

## 幽门螺杆菌 *cag* PAI 编码的 IV 型分泌系统

崔蕾蕾 邵世和\*

(江苏大学医学技术学院 镇江 212013)

**摘 要** 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 是定植于人胃部特定的病原菌, 感染呈全球分布, 感染率高达 50% 以上。现已证实它是轻度胃炎、消化性溃疡及胃癌的主要病因。I 型 *H. pylori* 菌株含有一个约 40kb 的特殊基因片段, 即 *cag* 致病岛 (cytotoxin associated gene pathogenicity island, *cag* PAI), 该片段只出现于致病相关菌株, 基因呈高密度分布并编码一个分泌转运系统称为 IV 型分泌系统 (type IV secretion system, TFSS), 通过转运相关毒素而参与 *H. pylori* 诱导上皮细胞细胞内的酪氨酸磷酸化、细胞骨架重排、基垫结构形成、活化核转录因子 NF- $\kappa$ B、诱导促炎细胞因子白细胞介素-8 的表达等, 故在 *H. pylori* 的致病中起着关键作用。近年来, 研究者们致力于研究 IV 型分泌系统的功能, 但是对于这个装置是如何转运蛋白进入宿主细胞的确切机制还是知之甚少, 因此, 对 IV 型分泌系统的研究将有助于进一步明确 *H. pylori* 致病机制, 并为临床诊断和治疗提供新的靶点。

**关键词**: 幽门螺杆菌; *cag* PAI; IV 型分泌系统 (TFSS)

中图分类号: Q78, Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)04-0743-03

细菌性病原体破坏真核宿主需要专门的大分子分泌系统来将致病因子转运到环境中或直接转运到宿主细胞中。转运大分子经过细菌或真核生物膜的过程需要多组分的装置即分泌系统。目前已知细菌具有 4 种分泌系统, 其中 I、II 型是我们熟知的一般分泌途径, 可将蛋白排泌于菌体外环境; III、IV 型较为特殊, 通过细菌的菌毛样结构与宿主细胞紧密结合形成一个孔道, 将蛋白直接注入宿主细胞内。IV 型分泌系统 (TFSS) 是革兰阴性菌, 如根癌农杆菌、幽门螺杆菌、百日咳杆菌、布鲁菌、空肠弯曲菌、嗜肺军团菌等通常使用的分泌机制, 通过 TFSS 将蛋白毒素和其他致病因子运输到宿主细胞内<sup>[1,2]</sup>。

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 是定植于人胃部特定的病原菌, 感染呈全球分布, 感染率高达 50% 以上。现已证实它是轻度胃炎、消化性溃疡及胃癌的主要病因<sup>[3]</sup>。I 型 *H. pylori* 菌株中含有一个约 40kb 的特殊基因片段, 即 *cag* 致病岛 (cytotoxin associated gene pathogenicity island, *cag* PAI), 编码 31 个推测与毒素及毒素装配和分泌功能相关的蛋白。目前认为由 *cag* PAI 编码的 IV 型分泌系统 (type IV secretion system, TFSS) 形成一个跨膜通道, 通过转运相关毒素如效应蛋白 CagA 而参与 *H. pylori* 诱导上皮细胞内的酪氨酸磷酸化、细胞骨架重排、基垫结构形成, 使得 AGS 胃上皮细胞发生形态改变<sup>[4]</sup>, 活化核转录因子 AP-1<sup>[5]</sup> 和 NF- $\kappa$ B<sup>[6,7]</sup>, 诱导促炎症反应细胞因子如 IL-8 的表达, 在 *H. pylori* 的致病过程中起着关键作用。本文将对近年来 TFSS 的结构及功能的研究作一简要的概述。

### 1 TFSS 的组分

*H. pylori* *cag* PAI 编码的 TFSS 装置是一个菌毛样的大分子结构, 横跨细胞膜并伸出细菌外膜的表面<sup>[8]</sup>。TFSS 结构

跨越细菌内外膜, 用特异糖基转移酶 HP0523 来切断肽聚糖, 使得 TFSS 装置能够横跨细菌细胞壁<sup>9,10]</sup>。

在 *H. pylori* 中, TFSS 组分包括定位于内膜的 3 种三磷酸腺苷酶 (ATPases), 即 HP0544/CagE 和 HP0525/Cag $\alpha$ , 以及偶联蛋白 HP0524/Cag $\beta$ , 它们分别是 VirB4、VirB11 及 VirD4 的同源物, HP0544/CagE 蛋白由同型二聚体组成, 具有 ATPases 活性并为转运底物提供能量<sup>[11]</sup>。HP0525/Cag $\alpha$  蛋白形成六聚体结构, 具有核苷酸水解活性, 能被脂质激活<sup>[12]</sup>, 抑制 Cag $\alpha$  的活性能阻断 CagA 的转运及降低 *cag* 致病岛的毒力<sup>[13]</sup>。VirD4/HP0524 是转运 CagA 所必需的, 但是对于诱导 IL-8 却不是必要的, 因而, VirD4 的功能可能是作为一个衔接蛋白, 发挥偶联作用将 CagA 转运到 TFSS 的槽中<sup>[14]</sup>。

跨膜通道本身连接内外膜, 由 HP0529(CagW)/VirB6、HP053X(CagT)/VirB7、HP0530(CagV)/VirB8、HP0528(CagX)/VirB9 和 HP0527(CagY)/VirB10 组成, HP0530(CagV)/VirB8 和 HP0527(CagY)/VirB10 形成转运装置的核心, 可能跨越内外膜形成一个孔道<sup>[15,16]</sup>。HP0529 有 5 或 6 个跨膜螺旋, 与 HP0530 和 HP0527 形成内膜复合体。HP0528 与脂蛋白 HP0532 形成外膜复合体。Tanaka 等用免疫金电镜技术发现 HP0532/CagT 和 HP0528/CagX 沿着菌毛的长度定植, 而 Rohde 等描述 HP0532/CagT 在菌毛的基部环形分布, HP0532 在形成转运装置的过程中, 介导菌毛与通道的核心复合物 HP0530(CagV)-HP0528(CagX)-HP0527(CagY) 的连接, 对稳定其他蛋白起着关键的作用。HP0527(CagY) 含有许多反重复序列, 促进编码序列基因重排, 很可能提供表面结构的抗原变异来进行免疫逃避<sup>[17]</sup>。

HP0546 是 TFSS 伸出细菌表面菌毛样结构的主要成分, 其作用可能是建立细菌和宿主细胞的接触<sup>[14]</sup>。

基金项目: 江苏省科技厅项目 (BS2004021); 江苏大学高级人才项目 (JDG2004008)

\* 通讯作者。Tel: 86-10-5038375-326; E-mail: shaoshihe2006@163.com

作者简介: 崔蕾蕾 (1980-), 女, 江苏盐城人, 硕士研究生, 主要研究幽门螺杆菌致病机制。E-mail: cuileilei80@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-11-14; 接受日期: 2007-04-19; 修回日期: 2007-02-18

## 2 TFSS 的功能

*H. pylori* 携带的由 *cag* PAI 编码的 TFSS 已逐渐成为公认的 *H. pylori* 重要的毒力决定子。其功能主要为将 CagA 蛋白转运入胃上皮细胞中,还诱导促炎症反应细胞因子如 IL-8 的合成和分泌。

### 2.1 将细菌效应分子 CagA 蛋白转运到不同种类的真核细胞中

在 *H. pylori* 中,唯一一个已知的通过 TFSS 转运的蛋白是 CagA 蛋白。该蛋白亦是由 *cag* PAI 中一个基因编码。CagA 蛋白通过 TFSS 转运的确切机制还不十分清楚。*H. pylori* 26695 菌株的致病岛存在的 27 个基因中,有 6 个与 *A. tumefaciens* 代表的基本 TFSS 中 *virB* 操纵子具有同源性。Fischer<sup>[14]</sup>等通过精确的缺失/插入遗传突变来敲除单个基因,并且不导致下游基因表达产生极化效应,发现其中 17 种基因是易位 CagA 进入宿主细胞所必需的,14 种能使 *H. pylori* 完全诱导 IL-8 转录。TFSS 的所有组分均参与了 CagA 的转运,基因 *hp0524* 的产物是 CagA 易位所必需的成分,但不诱导 IL-8 的分泌。Selbach<sup>[18]</sup>等分析了 *cag I* 和 *cag II* 的 *cag* PAI 的 12 种基因的功能,包括完整的 *virB/D* 复合物 (*VirB4*, *VirB7*, *VirB8*, *VirB9*, *VirB10*, *VirB11* 和 *VirD4*)。结果显示互补的 CagA 和 *VirD4* 能修复野生株的功能,表明表型改变和 CagA 的磷酸化依赖于全部 *virB/D* 同源基因和几个其它的 *cag* PAI 基因,CagA 易位是由 *VirD4*-CagA-依赖性机制调节的。*VirD4* 是 CagA 易位所必需的,其功能可能是作为一个衔接蛋白,将 CagA 转入 TFSS 的槽中。Hohlfeld<sup>[19]</sup>等已经鉴定了 *H. pylori* CagA 蛋白的分泌信号是通过 TFSS 被运送到真核细胞中。CagA 和绿色荧光蛋白 (GFP) 的融合蛋白不能将 GFP 转运到真核细胞中,但是 GFP 和 CagA C-末端却在野生型 CagA 易位中显示显性负效应。CagA 易位依赖 C-末端的 20 个氨基酸,含有一排正电荷残基。有趣的是,如果用其它 IV 型分泌蛋白重构 CagA 易位成分来代替 CagA 的 C-末端区域,这些正电荷在 CagA 转运中既不是必需的也不是充分的。用 phosphorylatable 肽标记的新的 IV 型易位测定法研究发现,如果去掉 CagA 的 N-末端部分也不能转运蛋白。因此,*cag* PAI 编码的 TFSS 似乎与其它系统不论其组成和结构,还是底物识别和转运都是有偏差的,其作用的确切机制还有待进一步的研究。

### 2.2 诱导 IL-8 的合成和分泌

*H. pylori* 的 TFSS 除了能转运 CagA,也能间接诱导宿主细胞促炎症反应应答。CagA 阳性的 *H. pylori* 诱导 IL-8 表达的能力远远大于 CagA 阴性的菌株<sup>[20]</sup>,但是令人疑惑的是,剔除 CagA 并不影响 NF- $\kappa$ B 及 MAPK 的激活和 IL-8 的生成,这提示 CagA 阳性的 *H. pylori* 引发的 IL-8 生成尚有其他调控因素,如可能有 *cag* PAI 的其它产物蛋白进入了宿主细胞或者 IL-8 的生成从根本上是由 TFSS 对宿主细胞的影响决定的,而与分泌内容无关<sup>[21]</sup>。近来还发现 *H. pylori* 能通过 TFSS 向宿主细胞内递送肽聚糖。易位的肽聚糖由细胞内病原体识别分子 Nod1 检测到,Nod1 能够激活信号级联放大,使得真核转录因子如核因子 kappa B (NF- $\kappa$ B) 激活,这些转录因子能够刺激许多炎症介质的合成和分泌,如白细胞介素-8 (IL-8)<sup>[22]</sup>。Selbach 等<sup>[18]</sup>发现所有接触-依赖 IV 型运载体运载体复合物的 *virB* 基因敲除株 ( $\Delta$ *virB4*, *virB7*, *virB8*, *virB9*,

*virB10* 和 *virB11*) 及缺失整个 *cag* PAI 的突变株不能分泌 IL-8,因此,认为细菌刺激 IL-8 分泌的能力很大程度上与它们易位 CagA 的能力有关,即 TFSS 可诱导 IL-8 的分泌。

因此,目前对于上皮细胞通过 TFSS 诱导 IL-8 合成的机制主要有两种假说:①效应蛋白易位假说;②受体刺激假说。Naumann 等<sup>[5]</sup>认为 IL-8 的诱导是由 *cag* PAI 编码的 CagA 以外的其他效应蛋白易位到上皮细胞内,通过 Rho-GTPases/PAK/MKK4/JNK 途径或 PAK/NIK/I $\kappa$ B kinases 途径诱导信号级联放大,激活转录因子 AP-1 和 NF- $\kappa$ B,从而诱导细胞因子基因转录。Fischer 等<sup>[14]</sup>认为 IL-8 的诱导是由位于细菌表面完整的 TFSS 结合到细胞受体上,通过上述的信号转导途径将信号转入细胞内,诱导 IL-8 合成。

## 3 宿主细胞因子对 TFSS 功能的影响

已经系统地研究了 *H. pylori* TFSS 功能的基因,但很少有研究涉及到宿主细胞的因子。为了证实 *H. pylori* TFSS 发挥功能是否需要宿主细胞决定子,Bauer 等<sup>[23]</sup>分别用野生型 *H. pylori* 和选择的 *cag* PAI 基因等基因敲除的突变株感染了 19 种不同的哺乳动物细胞株,分析其 CagA 转运、宿主细胞蛋白脱磷酸化、细胞因子分泌 (IL-8 和巨噬细胞炎症蛋白 2) 以及细胞表型改变。研究结果证实,不仅仅是细菌而且宿主细胞因子也决定了感染的细胞应答。首次提供了不同宿主因子在 *cag* PAI 介导的应答中起作用的明确的实验证据。对这些未知的宿主细胞因子的检测不仅有助于我们了解宿主-病原体相互作用,还有助于新的治疗方法的发展。

## 4 结语

只有探究 *H. pylori* 与真核细胞之间分子水平上的相互作用,我们才能从组织和器官水平上够理解细菌与宿主是如何达到终生共存的。*cag* PAI 编码的 TFSS,被认为是 *H. pylori* 中又一新的致病因素,虽然其转运蛋白毒素 CagA 等及诱导 IL-8 等细胞因子分泌的确切机制还没有被完全了解,但随着对 TFSS 研究的深入,将有助于进一步阐明 *H. pylori* 的致病机制,有望成为临床诊断和治疗的新靶点。随着分子生物学技术、免疫学技术的不断发展,人们对 TFSS 研究的不断深入,其结构及功能仍有待继续探讨。

## 参 考 文 献

- [1] Burns DL. Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2003 4(1):29-34.
- [2] Cascales E, Christie PJ. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 2003, 1(2):137-149.
- [3] Backert S, Schwarz T, Miehle S, et al. Functional analysis of the *cag* pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. *Infect Immun* 2004, 72(2):1043-1056.
- [4] Bourzac KM, Guillemin K. Helicobacter pylori-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol* 2005, 7(7):911-919.
- [5] Naumann M, Wessler S, Bartsch C, et al. Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the *cag* pathogenicity island. *Biol*

- [ 6 ] Wataru S, Yoshihiro H, Haruhiko Y, *et al.* NF- $\kappa$ B and ERK-signaling pathways contribute to the gene expression induced by *cag* PAI-positive-*Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*, 2005, **11**( 39 ) : 6134 – 6143.
- [ 7 ] Covacci A, Rappuoli R. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins : Trojan horses for the host cell. *J Exp Med*, 2000, **191**( 4 ) : 587 – 592.
- [ 8 ] Tanaka J, Suzuki T, Mimuro H, *et al.* Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 2003 **5**( 6 ) : 395 – 404.
- [ 9 ] Rohde M, Puls J, Buhrdorf R, *et al.* A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* *cag* type IV secretion system. *Mol Microbiol* 2003 **49**( 1 ) : 219 – 234.
- [ 10 ] Hoppner C, Liu Z, Domke N, *et al.* VirB1 orthologs from *Brucella suis* and pKM101 complement defects of the lytic transglycosylase required for efficient type IV secretion from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 2004, **186**( 5 ) : 1415 – 1422.
- [ 11 ] Yuan Q, Carle A, Gao C, *et al.* Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *Biol Chem*, 2005, **280**( 28 ) : 26349 – 26359.
- [ 12 ] Savvides SN, Yeo HJ, Beck MR, *et al.* VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies : new insights into bacterial type IV secretion. *EMBO J* 2003 **22**( 9 ) : 1969 – 1980.
- [ 13 ] Hillerlingmann M, Pansegrau W, Doyle M, *et al.* Inhibitors of *Helicobacter pylori* ATPase CagA block CagA transport and *cag* virulence. *Microbiology* 2006, **152**( pt 10 ) : 2919 – 2930.
- [ 14 ] Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, *et al.* Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island : essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* 2001, **42**( 5 ) : 1337 – 1348.
- [ 15 ] Busler VJ, Torres VJ, McClain MS, *et al.* Protein-protein interactions among *Helicobacter pylori* *cag* proteins. *J Bacteriol*, 2006, **188**( 13 ) : 4787 – 4800.
- [ 16 ] Terradot L, Bayliss R, Oomen C, *et al.* Structures of two core subunits of the bacterial type IV secretion system, VirB8 from *Brucella suis* and ComB10 from *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**( 12 ) : 4596 – 4601.
- [ 17 ] Aras RA, Fischer W, Perez-Perez GI, *et al.* Plasticity of repetitive DNA sequences within a bacterial ( Type IV ) secretion system component. *J Exp Med* 2003, **198**( 9 ) : 1349 – 1360.
- [ 18 ] Selbach M, Moese S, Meyer TF, *et al.* Functional analysis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island reveals both VirD4-CagA-dependent and VirD4-CagA-independent mechanisms. *Infect Immun*, 2002, **70**( 2 ) : 665 – 671.
- [ 19 ] Hohlfeld S, Pattis I, Puls J, *et al.* A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Mol Microbiol*, 2006, **59**( 5 ) : 1624 – 1637.
- [ 20 ] Kim SY, Lee YC, Kim HK, *et al.* *Helicobacter pylori* CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. *Cellular Microbiology* 2006, **8**( 1 ) : 97 – 106.
- [ 21 ] Rieder G, Hatz RA, Moran AP, *et al.* Role of adherence in interleukin-8 induction in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Infect Immun*, 1997, **65**( 9 ) : 3622 – 3630.
- [ 22 ] Viala J, Chaput C, Boneca IG, *et al.* Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Nat Immunol*, 2004, **5**( 11 ) : 1166 – 1174.
- [ 23 ] Bauer B, Moese S, Bartfeld S, *et al.* Analysis of Cell type-Specific responses mediated by the type IV secretion system of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2005, **73**( 8 ) : 4643 – 4652.

## The type IV secretion system encoded by the *cag* PAI of *Helicobacter pylori*

CUI Lei-lei, SHAO Shi-he\*

( School of Medical Teconology, Jiangsu University, Jiangsu 212013, China )

**Abstract:** *Helicobacter pylori* is a human-specific gastric pathogen that colonizes over half the world's population. Infection with this bacterium is associated with a spectrum of gastric pathologies ranging from mild gastritis to peptic ulcers and gastric cancer. A strong predictor of severe disease outcome is infection with a bacterial strain harbouring the *cag* (cytotoxin associated gene) pathogenicity island (PAI), a 40 kb stretch of DNA that encodes homologues of several components of a type IV secretion system (TFSS). One gene within the *cag* PAI, *cagA*, has been shown to encode a substrate for the TFSS which is translocated into host cells inducing the dephosphorylation of host cell proteins and leading to changes in the morphology or shape of AGS gastric epithelial cells. Furthermore, the TFSS is involved in the induction of proinflammatory cytokines. It appears to play a key role in *H. pylori* pathogenesis. Very little is known about the *H. pylori* *cag* PAI-encoded TFSS, the expression of Cag proteins in *H. pylori*, and the functions of individual proteins encoded by the *cag* PAI. Only by exploring the mechanistic details of the interplay between *H. pylori* and eukaryotic cells can we endeavour to understand how these cellular interactions play out at the tissue and organismal level during the lifelong coexistence of bacterium and host.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*; *cag* PAI; type IV secretion system (TFSS)

Foundation item: Technology Government Program of Jiangsu Province (BS2004021); High-grade Talented Man Program of Jiangsu University (JDG2004008)

\* Corresponding author. Tel 86-10-5038375-326; E-mail: shaoshihe2006@163.com

Received: 14 November 2006 / Accepted: 19 April 2007 / Revised: 18 February 2007