

幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白 A 对人胃腺癌上皮 AGS 细胞蛋白质组的影响

葛 振^{1,2} 朱永良³ 钟 献¹ 余捷凯¹ 郑 树^{1*}

(¹ 浙江大学医学院附属第二医院肿瘤研究所, 杭州 310009; ² 浙江大学沃森基因组科学研究院, 杭州 310029;

³ 浙江大学医学院附属第二医院消化科, 杭州 310009)

摘要 为明确幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白 A(CagA)在致病过程中对宿主细胞蛋白质表达的影响及其与 CagA 磷酸化的相关性, 分别用野生型 *cagA* 质粒和磷酸化位点突变型 *cagA* 质粒转染人胃腺癌上皮 AGS 细胞, 应用表面加强激光解析电离-飞行时间质谱技术, 分析细胞蛋白质组的改变。结果表明, 在可捕获的 400 多个蛋白质中, 野生型 CagA 可使 AGS 细胞质荷比为 4 229、4 714、4 728、5 129、6 546、6 657、8 162、9 084、13 803、14 021 的 10 个蛋白质表达上调, 质荷比为 2 013、4 286、8 563、9 952、11 085、11 645 的 6 个蛋白质表达下调。突变型 CagA 只能使质荷比为 4 714、4 728、6 546 和 6 657 的蛋白质表达上调。这些结果提示, 这 16 个差异表达蛋白质可能参与了 CagA 的致病过程, 其中质荷比为 4 714、4 728、6 546 和 6 657 蛋白质表达的改变与 CagA 的磷酸化作用无关, 而其余 12 个蛋白质表达的改变则都依赖于 CagA EPIYA 重复序列酪氨酸位点的磷酸化。这些发现为进一步探讨 CagA 的致病机制提供了实验依据。

关键词 细胞毒素相关蛋白 A; 磷酸化; SELDI-TOF-MS; 蛋白质芯片

流行病学资料表明, 幽门螺杆菌(Hp)细胞毒素相关蛋白 A(cytotoxin-associated protein A, CagA)与慢性活动性胃炎、消化性溃疡和胃癌的发生密切相关^[1-5]。CagA 由 Hp 疾病相关基因“*cag* 致病岛”编码并通过特有的 IV 型分泌途径进入宿主细胞^[6], 其 C 端谷氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-酪氨酸-丙氨酸(EPIYA)模体中酪氨酸位点的磷酸化对其生物学功能的发挥至关重要^[7]。以往的研究虽已发现了一部分与 CagA 作用相关的信号转导通路, 但 CagA 的致病机制至今仍不完全明确。因此, 从蛋白质组角度整体性地研究 CagA 对宿主细胞的影响, 特别是 CagA 磷酸化在其致病过程中的具体作用将有助于对其致病机制的全面认识。

表面加强激光解析电离-飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术可用于建立细胞特异的蛋白质表达谱, 分析不同生理或病理状态下蛋白质组的差异。相对于双向电泳等蛋白质组学研究手段, SELDI-TOF-MS 具有高通量、高灵敏度、操作简便, 重复性好等优势^[8,9], 已在肿瘤标志物的筛选和肿瘤的早期诊断中发挥了重要作用^[10-13], 在疾病机制研究等领域也具有很好的应用前景。

本研究运用 SELDI-TOF-MS 分析转染野生型或磷酸化位点突变型 *cagA* 基因的人胃腺癌上皮 AGS 细胞(以下简称 AGS 细胞)蛋白质表达谱的变化, 从而确定参与 CagA 致病过程的宿主细胞蛋白质, 并分析蛋白质表达差异与 CagA 磷酸化的相关性。这将为进一步阐明 CagA 在 Hp 致病过程中的作用机制提供新的线索和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃腺癌上皮 AGS 细胞(ATCC)。RPMI 1640 培养基(Gibco)。胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)。PCR 试剂及逆转录试剂盒(Promega)。DL2000 DNA Marker(大连宝生物工程有限公司)。PCR 产物胶回收试剂盒(Qiagen)。QuikChange II site-directed mutagenesis 定点突变试剂盒(Stratagene)。Trizol 试剂(Invitrogen)。RQ1 RNase-Free Dnase

收稿日期: 2006-03-13 接受日期: 2006-05-11

国家重点基础研究发展规划(973计划)资助项目(No.2004CB518707)

* 通讯作者。Tel: 0571-87784501, Fax: 0571-87214404, E-mail:

zhengshu@zju.edu.cn

(Promega)。Lipofectamine™ 2000 脂质体转染试剂及配套 Opti-MEM 无血清培养基(Invitrogen)。蛋白质定量试剂盒(Bio-Rad)。蛋白质芯片实验所用化学试剂(Sigma)。Sinapic acid(SPA)粉末(Fluka)。pcDNA3.1(+)质粒(Invitrogen)。

1.2 仪器

PBS II Plus 表面加强激光解析电离 - 飞行时间质谱仪、标准分子量蛋白质芯片、SAX2 型和 CM10 型蛋白质芯片(Ciphergen Biosystems)。

1.3 方法

1.3.1 质粒的构建 野生型 *cagA*/pcDNA3.1(+)质粒和突变型 *cagA*/pcDNA3.1(+)质粒的构建方法详见朱永良等^[14]的前期实验。野生型 *cagA* 质粒带有一长度为 1 509 bp、含有 3 个串联的 EPIYA 模体和 1 个 EPIYA 重复序列(在 D2 区的氨基酸序列为 D-F-D)的 *cagA* 基因功能片段。突变型质粒由野生型质粒 *cagA* 基因 EPIYA 重复序列中的酪氨酸编码序列定点突变为苯丙氨酸编码序列获得。

1.3.2 细胞培养和转染 AGS 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。转染实验共分 4 组。野生型组: 转染 *cagA*/pcDNA3.1(+)质粒; 突变型组: 转染 *cagA*/pcDNA3.1(+)突变体质粒; 空载体组: 转染 pcDNA3.1(+)空载体质粒; 空白对照组: 未经转染的 AGS 细胞。以转染 *EGFP*/pcDNA3.1(+)质粒的 AGS 细胞作为监控转染效率的对照。转染采用 Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂。以 5.5×10^5 个/孔的密度将细胞接种于 6 孔板, 培养 18 h 后每孔各用 1 ml Opti-MEM 漂洗 2 遍。以 4 μg 质粒 DNA: 6 μl 脂质体的比例转染每孔细胞, 转染步骤按产品说明书进行。37 °C、5% CO₂ 温育 6 h 后撤除转染试剂换以新鲜培养基, 48 h 后收集 4 组细胞。每组设 4 个复孔。

1.3.3 RT-PCR 检测转染细胞中 *cagA* 基因 mRNA 的表达 采用 Trizol 试剂按常规氯仿异丙醇法抽提细胞的总 RNA, 经 RQ1 RNase-Free DNase 处理后逆转录成 cDNA。以上游引物: 5'-AAGCAGGACAA-GCAACTAGC-3', 下游引物: 5'-CAGTAGGCACT-TGTTTCGCACTC-3' 扩增 *cagA* 基因, 目的片段长度为 513 bp。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 30 循环, 72 °C 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, β 肌动蛋白基因扩增产物作为内参

照, 长度为 590 bp。目的片段胶回收后测序鉴定。

1.3.4 SELDI-TOF-MS 检测细胞蛋白质组的改变 上述收集的细胞用 PBS(0.01 mol/L, pH 7.0)离心清洗 3 遍。每孔细胞沉淀用 100 μl 含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液(8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 50 mmol/L DTT)重悬, 冰浴裂解 30 min, 于 4 °C, 20 000 g, 30 min 离心, 取上清液, 测定蛋白质浓度并调整至 5 mg/ml。

用 SAX2 型和 CM10 型蛋白质芯片分别对 4 组细胞蛋白质进行结合。各处理组在两种芯片上各点 4 个样本点。芯片对蛋白质的结合采用产品说明书中“原位点样”的方法。芯片各样本点用 3 μl 结合缓冲液(SAX2: 50 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0; CM10: 50 mmol/L 醋酸钠, pH 4.0)平衡 3 次, 每次 5 min。吸除缓冲液后迅速滴加 5 μl 用相应结合缓冲液稀释到 1.5 mg/ml 的蛋白质样品, 室温温育 1 h 后吸除。每点滴加 3 μl 结合缓冲液温育 5 min 后吸除, 重复 3 遍。每点滴加 3 μl HPLC 水并迅速吸除, 重复 2 遍。以上步骤均在保持一定湿度的湿盒中完成。将芯片风干 20 min, 每点滴加 1 μl 能量吸收剂 SPA 溶液(用 HPLC 级水将含 1% 三氟乙酸的乙腈溶液稀释 1 倍, 加入 SPA 粉末配制成饱和溶液, 再用上述溶液稀释 1 倍获得)并风干, 重复操作 1 遍。用标准分子量蛋白质芯片将 SELDI 质谱系统校正到分子量误差小于 0.1%。将结合好蛋白质的 SAX2 和 CM10 芯片用质谱阅读仪分别检测。所有样本点使用统一的分析参数: 激光强度 180, 检测灵敏度 7, 每个样本取 240 个点的平均值, 所收集蛋白质的质量和电荷比值(简称质荷比)范围为 1 500~60 000, 优化范围为 2 000~20 000。

1.3.5 数据处理与统计分析 同一芯片所得样本点原始数据先以 ProteinChip Software 3.1 软件校正, 使总离子强度和分子量达到均一。用 Biomarker Wizard 模块, 设置初始噪音过滤值为 5, 二次噪音过滤值为 2, 以 0.3% 为最小阈值对质荷比位于 2 000~20 000 的蛋白质进行聚类。鉴于样本数据不遵循正态分布, 因而采用 Mann-Whitney 检验对野生型组、突变型组、空载体组中每个特定质荷比的蛋白质峰值进行两两成组比较, 以 $P < 0.05$ 作为有统计学意义的判断标准。

2 结果

2.1 细胞转染效率

转染pEGFP/pcDNA3.1(+)质粒的AGS细胞于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况，计算转染效率。转染效率=(EGFP表达阳性的细胞数/计数细胞总数)×100%。经多视野阳性细胞计数计算的转染效率约为41%。

2.2 转染细胞中 *cagA* 基因 mRNA 的表达

RT-PCR 结果显示，在转染野生型质粒和转染突变型质粒的 AGS 细胞中均有 *cagA* 基因 mRNA 的表达，扩增片段长度为 513 bp(图 1)。扩增片段凝胶纯化后的测序结果显示分别为野生型 *cagA* 基因和磷酸化位点突变型 *cagA* 基因。

2.3 芯片对细胞蛋白质的结合

本研究选用的SAX2型和CM10型蛋白质芯片的表面具有不同的理化性质：SAX2 表面为强阴离子交换介质而 CM10 为弱阳离子交换介质，分别可结合等电点小于 9.0 和等电点大于 4.0 的蛋白质。因此两种芯片具有互补性(图 2)，提高了检测的全面性和完整性。表达谱数据显示：在 180 激光强度下所得蛋白质峰的区分度最佳。两种芯片所捕获的蛋白质都集中于 1 500~30 000 质荷比范围内。SAX2 和 CM10 芯片分别可获得(226 ± 25)个和(189 ± 17)个强度大于 1.0、信噪比大于 5.0 的蛋白质峰。

2.4 CagA 对 AGS 细胞蛋白质组的改变

为确定与 CagA 致病过程相关的宿主细胞蛋白质，我们将野生型 *cagA* 基因导入 AGS 细胞，并以转染 pcDNA3.1(+)的 AGS 细胞作为阴性对照，比较两者蛋白质表达谱的差异。对于每个特定质荷比的

蛋白质，进行两组之间峰值的非参数检验($n=4$)，将 $P<0.05$ 、峰值差异大于 50% 的蛋白质定为候选的差异表达蛋白质(简称候选蛋白)。芯片图谱与数据显示，在 SAX2 所结合的近 230 个蛋白质中有 7 个蛋白质的峰值在野生型组与空载体组之间存在显著差异($P<0.05$)。其中质荷比为 6 546 和 9 084 的 2 个蛋白质在野生型组中的平均峰值上调至空载体组的 2.26 倍和 2.35 倍(图 3c、图 3d，表 1)；质荷比为 2 013、4 286、8 563、9 952、11 645 的 5 个蛋白质表达水平下调，其中下调幅度最大的是质荷比为 2 013 的蛋白质，峰值仅为空载体组的 29%(图 3a、图 3b、图 3d，表 1)。

在CM10所结合的近190个蛋白质中有9个蛋白质的峰值在野生型组与空载体组之间存在显著差异($P<0.05$)。其中质荷比为 4 229、4 714、4 728、5 129、6 657、8 162、13 803、14 021 的 8 个蛋白质在野生型组中的峰值上调至空载体组的 1.77~2.92 倍不等(图 4a、图 4b、图 4c、图 4d，表 1)；质荷比为 11 085 的蛋白质在野生型组中的表达水平低于空载体组，峰值是空载体组的 58%(图 4d，表 1)。综合两种芯片的检测结果，共 16 个蛋白质的表达受到 CagA 的影响，提示这些蛋白质表达水平的改变是 CagA 与宿主细胞相互作用的结果，这些差异表达蛋白质可能参与了 CagA 的致病过程。

2.5 CagA 磷酸化与细胞蛋白质组改变的关系

CagA生物学功能的发挥在很大程度上依赖于其EPIYA重复序列中酪氨酸位点的磷酸化。为进一步区分 16 个候选蛋白表达的改变是与 CagA 磷酸化效

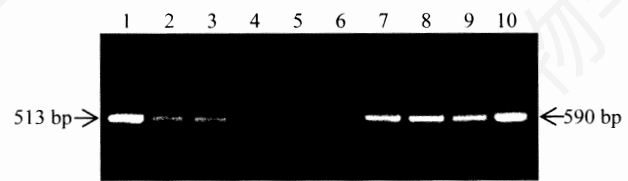


图1 RT-PCR检测转染后AGS细胞中*cagA*基因mRNA的表达
1: 阳性对照; 2: 野生型组; 3: 突变型组; 4: 空载体组(阴性对照); 5: 空白对照组; 6: marker; 7~10: 2~5 的β肌动蛋白基因扩增片段。

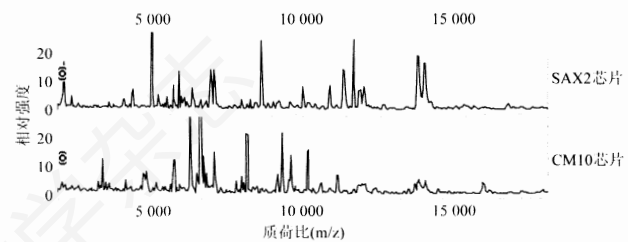


图2 两种蛋白质芯片对 AGS 细胞不同蛋白质的结合
基于 SAX2 型和 CM10 型蛋白质芯片的 AGS 细胞在质荷比为 2 000~20 000 范围的蛋白质表达谱，显示了两种芯片的互补性。

表1 转染野生型*cagA*质粒后表达发生改变的宿主细胞蛋白质

芯片类型	质荷比	平均峰值($\bar{x} \pm s$)		峰值改变倍数
		空载体组	野生型组	
SAX2	2 013	30.39±7.19	8.82±5.37	-3.45*
	4 286	5.08±0.85	2.25±0.70	-2.26*
	6 546	3.08±0.88	6.95±1.34	2.26*
	8 563	9.73±1.88	3.72±0.42	-2.62*
	9 084	2.61±1.35	6.13±1.74	2.35*
	9 952	5.22±2.07	2.51±0.95	-2.08*
CM10	11 645	3.39±0.98	1.32±0.86	-2.57*
	4 229	4.29±0.57	9.36±0.32	2.18*
	4 714	10.16±1.26	17.95±3.61	1.77*
	4 728	11.11±1.75	20.51±4.02	1.80*
	5 129	3.59±0.72	6.93±0.61	1.93*
	6 657	9.67±2.45	22.83±4.27	2.36*
	8 162	4.26±0.38	8.88±1.06	2.08*
	11 085	3.37±0.75	1.94±0.46	-1.74*
	13 803	2.97±0.79	8.66±0.48	2.92*
	14 021	3.06±0.24	5.59±0.41	1.83*

统计方法采用 Mann-Whitney 非参数检验($n=4$)，* $P<0.05$ 。

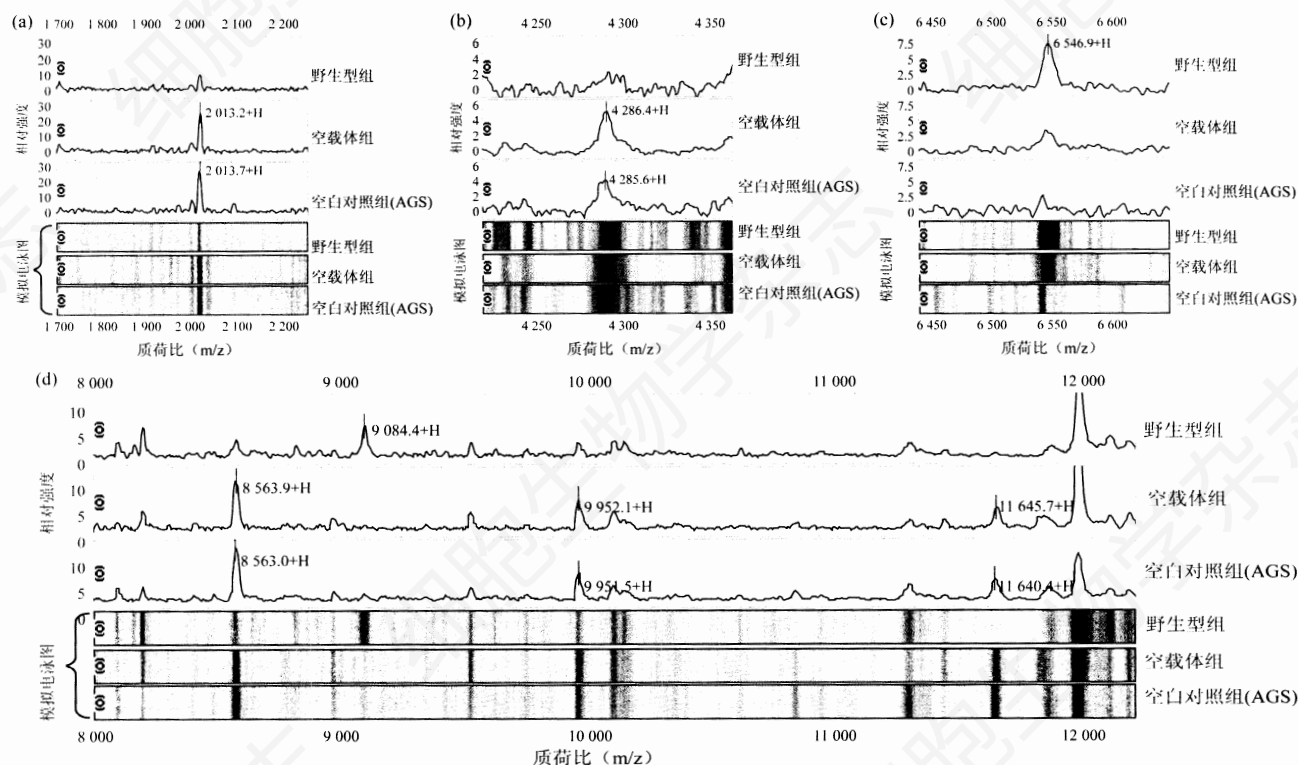


图3 野生型组与空载体组 SAX2 芯片蛋白质表达谱的比较

a: 质荷比为 2 013 的蛋白质表达水平比较; b: 质荷比为 4 286 的蛋白质表达水平比较; c: 质荷比为 6 546 的蛋白质表达水平比较; d: 质荷比为 8 563、9 084、9 952、11 645 的蛋白质表达水平比较。

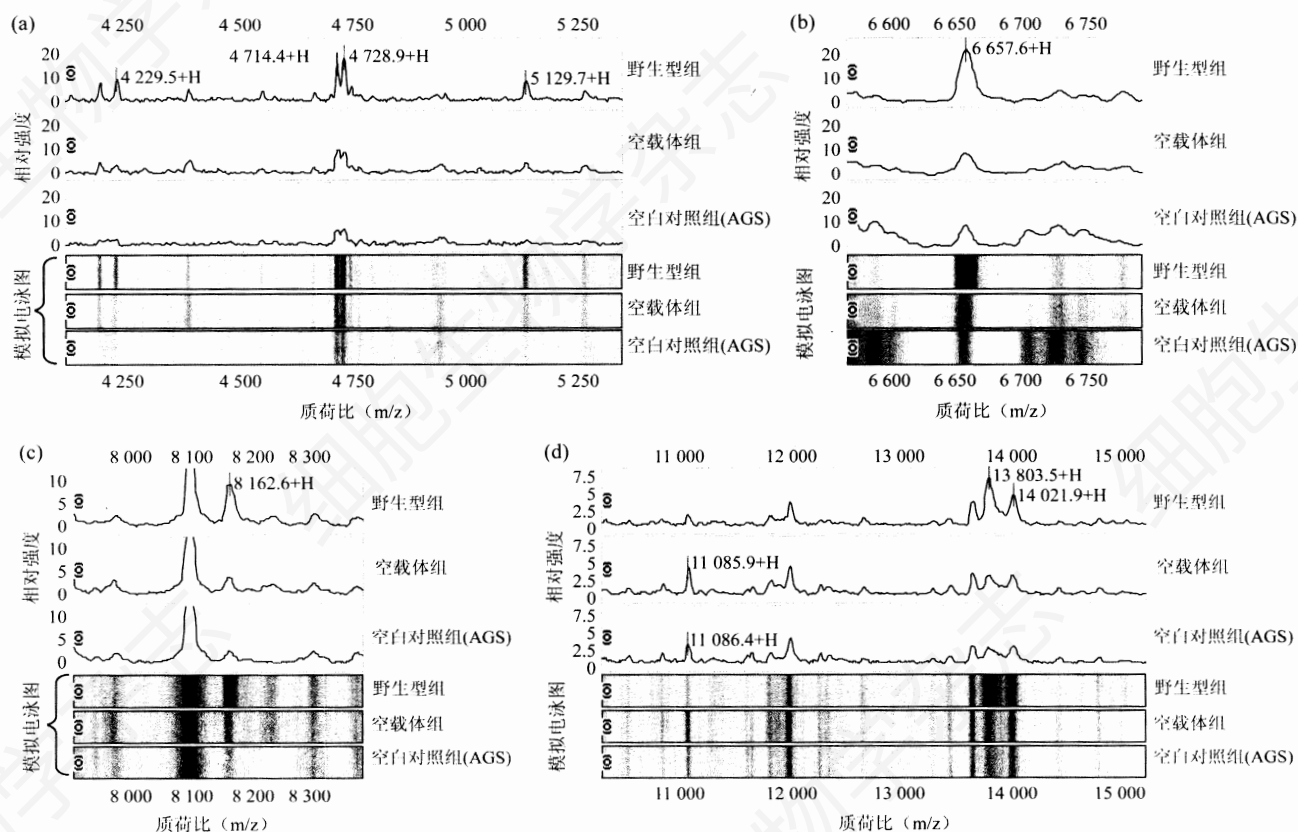


图4 野生型组与空载体组 CM10 芯片蛋白质表达谱的比较

a: 质荷比为 4 229、4 714、4 728、5 129 的蛋白质表达水平比较; b: 质荷比为 6 657 的蛋白质表达水平比较; c: 质荷比为 8 162 的蛋白质表达水平比较; d: 质荷比为 11 085、13 803、14 021 的蛋白质表达水平比较。

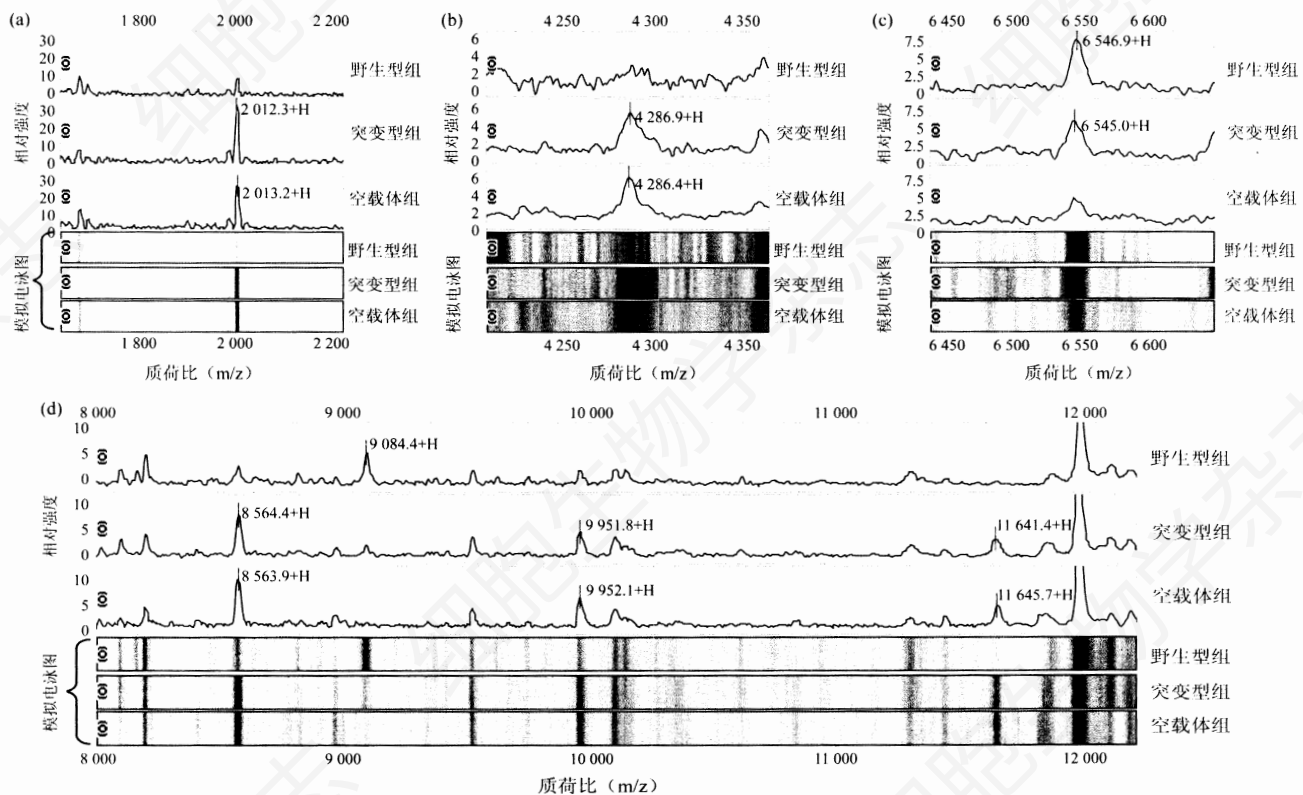


图5 SAX2 芯片检测候选蛋白在突变型组中的表达情况及与野生型组、空载体组的比较

a: 质荷比为 2 013 的蛋白质表达水平比较; b: 质荷比为 4 286 的蛋白质表达水平比较; c: 质荷比为 6 546 的蛋白质表达水平比较; d: 质荷比为 8 563、9 084、9 952、11 645 的蛋白质表达水平比较。

应相关, 还是 CagA 其他功能作用的结果, 我们用先前构建的突变型 *cagA* 质粒转染 AGS 细胞, 得到突变型组蛋白质表达谱, 然后与野生型组和空载体组比较以上 16 个候选蛋白的表达水平。SAX2 表达谱比较结果显示, 在野生型组中表达发生改变的 7 个候选蛋白中, 只有质荷比为 6 546 蛋白质的表达水平在突变型组中也发生了同样的改变, 峰值与空载体组存在显著差异 ($P < 0.05$), 为空载体组的 1.8 倍 (图 5c, 表 2), 说明磷酸化或非磷酸化的 CagA 都可引起该蛋白质表达水平的升高, 提示质荷比为 6 546 蛋白质表达的改变与 CagA 的酪氨酸磷酸化作用无关。其余 6 个候选蛋白 (质荷比为 2 013、4 285、8 563、9 084、9 952、11 645) 在突变型组中的峰值与空载体组均无差异 ($P > 0.05$), 而与野生型组有显著差异 ($P < 0.05$) (图 5a、图 5b、图 5d, 表 2), 提示野生型组中这 6 个蛋白质表达的改变与 CagA 的磷酸化相关。

另一方面, CM10 表达谱比较结果显示, 9 个候选蛋白中质荷比为 4 714、4 728、6 657 的 3 个蛋白质在突变型组中的峰值与野生型组无差异 ($P > 0.05$), 而与空载体组存在显著差异 ($P < 0.05$), 上调

幅度为 1.70 倍、1.97 倍和 2.22 倍 (图 6a、图 6b, 表 2), 提示这 3 个蛋白质表达水平的升高与 CagA 的磷酸化作用无关。其余 6 个蛋白质 (质荷比为 4 229、5 129、8 162、11 085、13 803、14 021) 在突变

表2 16个候选蛋白在突变型组中的表达及与CagA磷酸化的关系

芯片类型	质荷比	平均峰值 ($\bar{x} \pm s$)		峰值改变倍数
		空载体组	突变型组	
SAX2	2 013	30.39 $\pm$ 7.19	29.92 $\pm$ 9.53	-1.02**
	4 286	5.08 $\pm$ 0.85	4.44 $\pm$ 0.58	-1.14**
	6 546	3.08 $\pm$ 0.88	5.53 $\pm$ 0.69	1.80*
	8 563	9.73 $\pm$ 1.88	10.86 $\pm$ 1.77	1.12**
	9 084	2.61 $\pm$ 1.35	2.75 $\pm$ 0.60	1.05**
	9 952	5.22 $\pm$ 2.07	5.19 $\pm$ 1.30	-1.01**
	11 645	3.39 $\pm$ 0.98	3.70 $\pm$ 1.10	1.09**
CM10	4 229	4.29 $\pm$ 0.57	6.13 $\pm$ 0.78	1.43**
	4 714	10.16 $\pm$ 1.26	17.31 $\pm$ 1.41	1.70*
	4 728	11.11 $\pm$ 1.75	21.92 $\pm$ 2.58	1.97*
	5 129	3.59 $\pm$ 0.72	4.58 $\pm$ 0.46	1.28**
	6 657	9.67 $\pm$ 2.45	21.46 $\pm$ 1.92	2.22*
	8 162	4.26 $\pm$ 0.38	4.97 $\pm$ 0.24	1.17**
	11 085	3.37 $\pm$ 0.75	3.19 $\pm$ 0.39	-1.06**
	13 803	2.97 $\pm$ 0.79	4.14 $\pm$ 1.23	1.39**
	14 021	3.06 $\pm$ 0.24	3.66 $\pm$ 1.04	1.20**

统计方法采用 Mann-Whitney 非参数检验 ($n=4$)。* $P < 0.05$, 提示与 CagA 磷酸化无关; ** $P > 0.05$, 提示与 CagA 的磷酸化有关。

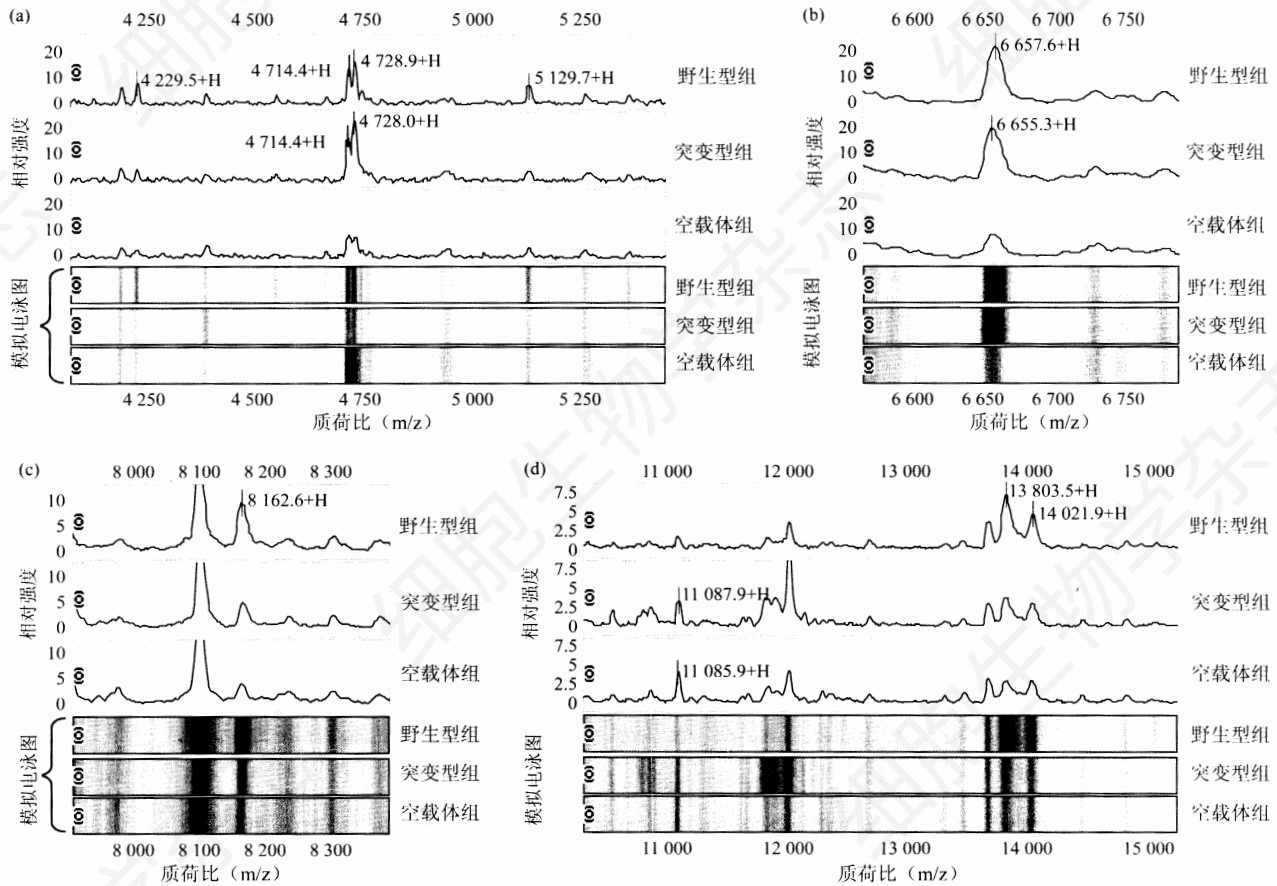


图6 CM10 芯片检测候选蛋白在突变型组中的表达情况及与野生型组、空载体组的比较

a: 质荷比为4 229、4 714、4 728、5 129的蛋白质表达水平比较; b: 质荷比为6 657的蛋白质表达水平比较; c: 质荷比为8 162的蛋白质表达水平比较; d: 质荷比为11 085、13 803、14 021的蛋白质表达水平比较。

型组中的峰值与空载体组无差异($P>0.05$), 而与野生型组存在显著差异($P<0.05$)(图6a、图6c、图6d, 表2), 提示野生型组中这6个蛋白质表达水平的改变与CagA的酪氨酸磷酸化有关。因此, 表达受CagA影响的16个宿主细胞蛋白质中, 质荷比为2 013、4 285、8 563、9 952、11 085、11 645蛋白质表达水平的降低和质荷比为4 229、5 129、8 162、9 084、13 803、14 021的蛋白质表达水平的升高是CagA磷酸化后引起宿主细胞一系列反应的结果, 而质荷比为4 714、4 728、6 546、6 657蛋白质表达水平的升高与CagA的磷酸化效应无关, 可能是CagA其他生物学功能作用的结果。

3 讨论

在Hp的致病过程中, 疾病的演进是病原体与宿主细胞相互作用的结果, 有大量宿主细胞蛋白质参与其中并涉及众多信号通路的改变。当前关于胃上皮细胞对CagA应答机制的研究往往分别针对少数

信号转导通路或个别相关蛋白质, 因而很难全面阐明CagA的致病机制。SELDI-TOF-MS是一项全新的蛋白质组学研究方法, 可将样品中的蛋白质根据质荷比的不同及量的多寡直观地用位置和强弱不同的峰表现出来, 进而形成图谱用于分析。这一方法可检测到fmol(10^{-15} mol)数量级的微量蛋白, 并可一次性获得样品中成百上千个蛋白质的数据^[8,9], 是分析细胞蛋白质组的有力工具。

本研究运用SELDI-TOF-MS分析CagA对宿主细胞蛋白质组的影响, 旨在从整体出发确定参与CagA致病过程的宿主细胞蛋白质。AGS细胞来源于人胃腺癌上皮细胞, 属于低分化胃癌细胞株, 具备人胃上皮细胞绝大多数的生物学功能和生化功能特征。与胃上皮细胞相比, AGS细胞容易获得, 并能传代培养, 因此常用其替代胃上皮细胞作相关研究^[15-17]。我们从转染野生型cagA基因的AGS细胞蛋白质表达谱中检测到16个表达水平发生改变的蛋白质, 可初步确定这些改变与CagA有关。进一

步鉴定这些蛋白质及其功能对于阐明 CagA 的致病机制, 确定新的治疗靶点、开发有效靶向药物都有重要意义。因此, 我们根据质谱给出的质荷比, 结合芯片提供的等电点范围, 在 Swiss-Prot 数据库中检索匹配的蛋白质信息。结果提示, 16 个蛋白质中表达水平上调的多数为抗微生物肽家族成员, 这与细胞的防御机制有关。有个别提示为组蛋白家族成员, 这可能与 CagA 激活 MAPK 信号途径而导致细胞增殖、分化有关。另有一些提示为趋化因子、肿瘤相关因子、血管生成因子, 这与 CagA 引起胃肠道上皮细胞癌变的事实相符。表达下调的蛋白质提示为神经递质类物质、一些信号途径分子等。这些信息对 16 个差异表达蛋白质的功能给出了大体的框定, 为随后的鉴定工作提供了有益的参考。

磷酸化 CagA 的功能一直是胃肠道疾病特别是胃癌研究的热点。CagA 进入宿主细胞后, 其 C 端 EPIYA 模体中的酪氨酸被位于宿主细胞质膜的非受体型酪氨酸激酶家族成员 c-src 和 Lyn 激酶磷酸化^[18,19]。磷酸化的 CagA 通过与 SHP-2 结合并激活其磷酸酶活性而强烈干扰 Ras/Rho、Erk、Met、MAPK 等多条信号转导通路, 激活转录因子 NF- κ B 和 AP-1, 激活原癌基因 *c-fos* 和 *c-jun*, 导致细胞增殖与分化^[20-22]。磷酸化的 CagA 还会导致宿主细胞的肌动蛋白细胞骨架重构, 激活 Rho、GTP 酶、Rac1 和 CDC44, 促使多种细胞因子和炎症因子的释放^[23-25]。而目前对于不基于磷酸化的 CagA 功能仍知之甚少。本研究用定点突变的方法将野生型 *cagA* 基因 EPIYA 重复序列中的酪氨酸反密码子突变为苯丙氨酸反密码子, 以使编码的 CagA 不能被磷酸化, 从而细分 CagA 引起的宿主细胞蛋白质表达的变化哪些与 CagA 的磷酸化效应有关, 哪些是 CagA 其他功能作用的结果。对比突变型组与野生型组的蛋白质表达谱发现, 16 个候选蛋白中有 12 个与 CagA 的磷酸化效应有关。这 12 个蛋白质分子量均在 20 000 Da 以下, 并且有不少在 Swiss-Prot 数据库中未检索到匹配的蛋白质信息, 因此可能是磷酸化 CagA 参与的复杂生物学反应中未经报道的小分子蛋白质。这对以往集中于受 CagA 干扰的信号转导通路中大分子蛋白质的研究作了有益的补充。另一方面, 非磷酸化的

CagA 并非完全没有生物学功能。本研究所发现的 4 个与 CagA 磷酸化作用无关的差异表达蛋白质可为揭示不基于磷酸化的 CagA 的功能提供新的线索。

相对于其他蛋白质组学研究技术, SELDI-TOF-MS 在 2 000 到 20 000 Da 的低分子量范围具有更高的分辨力, 所发现的差异表达蛋白质多数是在特异性环境中产生的低分子量蛋白质, 可以是代谢产物、发生了异常切割的蛋白质、修饰蛋白、神经递质、多肽或细胞因子。因此, 本研究检测到的差异表达蛋白质很可能是以前没有报道过的参与 CagA 致病过程的小分子。进一步鉴定和研究这些蛋白质有可能发现小分子物质在 CagA 致病过程中发挥的作用, 也可能发现已知的相关蛋白质发生的特殊的修饰作用(如异常切割等)。而蛋白质芯片表面的理化性质, 如所结合蛋白质的等电点范围等, 以及质谱分析显示的蛋白质质荷比等数据都为下一步蛋白质的分离纯化与功能鉴定提供了可靠的实验依据。

参考文献(References)

- [1] Held M et al. *Helicobacter*, 2004, **9**: 271
- [2] Blaser MJ et al. *Cancer Res*, 1995, **55**: 2111
- [3] Parsonnet J et al. *Gut*, 1997, **40**: 297
- [4] Rugge M et al. *Cancer*, 1999, **85**: 2506
- [5] Nobuta A et al. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004, **20**(Suppl 1): 1
- [6] Odenbreit S et al. *Science*, 2000, **287**: 1497
- [7] Higashi H et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 14428
- [8] Issaq HJ et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **292**: 587
- [9] Weinberger SR et al. *Pharmacogenomics*, 2000, **1**: 395
- [10] Petricoin EF et al. *Lancet*, 2002, **359**: 572
- [11] Adam BL et al. *Cancer Res*, 2002, **62**: 3609
- [12] Zhang Z et al. *Cancer Res*, 2004, **64**: 5882
- [13] Wilson LL et al. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, **1022**: 317
- [14] Zhu YL et al. *World J Gastroenterol*, 2005, **11**: 880
- [15] Bach S et al. *Infect Immun*, 2002, **70**: 988
- [16] Backert S et al. *Proteomics*, 2005, **5**: 3902
- [17] Lim JW et al. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36**: 1624
- [18] Stein M et al. *Mol Microbiol*, 2002, **43**: 971
- [19] Selbach M et al. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 6775
- [20] Higashi H et al. *Science*, 2002, **295**: 683
- [21] Keates S et al. *Gastroenterology*, 1997, **113**: 1099
- [22] Meyer-ter-Vehn T et al. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 16064
- [23] Churin Y et al. *Mol Microbiol*, 2001, **40**: 815
- [24] Papini E et al. *EMBO J*, 1997, **16**: 15
- [25] Li SD et al. *Infect Immun*, 1999, **67**: 3893

Proteomic Analysis of Human Gastric Adenocarcinoma Epithelial AGS Cells Following Transfection of *Helicobacter pylori* Cytotoxin-associated Gene A

Zhen Ge^{1,2}, Yong-Liang Zhu³, Xian Zhong¹, Jie-Kai Yu¹, Shu Zhen^{1*}

¹ Cancer Institute, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China;

²James D. Watson Institute of Genome Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

³ Gastroenterological Department, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China)

Abstract *Helicobacter pylori* (Hp) cytotoxin-associated protein A (CagA) is closely associated with gastritis, peptic ulcer and gastric carcinoma. Tyrosine-phosphorylation of C-terminal region repeat sequence(s) is considered playing an important role in the biological function of CagA. To identify the host cell proteins involved in CagA induced pathogenesis and investigate whether the changes of protein expression depend on the tyrosine-phosphorylation of CagA, protein expression profiles were analyzed in human gastric adenocarcinoma epithelial AGS cells transfected with wild type *cagA* and phosphorylation site mutant *cagA* using ProteinChips and surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) proteomics technology. The profiles showed the expression level of 10 proteins at mass/charge ratios (*m/z*) of 4 229, 4 714, 4 728, 5 129, 6 546, 6 657, 8 162, 9 084, 13 803, 14 021 were up-regulated while 6 proteins at *m/z* of 2 013, 4 286, 8 563, 9 952, 11 085, 11 645 were down-regulated after wild type *cagA* transfection, indicating that these 16 proteins might have relationships with CagA induced pathogenesis. Besides, only 4 proteins at *m/z* of 4 714, 4 728, 6 546, 6 656 among the 16 proteins mentioned above were found up-regulated after mutant *cagA* transfection, suggesting these expression changes were independent of the tyrosine-phosphorylation of CagA while the changes of other 12 proteins were dependent of the tyrosine-phosphorylation of CagA. These results may provide new targets for further understanding of the biological function and pathogenesis of CagA.

Key words CagA; phosphorylation; SELDI-TOF-MS; ProteinChips

Received: March 13, 2006 Accepted: May 11, 2006

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2004CB518707)

*Corresponding author. Tel: 86-571-87784501, Fax: 86-571-87214404, E-mail: zhengshu@zju.edu.cn