

研究报告

幽门螺杆菌东、西方株 CagA 的序列差异及其对胃癌细胞生长与凋亡的影响

龙妮娅^{1,2} 熊林^{1,2} 赵艳^{1,2} 袁航^{1,2} 李雅洁^{1,2} 陈学书^{1,2} 张晓怡^{1,2}
谢渊^{1,2} 周建奖^{1,2,3*}

- (1. 地方病与少数民族疾病教育部重点实验室 贵州医科大学 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. 贵州医科大学附属医院临检科 贵州 贵阳 550004)

摘要:【背景】幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是胃癌的主要致病因素,其分泌的细胞毒素相关基因 A 蛋白(Cytotoxin associated gene A, CagA)是目前已知唯一能被 *H. pylori* 注入胃上皮细胞并模拟胞内蛋白发挥作用的癌蛋白,参与胃癌的发生发展。【目的】比较 *H. pylori* 东亚株和西方株 CagA 结构差异,初步探讨 *H. pylori*-CagA 对胃癌细胞增殖与凋亡的影响。【方法】对 *H. pylori* 东亚株和西方株 CagA 的核酸及氨基酸序列进行生物信息学分析,构建含东亚株和西方株 *cagA* 基因的真核表达载体,转染胃癌细胞 AGS,用 Western blot 法检测 CagA 蛋白的表达,用 CCK8 法测定细胞的生长曲线,流式细胞术检测细胞凋亡。【结果】生物信息学分析发现 *H. pylori* 东亚、西方菌株 CagA 的核酸序列和氨基酸序列均存在特征性差异。构建了含东亚、西方菌株 *cagA* 基因的表达载体[命名为 GZ7/*cagA* (东亚株)和 26695/*cagA* (西方株)]。与空载体组比较, GZ7/*cagA* 和 26695/*cagA* 转染组均表达 CagA 蛋白,两组比较表达量无显著性差异, GZ7/*cagA* 转染组细胞生长显著增加,而 26695/*cagA* 转染组细胞生长显著降低 ($P<0.05$)。GZ7/*cagA* 转染组、26695/*cagA* 转染组细胞的凋亡率分别为 7.23 ± 0.96 及 9.17 ± 1.40 ,均高于空载体组 (5.03 ± 0.63),差异有统计学意义 ($P<0.05$)。【结论】东亚株与西方株 CagA 之间有结构和功能的差异,东亚株 CagA 能促进细胞增殖,而西方株 CagA 却抑制细胞增殖,但两者均能促进细胞凋亡。

关键词: 幽门螺杆菌, CagA, 胃癌, 细胞增殖, 细胞凋亡

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31560326, 31660031); Science and Technology Planning Project of Guizhou Province (LH[2015]7360); Science and Technology Foundation of Guizhou Provincial Health and Family Planning Commission (gzwjkj2015-1-010)

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

Received: May 10, 2017; Accepted: June 23, 2017; Published online (www.cnki.net): July 04, 2017

基金项目: 国家自然科学基金(31560326, 31660031); 贵州省科技合作计划项目(黔科合 LH 字[2015]7360); 贵州省卫计委科技基金(gzwjkj2015-1-010)

*通信作者: E-mail: jianjiangzhou@sina.cn

收稿日期: 2017-05-10; 接受日期: 2017-06-23; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-07-04

Sequences difference of CagA between East Asian strain and Western strain of *Helicobacter pylori* and its impact on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells

LONG Ni-Ya^{1,2} XIONG Lin^{1,2} ZHAO Yan^{1,2} YUAN Hang^{1,2} LI Ya-Jie^{1,2}
CHEN Xue-Shu^{1,2} ZHANG Xiao-Yi^{1,2} XIE Yuan^{1,2} ZHOU Jian-Jiang^{1,2,3*}

(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 Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

Abstract: [Background] *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) has been described as a main pathogenic factor for gastric cancer. Protein product of the cytotoxin associated gene A (CagA) has been known as the only oncoprotein that is secreted and injected into gastric epithelial cells by the bacteria, thus mediating the development of gastric cancer. [Objective] To compare the sequence difference of CagA between the East Asian strain and Western strain of *H. pylori*, and explore the effects of *H. pylori*-CagA on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells. [Methods] DNA and amino acid sequences of CagA in East Asian strain and Western strain were analyzed. A eukaryotic expression vector containing the *cagA* gene from each strain was constructed and transferred into AGS gastric cancer cells. The CagA protein was assessed using Western blot. Cell growth curve and apoptosis were determined using CCK8 and flow cytometry, respectively. [Results] Comparison of the DNA and amino acid sequences in the CagA between the two strains revealed some characteristic differences. The expression vectors of *H. pylori-cagA* gene were constructed successfully and named as GZ7/*cagA* (East Asian strain) and 26695/*cagA* (Western strain). Compared with cells transfected with the empty vector, the cells transfected with the East Asian strain and the Western strain derived *cagA* expressed CagA proteins, but there is no difference in protein levels between the two groups. The cells transfected with the East Asian strain and the Western strain derived *cagA* grew significantly fast or slower, respectively ($P < 0.05$). The apoptotic rates of cells expressing the East Asian strain derived CagA and the Western strain derived CagA were 7.23 ± 0.96 and 9.17 ± 1.40 , respectively, both being higher than that of the cells expressing the empty vector (5.03 ± 0.63) ($P < 0.05$). [Conclusion] There are structural and functional differences in the CagA between the East Asian and Western strains of *H. pylori*. While the one in the East Asian strain promotes the proliferation, Western CagA inhibits the proliferation of gastric cancer cells. However, the CagA in the both strains promotes apoptosis of the cells.

Keywords: *Helicobacter pylori*, CagA, Gastric cancer, Proliferation, Apoptosis

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是一种螺旋状革兰氏阴性微需氧菌,全球约50%以上人口感染幽门螺杆菌,大多数幽门螺杆菌感染者呈无症状胃炎,有10%–15%的人群发展为萎缩性胃炎、消化性溃疡、胃癌及粘膜相关淋巴瘤^[1]。细胞毒素相关基因A蛋白(Cytotoxin associated gene A protein, CagA)是由*H. pylori*产生并注入胃上皮细胞的高毒力蛋白,其基因位于*H. pylori*基因组 *cag* 致病岛(*cagPAI*)的3'末端。当

H. pylori 感染人胃组织并吸附在胃上皮细胞后,通过细菌VI型分泌系统将CagA注入胃上皮细胞,调控细胞内信号转导并参与胃相关疾病的发生发展^[2]。由于CagA蛋白C端为高度变异区,根据谷氨酸—脯氨酸—异亮氨酸—酪氨酸—丙氨酸连续排列形成的EPIYA基序,将*H. pylori*分为东亚菌株和西方菌株。典型的西方菌株CagA含EPIYA-A、B、C位点,东亚菌株CagA含EPIYA-A、B、D位点。有研究发现*H. pylori*东亚菌株的感染力和致

病性均高于 *H. pylori* 西方菌株, 但是机制尚不清楚^[3]。课题组前期从临床胃组织中分离获得 30 株 *H. pylori* 临床菌株, 完成 *cagA* 基因全长测序并将序列上传至 GenBank。本研究将比对东亚、西方株 *H. pylori-cagA* 的基因序列和 CagA 的氨基酸组成, 初步研究东亚菌株和西方菌株 CagA 对胃癌细胞增殖和凋亡的影响, 探讨 *H. pylori* 东亚、西方菌株 CagA 的序列和功能差异。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和载体

H. pylori GZ7 临床株由课题组分离自临床胃癌组织, 经测序证实为典型东亚菌株; *H. pylori* 26695 西方菌株购于美国 ATCC 菌株库。30 株 pMD18-T/*cagA* 原核克隆载体为课题组保存; 人胃癌细胞株 AGS 购于美国 ATCC 细胞库(编号为 CRL-1739); pcDNA3.1/Myc-His(-)、pcDNA3.1/GFP 真核表达载体购于美国 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

质粒 DNA 提取试剂盒购于 MO Bio Laboratories 公司; LipofectamineTM 2000 购于 Invitrogen 公司; CagA 抗体、羊抗鼠二抗购于 Santa Cruz 公司; ECL 发光液购于 Merck Millipore 公司; CCK8 试剂购于同仁化学研究所; 胎牛血清、RPMI-1640 培养液和 Opti-MEM 培养液购于 Gibco 公司。细胞凋亡检测试剂盒和流式细胞仪购于 BD Medical Technology 公司; 凝胶成像仪购于 Bio-Rad 公司; 全自动化学发光成像分析仪购于上海天能科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *H. pylori-cagA* 基因系统发育树构建及 CagA 蛋白序列分析

课题组上传至 GenBank 的 *H. pylori-cagA* 序列登录号为 KR154731-KR154758、GQ161098、GQ161099, 利用 MEGA 7.0 软件对上述 *H. pylori-cagA* 序列进行系统发育树聚类分析, 并对东亚、西方菌株 CagA 蛋白 C 端氨基酸序列进行比较, 寻找东亚、西方菌株 *cagA* 的结构差异。

1.2.2 构建 pcDNA3.1/*cagA* 真核表达载体

提取 pMD18-T/*cagA*-GZ7 及 pMD18-T/*cagA*-26695 质粒 DNA 为模板, 设计带酶切位点 *Xho* I 和 *Kpn* I 的引物 F (5'-CCGCTCGAGCGGACAATGGC TAACGAAAC-3')和 R (5'-CGGGGTACCCCGAGA TTTTGGAAACCAC-3'), 高保真 DNA 聚合酶 PrimeSTARTM 进行 PCR 扩增 *cagA* 基因, PCR 产物进行切胶回收纯化, 将 *cagA* 用 T4 DNA 连接酶接入 pcDNA3.1/Myc-His(-)真核表达载体, 转化感受态 *E. coli* DH5 α , 挑取阳性克隆提取质粒 DNA, 用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Kpn* I 对阳性克隆的质粒 DNA 进行双酶切鉴定并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序正确的质粒分别命名为东亚菌株 GZ7/*cagA* 及西方菌株 26695/*cagA*。

1.2.3 pcDNA3.1/*cagA* 转染胃癌细胞 AGS

以细胞数为 10^6 个/mL 的 AGS 细胞接种六孔板, 加无抗生素 RPMI-1640 培养液(含 10% FBS)至 2 mL/孔, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞融合至 80%, 以质粒和 LipofectamineTM 2000 的质量比为 3:5 的比例分别将空载体、GZ7/*cagA*、26695/*cagA* 转染胃癌细胞, 以 Opti-MEM 代替载体作为空白对照, 以 pcDNA3.1/GFP 转染 AGS 细胞评估转染效率。转染 6 h 后用含 10% FBS、无抗生素的 RPMI-1640 换液, 培养至 24 h 观察转染效率, 收集细胞备用。

1.2.4 Western blot 法检测 CagA 蛋白的表达

提取上述空载体对照组、GZ7/*cagA* 和 26695/*cagA* 转染组细胞总蛋白, BCA 法对总蛋白定量后进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后将蛋白转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶封闭, 用 CagA 鼠单克隆抗体为一抗、羊抗鼠抗体为二抗进行 Western blot, 并分析比较 GZ7/*cagA*、26695/*cagA* 转染组 CagA 蛋白的表达水平。

1.2.5 CCK8 法测定转染后细胞的生长活力

AGS 细胞转染后 24 h 制备单细胞悬液, 以 5 000 个/100 mL 细胞数接种 96 孔板, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱连续培养 0、24、48、72、96、120 h, 每个检测时间点加 10 μ L/孔 CCK8 试剂, 置

于 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养 1 h, 酶标仪 A₄₅₀ 检测吸光度值, GraphPad Prism 5.0 作细胞生长曲线。

1.2.6 流式细胞术检测转染后细胞凋亡

AGS 细胞转染后 24 h 收集细胞, 预冷 PBS 洗涤细胞 2 遍, 每个待测样本管加 500 μL Binding buffer 重悬细胞, 细胞计数 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ 个/mL, 取 100 μL Binding buffer 细胞悬液, 加 5 μL AnnexinV-FITC 轻悬混匀, 避光室温孵育 15 min, 加 5 μL PI 轻悬混匀。加样如下: 阴性对照组: 均不加; 单染对照组: 各加 5 μL AnnexinV-FITC 和 PI; 实验组: 均加入 5 μL AnnexinV-FITC 和 PI, 室温避光孵育 5 min, 加 300 μL Binding buffer 补足体积至 400 μL。细胞悬液经 400 目尼龙网过滤后流式细胞仪检测。

1.2.7 统计学分析

实验重复 3 次, 每次 3 个复孔, 实验数据以均

值±标准差表示, 应用 SPSS 22.0 软件进行统计。氨基酸构成比比较用独立样本 *t* 检验, 蛋白表达量灰度值和细胞凋亡百分率比较用单因素方差分析, 细胞的生长曲线比较用双因素方差分析, *P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 *H. pylori* 东亚、西方菌株 *cagA* 基因的序列比对

30 株 *H. pylori-cagA* 基因聚类为两大群, 21 株为东亚群, 9 株为西方群(图 1)。氨基酸序列比较发现 CagA 的 C 端差异较大, 其差异主要位于 EPIYA-D (东亚株)和 EPIYA-C (西方株)基序两侧, 具有菌株特异性。根据这些差异序列将菌株分为东亚株和西方株(图 2)。

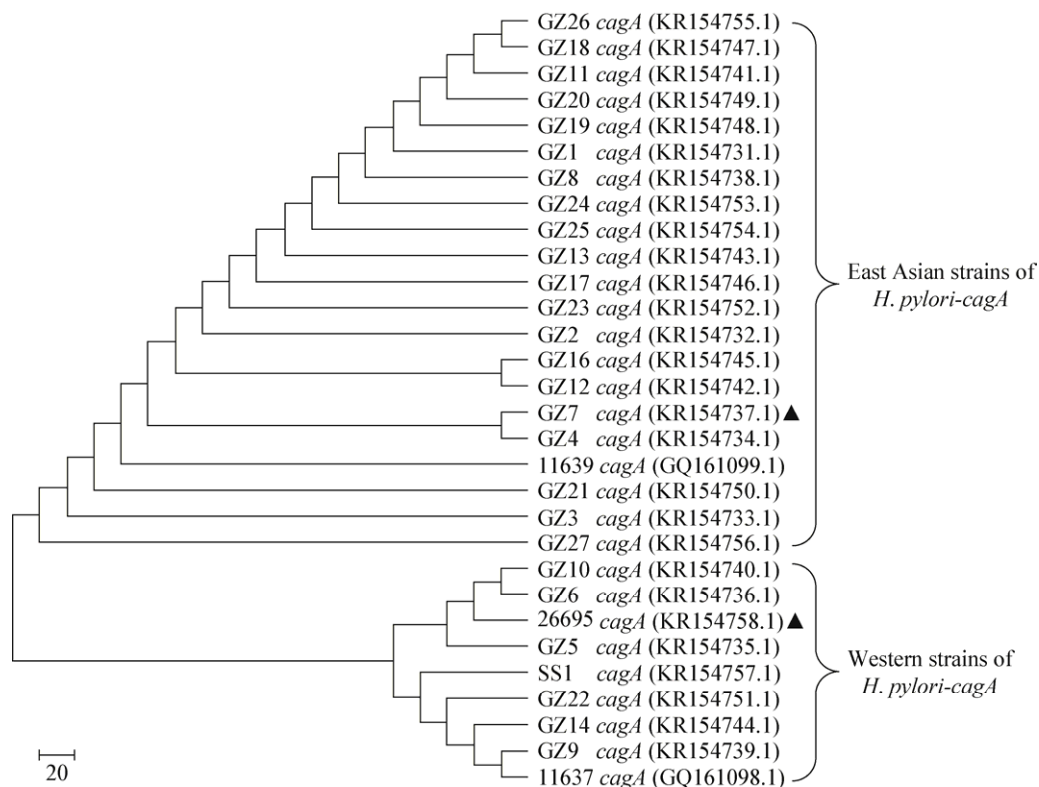


图 1 *H. pylori-cagA* 基因聚类分析

Figure 1 Cluster analysis of *H. pylori-cagA* genes

注: ▲: *H. pylori* 东亚菌株 GZ7 和西方菌株 26695 的 *cagA* 基因。

Note: ▲: The *H. pylori-cagA* gene of East Asian strain GZ7 and Western strain 26695.

Strains	EPIYA-A	EPIYA-B	EPIYA-C/D	
GZ26	EPIYAKVNNKKKAGQAASPEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GVGRSASP-EPIYVITIDFDEANQAGFPLRRSAAVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1003
GZ8	EPIYAKVNNKKKAGQAASPEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GVGRSASP-EPIYVITIDFDEANQAGFPLRRSAAVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1003
GZ13	EPIYAKVNNKKKAGQVASEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GAGRSASPEEPIYATIDFDEANQAGFPLRRYAVVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1004
GZ21	EPIYAKVNNKKKAGQVANPEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GVGQSASP-EPIYATIDFDEANQAGFPLRRHAAVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	999
GZ24	EPIYAVNNKKKAGQATSPEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIALAGKGVGAFS	GAGESASPEEPIYATIDFDEANQAGFPLRRSAFVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1004
GZ25	EPIYAVNNKKKAGQATSPEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIALAGKGVGAFS	GAGESASPEEPIYATIDFDEANQAGFPLRRSAFVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1004
GZ7	EPIYAKVNNKKKAGQVASEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGAFS	GAGRSASPEEPIYATIDFDEANQAGFPLRRSTAVGNDLSKVGLSREELTRRIGDL	1002
GZ19	EPIYAVNNKKKAGQVASEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GAGRSASPEEPIYATIDFDEANQAGFPLRRSAAVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1003
GZ4	EPIYAVNNKKKAGQVASEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GAGQSASP-EPIYATIDFDEANQAGFPLRRYAGVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1002
GZ1	EPIYAVNNKKKAGQAASPEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GVGQSASP-EPIYATIDFDEANQAGFPLRRSAAVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1003
GZ20	EPIYAVNNKKKAGQATSPEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GAGRSASPEEPIYATIDFDEANQAGFPLRRYAGVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1009
GZ12	EPIYAVNNKKKAGQATSPEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GAGESASPEEPIYATIDFDEANQAGFPLRRSAAVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1010
GZ16	EPIYAKVNNKKKAGQAASPEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GAGRSASPEEPIYATIDFDEANQAGFPLRRSAAVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1007
GZ17	EPIYAKVNNKKKAGQVASEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GAGRSASPEEPIYATIDFDEANQAGFPLRRYAGVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1004
GZ23	EPIYAKVNNKKKAGQVASEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GAGESASPEEPIYATIDFDEANQAGFPLRRYAGVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1004
GZ2	EPIYAKVNNKKKAGQVASEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GAGESASPEEPIYATIDFDEANQAGFPLRRYAGVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1004
GZ11	EPIYAKVNNKKKAGQAASPEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GAGRSASPEEPIYATIDFDEANQAGFPLRRSAAVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1003
GZ27	-----TEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GAGQSASP-EPIYATIDFDEANQAGFPLRRSAAVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	986
GZ18	EPIYAVNNKKKAGQATSPEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GAGESASPEEPIYATIDFDEANQAGFPLRRSAAVNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1003
GZ3	EPIYAVNNKKKAGQVASEEPIYAVQAKKVS	AKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFS	GAGRSASPEEPIYATIDFDEANQAGFPLRRSTAVGNDLSKVGLSREQELTRRIGDL	1002
<hr/>				
GZ10	EPIYAKVNNKKKGEVASLEPIYAVQAKKVS	AKIDRLNQTASGLGDVGGATGFPLKHKHDKVGDLSKVGLSASP-EPIYATIDDLGG---PFPLKRHDKVGDLSKVGLSREQELKQKIDNL		1010
GZ6	EPIYAKVNNKKKGEVASLEPIYAVQAKKVS	AKIDRLNQTASGLGDVGGATGFPLKHKHDKVGDLSKVGLSASP-EPIYATIDDLGG---PFPLKRHDKVGDLSKVGLSREQELKQKIDNL		1010
26695	EPIYAKVNNKKKGEVASLEPIYAVQAKKVS	AKIDRLNQTASGLGDVGGATGFPLKHKHDKVGDLSKVGLSASP-EPIYATIDDLGG---PFPLKRHDKVGDLSKVGLSREQELKQKIDNL		1010
GZ5	EPIYAKVNNKKKGEVASLEPIYAVQAKKVS	AKIDRLNQTASGLGDVGGATGFPLKHKHDKVGDLSKVGLSASP-EPIYATIDDLGG---PFPLKRHDKVGDLSKVGLSREQELKQKIDNL		1010
11639	EPIYAKVNNKKKAGQVASEEPIYAVQAKKVS	AKIDRLNQTASGLGDVGGAMGFPLKRHDKVDDLSKVGLSANH-EPIYATIDDLGG---PFPLKRHDKVDDLSKIGLSRNQELAQKIDNL		1015
SS1	EPIYAKVNNKKKAGQAASLEPIYAVQAKKVS	AKIDRLNQTASGLGVVQQAAG-----PFPLKRHDKVDDLSKVGLSRNQLAQKIDNL		972
GZ22	EPIYAKVNNKKKAGQAASLEPIYAVQAKKVS	AKIDRLNQTASGLGVVQQAAG-----PFPLKRHDKVDDLSKVGLSRNQLAQKIDNL		972
GZ14	EPIYAKVNNKKKAGQAASLEPIYAVQAKKVS	AKIDRLNQTASGLGVVQQAAG-----PFPLKRHDKVDDLSKVGLSRNQLAQKIDNL		972
GZ9	EPIYAKVNNKKKAGQAASLEPIYAVQAKKVS	AKIDRLNQTASGLGVVQQAAG-----PFPLKRHDKVDDLSKVGLSRNQLAQKIDNL		972
11637	EPIYAKVNNKKKAGQAASLEPIYAVQAKKVS	AKIDRLNQTASGLGVVQQAAG-----PFPLKRHDKVDDLSKVGLSRNQLAQKIDNL		972

图 2 *H. pylori*-CagA 蛋白 C 端氨基酸序列比较

Figure 2 The differential sites of *H. pylori*-CagA sequences

注：深色阴影为 EPIYA 基序；浅色阴影为东亚株和西方株的差异氨基酸序列；分隔线上下分别为东亚株和西方株。

Note: The dark and light shadows show EPIYA motifs and the differential amino acid sequences of CagA. The separation line divides the strains into East Asian strain (upper) and Western strain (bottom).

2.2 *H. pylori-cagA* 载体构建及鉴定

PCR 扩增 *cagA* 基因，获得 3.5 kb 基因片段，与真核载体连接后测序证实 GZ7/*cagA* (东亚株)及 26695/*cagA* (西方株)载体构建成功(图 3)。

2.3 *cagA* 转染 AGS 细胞 CagA 蛋白的表达

GZ7/*cagA* 和 26695/*cagA* 载体转染 AGS 细胞后，Western blot 检测 CagA 蛋白表达。结果显示与空载体组比较，转染组均表达 CagA 蛋白，且差异具有统计学意义($P < 0.01$)，但 GZ7/*cagA* 转染组与 26695/*cagA* 转染组比较，差异无统计学意义($P > 0.05$) (图 4)，提示 CagA 蛋白在东亚和西方菌株中表达量无显著差异。

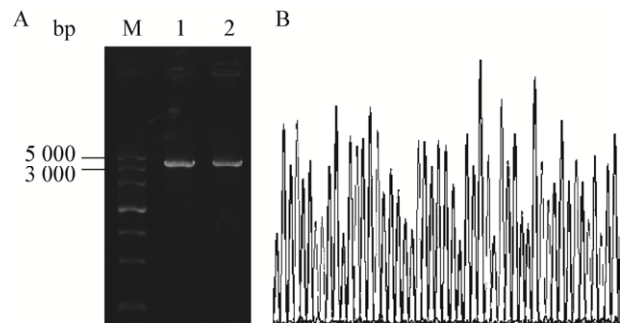


图 3 *H. pylori-cagA* 基因载体鉴定

Figure 3 Identification of *H. pylori-cagA* gene vectors

注：A：*cagA* 基因电泳图；1：东亚株 GZ7；2：西方株 26695；M：DL5000 Marker。B：*cagA* 部分测序峰图。

Note: A: Electrophoresis map of *cagA* gene; 1: East Asian strain (GZ7); 2: Western strain (26695); M: DL5000 Marker. B: The partial sequencing map of *cagA*.

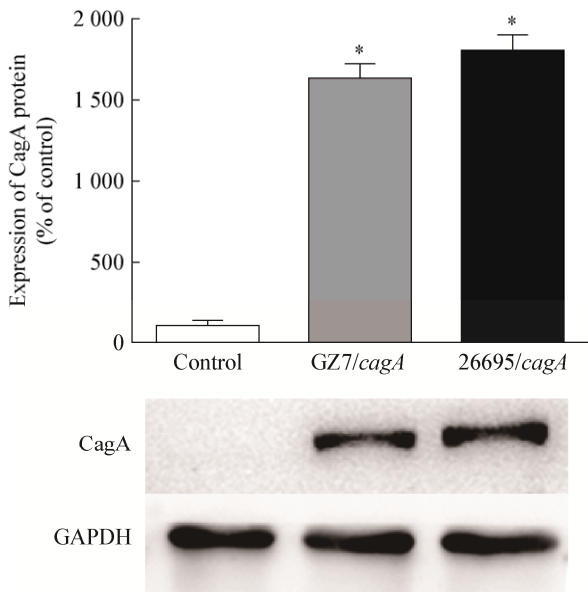


图4 *cagA* 转染细胞 CagA 蛋白的表达
Figure 4 The expression levels of CagA protein transfected with *cagA*

注: *与 Control 组比较, $P < 0.01$.

Note: *Compared with control, $P < 0.01$.

2.4 *cagA* 转染对 AGS 细胞生长的影响

用 *cagA* 载体转染细胞 24 h 后检测细胞的生长曲线。结果显示与空载体组比较, GZ7/*cagA* 转染组细胞生长显著增加, 而 26695/*cagA* 转染组细胞生长显著降低 ($P < 0.05$) (图 5), 提示东亚株 CagA 能促进细胞生长, 而西方株却抑制细胞生长。

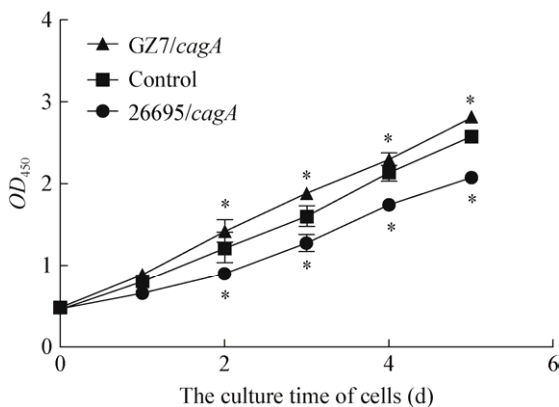


图5 *cagA* 转染 AGS 细胞的生长曲线
Figure 5 The growth curve of AGS cells transfected with *cagA*

注: *与 Control 组相比, $P < 0.05$.

Note: *Compared with control, $P < 0.05$.

2.5 *cagA* 转染对 AGS 细胞凋亡的影响

如图 6 所示, AGS 细胞转染后 24 h, 与空载体对照组比较, GZ7/*cagA* 和 26695/*cagA* 转染组细胞凋亡增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。虽然 GZ7/*cagA* 转染组细胞凋亡率高于 26695/*cagA* 转染组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论与结论

H. pylori 感染与胃癌的发生发展密切相关, 是胃癌最重要的致癌原^[4]。*H. pylori* *cag* 致病岛编码的 CagA 蛋白是目前已知唯一能够注入胃上皮细胞的高毒力癌蛋白。流行病学资料显示, 发展中国家 *H. pylori* 的感染率高达 60%–90%, 而吴莺等报道中国镇江地区 *cagA*⁺ *H. pylori* 感染率为 93.3%^[5-6], 远高于欧美国家的 60%–70%, 与日本等东亚国家的报道相符^[7]。中国作为东亚发展中国家, 感染的 *cagA*⁺ *H. pylori* 多数为含 CagA 蛋白 EPIYA-A、B、D 位点的东亚株, 而西方国家多为含 CagA 蛋白 EPIYA-A、B、C 位点的西方株, 推测东亚、西方国家感染的 *H. pylori* 所携带的 CagA 差异可能是东亚国家胃癌发病率和死亡率远高于西方国家的重要原因^[8]。然而, *H. pylori* 致东亚国家胃癌高发的具体机制至今仍未阐明。研究证实, 胃癌细胞的增殖和凋亡调控紊乱在胃粘膜癌变进程中起着重要作用^[9], 但这种紊乱与东、西方株 CagA 是否有关尚不清楚。因此, 本研究首先分析东、西方株 CagA 的基因序列和氨基酸序列的差异, 再分别构建东、西方株 *cagA* 的表达载体, 转染细胞后初步探讨东、西方株 CagA 对胃癌细胞生长和凋亡的影响。

首先, 用系统发育树 NJ 聚类算法对 30 株临床分离的 *H. pylori-cagA* 基因进行聚类, 其中 9 株 *H. pylori* 聚为西方株, 21 株 *H. pylori* 聚为东亚株, 提示贵州地区 *H. pylori* 感染多为东亚株, 同时也存在西方株感染。*H. pylori* 中 *cagA* 基因的 3'端具有多态性, 在不同的菌株有不同的序列, 赋予 CagA 蛋白的 C 端有不同类型的 EPIYA 基序。对 30 株 CagA 蛋白序列比较发现, 西方株 CagA EPIYA-C 基序左侧翼

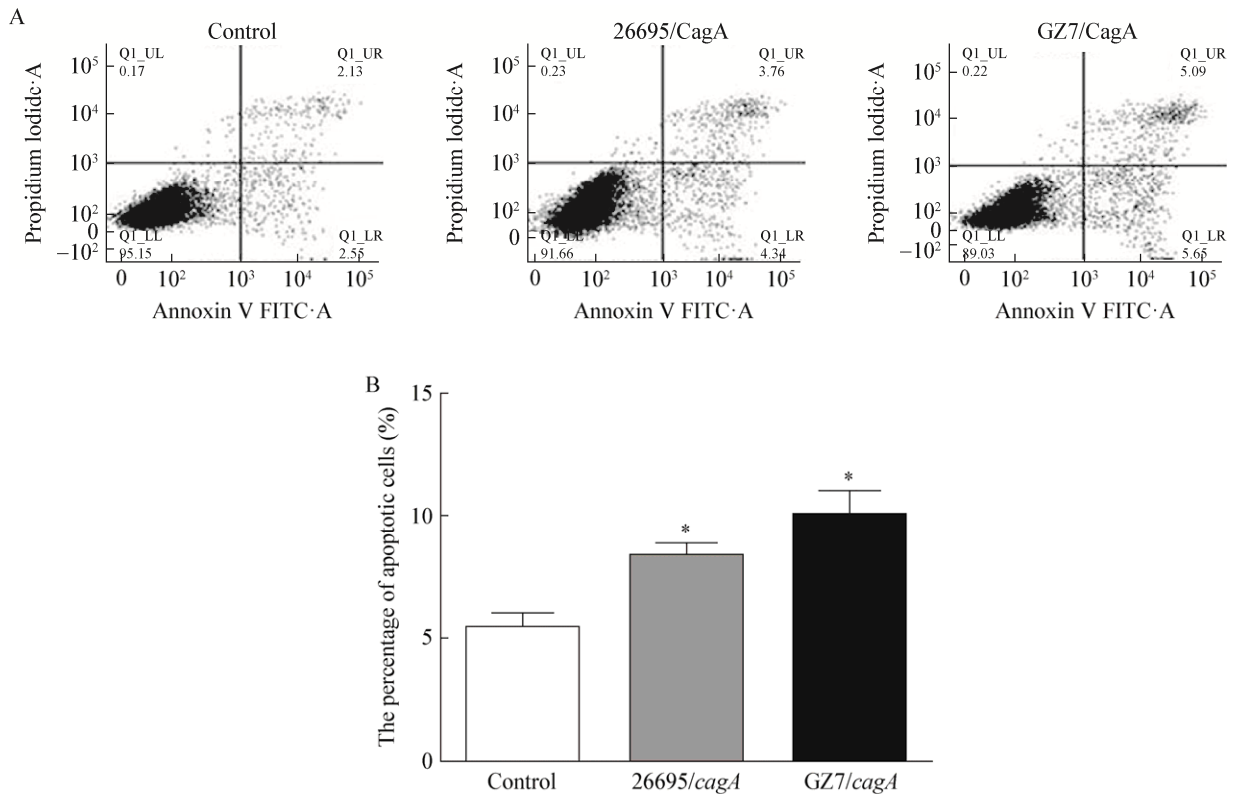


图6 *cagA* 转染后细胞凋亡百分率比较

Figure 6 The percentage of apoptotic cells after transfection with *cagA*

注：A：流式细胞凋亡图。B：细胞凋亡百分率柱状图；*代表与 Control 组相比， $P < 0.05$ 。

Note: A: Flow cytometry. B: Histogram of percentage of apoptotic cells; *Compared with control $P < 0.05$.

的氨基酸序列为 FPLKKHDKVGDLSKV，但是在东亚株 CagA EPIYA-D 中被 KIASAGKGVGAFSGA 序列取代；EPIYA-C (西方株) 基序右侧翼氨基酸序列为 DDL、RRSAVN 及 TRRIGD，而 EPIYA-D (东亚株) 为 DFD、KRHDKVG 及 KQKIDN。EPIYA 基序中的酪氨酸(Y)是 CagA 主要的磷酸化位点，尤其是 EPIYA-C 和 EPIYA-D，虽然这些序列差异的原因和作用目前并不清楚，但是推测可能与 *H. pylori* 东亚株致病性更强有关^[10]。Hatakeyama^[11] 发现，东亚株 CagA 中 EPIYA-D 的磷酸化位点的侧翼序列比 EPIYA-C 的侧翼序列能更好结合下游分子 SHP2，激活下游的信号通路，可能参与胃癌的发生发展。但是这个结论尚需更多的研究证实。

细胞增殖和凋亡是维持体内内环境动态平衡与稳定的生物学过程^[12]。有研究者用 $CagA^+$ 和

$CagA^-$ *H. pylori* 感染细胞，研究其对细胞增殖和凋亡的影响，但是报道不完全一致。Rokkas 等^[13] 发现， $CagA^+$ 菌株促进细胞增殖的作用较强，而促凋亡的作用相对较弱；也有相关研究显示， $CagA^+$ *H. pylori* 感染者胃粘膜上皮细胞凋亡率高于 $CagA^-$ *H. pylori* 感染者。Boonyanugomol 等^[14] 的研究发现， $CagA^+$ *H. pylori* 较 $CagA^-$ *H. pylori* 能明显抑制 HepG2 细胞增殖，促进细胞凋亡。本研究分别用 GZ7/*cagA* 和 26695/*cagA* 载体转染人胃癌细胞系 AGS，Western blot 检测发现构建了高表达 CagA 蛋白的细胞模型，且东亚和西方菌株 CagA 蛋白的表达无显著差异。CCK8 实验测定转染后细胞生长情况发现，与空载体比较，东亚株 CagA 能促进胃癌细胞生长，而西方株 CagA 却抑制细胞生长，因此本研究认为不同 *H. pylori* 菌株对细胞增殖的影

响是不相同的,可能是上述研究报道不一致的原因之一。此外,东亚、西方株 CagA 对细胞凋亡的影响比较一致,均能促进细胞凋亡。虽然实验发现东亚型 CagA 促细胞凋亡能力高于西方型,但差异没有统计学意义,尚需进一步的研究证实。

综上所述,本研究发现东亚株与西方株 CagA 的序列结构有特征性的差异,对细胞增殖的影响完全相反,推测这些差异可能是导致东亚株比西方株有更强致癌性的原因,但是尚需要进一步的研究证实。

REFERENCES

- [1] 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 Microbiology, 2016, 16: 201
- [2] Backert S, Tegtmeyer N, Selbach M. The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: the master key hypothesis[J]. Helicobacter, 2010, 15(3): 163-176
- [3] Hayashi T, Morohashi H, Hatakeyama M. Bacterial EPIYA effectors—where do they come from? What are they? Where are they going?[J]. Cell Microbiology, 2013, 15(3): 377-385
- [4] Wang F, Meng WB, Wang BY, et al. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer[J]. Cancer Letter, 2014, 345(2): 196-202
- [5] Wu Y, Zhang YL, Fan Y, et al. Study of the 3' terminal variable region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolated from patients living in Zhenjiang[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2007, 15(29): 3147-3151 (in Chinese)
吴莺, 张尤历, 范钰, 等. 镇江地区 *H. pylori* 的 *cagA* 基因及其 3'可变区结构的变化[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(29): 3147-3151
- [6] Nomura AMY, Pérez-Pérez GI, Lee J, et al. Relation between *Helicobacter pylori cagA* status and risk of peptic ulcer disease[J]. American Journal of Epidemiology, 2002, 155(11): 1054-1059
- [7] Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, et al. 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
- [8] Chen CY, Wang FY, Wan HJ, et al. Amino acid polymorphisms flanking the EPIYA-A motif of *Helicobacter pylori* CagA C-terminal region is associated with gastric cancer in east China: experience from a single center[J]. Journal of Digestive Diseases, 2013, 14(7): 358-365
- [9] Yu XW, Xu Y, Gong YH, et al. *Helicobacter pylori* induces malignant transformation of gastric epithelial cells *in vitro*[J]. APMIS, 2011, 119(3): 187-197
- [10] Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis[J]. Future Oncology, 2014, 10(8): 1487-1500
- [11] Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein[J]. Nature Reviews Cancer, 2004, 4(9): 688-694
- [12] Kaplan-Türköz B, Jiménez-Soto LF, Dian C, et al. Structural insights into *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA interaction with $\beta 1$ integrin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(36): 14640-14645
- [13] Rokkas T, Ladas S, Liatsos C, et al. Relationship of *Helicobacter pylori* CagA status to gastric cell proliferation and apoptosis[J]. Digestive Diseases and Sciences, 1999, 44(3): 487-493
- [14] Boonyanugomol W, Chomvarin C, Baik SC, et al. Role of *cagA*-positive *Helicobacter pylori* on cell proliferation, apoptosis, and inflammation in biliary cells[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2011, 56(6): 1682-1692