonucleotides, CP1 (G3TG-

2TGT2G5TG2TGT) and CP3 (TGTG2TG5T2GTG2TG3), were constructed by InsightII (MSI) software in IRIS Indigo2 (SGI) workstation using the crystal structure of TAT triplex formation as the template. The initial structures subsequently were minimized by molecular mechanics. The final structures were believed as the dominant conformation. The results showed that the energy of CP1 is lower than that of CP3, and the former is more stable than the latter. Moreover, the results further proved that the 21nt oligodeoxyribonucleotide CP1 stably combines with the core promoter (Cp) fragment of hepatitis B virus (HBV) to form a triplex DNA, and CP1 specifically inhibits a specific cellular factor (DNA binding protein) binding to Cp fragment. These results indicated that specific repression of gene transcription of HBV DNA might be possible by triplex-formation DNA.

Key words triplex DNA, antigene strategy, homology modeling, core promoter, hepatitis B virus (HBV)

蛇毒 NGF 对 PC12 细胞 MAPK 表达的影响

秦丽雅¹⁾ 刘玉欣²⁾ 张 蕾 宋伶俐 崔肇春³⁾

(大连市医药科学研究所, 大连 116013)

摘要 有丝分裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 是磷酸化瀑布中涉及的一类重要蛋白激酶。阐明各种胞外因素对 MAPK 的调节, 以及各种外界信息所经历的具体过程是摆在研究者面前的挑战性任务。用含有长白白眉蝮蛇 (*A. halys*) 蛇毒神经生长因子 (NGF) 的培养基培养 PC12 细胞, 观察 MAPK 和 MAPK 激酶 (MAPKK) 表达及 MAPK 的活性。结果表明, *A. halys* 蛇毒 NGF 使 PC12 细胞的 MAPK 和 MAPKK 的表达及 MAPK 活性明显增加。当蛇毒 NGF 浓度在 25~ 100 $\mu\text{g/L}$ 时, 随浓度的增加, 酶的表达和活性呈线性增加。由 *A. halys* 蛇毒 NGF 诱导的 MAPK 和 MAPKK 表达的增加依赖于蛋白激酶 C (PKC)。

关键词 有丝分裂原激活的蛋白激酶, 神经生长因子, 长白白眉蝮蛇, 蛇毒, PC12 细胞

学科分类号 Q78

有丝分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是近年发现的一类蛋白激酶^[1], 其激活是一个由蛋白激酶组成的级联反应 (瀑布)^[2] 完成的。该瀑布包括 MAPK、MAPK 激酶 (MAPKK) 及 MAPKK 激酶 (MAPKKK), 这个瀑布被认为是细胞增殖信息进入细胞核之前的一个共同通路。MAPK 介导细胞的生长与增殖^[3,4]。已知神经生长因子 (NGF) 能促进大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞系的分化,

抑制增殖^[4~6]。是否长白白眉蝮蛇 (*Agkistrodon halys*) 来源的神经生长因子也具有同样的作用, 以及长白白眉蝮蛇蛇毒神经生长因子对 MAPK 瀑布有什么影响, 这对于阐明 NGF 的促分化机制、某些疾病的发病机理及治疗有重要的理论意义; 也为我国长白白眉蝮蛇蛇毒的深度开发提供了理论依

¹⁾ 本文为其博士论文的一部分。 ²⁾ 通讯联系人。

³⁾ 大连医科大学生物化学教研室, 大连 116027。

Tel: (0411) 2683872, E-mail: dimps@mail.dlptt.ln.cn

收稿日期: 1999-03-15, 修回日期: 1999-07-16

据. 本文观察 *A. halys* 蛇毒 NGF 对 ERK1 (一种 MAPK) 和 MAPKK-XI 的表达, 以及对 ERK1 的活性的影响, 以及它们的表达与蛋白激酶 C 之间的关系, 以此来阐明长白眉蝮蛇蛇毒神经生长因子对 MAPK 瀑布的作用机制.

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞系, 美国德克萨斯州立大学, 圣·安东尼奥卫生科学中心微生物系提供; *A. halys* 蛇毒 NGF, 比活性 8.75 $\mu\text{g/L}$, 自提, 电泳纯 (提取方法待发表, 促进 PC12 细胞生长见图 1); RPMI 1640 培养基, Gibco, 美国; 小牛血清, 大连市旅顺检验试剂厂; ERK1 (MAPK 家族中的一员) 抗体和 MAPKK-XI 抗体, Kinetek 生物技术公司 (加拿大 UBC 的 Steven Pelech 教授

赠送), 其中 MAPK-XI 抗体 (anti-MAPKK-subdomain XI) 是对 55 ku MAPKK 有特异性的兔多克隆抗体. 它是根据蟾蜍 MAPKK 亚微区 XI 合成的 22 肽而制成的抗体. 此 22 肽的抗体序列为 ERQDFV NKCLVKNPAERADLKC. 此序列中 20 或 21 个残基 (> 95%) 与人、大鼠、小鼠、家兔 MAPKK 具有同源性. 3, 3'-二氨基联苯胺盐酸盐 (DAB), 北京化工厂; ABC 药盒, Vector Laboratories, Inc. 美国; 抑蛋白酶亮肽 (leupeptin), 抑胃肽 (pepstatin), 苯甲基磺酰氟 (PMSF), PKC 抑制剂 H-7 [1-(5-异喹啉磺酰基)-2-甲基哌嗪, 1-(5-isoquinocinylsulfonyl)-2-methyl piperazine], 髓鞘碱性蛋白 MBP 均为 Sigma 产品, 美国; Fuji X-ray 胶片, 富士胶片株式会社, 日本.

2117 多功能电泳仪, LKB, 瑞典; CS-9000 型飞点式薄层扫描仪, 岛津, 日本.

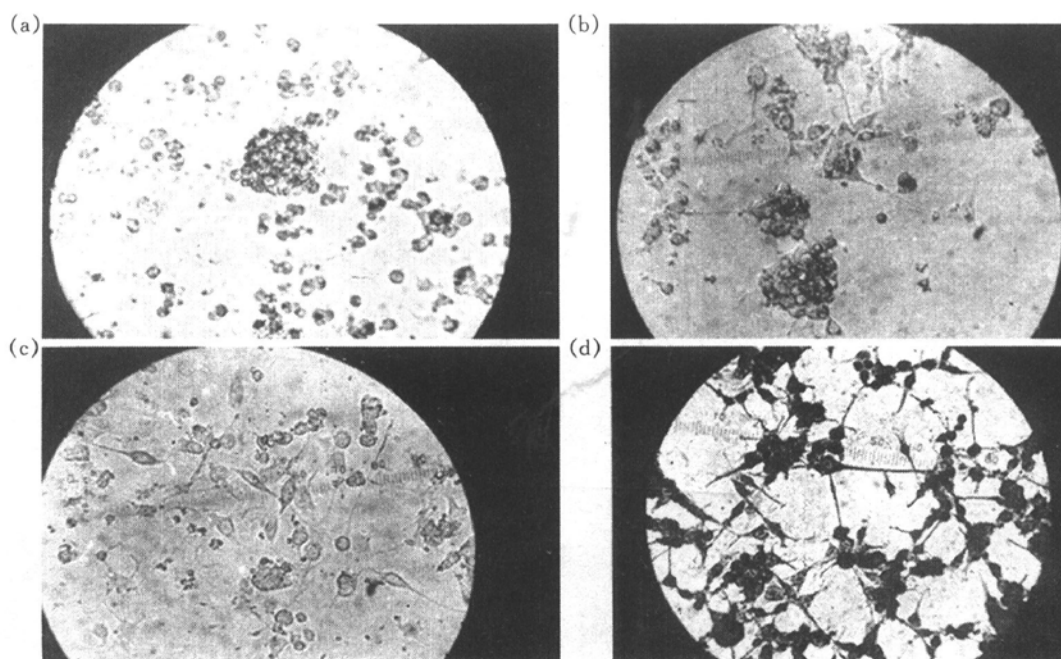


图 1 白眉蝮蛇蛇毒 NGF (50 $\mu\text{g/L}$) 促进 PC12 细胞生长的照片

(a) 对照; (b), (c), (d) 分别为用 50 $\mu\text{g/L}$ NGF 处理细胞 2 d, 4 d 和 8 d.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: PC12 细胞接种于含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 置 5% CO_2 培养箱中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 每 36 小时换一次培养基, 实验用对数生长期的细胞.

1.2.2 细胞提取液的制备^[7]: 收集对数生长期之细胞, 用无血清培养液 (RPMI 1640 10.4 g, 加三蒸水至 1 L, 调 pH 值至 7.2, G6 漏斗过滤除菌)

洗两次, 向细胞加入无血清培养液使细胞数为 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵箱平衡 4 h, 离心去培养液, 细胞分为对照组和处理组. 分别加入无血清培养液和含不同浓度 *A. halys* 蛇毒 NGF 的无血清培养液, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵箱中培养 1 h. 取 2×10^7 个细胞, 用含 1 mmol/L Na_3VO_4 的冰冷的 PBS 5 ml 洗一次, 离心收集细胞, 加 0.5 ml 细胞溶解液溶解 20 min (4 $^{\circ}\text{C}$), 冰水浴中超声 15 min, 以

10 000 r/min 离心 15 min (4℃), 上清液为细胞提取液, 用 Lowry 法测定蛋白含量. -70℃ 贮存, 备用.

1.2.3 蛋白质印迹: 取 100 μg 细胞提取液的蛋白质采用文献 [8] 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶不连续电泳系统, 进行垂直板电泳, 浓缩胶中电压 100 V, 分离胶中电压 150 V, 电泳 4 h. 电泳后的分离胶在转移缓冲液 (39 mmol/L 甘氨酸, 48 mmol/L Tris, 0.037% SDS, 20% 甲醇) 中平衡 30 min. 硝酸纤维素膜在蒸馏水中浸泡 20 min, 然后在转移缓冲液中平衡 1 h, 滤纸在转移缓冲液中浸泡 30 min, 在 LKB 2117 多功能电泳仪上进行蛋白质印迹电泳. 印迹后的膜用含 5% BSA 的 TBS (20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl) 封闭 2 h (室温), 用含 0.05% 吐温 20 的 TBS (TTBS) 洗两次. 在对 MAPK 特异的兔多克隆抗体 ERK1 或对 MAPKK 特异的兔多克隆抗体 MAPKK-XI 中孵育过夜 (室温). 次日, 用 TTBS 将膜洗两次, 在生物素化的羊抗兔 IgG (用 1% BSA-TTBS, 1:3 000 稀释) 中孵育 2 h (室温). 膜用 TTBS 洗两次, 用 TBS 洗一次, 在 ABC 试剂中放置 2 h, 用 0.05% DAB 显色 5 min, 对显色带在 500 nm 进行扫描定量, 并拍照.

1.2.4 MAPK 活性测定: 取 2 g/L 髓鞘碱性蛋白 10 μl, 加 20 μl 缓冲液 (12.5 mmol/L MOPS, pH 7.2, 12.5 mmol/L β-磷酸甘油, 7.5 mmol/L MgCO₃, 0.5 mmol/L EGTA, 0.05 mmol/L NaF, 2 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L 钒酸钠, 25 mg/L

BSA, 100 μmol/L ATP). 50 μmol/L [γ -³²P] ATP 和 100 μg 用 *A. halys* 蛇毒 NGF 处理 1 h 的 PC12 细胞提取液的蛋白质, 在 30℃ 反应 15 min, 加反应终止液 (1 ml 2 mol/L Tris, pH 6.8, 2 ml 20% SDS, 4 ml 甘油, 3 ml 蒸馏水, 308 mg DTT) 10 μl, 使反应停止, 然后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 取出后用蒸馏水漂洗, 干燥, 使用 Fuji X-ray 胶片在 4℃ 放射自显影 48 h, 对显色带进行光密度扫描定量. 分离胶置考马斯亮蓝 R250 液 (R250 1.0 g, 甲醇 225 ml, 乙酸 50 ml, 加蒸馏水至 500 ml) 中染色. 拍照.

2 结 果

2.1 蛇毒 NGF 对 PC12 细胞 MAPK 及 MAPKK 表达与活性的影响

图 2 和图 3 是 PC12 细胞用不同浓度的蛇毒 NGF (25、50、100 μg/L) 处理 1 h, 经蛋白质印迹及免疫染色后的结果, 由图 2 及图 3 可见, *A. halys* 蛇毒 NGF 使 PC12 细胞的 MAPK 和 MAPKK 的表达明显增强, 当蛇毒 NGF 浓度在作者所用的 25~100 μg/L 范围内, 随浓度的增加, 酶的表达呈线性增加.

图 4 为蛇毒 NGF 影响 PC12 细胞 MAPK 和 MAPKK 表达的时间曲线, 从图 4 可见, PC12 细胞经蛇毒 NGF (50 μg/L) 在 37℃ 5% CO₂ 孵箱中培养 90 min 的过程中, MAPK 和 MAPKK 的表达在 60 min 时达最高, 90 min 时又下降至起始表达量.

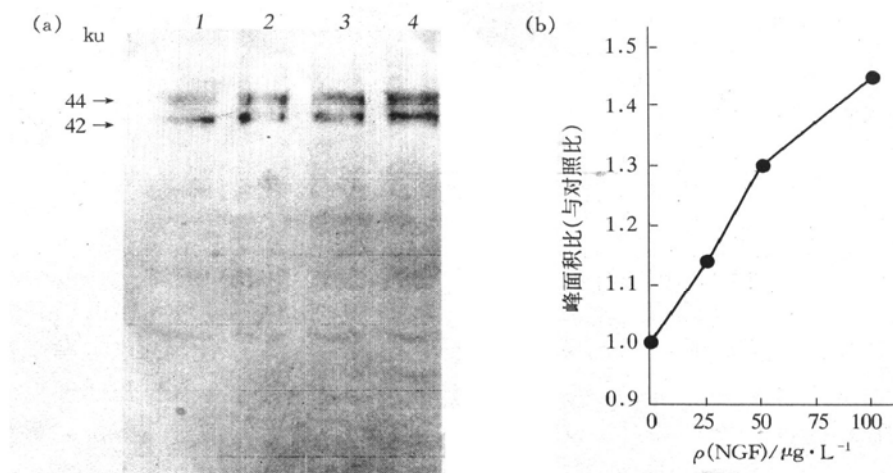


图 2 白眉蝮蛇蛇毒 NGF 对 PC12 细胞 MAPK 表达的影响

用 NGF 处理 PC12 细胞, 将细胞提取液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白质印迹, 然后用抗 ERK1 抗体免疫染色. (a) 蛋白质印迹免疫染色照片, 1: 对照; 2、3、4: 分别代表用 25、50、100 μg/L NGF 处理细胞. (b) 44 ku 染色区带的密度扫描结果, 纵坐标为对应染色区带密度扫描所得峰的峰面积 (为两次实验的平均值).

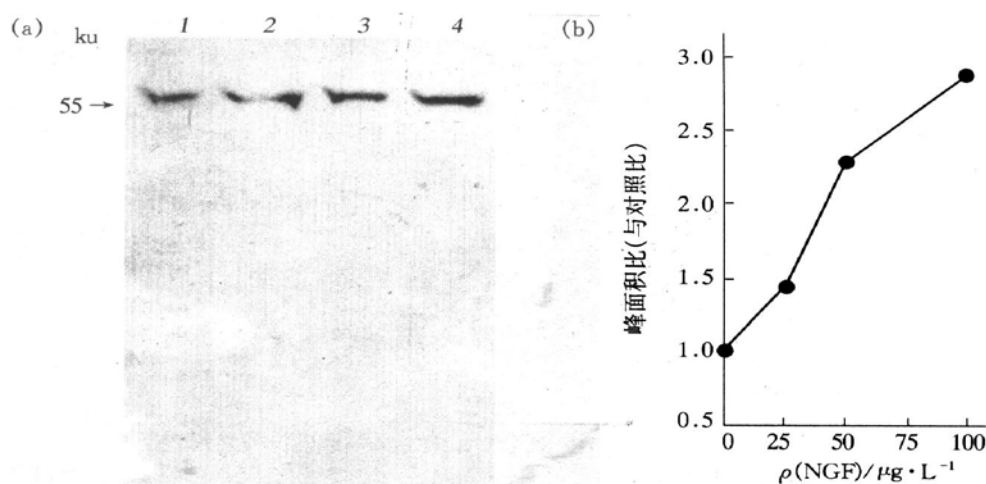


图3 白眉蝮蛇蛇毒 NGF 对 PC12 细胞 MAPKK 表达的影响

用 NGF 处理 PC12 细胞, 将细胞提取液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白质印迹, 然后用抗 MAPKK-XI 抗体免疫染色. (a) 蛋白质印迹免疫染色照片, 1: 对照; 2、3、4: 分别用 25、50、100 $\mu\text{g/L}$ NGF 处理细胞. (b) 55 ku 染色区带的密度扫描结果, 纵坐标为对应染色区带密度扫描所得峰的峰面积 (为两次试验的平均值).

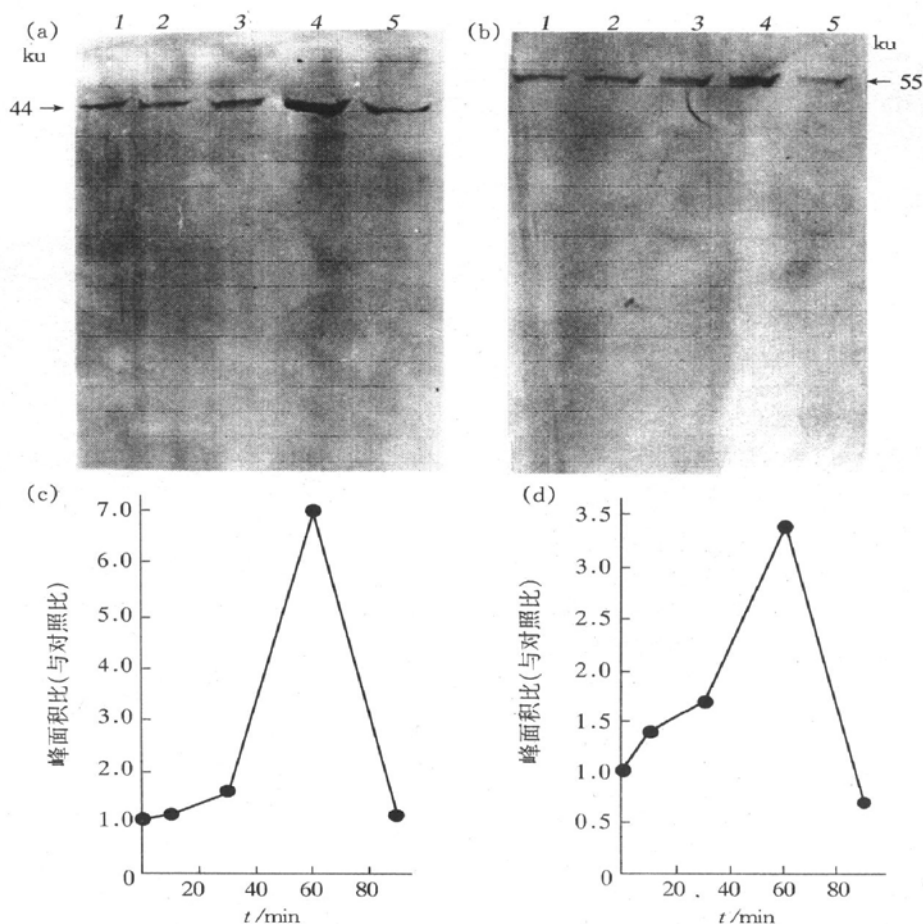


图4 白眉蝮蛇蛇毒 NGF (50 $\mu\text{g/L}$) 影响 PC12 细胞表达 MAPK 和 MAPKK 的时间进程

(a) 显示 ERK1 的蛋白质印迹免疫染色照片, (b) 显示 MAPKK-XI 的蛋白质印迹免疫染色照片, (c) 为 (a) 的密度扫描结果; (d) 为 (b) 的密度扫描结果. 1: 对照; 2、3、4、5: 分别用 50 $\mu\text{g/L}$ NGF 处理细胞 10、30、60、90 min.

图 5 为不同浓度蛇毒 NGF (25、50、100 $\mu\text{g/L}$) 处理 PC12 细胞后, MAPK 活性发生变化, 影响 MBP 磷酸化的放射自显影图谱. 由图 5

可见, *A. halys* 蛇毒 NGF 能提高 MAPK 活性, 使 MBP 磷酸化增加, 随着蛇毒 NGF 浓度的提高其激活 MAPK 活性的作用加强.

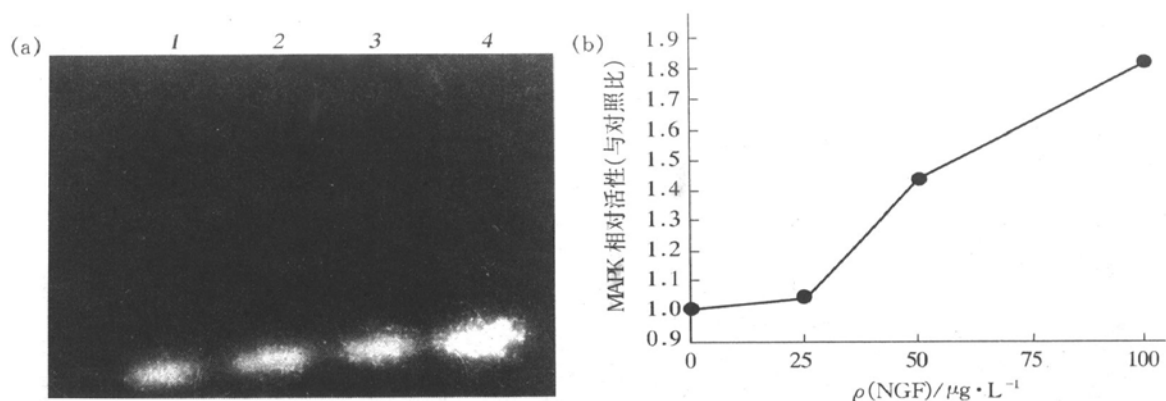


图5 白眉蝮蛇毒 NGF 对 PC12 细胞 MAPK 活性的影响

(a) 通过 MBP 放射活性表示 ERK1 活性的放射自显影照片。1: 对照; 2、3、4: 分别用 25、50、100 $\mu\text{g/L}$ NGF 处理细胞。(b) 对 (a) 放射自显影照片进行密度扫描所得放射强度曲线。

2.2 H-7 对 MAPK 和 MAPKK 表达的影响

用 PKC 抑制剂 H-7 对 PC12 细胞预处理 1 h, 然后用不同浓度的蛇毒 NGF (25、50、100 $\mu\text{g/L}$) 处理 1 h, 结果显示, MAPK 和 MAPKK 的表达比

未用 H-7 处理的 PC12 细胞的 MAPK 和 MAPKK 的表达明显减少 (图 6), 说明 *A. halys* 蛇毒 NGF 激活的 MAPK、MAPKK 的表达增加依赖于 PKC。

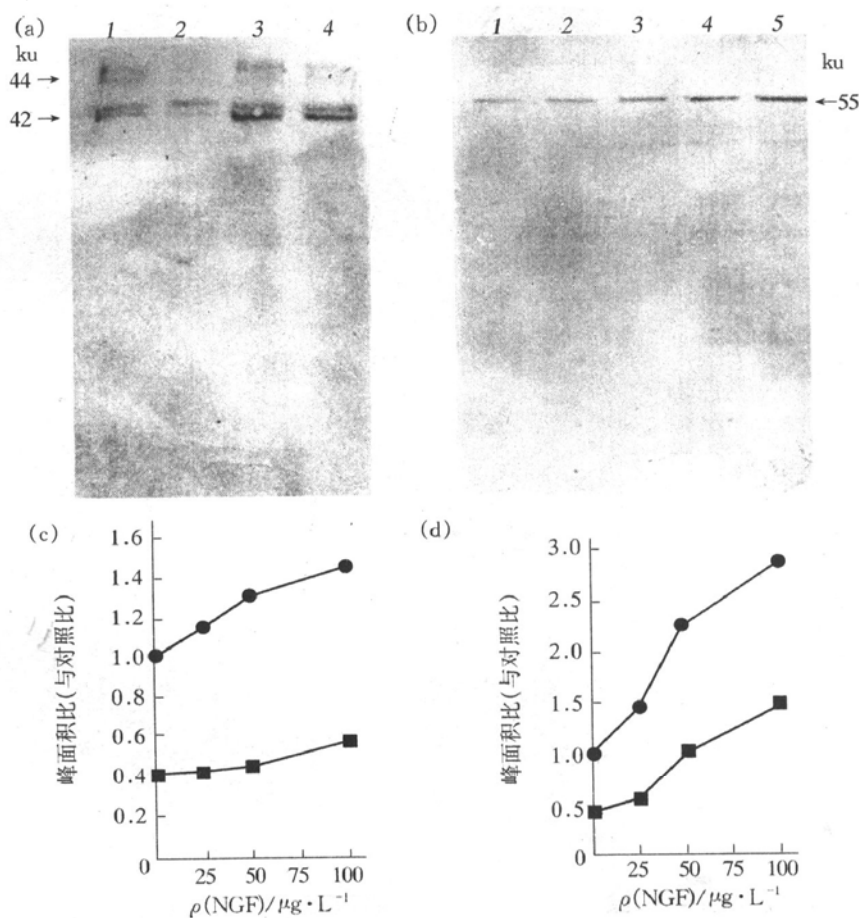


图6 H-7 对白眉蝮蛇毒 NGF 诱导的 PC12 细胞的 MAPK 和 MAPKK 表达的影响

用 PKC 抑制剂 H-7 (60 mmol/L) 处理 PC12 细胞 1 h, 然后用不同浓度的 NGF (25、50、100 $\mu\text{g/L}$) 处理 1 h. (a) ERK1 的蛋白质印迹免疫染色照片, 1: 对照 (仅加 H-7, 无 NGF); 2、3、4: 用 H-7 及分别用 25、50、100 $\mu\text{g/L}$ NGF 处理细胞。(b) MAPKK-XI 的蛋白质印迹免疫染色照片, 1: 对照 (仅加 H-7, 无 NGF); 2: 对照 (无 H-7 及 NGF); 3、4、5: 用 H-7 及分别用 25、50、100 $\mu\text{g/L}$ NGF 处理细胞。(c) ■—■ 曲线为图 6a 中 44 ku 染色区带的密度扫描曲线, ●—● 曲线引自图 2b. (d) ■—■ 曲线为图 6b 中 55 ku 染色区带的密度扫描曲线, ●—● 曲线引自图 3b. ●—●: NGF; ■—■: H7 和 NGF.

3 讨 论

PC12 细胞系是研究 NGF 功能和作用机制常用的细胞系。NGF 能促进 PC12 细胞的分化, 虽然这一作用的机制不十分清楚, 但已有文献报道 NGF 能诱导 PC12 细胞蛋白质磷酸化^[9, 10]。磷酸化瀑布在有丝分裂原所始动的信息传递途径中起重要作用, MAPK 是磷酸化瀑布中涉及的激酶之一^[11], 它可被有丝分裂原和促分化因子激活。有丝分裂原表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和促分化因子 NGF 均能诱导 MAPK 的活化。EGF 诱导的 MAPK 的活化不依赖于 PKC, NGF 诱导的 MAPK 的活化依赖于 PKC^[12]。实验结果表明, 我国特产的长白白眉蝮蛇 (*A. halys*) 其蛇毒 NGF 能使 MAPK 和 MAPKK 的表达以及 MAPK 的活性明显增加, 当浓度在作者所用的 25~100 $\mu\text{g/L}$ 范围内, 随浓度的增加, MAPK 和 MAPKK 的表达与活性呈线性增加。此结果提示 *A. halys* 蛇毒 NGF 能激活 MAPK 和 MAPKK。用 PKC 抑制剂 H-7 对 PC12 细胞预处理 1 h, 然后用蛇毒 NGF 处理 1 h, 结果显示, MAPK 和 MAPKK 的蛋白质量较未用 H-7 处理的 PC12 细胞的蛋白质量明显减少, 表明 *A. halys* 蛇毒 NGF 激活的 MAPK 和 MAPKK 表达的增加至少部分地依赖于 PKC。PKC 在 MAPK 和 MAPKK 的上游对 Ras-MAPK 途径正向调节, 其正调节作用表现在: PKC 抑制 Ras-GDP 的转化和直接活化 Raf-1^[13]。H-7 抑制 PKC 的活性, 从而抑制 PKC 对 Ras-MAPK 途径的正调节, 使依赖于 PKC 的蛇毒 NGF 诱导的 MAPK 表达的增加受到抑制, 显示出蛋白质印迹中的免疫染色带明显变窄, 扫描得到的峰面积值明显小。时间进程曲线的结果表明, PC12 细胞经 *A. halys* 蛇毒 NGF (50 $\mu\text{g/L}$) 处理不同时间后, 在 60 min 时, MAPK 和 MAPKK 表达的激活作用最大, 所以在其他实验中, 被试物均对细胞处理 1 h。

细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinases, ERKs) 是典型的 MAPK, 其家族的三个成员 ERK1、ERK2 和 ERK3 已被克隆并测序^[14, 15]。ERK1 和 ERK2 属于 S/T 蛋白激酶家族, 它们的激活需要在 Y 和 T 残基上同时磷酸化^[16]。细胞外信使例如胰岛素、NGF、佛波酯可增加 ERK 活性^[17]。本文首次证实了 *A. halys* NGF 对 ERK 活性的影响。ERK1 抗体是对 ERK1 特异的兔多克隆抗体, 是对应于大鼠 44 ku ERK1 蛋白

的羧基端 352 到 367 位氨基酸的肽段。识别 44 ku ERK1, 与 42 ku ERK2 有交叉反应。从图 1 可见, *A. halys* NGF 在影响 44 ku ERK1 表达的同时, 与 42 ku 的 ERK2 有交叉反应, 对其影响与对 ERK1 表达的影响相似。

MAPK 激酶 (MAPKK) 是 MAPK 瀑布的一个环节, 它是一种对底物中 Y 和 S/T 残基具有双重特异性的蛋白激酶, 通过催化 MAPK 调节部位 TEY-序列中的 T 与 Y 残基的双磷酸化激活 MAPK。*A. halys* NGF 不仅影响 MAPK 表达, 而且对 MAPKK 的表达也有影响, 是否对 MAPK 表达的来源于对 MAPKK 表达的影响, NGF 对 MAPK 瀑布的影响其作用位点是什么? 是需要继续探讨的课题。

我们知道, MAPK 的激活是与细胞分裂的加强相联系的, 有丝分裂原和促分化因子均能诱导 MAPK 的活化, 因此, 我们有理由相信, MAPK 瀑布参与许多生命过程, 特别是在调节细胞分裂增殖到停止增殖进而分化的过程中起重要作用。

参 考 文 献

- 1 Davis R J. The MAPK signal transduction pathway. *J Biol Chem*, 1993, **268** (20): 14553~14556
- 2 Nishida E, Gotoh Y. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *TIBS*, 1993, **18** (April): 128~131
- 3 Pelech S L, Charest D L, Mordret G P, *et al.* Networking with MAP kinases. *Mol Cell Biochem*, 1993, **127/128** (November): 157
- 4 Tombes R M, Auer K L, Mikkelsen R, *et al.* The mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade can either stimulate or inhibit DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes depending upon whether its activation is acute/phasal or chronic. *Biochem J (England)*, 1998, **330** (Pt 3): 1451~1460
- 5 Xing J, Kornhauser J M, Xia Z, *et al.* Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol (United States)*, 1998, **18** (4): 1946~1955
- 6 Rozlari G, Erhardt P, Cooner G M, *et al.* Intact Ras function is required for sustained activation and nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinases in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *Eur J Cell Biol (Germany)*, 1998, **75** (1): 54~58
- 7 Victor I, Schwenger P, Wei L, *et al.* Tumor necrosis factor-induced activation and increased tyrosine phosphorylation of MAPK in human fibroblasts. *J Biol Chem*, 1993, **268** (25): 18994~18999
- 8 Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 1990, **61** (April 20): 203~212
- 9 Halegona S, Patrick J. Nerve growth factor mediated phosphorylation of specific proteins. *Cell*, 1980, **22** (November): 571~581

- 10 End D, Tolson N, Hashimoto S, *et al.* Nerve growth factor-induced decrease in the cell-free phosphorylation of a soluble protein in PC12 cells. *J Biol Chem*, 1983, **258** (10): 6549~ 6555
- 11 Ray L B, Sturgill T W. Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*, 1988, **263** (25): 12721~ 12727
- 12 Gotoh Y, Nishida E, Yamashita T, *et al.* Microtubule-associated protein (MAP) kinase activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. *Eur J Biochem*, 1990, **193** (3): 661~ 669
- 13 朱锦芳, 郑仲承, 刘新垣. 细胞因子受体及其介导的信号转导. *生命的化学*, 1996, **16** (3): 14~ 17
Zhu J F, Zheng Z C, Liu X Y. *Chemistry of life*, 1996, **16** (3): 14~ 17
- 14 Boulton T G, Cobb M H. Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regulation*, 1991, **2**: 357~ 371
- 15 Boulton T G, Gregory J S, Cobb M H. Purification and properties of ERK1, an insulin-stimulated MAP2 protein kinase. *Biochemistry*, 1991, **30** (1): 278~ 286
- 16 Crews C M, Alessandrini A, Erikson R L. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*, 1992, **258** (16): 478~ 480
- 17 Thomas S M, Demarco M, D'Arcangelo G, *et al.* Ras is essential for nerve growth factor and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinase. *Cell*, 1992, **68** (20): 1031~ 1040

Effect of Nerve Growth Factor from the Venom of *A. halys* on the Expression of Mitogen-activated Protein Kinases of PC12 Cells. QIN Li-Ya, LIU Yu-Xin, ZHANG Lei, SONG Ling-Li (*Dalian Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Dalian 116013, China*); CUI Zhao-Chun (*Dalian Medical University, Dalian 116027, China*).

Abstract Mitogen activated protein kinase (MAPK) is a group of important protein kinases involved in phosphorylation cascade in the mitogen-initiated signal transduction pathways. NGF from *Agkistrodon halys* has been used to investigate its effects on MAPK and MAPKK of PC12 cells. The results showed that this kind of NGF increased MAPK and MAPKK expression and MAPK activity. The above increases were NGF concentration dependent in the range of 25~ 100 µg/L. The use of PKC inhibitor H-7 indicated that the increased expressions of MAPK and MAPKK expression were PKC-dependent.

Key words mitogen activated protein kinase, nerve growth factor, *Agkistrodon halys*, snake venom, PC12 cell

辐射敏感细胞 ku80 基因突变及其 DNA 结合活性研究*

江国春 袁丽珍 郭学敏 魏 康 张雪峰 贾向旭

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 RT-PCR 克隆辐射敏感细胞及其亲本细胞的 ku80 基因 cDNA, 发现辐射敏感细胞的 ku80 基因与双链断裂 DNA 末端相互作用的位置存在基因突变, 用凝胶阻滞和 DNA-蛋白质印迹进一步证实突变 ku 基因编码蛋白结合双链断裂末端 DNA 的能力下降, 暗示其细胞辐射敏感性可能与 Ku 蛋白功能异常有关。

关键词 ku 基因, DNA-PK, 细胞辐射敏感性, 基因突变

学科分类号 Q75

DNA 双链断裂 (DSB) 可由电离辐射等直接形成, 也可由一些间接因素所产生, 如由抗体成熟过程中 V (D) J 重组时产生。由于 DSB 能破坏基因组的完整性, 因而对细胞具有潜在的威胁。细胞内存在一套完整的机制对 DSB 进行修复, 其中就包括许多 DNA 双链断裂修复基因, 如 XRCC4、XRCC5、XRCC6 和 XRCC7 等, 这些 DNA 修复基因的功能异常将使细胞 DSB 修复缺陷, 对辐射超敏感, 因而越来越引起人们的重视^[1,2]。SX-9 细胞是小鼠乳腺癌细胞 SR-1 经化学诱变而形成的辐射

敏感细胞, 我们以前的研究发现其 DNA 损伤修复缺陷^[3], 最近文献报道 DNA-PK 激酶活性降低, 与 ku80 基因正常细胞融合后存活率提高, 因而提示其辐射敏感性与 ku80 基因异常有关^[4,5]。本文通过对 SX-9 细胞和 SR-1 细胞 ku80 基因片段的克隆, 研究对辐射敏感 SX-9 细胞 ku 基因的功能异常对双链断裂 DNA 结合能力的影响。

* 国家自然科学基金资助项目 (39900031)。

Tel: (010) 66931233, E-mail: jianggc@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 1999-05-04, 修回日期: 1999-10-15