

膜胆固醇对重组创伤弧菌溶细胞素活性的影响

丁卉¹ 潘婍妮¹ 郭秋¹ 楼永良^{1*} 严杰² 伍越¹ 王福乐¹

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;

²浙江大学医学院病原生物学教研室, 杭州 310031)

摘要 研究膜胆固醇对重组创伤弧菌溶细胞素(recombinant *Vibrio vulnificus* hemolysin, rVvhA)生物学活性的影响,以进一步明确rVvhA的分子致病机制。利用甲基- β -环糊精(M β CD)可以去除细胞膜上胆固醇的能力,rVvhA作用细胞之前,细胞预先经5 mmol/L M β CD处理。测定M β CD预处理组和未处理组(即rVvhA直接作用组)细胞的存活率、细胞内钙离子浓度、培养上清中钾离子浓度及细胞凋亡与坏死情况。结果显示M β CD预处理组的细胞存活率较rVvhA直接作用组高,rVvhA引起的钙离子内流和钾离子释放受到抑制、细胞凋亡率也明显降低。结果表明,在rVvhA活性发挥中细胞膜上的胆固醇是必须存在的,胆固醇的降低会抑制rVvhA的活性。

关键词 创伤弧菌; 溶细胞素; 甲基- β -环糊精; 胆固醇

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*, Vv)是一种革兰阴性的嗜盐性弧菌^[1],自然存在于近海或海湾的海水中及鱼类、贝甲等海产品中。Vv主要通过经口感染和伤口接触两条途径感染人体,Vv感染后,若未能得到及时有效的治疗,可迅速发展成败血症,死亡率高达55.5%^[2]。创伤弧菌溶细胞素(*Vibrio vulnificus* hemolysin, VvhA)是Vv唯一分泌至胞外的具有种特异性的外毒素^[3],是Vv主要的致病因子之一,毒性很强,具有溶解细胞、诱导细胞凋亡的作用,但是其具体的致病机制仍未十分明确。

VvhA是一种孔形成毒素(pore-forming toxin, PFT),作用细胞后可在细胞膜表面形成跨膜小孔。对PFT家族成员如产气荚膜梭菌溶素O(perfringolysin O, PFO)、链球菌溶血素O(streptolysin O, SLO)及中间型链球菌溶素(intermedilysin, ILY)等研究发现,膜胆固醇在PFT的活性发挥中起着重要作用,膜胆固醇减少会抑制毒素的活性作用^[4]。本实验利用甲基- β -环糊精(M β CD)预处理以降低小鼠单核巨噬细胞(J774A.1)细胞膜上胆固醇的含量,再经rVvhA作用,比较M β CD预处理组和rVvhA直接作用组细胞存活率、胞内钙离子浓度、钾离子释放量及细胞凋亡等情况,从而研究得到膜胆固醇在rVvhA活性发挥中的作用,为进一步明确rVvhA的分子致病机制提供实验依据。

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)菌株由本实验构建和保存;J774A.1由浙江大学病原微生物教研室惠赠。

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-X 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;M β CD(甲基- β -环糊精)购自Sigma公司;RPMI-1640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、胰酶细胞消化液、Fluo-3 AM 钙离子检测荧光探针、6厘米细胞培养皿及培养板购自碧云天生物技术研究所;细胞胆固醇检测试剂盒购自美国Cayman公司;钾离子检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司;激光共聚焦专用小皿为Willco wells B.V.公司产品。

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^[5]进行,前期工作已成功构建了重组质粒pET-28a(+)-vvhA。0.5mmol/L IPTG 诱导 *E.coli*

收稿日期: 2010-04-16 接受日期: 2010-08-25

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: 13857772709, E-mail: lyl@wzmc.net

BL21(DE3) (含 pET-28a(+)-vvhA 质粒)菌株表达, SDS-PAGE 分析表达产物。通过 Ni²⁺-NTA 亲和层析纯化表达产物。稀释复性结合分步透析复性后, 利用绵羊红细胞测定其溶血活性。rVvhA 蛋白冷冻干燥成粉末于 -70℃ 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 J774A.1 细胞培养及传代 J774A.1 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 置于 37℃、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 天更换培养液。

1.2.3 MβCD 预处理及其去胆固醇能力的检测 收集对数生长期 J774A.1 细胞, 调整密度为 2×10⁵ 个/ml, 接种于激光共聚焦专用小皿(35×22 mm, 玻璃底面厚度为 0.17 mm)中, 1 ml/皿, 37℃、5% CO₂ 培养 24 h。MβCD 用 pH7.4 PBS 配制成 5 mmol/L 溶液, 0.22 μm 滤器过滤。rVvhA 作用之前细胞预先与 5 mmol/L MβCD 置于 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 30 min。利用激光共聚焦显微镜按照细胞胆固醇检测试剂盒操作说明测定细胞膜上胆固醇的变化情况。

1.2.4 细胞生长抑制实验 实验分 rVvhA 直接作用组(0 HU/ml、0.5 HU/ml、1.0 HU/ml、1.5 HU/ml、2.0 HU/ml、2.5 HU/ml、3.0 HU/ml、4.0 HU/ml)和 MβCD 预处理组(MβCD+ 对应浓度的 rVvhA)。收集对数生长期细胞, 调整密度为 2×10⁵ 个/ml, 接种于 96 孔板, 100 μl/孔, 待细胞完全贴壁后, MβCD 预处理细胞 30 min。弃去孔内所有液体, 改加 RPMI-1640, 并加入不同量 rVvhA, 同时设立试剂空白组。每组设 3 个复孔。蛋白作用 6 h 后, MTT 法检测细胞存活率, 测定 570 nm 处各孔的吸光度(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。

1.2.5 培养上清中钾离子浓度的测定 实验分为 rVvhA 直接作用组(0 HU/ml、0.5 HU/ml、1.0 HU/ml、2.0 HU/ml、3.0 HU/ml、4.0 HU/ml)和 MβCD 预处理组(MβCD+ 对应浓度的 rVvhA), 细胞以 2×10⁵ 个/ml 密度接种于 12 孔板中, 培养 24 h。MβCD 预处理。将孔内液体弃去, 改加 RPMI-1640, 并加入相应量的 rVvhA 作用细胞 6 h。收集培养液上清, 按试剂盒操作说明测定钾离子浓度。

1.2.6 瞬时胞内钙离子浓度的测定 实验分为 rVvhA 直接作用组(2.0 HU/ml)和 MβCD 预处理组(MβCD+ 对应浓度的 rVvhA), J774A.1 细胞以 2×10⁵ 个/ml 接种于 LSCM 小皿中, 培养 24 h。5 mmol/L MβCD 预处理细胞。两实验组细胞均加 5 μmol/L

Fluo-3 AM 钙离子检测荧光探针(用含 1% BSA 的 Hanks 稀释), 37℃ 避光孵育 40 min, 使探针负载。Hanks 洗涤 3 次, 继续孵育 20 min, 使负载更完全。激光扫描共聚焦显微镜下进行连续扫描, 激发波长 488 nm, 发射波长 527 nm, 扫描时间 4 s, 间隔时间 4 s, 共扫描 6 min。加 rVvhA 前先扫描几张作为正常对照, 于间隔期迅速加入 2.0 HU/ml rVvhA 作用于细胞, 继续扫描, 以得到 rVvhA 作用组和 MβCD 预处理组细胞瞬间钙离子浓度的变化情况。

1.2.7 细胞凋亡检测 实验分为 rVvhA 直接作用组(0 HU/ml、1.0 HU/ml、2.0 HU/ml、3.0 HU/ml)和 MβCD 预处理组(MβCD+ 对应浓度的 rVvhA)。J774A.1 细胞按 2×10⁵ 个/孔接种 6 孔板, 生长 24 h, 改为无血清的基础培养基, 5 mmol/L MβCD 预处理细胞。加入相应浓度 rVvhA 作用细胞, 作用 6 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率。

1.2.8 统计学处理 以上实验重复 3 次, 采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。所有变量均采用表示。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、Ni²⁺-NTA 亲和层析法纯化得到 rVvhA(图 1, 条带 5、条带 6)。稀释复性结合分步透析进行蛋白复性。溶血活性为 0.2 μg/HU。

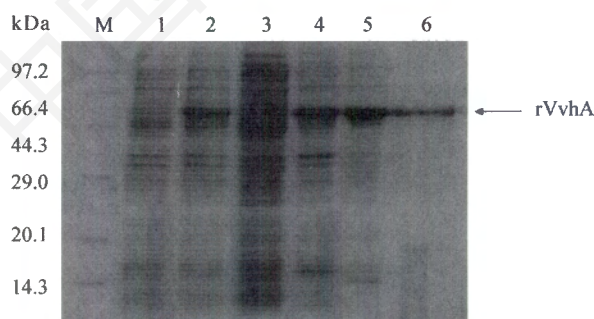


Fig.1 Expression and purification of rVvhA

M: protein marker; 1: total bacteria not induced by IPTG; 2, 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.

2.2 M β CD 去胆固醇能力的检测结果

图2所示,经5 mmol/L M β CD作用后, J774A.1 细胞上胆固醇含量明显减少。Image-Pro Plus 6.0 软件分析,细胞经M β CD处理后胆固醇含量大约减少了64%,与对照组相比,差异有明显统计学意义($P<0.01$) (图3)。

2.3 M β CD 预处理抑制 rVvhA 的细胞毒性作用

如图4所示, rVvhA 直接作用后细胞存活率明显下降,且呈剂量依赖性,0.5 HU/ml 组较对照组有降低,但无明显差异。1.0 HU/ml、1.5 HU/ml、2.0 HU/ml、

2.5 HU/ml、3.0 HU/ml 作用组与对照组相比均有显著差异($P<0.05$)。M β CD 预处理组细胞存活率较 rVvhA 直接作用组升高,除0.5 HU/ml 作用组外,1.0、3.0 HU/ml 各组存活率与 rVvhA 直接作用组相比差异具有统计学意义($P<0.05$),同时 M β CD 预处理组与正常对照组比较,存活率没有显著差别。

2.4 M β CD 预处理抑制 rVvhA 引起的细胞内钾离子释放

rVvhA 直接作用细胞可引起细胞内钾离子释放至胞外,与对照组相比,0.5 HU/ml 组无明显差异,

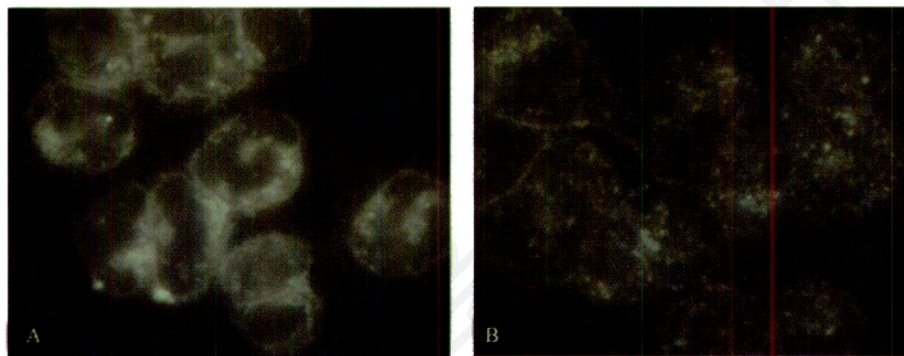


Fig.2 Cholesterol depletion by M β CD in J774A.1 cells ($\times 600$)

A: control; B: J774A.1 incubated with 5mmol/L M β CD for 30min.

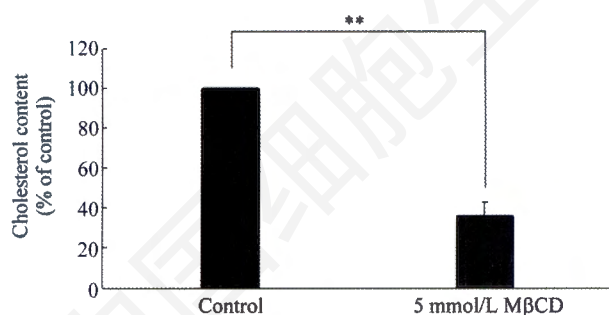


Fig.3 The extent of cholesterol depletion by M β CD in J774A.1 cells

** $P<0.01$, compared with control.

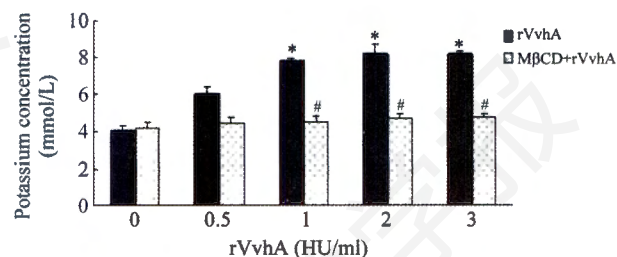


Fig.5 Effect of M β CD on rVvhA induced release of potassium ion from J774A.1 cells

* $P<0.05$, compared with control; # $P<0.05$, compared with rVvhA.

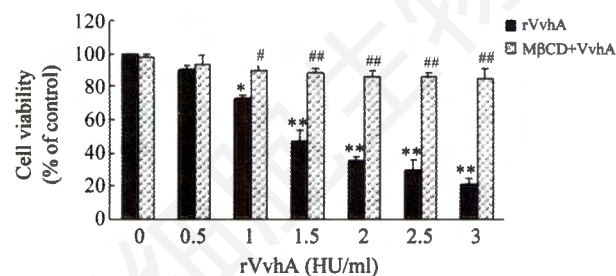


Fig.4 Effects of M β CD on rVvhA induced-cell cytotoxicity of J774A.1 cells

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with control; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with rVvhA, respectively.

1.0 HU/ml、2.0 HU/ml、3.0 HU/ml 组均有显著差别 ($P<0.05$)。而 M β CD 预处理组细胞培养上清中钾离子的浓度较对照组虽有升高但差异没有统计学意义 ($P>0.05$),与 rVvhA 直接作用组相比,除0.5 HU/ml 浓度组外,其余3个浓度组都具有显著差异 ($P<0.05$)。

2.5 M β CD 预处理抑制 rVvhA 引起的钙离子内流

如图6所示, A1、A2 分别代表 rVvhA 直接作用组加入 rVvhA 作用前后细胞内钙离子变化情况,可见

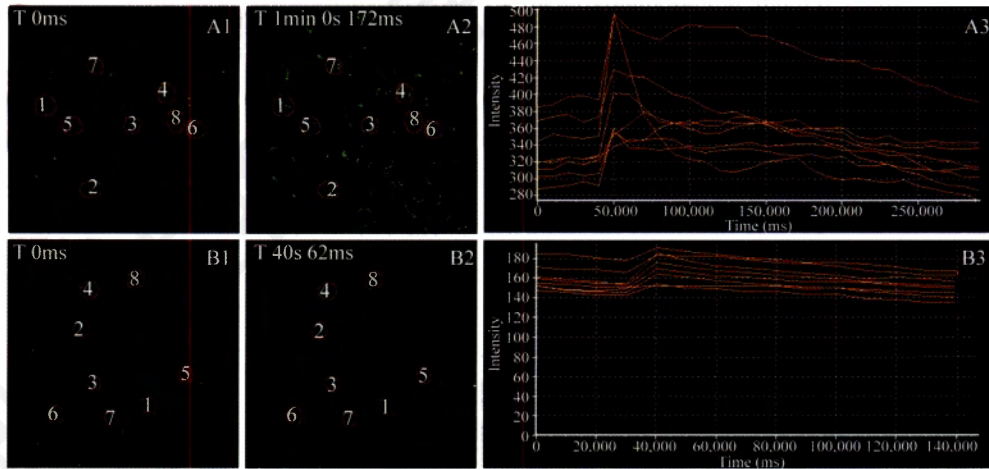


Fig.6 Effects of MβCD on rVvhA-induced increase of [Ca²⁺]_i in J774A.1 cells

A: rVvhA directly treated; B: cell incubated with MβCD before rVvhA treated; 1: control; 2: treated with 2.0 HU/ml rVvhA; 3: the change of fluorescence intensity in HUVEC.

Table 1 Effects of MβCD on rVvhA-induced cell apoptosis of J774A.1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Cell proportion (%)	Control group	rVvhA			MβCD+rVvhA		
		1.0 HU/ml	2.0 HU/ml	3.0 HU/ml	1.0 HU/ml	2.0 HU/ml	3.0 HU/ml
Apoptosis cells	4.31±1.5	13.5±2.14*	24.9±1.3**	30.3±3.4**	6.3±2.03*	8.7±1.95**	7.1±3.0**
Dead cells	6.7±1.63	13.2±4.02	17.4±2.6	39.2±5.1	7.3±3.49	9.4±1.67	10.1±4.3
Live cells	88.3±2.2	69±5.13	54.4±4.16	28.1±3.5	85.3±2.61	84.3±3.1	83±1.1

P*<0.05, *P*<0.01, compared with control; **P*<0.05, ***P*<0.01, compared with rVvhA.

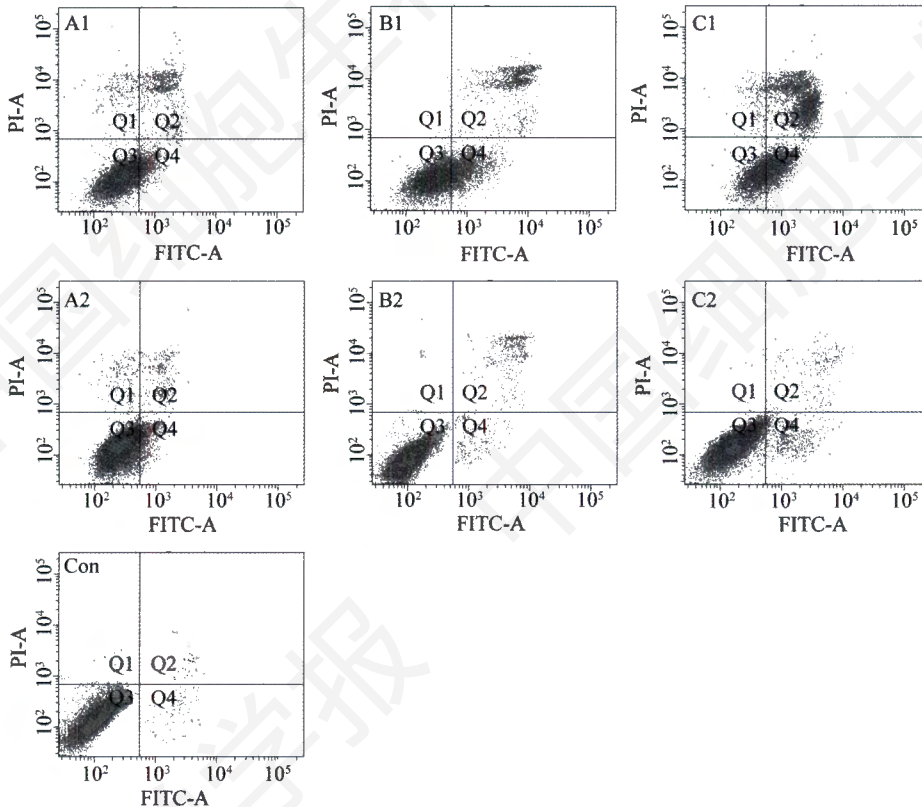


Fig.7 Effects of MβCD on rVvhA induced-cell apoptosis of J774A.1 cells

Note: A1~C1: cells treated with 1.0 HU/ml, 2.0 HU/ml, 3.0 HU/ml rVvhA for 6 h, respectively; A2~C2: cells incubated with 5 mmol/L MβCD for 30 min before treated with 1.0 HU/ml, 2.0 HU/ml, 3.0 HU/ml rVvhA; Con: control.

当加入 rVvhA 后, 细胞荧光强度明显变强, 提示胞内钙离子浓度增加, A3 为任意选取的 8 个细胞荧光强度变化曲线。B1、B2 为 M β CD 预处理组加入 rVvhA 作用前后细胞内钙离子浓度变化情况, 可见 rVvhA 作用前后钙离子浓度变化不明显。B3 为选取的 8 个细胞荧光强度变化曲线, 趋势较平缓。

2.6 M β CD 预处理抑制 rVvhA 引起的细胞凋亡

如表 1 所示, 1.0 HU/ml rVvhA 直接作用 J774A.1 细胞 6 h 后与对照组的细胞凋亡率分别为 13.5% \pm 2.14% 和 4.31% \pm 1.5%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 2.0 HU/ml 和 3.0 HU/ml rVvhA 作用后凋亡率分别为 24.9% \pm 1.3% 和 30.3% \pm 3.4%, 明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 具有明显的剂量依赖性。而 M β CD 预处理组, 三个浓度 rVvhA 作用后细胞凋亡率分别为 6.3% \pm 2.03%、8.7% \pm 1.95% 和 7.1% \pm 3.0%, 与对照组相比虽略有升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 与 rVvhA 直接作用组相比, 1.0 HU/ml、2.0 HU/ml 和 3.0 HU/ml 3 个作用浓度的凋亡率均降低, 且具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

创伤弧菌溶细胞素是创伤弧菌唯一分泌至体外的具有膜成孔作用的外毒素, 毒性强, 是创伤弧菌的重要致病因子之一, 但其致病机制至今仍未十分明确。本实验利用基因工程方式表达得到 rVvhA, 已证实 rVvhA 具有溶血活性、致炎应激、诱导 HUVEC 细胞凋亡等作用^[6-8], 在本实验中我们利用 rVvhA 替代天然 VvhA 进行分子致病机制的研究。

实验结果表明, rVvhA 对 J774A.1 具有细胞毒性作用, 可以抑制细胞增殖, 呈剂量依赖性。rVvhA 作用 J774A.1 后可引起细胞内钾离子外流和钙离子增加。有文献报道, 钾离子外流是 rVvhA 在细胞表面聚合形成可渗透单价离子的跨膜小孔引起的; 钙离子增加是细胞外钙离子通过跨膜孔道被动扩散入细胞内所致^[9,10]。研究发现, 早期凋亡细胞可以测及的最早生物学变化就是细胞内快速、持续的钙离子浓度升高, 而钙离子作为参与许多生命活动的关键第二信使, 作为一种诱导细胞凋亡的信号已得到多方面的验证。有报道指出, 细胞张力收缩是凋亡发生的标志, 发生在细胞 DNA 裂解前, 并且伴随着细胞内钾离子释放^[11], 提示细胞凋亡的发生与钾离子释放有联系。图 7 和表 1 也证实 rVvhA 可以诱导 J774A.1 细胞发生凋亡。

胆固醇广泛存在于哺乳动物细胞膜, 它可以影响

生物膜的某些生物物理特性如膜流动性、侧向扩散和通透性等, 并能调节膜蛋白的结构和功能^[12], 同时也是构成脂质双分子层的重要组分, 可以影响其动力学改变和功能改变。近年的研究发现胆固醇在病原体与宿主细胞间的相互作用中有着重要意义, 它可以作为细胞上病原体结合的受体, 也可以作为一种调节因素增强毒素活性。Park 等^[13]报道, 低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 通过引起 VvhA 寡聚而使 VvhA 丧失活性, 提出细胞膜中的胆固醇是 VvhA 作用靶细胞质膜上的受体这一观点。M β CD 是一种经典的胆固醇络合剂, 可以选择性的、快速有效的去除细胞膜上的胆固醇^[14,15]。本实验采用 5mmol/L M β CD 预处理细胞以降低细胞膜上胆固醇含量, 且 MTT 结果证实 5mmol/L M β CD 本身对细胞没有细胞毒作用。比较 M β CD 预处理组和 rVvhA 直接作用组, 前者 rVvhA 作用后细胞存活率明显增加, 钾离子外流、乳酸脱氢酶释放及钙离子内流均受到一定程度抑制, 细胞凋亡率也明显降低。结果提示细胞膜上胆固醇含量的减少很大程度上影响了 rVvhA 生物学活性的发挥。

分析胆固醇对 rVvhA 的影响作用, 若胆固醇是其受体, 则含量的减少将直接影响毒素结合至细胞上的量, 从而影响活性。在对破伤风杆菌溶血素 (tetanolysin) 和 PFO 等的研究发现, 当脂质体中胆固醇所占摩尔百分比为 40 mol% 时, 两种毒素只是少量结合到细胞上, 而当比例上升到 55 mol% 时, 毒素的结合量达到最大值^[16,17], 提示毒素结合至细胞不仅要求胆固醇的存在, 还需要胆固醇达到一定水平。在对 SLO 及 ILY 等的研究发现细胞上胆固醇含量降低并不会明显降低毒素的结合量, 但是毒素的活性几乎完全抑制^[4]。一方面可能是膜上胆固醇含量减少影响了脂质双层的流动性, 从而影响毒素单体寡聚化形成多聚体, 最终影响活性。另一方面, 胆固醇可以通过促进膜成孔毒素跨膜片段插入膜中^[18]调节毒素的活性。

综上所述, 本研究发现 rVvhA 对 J774A.1 细胞有细胞毒性作用, 可以抑制其增殖。rVvhA 具有膜成孔作用, 可以引起钙离子内流及钾离子释放, 同时可以引起细胞凋亡。细胞经 M β CD 处理降低了膜上胆固醇含量后可以降低 rVvhA 的活性, 提示 rVvhA 活性的发挥需要细胞膜上胆固醇的存在, 而膜胆固醇影响 rVvhA 活性的具体机制还有待进一步的研究。

参考文献 (References)

- 1 Hollis DG, Weaver RE, Baker CN, Thornsberry C. Halophilic vibrio species isolated from blood cultures. *J Clin Microbiol* 1976; 3: 425-31.

- 2 Gulig PA, Bourdage KL, Starks AM. Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *J Microbiol* 2005; 43(6): 118-31.
- 3 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.
- 4 Giddings KS, Johnson AE, Tweten RK. Redefining cholesterol's role in the mechanism of the cholesterol-dependent cytolysins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(20): 11315-20.
- 5 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.
- 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 谢旦立, 王 波, 丁 卉, 郑 丽, 楼永良, 严 杰. 创伤弧菌溶细胞素融合蛋白对人 Caco-2 细胞 IL-8 基因表达和 IL-8 分泌的影响. *中国人兽共患病学报* 2010; 30(1): 60-5.
- 8 王 波, 丁 卉, 谢旦立, 楼永良, 严 杰, 杨 军, 等. 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. *中国细胞生物学学报* 2010; 32(1): 103-8.
- 9 Park JW, Jahng TA, Rho HW, Park BH, Kim NH, Kim HR. Inhibitory mechanism of Ca²⁺ on the hemolysis caused by *vibrio vulnificus* cytolysin. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1194(1): 166-70.
- 10 Rho HW, Choi MJ, Lee JN, Park JW, Kim JS, Park BH, *et al.* Cytotoxin mechanism of *vibrio vulnificus* cytolysin in CPAE cells. *Life Sci* 2002; 70(16): 1923-34.
- 11 Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97(17): 9487-92.
- 12 Simons K, E Ikonen. How cells handle cholesterol? *Science* 2000; 290(5497): 1721-26.
- 13 Park KH, Yang HB, Kim HG, Lee YR, Hur H, Kim JS, *et al.* Low density lipoprotein inactivates *vibrio vulnificus* cytolysin through the oligomerization of toxin monomer. *Med Microbiol Immunol* 2005; 194(3): 137-41.
- 14 Uwe K, Gerald G, Falk F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with β -cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 1995; 34(42): 13784-93.
- 15 Patricia GY, Wendi VR, Elisabeth PC, Genevieve WS, William JJ, Michael CP, *et al.* Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *Biol Chem* 1996; 271(27): 16026-34.
- 16 Heuck AP, Hotze E, Tweten RK, Johnson AE. Mechanism of membrane insertion of a multimeric barrel protein: perfringolysin O creates a pore using ordered and coupled conformational changes. *Mol Cell* 2000; 6(5): 1233-42.
- 17 Rottem S, Cole RM, Habig WH, Barile MF, Hardegree MC. Structural characteristics of tetanolysin and its binding to lipid vesicles. *J Bacteriol* 1982; 152(2): 888-92.
- 18 Palmer M. Cholesterol and the activity of bacterial toxins. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 238(2): 281-9.

Membrane Cholesterol Influences the Activity of Recombinant *Vibrio Vulnificus* Hemolysin

Hui Ding¹, Li-Ni Pan¹, Qiu Guo¹, Yong-Liang Lou^{1*}, Jie Yan², Yue Wu¹, Fu-Le Wang¹

(¹Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, School of Medical Lab Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; ²Department of Medical Microbiology and Parasitology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract To study the effect of membrane cholesterol on the activity of recombinant *Vibrio vulnificus* hemolysin (rVvhA). Before treated with rVvhA, J774A.1 cells were incubated with 5 mmol/L M β CD for 30 min to remove cholesterol from cells. After rVvhA treatment, the cell viability was determined by MTT assay. The intracellular [Ca²⁺] was determined using Fluo-3 AM fluorescent probe combined with Laser scanning confocal microscope, the release of cellular K⁺ into reaction medium and the cell apoptosis were detected according to detect kit instructions. The results showed cell pretreated with M β CD increased the cell viability, blocked rVvhA induced Ca²⁺ influx and K⁺ release, and inhibited the rVvhA induced-apoptosis. In conclusion, membrane cholesterol is required for activity of rVvhA, the depletion of cholesterol can inhibited the activity of rVvhA.

Key words *Vibrio vulnificus*; hemolysin; M β CD; cholesterol

Received: April 16, 2010

Accepted: August 25, 2010

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

*Corresponding author. Tel: 13857772709, E-mail: lyl@wzmc.net