

创伤弧菌溶细胞素融合蛋白重组、表达与 细胞毒活性鉴定

桂 静 肖美英 楼永良* 胡 蝶 严 杰¹ 朱晔晶

(温州医学院微生物研究所, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035;

¹浙江大学医学院病原生物学教研室, 杭州 310031)

摘要 研究重组创伤弧菌溶细胞素融合蛋白(rVvhA)诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, human ECV304)凋亡的作用。诱导含 pET-28a(+)*vvhA* 重组质粒的 BL21 大肠杆菌表达创伤弧菌溶细胞素融合蛋白, 应用 Ni²⁺ 亲和层析方法对 rVvhA 进行纯化; 利用分步稀释加透析相结合的方法进行蛋白质复性; 绵羊红细胞裂解试验对复性后的 rVvhA 进行溶血活性初步测定; MTT 法检测 rVvhA 对人 ECV304 细胞的体外毒性作用; 应用 Hoechst33342/PI 活细胞荧光双染及流式细胞术分析 rVvhA 对人 ECV304 细胞诱导凋亡的影响。结果显示, 用 Ni²⁺-NTA His Band 亲和层析柱纯化 rVvhA 纯度达 88.6% 左右; 复性后的 rVvhA 有一定的溶血活性, 其溶血活性具有时间-剂量依赖性; MTT 结果显示 rVvhA 具有降低人 ECV304 细胞的存活率活性; 浓度为 2.0 HU/ml rVvhA 作用人 ECV304 12 h 后, 其诱导凋亡的活性高于对照组和浓度为 0.5 HU/ml rVvhA 处理组, 具有剂量依赖性; 浓度为 2.0 HU/ml rVvhA 处理组加用 40 μmol/L caspase 全酶抑制剂(Z-VAD-FMK)后凋亡率较 2.0 HU/ml rVvhA 处理组有一定程度降低。rVvhA 对人 ECV304 细胞具有诱导凋亡的生物学活性, 推测诱导凋亡途径可能与 caspase 家族有关。

关键词 创伤弧菌; 溶细胞素; rVvhA; 人 ECV304 细胞; 细胞凋亡; caspase

创伤弧菌是一种具有荚膜的革兰氏阴性嗜盐弧菌, 存在于海洋环境中, 尤其是海湾附近的港口。临床病例分析和流行病学调查资料显示该菌主要引起原发性败血症及严重的伤口感染^[1]。此菌引起的感染病程发展非常迅速, 发病后死亡率高达 50% 以上, 被认为是一种少见而又致命的感染性疾病; 由于此菌感染后病情凶险, 其确切的致病机制研究逐渐引起国内外学者的关注^[2]。国内浙江沿海地区曾有过此菌感染的相关报道^[3]。研究发现, 与创伤弧菌致病性相关的毒力因素包括溶细胞素、金属蛋白酶、荚膜多糖、脂多糖、磷脂酶等^[4]。创伤弧菌溶细胞素(*Vibrio vulnificus* cytolyisin, VVC)是由创伤弧菌结构基因 *vvhA* (*V.vulnificus* structural gene for cytolyisin) 编码的一种相对分子质量为 50 851 Da 的细胞外蛋白质, 是一种能使细胞膜形成孔道的细胞毒素和溶血毒素, 是创伤弧菌向胞外释放的唯一外毒素, 毒力强, 具有种特异性, 极低剂量即可表现出极强的生物学活性, 被认为是创伤弧菌释放的主要毒素之一^[5]。由于 *vvhA* 突变菌株对实验小鼠的半数致死剂量(median lethal dose, LD₅₀)与未突变的野生株致死性相差不大^[6,7],

故 VVC 在创伤弧菌致病力中的作用仍有争议, 其确切的致病机制尚未完全阐明。

研究证实, 从临床和环境分离到的创伤弧菌的 *vvhA* 基因序列比较保守^[8], 故我们在前期工作中成功构建了重组表达载体 pET-28a(+)*vvhA* 质粒^[9]; 本实验以人 ECV304 细胞为模型, 观察重组创伤弧菌溶细胞素融合蛋白(rVvhA)对人类内皮细胞凋亡的影响, 以探讨其所致的细胞损伤相关机制, 为进一步探索 VVC 的致病机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、菌种和质粒 人脐静脉内皮细胞株(lines of human umbilical vein endothelial cell, human ECV304)由中国医学科学院惠赠; *E.coli* BL21(DE3) (含 pET-28a(+)*vvhA* 质粒)菌株由本实验室构建及保存。

收稿日期: 2007-10-19 接受日期: 2007-11-30

浙江省自然科学基金项目(No.X205004)

* 通讯作者。Tel: 0577-86699200, E-mail: lyl@wzmc.net

1.1.2 主要试剂及耗材 Ni²⁺-NTA His Band 亲和层析柱购自上海申能博彩生物科技有限公司; 异丙基硫代β-D-半乳糖苷(IPTG)购自宝生物工程(大连)有限公司; 还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSH)、二硫苏糖醇(DTT)、盐酸胍及精氨酸均为 BBI 公司产品; RPMI1640 培养基为美国 Gibco 公司产品; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 细胞培养板和培养瓶购自 Corning 公司; Hoechst33342/PI 细胞凋亡与坏死检测试剂盒、caspase 全酶抑制剂(Z-VAD-FMK)及 MTT 细胞毒性与增殖检测试剂盒均购自碧云天生物技术研究; 膜联蛋白(annexin) V-488/PI 凋亡检测试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 rVvhA 的表达、纯化及复性 按照文献进行^[9,10], 扩增含 pET-28a(+)-vvhA 的 BL21 大肠杆菌, 经诱导、破菌后分离变性包涵体, 表达产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定, 利用 Bandscan V5.0 软件分析融合蛋白表达量。将大量诱导菌体获得的包涵体沉淀反复洗涤后, 用 Ni²⁺-NTA His Bind 亲和层析柱纯化, 各洗脱样品用 SDS-PAGE 分析纯化效果。用变性液调整纯化后的 rVvhA 浓度至 500 mg/ml, 用复性液(50 mmol/L Tris-HCl、0.3 mol/L NaCl、0.01 mol/L KCl、2.2 mmol/L MgCl₂、2.2 mmol/L CaCl₂、0.4 mol/L 蔗糖、0.5 mol/L 精氨酸、30 mmol/L DTT、GSH : GSSH=5 : 1, pH 8.5)逐滴加入并搅拌稀释 rVvhA, 使蛋白质的终浓度约为 100 mg/L, 4 °C, 磁力搅拌器温和搅拌 48 h, 然后将复性样品转移至截留分子量为 14 kDa 的透析袋中用透析液(20 mmol/L Tris-HCl、0.5 mol/L NaCl, pH 8.0)透析 48 h, 期间多次更换透析液, 20 000 r/min 离心取上清液, 超滤浓缩至适当体积, 用 PBS 进行缓冲液转换, Bradford 法进行蛋白质定量后, 于 -70 °C 冷冻干燥成粉末保存。

1.2.2 溶血活性测定 按照文献进行^[11], rVvhA 干粉用 1 ml 0.1% PBS-BSA (pH 7.2) 缓冲液溶解, Bradford 法进行蛋白质定量后将 rVvhA 稀释至所需蛋白质浓度, 分别为 0.5 HU/ml、1.0 HU/ml、2.0 HU/ml、3.0 HU/ml; 于不同浓度组中依次各加入 1 ml 0.7% 的绵羊红细胞悬液, 1 : 1 混合, 37 °C 温育 30 min, 2 500 r/min 离心除去未裂解红细胞, 取上清液, 测波长 545 nm 光吸收值。1 HU(溶血单位)即使红细胞悬液中的血红蛋白释放一半时所需的作用蛋白质的量。前期实验测定 rVvhA 的溶血活性约为 0.2 mg/HU^[9]。

1.2.3 人 ECV304 细胞株培养及传代 人 ECV304

细胞培养于含 10% 胎牛血清, 100 μg/ml 链霉素, 100 U/ml 青霉素的 RPMI-1640 培养液中, 置 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。当培养的细胞生长铺满瓶底时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 每 2~3 天更换新鲜培养液。

1.2.4 MTT 法测定细胞生长抑制率 收集对数生长期的人 ECV304 细胞, 接种于 96 孔板(2×10⁴ 个/孔), 4 h 细胞完全贴壁后加入 rVvhA, 使其终浓度分别为 0.5 HU/ml、1.0 HU/ml、1.5 HU/ml、2.0 HU/ml、2.5 HU/ml、3.0 HU/ml、3.5 HU/ml、4.0 HU/ml, 设加培养液的阴性对照组, 置培养箱中培养 24 h。按 MTT 检测试剂盒操作说明进行。用酶标仪测定 570 nm 处各组细胞(6 个孔)的 A 值, 以此表示细胞的相对活力。

1.2.5 Hoechst33342/PI 荧光双染进行细胞凋亡形态学观察 人 ECV304 细胞按 1×10⁵ 个/孔接种 35 mm 小培养皿, 长满瓶底 70% 后改用无血清培养液温育, 并进行实验分组, 分别为加培养液的对照组、0.5 HU/ml rVvhA 处理组、2.0 HU/ml rVvhA 处理组、2.0 HU/ml rVvhA+40 μmol/L Z-VAD-FMK 组(Z-VAD-FMK 的使用按其操作说明进行实验处理)。作用 12 h 后, 按 Hoechst33342/PI 荧光染色试剂盒的操作说明进行活细胞染色, 使用激光共聚焦显微镜观察细胞凋亡的形态(200×)。正常细胞核 Hoechst33342 染色为淡蓝色荧光, PI 不染色; 凋亡细胞核 Hoechst33342 染色为强亮蓝色荧光, PI 不染色; 死亡细胞核 Hoechst33342 染色为强亮蓝色荧光, PI 染色呈红色荧光。

1.2.6 流式细胞术定量检测细胞凋亡 人 ECV304 细胞按 5×10⁵ 个/孔接种 6 孔板, 长满瓶底 90% 后改用无血清培养液温育, 并进行实验分组, 按细胞凋亡形态学观察处理分组。作用 12 h 后, 分别收集不同处理组细胞, 按膜联蛋白 V-488/PI 凋亡检测试剂盒操作说明进行处理。1 h 内用流式细胞仪检测各组凋亡细胞率。

1.2.7 统计学处理 以上实验至少重复 3 次, 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。所有变量均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析(ANOVA), 各实验组与阴性对照组间比较采用 *t* 检验, 以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 rVvhA 的表达、包涵体的提取及纯化

表达的融合蛋白约为 54 kDa, 电泳结果与该融合

蛋白的理论推算值基本相符, 见图 1。利用 BandsScan V5.0 软件分析, 以包涵体的形式表达的重组蛋白质占菌体总蛋白质的 60% 左右, 经反复洗涤后, 初步纯化的包涵体纯度可达到 78% 左右。变性的包涵体经 Ni^{2+} -NTA His Bind 层析柱纯化后, 获得高纯度的目的蛋白质(图 2), 用 BandsScan V5.0 软件分析, 经 NTA-500 和 NTA-1000 洗脱后的纯化蛋白质纯度分别达到 85.4% 和 88.6%。

2.2 复性重组蛋白质溶血活性检测

复性重组蛋白质溶血活性检测结果见图 3。0.5 HU/ml rVvhA 作用组与 PBS 阴性对照组差异无统计学意义($P>0.05$); 而 1.0 HU/ml、2.0 HU/ml、3.0 HU/ml rVvhA 作用组与 PBS 阴性对照组差异有统计学意义($P<0.01$), rVvhA 具有溶血活性, 且呈时间-剂量依赖性。

2.3 MTT 结果

不同浓度活性 rVvhA 与人 ECV304 细胞作用 24 h 后其细胞毒性作用均有差别, 其中 1.5 HU/ml rVvhA 作用组其细胞活性百分率仍大于 50%, 其半数抑制浓度(IC_{50})小于 2.0 HU/ml。0.5 HU/ml rVvhA 作用组其细胞存活率与对照组相比, 差异无统计学意义($P>0.05$), 而 1.0~4.0 HU/ml rVvhA 作用组其细胞存活率与对照组相比, 差异均有统计学意义($P<0.05$), 不同浓度 rVvhA 对人 ECV304 细胞的增殖抑制作用随浓度的增加而逐渐增强(图 4)。

2.4 细胞凋亡形态学观察结果

Hoechst33342/PI 活细胞荧光双染结果见图 5。对照组细胞核均匀, Hoechst33342 染色呈弥散均匀淡染荧光, PI 不染色; 0.5 HU/ml rVvhA 作用组经 Hoechst33342 染色后可见大部分为正常细胞核, 仅少量细胞核出现核固缩, 染色呈亮蓝色荧光增强等凋亡细胞核形态学改变, 其中 PI 染色细胞数极少; 2.0 HU/ml rVvhA 作用组凋亡细胞比例较 0.5 HU/ml rVvhA 作用组明显增加, 核为强亮蓝色荧光染色, 核边缘呈明显波纹状或折缝状改变, 可见到染色质聚集、边缘化等凋亡早期典型形态学改变, PI 不染色; 2.0 HU/ml rVvhA+40 $\mu\text{mol/L}$ Z-VAD-FMK 作用组凋亡细胞比例较 2.0 HU/ml rVvhA 作用组有所下降, 细胞凋亡影响与 0.5 HU/ml rVvhA 作用组相当。rVvhA 对人 ECV304 的凋亡诱导作用具有浓度依赖性, caspase 全酶抑制剂对 rVvhA 的细胞毒活性具有一定的抑制作用。

2.5 流式细胞术检测凋亡

流式细胞仪结合膜联蛋白 V-488/PI 标记法检测

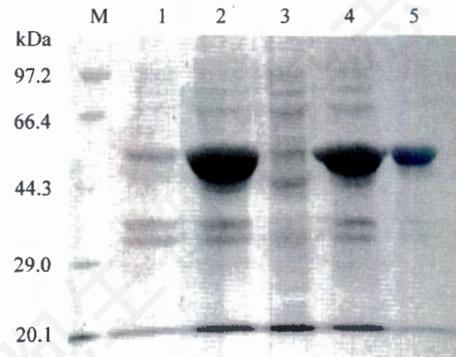


图 1 rVvhA 表达的 SDS-PAGE 分析

M: 蛋白质分子量标准; 1: 未经 IPTG 诱导的重组质粒转化的 BL21 总蛋白; 2: 0.5 mmol/L IPTG 诱导的重组质粒转化的 BL21 总蛋白; 3 和 4: 0.5 mmol/L IPTG 诱导碎菌后上清液蛋白与沉淀蛋白; 5: 洗涤后的表达蛋白。

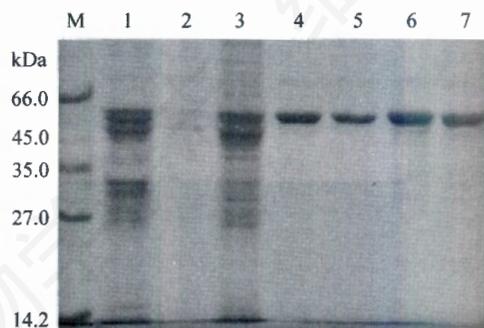


图 2 rVvhA 经 Ni^{2+} -NTA 亲和层析纯化 SDS-PAGE 分析

M: 蛋白质分子量标准; 1: 样品穿透液; 2: GuNTA-0 洗脱蛋白; 3~7: 20 mmol/L、60 mmol/L、100 mmol/L、500 mmol/L、1 000 mmol/L 咪唑洗脱蛋白。

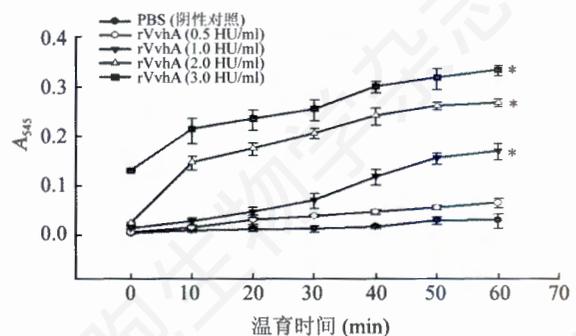


图 3 rVvhA 的溶血活性分析(与对照组比, $*P<0.01$)

发现, 0.5 HU/ml rVvhA 作用人 ECV304 细胞 12 h 后与未处理的对照组相比, 细胞凋亡率分别为($11.29 \pm 6.9\%$)和($3.63 \pm 1.7\%$), 0.5 HU/ml rVvhA 作用组凋亡率高于对照组, 但差异无统计学意义($P>0.05$); 2.0 HU/ml rVvhA 作用 12 h 后凋亡率为($25.57 \pm 5.6\%$), 明显高于对照组($3.63 \pm 1.7\%$), 差异有统计学意义($P<0.01$),

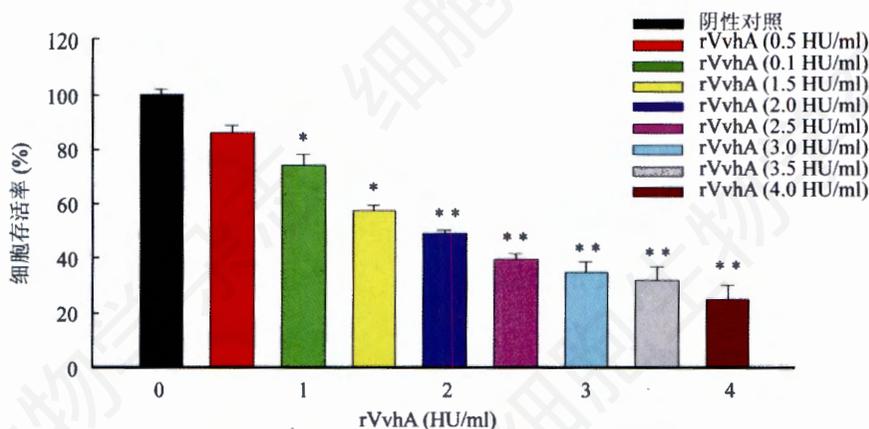


图4 rVvhA 对人 ECV304 细胞活性的影响(与对照组比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

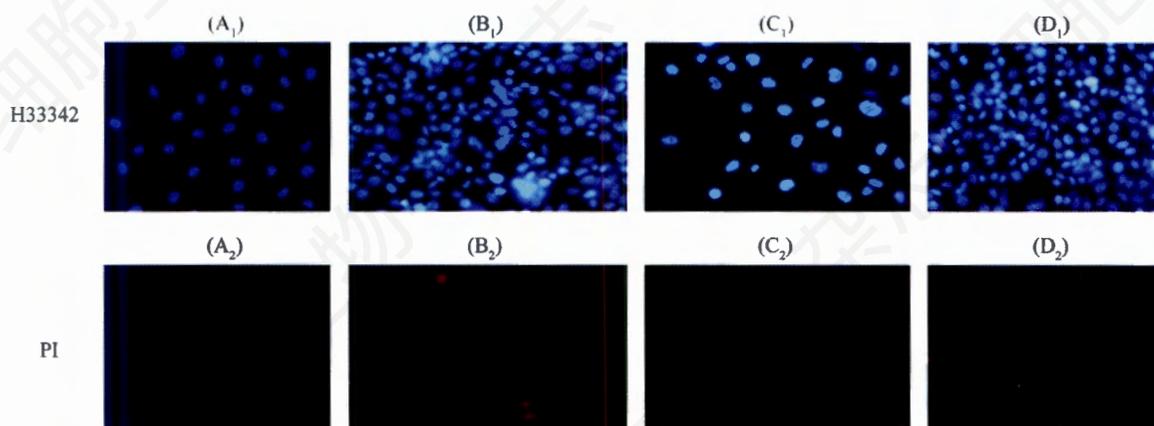


图5 不同浓度 rVvhA 处理组诱导的人 ECV304 细胞凋亡核形态学比较(Hoechst33342/PI 活细胞荧光染色)

A: 对照组细胞核, 其中 A₁ 为 H33342 染色的细胞核(200×); A₂ 为 PI 染色的细胞核(200×)。B: 0.5 HU/ml rVvhA 处理组细胞核, 其中 B₁ 为 H33342 染色的细胞核(200×); B₂ 为 PI 染色的细胞核(200×)。C: 2.0 HU/ml rVvhA 处理组细胞核, 其中 C₁ 为 H33342 染色的细胞核(200×); C₂ 为 PI 染色的细胞核(200×)。D: 2.0 HU/ml rVvhA+40 μmol/L Z-VAD-FMK 处理组细胞核, 其中 D₁ 为 H33342 染色的细胞核(200×); D₂ 为 PI 染色的细胞核(200×)。

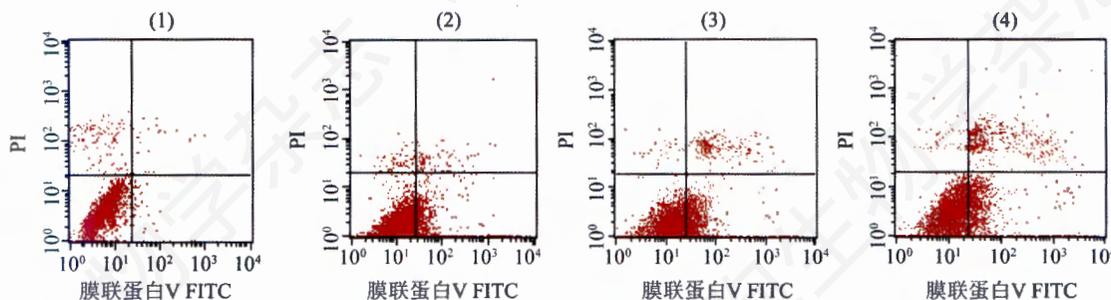


图6 不同浓度 rVvhA 处理组与对照组细胞膜联蛋白 V-488 和 PI 双染后流式凋亡分析图

1: 对照组; 2: 0.5 HU/ml rVvhA 作用组; 3: 2.0 HU/ml rVvhA 作用组; 4: 2.0 HU/ml rVvhA+40 μmol/L Z-VAD-FMK 作用组。

表1 不同浓度 rVvhA 处理组对人 ECV304 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞比例(%)	对照组	rVvhA		
		0.5 HU/ml 组	2.0 HU/ml 组	2.0 HU/ml+40 μmol/LZ-VAD-FMK 组
凋亡细胞	3.63±1.7	11.29±6.9	25.57±5.6**	13.5±3.9*
死细胞	1.35±0.8	1.41±0.8	5.05±3.1	3.81±4.5
活细胞	84.6±3.7	73.21±2.4	45.45±5.6	68.61±5.3

与对照组比, ** $P<0.01$; 与 2.0 HU/ml rVvhA 作用组比, * $P<0.05$ 。

具有明显的剂量依赖性; 2.0 HU/ml rVvhA+40 μ mol/L Z-VAD-FMK 作用组凋亡率为(13.5 \pm 3.9)%, 明显低于 2.0 HU/ml rVvhA作用组, 差异有统计学意义($P<0.05$) (表 1, 图 6)。

3 讨论

血管内皮细胞直接和血液接触, 容易受到血液中病理生理变化的影响, 多种因素的综合作用会导致内皮功能障碍, 出现凋亡或坏死改变, 进而引起一系列继发机体生理生化功能改变, 出现各种临床病症^[12]。VVC 在体内试验及体外试验中对血管内皮细胞均显示出很强的生物学作用, 血管内皮细胞被认为是其作用的主要靶细胞之一^[13]。Kwon 等^[14]研究证实 VVC 在 0.4 HU/ml 时即可诱导人 ECV304 细胞产生大量的超氧阴离子, 导致细胞色素 *c* 释放和 caspase-3 的激活及 DNA 裂解, 致使细胞凋亡; 浓度在 2.0 HU/ml 时会引起人 ECV304 细胞大量死亡。本实验证实以基因工程方式克隆表达复性出的 rVvhA 不仅具有特征性的溶血活性, 还可抑制人 ECV304 细胞生长, 24 h 的中效浓度(effective concentration for 50% inhibition, EC₅₀)为 2.0 HU/ml, 低于此浓度时生长抑制不明显, 而高于该浓度时, 细胞生长受到显著抑制。因此, 我们选用此浓度诱导人 ECV304 细胞凋亡。在本实验中, 经 2.0 HU/ml rVvhA 处理人 ECV304 细胞 12 h 后, 运用 Hoechst33342/PI 活细胞荧光双染可观察到的细胞凋亡的核形态学改变(核固缩、染色质聚集、边缘化等), 流式细胞仪检测其诱导的细胞凋亡率为(25.57 \pm 5.6)%, 说明该浓度是比较合适的 rVvhA 诱导人 ECV304 细胞凋亡的浓度。Caspase 全酶抑制剂可

一定程度降低 2.0 HU/ml rVvhA 诱导的细胞凋亡率, 为(13.5 \pm 3.9)%, 推测 caspase 家族可能在 rVvhA 诱导的细胞凋亡中发挥作用, 但不排除 rVvhA 诱导的细胞损伤还涉及其他信号转导通路的可能。亦有研究证实不依赖 caspase 的细胞凋亡损伤模式存在^[15]。因此, 其具体的细胞毒性机制仍有待进一步研究。

Gray 等^[16]证实天然的 VVC 其溶血活性单位 1 HU 为 0.01 mg, 我们前期结果证实 rVvhA 溶血活性单位 1 HU 约为 0.2 mg^[9], 溶血活性明显降低, 考虑此蛋白质为融合蛋白, 其空间结构与天然蛋白仍有较大的差异, 稳定性较差, 导致其生物学活性一定程度降低。此次实验证实 rVvhA 替代天然的 VVC 用于 VVC 致病机制研究的具有一定的可行性, 为进一步阐明 VVC 的动物致死活性与其细胞毒性机制之间的关系提供了一些相关的实验与理论依据。

参考文献(References)

- [1] Strom MS *et al. Microbes Infect*, 2000, 2: 177
- [2] Chiang SR *et al. J Microbiol Immunol Infect*, 2003, 36: 81
- [3] 卢中秋等. *中国急救医学*, 2003, 23: 470
- [4] Gulig PA *et al. J Microbiol*, 2005, 43: 118
- [5] Lee SE *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324: 86
- [6] Wright AC *et al. Infect Immun*, 1991, 59: 192
- [7] Fan JJ *et al. Infect Immun*, 2001, 69: 5943
- [8] Lee SE *et al. J Clin Microbiol*, 1998, 36: 2887
- [9] 李桂军等. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23: 852
- [10] Charbonnier F *et al. Protein Expr Purif*, 2001, 23: 121
- [11] Kothary MH *et al. Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 3707
- [12] 杜冠华. *基础医学与临床*, 2004, 24: 258
- [13] Kim BS *et al. Expe Mol Med*, 2002, 34: 308
- [14] Kwon KB *et al. J Biol Chem*, 2001, 276: 47518
- [15] Lee YR *et al. Infect Immun*, 2004, 72: 6157
- [16] Gray LD *et al. Infect Immun*, 1985, 48: 62

Recombination Expression and Cytolytic Bioactivity of *vvhA* Fusion Protein : Cytolysin of *V.vulnificus*

Jing Gui, Mei-Ying Xiao, Yong-Liang Lou*, Die Hu, Jie Yan¹, Ye-Jing Zhu

(Department of microecology, Key Research Laboratory for Medical Genetics of Zhejiang, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; ²Department of Medical Microbiology and Parasitology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract The aim of the study is to investigate cytolytic bioactivity of *vvhA* fusion protein (rVvhA): cytolysin of *V.vulnificus* on the apoptosis of human ECV304 cells. rVvhA was expressed highly in *E.coli* BL21 (DE3) bearing recombinant plasmid pET-28a(+)*vvhA* induced by 0.5 mmol/L IPTG. The expressed product was denatured and then purified by metal affinity chromatography using Ni²⁺-NTA resin. Finally, rVvhA was refolded using dilution and step dialysis. The bioactivity of rVvhA was confirmed by cytolysis against sheep erythrocytes and evaluated by MTT, Hoechst33342/PI fluorescent staining and flow cytometry. The results showed that rVvhA was purified to a purity of 88.6%. The fusion protein had a cytotoxic effect against sheep erythrocytes in time- and dose-dependent manner and reduced the viability of human ECV304 cells in a dose-dependent manner; The caspase pan inhibitor, Z-VAD-FMK, can partially inhibit rVvhA induced apoptosis. rVvhA has cytotoxic effect on human ECV304 cells and this process is probably correlated with the activation of caspase.

Key words *V.vulnificus*; cytolysin; rVvhA; human ECV304; cell apoptosis; caspase

Received: October 19, 2007 Accepted: November 30, 2007

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.X205004)

*Corresponding author. Tel: 86-577-86699200, E-mail:lyl@wzmc.net