

rVvhA功能膜成孔的预测及细胞毒作用机制分析

刘艳飞 陈建林 许玲 楼永良*

(温州医学院检验医学院, 温州 325035)

摘要 利用生物信息学预测rVvhA的141-335位氨基酸片段有膜成孔模序。基因克隆表达得到95%以上纯度的rMpf, 电子透射电镜观察其能够抑制Hela细胞生长且呈剂量依赖性, 即0.8, 1.6, 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rMpf作用8 h后, 细胞和线粒体形态均发生凋亡和坏死改变, 细胞内活性氧产生明显, 线粒体膜电位下降, mPTP荧光检测膜通道孔活性增强。以上结果表明, rMpf具有诱导Hela细胞损伤的生物学活性, 可通过改变膜通透性引起细胞凋亡。

关键词 溶细胞素; 生物信息学; 凋亡; 线粒体; 活性氧

创伤弧菌溶细胞素(*Vibrio vulnificus* cytolysin, VVC)作为创伤弧菌唯一分泌至细胞外, 具有很强的活性、毒性和种属特征性的外毒素, 是创伤弧菌感染最重要的毒力因子^[1]。我们的前期工作已证实, 利用基因工程方式克隆表达、纯化和复性重组创伤弧菌溶细胞素(rVvhA), 不仅具有溶血活性, 还可以使ECV304细胞凋亡^[2], 具有胶体渗透性, 对多种细胞具有致凋亡、坏死和致应激作用, 结合到靶细胞膜上后, 能寡聚形成 Ca^{2+} 不能渗透的跨膜小孔^[1,3-4]。

VVC是一类胆固醇细胞溶素(cholesterol-dependent cytolysins, CDCs)、膜成孔毒素^[5], 此类毒素羧基端包含一个共同基序: 含有半胱氨酸的11肽(ECT-GLAWEWWR)^[6-7], 有学者认为该段基序是其发挥溶细胞作用的必需结构。成孔毒素发挥溶细胞功能的机制首先是单体发生寡聚化, 形成环状前孔结构, 继而发生构象改变使前孔插入膜中, 最终形成一个大型的 β 桶状孔道, 可造成靶细胞因自身渗透压的改变而裂解^[6-8]。对VVC晶体结构分析其包含不同的功能结构域, 其中膜成孔结构域的 β 链和 α 螺旋参与细胞结合单体寡聚化和前孔形成, 在细胞成孔过程中发挥了主要作用^[8-9]。有些成孔毒素通过线粒体膜引起细胞色素C释放, 激活caspase-9和 Ca^{2+} 外流从而诱导细胞凋亡^[10-11]。因此, 本实验主要针对VVC成孔功能域发挥的作用进行探究分析, 同时结合生物信息学方法对蛋白质结构和功能进行预测分析, 重组表达预测到可能的VVC膜成孔多肽, 进一步研究上述功能肽的生物学活性, 对于完善VVC的结构功能研究及创伤弧菌致病机制研究有重要意义, 更为今后进一步开发出新型的致凋亡肽和膜成孔肽及以此

为基础的新型细胞转染试剂和改造该毒素的新药开发提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体和质粒 含vvhA基因的克隆质粒由浙江大学医学院病原生物学教研室惠赠, *E.coli* BL21 (DE3)菌株、原核表达载体pET28a(+)由本实验室保存。

1.1.2 细胞株和培养基 Hela细胞株由本实验室保存, RPIM1640培养基购自美国Gibco公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司

1.1.3 主要试剂 限制性核酸内切酶Xho I、Nco I, 质粒小量抽提试剂盒、DNA胶回收试剂盒、ExTaq酶、DNA DL2 000 Marker、DNA DL5 000 Marker、T4 DNA连接酶、PCR试剂均购于日本宝生物工程(大连)有限公司; Ni^{2+} -NTA His Band亲和层析柱购自上海申能博彩生物科技有限公司; 还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)、 β -巯基乙醇(2-ME)均为BBI公司产品; 精氨酸购自上海生工生物工程技术有限公司; CCK-8细胞毒性与增殖检测试剂盒、细胞膜红色荧光探针(DiI)、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、活性氧检测试剂盒均购自碧云天生物技术研究所; 活体细胞线粒体膜通道孔(mPTP)荧光检测试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 膜成孔功能模序的预测 利用BLAST对

收稿日期: 2012-01-14 接受日期: 2012-03-12

浙江省自然科学基金(No. Y2090468)资助项目

*通讯作者。Tel: 0577-86699200, E-mail: lyl10282004@yahoo.com.cn

VVC基因和氨基酸序列比对分析, 搜寻同源序列, 利用SOPMA和TmPred Server对VVC进行在线二级结构和相关跨膜功能域预测分析, 利用InterPro对VVC进行在线综合注释和结构域预测, 最后利用SWISS-MODLE在线预测VVC三级结构, 并对模型进行评估分析, 获得可能存在的膜成孔模序。

1.2.2 膜成孔多肽mpf基因的获得与克隆 根据预测的膜成孔基因的核酸序列, 以pET28a(+)作为表达载体并利用其His6-Tag自然结尾, 利用primer 5.0引物设计软件进行全基因引物设计, 如下:

上游引物P₁: 5'-CGC CAT GGT ATC GGG TTA CAC ACC GAA AAA AG-3', 下游引物P₂: 5'-TTC TCG AGC AGT GGA TGA TTC CAG TCG ATG-3', P₁、P₂的5'端分别引入Nco I、Xho I限制性酶切位点及保护性碱基。引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 60 s, 30个循环; 72 °C 5 min, 4 °C 10 min。将纯化的mpf基因与pET28a(+)质粒连接构建重组质粒, PCR和双酶切鉴定重组质粒, 并送上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.3 rMpf的表达、纯化、复性及活性测定 前期工作成功构建了重组质粒pET-28a(+)-mpf, 0.5 mmol/L IPTG诱导E.coli BL21(DE3)(含pET-28a(+)-mpf质粒)菌株表达, SDS-PAGE分析表达产物。通过Ni²⁺-NTA亲和层析法纯化表达产物。复性液结合分步透析法复性后, 检测其活性。rMpf蛋白冷冻干燥成粉末, 于-80 °C保存。

1.2.4 HeLa细胞株的培养及传代 HeLa细胞培养于含10%胎牛血清的RPIM1640培养液中, 置37 °C、5% CO₂、饱和湿度的CO₂培养箱中培养。当细胞生长至铺满瓶底时, 用0.25%胰蛋白酶消化传代, 每2~3 d更换新鲜培养液。

1.2.5 细胞生长抑制实验 采用CCK-8法, 收集对数生长期的HeLa细胞, 接种于96孔板(1×10⁴/孔)。待细胞生长过夜使其成为单层细胞, 同时进行分组实验, 分别为加基础培养液的正常组和0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.6 μg/mL rMpf作用组, 另外设加培养液的正常组和只加试剂的空白组, 每组设三个复孔。置37 °C、5% CO₂、饱和湿度的CO₂培养箱中, 作用4 h。用酶标仪测定450 nm处各组细胞的吸光度(D)值, 以(D_{作用组}-D_{空白组})/(D_{正常组}-D_{空白组})×100%表示细胞的相对活力。

1.2.6 rMpf作用HeLa细胞后形态学观察 HeLa细

胞按4×10⁵/孔接种于6孔板, 待细胞生长过夜使其成为单层细胞, 改为无血清的基础培养基, 同时进行分组实验, 分别为加基础培养液的正常组和0.8, 1.6, 2.4 μg/mL rMpf作用组, 置37 °C、5% CO₂、饱和湿度的CO₂培养箱中, 作用2~8 h后, 于倒置显微镜下观察细胞形态变化。

1.2.7 rMpf作用HeLa细胞后超微结构观察 HeLa细胞按5×10⁶/孔接种于6孔板, 待细胞生长过夜使其成为单层细胞, 改为无血清的基础培养基, 同时进行分组实验, 分别为加基础培养液的正常组、1.6 μg/mL和2.4 μg/mL rMpf作用组, 置37 °C、5% CO₂、饱和湿度的CO₂培养箱中, 作用8 h后, 收集细胞, 经戊二醛预固定, 磷酸缓冲液冲洗, 四氧化锇酸后固定, 双蒸水冲洗, 逐级丙酮脱水, 包埋、聚合, 半薄切片, 光镜观察定位, 超薄切片, 醋酸铀、柠檬酸铅双染, 电子透射电镜(Hitachi Ltd公司H-7500型号)下观察细胞和线粒体的超微结构。

1.2.8 rMpf作用HeLa细胞膜荧光探针(DiI)观察 HeLa细胞按4×10⁵/孔接种于6孔板, 待细胞生长过夜使其成为单层细胞, 改为无血清的基础培养基, 同时实验分组: 加基础培养液的正常组和0.8, 1.6, 2.4 μg/mL rMpf作用组, 置37 °C、5% CO₂、饱和湿度的CO₂培养箱中, 作用4 h后, 按细胞膜荧光探针说明装载探针, 激光共聚焦观察荧光分布变化情况。

1.2.9 Annexin V-FITC/PI检测细胞凋亡与坏死率 HeLa细胞按4×10⁵/孔接种于6孔板, 待细胞生长过夜使其成为单层细胞, 改为无血清的基础培养基, 同时实验分组: 加基础培养液的正常组和0.8, 1.6, 2.4 μg/mL rMpf作用组, 置37 °C、5% CO₂、饱和湿度的CO₂培养箱中, 作用4 h。按Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒提供的操作说明进行, 染色完后1 h内用流式细胞仪检测各组细胞凋亡和坏死的情况。

1.2.10 检测rMpf对HeLa细胞胞内活性氧水平的影响 HeLa细胞按4×10⁵/孔接种于6孔板, 待细胞生长过夜使其成单层细胞, 改为无血清的基础培养基, 同时实验分组: 加基础培养液的正常组和0.8, 1.6, 2.4 μg/mL rMpf作用组, 置37 °C、5% CO₂、饱和湿度的CO₂培养箱中, 作用4 h, 然后按活性氧检测试剂盒装载探针, 于荧光显微镜下观察和荧光酶标仪检测活性氧产生的动态变化。

1.2.11 检测rMpf对HeLa细胞线粒体膜电位(Δψ)的影响 HeLa细胞按4×10⁵/孔接种于6孔板, 待细

胞生长过夜使其成为单层细胞, 改为无血清的基础培养基, 同时实验分组: 加基础培养液的正常组、CCCP阳性对照组和0.8, 1.6, 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rMpf作用组, 置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的 CO_2 培养箱中, 作用4 h, 其中CCCP(10 mmol/L)作用30 min, 收集细胞, 按线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)操作说明书进行处理。根据红绿两种荧光强弱变化的特征, 利用流式细胞仪和荧光显微镜检测绿色荧光率, 反映线粒体膜电位的变化。

1.2.12 检测rMpf对Hela细胞线粒体膜通道孔活性的影响 Hela细胞按 4×10^5 /孔接种于6孔板, 待细胞生长过夜使其成为单层细胞, 改为无血清的基础培养基, 同时实验分组: 加基础培养液的正常组和0.8, 1.6, 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rMpf作用组, 置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的 CO_2 培养箱中, 作用4 h, 按活体细胞线粒体膜通道孔(MPTP)荧光检测试剂盒操作说明进行, 于荧光显微镜观察, 荧光酶标仪检测RFU值, 每隔5 min检测一次, 持续30 min, 计算线粒体膜通道孔活性。

1.2.13 统计学处理 以上实验均重复3次以上, 采用SPSS16.0软件进行统计学分析, GraphPad Prism 5.0软件进行作图分析, 相关变量采用均数 \pm 标准误(means \pm SEM)表示。组间比较采用单因素方差分析, 各实验组与正常组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 模序mpf的预测及其重组质粒pET-28a(+)-mpf的表达

BLAST比对VVC基因、氨基酸序列, 结果其与已知的杀白细胞素/溶血素家族、多种细菌成孔毒素具有很高的同源性, 如霍乱弧菌成孔毒素、嗜水气单胞菌成孔毒素等。SPOMA和TmPred Server分析天然的VVC二级结构多个位点具有跨膜结构, 进一步功能结构域分析得到了含有跨膜结构 α 螺旋(295-313位氨基酸)(图1A)和 β 片层结构的可能的成孔模序Leukocidin/haemolysin(图1B)以及mpf三级结构模型(图1C)。

PCR扩增膜成孔模序mpf对应的基因片段(603 bp)连入载体pET-28a(+), 经双酶切并测序证明pET-28a(+)-mpf融合基因的序列与GenBank登陆的vvhA基因序列(M34670, gi: 155311)相同。将该成功构建的

重组体经三步洗涤法、 Ni^{2+} -NTA亲和层析法纯化得到rMpf(图2), 分子量约为27 kDa, 复性液结合分步透析法复性后, 其最低有效浓度为0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 rMpf的细胞毒性结果

CCK-8结果显示, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rMpf作用4 h后, Hela细胞存活率明显下降且呈剂量依赖性, 存活率分别为93.49%、86.57%、79.45%、64.12%和28.30%, 与正常组相比, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)(图3)。

rMpf作用Hela细胞2 h后, 相差显微镜下观察, 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rMpf组细胞开始变圆(图4B), 1.8, 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rMpf组细胞发生皱缩, 甚至变形或肿胀(图4C和图4D); 作用到8 h, 可见细胞染色质聚集, 细胞核固缩(图4b和图4c), 细胞膜连同细胞浆与细胞核逐渐脱离, 出现脱胞现象(图4d); 同时, 作用到4 h, 装载DiI细胞膜探针, 在激光共聚焦下观察, 可见包绕细胞膜的红色荧光, 随着rMpf浓度增加, 染料逐渐随着细胞浆膨出、或进入胞浆形成有红色荧光膜包绕的单独泡状结构(图5)。

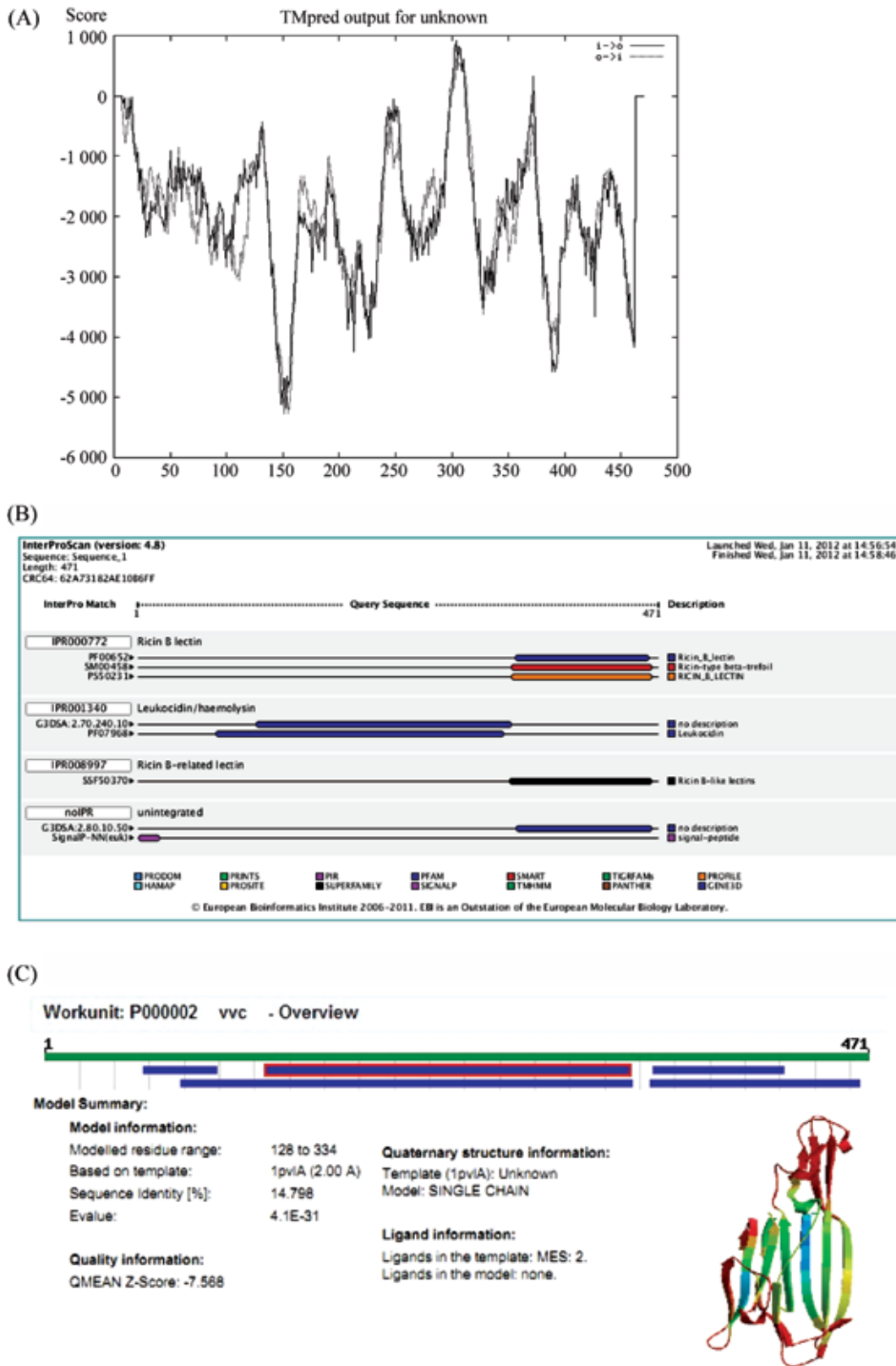
电子透射显微镜下观察1.6, 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rMpf作用Hela细胞8 h后, 细胞膜表面微绒毛消失; 细胞浆存在许多空泡; 细胞核固缩; 核染色质凝聚, 并集中分布在核膜的边缘(图6B和图6C)。同时细胞器线粒体也有异常改变: 浓缩、肿胀、正常的嵴结构消失, 呈多囊状、空泡化、气球样改变, 细胞核溶解(图6b和图6c)。可见, rMpf对Hela细胞损伤具有时间-剂量依赖性。

2.3 流式细胞仪定量检测细胞凋亡率

流式细胞术结合Annexin V-FITC/PI检测rMpf作用Hela细胞4 h后, 0.8, 1.6, 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组的凋亡率分别为(13.17 \pm 0.38)%、(15.80 \pm 0.98)%和(20.83 \pm 1.20)%, 随处理浓度的升高凋亡率增高, 较正常组(7.20 \pm 0.36)%相比, 差异具有统计学意义($P < 0.01$, 表1和图7)。由此可见, rMpf能诱导Hela细胞凋亡, 且具有剂量依赖性。

2.4 rMpf对Hela细胞胞内活性氧水平的影响

DCFH-DA装载后, 荧光显微镜下可见, rMpf作用Hela细胞4 h后, 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rMpf组呈弱阳性, 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rMpf组呈强阳性, 胞内ROS水平随着rMpf作用浓度的增加荧光逐渐增强(图8); 同时荧光酶标仪检测发现, Hela细胞活性氧产生量也随着浓度的增加逐渐升高, 与对照组相比, 作用4 h后, 0.8, 1.6, 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$

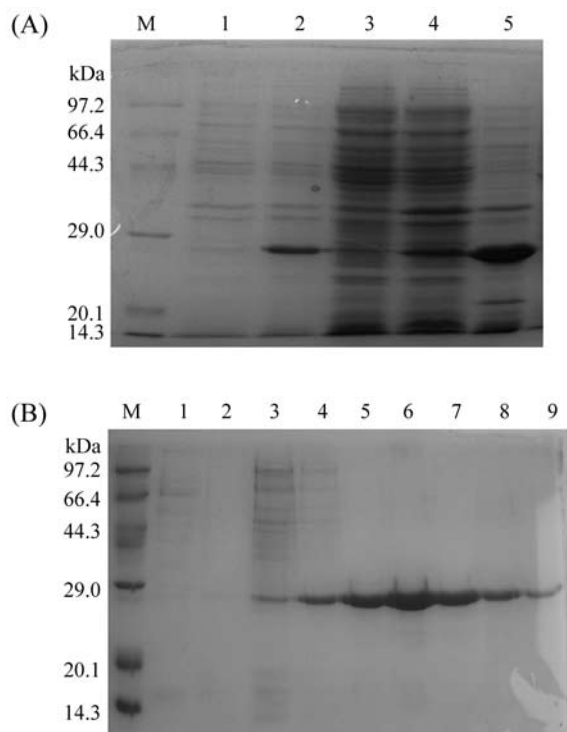


A: tmpred Server分析VVC跨膜结构图, score大于500有意义; B: interProScan预测VVC功能位点模式图; C: SWISS-MODEL预测VVC成孔模序三级结构模型图。

A: tmpred Server transmembrane structure analysis of VVC. The scores of (A) above 500 are considered significant; B: interProScan functional motif prediction of VVC; C: SWISS-MODEL tertiary structure prediction of VVC pore-forming motif.

图1 VVC功能结构位点预测图

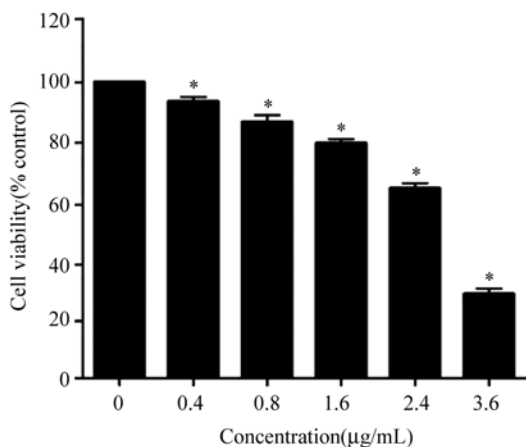
Fig.1 The motif and domain prediction of VVC



A: M: 蛋白质分子量标准(低); 泳道1、2: pET28a(+)-mpf未用IPTG诱导、经0.5 mmol/L IPTG诱导后的全菌; 泳道3、4: 超声后上清、超声后的沉淀; 泳道5: 三步洗涤后的沉淀; B: M: 蛋白质分子量标准(低); 泳道1: 蛋白穿透液; 泳道2~9: 重组蛋白分别经NTA-0, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300 mmol/L洗脱后的蛋白。

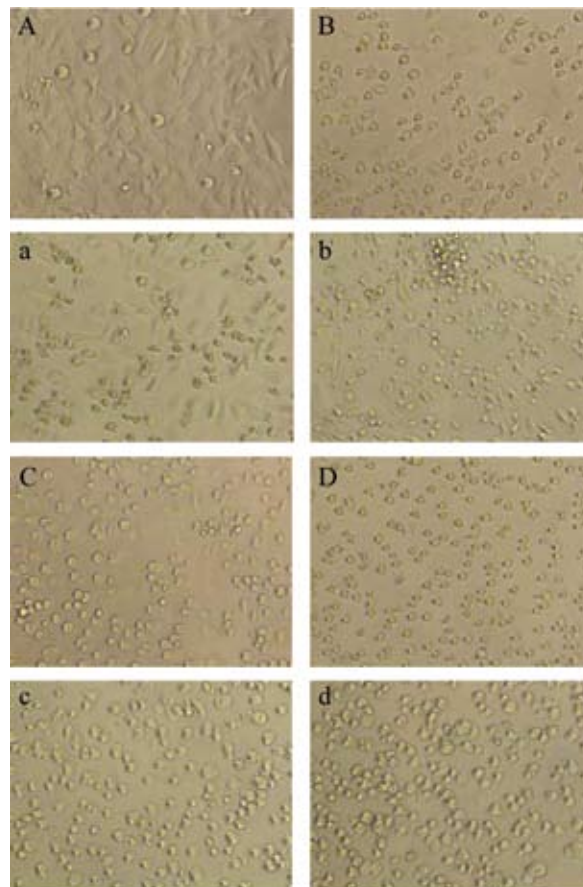
A: lane M: low molecular protein marker; lane1, 2: crude extract of BL21(DE3) pET28a(+)-mpf induced without and with IPTG; lane3, 4: supermatant and sediment of BL21(DE3) pET28a(+)-mpf induced with 0.5 mmol/L IPTG; lane 5: inclusion body with three-step washing; B: lane M: low molecular protein marker; lane 1: penetration sample; lane2~9: protein after elution with various concentrations of imidazole(0, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300 mmol/L).

图2 SDS-PAGE分析融合蛋白rMpf的表达、纯化情况
Fig.2 Analysis of the expression and purification of rMpf by SDS-PAGE



*P<0.01.

图3 rMpf对Hela细胞活性的影响
Fig.3 The effect of rMpf on viability of HeLa cells



A、a: 正常组; B、b: 0.8 µg/mL rMpf作用组; C、c: 1.6 µg/mL rMpf作用组; D、d: 2.4 µg/mL rMpf作用组。图A~图D作用2 h, 图a~图d作用8 h。

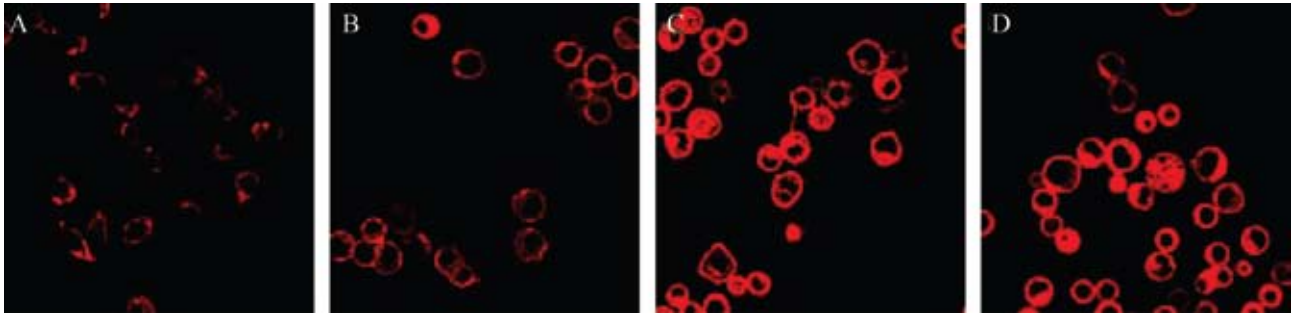
A, a: control; B, b: 0.8 µg/mL rMpf group; C, c: 1.6 µg/mL rMpf group; D, d: 2.4 µg/mL rMpf group. A~D, 2 h; a~d, 8 h.

图4 不同浓度rMpf作用Hela细胞2 h、8 h细胞形态变化(200×)
Fig.4 The morphology of various concentrations of rMpf to HeLa cells for 2 h and 8 h(200×)

rMpf作用组差异具有统计学意义(P<0.01)(图9)。由此可见, rMpf对Hela细胞具有损伤作用, 诱导胞内ROS水平升高且呈rMpf剂量依赖性。

2.5 rMpf对Hela细胞线粒体膜电位(Δψ)的影响

0.8, 1.6, 2.4 µg/mL rMpf作用Hela细胞4 h, 装载JC-1后荧光显微镜下观察, 随着rMpf浓度增加, HeLa细胞红色荧光逐渐减弱, 绿色荧光逐渐增强(图10)。同时流式细胞仪检测显示, rMpf作用组Hela细胞绿色荧光率分别为(10.0±0.76)%、(19.83±3.89)%和(35.6±2.14)%, 与正常组(6.73±1.19)%、CCCP阳性对照组(39.28±0.82)%相比, 0.8 µg/mL rMpf作用组没有显著差异(P>0.05), 1.6, 2.4 µg/mL rMpf作用组差异具有统计学意义(P<0.01)(图11和表2)。说明随着rMpf浓度增加, HeLa细胞线粒体膜电位逐渐下降。

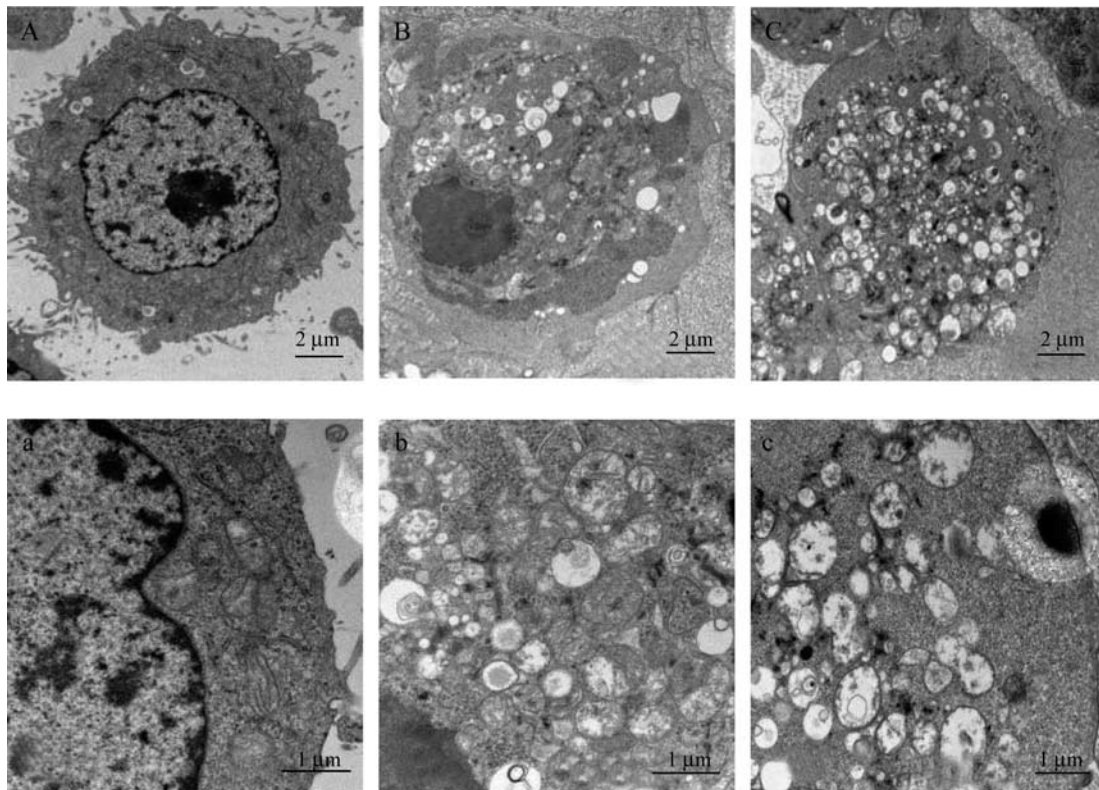


A: 正常组; B: 0.8 $\mu\text{g/mL}$ rMpf作用组; C: 1.6 $\mu\text{g/mL}$ rMpf作用组; D: 2.4 $\mu\text{g/mL}$ rMpf作用组。

A: control; B: 0.8 $\mu\text{g/mL}$ rMpf group; C: 1.6 $\mu\text{g/mL}$ rMpf group; D: 2.4 $\mu\text{g/mL}$ rMpf group.

图5 LCSM检测不同浓度rMpf作用Hela细胞4 h对细胞膜的影响(600 \times)

Fig.5 Identification of Hela cells membrane with various concentrations of rMpf for 4 h by LCSM(600 \times)



A、a: 正常组的细胞和线粒体形态; B、b: 1.6 $\mu\text{g/mL}$ rMpf作用组细胞和线粒体形态; C、c: 2.4 $\mu\text{g/mL}$ rMpf作用组细胞和线粒体形态。

A, a: control; B, b: 1.6 $\mu\text{g/mL}$ rMpf group; C, c: 2.4 $\mu\text{g/mL}$ rMpf group.

图6 不同浓度rMpf作用Hela细胞8 h细胞和线粒体超微结构改变

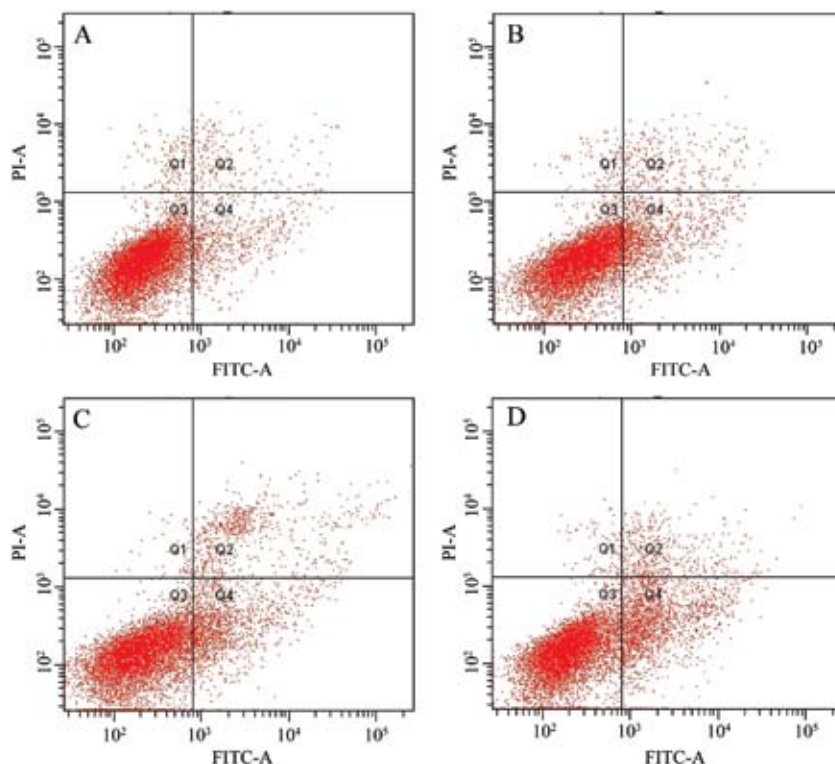
Fig.6 The ultrastructure of mitochondria and Hela cells with various concentrations of rMpf for 8 h

表1 不同浓度rMpf对Hela细胞凋亡率影响的比较

Table 1 Comparison of apoptosis of Hela cells with virous concentrations of rMpf(means \pm SEM, $n=3$)

细胞比例(%)	对照组	rMpf($\mu\text{g/mL}$)		
Cell proportion(%)	Control	0.8	1.6	2.4
Apoptosis rates	7.20 \pm 0.36	13.17 \pm 0.38**	15.80 \pm 0.98**	20.83 \pm 1.20**
Necrosis rates	1.90 \pm 0.23	3.03 \pm 0.34*	4.80 \pm 0.21**	6.87 \pm 0.35**

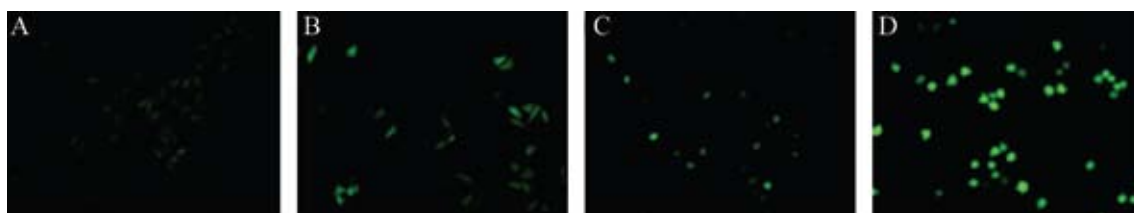
* $P<0.05$, ** $P<0.01$.



A: 正常组; B: 0.8 μg/mL rMpf作用组; C: 1.6 μg/mL rMpf作用组; D: 2.4 μg/mL rMpf作用组。
 A: control; B: 0.8 μg/mL rMpf group; C: 1.6 μg/mL rMpf group; D: 2.4 μg/mL rMpf group.

图7 流式细胞仪检测不同浓度rMpf对Hela细胞凋亡的影响

Fig.7 Analysis of Hela cells apoptosis with various concentrations of rMpf by flow cytometry



A: 正常组; B: 0.8 μg/mL rMpf作用组; C: 1.6 μg/mL rMpf作用组; D: 2.4 μg/mL rMpf作用组。
 A: control; B: 0.8 μg/mL rMpf group; C: 1.6 μg/mL rMpf group; D: 2.4 μg/mL rMpf group.

图8 荧光显微镜检测不同浓度rMpf对Hela细胞ROS的影响(200×)

Fig.8 Identification of Hela cells ROS generation with various concentrations of rMpf by fluorescence microscope(200×)

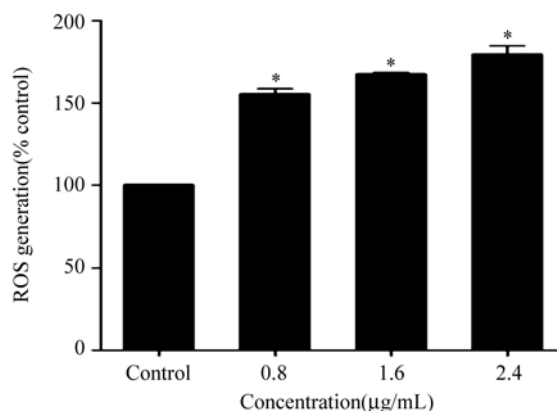
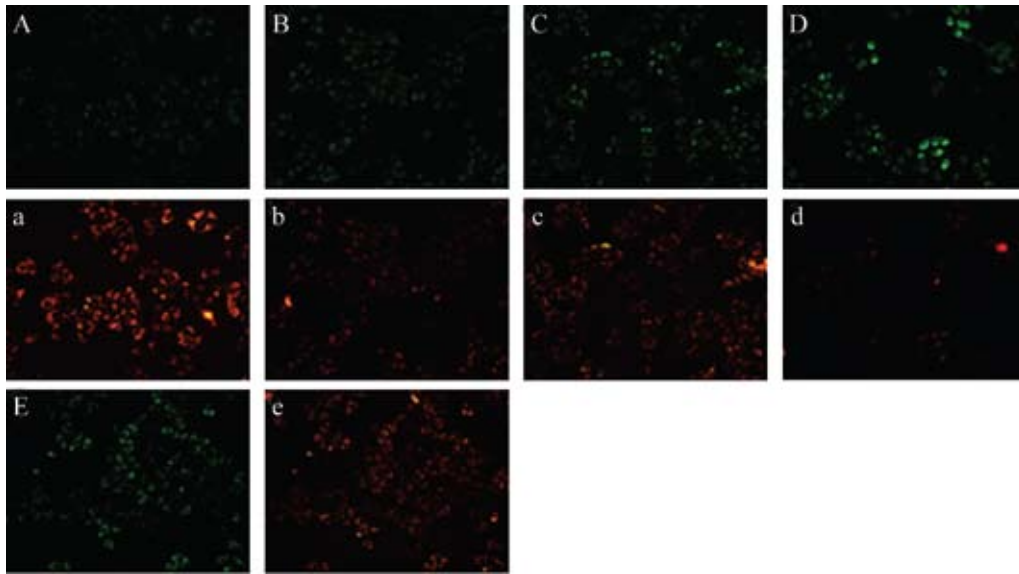


图9 荧光酶标仪分析不同浓度rMpf对Hela细胞胞内活性氧的影响

Fig.9 Analysis of Hela cells ROS generation with various concentrations of rMpf by fluorescence microplate reader

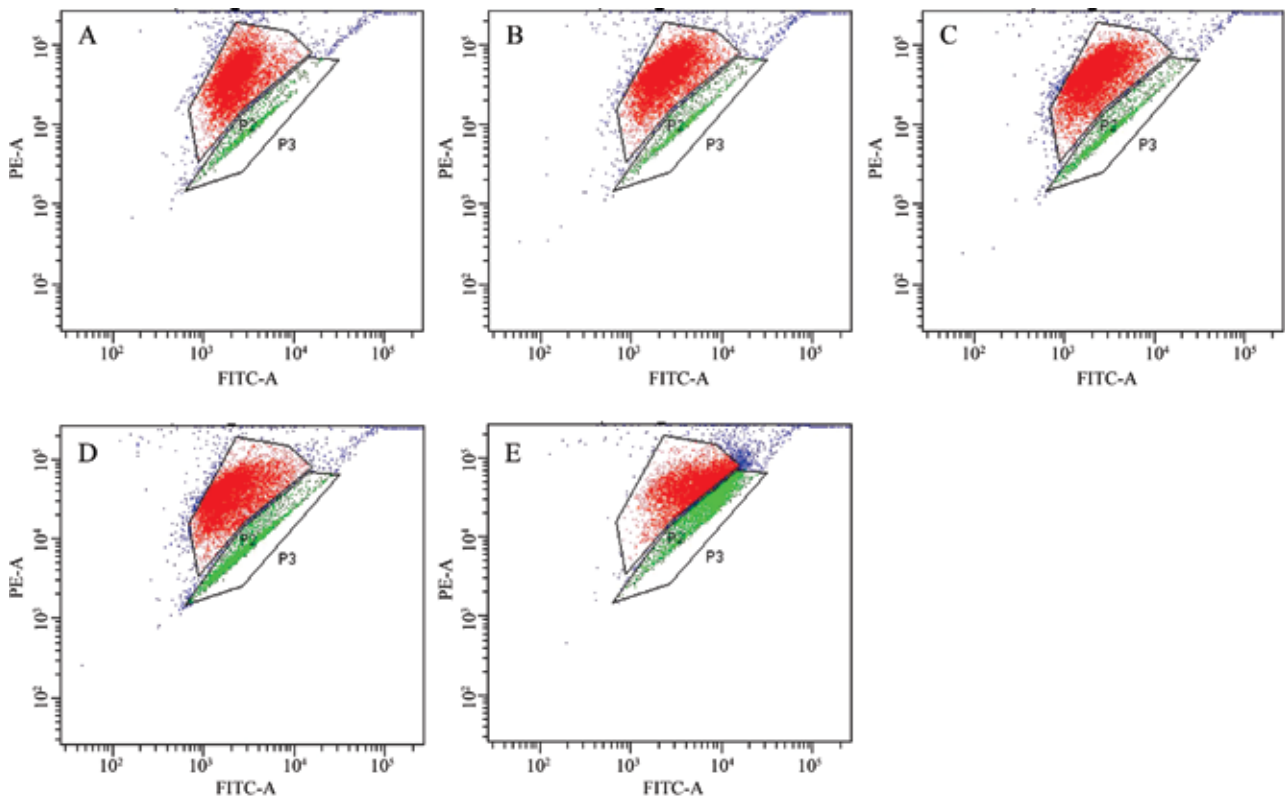


A、a: 正常组; B、b: 0.8 $\mu\text{g/mL}$ rMpf作用组; C、c: 1.6 $\mu\text{g/mL}$ rMpf作用组; D、d: 2.4 $\mu\text{g/mL}$ rMpf作用组; E、e: CCCP作用组; A~E: 绿色荧光; a~e: 红色荧光。

A, a: control; B, b: 0.8 $\mu\text{g/mL}$ rMpf group; C, c: 1.6 $\mu\text{g/mL}$ rMpf group; D, d: 2.4 $\mu\text{g/mL}$ rMpf group; E, e: CCCP group; A~E: green; a~e: red.

图10 荧光显微镜检测不同浓度rMpf对Hela细胞线粒体膜电位的影响(200 \times)

Fig.10 Identification of HeLa cells mitochondrial membrane potential with different concentrations of rMpf by fluorescence microscope(200 \times)



A: 正常组; B: 0.8 $\mu\text{g/mL}$ rMpf作用组; C: 1.6 $\mu\text{g/mL}$ rMpf作用组; D: 2.4 $\mu\text{g/mL}$ rMpf作用组; E: CCCP作用组。

A: control; B: 0.8 $\mu\text{g/mL}$ rMpf group; C: 1.6 $\mu\text{g/mL}$ rMpf group; D: 2.4 $\mu\text{g/mL}$ rMpf group; E: CCCP group.

图11 流式细胞仪检测不同浓度rMpf对Hela细胞线粒体膜电位的影响

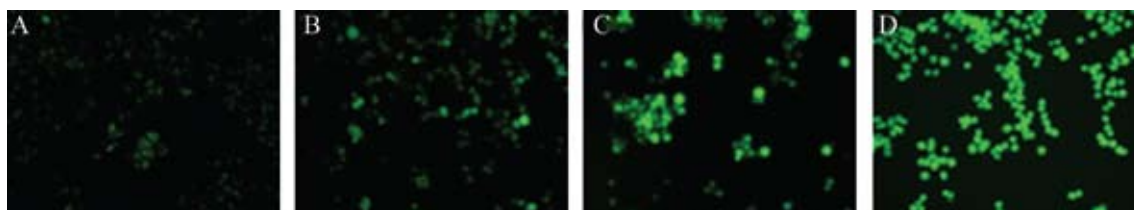
Fig.11 Analysis of HeLa cells mitochondrial membrane potential with various concentrations of rMpf by flow cytometry

表2 不同浓度rMpf对Hela细胞线粒体膜电位的变化比较

荧光率(%)	正常组	rMpf($\mu\text{g/mL}$)			CCCP($10\ \mu\text{mol/L}$)
Fluorescence rates(%)	Control	0.8	1.6	2.4	
Green rates	6.73 \pm 1.19	10.00 \pm 0.76*	19.83 \pm 3.89*	35.60 \pm 2.14**	39.28 \pm 0.82**

与对照组相比较, * P <0.05, ** P <0.01。

* P <0.05, ** P <0.01 vs control group.



A: 正常组; B: 0.8 $\mu\text{g/mL}$ rMpf作用组; C: 1.6 $\mu\text{g/mL}$ rMpf作用组; D: 2.4 $\mu\text{g/mL}$ rMpf作用组。

A: control; B: 0.8 $\mu\text{g/mL}$ rMpf group; C: 1.6 $\mu\text{g/mL}$ rMpf group; D: 2.4 $\mu\text{g/mL}$ rMpf group.

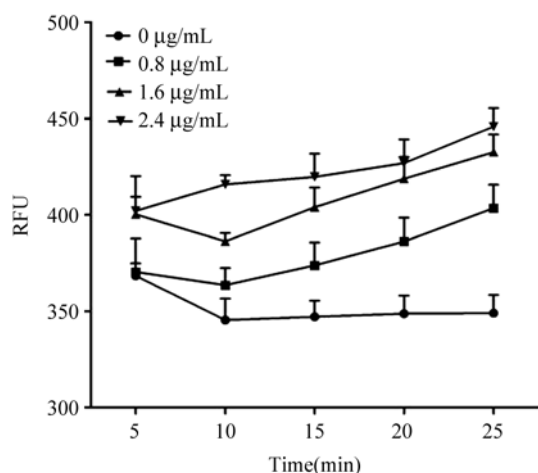
图12 荧光显微镜检测不同浓度rMpf对Hela细胞线粒体膜通道孔活性的影响(200 \times)Fig.12 Identification of HeLa cells mPTP with various concentrations of rMpf by fluorescence microscope(200 \times)

图13 荧光酶标仪分析不同浓度rMpf对Hela细胞线粒体膜通道孔活性的影响

Fig.13 Analysis of HeLa cells mPTP with various concentration of rMpf by fluorescence microplate reader

2.6 rMpf对Hela细胞线粒体膜通道孔活性的影响

rMpf作用Hela细胞4 h, 荧光显微镜下可见正常组细胞呈绿色弱荧光, 而rMpf作用组大部分细胞脱落变圆, 随着rMpf浓度增加, 绿色荧光逐渐增强(图12); 荧光随着时间延长(30 min内)有增强趋势(图13), 钙黄绿素持续进入线粒体聚集, 而淬灭率很低, 线粒体膜通道孔均已经完全开放并处于长期开放状态。

3 讨论

VVC毒性很强, 对多种哺乳细胞有损伤作用,

已证实其具有溶血活性、致炎应激、诱导凋亡等作用。VVC属于成孔毒素, 有研究报道, 该类毒素晶体结构有三个功能结构域: 溶细胞结构域、 β -三叶草形凝集素结构域以及 β -柱状凝集素结构域, 不同的部分发挥不同的作用^[12]; VVC经胆固醇介导, 插入靶细胞膜内形成四聚体跨膜小孔, 导致细胞裂解^[3,13], 但对VVH氨基酸序列分析预测其没有 β -柱状凝集素结构域, 即没有了结合细胞膜的受体。然而, Kashimoto等^[14]报道VVH的334位的苯丙氨酸对于其结合和寡聚化起着重要的作用, 且能稳定成孔结构域的 β 片层结构, 从而形成跨膜小孔, 溶解细胞。

进一步分析VVH作用机制及其起作用的功能结构域或模序, 利用生物信息学预测VVH具有成孔毒素共同的结构特征: 含有半胱氨酸的11肽(ECT-GLAWEWWR)^[6-7], 分析可能有膜成孔模序, 并用工程菌*E.coli* BL21(DE3)^{pET-28a(+)-mpf}高效表达出活性多肽rMpf。作为VVH溶细胞毒素的成孔活性部分, rMpf单独也能发挥一定的溶细胞作用, 即作用于真核细胞原生质膜, 在膜上形成孔道结构, 打破细胞内外分子差异屏障, 从而引起细胞膨胀和细胞溶解^[6-7]。本实验中, CCK-8实验证明该段多肽具有细胞毒性作用, 0.8, 1.6, 2.4 $\mu\text{g/mL}$ rMpf作用于Hela细胞, 镜下观察细胞肿胀, 膜结构会连同胞浆与细胞核逐渐脱离, 胞浆空泡化, 最后破裂溶解, 细胞器如线粒体呈多囊、气球样改变。

细胞通透性的改变早期会引起细胞因子的释

放,从而诱导凋亡,最终导致细胞的死亡^[7]。依赖线粒体的细胞凋亡途径中,涉及多种细胞因子的参与,ROS在细胞凋亡和坏死过程中起着重要介导作用,其在体内的生成可破坏细胞内的氧化还原体系的平衡,一方面引起DNA的损伤,另一方面同时激活细胞凋亡的信号转导通路^[15-16]。本实验中,经rMpf处理过的Hela细胞活性氧产生,且随着rMpf浓度增加荧光增强,ROS水平不断升高,诱发线粒体损伤^[17],可观察到线粒体的形态改变、线粒体膜电位下降,1.6 μg/mL和2.4 μg/mL rMpf作用组绿色荧光率分别为(19.83±3.89)%和(35.6±2.14)%,而正常组为(6.73±1.19)%。诸如此类的改变会直接或间接地引发PT通道^[18-19],PT是定位于线粒体内外膜接触点的非特异性钙离子依赖性通道^[20-21],如钙离子过度进入、线粒体谷胱甘肽的氧化和活性氧水平的增加等导致膜通道孔的持续开放,线粒体通透性显著改变,而造成细胞色素C的释放和线粒体膜电位的消失^[22]。钙黄绿素进入细胞及线粒体会产生极强的绿色荧光,线粒体膜通道孔瞬时开放,钙黄绿素释放出来,被钴离子淬灭。但本实验中,荧光显微镜下观察绿色荧光反而随着rMpf浓度的升高而增强,30 min内RFU值也呈升高趋势,可能rMpf作用Hela细胞后,线粒体膜通道孔完全开放,大量进入线粒体聚集的探针只有少量释放淬灭。

膜成孔片段作为VVC重要的功能结构,在其溶细胞过程中发挥了重要的作用,但rMpf作为单独的多肽,细胞内亚细胞器均有损伤,且有细胞活性分子产生,可以通过线粒体途径引起细胞膜成孔而凋亡。可以推测,rMpf不仅仅只是作用于细胞膜,而是通过细胞膜进入细胞内,发挥毒性作用。相差显微镜和透射电镜下均可见大部分细胞形态呈明显凋亡改变,而流式结合Annexin V-FITC/PI测定细胞凋亡只有一部分Annexin V阳性,说明还有部分已经凋亡细胞并未被Annexin V染色,故考虑今后可以选择cleaved caspase-3来测定凋亡细胞。关于这些疑问我们将会进一步进行研究与分析。

参考文献 (References)

- 1 Lee SE, Ryu SY, Kim SY, Kim YR, Koh JT, Kim OJ, *et al.* Production of *Vibrio vulnificus* hemolysin *in vivo* and its pathogenic significance. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(1): 86-9.
- 2 Kwon KB, Yang JY, Ryu DG, Rho HW, Kim JS, Park JW, *et al.* *Vibrio vulnificus* cytolysin induces superoxide anion-initiated apoptotic signaling pathway in human EVC304 cells. *J Biochem* 2001; 276(50): 47518-23.
- 3 Soltani CE, Hotze EM, Johnson AE, Tweten RK. Structural elements of the cholesterol-dependent cytolysins that are responsible for their cholesterol-sensitive membrane interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(51): 20226-31.
- 4 Lee YR, Park KH, Lin ZZ, Kho YJ, Park JW, Rho HW, *et al.* A calcium-calmodulin antagonist block experimental *Vibrio vulnificus* cytolysin-induced lethality in an experimental mouse model. *Infect Immun* 2004; 72(10): 6157-9.
- 5 Yu HN, Lee YR, Park KH, Rah SY, Noh EM, Song EK, *et al.* Membrane cholesterol is required for activity of *Vibrio vulnificus* cytolysin. *Arch Microbiol* 2007; 187(6): 467-73.
- 6 贺政新, 郑玉玲, 姜永强. 细菌成孔毒素研究进展. 现代生物医学进展(He Zhengxin, Zheng Yuling, Jiang Yongqiang. Recent advance on the pore forming toxins. *Progress in Modern Biomedicine*) 2009; 9(15): 2941-3.
- 7 杨 杨, 郭晓奎. 细菌成孔毒素研究进展. 微生物与感染(*Journal of Microbes and Infection*) 2008; 3(1): 47-9.
- 8 乔 旭, 吴芬芳, 苏 鹏, 李庆伟. CDC/MACPF家族成孔毒素研究进展. 遗传(Qiao Xu, Wu Fenfang, Su Peng, Li Qingwei. Research progress on the MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Hereditas*) 2010; 32(11): 1126-32.
- 9 Ramachandran R, Tweten RK, Johnson AE. Membrane-dependent conformational changes initiate cholesterol-dependent cytolysin oligomerization and intersubunit β -strand alignment. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11(8): 697-705.
- 10 Schuerch DW, Wilson-Kubaiek EM, Tweten RK. Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(35): 12537-42.
- 11 Genestier AL, Michallet MC, Pré vost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, *et al.* Staphylococcus aureus panton-valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest* 2005; 115(11): 3117-27.
- 12 Olson R, Gouaux E. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) pro-toxin and its assembly into a heptameric transmembrane pore. *J Mol Biol* 2005; 350(5): 997-1016.
- 13 Zitzer A, Palmer W, Weller U, Wassenaar T, Biermann C, Traunum-Jensen J, *et al.* Mode of primary binding to target membranes and pore formation induced by *Vibrio cholerae* cytolysin (hemolysin). *Eur J Biochem* 1997; 247(1): 209-16.
- 14 Kashimoto T, Ueno S, Koga T, Fukudome S, Ehara H, Komai M, *et al.* The aromatic ring of phenylalanine 334 is essential for oligomerization of *Vibrio vulnificus* hemolysin. *J Bacteriol* 2010; 192(2): 568-74.
- 15 Ju WK, Kim KY, Angert M, Lindsey JD, Crowston JG, Ellisman MH, *et al.* Elevated hydrostatic pressure triggers release of OPA1 and cytochrome C, and induces apoptotic cell death in differentiated RGC-5 cells. *Mol Vis* 2009; 15: 120-34.
- 16 Sun MG, Williams J, Munoz-Pinedo C, Perkins GA, Brown JM, Ellisman MH, *et al.* Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals transformation of mitochondria during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2007; 9(9): 1057-65.
- 17 Conde de la Rosa L, Schoemaker MH, Vrenken TE, Buist-Homan M, Havinga R, Jansen PL, *et al.* Superoxide anions and

- hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: Involvement of JNK and ERK MAP kinases. *J Hepatol* 2006; 44(5): 918-29.
- 18 Sedlic F, Sepac A, Pravdic D, Camara AK, Bienengraeber M, Brzezinska AK, *et al.* Mitochondrial depolarization underlies delay in permeability transition by preconditioning with isoflurane: Roles of ROS and Ca²⁺. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299(2): C506-15.
- 19 Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: A mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287(4): C817-33.
- 20 Haworth RA, Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺-trigger site. *Arch Biochem Biophys* 1979; 195(2): 460-7.
- 21 Halestrap AP. Mitochondria and reperfusion injury of the heart—a holey death but not beyond salvation. *J Bioenerg Biomembr* 2009; 41(2): 113-21.
- 22 Basañez G, Zhang J, Chau BN, Maksaev GI, Frolov VA, Brandt TA, *et al.* Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *J Biol Chem* 2001; 276(33): 31083-91.

The Prediction and Cytotoxicity Mechanism Analysis on the Functional Motif of the Membrane Pore-forming in rVvhA

Liu Yanfei, Chen Janlin, Xu Ling, Lou Yongliang*

(School of Medical Lab Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract It was predicted that the area between the sites 141-335 of rVvhA amino acid sequence has the membrane pore-forming motif through the methods of bioinformatic. Using methods of gene-cloning, purification and renaturation, the rMpf proteins with purity of more than 95% was obtained. It can inhibit the growth of HeLa cells and the effect was depended on doses, 0.8, 1.6, 2.4 μg/mL rMpf was used respectively for 8 hours, by transmission electron microscopy it was found that the cells show characteristic of apoptosis and the structure of mitochondrion was altered; intra-cellular ROS production was increased obviously; mitochondrial membrane potential was lowered; mitochondrial permeability transition pore activity was increased as revealed by mPTP's fluorescence inspection. The above data show that rMpf plays a role in inducing HeLa cells' damage, and leads to cell apoptosis via influencing cell membrane permeability.

Key words cytolysin; bioinformatics; apoptosis; mitochondrial; ROS

Received: January 14, 2012 Accepted: March 12, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y2090468)

*Corresponding author. Tel: 86-577-86699200, E-mail: ly110282004@yahoo.com.cn