

- [17] Lee BN, Follen M, Shen DY, et al. Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4+ T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11(2): 239-244.
- [18] Mahmud SM, Robinson K, Richardson R, et al. HLA polymorphisms and cervical human papillomavirus infection in a cohort of Montreal University Students[J]. J Infect Dis, 2007, 196(1): 82-

90.

- [19] 黄金双, 林蓓, 齐跃, 等. 人类白细胞抗原 DRB1 等位基因多态性与子宫颈癌易感性的相关研究[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(10): 715-716.

(收稿日期: 2010-05-03)

• 综 述 •

幽门螺杆菌毒素相关蛋白 cagA 在胃癌发生机制中的研究进展

史红霞 综述, 王 东 审校

(贵州省六盘水市首钢水城钢铁集团公司总医院检验科 553028)

关键词: 螺杆菌, 幽门; 毒力因子类; 胃肿瘤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.02.040

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)02-0223-03

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是一种长期寄生于胃黏膜上皮细胞中的革兰阴性微需氧菌,也是世界各地最常见的感染性病原之一。1984年 Warren 和 Marshal 成功分离出幽门螺杆菌,并发现 Hp 可在生长代谢过程中分泌多种毒力因子,与多种胃部疾病密切相关。大量研究表明, Hp 在粘稠环境中具有极强的运动力,当其进入胃体后,可借助菌体鞭毛提供的动力穿过粘液层而到达胃黏膜,并通过粘附素与胃黏膜上皮细胞牢固地结合,避免随食物一起被胃排空; Hp 能分泌超氧化物歧化酶和过氧化氢酶,可对抗中性粒细胞的吞噬杀伤作用; Hp 富含尿素酶,能水解尿素释放氨,从而在菌体周围形成“氨云”保护层,以抵制胃酸的杀灭作用。由于 Hp 具有上述生物学特征,使得全球约 25% 的发达国家人口和 70%~90% 的发展中国家人口被其感染,是引发胃部疾病的主要致病菌^[1]。世界卫生组织/国际癌症研究机构(WHO/IARC)于 1994 将幽门螺杆菌定为 I 类致癌物质。

幽门螺杆菌可在生长代谢过程中分泌多种毒力因子,其中毒素相关蛋白 cagA 最为重要并与胃癌的发生、发展及转移密切相关,因而受到广泛关注从而成为研究胃癌相关发病机制的热点和分子标志。体外研究表明,只有当 CagA 蛋白阳性时 Hp 感染胃上皮细胞才能诱导各种趋化因子。在体内, CagA 蛋白阳性感染将诱导大规模的免疫反应和严重的胃炎。许多的研究表明感染 CagA 蛋白阳性菌株与胃溃疡、胃萎缩和胃癌的高发生率有关。幽门螺杆菌主要有两个亚型: 东方亚洲型和西方型。流行病学资料也显示超过 90% 的幽门螺杆菌东方亚洲株携带 cagA 基因,即 cagA 阳性; 而一半以上的幽门螺杆菌西方株为 cagA 阴性。由此可以推测, cagA 阳性株的分布不均可能是造成东西方胃癌发生率存在差异的主要原因之一。

胃癌是危害人类健康的主要恶性肿瘤之一,全球胃癌的致死率位居所有肿瘤致死率的第二位。而胃癌导致患者死亡的主要原因之一则是胃癌的转移。胃癌的转移主要有以下四条途径: (1) 直接蔓延: 癌肿侵入胃壁后,向纵深方向发展并突破浆膜层,直接侵犯相邻器官和组织。(2) 淋巴结转移: 是胃癌转移的重要途径,并且发生较早。随着癌肿的不断增长,其侵犯胃壁越深,面积越广,转移的机会也就越多,并且由近及远地转移到各级淋巴结。(3) 血行转移: 多发生在胃癌晚期。部分胃癌患者的癌细胞或癌栓可经血液循环而播撒到其他器官,从而形成转移灶。(4) 胃癌细胞腹腔内种植转移: 少数情况下会出

现癌肿突破胃壁浆膜,坏死的癌组织脱落到其他器官或腹膜上,可发生种植性生长。在胃癌的转移途径中,通常以淋巴转移和直接蔓延为主,在胃癌晚期也可经血行转移。此外,癌细胞还可以因组织脱落而直接种植于其他器官或腹腔内。

1 幽门螺杆菌毒素相关蛋白 cagA 与胃癌

Argent 等^[2]研究发现, Hp 的 cag 致病岛(cag PAI)全长约 40 Kb,由 27~31 基因组成,所编码产生的 IV 分泌系统(T4SS)含有内、外侧跨膜蛋白复合体循环抗原和位于菌体表面的菌毛,可通过激活核因子 NF- κ B 以及分泌细胞因子和趋化因子而诱发胃黏膜炎症。cagA 基因则位于 cag PAI 的 C 末端,其编码的 CagA 蛋白是一种相对分子质量为 120~170 kd 的免疫原性蛋白,也是目前唯一已知的一种由 cag PAI 生成的功能蛋白。流行病学资料显示, Hp 包含两种亚型即东方亚洲型及西方型。超过 90%~95% 的 Hp 东方株携带了 cag PAI,即 cagA 阳性; 而一半以上的西方株则为 cagA 阴性。由于这种分布差异的存在,造成了东西方 Hp 诱导胃癌发生率上的不同。cagA 阳性 Hp 长期定植于宿主的胃黏膜上皮细胞中,可导致胃黏膜组织发生一系列的渐进性改变,即浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生、非典型性增生直至胃癌的发生。

长期研究表明^[3],由于游离的 CagA 蛋白不能直接进入胃黏膜上皮细胞,所以必须依赖 IV 分泌系统(T4SS)将其转位于上皮细胞内,并且被 Src 和 Abl 蛋白激酶磷酸化,磷酸化的 CagA 蛋白再与 SHP-2 磷酸酶相互作用,最终导致胃黏膜上皮细胞发生“蜂鸟”样改变。据研究推测, Hp 所诱导的这种“蜂鸟”样改变可能与胃黏膜组织的癌变密切相关。

汪苏等^[4]则报道了激活的 SHP-2 可以使酪氨酸蛋白激酶 FAK 的磷酸化水平下降,从而抑制 FAK 激酶的活性,进而增强了 CagA 蛋白引起“蜂鸟样”的形态学改变的能力。体外试验也显示,经 cagA 阳性的 Hp 感染的胃黏膜上皮细胞在培养过程中会从未受刺激的“鹅卵石”样形态转变成“蜂鸟样”形态,表明 cagA 阳性的 Hp 在胃黏膜上皮细胞的癌变方面起到关键作用。最近的研究证实, CagA 蛋白在胃癌细胞的粘附、运动、浸润及 c-Met、Grb2、SHP-2 的磷酸化等方面发挥了关键性的调控作用。

Amanda Oldani 等^[5]研究发现, cagA 阳性的 Hp 通过 T4SS 将毒素相关蛋白 cagA 注入胃黏膜上皮细胞内,依赖宿主细胞的酪氨酸磷酸化,以对抗空泡毒素 A(VacA)诱发的细

胞凋亡。他们阐述了 CagA 蛋白对抗 VacA 活性的两种互补机制:一方面,磷酸化的 CagA 蛋白可阻滞被胞饮的 VacA 进入细胞器内,从而抑制了 VacA 促凋亡机制中所必需的前提条件;另一方面,非磷酸化的 CagA 蛋白则可以启动抗凋亡活性,并在线粒体水平阻遏了 VacA 的促凋亡作用。在这两种机制的相互协调下,CagA 蛋白促使了上皮细胞发生形态学及炎性改变,最终导致胃癌的发生。

此外,进入胃黏膜上皮细胞的 CagA 蛋白还能与 Grb2 结合,激活 Ras/MEK/ERK 信号通路从而促使胃黏膜上皮细胞的生长、增加细胞运动能力、诱导细胞散射表型,而这一作用方式却不依赖于 CagA 蛋白酪氨酸磷酸化^[6]。

2 信号通路介导幽门螺杆菌毒素相关蛋白 cagA 诱发胃癌

Jones 等^[7]在研究 cagA 蛋白 EPIYA 基因多态性对胃癌发展的影响中发现,EPIYA-C 与 EPIYA-D 是 CagA 蛋白最初被宿主细胞磷酸化的位点,并且促使磷酸化的 CagA 蛋白与 SHP-2 的结合,这在胃癌的发生、发展过程中起到了关键性的作用。Zhong 等^[8]则报道了 CagA 蛋白的 EPIYA 位点能被 Src 蛋白激酶家族磷酸化,SH2 磷酸酶则与磷酸化的 CagA 蛋白相互作用而被激活,并可通过 Ras/Raf 依赖性或非依赖性机制活化 MAPK/MEK/ERK 信号通路,持续激活的 ERK 促进了细胞周期从 G1 期到 S 期的进程,加速了细胞分裂增殖的能力,这为胃癌细胞的粘附、浸润、扩散及迁移创造有利条件。

Bronte-Tinkew 等^[9]研究表明,活化的 STAT3 与胃癌的发生、发展密切相关。Hp 可促进 STAT3 的磷酸化、核易位及核转录活性。但是 Hp 调节的 STAT3 的活化是 cagA 依赖性的,而 CagA 蛋白调控的 STAT3 活化则是非酪氨酸磷酸化性的。Kim 等^[10]研究发现,被 cagA 阳性 Hp 感染的胃癌细胞株中,来源于 ILs 和 TLRs 的细胞外信号首先通过 JAK-STAT 和 MAPK 信号通路途径被传递到细胞核内的 NF- κ B、NFKBIA 及 AP-1,然后再通过 JAK-STAT 和 BTK 信号通路途径反馈到细胞质中的靶蛋白,从而引发胃癌细胞的分裂增殖效应,加速了细胞周期的进程,进而增加了胃癌恶化的强度。这种“瀑布式”的级联放大效应也被认为是 cagA 阳性 Hp 感染的胃癌细胞株的特征之一。

Jimenez-Soto 等^[11]在最近的研究中发现,Hp 将毒素相关蛋白 cagA 转位到胃黏膜上皮细胞内主要是通过一种 RGD 序列依赖性的宿主细胞膜表面 $\alpha 5 \beta 1$ 异二聚体整联蛋白途径,并联合 T4SS-菌毛-相关蛋白 CagL 间的相互作用实现的。此外,他们还通过不同的方法证实了 $\beta 1$ 整联蛋白对于 cag-T4SS 而言是一种细胞受体,并在 Hp 诱导的胃黏膜损伤乃至癌变进程中发挥着重要作用。Snider 等^[12]则首次报道了 $\beta 1$ 整联蛋白激活 CagA 非依赖性 JNK 信号通路对于 Hp cagA 诱发胃癌细胞的粘附、浸润及迁移是必不可少的。他们的研究显示,激活 JNK 信号通路的 $\beta 1$ 整联蛋白独立于已被证实的上游激酶和信号分子之外,包括 Nod1、Cdc42、Rac1、MKK4 及 MKK7 等,是一种全新的 CagA 非依赖性 JNK 信号通路激活细胞因子。他们还发现,JNK 信号通路的激活虽然是 CagA 非依赖性的,但是 T4SS 的作用机制在 JNK 信号通路活化过程中仍然发挥着主导作用。

3 细胞因子介导幽门螺杆菌毒素相关蛋白 cagA 诱发胃癌

Ogden 等^[13]研究证实,与 Hp 共培养后,胃癌细胞的 MMP7 表达水平升高,这与 Hp cag 致病岛中的 cagE 基因密切相关。cagE 基因能编码产生一种与百日咳杆菌分泌的

VirB4 毒素输出蛋白高度同源的蛋白质。基于这种同源性,CagE 蛋白被认为是一种 ATPase,其为 CagA 蛋白和其他的 cag 致病岛基板从 Hp 细胞质直接进入宿主细胞提供所需的能量,并使宿主细胞的 MMP7 表达水平升高,从而增加了胃黏膜上皮细胞癌变的风险。Burkitt 等^[14]则报道,在 cagA 阳性 Hp 感染的胃癌细胞株中胃泌素表达水平升高,高表达的胃泌素可通过 MAPK AP-1 依赖性信号通途径使 MMP-9 表达水平升高,并且可以检测到胃癌患者血清中 MMP-7 水平显著升高,而 MMPs 家族对 ECM 及基质膜的降解效应则促进了胃癌细胞浸润、侵袭及迁移。

Xiao 等^[15]在研究人类胃癌疾病中 Hp 感染与 COX-2、EGFR 及 VEGF 表达水平的相关性时发现,cagA 阳性的 Hp 感染可上调胃癌组织中 COX-2、EGFR 及 VEGF 表达,增强了胃癌组织的血管再生能力,进而加大了胃癌组织的淋巴微血管密度,为胃癌细胞的扩散、浸润及迁移创造条件,推动了胃癌恶化的进程。Wiedemann 等^[16]构建了胰岛素/胃泌素转基因蒙古沙鼠模型,他们发现经野生型 cagA 阳性 Hp 处理 32 周后的转基因沙鼠模型胃窦 G 细胞分泌胃泌素的功能显著增强,同时伴有高胃泌素血症。因此推测 cagA 阳性 Hp 诱发的胃癌及其恶变可能源于胃泌素作用导致的胃酸分泌减少所形成的萎缩性胃炎。由此可见,多种细胞因子在幽门螺杆菌毒素相关蛋白 cagA 诱发的胃癌进程中起到了关键性的调节作用。

4 展 望

综上所述,胃癌是导致患者死亡的主要恶性肿瘤之一。而幽门螺杆菌作为 I 类致癌物质严重威胁着人类健康,可在生长代谢过程中分泌多种毒力因子,与多种胃部疾病尤其是胃癌的发生、发展密切相关。在幽门螺杆菌所分泌的毒力因子中,毒素相关蛋白 cagA 最为重要并在胃癌的发生、发展进程中扮演了重要的角色,从而成为研究胃癌相关发病机制的热点。虽然迄今为止对于幽门螺杆菌诱发胃癌的详尽致病机制仍不清楚,但是近年来随着研究的不断深入和分子生物学技术的快速发展,从分子水平入手并以幽门螺杆菌毒素相关蛋白 cagA 为研究靶向逐渐成为预防和治疗胃癌突破口,并为探索胃癌相关病理机制提供可能的理论依据,这对于今后胃癌的研究具有深远的临床意义。

参考文献

- [1] Umit H, Tezel A, Bukavaz S, et al. The relationship between virulence factors of helicobacter pylori and severity of gastritis in infected patients[J]. Dig Dis Sci, 2009, 54(1): 103-110.
- [2] Argent RH, Thomas RJ, Letley DP, et al. Functional association between the Helicobacter pylori virulence factors VacA and CagA [J]. J Med Microbiol, 2008, 57(Pt 2): 145-150.
- [3] Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in Helicobacter pylori Pathogenesis[J]. Cell Microbiol, 2008, 10(8): 1573-1581.
- [4] 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(3): 175-177.
- [5] Oldani A, Cormont M, Hofman V, et al. Helicobacter pylori Counteracts the Apoptotic Action of Its VacA Toxin by Injecting the CagA Protein into Gastric Epithelial Cells[J/OL]. PLoS Pathogens, 2009, <http://www.ncbi.nlm.gov/pubmed/19798427>.
- [6] 张微, 刘纯杰. 幽门螺杆菌致胃癌发生机制[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2008, 17(3): 177-181.
- [7] Jones KR, Joo YM, Jang S, et al. Polymorphism in the CagA EPIYA Motif Impacts Development of Gastric Cancer[J]. J Clin

Microbiol, 2009, 47(4): 959-968.

[8] Zhong Q, Shao SH, Cui LL, et al. Type IV secretion system in *Helicobacter pylori*; a new insight into pathogenicity[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(23): 2138-2142.

[9] Bronte-Tinkew DM, Terebiznik M, Franco A, et al. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A activates the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in vitro and in vivo[J]. Cancer Res, 2009, 69(2): 632-639.

[10] Kim KK, Kim HB. Protein interaction network related to *Helicobacter pylori* infection response[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(36): 4518-4528.

[11] Jimenez-Soto LF, Kutter S, Sewald X, et al. *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits β 1 integrin in a novel RGD-Independent manner[J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(12): 1-14.

[12] Snider JL, Allison C, Bellaire BH, et al. The β 1 integrin activates JNK independent of CagA, and JNK activation is required for *Helicobacter pylori* CagA⁺-induced motility of gastric cancer cells

[J]. J Biol Chem, 2008, 283(20): 13952-13963.

[13] Ogden SR, Wroblewski LE, Weydig C, et al. p120 and Kaiso regulate *Helicobacter pylori*-induced expression of matrix metalloproteinase-7[J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(10): 4110-4121.

[14] Burkitt MD, Varro A, Pritchard DM. Importance of gastrin in the pathogenesis and treatment of gastric tumors[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(1): 1-16.

[15] Xiao WM, Ding YB, Shi RH, et al. Correlation of *Helicobacter pylori* infection with the expression of COX-2 and EGFR and VEGF in human gastric carcinoma[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2008, 30(9): 668-671.

[16] Wiedemann T, Loell E, Mueller S, et al. *Helicobacter pylori* cag-pathogenicity island-dependent early immunological response triggers later precancerous gastric changes in Mongolian gerbils[J]. PLoS ONE, 2009, 4(3): 1-13.

(收稿日期: 2010-05-04)

• 综 述 •

乙型肝炎病毒外膜大蛋白

谢国强, 邵耀明 综述, 徐 苗 审校

(江苏省无锡市人民医院检验科 214023)

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 外膜大蛋白; 研究

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 02. 041

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)02-0225-03

随着人们对乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)认识的深入,在预防、诊断和治疗方面的突破,若仍延用传统的常规诊断方法(如乙肝三系和 HBV-DNA 检测)已不能全面、真实、快速地反映乙肝病毒在患者体内感染状况以及抗病毒治疗的效果。近年来随着对乙肝病毒外膜大蛋白(HBV-LP)在乙型肝炎发病机制、感染与病毒复制等方面的探究,研究者们逐渐认识到 HBV-LP 具有越来越重要的临床意义,如 Pre-S1 抗原能够反映 HBV 的复制情况,可作为预测干扰素治疗是否有效的指标,推测急、慢性乙型肝炎的预后情况,并用于制备重组乙肝疫苗等^[1]。目前我国关于 HBV-LP 的报道还很少,本文将就其研究进展和临床应用作一概述。

1 HBV-LP 的结构-双重拓扑结构

乙型肝炎病毒为嗜肝 DNA 病毒,含有 3 200 个核苷酸,4 个开放读码框架,可编码 6 种蛋白,其中由 S 基因编码了 3 种外膜蛋白,即主蛋白(即 HBsAg)、中蛋白(HBsAg 和 Pre-S2 蛋白)和大蛋白(HBsAg、Pre-S1 蛋白和 Pre-S2 蛋白)。乙肝病毒的 3 个包膜蛋白是从一个开放阅读框的 3 个不同起始位点与相同的终止位点翻译表达而来^[2]。乙肝病毒感染人体后,在血清中主要存在三种形式:即大球形颗粒(Dane 颗粒)、小球形颗粒和管形颗粒。前 S1 抗原、前 S2 抗原只在 Dane 颗粒上表达,前 S1 抗原由 108~110 个氨基酸残基组成,其 21~47 位氨基酸为肝细胞膜受体。前 S2 抗原含有 55 个氨基酸残基,其 C 端与表面抗原 N 端相连,N 端 109~133 位氨基酸为聚令人血清蛋白受体。

在病毒粒子成熟过程中,大蛋白 preS 结构域停留在内质网膜的胞质面,通过 S 结构域的 II 型信号和疏水 C 端跨过内质网膜,大约有一半的大蛋白跨膜区域的拓扑结构在翻译后发生了改变,使得 preS 区域暴露于病毒粒子的表面,从而产生大

蛋白的独特双重拓扑结构^[3]。

2 HBV-LP 是 HBV 一个转录激活子

HBV 表面抗原基因由一个单独的 ORF 组成。该 ORF 被分割成三个分别起始于三个同框 ATG 密码子的编码区 PreS1、PreS2、S,相应的蛋白结构域分别为 PreS1、PreS2 和 S,由 ATG 翻译合成的三个 HBV 表面蛋白都是组成膜蛋白的成分。最近的研究工作显示,HBV-LP 的 PreS1-PreS2 定位于细胞质而不是在翻译时通过转移跨过内质网膜^[4-6],该定位使得 PreS2 aa4 的糖基化位点不能与糖基转移酶靠近。在病毒颗粒中,有一部分的 HBV-LP 的 PreS1-PreS2 出现在病毒表面。

另有报道称乙型肝炎病毒 C 端截短的中表面蛋白(MH-Bst)能作为转录激活子起作用,该功能依赖于 MHBst N 端 PreS2 结构域的胞质定位。在野生型 MHBs 中,PreS2 结构域在翻译时转移至内质网(ER)腔。最近也有报道显示,HBV-LP 的 PreS2 结构域在翻译完成后先停留在 ER 膜的胞质面,那么,HBV-LP 是否与 MHBst 具一样的转录激活功能? Eberhard 等研究发现,与 MHBst 相似,HBV-LP 也能激活一系列启动子元件。另有证据表明 HBV-LP 能依赖 PKC 活化 AP-1 和 NF- κ B,PKC 下游的 c-Raf-1 激酶的功能是 AP-1 和 NF- κ B 依赖 HBV-LP 活化的先决条件,因为对 c-Raf-1 激酶的抑制能消除 AP-1 和 NF- κ B 的 HBV-LP-依赖的转录水平的活化。

相关研究还证明了 HBV-LP 确实是一个转录激活因子,并且与 HBV-LP 依赖的转录活化和 MHBst 依赖的转录激活一样,由 PKC 依赖的 c-Raf-1/MAP2-激酶信号转导途径的活化所介导。

3 HBV-LP 在乙肝病毒形成中的作用

乙肝病毒核衣壳的形成依靠 HBV-LP,HBV-LP 作为一个跨膜多肽存在于内质网膜中^[7]。之前的研究表明,HBV-LP 的