

DOI:10.13350/j.cjpb.220508

• 论著 •

# 幽门螺杆菌 CagA 的序列差异对细胞形态的影响<sup>\*</sup>

曾晓燕, 全欣莹, 李雷蕾, 贾岑岑, 廖永慧, 谢渊, 赵艳, 周建奖<sup>\*\*</sup>

(贵州医科大学地方病与少数民族疾病教育部重点实验室, 贵州省医学分子生物学重点实验室, 贵州贵阳 550004)

**【摘要】 目的** 比较幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染过程中不同细胞毒素相关基因 A (cytotoxin-associated gene A, CagA)序列对胃上皮癌细胞株 AGS 形态的影响,探讨 CagA 序列的结构差异。**方法** 将含不同 CagA 序列的 4 株东亚株、3 株西方株、1 株 *cagA* 基因敲除株和 1 株 CagA C 端缺失株的 Hp 以感染复数 30 : 1 分别感染 AGS 细胞 6 h 和 7 d,观察不同时间点的细胞形态变化。以未感染及煮沸 10 min 的 Hp 感染 AGS 细胞为空白对照及阴性对照。从 GenBank 数据库收集 150 条 *cagA* 基因序列,用 MEGA7.0 软件进行聚类分析。**结果** *cagA* 基因敲除株和 *cagA* 基因 C 端缺失株 Hp 感染 AGS 细胞 6 h 均未出现明显的细胞形态改变,其它 7 株(*cagA* 基因完整)感染细胞后均出现明显的蜂鸟样表型的形态改变。将 9 株 Hp 煮沸 10 min 灭活后感染的细胞也未出现明显的形态改变。Hp 持续感染 7 d 后,只有 3 株西方株和 1 株东亚株感染的细胞呈现蜂鸟样表型,另 3 株带 CagA 的 EPIYA 基序变异的东亚株未发生细胞形变。聚类分析显示,多株起源于东亚国家日本、中国和韩国的 Hp 聚类于西方株,且西方株 CagA 中 EPIYA 基序更容易发生变异。**结论** Hp 西方株在中国和其它东亚国家普遍流行,其 CagA 比亚洲株的 CagA 有更强的致细胞形变能力和更多的 EPIYA 基序变异,完整的 CagA 序列是诱导细胞形变的主要因素。这些数据对深入研究 Hp 不同基因型的致病能力有重要意义。

**【关键词】** 幽门螺杆菌;CagA;聚类分析;细胞形态学

**【中图分类号】** R378.91

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)05-0537-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 May;17(5):537-541.]

## Effect of CagA sequence difference of *Helicobacter pylori* on cell morphology

ZENG Xiao-yan, QUAN Xin-ying, LI Lei-lei, JIA Cen-cen, LIAO Yong-hui, XIE-Yuan, ZHAO Yan, ZHOU Jian-jiang (Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education & Key Laboratory of Medical Molecular Biology of Guizhou Province, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)<sup>\*\*\*</sup>

**【Abstract】 Objective** To compare the effect of cytotoxin-associated gene A (CagA) sequence differences on the morphology of gastric epithelial cancer cell line AGS cells during *Helicobacter pylori* (Hp) infection and analyze the structural differences of CagA sequences. **Methods** AGS cells were infected with Hp that contained different CagA sequences, including 4 East Asian strains, 3 Western strains, 1 *cagA* knockout strain, and 1 *cagA* c-terminal deleted strain, with a multiplicity of infection of 30, and then the cell morphology was observed at 6 hours and 7 days after infection. AGS cells alone and AGS cells infected with Hp boiled for 10 min were used as blank and negative controls. Subsequently, the 150 *cagA* sequences collected from the GenBank database were clustered with MEGA7.0 software. **Results** The significant changes in cell morphology of AGS cells infected with the *cagA* knockout strain and *cagA* C-terminal deleted strain were not detected, while AGS cells infected with other 7 strains containing complete *cagA* sequences exhibited the hummingbird phenotype at 6 hours after infection. Furthermore, the morphology of AGS cells infected with 9 Hp strains boiled for 10 min did also not change significantly. After 7 days of persistent infection with Hp, AGS cells infected with 3 Western strains and 1 East Asian strain showed the hummingbird phenotype, while the infection of AGS cells with other 3 East Asian strains carrying the mutated EPIYA motif in CagA did not cause any significant changes in cell morphology. Cluster analysis showed that many Hp strains originating from East Asian countries, including Japan, China, and Korea, were clustered into Western strains, and the EPIYA motif in CagA of Western strains was more prone to variations. **Conclusion** The western strains of Hp are prevalent in China and other East Asian countries, and CagA of these strains has a stronger ability to cause cell morphologic changes and more variations in EPIYA motifs than CagA of East Asian strains. The complete CagA sequences are a key factor for inducing cell morphological changes. These

<sup>\*</sup> **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 32160166, 31760328); 贵州省科技计划项目[黔科合支撑(2020)4Y026 号, 黔科合基础(2020)1Z010, 黔科合基础(2020)1Y333]。

<sup>\*\*</sup> **【通讯作者】** 周建奖, E-mail: zjj1985048@gmc.edu.cn

**【作者简介】** 曾晓燕(1996-), 女, 贵州人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤分子机制研究。E-mail: 2500987344@qq.com

data are significant for further study of the pathogenicity of different Hp genotypes.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; CagA; cluster analysis; cell morphology

胃癌是全球癌症死亡的第三大原因,其强致病因素之一是幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染<sup>[1]</sup>。Hp是一种可定植于胃上皮细胞的螺旋形革兰阴性细菌,长期感染会引起胃黏膜炎症、严重的胃萎缩、胃癌和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤<sup>[2-3]</sup>。细胞毒素相关基因A蛋白(Cytotoxin-associated gene A, CagA)是Hp重要的毒力因子之一,被认为是导致胃癌发生的重要原因。在CagA蛋白羧基端可变区含有谷氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-酪氨酸-丙氨酸(Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala, EPIYA)基序<sup>[4]</sup>。根据EPIYA基序的不同可将Hp分为东亚株和西方株。研究显示,西方株的CagA主要在EPIYA-C基序被磷酸化,东亚株的CagA主要在其EPIYA-D基序被磷酸化,磷酸化的EPIYA-C和EPIYA-D与宿主细胞内酪氨酸磷酸酶-2(Tyrosine phosphatase-2, SHP-2)的结合能力不同,并且EPIYA-D与SHP-2的结合能力比EPIYA-C强<sup>[5-6]</sup>。磷酸化的CagA与细胞内SHP-2结合,激活下游通路,导致细胞骨架重排和细胞拉伸即“蜂鸟样表型”的改变,这种细胞形变能够使细胞获得迁移和侵袭的能力,从而促进胃癌细胞发生转移<sup>[7-9]</sup>。EPIYA不同位点的磷酸化引起细胞形态改变的程度也不一样,从而解释了携带不同亚型CagA的Hp临床分离株致病力的差异性<sup>[10]</sup>。

熊林等<sup>[11]</sup>从临床胃黏膜组织中纯化了24株Hp,获得的CagA序列提交到GenBank并命名为GZ序列。通过分析CagA EPIYA基序确定20株为东亚株,6株为西方株。本研究选择9株Hp,包括临床菌株GZ7、GZ15、GZ19、GZ26及GZ8共5株、国际标准西方株11637、11639及26695共3株,以及GZ7的cagA基因敲除株GZ7 cagA,感染低恶性的胃上皮癌细胞株AGS,探讨含有不同CagA序列的Hp对AGS细胞的形态影响;从GenBank收集150个CagA序列进行富集分析,比较CagA的变异情况,为Hp-CagA序列差异导致的致病力差异提供有价值的实验数据。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 细胞与细菌** 人胃上皮细胞株AGS(No: CRL-1739)购于美国ATCC细胞库;Hp11637、Hp11639及Hp26695株购于美国ATCC菌株库;HpGZ7分离自临床胃癌组织, HpGZ8、GZ15、GZ19、GZ26株分离自临床胃良性病变组织,由本室保存;HpGZ7 cagA为HpGZ7菌株敲除cagA基因的敲除菌。上述所取

组织患者知情同意,并经医院伦理委员会批准[2017伦审第(43)]。

**1.2 主要试剂与仪器** 胎牛血清, RPMI-1640培养基, DMEM高糖培养基和青霉素/链霉素购于Gibco公司(美国);哥伦比亚血琼脂培养基和无菌脱纤维羊血购于南京便诊生物科技有限公司;DMSO、0.25% EDTA胰蛋白酶, 琼脂糖和琼脂粉购于Sigma公司(美国);Hp选择剂购于OXOID公司(英国);革兰染色液购于南京建成生物科技公司。CO<sub>2</sub>恒温培养箱购于Thermo Fisher公司(美国);倒置显微镜购于日本奥林巴斯公司;超纯水仪购于Millipore公司(美国);MoxiTM Z型自动细胞计数仪购于ORFLO公司(美国);TGem Plus型全波长分光光度计购于TIANGEN生物技术(中国)公司;微需氧产气袋购于三菱(中国)公司;幽门螺杆菌尿素酶试纸购于索莱宝公司。

### 2 方法

**2.1 Hp的培养及鉴定** 取液氮冻存的Hp菌液,迅速置于37℃水浴轻摇1~2 min至融解,以5 000 r/min(离心半径7.5 cm)离心5 min,弃上清,加入200 μl胎牛血清重悬细菌沉淀;将菌液转至哥伦比亚血琼脂培养板(哥伦比亚琼脂粉3.9 g,蒸馏水90 ml,无菌脱纤维羊血10 ml,选择剂400 μl),正置于37℃、10% CO<sub>2</sub>培养箱培养3~7 d。细菌计数:刮取细菌至1×PBS缓冲液,洗涤2~3次,再用1×PBS缓冲液重悬细菌,用紫外分光光度计检测600 nm处的吸光度(A)值。A=1时,CFU=7.5×10<sup>7</sup>。并通过革兰染色、尿素酶及过氧化氢酶试验进行验证。

**2.2 细胞培养** AGS细胞用完全培养基(含DMEM高糖培养基,10%胎牛血清,1%青霉素和链霉素),置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养。待细胞生长至90%融合时进行传代。

**2.3 Hp感染细胞** 待细胞生长至70%~80%融合度时, Hp以MOI为30:1感染胃上皮细胞AGS,在进行感染之前将细胞换成无双抗培养基,感染6 h用1×PBS缓冲液洗涤细胞3次,观察细胞形态。感染7 d实验组在感染6 h时同样用1×PBS洗3次,换新的培养基,持续培养过程中细胞隔2 d换液,感染至7 d时观察细胞形态变化并拍照。

**2.4 序列比对及聚类分析** 从GenBank中选取150株Hp的cagA序列(包括课题组纯化的24株临床分离株)。用DNASTAR 7.1软件将cagA基因转换成氨基酸序列并分析数量差异,使用Clustalx软件进行多

序列比对,运用 MEGA7.0 软件进行系统发育树聚类分析。

结 果

1 Hp 的培养、鉴定及 CagA EPYIA 基序特征

选择保存的 9 株 Hp,包括临床菌株 GZ7、GZ15、GZ19、GZ26 及 GZ8 共 5 株东亚株、国际标准西方株 11637、11639 及 26695 共 3 株及 GZ7 的 *cagA* 基因敲除株 GZ7  $\Delta$ *cagA*,从液氮中复苏后进行微需氧培养及尿素酶和革兰染色鉴定。结果显示,培养 72 h 后 Hp 出现针尖样菌落(图 1A);刮取少量菌落于尿素酶试纸上呈现红色阳性反应(图 1B);革兰染色菌体呈弧杆状、螺杆菌状、海鸥状等(图 1C),证实为 Hp。



A 哥伦比亚血琼脂平板上培养的 Hp B 尿素酶试验 C 革兰染色(400×)

图 1 Hp 的培养及鉴定

A *H. pylori* cultured on colombian blood agar plate B Urease assay C Gram stain of *H. pylori* (400×)

Fig.1 *H. pylori* culture and identification

9 株 Hp 的 CagA EPYIA 基序特征见表 1。东亚株中 GZ7 的 CagA 含 EPIYA-ABD,为典型的东亚株;GZ8 和 GZ26 的 CagA 中 EPIYA-D 第 5 位氨基酸由 A(谷氨酸)变为 V(缬氨酸);GZ19 的 CagA 中 EPIYA-B 第 2 位氨基酸由 P(脯氨酸)变为 S(丝氨酸);GZ15 缺少含 EPIYA 基序的 CagA C 端序列。西方株中 26695 和 11639 的 CagA 中 EPIYA-B 第 5 位氨基酸从 A(谷氨酸)变成 T(苏氨酸);11637 缺失 EPIYA-C。Hp GZ7  $\Delta$ *cagA* 敲除了 *cagA* 基因。

2 Hp 感染 6h 对 AGS 细胞形态的影响

分别将 9 株 Hp 以 MOI 为 30:1 感染 AGS 细胞 6 h,观察其形态变化,结果如图 2。与对照 AGS 细胞比较,HpGZ7 $\Delta$ *cagA* 和 GZ15 感染后未出现明显的细胞形态改变,细胞呈不规则多边形。其它 7 株 Hp 感染细胞后均出现了明显的蜂鸟样表型,且蜂鸟样表型的形变程度不同。分别将上述 9 株 Hp 煮沸 10 min 灭活后感染细胞,均未出现明显的形态改变。提示活的 Hp 中完整的 CagA 诱导了细胞的蜂鸟样表型。

3 Hp 感染 AGS 7d 对细胞形态的影响

分别用 9 株 Hp 及煮沸 10 min 灭活的 Hp 以 MOI 为 30:1 感染 AGS 6 h,PBS 清洗细胞以去除游离 Hp,继续培养 7 d 后观察细胞形态变化,结果如图

3。HpGZ7、11637、11639 及 26695 感染组细胞均出现了明显的蜂鸟样表型,形变程度由大至小分别为 Hp GZ7、26695、11639 及 11637 感染组。其它感染组及灭活的 Hp 感染组均未出现明显的细胞形态变化,与 AGS 对照形态一致。

表 1 9 株 Hp CagA 中的 EPYIA 基序特征  
Table 1 Characteristics of EPYIA motifs in CagA from 9 *H. pylori* strains

| 菌株<br>Strain             | GenBank 索引号<br>GenBank number | 菌株来源<br>Source of strain | EPIYA 基序<br>EPIYA motif | 分类<br>Classification | 变异 Variation |            |
|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------|--------------|------------|
|                          |                               |                          |                         |                      | 位点<br>Site   | 类型<br>Type |
| GZ7                      | KR154737                      | Gastric cancer           | ABD                     | East Asia            | NO           |            |
| GZ8                      | KR154738                      | Gastric ulcer            | ABD <sup>#</sup>        | East Asia            | EPIY [A]-D   | A→V        |
| GZ15 <sup>Ⓢ</sup>        | -                             | Gastric ulcer            | -                       | East Asia            | EPIYA-ABC    | Deletion   |
| GZ19                     | KR154748                      | Gastritis                | AB <sup>#</sup> D       | East Asia            | E [P] IYA-B  | P→S        |
| GZ26                     | KR154755                      | Gastric ulcer            | ABD <sup>#</sup>        | East Asia            | EPIY [A]-D   | A→V        |
| NCTC11637                | GQ161098                      | -                        | AB                      | Western              | EPIYA-C      | Deletion   |
| NCTC11639                | GQ161099                      | -                        | AB <sup>#</sup> C       | Western              | EPIY [A]-B   | A→T        |
| 26695                    | KR154758                      | -                        | AB <sup>#</sup> C       | Western              | EPIY [A]-B   | A→T        |
| GZ7 $\Delta$ <i>cagA</i> | -                             | Gastric cancer           | -                       | East Asia            | <i>cagA</i>  | Deletion   |

注:ABD/C;EPIYA-A、-B 和 -D/C;阴影:氨基酸变异;Ⓢ:临床分离株 CagA 的 C 末端序列缺失其 CagA 序列未提交至 GenBank 数据库;#:变异部位。

Notes: ABD/C; EPIYA-A, -B and -D/C; Shadow: amino acid variation; Ⓢ: A clinical isolate with deletion of C-terminal sequence of CagA and its sequences not submitted to GenBank database; #: Variation site.

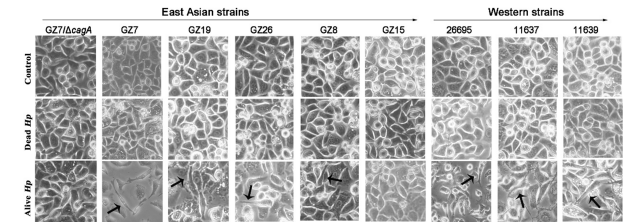


图 2 Hp 感染 6 h 后的 AGS 细胞形态变化

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

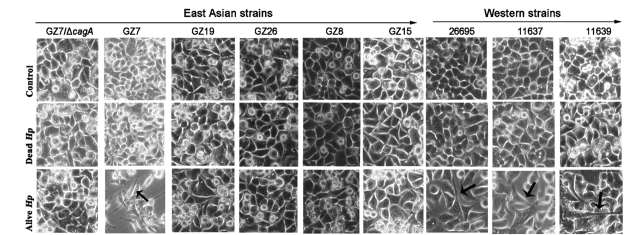


图 3 Hp 感染 7 d 后的 AGS 细胞形态变化

Fig.3 Morphology of AGS cells infected with *H. pylori* for 7 days

4 CagA 蛋白序列比对及聚类分析

由于来自不同国家和地区的 Hp 均与胃癌发病率相关。因此本研究随机从 GenBank 数据库中获取包括本室保存的临床分离株在内的 150 个 Hp-CagA 序列,用 DNASTAR 7.1 软件将 150 条 *cagA* 基因序列翻译成氨基酸序列进行比对,并用 MEGA7.0 软件进行聚类分析。结果显示,150 株 Hp 菌株聚类为 2 大群:80 株东亚群和 70 株西方群。西方群进一步聚类为 3



群;典型西方群 58 株,西方型东亚群 10 株,西方型南美群 2 株(图 4)。东亚群主要来自中国(20/80)、日本(17/80)等东亚国家,以及越南(29/80)、菲律宾(6/80)等东南亚国家。西方群主要来自南美洲国家如哥伦比亚(24/70)和东南亚国家菲律宾(12/70)。CagA 序列分析显示,150 株 Hp 中有 73 株(48.7%)的 CagA EPIYA 序列发生变异,且西方株变异率更高,尤其是 EPIYA-B 基序的 A→T 突变(东亚株 5.5%,西方株 34.2%)及 EPIYA-C 重复突变(东亚株 0,西方株 42.5%)(表 2)。

表 2 150 株 Hp CagA 蛋白 EPIYA 基序变异  
Table 2 The sequence variations in EPIYA motifs of CagA from 150 *H. pylori* strains

| EPIYA 基序<br>EPIYA<br>Motifs | 菌株(%) Strains           |                              |                           | 变异<br>Variation |
|-----------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------|
|                             | 总数(n=73)<br>Total(n=73) | 东亚(n=11)<br>East Asian(n=11) | 西方(n=62)<br>Western(n=62) |                 |
| EPIYA-A                     | 2(2.7)                  | 1(1.4)                       | 1(1.4)                    | Deletion        |
| EPIYA-B <sup>a</sup>        | 29(39.7)                | 4(5.5)                       | 25(34.2)                  | A→T             |
| EPIYA-B                     | 5(6.8)                  | 3(4.1)                       | 2(2.7)                    | P→S             |
| EPIYA-B <sup>b</sup>        | 1(1.4)                  | 0(0.0)                       | 1(1.4)                    | I→V             |
| EPIYA-B <sup>c</sup>        | 1(1.4)                  | 1(1.4)                       | 0(0.0)                    | A→S             |
| EPIYA-C                     | 31(42.5)                | 0(0.0)                       | 31(42.5)                  | Duplication     |
| EPIYA-C                     | 6(8.2)                  | 1(1.4)                       | 5(6.8)                    | Deletion        |
| EPIYA-D                     | 2(2.7)                  | 2(2.7)                       | 0(0.0)                    | A→V             |

注: <sup>a</sup>: 菌株 Shi257 (AB587256.1) 和 Shi417 (AB587258.1) 同时有 A→T 和 P→S 变异; <sup>b</sup>: 菌株同时有 I→V 和 A→T 变异; <sup>c</sup>: 菌株同时有 P→S 和 A→S 变异。

Notes: <sup>a</sup>: *H. pylori* strains Shi257 (AB587256.1) and Shi417 (AB587258.1) contain the A→T and P→S variations simultaneously; <sup>b</sup>: This strain contains the I→V and A→T variations simultaneously; <sup>c</sup>: This strain contains the P→S and A→S variations simultaneously.

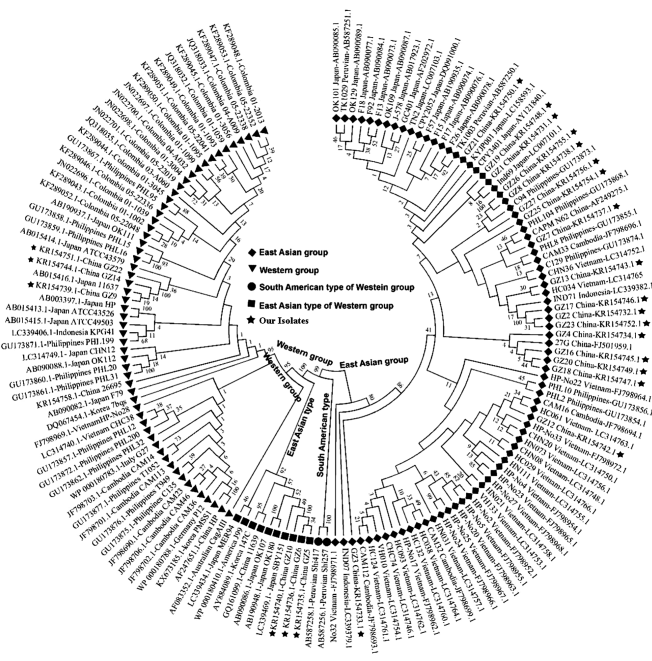


图 4 基于 CagA 序列的 150 株 Hp 系统发育树  
Fig. 4 Phylogenetic tree of 150 *H. pylori* strains based on CagA sequences

## 讨论

随着人口老年化增加,胃癌的发病率和死亡率逐渐增高,发展中国家的胃癌发病率高于发达国家。我国是胃癌的高发区,发病率和死亡率分别占全部肿瘤的第 3 位,已经成为影响人口健康的重要疾病之一<sup>[12]</sup>。研究发现,Hp 长期感染是导致胃癌的重要因素之一,但是其致病机制至今仍不清楚<sup>[13]</sup>。CagA 蛋白是 120~150 ku 的亲水性蛋白质,蛋白序列分为保守区和可变区,其上游氨基端约 800 个氨基酸为保守区,下游羧基端 300~400 个氨基酸为可变区。CagA 的羧基端含有 EPIYA 基序,根据 EPIYA 基序的不同可将 Hp 分为西方株(含 EPIYA-ABC)和东亚株(含 EPIYA-ABD),且西方株和东亚株的致病能力不同。CagA 蛋白是 Hp 重要的毒力因子之一,可由 IV 型分泌系统易位到细胞膜内,通过依赖和不依赖磷酸化的方式发挥不同的作用。在酪氨酸激酶的作用下,易位到细胞内的 CagA 在其 C 端的 EPIYA 基序上发生磷酸化,再与 SHP-2 等多种下游蛋白分子结合,干扰细胞内的信号转导,导致细胞骨架发生重排,引起细胞骨架中肌动蛋白的改变而导致胃上皮细胞变为长梭形,即出现蜂鸟样表型<sup>[14-15]</sup>。此外,CagA 多聚化基序(CagA multimerization motif, CM)还可结合极性调节激酶 1b(Polarity-regulating kinase1b, PAR1b),抑制 PAR1b 激酶活性,从而引起细胞连接和极性缺陷,促进上皮细胞的形态改变。PAR1b 还能形成同源二聚体,与二聚化的 CagA 结合,加强 CagA-SHP-2 复合物的形成,使 SHP-2 失调,有利于细胞形成蜂鸟样表型,从而提升细胞的运动能力和增强肿瘤侵袭性<sup>[16-18]</sup>。目前关于 Hp 的致病机制仍不十分清楚,尤其是对东亚株比西方株致病能力更强的机制研究尚少,还有很多问题尚待解决。

EPIYA 基序是 CagA 发生磷酸化的重要序列,在引起细胞形变中发挥重要作用。本研究用 9 株含不同 CagA 序列的 Hp 感染低恶性的胃上皮癌细胞 AGS,观察感染 6 h 和 7 d 后细胞的形态变化。结果显示,感染 6 h 后除了 *cagA* 基因敲除株(GZ7  $\Delta cagA$ )和 CagA C 端缺失株(GZ15)外,其余 7 株 Hp 感染均能引起 AGS 细胞发生不同程度的蜂鸟样表型的形态变化,且典型的东亚株 GZ7(EPIYA 基序无突变)诱导细胞形变更为明显,而煮沸灭活后的 Hp 感染细胞不能引起细胞形态的改变。证明活的 Hp 中完整的 CagA 序列是诱导细胞发生形变的关键因素。Hp 持续感染 7 d,西方株感染引起的细胞形态变化比东亚株感染引起的细胞形态变化更明显。在 CagA 完整的 4 株东亚株中,只有典型东亚株 HpGZ7 使细胞出现了明显的蜂鸟样表型,其他 3 株东亚菌株感染未引起细胞形态变化,其中 2 株(GZ26 和 GZ8)在 EPIYA-D 位点第 5

位氨基酸由 A(谷氨酸)变异为 V(缬氨酸),1株(GZ19)在 EPIYA-B 位点第 2 位氨基酸由 P(脯氨酸)变异为 S(丝氨酸),推测可能是 EPIYA 基序的变异在 AGS 持续感染中导致 CagA 功能降低,但该结论尚需进一步研究。相反,3 株西方株的持续感染均能引起细胞的蜂鸟样形态变化,且 Hp11637 缺少 EPIYA-C 和 CM 基序也能诱导细胞形态变化,提示西方株的 CagA 比东亚株的 CagA 有更强的致细胞形变能力。流行病学研究显示,西方人群感染的 Hp 有 60% 是 *cagA* 阳性,且感染 *cagA*<sup>+</sup> Hp 的患者有更高的比例发展为胃癌,但是几乎所有的 Hp 东亚株都是 *cagA* 阳性,但仅有 1% 的感染患者发展为胃癌<sup>[19-20]</sup>。也有研究报道 Hp 的致病能力与不同序列的 CagA 和下游信号蛋白的结合而导致的毒力差异有关<sup>[21]</sup>。

为了进一步探讨 CagA 中 EPIYA 的变异,本研究收集了 150 条 Hp-CagA 序列进行比对、聚类及 EPIYA 变异分析,发现许多起源于东亚国家包括日本、中国和韩国的菌株聚类于西方群。在本室保存的 24 株临床分离株中,分别有 18 株和 6 株聚类到东亚群和西方群,表明 Hp 西方株在中国和其它东亚国家普遍流行。并且,来自同一国家和地区的菌株倾向于聚类在一起,这可能是导致不同地区胃癌发病率差异的原因。变异分析显示有 48.7% 的 AGS-CagA 中 EPIYA 基序发生变异,且西方株的变异远超过东亚株,尤其是 EPIYA-B 基序的 A→T 突变及 EPIYA-C 重复突变,分别占西方株的 34.2% 和 42.5%。

Hp 能引起细胞发生不同程度的形变,从而提高细胞的侵袭能力,其中完整的 CagA 序列是诱导细胞发生形变的关键因素。在持续的 Hp 感染过程中,西方株的 CagA 比东亚株的 CagA 有更强的致细胞形变能力。此外,Hp 西方株在中国和其它东亚国家普遍流行,其 CagA 的 EPIYA 比东亚株有更多的变异,尤其是 EPIYA-B 基序的 A→T 突变及 EPIYA-C 重复突变。这些数据对进一步研究 Hp 不同基因型的致病能力有重要意义。

#### 【参考文献】

- [1] Hoffmann W. Current status on stem cells and cancers of the gastric epithelium[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(8):19153-19169.
- [2] Alzahrani S, Lina TT, Gonzalez J, et al. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(36):12767-12780.
- [3] Wang F, Meng W, Wang B, et al. *Helicobacter pylori* induced gastric inflammation and gastric cancer[J]. Cancer Lett, 2014, 345(2):196-202.
- [4] Akguc M, Karatayli E, Celik E, et al. Production of a recombinant CagA protein for the detection of *Helicobacter pylori* CagA

- antibodies[J]. Mikrobiyol Bul, 2014, 48(3):402-412.
- [5] Hatakeyama M. Malignant *Helicobacter pylori*-associated diseases: Gastric cancer and MALT lymphoma[J]. Adv Exp Med Biol, 2019(1149):135-149.
- [6] Hayashi T, Senda M, Suzuki N, et al. Differential mechanisms for SHP2 binding and activation are exploited by geographically distinct *Helicobacter pylori* CagA oncoproteins[J]. Cell Rep, 2017, 20(12):2876-2890.
- [7] Tegtmeyer N, Wessler S, Necchi V, et al. *Helicobacter pylori* employs a unique basolateral type IV secretion mechanism for CagA delivery[J]. Cell Host Microbe, 2017, 22(4):552-560.
- [8] Lin L, Wei H, Yi J, et al. Chronic CagA-positive *Helicobacter pylori* infection with MNNG stimulation synergistically induces mesenchymal and cancer stem cell-like properties in gastric mucosal epithelial cells[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10):17635-17649.
- [9] 邢军明, 黄志刚. 癌蛋白 CagA、ERK 信号通路 with 胃癌关系的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2013, (31):3363-3368.
- [10] 万秀坤, 刘纯杰. 幽门螺杆菌 CagA 蛋白及其致病机制的研究进展[J]. 微生物学报, 2016, 56(12):1821-1830.
- [11] 熊林, 陈峥宏, 刘正美, 等. 幽门螺杆菌临床株 *cagA* 基因克隆及序列分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(09):769-773, 777.
- [12] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [13] Chen HY, Hu Y, Lu NH, et al. Caudal type homeoboxes as a driving force in *Helicobacter pylori* infection-induced gastric intestinal metaplasia[J]. Gut Microbes, 2020, 12(1):1-12.
- [14] Mishra JP, Cohen D, Zamperone A, et al. CagA of *Helicobacter pylori* interacts with and inhibits the serine-threonine kinase PRK2[J]. Cell Microbiol, 2015, 17(11):1670-1682.
- [15] Coulombe G, Rivard N. New and unexpected biological functions for the src-homology 2 domain-containing phosphatase SHP-2 in the gastrointestinal tract[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2015, 2(1):11-21.
- [16] Tsutsumi R, Higashi H, Higuchi M, et al. Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase[J]. J Biol Chem, 2003, 278(6):3664-70.
- [17] Lind J, Backert S, Hoffmann R, et al. Systematic analysis of phosphotyrosine antibodies recognizing single phosphorylated EPIYA-motifs in CagA of East Asian-type *Helicobacter pylori* strains[J]. BMC Microbiol, 2016, 16(1):201.
- [18] 汪苏, 周建奖, 单可人. 幽门螺杆菌 CagA 蛋白研究进展[J]. 微生物与感染, 2008(3):175-177, 189.
- [19] Nejati S, Karkhah A, Darvish H, et al. Influence of *Helicobacter pylori* virulence factors CagA and VacA on pathogenesis of gastrointestinal disorders[J]. Microb Pathog, 2018(117):43-48.
- [20] Chen SY, Zhang RG, Duan GC. Pathogenic mechanisms of the oncoprotein CagA in *H. pylori*-induced gastric cancer (Review) [J]. Oncol Rep, 2016, 36(6):3087-3094.
- [21] Hashi K, Imai C, Yahara K, et al. Evaluating the origin and virulence of a *Helicobacter pylori* *cagA*-positive strain isolated from a non-human primate[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):15981.

【收稿日期】 2022-01-15 【修回日期】 2022-04-05