

DOI:10.13350/j.cjpb.220906

• 论著 •

幽门螺杆菌 HtrA 的表达、纯化及结晶尝试*

田新利¹, 林玲辉¹, 李娜¹, 徐鹤¹, 郭菲¹, 刘威², 林雪霞^{1*}

(1. 邢台医学高等专科学校, 河北邢台 054000; 2. 陆军军医大学)

【摘要】 目的 构建幽门螺杆菌原核表达载体, 表达、纯化并筛选幽门螺杆菌 HtrA 蛋白的结晶条件, 测定 HtrA 蛋白酶活性。方法 通过 PCR 技术构建幽门螺杆菌 HtrA 蛋白基因重组表达质粒 pET-28a-HtrA, 在大肠埃希菌 BL21 (DE3) 进行重组蛋白 HtrA 的原核表达; 经 Ni 离子亲和层析、凝胶过滤层析纯化蛋白; 通过 Hampton Research 结晶试剂盒筛选 HtrA 蛋白结晶条件。经 SDS-PAGE 和质谱鉴定后通过免疫荧光法测定 HtrA 蛋白酶活性。结果 成功构建重组质粒 pET-28a-HtrA, 转化至大肠埃希菌 BL21(DE3) 菌株进行 HtrA 蛋白可溶性表达, 表达蛋白分子质量约为 53 ku, 与预期相符; 使用 AKTA pure 纯化目标蛋白, SDS-PAGE 分析蛋白纯度达 95%, 产量约 11 mg/L; 使用结晶机器人筛选 HtrA 蛋白的初始结晶条件为: 0.1 mol/L 甘氨酸, pH 9.0, 0.2% 二恶烷, 10% 聚乙二醇。重组 HtrA 具有蛋白酶活性, 即能切割 E-cadherin。结论 利用蛋白表达、纯化和蛋白结晶技术筛选出幽门螺杆菌 HtrA 蛋白结晶条件, 为其三维结构解析与功能研究奠定了基础。

【关键词】 幽门螺杆菌; HtrA; 蛋白酶; E-cadherin; 结晶

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)09-1020-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Sep.; 17(9): 1020-1024.]

Expression, purification and crystallization trials of *Helicobacter pylori* HtrA

TIAN Xin-li¹, LIN Ling-hui¹, LI Na¹, XU He¹, GUO Fei¹, LIU Wei², LIN Xue-xia¹ (1. Xingtai Medical College, Xingtai, Hebei, 054000; 2. Army Medical University, Chongqing, 400038)

【Abstract】 **Objective** To construct *Helicobacter pylori* prokaryotic expression vector, express, purify and screen out crystallization conditions of *H. pylori* protease HtrA. HtrA protease activity was determined. **Methods** The recombinant expression plasmid pET-28A-HtrA of *H. pylori* was constructed by PCR, and the prokaryotic expression of the recombinant protein HtrA was carried out in *E. coli* BL21(DE3). The expressed protein was purified by a two-step chromatography strategy using an Ni²⁺ affinity column and a gel filtration column. Preliminary crystallization conditions were screened using Hampton Research crystallization kits. HtrA protease activity was determined by immunofluorescence assay after SDS-PAGE and mass spectrometry. **Results** The recombinant plasmid pET-28A-HtrA was successfully constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) strain for soluble expression of HtrA protein. The molecular weight of HtrA protein was about 53 ku, which was consistent with the expectation. The destination protein was purified using an AKTA pure. SDS-PAGE analysis showed that the purity of the protein was 95%, and the yield was about 11 mg/L. A crystallization condition, 0.1 mol/L Bicine pH 9.0, 2% v/v 1,4-Dioxane, 10% w/v Polyethylene glycol was found out of ca 500 conditions using a protein crystallization robot. The recombinant HtrA has protease activity, that is, it can cleave E-cadherin. **Conclusion** The crystallization conditions of *H. pylori* HtrA protein were screened by protein expression, purification and crystallization techniques. Our experimental results have established a good starting point for further study of HtrA 3d structure and functions.

【Key words】 *Helicobacter pylori*, HtrA, protease, E-cadherin, crystallization

*** 幽门螺杆菌是一种螺旋状、微需氧革兰阴性杆菌, 已被确认与慢性胃炎、消化性溃疡、萎缩性胃炎、胃腺瘤、胃增生性息肉、胃远端腺癌、黏膜相关淋巴组织淋巴瘤等有关^[1-2], 在大多数情况下, 这些疾病的发生都存在幽门螺杆菌感染。许多幽门螺杆菌的致病因子都与细菌的生存、定植以及组织损伤密切相关, 尤以幽门螺杆菌分泌的一种新型毒力因子 HtrA^[3] 备受关注。

HtrA 及其同源蛋白广泛表达在原核生物和真核

生物中, 通常作为蛋白酶和分子伴侣参与许多生物的生命活动过程^[4-5]。该蛋白家族的所有成员都包含一

* **【基金项目】** 河北省卫生健康委员会办公室关于河北省 2020 年度医学科学研究课题(No. 20201591)。

** **【通讯作者】** 林雪霞, E-mail: 15131911996@qq.com

【作者简介】 田新利(1972-), 男, 河北邢台人, 硕士, 副教授, 主要从事原核细胞的结构生物学研究。
E-mail: xtxl66@163.com

个高度保守的丝氨酸蛋白酶结构域和至少一个 PDZ 结构域,具有 PDZ 结构域的蛋白可与许多细胞膜受体或其他信号分子的胞内结构域结合,调节多种信号转导途径。例如, HtrA 3 个同源物 (DegP, DegQ 和 DegS) 包含这两种结构域,但其活性受到差异调控。DegP 是一种不依赖 ATP 的伴侣蛋白酶,与底物结合后可转化为活性形式^[6],与调节蛋白酶 DegS 相反, RseA、DegQ 将未折叠的蛋白质降解成小肽^[6-8]。此外,除了蛋白质质量控制的各个方面,人类 HtrA1 蛋白也参与细胞病变^[9]。如与阿尔茨海默病、关节炎和胃肠道癌症等严重疾病有关^[10-12]。

幽门螺旋杆菌可分泌 HtrA 到细胞外空间, HtrA 蛋白酶切割 E-钙黏蛋白的外域,宿主细胞黏附蛋白。E-钙黏蛋白是钙黏蛋白家族中被广泛研究的成员之一,由胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域组成。E-钙黏蛋白是一种哺乳动物细胞表面蛋白,在细胞黏附和肿瘤抑制中具有重要作用^[13-15]。E-钙黏蛋白的突变与癌症的进展和转移有关,而 E-钙黏蛋白外结构域的蛋白水解释放往往与癌症的发生相关,特别是在乳腺癌和胃癌^[16]。因此,幽门螺旋杆菌分泌的 HtrA 可能通过 E-cadherin 的分裂参与胃癌的发生发展。虽然近年来对来自大肠埃希菌和嗜肺军团菌的 DegP、DegQ 和 DegS 的结构和功能进行了研究,但来自幽门螺旋杆菌的 HtrA 的结构功能关系尚不清楚。本研究将幽门螺旋杆菌 HtrA 蛋白在大肠埃希菌中进行可溶性表达、纯化,并通过结晶试剂盒筛选出结晶条件。采用 Western blot 和质谱对其进行鉴定,通过免疫荧光法进一步分析 HtrA 对 E-cadherin 的蛋白酶活性。

材料与方 法

1 材料

1.1 主要试剂 限制性内切酶 NcoI 和 XhoI, DNA 聚合酶, PCR 纯化试剂盒, T4 DNA 连接酶试剂盒、凝胶提取试剂盒和质粒提取试剂盒均购自 Takara (大连) 公司; 引物由上海生工公司合成; 异丙基硫代-β-半乳糖苷 (IPTG) 购自 Invitrogen (上海) 公司; 硝酸三乙酸镍 (Ni NTA) Sepharose 树脂购自美国 Novagen 公司; Anti-6 * his 标记抗体购于天津阳光生物技术公司; 抗 E-cadherin 胞外结构域的单克隆抗体 HecD1 购自美国 Calbiochem 公司; 荧光标记的 546 偶联的抗小鼠抗体购自美国 Invitrogen 公司; 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 购自瑞士 Roche 公司。

1.2 载体、细菌及细胞 表达载体 pET-28a 和大肠埃希菌宿主菌株 BL21 (DE3) 购自美国 Novagen 公司, 由本实验室保存; 人 MKN-28 细胞由重庆陆军军医大学药学院毛旭虎教授提供。

2 方法

2.1 HtrA 表达载体的构建 HtrA (Accession No: AE000511. 1) 核苷酸序列由上海生工公司合成。上游引物: 5'-ACCCATGGATATGTCCCTCTAAAG-3'; 下游引物: 5'-TGTCTAGATTTACACAAAATGATCC-3' (包括 NcoI 和 XhoI 两个酶切位点)。PCR 扩增 HtrA 基因, PCR 反应体系 (50 μl): 10×buffer 5 μl; 4 种 dNTP 混合物 4 μl; MgCl₂ 3 μl; 引物各 0.5 μl; 模板 DNA 0.5 μl; Taq 酶 0.3 μl; ddH₂O 36.2 μl。扩增条件: 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 NcoI 和 XhoI 酶切后连接到 pET-28a 中, 构建重组表达质粒。质粒测序由上海生工公司完成。

2.2 HtrA 蛋白的表达 将重组质粒 pET28a-HtrA 转化至大肠埃希菌 BL21 (DE3), 接种至含 30 μg/ml 卡那霉素和 1% 葡萄糖的 100 ml LB 液体培养基, 37 °C 培养, 当 A₆₀₀ 值达到 0.6~0.8 时, 加入异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L。37 °C 继续培养 4 h。取 1 ml 培养液离心, 沉淀加入缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 300 mmol/L NaCl), 冰上超声波裂解 10 min, 30 000 g 离心 30 min, 分别收集沉淀和上清进行 12% SDS-PAGE 分析。

2.3 HtrA 蛋白的纯化 所有纯化过程均在 4 °C 进行。将细菌沉淀加入 25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 300 mmol/L NaCl 的缓冲液中重悬, 4 °C 下高压细胞破碎仪 (ATS) 破碎细胞, 30 000 g 离心 30 min, 去除沉淀, 取上清液上样于 Ni-NTA 亲和层析柱, 用 200 mL 洗涤缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 20 mmol/L 咪唑, 300 mmol/L NaCl) 洗脱杂蛋白。随后用洗脱缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 200 mmol/L 咪唑, 300 mmol/L NaCl) 洗脱目的蛋白 HtrA。将目的蛋白上样于 Sephadex 200 凝胶过滤层析柱, 用洗脱缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA) 洗脱, 收集目的蛋白洗脱峰。用 Bradford 法测定目的蛋白的浓度, 通过 SDS-PAGE 分析蛋白的纯度, 通过 Western blot 和质谱对重组 HtrA 进行鉴定。

2.4 HtrA 蛋白结晶条件的筛选 在 4 °C、6 000 r/min 的条件下将 HtrA 蛋白离心浓缩至 10 mg/ml 后, 以 Crystal Screen、SaltRx、PEGRx、PEG/Ion、Index 结晶试剂盒作池液, 使用 Gryphon 蛋白结晶自动化工作站在 96 孔坐滴结晶板点样, 并贴膜密封晶体板, 置于 20 °C 恒温隔音结晶室内, 以搜索重组蛋白 HtrA 的结晶条件。

2.5 蛋白酶活性分析 使用 FITC (荧光素异硫氰酸

酯)标记的酪蛋白(G-Biosciences,美国)按照说明书进行蛋白酶定量分析。

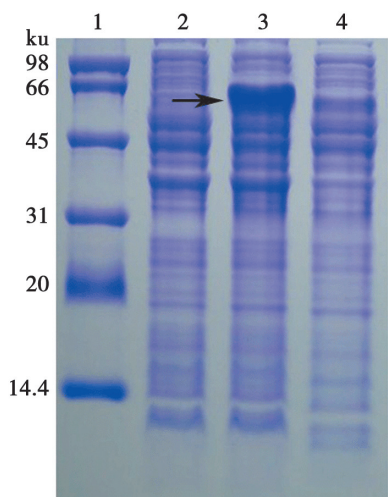
2.6 Western blot 和免疫荧光检测 将蛋白重悬于裂解缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 300 mmol/L NaCl),煮沸 15 min,经 SDS-PAGE 电泳后转膜,采用小鼠抗 his 单克隆抗体(Abcam, UK)进行增强化学发光(ECL) Western blot 检测。

将 MKN-28 细胞(胃癌细胞系细胞)接种在 24 孔板上,平均细胞密度的 4×10^4 个细胞/孔,孵育 24 h。将培养细胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤;加入抗 E-钙抗体(1 mg/ml, 1:100, Calbiochem, USA)孵育过夜, PBS 洗涤;加入荧光标记的 647-山羊抗鼠免疫球蛋白(Invitrogen)孵育 45 min, PBS 洗涤;加入 $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)孵育 10 min, PBS 洗涤后用 30% 甘油封闭,置于荧光显微镜下观察。

结果

1 幽门螺杆菌 HtrA 的可溶性表达

为了将合成的 HtrA 插入到 pET28a 载体中,设计了两种特殊的引物对 HtrA 核苷酸序列进行扩增。将 PCR 产物克隆到表达载体 pET-28a 中,通过 DNA 测序确定插入序列正确。用 C 端带有 his 标签的表达质粒 pET-28a-HtrA 转化大肠埃希菌 BL21(DE3)细胞,经 1 mmol/L IPTG 诱导,SDS-PAGE 显示表达的重组 HtrA 分子质量约为 53 ku,表达量达到菌体总蛋白的 20%。即使在 37 °C 下诱导,细胞裂解后的上清液中仍有大量的表达产物(图 1),表明重组 HtrA 是一种可溶性蛋白。



1 标准蛋白 2 未诱导重组菌全细胞裂解液 3 重组菌诱导后全细胞裂解液 4 重组菌诱导后全细胞裂解上清

图 1 HtrA 蛋白在大肠埃希菌中的表达

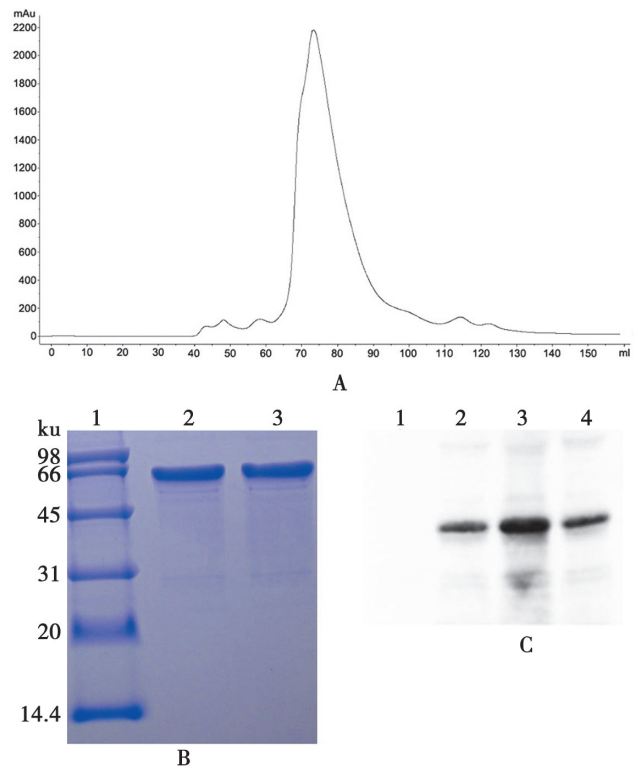
1 Protein standard 2 Un-induced whole cell lysate 3 Whole cell lysate after induction 4 Supernatant.

Fig. 1 Expression of HtrA protein in *E. coli*

2 HtrA 蛋白的纯化及鉴定

为了筛选表达 HtrA 的最佳诱导条件,选取不同的诱导温度、IPTG 浓度和诱导时间进行试验,最终确定以 1 mmol/L IPTG 在 37 °C 培养条件下诱导 4 h 为最佳可溶性表达条件。采用 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析和凝胶过滤层析纯化重组 HtrA。用含 20 mmol/L 咪唑的缓冲液从 Ni NTA 柱中有效地去除大部分杂蛋白,然后用含 200 mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱,收集单峰 HtrA。用 Sephadex 200 柱进一步纯化洗脱组分(图 2A)。经 SDS-PAGE 检测,HtrA 纯度达 95% 以上(图 2B)。

从 1 L 的细菌培养液中纯化 HtrA 的最终产量约为 11 mg。通过 Western blot 对 HtrA 进行鉴定,该蛋白能被相应抗体识别(图 2C)。HtrA 的质谱分析如图 3,其序列与 NCBI 中的蛋白序列一致。



A Superdex 200 纯化 HtrA 蛋白洗脱峰 B 纯化 HtrA 蛋白的 SDS-PAGE 分析 1 蛋白分子质量标准 2、3 Sephadex 200 柱纯化的 HtrA 蛋白 C HtrA 蛋白的 Western blot 分析 1~4 分别为未诱导重组菌全细胞裂解液、诱导后全细胞裂解液、诱导后全细胞裂解上清及纯化蛋白与相应抗体反应条带

图 2 HtrA 蛋白的纯化与鉴定

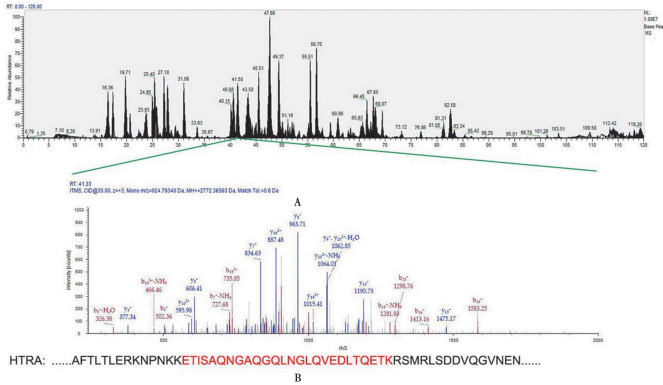
A Purification of HtrA protein by Superdex 200 B SDS-PAGE of HtrA protein after purification. Lane 1, protein marker, Lanes 2 and 3, proteins from Sephadex 200 column C Western blotting of HtrA protein. Lane 1, un-induced whole cell lysate, lane 2, whole cell lysate after induction, lane 3, supernatant, lane 4, after purification

Fig. 2 Purification and identification of HtrA protein

3 HtrA 蛋白结晶条件初筛

将纯化的 HtrA 蛋白浓缩至 10 mg/ml 后,用结晶试剂盒初步筛选其结晶条件,点样在结晶室放置 1

周后观察,在 Crystal Screen 的第 33 号条件即 4.0 mol/L 甲酸钠液滴中出现细小成簇的针状晶体。在 Crystal Screen 的第 96 号条件即 0.1 mol/L 甘氨酸, pH 9.0, 0.2% 二恶烷, 10% 聚乙二醇液滴中出现锥形晶体(图 4)。其他条件下的液滴以蛋白沉淀为主,未见明显结晶迹象。

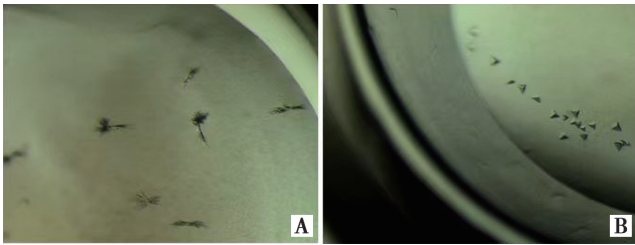


A 整个 HtrA 蛋白的质谱图 B 部分 HtrA 蛋白的质谱图

图 3 HtrA 蛋白的质谱图

A Mass spectrum of the whole HtrA protein B One of detected peptides from HtrA protein

Fig. 3 LC/MS-TOF of HtrA protein.



A 结晶条件为 4.0 mol/L 甲酸钠 B 结晶条件为 0.1 mol/L 甘氨酸, pH 9.0, 0.2% (v/v) 1,4-二恶烷, 10% (w/v) 聚乙二醇

图 4 显微镜下的 HtrA 晶体

A 4.0 mol/L Sodium formate B 0.1 mol/L Bicine pH 9.0, 2% v/v 1,4-Dioxane, 10% w/v Polyethylene glycol

Fig. 4 HtrA crystals observed under microscope

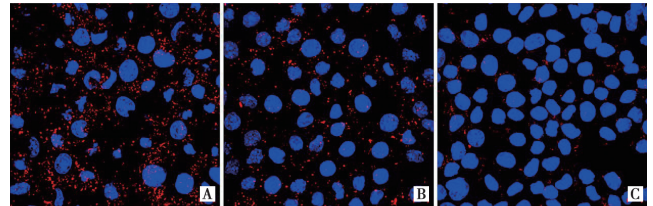
4 HtrA 的生物活性鉴定

幽门螺杆菌 HtrA 蛋白的底物为 E-钙,一种细胞间黏附分子^[3]。将 MKN-28 细胞培养于含有 1640 培养液(美国 Hyclone 公司)的 24 孔板中,将纯化的 HtrA 加入终浓度为 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 的 E-钙黏蛋白培养液中,分别于孵育 12 h 和 24 h 后进行免疫荧光染色,在共聚焦激光扫描显微镜下观察到细胞外结构域 E-cadherin 大量缺失,说明大肠埃希菌表达的 HtrA 蛋白酶与天然存在的蛋白酶一样具有切割 E-cadherin 的活性(图 5)。

讨论

幽门螺杆菌 HtrA 是一种新的分泌型毒力因子,而其来自大肠埃希菌的同源物 DegP、DegQ 和 DegS

参与错误折叠蛋白的清除并起分子伴侣作用^[3,17]。HtrA 可通过细菌分泌系统分泌在胃黏膜表面,损伤黏膜细胞,导致胃溃疡和胃癌的发生。虽然其同源蛋白(DegP、DegQ 和 DegS)在细菌蛋白质量控制和分子伴侣中发挥重要作用,但关于 HtrA 的功能尚不清楚。体外研究也显示 HtrA 作用于胃黏膜细胞膜上的 E-钙粘连蛋白,破坏细胞连接^[3,18],但其作用机制尚不明确。



A 未处理的融合 MKN-28 细胞 B 融合后的 MKN-28 细胞用重组 HtrA 消化 12 h C 融合后的 MKN-28 细胞用重组 HtrA 消化 24 h。红色部分为 E-cadherin 缺失;DAPI 染色细胞核呈蓝色。

图 5 E-钙黏蛋白的免疫荧光检测

Confluent MKN-28 cells were left untreated (A) or were digested with recombinant HtrA for 12 h (B) and 24h (C). Loss of E-cadherin (red) was demonstrated using an antibody detecting the extracellular domain. Nuclei(blue) were stained using DAPI

Fig. 5 Immunofluorescence of E-cadherin

DegP、DegQ 和 DegS 这 3 种蛋白已被成功表达,但是在表达纯化的过程中均形成了多聚体,从晶体结构来看正是这种多聚体结构发挥了蛋白质质量控制和分子伴侣的功能。然而,本研究在 HtrA 蛋白的表达纯化过程中并未看到形成的多聚体,HtrA 基本上都是单体。这可能与幽门螺旋杆菌分泌 HtrA 到胞外发挥蛋白酶功能有关,或不具备蛋白质量控制和分子伴侣的功能,仅仅作为幽门螺旋杆菌的一个毒力因子,其分子机制尚不清楚,因此可从其晶体结构揭示 HtrA 的调控机制。

SDS -PAGE 电泳分析重组 HtrA 的分子质量约为 53 ku,与预期值相一致。质谱鉴定证实 HtrA 蛋白序列与 NCBI 中的蛋白序列一致。

通过优化筛选到两个结晶条件,分别形成成簇针状晶体和锥形晶体,说明重组 HtrA 蛋白具备可结晶性。然而,由于较强的各向异性,针状蛋白晶体通常衍射能力较弱,难以满足收集较高分辨率数据的需要。而锥形晶体较利于蛋白晶体衍射,但仍需通过优化缓冲液 pH 值、沉淀剂及添加剂种类和浓度、结晶温度等,促使蛋白生长出质量更好的晶体,解析蛋白三维结构。

本研究通过原核表达系统成功表达纯化了具有蛋白酶活性的幽门螺旋杆菌 HtrA 蛋白,并以可溶性和单体形式存在于高盐溶液中。该蛋白可通过切割 E-钙黏蛋白来破坏细胞之间的连接,所以在大肠埃希菌

中表达的 HtrA 具有蛋白酶活性。同时筛选出蛋白的两个结晶条件,为进一步研究该蛋白的晶体结构和功能奠定了基础,为阐明幽门螺旋杆菌感染的分子机制提供了基础资料。

【参考文献】

- [1] Zhang R, Duan G, Shi Q, et al. Construction of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing a fusion protein of Omp22 and HpaA from *Helicobacter pylori* for oral vaccine development [J]. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(11):1911-1916.
- [2] Suzuki H, Moayyedi P. *Helicobacter pylori* infection in functional dyspepsia[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(3):168-174.
- [3] Hoy B, Lower M, Weydig C, et al: *Helicobacter pylori* HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion[J]. *EMBO Rep*, 2010, 11(10):798-804.
- [4] Clausen T, Kaiser M, Huber R, et al. HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, 12(3):152-162.
- [5] Geppert T, Hoy B, Wessler S, et al. Context-based identification of protein-protein interfaces and "hot-spot" residues[J]. *Chem Biol*, 2011, 18(3):344-353.
- [6] Zhang S, Cheng Y, Ma J, et al. DegP degrades a wide range of substrate proteins in *Escherichia coli* under stress conditions[J]. *Biochem J*, 2019(476):3549-3564.
- [7] Isaac DD, Pinkner JS, Hultgren SJ et al: The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(49):17775-17779.
- [8] Kim S, Grant RA, Sauer RT: Covalent linkage of distinct substrate degrons controls assembly and disassembly of DegP proteolytic cages[J]. *Cell*, 2011, 145(1):67-78.
- [9] Truebestein L, Tennstaedt A, Monig T, et al. Substrate-induced remodeling of the active site regulates human HTRA1 activity [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(3):386-388.
- [10] Skorko-Glonek J, Zurawa-Janicka D, Koper T, et al. HtrA protease family as therapeutic targets [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2013, 19(6):977-1009.
- [11] Hou Y, Lin H, Zhu L et al: Lipopolysaccharide increases the incidence of collagen-induced arthritis in mice through induction of protease HTRA-1 expression[J]. *Arthritis Rheumatism*, 2013, 65(11):2835-2846.
- [12] Prorok-Hamon M, Friswell MK, Alswied A, et al. Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+ *Escherichia coli* expressing lpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer[J]. *Gut*, 2014(63):761-770.
- [13] Georg B, Marianne G, Maryam R. Endothelial cadherins in cancer[J]. *Cell Tissue Res*, 2014(355):523-527.
- [14] Yang WH, Lan HY, Huang CH, et al. RAC1 activation mediates Twist1-induced cancer cell migration[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(4):366-374.
- [15] Gavert N, Shvab A, Sheffer M, et al. c-Kit is suppressed in human colon cancer tissue and contributes to L1-mediated metastasis[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(18):5754-5763.
- [16] Yang G, Zhang J, You WM, et al. Targeted disruption of the BCL9/ β -catenin interaction by endosomal-escapable nanoparticles functionalized with an E-cadherin-derived peptide[J]. *Nanotechnology*, 2020, 31(11):10.
- [17] Lower M, Weydig C, Metzler D, et al. Prediction of extracellular proteases of the human pathogen *Helicobacter pylori* reveals proteolytic activity of the Hp1018/19 protein HtrA [J]. *PLoS one*, 2008, 3(10):e3510.
- [18] Carmen MA, Maria S, Camilla G, et al. HtrA-mediated E-cadherin cleavage is limited to DegP and DegQ homologs expressed by gram-negative pathogens[J]. *Cell Communication and Signaling*, (2016) 14:30.

【收稿日期】 2022-04-14 【修回日期】 2022-07-02