CagA 对幽门螺杆菌与宿主细胞相互作用影响的研究进展

姬晓云　张建中
作者单位：102206 北京市，中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

【摘要】 在体外实验中，幽门螺杆菌（helicobacter pylori，*H. pylori*）和宿主细胞相互作用后发生很多变化，而 H. pylori 的毒素相关蛋白(cytotoxin associated gene A,CagA)是其重要的毒力因子之一，在 H. pylori 与宿主细胞相互作用中起着非常重要的作用，包括 CagA 转运进入细胞、CagA 磷酸化和断裂，以及引起胞内信号转导通路的改变。本文就 CagA 对 H. pylori 与宿主细胞相互作用影响的研究进行了综述。

【关键词】　CagA；幽门螺杆菌；细胞；相互作用；

【Abstract】In vitro, CagA plays an important role in the interaction between *H. pylori* and host cells, including the translocation of CagA into host cells, the phosphorylation and breakage of CagA, and changes of the intracellular signal transduction pathways. This article gives a brief review on the function of CagA in the interaction between *H. pylori* and host cells.

【Key word】CagA; *H. pylori*; host cell; interaction;

自 1983 年 Marshall 和 Warren 首次从胃分离到 *H. pylori* 后，*H. pylori* 的研究逐渐成为热点。它是一种主要定植于人类胃肠道的螺旋状的、微需氧的革兰阴性菌[1, 2]。研究表明，*H. pylori* 的感染与人类慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃腺癌和黏膜相关淋巴组织淋巴瘤（MALT）的发生密切相关[3, 4]。作为 *H. pylori* 的重要毒力因子， CagA 在 *H. pylori* 与宿主细胞相互作用的过程中起到了非常重要的作用，现就 CagA 的研究进展综述如下。

1　CagA 的基本特征及其转运

1.1 CagA 的基本特征　cag 毒力岛（cag pathogenecity island，cagPAI）是一个由 27 到 31 个基因组成的约 40 kb 的 DNA 片断，包含了一些与功能性Ⅳ型分泌系统（type Ⅳ secretion system, TFSS）编码基因中的 virB4,virB7,virB8,virB9,virB10,virB11,virD4 等基因同源的序列，其编码的 CagA 是 *H. pylori* 的一种主要毒力特征，CagA 分子量范围在 120～145 kDa，N 端相对保守，C 端变异较大。

1.2 CagA 通过Ⅳ型分泌系统转运进入宿主细胞　研究证实，cagPAI 编码的Ⅳ型分泌系统可以将 CagA 转运进入胃上皮细胞，从而引起一系列细胞信号转导通路的激活和细胞形态学的改变[5]。*H. pylori* 的Ⅳ型分泌系统除了包含已知的 VirB/D4 组份的同源物以外[6]，还编码蛋白 VirB6 和亚基 VirB2 和 VirB5[7]。cagPAI 上的 18 个基因被认为是 CagA 转运所必需的，其中有 14 个编码分泌系统的组份。目前已知的编码蛋白主要有 CagE(virB4)、CagT(virB7)、cagORF528（virB9）、cagORF527（virB10）、cagORF525（virB11）、cagORF524（virD4）、CagN[8]和 CagF。近来的研究结果表明 CagF 可以和 CagA 发生相互作用，且对于 CagA 的转运是必需的。CagF 可能起到类似伴侣蛋白的作用，参与早期的 CagA 识别和转运进入Ⅳ型分泌系统通路的过程[7]，但 *H. pylori* Ⅳ型分泌系统转运 CagA 进入宿主细胞的确切机制还不十分清楚。

2　CagA 的磷酸化

早期的体外实验发现，cagPAI 阳性的 *H. pylori* 菌株攻击人类胃上皮细胞（human gastric epithelial cells，AGS）之后，在 cagPAI 125～140 kDa 和 80 kDa 附近的蛋白发生了磷酸化，随后的研究发现 125～140 kDa 蛋白是一种细菌来源的蛋白，其分子量与 CagA 相同，构建的 CagA 缺失株未发现 125～140 kDa 附近的蛋白磷酸化，证明了 cagPAI 125～140 kDa 附近的蛋白就是 CagA[9]。此发现使研究 CagA 的致病机制成为 *H. pylori* 与细胞相互作用研究的热点。

CagA 的磷酸化位点（tyrosine phosphorylation motifs，TPM）首先成为研究者们关注的问题。用模体分析预测得到 3 个可能的酪氨酸磷酸化位点，即 TPM-A、TPM-B 和 TPM-C，以及其他更多的假定 TPMs。CagA 的 C 末端重复序列中所包含的 1～4 个 EPIYA 模体是 CagA 主要的磷酸化位点。研究表明 TPM-A 对于 CagA 的磷酸化无明显的作用，TPM-C 的存在对于 CagA 的磷酸化和伴随的宿主细胞蛋白的去磷酸化是充分的，而且还存在模体分析未预测出的 TPMs[10]。对于可以发生磷酸化的 *H. pylori* 菌株 P12 和不能发生磷酸化的 *H. pylori* 菌株 J99 的氨基酸序列比对发现，差异主要是在 C 末端的重复区域，这个区域具有不同数量的 EPIYA 模体。H. pylori 菌株在包含 EPIYA 模体的 C 末端区域呈现序列多态性。几乎所有的西方国家 *H. pylori* 分离菌株都包含保守的 EPIYA-A 和 EPIYA-B，还有不同拷贝数的 EPIYA-C，而东亚国家的代表菌株中无 EPIYA-C，但有一个特定的 EPIYA 位点，即 EPIYA-D。EPIYA-C 和 EPIYA-D 都是 CagA 发生磷酸化的主要位点[11]。通过位点突变和构建融合蛋白，对可能的酪氨酸磷酸化位点 Y-122、Y-899、Y-918 和 Y-972 进行了研究，用苯丙氨酸替代这些位点以后，其他 3 个位点的突变体磷酸化不受影响，而 Y-972 位点的突变体检测不到 CagA 的磷酸化，表明 Y-972 位点对于 CagA 的磷酸化至关重要[12]。

3　CagA 的断裂

2001 年，Moese 等发现使用大量的 *H. pylori* 菌株攻击吞噬细胞系 U937 后，用双向电泳（2-DE）和免疫印迹的方法可以识别出进入细胞的 3 种形式的 CagA，即全长的 130～140 kDa CagA 蛋白点（$p135^{CagA}$）、100～105 kDa 的 CagA

蛋白点（$p100^{CagA}$）和 30～40 kDa 蛋白点（$p35^{CagA}$）[13]。而且发现在不与宿主细胞接触的 H. pylori 菌株中，也可以检测到相对量低 2～4 倍的 $p100^{CagA}$ 和 $p35^{CagA}$。提示在细菌体内就有很少量的 CagA 发生了蛋白水解，进入宿主细胞后，蛋白水解过程得到了加强。这种断裂的发生是因为在 CagA 序列上存在容易断裂的区域，还是由于 CagA 在某种蛋白酶的作用下发生断裂或者自身水解，目前尚无定论。在感染 *H. pylori* 菌株的 U937 细胞中，$p35^{CagA}$是主要发生磷酸化的片段，而在感染 *H. pylori* 菌株的 AGS 细胞中，主要磷酸化的片段是 $p100^{CagA}$。说明在不同的宿主细胞内，酪氨酸磷酸化的模式不同，可能与不同宿主细胞内不同的蛋白激酶表达方式有关[14]。

通过对 $p100^{CagA}$ 和 $p35^{CagA}$ 在 2-DE 胶上的定位，得到 $p100^{CagA}$ 和 $p35^{CagA}$ 的等电点分别为 6.7 和 9.6，而且用 MALDI-TOF-MS 鉴定 $p35^{CagA}$，所有的肽段都来自 CagA 的 C 末端。说明 CagA 进入宿主细胞后断裂成两个片段，分别是 N 末端的 $p100^{CagA}$和 C 末端的 $p35^{CagA}$[12]。这种断裂与 CagA 的磷酸化，乃至 CagA 的细胞信号传导是否存在关联尚无研究证实。推断的假说[12] 如图 1 所示。

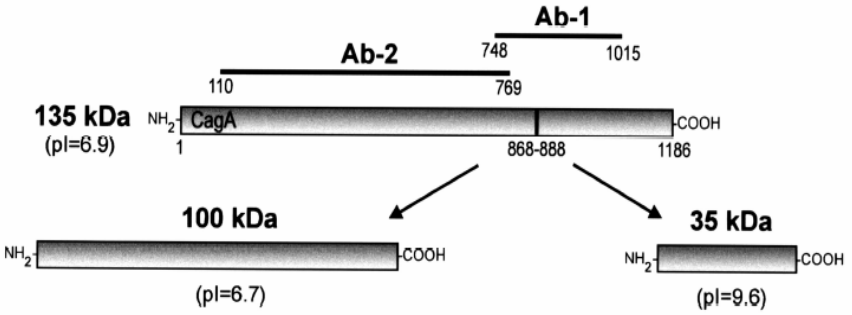

图 1　*H. pylori* 菌株 26695 进入 U937 细胞后的断裂假说

Figure 1 The breakage hypothesis of the invasion of *H. pylori* strain 26695 into U937 cells.

4　CagA 与细胞的信号转导通路

研究证实，CagA 通过Ⅳ型分泌系统转运进入宿主细胞后，其 C 端的酪氨酸磷酸化位点发生了酪氨酸磷酸化，由此引起了一系列细胞信号转导变化，并导致细胞的骨架重排，镜下可见细胞的延长和伸展，呈拉丝状，即所谓的“蜂鸟状表型”[12]。同时，可见微绒毛的消失和黏附点基座的形成。

研究表明，Src 家族激酶(src family kinases,SFKs)的 c-Src 使 CagA 发生了磷酸化，磷酸化的 CagA 结合并激活了包含 Src 同源 2 结构域的酪氨酸磷酸酶（src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase ，SHP-2），从而引起细胞外信号调节激酶/促分裂原活化蛋白激酶（extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase,ERK/MAP）信号因子的持续激活。同时，磷酸化的 CagA 抑制了 SFKs 的活性，这样对 CagA 的活性产生了负反馈调节作用，还引起埃兹蛋白（ezrin）和皮层肌动蛋白（cortactin）的去磷酸化，导致肌动蛋白的重组。此外，CagA 和 c-met 结合，其产物可以激活一些可以结合肌动蛋白的因子，如溶胶蛋白（gelsolin）、抑制蛋白（profilin）、切丝蛋白（cofilin）等，从而导致肌动蛋白动力学的变化。CagA-SHP-2 复合物通过抑制焦点粘连激酶（focal adhesion kinase,FAK）的活性，最终导致蜂鸟状表型的形成[15-22]。

SHP-2 是一种包含两个 SH2 结构域的胞浆酪氨酸磷酸酶，是细胞生长和移动的重要的正向调节因子。磷酸化的 CagA 可以特异地与 SHP-2 结合并激活其磷酸酶的活性，这种相互作用激活了多个信号级联反应，包括肌动蛋白细胞骨架的重排或一些翻译激活通路，比如 ERK/MAP 信号通路，对于蜂鸟状表型的形成既是充分的，也是必要的[15,16]。

近期研究发现，磷酸化的 CagA 也可以和 C 末端 Src 激酶（C-terminal src kinase，Csk）结合，Csk 通过特异地磷酸化 SFKs C 末端区域中保守的抑制性酪氨酸位点而负反馈调节 SFKs。而 CagA 与 Csk 的相互作用能够激活 Csk 的激酶活性，从而下调 SFKs。一方面，SFKs 能够磷酸化 CagA，所以 Csk 使之被抑制后，CagA 的磷酸化水平降低，从而引起 CagA-SHP-2 的水平也降低，因此，依赖 CagA 的 Csk 的激活是中止过多的 CagA-SHP-2 信号的一个有效的负反馈调节机制[17]。另一方面，SFKs 活性的抑制能够引起胞内其他一些蛋白的去磷酸化，如 ezrin 和 cortactin。这两种蛋白都可以调节肌动蛋白的重组，从而可能促使细胞蜂鸟状表型的形成。ezrin 是 ERM 蛋白家族（ezrin-radixin-moesin）的成员，同时可以连接肌动蛋白微丝与膜表面蛋白。而 cortactin 是肌动蛋白细胞骨架的重要调节因子，可以以非酪氨酸磷酸化的形式结合纤维型肌动蛋白(fibrous actin, F-actin)和肌动蛋白相关蛋白 Arp2/3，从而增加肌动蛋白交联的能力，这对于稳定肌动蛋白束可能有重要的作用[18,19]。

对于使 CagA 发生磷酸化的激酶的研究发现，只有 Src 家族激酶的抑制剂可以极大地降低 CagA 磷酸化水平，体外实验证实可以使 CagA 磷酸化的只有 c-Src 和 Lyn，表明 CagA 在宿主细胞内主要是在 c-Src 和 Lyn 的作用下发生磷酸化[20,21]。

表达 CagA 的 *H. pylori* 菌株也可以激活 c-met，CagA 可以和 c-met 的下游磷脂酶 C-γ (phospholipase C-γ，PLC-γ) 结合，并使其磷酸化。PLC-γ是一种磷脂酶，其产物磷脂酰肌醇 4,5 二磷酸(phophatidylinosital biphosphate,PIP2)

可以激活一些结合肌动蛋白的因子，如 gelsosin、profilin、cofilin 等，这些因子可能最终导致细胞动力学的变化。同时 CagA 也能激活 c-met 下游的磷酸酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinosital 3-kinase,PI3K)，提示 CagA 可能与 c-met 结合后发生了与肝细胞生长因子（hepatocyte growth factor，HGF）引起细胞蜂鸟状表型相同的信号通路[22]。研究发现 HGF 也能引起宿主细胞发生蜂鸟状表型的改变，而且证实 HGF 与其受体 c-met 结合后，使其磷酸化，招募多种信号分子，如 PI3K、PLC-γ、生长因子受体结合蛋白-2(growth factor receptor bound 2,Grb-2)等，激活了下游的信号通路，从而引起细胞形态学的变化[23]。

FAK 是一种调节表皮粘附点翻转的酪氨酸激酶，且激酶活性的抑制导致了细胞的蜂鸟状表型的形成。在 CagA 介导的 FAK 酪氨酸磷酸化水平降低的过程中，是需要 SHP-2 的参与的，活化的 SHP-2 可以和 FAK 形成一种酶底物复合体，在 SHP-2 的作用下，FAK 发生去磷酸化，从而活性降低。而且研究结果也表明 FAK 的去磷酸化对于蜂鸟状表型的形成是必要的[17]。

综上所述，CagA 阳性的 *H. pylori* 菌株黏附到胃黏膜上皮后，引起了以上皮细胞的延长和伸展为特征的形态学变化，在这种细菌与宿主细胞的相互作用中，CagA 通过Ⅳ型分泌系统由细菌转运进入宿主细胞内，定位于细胞的内膜，断裂成为 100 kDa 和 35 kDa 的两个片段。在 Src 家族激酶的作用下发生了主要是在 C 末端的 EPIYA 模体上的磷酸化，磷酸化的 CagA 可以结合 SHP-2 磷酸酶和 c-met,并使一些胞内蛋白去磷酸化，同时，CagA-SHP-2 复合物还可以抑制 FAK 的活性，最终导致宿主细胞信号转导通路的激活和形态学的变化。虽然至今为止幽门螺杆菌进入宿主细胞后，导致其信号转导通路的变化并最终引起机体组织癌变的机制还不完全清楚，但为今后 *H. pylori* 致病机制，尤其是 *H. pylori* 感染与胃癌发生关系的研究提供了重要线索，为胃癌防治提供理论依据。

参考文献

1 Solnick JV, Tompkins LS. *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease: pathogenesis and host-parasite interaction [J] .Infect Agents Dis,1992,1:294-309.

2 Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP,et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma [J] . N Eng J Med,1991,325:1127-1131.

3 Weel JF, Vander Hulst RW, Gerrist Y,et al. The interrelationship between cutotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori* -related diseases [J] . J Infect Dis, 1996, 173:1171-1175.

4 Pasceri V, Patti G, Cammarota G,et al.Virulent strains of *Helicobacter pylori* and vascular diseases: a meta-analysis [J] . Am Heart J,2006, 151: 1215-1222.

5 Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B,et al. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion [J] . Science, 2000,287:1497-1500.

6 Censini S,Stein M, Covacci A.Cellular responses induced after contact with *Helicobacter pylori* [J] .Current Opinion in Microbiology,2001,4: 41-46.

7 Couturier MR, Tasca E,Montecucco C,et al. Interaction with CagF is required for translocation of CagA into the host via the *Helicobacter pylori* type Ⅳ secretion system [J] .Infection and Immunity,2006,74: 273-281.

8 Bourzac KM,Satkamp LA,Guillemin K.The *Helicobacter pylori* cag pathogenecity island protein CagN is a bacterial membrane-associated protein that is processed at its C terminus [J] . Infection and Immunity, 2006,74:2537-2543.

9 Asahi M, Azuma T,Ito S,et al. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells [J] . J Exp Med,2000,191: 593-602.

10 Puls J, Fischer W, Haas R. Activation of *Helicobacter pylori* CagA by tyrosine phosphorylation is essential for dephosphorylation of host cell proteins in gastric epithelial cells [J] . Mol Microbiol,2002,43: 961-969.

11 Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y,et al. Epiya motif is a membrane targeting signal of *Helicobacter pylori* CagA in mammalian cells [J] . J Biol Chem,2005, 280: 23130-23137.

12. Backert S, Moese S, Selbach M,et al. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells [J] . Mol Microbiol,2001,42:631-644.

13 Moese S,Zimmy-Arndt U,Jungblut PR,et al.Identification of a tyrosine-phosphorylated 35kDa carboxy-terminal fragment($p35^{CagA}$) of the *Helicobacter pylori* CagA protein in phagocytic cells: Processing or breakage [J] . Proteomics,2001,1:618-629.

14 Backert S, Muller EM,Jungblut PR,et al. Tyrosine phosphorylation patterns and size modification of the

Helicobacter pylori CagA protein after translocation into gastric epithelial cells [J] . Proteomics.,2001,1:608-617.
15 Higashi H, Tsutsumi R, Muto S，et al.SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein [J] . Science, 2002,295: 683-686.
16 Yamazaki S,Yamakawa A,Ito Y,et al. The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa [J] . The Journal of Infection Diseases, 2003,187:334-337.
17 Tsutsumi R, Takahashi A, Azuma T,et al. Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 Complexed with *Helicobacter pylori* CagA [J] . Mol Cell Biol, 2006,26:261-276.
18 Selbach M, Moese S, Hurwitz R,et al. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation [J] . EMBO J, 2003,22: 515-528.
19 Selbach M, Moese S, Backert S,et al. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin [J] . Proteomics, 2004, 4: 2961-2968.
20 Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R,et al. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs [J] . Mol Microbiol, 2002, 43:971-980.
21 Selbach M, Moese S, Hanck CR,et al. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo [J] . The Journal of Biological Chemistry, 2002,277: 6775-6778.
22 Churin Y, Al-Ghoul L, Kepp O,et al. *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response [J] . J Cell Biol,2003,161:249-255.
23 Gale NW, Kaplan S, Lowenstein EJ,et al. Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras [J] . Nature,1993, 363:88-92.