

重组创伤弧菌溶细胞素诱导人脐静脉内皮细胞 凋亡的作用及其机制

王波¹ 丁卉¹ 谢旦立¹ 楼永良*¹ 严杰¹ 杨军¹ 赵志超¹

(温州医学院检验医学院, 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 为了研究重组创伤弧菌溶细胞素(rVvhA)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)凋亡的作用及其机制。采用 MTT 法、普通光学显微镜和电子透射电镜、流式细胞仪结合 Annexin V-PI 标记法、caspase 活性检测等方法测定 rVvhA 诱导 HUVEC 凋亡的作用。结果显示 rVvhA 能够抑制 HUVEC 生长。3.0 溶血单位(HU)/ml 和 4.0 HU/ml 的 rVvhA 作用 HUVEC 8 h 后, 细胞和线粒体的形态发生凋亡改变, 其中 4.0 HU/ml 处理组的凋亡率(51.73±1.96)% 高于对照组(3.53±0.64)% 和 3.0 HU/ml 处理组(12.83±5.00)%, 具有剂量依赖性; 4.0 HU/ml rVvhA 诱导 HUVEC 凋亡过程中, caspase-3、caspase-9 活性增加, 并且具有时间依赖性, 而 caspase-8 活性没有明显改变; 4.0 HU/ml rVvhA 加 caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-FMK 或 caspase-9 抑制剂 Ac-LEHD-FMK 的凋亡率分别下降到(14.2±3.47)%、(24.93±3.93)%。同时 caspase-3、caspase-9 活性也下降。结果表明 rVvhA 具有诱导 HUVEC 凋亡的生物学活性; 其机制可能与依赖 caspase 的线粒体途径有关。

关键词 创伤弧菌; 溶细胞素; 人脐静脉内皮细胞; 凋亡; caspase

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)是一种有荚膜的革兰阴性嗜盐菌, 主要存在于海洋中。人类通过食入受创伤弧菌污染的海产品或伤口感染, 引起原发性败血症、伤口感染或胃肠炎^[1]。尤其是肝肾功能异常、免疫功能低下的人群感染后更易发病^[2]。创伤弧菌感染的相关疾病发病后进展快、病情重, 其中原发性败血症和伤口感染患者的病死率分别高达 55%、25%^[1]。包括浙江省在内的我国沿海地区时有创伤弧菌感染并导致死亡的病例报道^[3]。创伤弧菌确切的致病机制至今仍未完全清楚, 但已肯定创伤弧菌溶细胞素(*Vibrio vulnificus* cytolysin, VVC)、荚膜多糖、脂多糖、金属蛋白酶是该菌毒力因子。其中 VVC 是 *vvhA* 基因编码的唯一外毒素, 被认为是创伤弧菌的主要毒力因子之一^[4]。

重组创伤弧菌溶细胞素(recombinant *Vibrio vulnificus* hemolysin, rVvhA)可以使人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)和 ECV304 细胞凋亡、caspase-3 活性增加^[5,6]。但是凋亡的发生是否与线粒体相关, 目前还未见专门报道。所以本实验根据 VVC 感染的临床表现, 以 HUVEC 为靶细胞, 除了观察 rVvhA 对 HUVEC 凋亡的影响外; 还通过线粒体形态和 caspase-9 活性的变化

初步研究相关的凋亡通路即 rVvhA 诱导 HUVEC 凋亡的发生是否与线粒体有关。实验结果将有助于更进一步丰富 rVvhA 的致病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和细胞株 *E.coli* BL21(DE3) (含 pET-28a (+)*vvhA* 质粒)菌株由本实验室构建和保存; HUVEC 细胞株由本实验室保存。

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)、蛋白质低分子量 marker、Trixton-100 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; RPIM1640 培养基购自 Hyclone 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; MTT 细胞毒性与增殖检测试剂盒、青链霉素、胰蛋白酶细胞消化

收稿日期: 2009-11-09 接受日期: 2010-01-08

浙江省自然科学基金(No.Y2090468)和浙江省科技计划(No.84008012)资助项目

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

液、6 厘米细胞培养皿、培养瓶及培养板购自碧云天生物技术研究所; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、caspase-3、caspase-8、caspase-9 分光光度法检测试剂盒、caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-FMK、caspase-9 抑制剂 Ac-LEHD-FMK 购自南京凯基生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 rVvhA 的表达、纯化、复性及溶血活性测定 按照文献进行^[7], 前期工作成功构建了重组质粒 pET-28a(+)-vvhA。0.5 mmol/L IPTG 诱导 *E. coli* BL21(DE3) (含 pET-28a(+)-vvhA 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, 利用绵羊红细胞测定其溶血活性。rVvhA 冷冻干燥成粉末于 -70 °C 保存。1 溶血单位(HU)为使红细胞悬液中的血红蛋白释放一半所需要的 rVvhA 量。

1.2.2 HUVEC 培养及传代 HUVEC 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 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。

1.2.3 细胞生长抑制试验 采用 MTT 法。收集对数生长期的 HUVEC, 接种于 96 孔板(1×10⁵ 个/孔)。待细胞生长 12 h 后加入 rVvhA, 使其终浓度分别为 0.5、1.5、3.0、3.5、4.0、4.5 HU/ml, 设加培养液的阴性组和只加试剂的正常组, 每组设三个复孔。置 CO₂ 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 处各组细胞的吸光度(A)值, 以(A_{作用组}-A_{空白组})/(A_{正常组}-A_{空白组})×100% 表示细胞的相对活力。

1.2.4 rVvhA 作用 HUVEC 形态学观察 HUVEC 按 2×10⁵ 个/孔接种 6 孔板, 生长 12 h, 改为无血清的基础培养基, 同时进行实验分组: 加基础培养基的正常组、3.0 HU/ml rVvhA 处理组、4.0 HU/ml rVvhA 处理组, 作用 8 h, 于倒置显微镜下观察细胞的形态。

1.2.5 rVvhA 作用 HUVEC 超微结构观察 HUVEC 按 2×10⁵ 个/孔接种 6 孔板, 生长 12 h, 改为无血清的基础培养基, 实验分组按 1.2.4 分组。作用 8 h 后, 收集细胞, 经过戊二醛预固定, 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, 最后电子透射电镜观察细胞和线粒体的超微结构。

1.2.6 细胞凋亡检测 采用流式细胞仪定量检测

rVvhA 作用 HUVEC 凋亡的情况。HUVEC 按 2×10⁵ 个/孔接种 6 孔板, 生长 12 h, 改为无血清的基础培养基, 同时进行实验分组: 按 1.2.4 处理, 外加 4.0 HU/ml rVvhA+50 μmol/L Ac-DEVD-FMK、4.0 HU/ml rVvhA+50 μmol/L Ac-LEHD-FMK 处理组, 其中 Ac-DEVD-FMK 和 Ac-LEHD-FMK 比 rVvhA 提前 1 h 加入。作用 8 h 后, 分别收集不同处理组细胞, 按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒提供的操作说明进行。染色完毕 1 h 内用流式细胞仪检测各组细胞凋亡或坏死的情况。

1.2.7 Caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 活性的检测 收集 1、2、4、6、8 h 正常组和 4.0 HU/ml rVvhA 处理组、4.0 HU/ml rVvhA+50 μmol/L Ac-DEVD-FMK 作用细胞 8 h 的处理组、4.0 HU/ml rVvhA+50 μmol/L Ac-LEHD-FMK 作用细胞 8 h 的处理组细胞于 50 ml 预冷的裂解缓冲液中, 按照 caspase-3、caspase-8、caspase-9 分光光度法检测试剂盒操作说明书进行。同时设立空白组。酶标仪检测 A₄₀₀ 值, 以 A_{400(处理组-空白组)}/A_{400(对照组-空白组)}}×100% 的值代表 caspase-3、caspase-8、caspase-9 的活性。}

1.2.8 统计学处理 以上实验重复 3 次, 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。所有变量均采用 $\bar{x} \pm s$ 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, *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 rVvhA 的表达、纯化及复性效果

表达的 rVvhA 分子量约为 54 kDa, 以包涵体形式存在(图 1 条带 2)。经反复洗涤、Ni-NTA 亲和层析法纯化得到 rVvhA(图 1 条带 5 和 6)。利用复性液

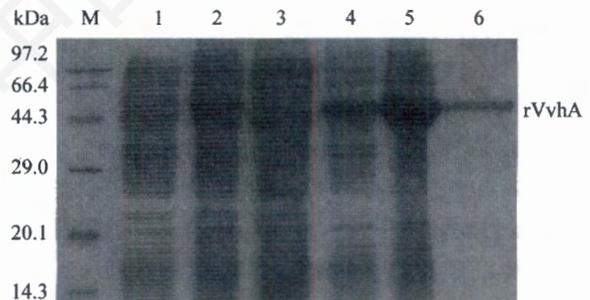


Fig.1 Expression and purification of rVvhA

M: protein marker; 1: total bacteria not induced by IPTG; 2 and 3: sediment and supernatant of the total bacteria induced by IPTG; 4: sediment of the total bacteria ultrasounded; 5: washed inclusion body of rVvhA; 6: purified rVvhA.

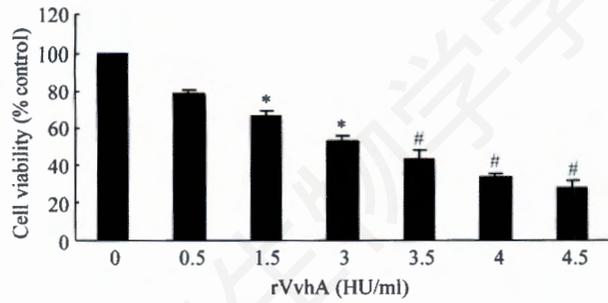


Fig.2 Effect of rVvhA on cell viability of HUVEC

* $P < 0.05$ and # $P < 0.01$, vs the control, respectively.

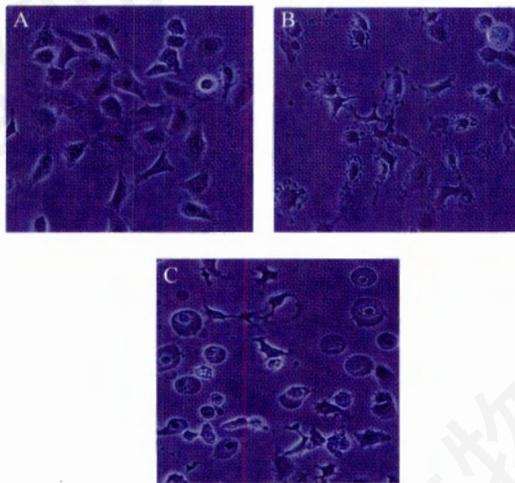


Fig.3 Morphology of HUVEC observed by inverted microscope

A: normal; B and C: HUVEC treated by 3.0 and 4.0 HU/ml rVvhA respectively after 8 h.

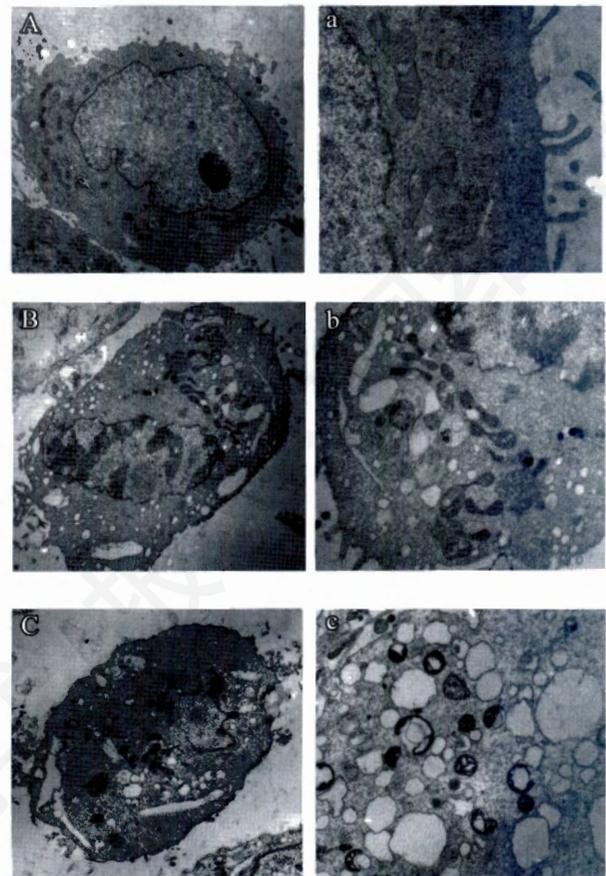


Fig.4 Apoptotic and mitochondrial morphology of the rVvhA-treated HUVEC for 8 h (TEM)

A, a: normal; B, b: cells were incubated with 3.0 HU/ml rVvhA (6 000 \times); C, c: cells were incubated with 4.0 HU/ml rVvhA (10 000 \times).

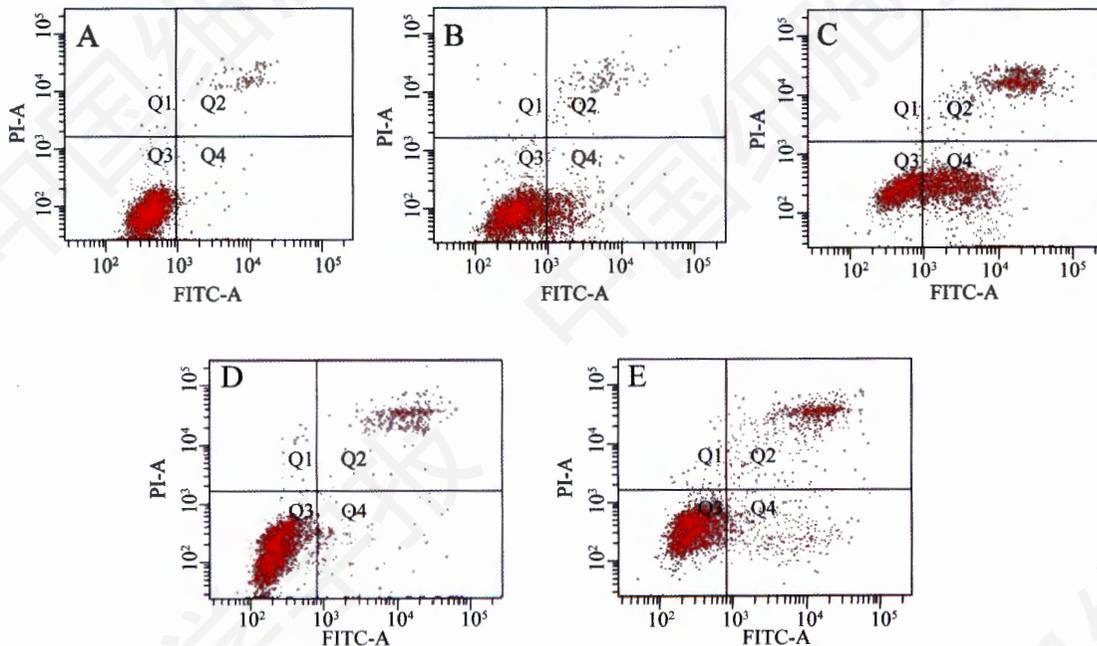


Fig.5 Changes in the percentage of apoptosis with five different groups

A: normal; B: 3.0 HU/ml rVvhA; C: 4.0 HU/ml rVvhA; D: 4.0 HU/ml rVvhA+Ac-DEVD-FMK; E: 4.0 HU/ml rVvhA+Ac-LEHD-FMK.

结合分步透析法进行复性后,测定其溶血活性为0.2 mg/HU。

2.2 rVvhA 的细胞增殖抑制作用

MTT 结果显示,0.5、1.5、3.0、3.5、4.0、4.5 HU/ml rVvhA 与 HUVEC 作用 24 h 后, HUVEC 的生长率分别为 79%、65.8%、52.4%、43.4%、34.1%、28.3%。随着 rVvhA 浓度的增加对 HUVEC 增殖抑制效果愈加明显(图 2)。

2.3 rVvhA 作用 HUVEC 形态学观察结果

3.0 HU/ml rVvhA 作用 HUVEC 8 h 后,倒置显微镜下观察到细胞开始发生圆缩(图 3B);在相同的时间里,4.0 HU/ml rVvhA 作用组的细胞已变圆,并且有脱落趋势(图 3C)。

2.4 rVvhA 作用 HUVEC 超微结构观察结果

3.0 HU/ml 和 4.0 HU/ml rVvhA 作用 HUVEC 8 h 后,透射电镜下观察:细胞体积变小;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 4B,图 4C)。不仅细胞形态发生改变,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(图 4b,图 4c)。

2.5 流式细胞仪定量检测细胞凋亡率

流式细胞仪结合 Annexin-V/PI 标记法检测显示:3.0 HU/ml 和 4.0 HU/ml rVvhA 处理组的细胞凋亡率分别为(12.83±5.00)%、(51.73±1.96)%,都高于对照组(3.53±0.64)%,且差异都具有统计学意义($P<0.05$),其中 4.0 HU/ml rVvhA 处理组差异具有明显统计学意义($P<0.01$)。由此可见,rVvhA 诱导 HUVEC 凋亡具有剂量依赖性(图 5A,图 5B,图 5C 和表 1)。

4.0 HU/ml rVvhA+Ac-DEVD-FMK 和 4.0 HU/ml rVvhA+Ac-LEHD-FMK 处理组凋亡率分别是(14.2±3.47)%、(24.93±3.93)%,与 4.0 HU/ml rVvhA 作用组相比,差异具有明显统计学意义($P<0.01$) (图 5D,图 5E 和表 1)。

2.6 Caspase-3、caspase-8、caspase-9 的活性

HUVEC 经 4.0 HU/ml rVvhA 作用 1 h 后, caspase-3 开始升高, caspase-9 略有增加。二者的活性随时间而逐渐升高(图 6)。8 h 时,与正常组相比,差异都有明显统计学意义($P<0.01$) (图 7)。而 caspase-8 活性变化不明显(图 6)。

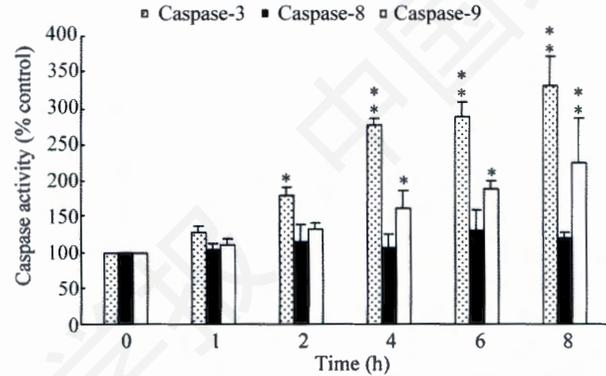


Fig.6 Effects of rVvhA on activities of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 in HUVEC at different times

* $P<0.05$ and ** $P<0.01$, vs the control, respectively.

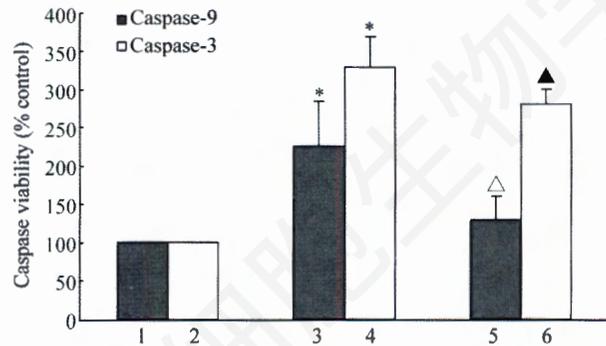


Fig.7 Caspase-3/caspase-9 activity in HUVEC treated with rVvhA with or without Ac-DEVD-FMK/Ac-LEHD-FMK

1, 2: control; 3, 4: 4.0 HU/ml rVvhA; 5: 4.0 HU/ml rVvhA+Ac-LEHD-FMK; 6: 4.0 HU/ml rVvhA+Ac-DEVD-FMK. * $P<0.01$, vs the control; ^ $P<0.01$ and ^ $P<0.05$, vs 4.0 HU/ml rVvhA-treated group, respectively.

Table1 Apoptosis and necrosis rates of HUVEC induced by different dosages of rVvhA with or without caspase-3/caspase-9 inhibitor ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Cell proportion (%)	Control group	rVvhA treated group			
		3.0 HU/ml	4.0 HU/ml	4.0 HU/ml+50 μ mol/L Ac-DEVD-FMK	4.0 HU/ml+50 μ mol/L Ac-LEHD-FMK
Apoptosis cells	3.53±0.64	12.83±5.00 ^a	51.73±1.96 ^b	14.2±3.47 ^c	24.93±3.93 ^c
Dead cells	1.6±1.08	6.47±3.07	18.57±5.76	12.13 ±6.96	18.83±2.17
Live cells	94.7±0.70	80.4±8.05	29.60±3.76	73.26±7.21	54.9±4.26

^a $P<0.05$ and ^b $P<0.01$, vs the control, respectively; ^c $P<0.01$, vs the 4.0 HU/ml rVvhA-treated group.

4.0 HU/ml rVvhA+Ac-DEVD-FMK 和 4.0 HU/ml rVvhA+Ac-LEHD-FMK 作用 HUVEC, 相对应的 caspase-3、caspase-9 活性也有下降, 与 4.0 HU/ml rVvhA 处理组相比, 差异具有统计学意义($P<0.05$) (图 7)。

3 讨论

VVC 是创伤弧菌分泌到细胞外的唯一外毒素, 对多种哺乳细胞有细胞毒性, 例如巨噬细胞、血管平滑肌细胞、血管内皮细胞等^[8-12]。我们前期工作证实以基因工程方式克隆表达、纯化和复性的 VVC 即 rVvhA, 不仅具有溶血活性, 还可以诱导 SMMC7721 上调 TNF- α 、HSP90^[6]。在本实验中, rVvhA 可以抑制 HUVEC 的生长, 并且具有剂量依赖性。3.0 HU/ml rVvhA 作用 HUVEC 24 h 后, HUVEC 的抑制率约为 47.6%, 高于此浓度时, 细胞生长受到显著抑制。

细胞凋亡过程中, 除了细胞体积变小、细胞核固缩、染色质浓缩等凋亡改变外, caspase 家族的激活也起着关键作用。例如, 凋亡的启动因子 caspase-2、caspase-8、caspase-9、caspase-10, 执行分子 caspase-3、caspase-6、caspase-7。其中 caspase-8、caspase-9 的激活分别在死亡受体途径和线粒体途径中起着重要作用, 这两条途径最后都经过 caspase-3 的激活导致细胞凋亡^[13]。其中线粒体途径介导的凋亡中, 除了 caspase-9 活性增加外, 线粒体的形态也会发生改变, 正常的嵴结构消失, 取而代之的是多囊状(vesicular)、水泡样或空泡化、肿胀(swollen)^[14,15]。本实验经 3.0 HU/ml 和 4.0 HU/ml rVvhA 处理的 HUVEC, 通过倒置显微镜和透射电镜观察到细胞形态发生凋亡的改变, 同时细胞器线粒体也有浓缩、肿胀、正常的嵴结构消失等改变; 流式细胞仪检测凋亡率分别达到(51.73 \pm 1.96)%、(3.53 \pm 0.64)%。此外, caspase-3、caspase-9 的活性也都有不同程度的升高。这些结果证明 rVvhA 可以导致 HUVEC 凋亡的发生; 线粒体形态、caspase-9 活性的改变提示凋亡可能与线粒体有关。

rVvhA 诱导 HUVEC 凋亡的过程中, caspase-3、caspase-9 活性增加且具有时间依赖性; 而 caspase-8 活性没有明显升高。caspase-3、caspase-9 的抑制剂可以使 rVvhA 诱导 HUVEC 的凋亡率降低; 同时还可以分别使 caspase-3、caspase-9 活性降低。进一步说明 rVvhA 诱导 HUVEC 凋亡可能与线粒体有关。线粒体途径介导凋亡的过程中, 除了线粒体形态改变之外, 还有线粒体通透性转运孔开放、线粒体膜电

位降低; 细胞色素 *c* (cytochrome *c*, Cyt c) 从线粒体转移到细胞浆, 后者与 caspase-9 及 Apaf-1 形成复合物激活 caspase-3, 导致细胞凋亡^[16]。此外, 线粒体还会释放一些与凋亡相关的其他因子, 如 AIF、EndoG 等。这些细胞因子是通过不依赖 caspase 途径直接导致染色体凝聚、DNA 片断化, 这一点不同于 Cyt c ^[15]。本实验中, caspase-3、caspase-9 的抑制剂使 HUVEC 细胞凋亡率分别下降到(14.2 \pm 3.47)%、(24.93 \pm 3.93)%, 与正常组(3.53 \pm 0.64)% 相比并没有完全阻断 rVvhA 诱导 HUVEC 凋亡的发生, 所以不排除不依赖 caspase 的线粒体途径的参与。同时也不排除 caspase 家族其他成员的参与。这些都有待于更详细的研究。

参考文献(References)

- 1 Chiang SR, Chuang YC. *Vibrio vulnificus* infection: clinical manifestations, pathogenesis and antimicrobial therapy. *J Microbiol Immunol Infect* 2003; 36(2): 81-8.
- 2 Gulig PA, Bourdage KL, Starks AM. Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *J Microbiol* 2005; 43 Spec No: 118-31.
- 3 卢中秋, 李秉熙, 黄唯佳, 程俊彦, 周铁丽. 创伤弧菌败血症的临床和流行病学特点. *中国急救医学* 2003; 23(7): 470-1.
- 4 Lee SE, Ryu PY, 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): 86-91.
- 5 Zhao JF, Sun AH, Ruan P, Zhao XH, Lu MQ, Yan J. *Vibrio vulnificus* cytolysin induces apoptosis in HUVEC, SGC-7901 and SMMC-7721 cells via caspase-9/3-dependent pathway. *Microb Pathog* 2009; 46(4): 194-200.
- 6 桂 静, 肖美英, 楼永良, 胡 蝶, 严 杰, 朱晔晶. 创伤弧菌溶细胞素融合蛋白重组、表达与细胞毒性鉴定. *细胞生物学杂志* 2008; 30(1): 89-94.
- 7 李桂军, 桂 静, 肖美英, 楼永良. 创伤弧菌溶细胞素 vvhA 基因在大肠杆菌中的表达及其对应激因子的调控. *中华微生物学和免疫学杂志* 2008; 28(1): 24-8.
- 8 Kim HR, Rho HW, Jeong MH, Park JW, Kim JS, Park BH, et al. Hemolytic mechanism of cytolysin produced from *V. vulnificus*. *Life Sci* 1993; 53(7): 571-7.
- 9 Rho HW, Choi MJ, Lee JN, Park JW, Kim JS, Park BH. Cytotoxic mechanism of *Vibrio vulnificus* cytolysin in CPAE cells. *Life Sci* 2002; 70(16): 1923-34.
- 10 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 ECV304 cells. *J Biol Chem* 2001; 276(50): 47518-23.
- 11 Kim JS, Chae MR, Chang K, Park KH, Rho HW, Park BH, et al. Cytotoxicity of *Vibrio vulnificus* cytolysin on rat peritoneal mast cells. *Microbiol Immunol* 1998; 42(12): 837-43.
- 12 Park JW, Ma SN, Song ES, Song CH, Chae MR, Park BH, et al. Pulmonary damage by *Vibrio vulnificus* cytolysin. *Infect Immun* 1996; 64(7): 2873-6.
- 13 Lawen A. Apoptosis — an introduction. *BioEssays* 2003; 25 (9): 888-96.

- 14 Sun MG, Williams J, Munoz-Pinedo C, Perkins GA, Brown JM, Ellsman MH, *et al.* Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals transformation of mitochondria during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2007; 9(9): 1057-65.
- 15 Ju WK, Kim KY, Lindsey JD, Angert M, Patel A, Scott RT, *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(5): 120-34.
- 16 Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15(22): 2922-33.

Effect of Apoptosis of rVvhA on HUVEC and the Related Mechanism

Bo Wang, Hui Ding, Dan-Li Xie, Yong-Liang Lou*, Yan Jie¹, Yang Jun, Zhi-Chao Zhao
(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, School of Medical Lab Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; ¹Department of Medical Microbiology and Parasitology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract To investigate the activity of recombinant *Vibrio vulnificus* hemolysin (rVvhA) on the apoptosis of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and the related mechanism, the cytotoxic effect of rVvhA on the growth of HUVEC was identified by MTT; cellular morphology was observed by inverted microscope, ultrastructure of cell and mitochondria were observed by transmission electron microscopy (TEM); apoptosis or necrosis in HUVEC was measured using flow cytometry; activities of caspase-3, caspase-8, caspase-9 were detected by spectrophotometry. We found that the viability of HUVEC exposed to rVvhA was inhibited. Cellular and mitochondrial morphology both occurred to change obviously observed by TEM in HUVEC treated by 3.0 HU/ml and 4.0 HU/ml rVvhA after 8 hours, and 4.0 HU/ml rVvhA (51.73±1.96)% had a better cytotoxic effect on HUVEC than that of the normal (3.53±0.64)% and 3.0 HU/ml rVvhA group (12.83±5.00)%. Besides, caspase-3 and caspase-9 activities of HUVEC treated with 4.0 HU/ml rVvhA both raise, but caspase-8 remained unchanging. The apoptosis of HUVEC treated by 4.0 HU/ml rVvhA+caspase-3 inhibitor (Ac-DEVD-FMK) or caspase-9 inhibitor (Ac-LEHD-FMK) was relatively reduced to (14.2±3.47)%, (24.93±3.93)%, respectively. At the same times, the caspase-3/caspase-9 activity reduced gradually by Ac-DEVD-FMK/Ac-LEHD-FMK. Our results discovery that the rVvhA has cytotoxic effect on HUVEC; Mitochondria-mediated apoptosis pathway which is dependent on caspase may be related to apoptosis induced by rVvhA in HUVEC.

Key words *Vibrio vulnificus*; cytolysin; human umbilical vein endothelial cell; apoptosis; caspase

Received: November 9, 2009 Accepted: January 8, 2010

The work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y2090468) and the Science and Technology Program of Zhejiang Province (No.84008012)

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