

大肠杆菌 *yijP* 侵袭蛋白诱导人脑微血管内皮细胞凋亡

王 淳* 方文刚 陈誉华**

(中国医科大学发育生物学教研室, 卫生部细胞生物学重点实验室, 沈阳 110001)

摘要 为研究大肠杆菌的脑微血管内皮细胞侵袭基因 *yijP* 的功能, 将 *yijP* 基因(1.04 kb)克隆到 pQE30 表达载体, 构建表达产物为 N 末端带有 6 个组氨酸(His)序列的 *yijP* 汇合蛋白, 以 M15 (pREP4)为受体菌, 大量表达(His)₆-*yijP* 汇合蛋白, 利用 Ni-NTA 亲和层析纯化汇合蛋白, 将经透析法复性的一定浓度的(His)₆-*yijP* 蛋白加入到体外培养的人脑微血管内皮细胞中, 结果显示 *yijP* 蛋白对人脑微血管内皮细胞有较强的细胞毒作用: 在相差显微镜下可观察到细胞皱缩、胞膜呈泡状膨出, 随着时间延长细胞逐渐脱落; 荧光显微镜下可见细胞核呈现为致密团块状或圆形浓染颗粒状, 呈凋亡样改变; DNA 琼脂糖凝胶电泳可见 DNA 阶梯状条带; 流式细胞仪显示在正常二倍体峰之前出现一个亚二倍体峰; Western 印迹可检测到 caspase-3 的活性片段。这些现象均出现在 *yijP* 蛋白作用于人脑微血管内皮细胞的 16 h 之后, 提示在大肠杆菌侵袭人脑微血管内皮细胞过程中, *yijP* 蛋白可能起到诱导脑微血管内皮细胞迟发性凋亡的毒素作用。

关键词 大肠杆菌; *yijP* 基因; 人脑微血管内皮细胞; 血脑屏障; 细胞凋亡

在新生儿细菌性脑膜炎的病因中, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) K1 株是主要致病菌之一。*E. coli* 经血行播散到脑, 但它如何穿过血液与脑组织之间的屏障结构——血脑屏障(blood-brain barrier, BBB), 目前尚不清楚。现有研究表明, *E. coli* 穿过 BBB 的始发过程是对人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cells, HBMEC)的侵袭^[1,2]。迄今已从 *E. coli* K1 株中克隆鉴定了一些与其侵袭人脑微血管内皮细胞有关的基因, 如 *ompA*、*ibeA*、*ibeB* 和 *yijP* 等^[3~6]。其中 *yijP* 基因, 也称 *f577* 或 *ibeC* 基因, 其 ORF 为 1734 bp。利用转座子插入和基因剔除技术发现, *yijP* 基因的 Tn *phoA* 插入突变、剔除 *yijP* 基因的 *E. coli* K1 对 HBMEC 的侵袭能力明显下降。推断的 *yijP* 基因编码产物, 即 *yijP* 蛋白是 *E. coli* K1 的外膜蛋白, 包括膜内的疏水部分和膜外的可溶性部分^[6]。为了解 *yijP* 蛋白参与介导 *E. coli* K1 侵袭 HBMEC 的机制, 本研究表达和纯化了该蛋白质的膜外部分, 并对其功能进行初步分析, 观察到 *yijP* 蛋白能诱导 HBMEC 迟发性凋亡新现象。

1 材料与方

1.1 材料

HBMEC 由美国约翰霍普金斯大学医学院 Kwang

Sik Kim 博士惠赠。M15(pREP 4)细菌株为本研究室保存。Nu-Serum, 美国 BD 公司产品; 1640 培养基, 美国 Invitrogen 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), Hyclone 公司; Ni-NTA 琼脂糖, Qiagen 公司; Hoechst 33258, Sigma 公司; caspase-3、 β 肌动蛋白抗体和 HRP 标记的羊抗兔、兔抗羊二抗均购自北京中山生物技术公司。ECL 试剂盒, Amerham Pharmacia 公司。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建 *yijP* 基因全长 1734 bp, 应用 PCR 方法获取其 C 末端的 1.04 kb 片段(编码 333 个氨基酸), 克隆到 pQE 质粒(Invitrogen 公司)的 *Sall* 和 *HindIII* 位点之间。如此构建的重组质粒 pQE-*yijP* 的表达产物为 N 末端带有 6 个组氨酸的 *yijP* 汇合蛋白, 其分子量为 41 kDa。

1.2.2 (His)₆-*yijP* 汇合蛋白的表达和纯化 将 pQE-*yijP* 重组质粒转化到受体菌 M15(pQE₄)。挑取 M15 (pREP4、pQE-*yijP*) 单菌落接种于 LB 培养基(10 g/L 细菌-胰蛋白胨, 5 g/L 细菌-酵母粉, 10 g/L NaCl),

收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-07-04

国家自然科学基金资助项目(No.30170053, No.30170470, No.30370702)

* 现工作于辽宁省肿瘤医院

** 通讯作者。Tel/Fax: 024-23260246, E-mail: yhcun@mail.cmu.edu.cn

培养过夜后按 1:100 接种于 $2 \times$ YT 培养基(16 g/L 细菌-胰蛋白胨, 10 g/L 细菌-酵母粉, 5 g/L NaCl), 37 °C 培养至菌液的 A_{600} 达到 0.6 ~ 0.7 时, 加 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 37 °C 诱导 5 h 后, 离心收集菌体沉淀。重悬沉淀菌体于裂解缓冲液(0.4 mol/L PMSF, 15 mmol/L β -巯基乙醇, 0.4 mg/ml 溶菌酶, 200 mmol/L Tris)中, 超声破碎 40 s。于 4 °C, 10 000 r/min 离心 20 min, 收集沉淀溶于 6 mol/L 盐酸胍中, 室温 1 h, 至溶解后, 5 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。制备 Ni-NTA 琼脂糖层析柱, 先用去离子水冲洗 3 遍, 然后用 6 mol/L 盐酸胍(pH 8.0)洗 1 次。将上述上清液(蛋白质样品)加入层析柱内, 分别用 pH 8.0 和 pH 6.8 的 8 mol/L 尿素淋洗, 最后用 pH 4.2 的 8 mol/L 尿素洗脱, 收集蛋白质峰, 并测定蛋白质浓度。

1.2.3 蛋白质的再折叠 用 8 mol/L 尿素(pH 8.0)稀释上述提纯的蛋白质至终浓度为 200 μ g/ml。按 1:4 比例加入氧化还原缓冲液(2 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 200 mmol/L Tris), 置 4 °C 过夜。次日, 把蛋白质转移到透析袋中, 在 pH 8.0 的透析液(20 mmol/L Tris, 10% 甘油)中透析, 4 °C 过夜之后, 离心去除蛋白质透析液中的沉淀部分, 收集上清液, 测定蛋白质浓度。蛋白质于 -70 °C 保存, 并保存少许透析后的透析液(透析缓冲液)做蛋白质功能分析对照之用。

1.2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 按《分子克隆实验手册》中的方法对诱导、纯化及再折叠的蛋白质进行检测。

1.2.5 yijP 蛋白对 HBMEC 的诱导凋亡作用 (1) 相差显微镜下观察细胞的形态变化 按我们以前报道的方法^[4,5]培养 HBMEC, 至细胞 80% 汇合后, 分别设透析液对照组(透析缓冲液)和 yijP 实验组, 加入一定量的折叠后的 yijP 汇合蛋白(对照组中加入等体积的透析缓冲液)之后, 继续培养 HBMEC, 并观察细胞形态变化。

(2) 荧光显微镜观察细胞核的形态变化 HBMEC 培养在盖玻片上, 至细胞 80% 融合后, 加入一定量的 yijP 蛋白(对照组为透析缓冲液), 继续培养 16 h 和 28 h, 以 $1 \times$ PBS 洗 2 次, 3.7% 甲醛固定 10 min, Hoechst 33258 染色 20 min, ddH₂O 洗 3 次后, 95% 甘油封片, 荧光显微镜下观察。

(3) DNA 的提取和琼脂糖凝胶电泳分析 收集经 yijP 蛋白(对照组为透析缓冲液)作用后的细胞, TES (5 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 20 mmol/L EDTA,

10% SDS)室温裂解 30 min, 加入蛋白酶 K(500 μ g/ml), 置 50 °C 作用 3 h, 以等体积酚、氯仿(1:1)抽提两次, 再以等体积氯仿抽提一次, 无水乙醇沉淀 DNA, 加入适量 TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)溶解 DNA。

(4) 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集经 yijP 蛋白(对照组为透析缓冲液)作用后的细胞(5×10^5 个), 用冷的 $1 \times$ PBS 洗 2 次, 加入预冷的 70% 无水乙醇固定, 离心后细胞悬浮于 1 ml $1 \times$ PBS 中, 加入 100 μ l 1% RNA 酶、碘化丙啶(propidium iodide, 终浓度为 25 μ g/ml)后, 低温 30 min, 流式细胞仪分析结果。

(5) Western 印迹检测 caspase-3 活性片段 收集经 yijP 蛋白(对照组为透析缓冲液)作用后的细胞, 以 RIPA 缓冲液($1 \times$ PBS; 1% NP40; 0.1% SDS; 0.1 mmol/L PMSF)于冰上裂解 30 min, 常规方法制备蛋白质电泳样品, 经 14% SDS-PAGE 后, 半干转印到 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 以 caspase-3 兔多克隆抗体为一抗、HRP-标记羊抗兔 IgG 为二抗; 检测 caspase-3 酶原前体和活性片段; 同时以 β 肌动蛋白作内对照。

2 结果

2.1 (His)₆-yijP 汇合蛋白的提纯

SDS-PAGE 分析显示: 在诱导后 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 可见一条逐渐增粗的蛋白质条带, 分子量约为 41 kDa(图 1A); 变性和再折叠后(复性后)的蛋白质条带与细胞裂解物中蛋白质条带位置一致(图 1B), 这与预期的(His)₆-yijP 汇合蛋白的分子量相符。变性法提取的(His)₆-yijP 汇合蛋白经再折叠后, 其浓度为 40 μ g/ml。

2.2 yijP 蛋白对 HBMEC 的诱导凋亡作用

2.2.1 yijP 蛋白诱发 HBMEC 细胞凋亡的形态学观察

为分析 yijP 蛋白的功能, 我们把(His)₆-yijP 蛋白加入到 HBMEC 的细胞培养液中, 在相差显微镜下观察细胞形态变化。结果发现: 大多数 HBMEC 细胞在温育 8 h 内没有明显的形态变化, 仍保持正常的多角形和短梭形。16 h 后 HBMEC 细胞逐渐呈现为皱缩, 胞膜呈泡状膨出(membrane blebbing), 并有圆形小体生成, 提示细胞有凋亡发生。随着时间的延长, 发生凋亡改变的细胞数量也逐渐增多。28 h 后细胞凋亡改变明显, 以后细胞逐渐脱落死亡(图 2A)。当加大 yijP 蛋白的浓度时发现细胞的凋亡改变

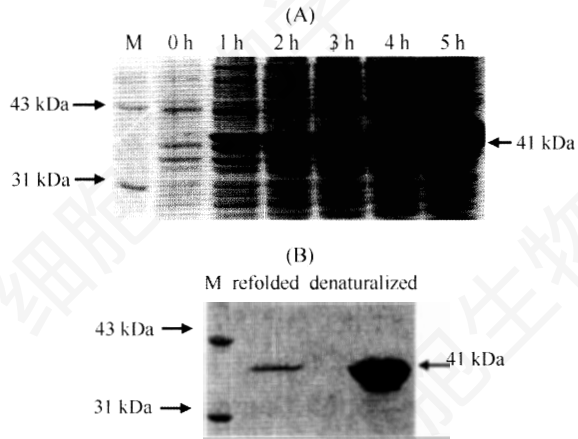


Fig.1 SDS-PAGE analysis of the confluence protein (His)₆-yijP

A: The confluence protein (His)₆-yijP expressing in *E.coli* cells(M: Protein molecular weight marker; 0 h-5 h: The total bacteria proteins induced for 0 h,1 h,2 h,3 h,4 h,5 h respectively. The arrow shows the confluence protein); B: The confluence protein (His)₆-yijP after denaturalized and refolded (M: Protein molecular weight marker; refolder: Refolded confluence protein; denaturalized: Denaturalized confluence protein. The arrow shows the confluence protein).

有浓度依赖性。而对照组 HBMEC 细胞(细胞与透析缓冲液共同温育相同的时间)仍保持多角形和短梭形,表明透析液对 HBMEC 细胞没有毒性作用。

为进一步确定 yijP 蛋白对 HBMEC 细胞的凋亡作用,我们用 Hoechst 33258 荧光染料对 HBMEC 细胞进行荧光染色。正常活细胞对染料拒染,而凋亡细胞有膜通透性的改变,可以摄取 Hoechst 染料,并与 DNA 结合在紫外光下呈蓝色荧光^[71]。在荧光显微镜下,与透析缓冲液共同温育的 HBMEC 细胞胞核呈均匀弥散状荧光;而与 yijP 共同温育的 HBMEC 细胞的胞核出现致密团块状或浓染颗粒状荧光,从而进一步提示有细胞凋亡发生(图 2B)。

2.2.2 yijP 蛋白诱发 HBMEC 细胞 DNA 降解 细胞发生凋亡时,核酸内切酶活化将 DNA 特异地切断于核小体间的连接区,形成的 DNA 片断长度总是核小体亚单位(180~200 bp)的整数倍。在琼脂糖凝胶电泳上形成特征性的阶梯状条带(DNA ladder)^[71]。yijP 蛋白与 HBMEC 细胞共同温育 16 h、28 h 后,在琼脂糖凝胶电泳上可见 DNA 特征性阶梯形条带,而对照组(透析缓冲液与 HBMEC 细胞共同温育)未观察到阶梯状条带(图 3)。

2.2.3 流式细胞仪检测亚二倍体峰 流式细胞仪(flow cytometer, FCM)对凋亡细胞进行分析和检测是目前应用较多的一类方法。FCM 检测可呈现亚二

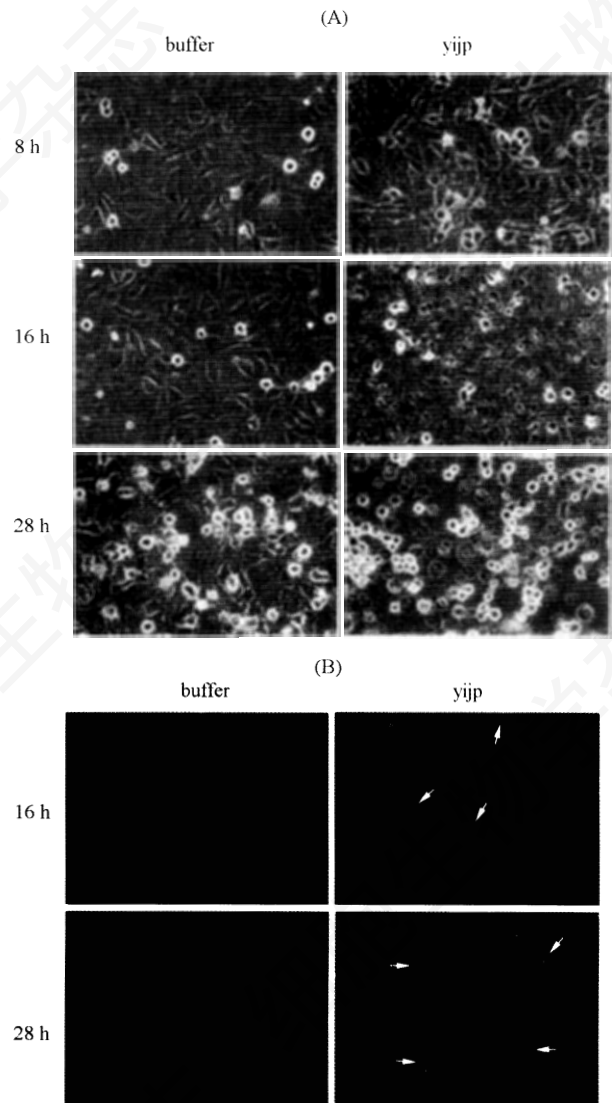


Fig.2 The morphological changes of the HBMEC induced by protein yijP

A: HBMEC was visualized under phase contrast microscopy (200 ×); B: HBMEC was visualized under fluorescent microscopy (400 ×), the arrows point to the nuclear condensation and fragmentation; buffer: HBMEC was incubated with dialysis buffer; yijP: HBMEC was incubated with protein yijP.

倍体核型峰的特征。在 DNA 直方图上,凋亡细胞出现二倍体峰(G₁ 细胞)的减少, G₁ 峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰型^[71]。HBMEC 细胞与 yijP 蛋白共同温育 16 h 和 28 h 后,在 G₁ 峰前出现一个凋亡峰。而与透析缓冲液共同温育的 HBMEC 细胞未检测出凋亡峰(图 4)。

2.2.4 Western 印迹检测 caspase-3 蛋白酶的级联反应是细胞凋亡的另一特征。其中,属半胱氨酸家族的 caspases 蛋白酶是调节细胞凋亡的中枢,启

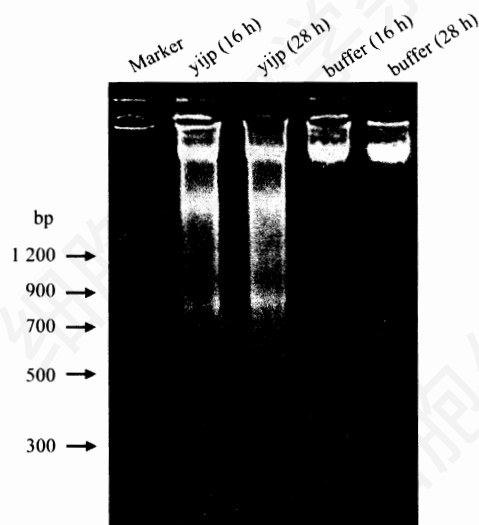


Fig.3 DNA ladder analysis in agarose gel electrophoresis
buffer: HBMEC was incubated with dialysis buffer; yijP: HBMEC was incubated with protein yijP (DNA ladder was visualized after 12 h and 28 h).

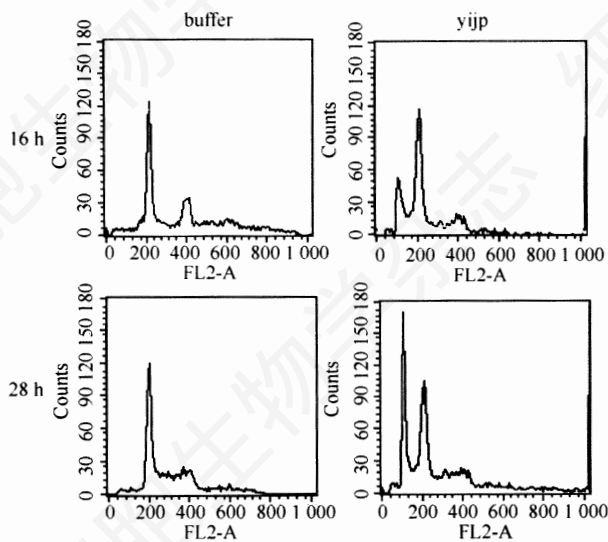


Fig.4 Detection of the apoptosis peak by FCM
buffer: HBMEC was incubated with dialysis buffer; yijP: HBMEC was incubated with protein yijP (apoptotic peak was visualized after 16 h and 28 h).

动一系列蛋白质级联切割反应。Caspase-3 在细胞凋亡过程中起着非常关键的作用。Caspase-3 正常情况下以无活性、分子量为 32 kDa 的前 caspase-3 的酶原(pro-caspase-3)形式存在, 当细胞发生凋亡时变为有活性的 caspase-3。激活过程是一个产生 P20/P10 等二聚体的蛋白质水解事件。活化的 caspase-3 进一步又切割不同的底物, 导致蛋白酶级联切割放大, 最终使细胞走向凋亡^[7]。为进一步证实 yijP 蛋

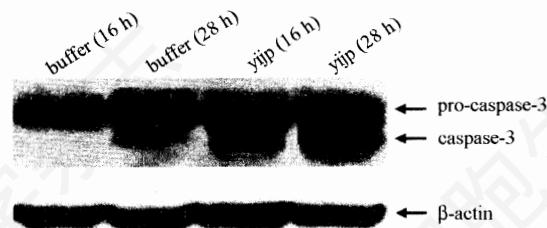


Fig.5 Detection of the activated cleavage of caspase-3 by Western blotting

buffer: HBMEC was incubated with dialysis buffer; yijP: HBMEC was incubated with protein yijP (the activity cleavage of caspase-3 was visualized after 16 h and 28 h).

白可诱导 HBMEC 细胞发生凋亡, 我们利用 Western 印迹检测 caspase-3 的活性片段。结果发现细胞与 yijP 蛋白共同温育 16 h 后可检测到 caspase-3 的活性片段, 28 h 后活性片段明显增加, 同时相应地 caspase-3 的酶原含量随着时间的延长逐渐下降(图 5)。而对照透析缓冲液组未检测到 caspase-3 的活性片段。

3 讨论

病原菌侵袭到宿主细胞之内是其与宿主细胞相互作用的结果, 其中细菌的“致病因子”起重要作用, 它们发出促使宿主细胞的结构和功能改变的信号, 以利于侵袭的完成; 另一方面, 宿主细胞在“协同”细菌侵袭的同时(如细胞骨架再重组), 也启动其细胞内的溶酶体等防御系统以“杀死”细菌, 或通过宿主细胞本身的凋亡而起到防御目的^[8]。目前, 除致病菌侵袭吞噬性宿主细胞(巨嗜细胞)所引起的凋亡现象之外, 关于致病菌侵袭到非吞噬性宿主细胞之后而引起的细胞凋亡现象也有不少文献报道, 如某些肠道致病菌侵袭肠上皮细胞^[9]、链球菌侵袭 HEp-2 上皮细胞^[10]均可引起上皮细胞凋亡。迄今已鉴定出一些诱发非吞噬性宿主细胞凋亡的病原菌“致病因子”^[11-13]。本实验发现, 体外重组的新生儿脑膜炎大肠杆菌 K1 株的 yijP 蛋白作用于 HBMEC 之后, HBMEC 显示出胞膜呈泡状膨出、细胞核出现致密团块(或浓染颗粒)、DNA 降解为阶梯状区带(DNA ladder)、以及 caspase-3(pro-CPP32)水解为 P20/P10 等二聚体等典型细胞凋亡特征。

现有研究表明, 诱发宿主细胞凋亡的“细菌致病因子”均为细菌分泌性蛋白或外膜蛋白。生物信息学分析结果显示, yijP 侵袭基因编码产物也为 *E.coli* 外膜蛋白^[6], 这提示在 *E.coli* K1 侵袭 HBMEC

过程中, *yijP* 蛋白有机会直接与 HBMEC 细胞中的某蛋白质发生作用, 像沙门氏菌侵袭蛋白 SipB 通过与 caspase-1 结合^[14]那样而诱导感染细胞凋亡。因此, 从 HBMEC 中寻找 *yijP* 的靶蛋白及其诱发细胞凋亡的信号转导通路将是进一步需要开展的工作。

有意义的是, 本研究中观察到的凋亡现象仅出现在 *yijP* 蛋白作用于 HBMEC 的 16 h 之后, 至 28 h 凋亡现象才明显出现, 相对于体外 *E. coli* 侵袭 HBMEC 的分析实验时间(2 h)^[3-6], *yijP* 蛋白作用于 HBMEC 之后所呈现出的凋亡是迟发性的。这种迟发性凋亡现象与已报道的致病菌侵袭肠上皮细胞过程中所引起的肠上皮细胞凋亡^[9]极为相似。我们考虑, *E. coli yijP* 侵袭蛋白诱发 HBMEC 出现迟发性凋亡的意义可能在于: 使经 *E. coli* 侵袭后的 HBMEC 细胞脱离基底膜或破坏细胞间紧密连接, 从而使血液中后续的细菌顺利越过 HBMEC 细胞屏障, 进而引起新生儿脑膜炎。

以上研究提示: 在 *E. coli* K1 侵袭 HBMEC 过程中, *yijP* 基因的功能之一可能是诱发 HBMEC 凋亡。本实验结果为进一步研究 *E. coli* K1 如何穿过血脑屏障而进入中枢神经系统积累了新资料。

参考文献 (References)

- [1] Kim KS. *Nat Rev Neurosci*, 2003, **4**: 376
- [2] Huang SH *et al.* *Cell Microbiol*, 2001, **3**: 277
- [3] Prasadarao NV *et al.* *Infect Immun*, 1996, **64**: 146
- [4] Huang SH *et al.* *Infect Immun*, 1999, **67**: 2103
- [5] Huang SH *et al.* *J Infect Dis*, 2001, **183**: 1071
- [6] Wang Y *et al.* *Infect Immun*, 1999, **67**: 4751
- [7] 彭黎明等. *细胞凋亡的基础与临床*. 北京: 人民卫生出版社, 2000, 20, 165
- [8] Cossart P *et al.* *Science*, 2004, **304**: 242
- [9] Kim JM *et al.* *J Clin Invest*, 1998, **102**: 1815
- [10] Nakagawa I *et al.* *Cell Microbiol*, 2001, **3**: 395
- [11] Chen M *et al.* *Am J Nephrol*, 2003, **23**: 140
- [12] Schuller S *et al.* *Cell Microbiol*, 2004, **6**: 289
- [13] Le'Negrate G *et al.* *Infect Immun*, 2001, **69**: 5001
- [14] Hersh D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 2396

Escherichia coli Invasion Protein *yijP* Induces Apoptosis of Human Brain Microvascular Endothelial Cells

Chun Wang*, Wen-Gang Fang, Yu-Hua Chen**

(Department of Development Biology, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract In order to further characterize the role of invasion locus *yijP* in the pathogenesis of *E. coli* meningitis, the *yijP* gene (about 1.04 kb) was subcloned into pQE30, and expressed in *E. coli* M15(pREP4) as His-tagged confluence protein induced by IPTG. The successfully harvested confluence protein by Ni-NTA agarose affinity chromatography was refolded by dialysis. Phase contrast microscopy was used to observed the morphological changes of human brain microvascular endothelial cells (HBMEC), and Hoechst 33258 staining, DNA agarose gel electrophoresis, FACScan flow cytometer and Western blotting were employed to investigate the type of the cell death. The results showed that the confluence protein *yijP* was toxic to HBMEC. Besides the cell shrinkage and nuclear condensation, DNA fragmentation, a sub-diploid peak and activity cleavage of caspase-3 were detected, which were the characteristics of the cell apoptosis. All these phenomena occurred after 16-hour incubation with the *yijP*. Our results indicated that *yijP* protein may act as a kind of toxin to induce delayed apoptosis of HBMEC.

Key words *Escherichia coli*; *yijP* gene; human brain microvascular endothelial cells; brain-blood barrier; apoptosis

Received: April 4, 2005 Accepted: July 4, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170053, No.30170470, No.30370702)

* Present address: Liaoning Cancer Hospital, Shenyang 110042, China

**Corresponding author. Tel/Fax: 86-24-23260246, E-mail: yhchen@mail.cmu.edu.cn