



研究报告

幽门螺杆菌临床分离株 CagA 的序列比对及其对胃上皮细胞形态与功能的影响

全欣莹^{1,2} 曾晓燕^{1,2} 熊林³ 王文玲⁴ 赵艳^{1,2} 谢渊^{1,2} 王琴容^{1,2}
张启芳^{1,2} 周建奖^{*1,2}

1 贵州医科大学地方病与少数民族疾病教育部重点实验室 贵州 贵阳 550004

2 贵州医科大学分子生物学重点实验室 贵州 贵阳 550004

3 遵义市第一人民医院检验科 贵州 遵义 563100

4 贵州省肿瘤医院腹部肿瘤科 贵州 贵阳 550001

摘要:【背景】细胞毒素相关基因 A 蛋白(Cytotoxin Associated Gene A Protein, CagA)是幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)重要的效应蛋白, CagA 的多态性与胃癌的发生发展密切相关。【目的】比较幽门螺杆菌临床分离株的 CagA 结构差异, 探讨不同 CagA 对胃上皮细胞形态及功能的影响。【方法】对 27 株幽门螺杆菌的 CagA 序列进行比对, 分析氨基酸组成差异及变异情况, 用含不同 CagA 序列的 5 株 *H. pylori* 感染低恶性胃上皮细胞 AGS 6 h, 感染复数(Multiplicity of Infection, MOI)为 30:1, 显微镜观察细胞形态变化, Western Blot 法检测极性调节激酶 1b (Polarity-Regulating Kinase 1b, PAR1b)的表达, ELISA 检测培养液中白介素 8 (Interleukin-8, IL-8)的浓度。【结果】临床分离株的 CagA 存在结构和氨基酸组成差异, 西方株的 EPIYA 基序存在更多变异, 具有完整 *cagA* 基因的菌株感染后细胞形态发生显著变化。Western Blot 分析结果显示: 与对照组比较, 西方株 NCTC 11639 和 *H. pylori* 26695 感染的细胞中 PAR1b 的表达升高, 而东亚株 *H. pylori* GZ7 感染的细胞中 PAR1b 表达降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 突变株 *H. pylori* GZ15 及 *H. pylori* GZ7/ Δ *cagA* 感染后 PAR1b 的表达无显著变化。与对照组比较, 实验组中 *H. pylori* 感染的细胞培养液中 IL-8 浓度均增加, 东亚株促进 IL-8 分泌的能力大于西方株。【结论】含不同 CagA 的幽门螺杆菌发挥不同的生物学功能。东亚株能抑制 PAR1b 的表达, 促进 IL-8 分泌的能力更强, *H. pylori* 感染引起的细胞形态变化依赖 *cagA* 基因的完整性。

关键词: 幽门螺杆菌, 细胞毒素相关基因 A 蛋白, EPIYA 基序, 极性调节激酶 1b, 白介素 8

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31760328); Natural Science Foundation of Guizhou Province ([2017] 5652, [2016] 1416); Guiyang Science and Technology Project ([2017] 30-4); Science Foundation of Guizhou Provincial Education Department (KY [2018] 020)

***Corresponding author:** E-mail: jianjiangzhou@sina.cn

Received: 06-07-2020; **Accepted:** 18-11-2020; **Published online:** 24-02-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31760328); 贵州省自然科学基金(黔科合平台人才[2017] 5652, 黔科合基础[2016] 1416); 贵阳市科技计划(筑科合同[2017] 30-4); 贵州省教育厅研究项目(黔科合 KY [2018] 020)

***通信作者:** E-mail: jianjiangzhou@sina.cn

收稿日期: 2020-07-06; **接受日期:** 2020-11-18; **网络首发日期:** 2021-02-24

Sequence of *Helicobacter pylori* clinical isolate CagA and its effect on the morphology and function of gastric epithelial cells

QUAN Xinying^{1,2} ZENG Xiaoyan^{1,2} XIONG Lin³ WANG Wenling⁴ ZHAO Yan^{1,2}
XIE Yuan^{1,2} WANG Qinrong^{1,2} ZHANG Qifang^{1,2} ZHOU Jianjiang^{*1,2}

1 Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education; Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China

2 Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China

3 Department of Clinical Laboratory of the First People's Hospital of Zunyi City, Zunyi, Guizhou 563100, China

4 Department of Abdominal Tumor of Guizhou Cancer Hospital, Guiyang, Guizhou 550001, China

Abstract: [Background] Cytotoxin associated gene A protein (CagA) is one of the most important effectors of *Helicobacter pylori*, and its polymorphism is suggested to be involved in the development and progression of gastric carcinoma. **[Objective]** To compare the structural differences of CagA as an *H. pylori* clinical isolate, and explore its effects on the morphology and function of gastric epithelial cells. **[Methods]** A total of 27 sequences of CagA were analyzed to reveal the differences in composition and amino acids variation. Five *H. pylori* strains containing different CagA sequences were used to infect low malignant gastric epithelial AGS cells for 6 hours at a multiplicity of infection (MOI) of 30. Then the cell morphology was observed by the microscope and the expression of polarity-regulating kinase 1b (PAR1b) was determined by the Western Blot. Finally, the concentration of interleukin-8 (IL-8) in the medium was detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **[Results]** It was found that there were differences in the structure and composition of amino acid of CagA. In particular, the EPIYA motifs of Western strains was detected with more variation, and the cell morphology of the strain with the intact CagA gene changed significantly after infection. Compared with the control group, the expression of PAR1b in the AGS cells infected with Western strains of NCTC 11639 and 26695 increased significantly, while expression of PAR1b in the cells infected with East Asian strain GZ7 decreased significantly, and both of the differences were statistically significant ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in the expression of PAR1b in the AGS cells infected with *H. pylori* GZ15 and *H. pylori* GZ7/ $\Delta cagA$. The concentration of IL-8 in the experimental group was higher than that in the control group for East Asia and Western strains ($P < 0.05$). Furthermore, the potential of East Asia strains to promote IL-8 secretion was greater than that of Western strains. **[Conclusion]** *H. pylori* containing different CagA performs different biological functions. The East Asian strains can inhibit the expression of PAR1b and have a more vital ability to promote the secretion of IL-8. In addition, the changes in cell morphology caused by *H. pylori* depend on the integrity of the *cagA*.

Keywords: *Helicobacter pylori*, CagA, EPIYA motif, PAR1b, IL-8

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)属于革兰氏阴性杆菌,具有遗传多样性,与人类慢性胃炎、消化性溃疡和胃癌的发生密切相关^[1]。细胞毒素相关基因 A 蛋白(Cytotoxin Associated Gene A Protein, CagA)是由 *H. pylori* 基因组编码并分泌的重要效应因子^[2]。当 CagA 阳性菌感染人胃上皮细胞后发生酪氨酸磷酸化,该磷酸化发生于 CagA 蛋白 C 端可变区的谷氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-酪氨酸-丙氨酸基

序(Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala, EPIYA Motif)上^[3]。根据 EPIYA 基序两侧的氨基酸序列将其分为 4 个不同类型: EPIYA-A、EPIYA-B、EPIYA-C 和 EPIYA-D。典型的东亚菌株包含 EPIYA-A、-B 和-D,西方菌株包含 EPIYA-A、-B 和-C^[4]。CagA 的 C 端还含有 CagA 多聚化基序(CagA Multimerization Motif, CM Motif),能募集并结合极性调节激酶 1b (Polarity-Regulating Kinase 1b, PAR1b),

CagA-PAR1b 相互作用引起细胞连接和极性缺陷^[5]。有研究报道 *H. pylori* 感染后诱导白介素 8 (Interleukin-8, IL-8) 的表达增加, 过表达的 IL-8 可增加胃癌细胞的黏附和迁移活动, 与胃癌风险有显著的相关性^[6-8]。由于菌株之间 CagA 蛋白的 EPIYA 基序数目及其间隔的氨基酸序列不同, 导致 CagA 蛋白的多态性和毒力存在差异^[9], 但这种差异是否引起宿主细胞形态和功能的差异, 目前仍未完全清楚。本研究用课题组分离的 *H. pylori* 临床菌株, 比较东亚和西方菌株 CagA 的结构差异, 探讨不同 CagA 对胃上皮细胞形态及功能的影响, 以期对不同 *H. pylori* 的致病机制提供更多线索。

1 材料与方法

1.1 菌株和主要试剂及仪器

NCTC11639 和 *H. pylori* 26695 西方株由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所惠赠; *H. pylori* GZ7 和 *H. pylori* GZ15 东亚株由课题组分离于临床胃黏膜并鉴定和保存^[10]; *H. pylori* GZ15 缺少 CagA 的 C-末端(含 EPIYA 基序和 CM 基序); *H. pylori* GZ7/ Δ cagA 为 *H. pylori* GZ7 菌株敲除 cagA 基因; 人低恶性胃上皮细胞株 AGS 购于 ATCC 细胞库(编号 CRL-1739)。

H. pylori 选择剂, Oxiod 公司; PAR1b 一抗, R&D Systems 公司; 马抗鼠二抗和细胞裂解液, Cell Signaling Technology 公司; 人 IL-8 ELISA 检测试剂盒, 中国欣博盛生物技术公司; RPMI-1640 培养液, Thermo Fisher 公司; Bicinchoninic Acid (BCA) 蛋白浓度测定试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司。多功能酶标仪, 塞默飞世尔科技(中国)有限公司; 化学发光及凝胶成像仪, 广州仪涛科学仪器有限公司。

1.2 *H. pylori* 培养

H. pylori 接种于 39 g/L 的哥伦比亚血平板(含 10% 绵羊血和 0.4% 选择剂), 置于含微需氧产气袋 (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) 的厌氧罐 37 °C 恒温培养 3-4 d。 *H. pylori* 100 °C 煮沸 30 min 感染细胞作为对照。

1.3 细胞培养

AGS 细胞用含有 10% 胎牛血清、双抗(青霉素 10 mg/mL, 链霉素 10 mg/mL) 的 RPMI-1640 培养液, 5% CO₂、37 °C 恒温培养。当 T25 培养瓶中细胞贴壁生长密度达到 80%-90% 时进行传代, 培养至 90% 融合时备用。

1.4 *H. pylori* 感染人低恶性胃上皮细胞株 AGS

H. pylori 感染前换成无血清无双抗 RPMI-1640 培养基培养 AGS 细胞, 用 NCTC 11639、*H. pylori* 26695、*H. pylori* GZ15、*H. pylori* GZ7、*H. pylori* GZ7/ Δ cagA 以 MOI 为 30:1 感染 AGS 细胞 6 h, 用倒置显微镜观察细胞形态并收集培养液和细胞蛋白备用。

1.5 氨基酸组成及变异分析

用 DNASTar 7.1 软件将课题组上传至 GenBank 的 27 株 cagA 基因转换成氨基酸序列, 登录号为 KR154731-KR154757 和 GQ161098-GQ161099, 分析数量差异, 使用 ClustalX 软件进行多序列比对, 分析变异情况。

1.6 Western Blot 法检测 PAR1b 蛋白的表达

细胞裂解液裂解细胞后用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对总蛋白定量, 进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后将蛋白转至 PVDF 膜, 用 5% BSA 封闭, 一抗用 PAR1b 鼠单克隆抗体, 二抗用马抗鼠, 进行 Western Blot, 分析比较 PAR1b 蛋白的相对表达水平。

1.7 ELISA 检测 *H. pylori* 感染 AGS 后培养液中 IL-8 的含量

IL-8 的含量检测按照人 IL-8 ELISA 检测试剂盒说明书操作: 取出试验所需板条, 加入细胞培养液或标准品 100 μ L/孔, 37 °C 孵育 90 min, 加入生物素化抗体工作液(100 μ L/孔), 37 °C 孵育 60 min, 加入酶结合物工作液(100 μ L/孔), 37 °C 避光 30 min, 加入显色底物(Tetramethyl Benzidine, TMB) 100 μ L/孔, 37 °C 避光孵育 15 min, 加入终止液 100 μ L/孔, 混匀后测量 450 nm 处 OD 值, 同时用 BCA 法定量培养液中的总蛋白, IL-8 的含量以 pg/mg 为单位。

1.8 统计学分析

应用 SPSS 22.0 软件进行统计, 采用独立样本

t 检验对氨基酸数量、蛋白表达量及 IL-8 的含量进行分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 CagA 蛋白 EPIYA 基序变异特征

用 DNASTar 7.1 软件将 27 株临床分离株的

cagA 基因序列翻译成氨基酸序列进行比对, 分析其结构特征。结果发现 27 株 *H. pylori* 中有 13 株 (48%) 的 EPIYA 基序发生氨基酸的变异, 其中 EPIYA-B 基序的 A→T 突变及 EPIYA-C 缺失变异最多(表 1), 推测这些变异可能影响 CagA 的功能。

表 1 CagA 的 EPIYA 基序特征

Table 1 Characteristics of EPIYA motifs in CagA from clinical isolates

菌株 Strains	登录号 GenBank accession No.	疾病来源 Diseases of strain origin	基序 EPIYA motif	类别 Classification	变异 Variation	
					Site	Type
GZ1	KR154731	Chronic gastritis	ABD	East Asia	No	
GZ2	KR154732	Gastric ulcer	ABD	East Asia	No	
GZ3	KR154733	Atrophic gastritis	ABD	East Asia	No	
GZ4	KR154734	Atrophic gastritis	ABD	East Asia	No	
GZ7	KR154737	Gastric cancer	ABD	East Asia	No	
GZ8	KR154738	Gastric ulcer	ABD [#]	East Asia	EPIYA-D	A→V
GZ12	KR154742	Chronic gastritis	ABD	East Asia	No	
GZ13	KR154743	Gastric ulcer	ABD	East Asia	No	
GZ16	KR154745	Gastric ulcer	ABD	East Asia	No	
GZ17 ^a	KR154746	Gastritis	ABD	East Asia	No	
GZ18 ^a	KR154747	Gastritis	ABD	East Asia	No	
GZ19	KR154748	Gastritis	AB [#] D	East Asia	EPIYA-B	P→S
GZ20	KR154749	Gastric ulcer	ABD	East Asia	No	
GZ21	KR154750	Chronic gastritis	ABD	East Asia	No	
GZ23	KR154752	Gastritis	ABD	East Asia	No	
GZ25	KR154754	Gastromrhagia	ABD	East Asia	No	
GZ26	KR154755	Gastric ulcer	ABD [#]	East Asia	EPIYA-D	A→V
GZ27	KR154756	Atrophic gastritis	BD	East Asia	EPIYA-A	Deletion
GZ15 ^{&}	Unsubmitted	Gastric ulcer	Unclassified	Unsubmitted	EPIYA	Deletion
GZ5	KR154735	Chronic gastritis	AB [#] C	Western	EPIYA-B	A→T
GZ6	KR154736	Gastric cancer	AB [#] C	Western	EPIYA-B	A→T
GZ9	KR154739	Gastric ulcer	AB	Western	EPIYA-C	Deletion
GZ10	KR154740	Chronic gastritis	AB [#] C	Western	EPIYA-B	A→T
GZ14	KR154744	Gastritis	AB	Western	EPIYA-C	Deletion
GZ22	KR154751	Gastric ulcer	AB	Western	EPIYA-C	Deletion
NCTC11637 [*]	GQ161098	Purchased strains	AB	Western	EPIYA-C	Deletion
NCTC11639 [*]	GQ161099	Donated by the CDC	AB [#] C	Western	EPIYA-B	A→T
26695 [*]	KR154758	Donated by the CDC	AB [#] C	Western	EPIYA-B	A→T

注: ABC/D: EPIYA-A、-B 和 -C/D 位点; ^a: 来源于同一病人的菌株; ^{*}: 由中国 *H. pylori* 菌株管理与保藏中心惠赠; [&]: CagA 的 C 端缺失且未分类, 未上传至 GenBank 数据库; [#]: 变异位点

Note: ABC/D indicates EPIYA-A, -B and -C/D sites; ^a: Represent strains from the same patient; ^{*}: Gifts from *H. pylori* Strain Management and Preservation Center, China; [&]: A clinical isolate with deletion of C-terminal region of CagA was not classified into any group and its sequence was not submitted to GenBank database; [#]: Variation site

2.2 CagA 的 20 种氨基酸构成差异

比较 27 株 CagA 氨基酸序列发现, 东亚、西方 *H. pylori* 株中 CagA 的氨基酸构成存在显著差异: 9 株西方株的 CagA 都含有半胱氨酸, 但仅有 5.5% (1/18) 东亚株 CagA 含有半胱氨酸; 东方株中谷氨酸 ($t=8.401$, $P=0.000$)、亮氨酸 ($t=3.555$, $P=0.000$)、苏氨酸 ($t=3.193$, $P=0.000$)、精氨酸 ($t=6.715$, $P=0.000$)、丝氨酸 ($t=3.706$, $P=0.000$) 显著高于西方株, 而赖氨酸 ($t=4.219$, $P=0.000$)、甘氨酸 ($t=9.762$, $P=0.000$)、组氨酸 ($t=9.461$, $P=0.000$)、缬氨酸 ($t=4.469$, $P=0.000$) 的含量显著低于西方株(图 1), 推测这些氨基酸的构成差异与

东亚、西方株致病性差异有关。

2.3 *H. pylori* 感染对胃上皮细胞形态的影响

为了探讨不同 *H. pylori* 菌株对细胞形态的影响, 按照 MOI 为 30:1, 分别用西方株 NCTC 11639、*H. pylori* 26695 和东亚株 *H. pylori* GZ7、*H. pylori* GZ15、*H. pylori* GZ7/ Δ cagA 菌株感染 AGS 细胞 6 h, 以各菌株煮沸 10 min 为对照。结果发现与对照组比较, *H. pylori* GZ15、*H. pylori* GZ7/ Δ cagA 感染的细胞形态未出现显著变化, 而 NCTC 11639、*H. pylori* 26695 和 *H. pylori* GZ7 感染的细胞出现了显著的“蜂鸟样”表型(图 2), 提示细胞形态变化与 CagA 的 EPIYA 基序有关。

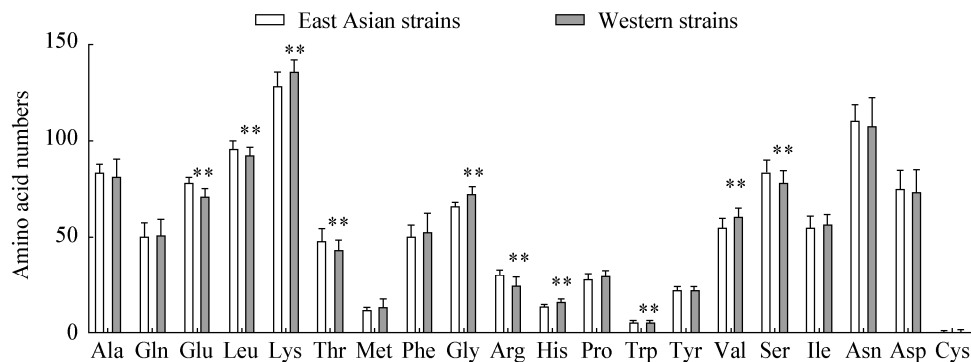


图 1 CagA 蛋白氨基酸构成比较

Figure 1 Comparison of amino acid composition in CagA from clinical isolates

注: Ala: 丙氨酸; Gln: 谷氨酰胺; Glu: 谷氨酸; Leu: 亮氨酸; Lys: 赖氨酸; Thr: 苏氨酸; Met: 甲硫氨酸; Phe: 苯丙氨酸; Gly: 甘氨酸; Arg: 精氨酸; His: 组氨酸; Pro: 脯氨酸; Trp: 色氨酸; Tyr: 酪氨酸; Val: 缬氨酸; Ser: 丝氨酸; Ile: 异亮氨酸; Asn: 天冬酰胺; Asp: 天冬氨酸; Cys: 半胱氨酸。*: 与东亚株比较, $P < 0.01$

Note: Ala: Alanine; Gln: Glutamine; Glu: Glutamic acid; Leu: Leucine; Lys: Lysine; Thr: Threonine; Met: Methionine; Phe: Phenylalanine; Gly: Glycine; Arg: Arginine; His: Histidine; Pro: Proline; Trp: Tryptophan; Tyr: Tyrosine; Val: Valine; Ser: Serine; Ile: Isoleucine; Asn: Asparagine; Asp: Aspartic acid; Cys: Cysteine. *: $P < 0.01$ compared to East Asian strains

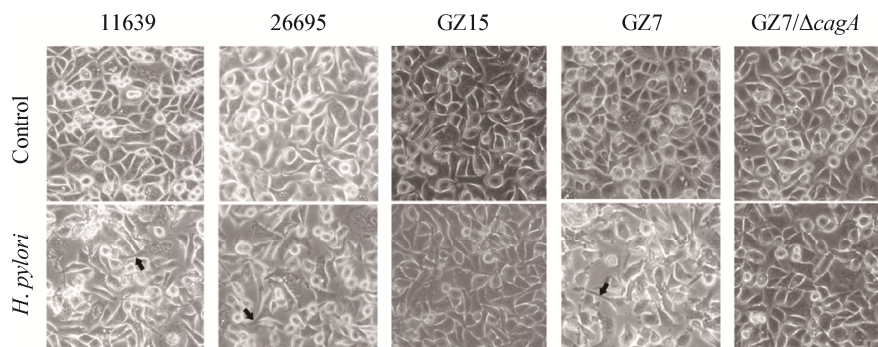


图 2 幽门螺杆菌感染 AGS 细胞 6 h 后的形态变化

Figure 2 Morphology of AGS cells infected with *H. pylori* for 6 hours

注: GZ15 缺失 CagA 的 C 端(含 EPIYA 和 CM 基序); 箭头表示细胞“蜂鸟样”形变

Note: GZ15 lacks the C terminal containing EPIYA and CM motifs; Arrow indicates the “hummingbird” phenotype

2.4 *H. pylori* 感染对 AGS 细胞中 PAR1b 蛋白表达的影响

以 MOI 为 30:1, 分别用 NCTC 11639、*H. pylori* 26695、*H. pylori* GZ15、*H. pylori* GZ7、*H. pylori* GZ7/ Δ cagA 感染 AGS 细胞 6 h 后, 通过 Western Blot 检测 PAR1b 蛋白的表达, 以各菌株煮沸 10 min 为对照。结果如图 3 所示: 与对照组比较, 西方株 NCTC 11639 和 *H. pylori* 26695 感染的细胞中 PAR1b 的表达升高, 而东亚株 *H. pylori* GZ7 感染的细胞中 PAR1b 表达降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 突变株 *H. pylori* GZ15 及 *H. pylori* GZ7/ Δ cagA 感染后 PAR1b 的表达无显著的变化。

2.5 *H. pylori* 感染对 AGS 细胞中 IL-8 分泌的影响

用 5 株 *H. pylori* 感染 AGS 6 h, 收集培养液, 检测培养液中 IL-8 的浓度。如图 4 所示, 与对照组比较, 各菌株感染的细胞培养液中 IL-8 浓度均增加, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 其中东亚株促进 IL-8 分泌的能力大于西方株。

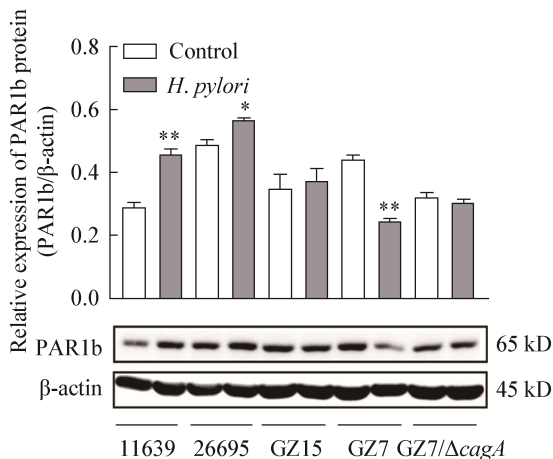


图 3 幽门螺杆菌感染 AGS 细胞 6 h 后 PAR1b 的蛋白表达

Figure 3 Expression levels of PAR1b protein in AGS cells infected with *H. pylori* for 6 hours

注: *: 与对照组比较, $P < 0.05$; **: 与对照组比较, $P < 0.01$
Note: *: $P < 0.05$ compared to control; **: $P < 0.01$ compared to control

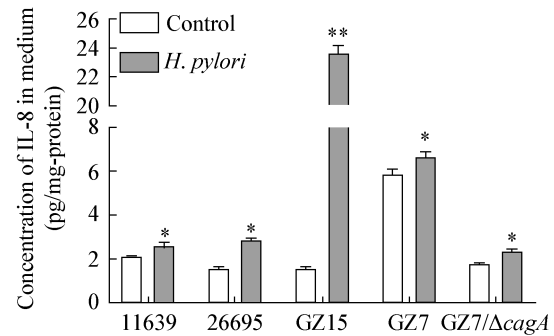


图 4 幽门螺杆菌感染 AGS 细胞后培养液中 IL-8 的检测
Figure 4 Concentration of IL-8 in medium of cells infected with *H. pylori*

注: *: 与对照组比较, $P < 0.05$; **: 与对照组比较, $P < 0.01$
Note: *: $P < 0.05$ compared to control; **: $P < 0.01$ compared to control

3 讨论与结论

H. pylori 与胃癌发生关系密切, 其主要效应蛋白 CagA 由 cag 致病岛(cag Pathogenicity Island, cag PAI)末端的 *cagA* 基因编码^[11]。许多研究证实, CagA 的 EPIYA 基序的多样性与胃癌的发病率相关, *H. pylori* 东亚株比西方株具有更大的致癌性^[12-14], 但是不同菌株的 CagA 在胃癌发生发展中的作用仍未完全清楚。因此, 研究不同 CagA 的序列差异及其对胃上皮细胞形态、功能的影响, 可揭示出更多 *H. pylori* 致病的机制。

将 27 株 *cagA* 基因序列转换成氨基酸序列经多序列比对, 结果发现西方菌株比东亚株更容易出现 EPIYA 基序的变异, 在 27 株 *H. pylori* 中共有 13 株发生 EPIYA 基序的变异, 其中东亚株 3 株, 占 23% (3/13), 而西方株均发生变异。西方株的变异主要表现为 EPIYA-B 基序的 A→T (丙氨酸→苏氨酸)突变和 EPIYA-C 缺失变异, 发现 1 株东亚株出现 EPIYA-A 缺失和 EPIYA-B 基序的 P→S (脯氨酸→丝氨酸)突变; 在东亚株中, 首次在 GZ 系列菌株中发现 2 株出现 EPIYA-D 基序的 A→V (丙氨酸→缬氨酸)突变。EPIYA 基序是 CagA 蛋白磷酸化位点, 位点变异会影响 CagA 与胃上皮细胞内多种激酶的相互作用, 如含多个 EPIYA-C 的西方株拥有更强的结合下游酪氨酸磷酸酶-2 (Tyrosine

Phosphatase-2, SHP-2)的能力^[15-16]。但是其他的变异还未被研究,尤其是东亚株的变异。

27株 *H. pylori* 的 CagA 蛋白中 20 种氨基酸组成分析发现,东亚、西方型 CagA 在氨基酸的组成和数量上存在显著差异,9 株西方菌株都含有半胱氨酸,但仅有 5.5%东亚株含有半胱氨酸,半胱氨酸与蛋白质的空间结构及生物活性密切相关,推测东亚、西方株中半胱氨酸的差异能影响 CagA 的构象及功能。此外,东亚株中谷氨酸、亮氨酸、苏氨酸、精氨酸、丝氨酸的含量更高,而西方株中赖氨酸、甘氨酸、组氨酸、缬氨酸的含量更高,这些氨基酸组成差异的临床意义尚不清楚。其中丝氨酸、苏氨酸是蛋白激酶的磷酸化靶点,与细胞周期调控密切相关,由此推测氨基酸组成的差异可能影响东亚、西方 *H. pylori* 的致病作用。

有研究表明,EPIYA 基序发生酪氨酸磷酸化后,EPIYA-D、EPIYA-C 与 SHP-2 (Src Homology 2-Containing Tyrosine Phosphatase)结合而引起细胞骨架重构,而且 EPIYA-D 位点磷酸化后与 SHP-2 结合能力强于 EPIYA-C 位点^[17-18]。本研究中西方株 NCTC 11639、*H. pylori* 26695 和东亚株 *H. pylori* GZ7 感染的细胞出现了显著的“蜂鸟样”表型,而敲除 *cagA* 基因的 GZ7/ $\Delta cagA$ 及缺失 CagA 的 C-末端 (GZ15)的菌株感染均不引起明显的细胞形态学改变,推测此差异源于 CagA 的完整性,尤其是否具有 CagA 的 C-末端。

除了 EPIYA 位点以外,CagA 蛋白 C 端多聚化位点的 CM 基序可以结合并抑制 PAR1b,促进上皮细胞转化,CagA-PAR1b 相互作用的强度与细胞紧密连接破坏的程度成正比,而且东亚株的 CM 基序对 PAR1b 具有更强的亲和力^[19]。Hatakeyama^[20]的研究表明东亚、西方株的 CagA 中 CM 基序的数量和位置存在差异:东亚株的 CagA 包含一个紧接 EPIYA-D 段下游的 CM 基序,而西方株 CagA 至少含有 2 个 CM 基序,其中一个位于 EPIYA-C 中,另一个位于最后一个 EPIYA-C 段的末端,具有 1 个 CM 基序的东亚株 CagA 与 PAR1b 的结合力等同于

含有 2 个 CM 基序的西方株 CagA。本研究发现不同 *H. pylori* 感染后对 PAR1b 的表达也会产生不同影响:GZ7/ $\Delta cagA$ 和 GZ15 菌株感染对 PAR1b 的表达无影响,而东亚株 GZ7 感染引起 PAR1b 的表达降低,西方株 NCTC 11639 和 26695 感染引起 PAR1b 的表达增加,提示东亚株 CM 基序对 PAR1b 表达的抑制作用强于西方株。推测东亚、西方株对 PAR1b 表达的不同影响源于两型 CM 基序的构成差异,但具体机制需进一步研究。

白介素 8 (Interleukin-8, IL-8)是趋化因子家族的细胞因子,在胃黏膜持续的炎症反应中导致胃黏膜损伤,促进胃局部炎症和胃癌的发生发展^[21]。有研究发现,*H. pylori* 可使细胞核因子- κ B (NF- κ B)激活,从而诱导下游靶基因 IL-8 的表达^[22]。本研究也发现所有的 *H. pylori* 菌株感染后细胞分泌的 IL-8 显著高于对照组,进一步提示 *H. pylori* 感染可激活 NF- κ B 信号通路,上调关键因子 IL-8 的表达。有研究发现,CagA 可通过其 CM 基序与细胞生长因子的受体 c-Met 相互作用,导致 PI3K/Akt 持续激活,使 NF- κ B 信号传导途径激活^[23]。与该研究一致,缺失 *cagA* 基因的 GZ7/ $\Delta cagA$ 促 IL-8 分泌的能力减弱;另外,东亚株比西方株更能促进 IL-8 的分泌,这可能源于两型 CM 基序构成差异影响了 CagA 与 c-Met 相互作用,从而引起 NF- κ B 信号传导途径激活程度的差异;此外,本研究还发现缺失 C 端的 GZ15 感染后也能明显上调 IL-8,但具体机制尚不清楚。

综上,本研究发现临床分离株中东亚株和西方株的 CagA 存在结构和氨基酸组成差异,西方株中 CagA 的 EPIYA 基序有更多的变异,CM 基序在东亚、西方株中的数量、位置及序列也不相同,这些序列差异影响 CagA 磷酸化水平及其与多种细胞蛋白的相互作用、PAR1b 表达及 IL-8 的分泌,可能是 CagA 序列差异导致临床菌株致病差异的原因。这些研究结果为进一步研究 *H. pylori* 的致病机制提供了重要的线索。

REFERENCES

- [1] Burkitt MD, Duckworth CA, Williams JM, Pritchard DM. *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: insights from *in vivo* and *ex vivo* models[J]. Disease Models & Mechanisms, 2017, 10(2): 89-104
- [2] Yang FH, Xu YG, Liu C, Ma CY, Zou SY, Xu X, Jia JH, Liu ZF. NF- κ B/miR-223-3p/ARID1A axis is involved in *Helicobacter pylori* CagA-induced gastric carcinogenesis and progression[J]. Cell Death & Disease, 2018, 9(1): 12
- [3] Safari F. EPIYA (or -like) motifs in mammalian proteins[J]. Journal of King Saud University-Science, 2014, 26(4): 276-284
- [4] Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. CagA protein of *Helicobacter pylori*: a hijacker of gastric epithelial cell signaling[J]. Biochemical Pharmacology, 2007, 73(11): 1697-1702
- [5] Hayashi T, Senda M, Morohashi H, Higashi H, Horio M, Kashiba Y, Nagase L, Sasaya D, Shimizu T, Venugopalan N, et al. Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA[J]. Cell Host & Microbe, 2012, 12(1): 20-33
- [6] Chung HW, Jang S, Kim H, Lim JB. Combined targeting of high-mobility group box-1 and interleukin-8 to control micrometastasis potential in gastric cancer[J]. International Journal of Cancer, 2015, 137(7): 1598-1609
- [7] Nastase A, Paslaru L, Herlea V, Ionescu M, Tomescu D, Bacalbasa N, Dima S, Popescu I. Expression of interleukine-8 as an independent prognostic factor for sporadic colon cancer dissemination[J]. Journal of Medicine and Life, 2014, 7(2): 215-219
- [8] Sun Q, Sun FK, Wang B, Liu S, Niu WB, Liu EY, Peng C, Wang JY, Gao HJ, Liang BJ, et al. Interleukin-8 promotes cell migration through integrin α v β 6 upregulation in colorectal cancer[J]. Cancer Letters, 2014, 354(2): 245-253
- [9] Li QP, Liu JW, Gong YH, Yuan Y. Association of CagA EPIYA-D or EPIYA-C phosphorylation sites with peptic ulcer and gastric cancer risks: a meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(17): e6620
- [10] Liu ZM, Zhou JJ, Zhao Y, Xiong L, Long NY, Xie Y. Isolation and culture and identification of clinical strains of *Helicobacter pylori*[J]. Journal of Guiyang Medical College, 2016, 41(4): 402-406 (in Chinese)
刘正美, 周建奖, 赵艳, 熊林, 龙妮娅, 谢渊. 幽门螺杆菌临床菌株的分离培养和鉴定[J]. 贵阳医学院学报, 2016, 41(4): 402-406
- [11] Lee YC, Chiang TH, Chou CK, Tu YK, Liao WC, Wu MS, Graham DY. Association between *Helicobacter pylori* eradication and gastric cancer incidence[J]. Gastroenterology, 2016, 150(5): 1113-1124
- [12] Hayashi T, Morohashi H, Hatakeyama M. Bacterial EPIYA effectors: Where do they come from? What are they? Where are they going?[J]. Cellular Microbiology, 2013, 15(3): 377-385
- [13] Hirai I, Sasaki T, Kimoto A, Yamamoto Y, Azuma T, Mahachai V, Hansomburana P, Lertkupinit C, Luangjaru S, Noophan P, et al. Infection of less virulent *Helicobacter pylori* strains in asymptomatic healthy individuals in Thailand as a potential contributing factor to the Asian enigma[J]. Microbes and Infection, 2010, 12(3): 227-230
- [14] Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis[J]. Future Oncology, 2014, 10(8): 1487-1500
- [15] Tegtmeyer N, Wessler S, Necchi V, Rohde M, Harrer A, Rau TT, Asche CI, Boehm M, Loessner H, Figueiredo C, et al. *Helicobacter pylori* employs a unique basolateral type IV secretion mechanism for CagA delivery[J]. Cell Host & Microbe, 2017, 22(4): 552-560.e5
- [16] Ferreira RM, Machado JC, Leite M, Carneiro F, Figueiredo C. The number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C tyrosine phosphorylation motifs influences the pattern of gastritis and the development of gastric carcinoma[J]. Histopathology, 2012, 60(6): 992-998
- [17] Argent RH, Kidd M, Owen RJ, Thomas RJ, Limb MC, Atherton JC. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*[J]. Gastroenterology, 2004, 127(2): 514-523
- [18] Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, Hatakeyama M. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(22): 14428-14433
- [19] Nishikawa H, Hayashi T, Arisaka F, Senda T, Hatakeyama M. Impact of structural polymorphism for the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein on binding to polarity-regulating kinase PAR1b[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 30031
- [20] Hatakeyama M. Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer[J]. Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences, 2017, 93(4): 196-219
- [21] Lee KE, Khoi PN, Xia Y, Park JS, Joo YE, Kim KK, Choi SY, Jung YD. *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric cancer[J]. World Journal of Gastroenterology, 2013, 19(45): 8192-8202
- [22] Yin J, Zeng F, Wu N, Kang K, Yang Z, Yang H. Interleukin-8 promotes human ovarian cancer cell migration by epithelial-mesenchymal transition induction *in vitro*[J]. Clinical and Translational Oncology, 2015, 17(5): 365-370
- [23] Suzuki M, Mimuro H, Kiga K, Fukumatsu M, Ishijima N, Morikawa H, Nagai S, Koyasu S, Gilman RH, Kersulyte D, et al. *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation[J]. Cell Host & Microbe, 2009, 5(1): 23-34