

• 综 述 •

创伤弧菌溶细胞素诱导细胞凋亡的研究现状及展望

江闰德 综述, 郑里翔 审校
(江西中医药大学, 江西南昌 330004)

关键词: 创伤弧菌溶细胞素; 细胞凋亡; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.12.051

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)12-1759-02

创伤弧菌溶细胞素(Vvc)是创伤弧菌唯一分泌至细胞外, 具备创伤弧菌种属特征性的细胞外蛋白质^[1]。其由结构基因 VvhA 编码, 相对分子质量为 $50\ 851 \times 10^3$, 水溶性好, 对热不稳定^[2-3]。创伤弧菌溶细胞素的活性和毒素非常强, 是创伤弧菌引发细胞、组织损伤的重要毒力因子之一。实验证明, 每毫克纯化的 Vvc 活力可达 81 000 溶细胞单位(81 000 HU/mg)。通过小鼠尾静脉注射毫克级以下水平的 Vvc, 结果可导致试验小鼠的死亡^[4]。有关创伤弧菌溶细胞素诱导细胞凋亡的作用以及机制已有大量研究, 本文将近年来相关研究作一综述。

1 创伤弧菌溶细胞素诱导细胞凋亡

细胞凋亡或程序性死亡(PCD)是由基因控制的自主性程序性死亡。凋亡在形态学上表现为, 细胞出现皱缩, 胞浆空泡化, 胞膜出泡, 染色质浓缩和出现凋亡小体等特征性改变。细胞发生凋亡的中心环节是激发了蛋白酶组成的级联反应, 其过程大概分为如下几个阶段: (1) 在体内、外因素的作用下, 刺激细胞接受凋亡信号; (2) 凋亡各级调控分子间起相互作用; (3) 蛋白水解酶被活化; (4) 最终引起含半胱天冬蛋白酶级联反应^[5]。整个过程分启动和执行两个阶段。启动阶段是指细胞在感受到相应的信号刺激后, 细胞内的一系列控制的开关出现开启或关闭。不同的刺激启动细胞死亡之路的最初方式可能不同。其中, 有两个通路当前研究的比较清楚: (1) 膜受体通路, 比如 Fas-FasL; (2) 细胞色素 C (CytC-c) 释放以及 Caspase 激活的生物化学通路。细胞凋亡的执行过程是级联式基因表达的结果, 其过程表现为 Caspase 不可逆性的有限水解底物的级联放大反应。放大途径主要包括两条: 由 Fas/FasL 启动的 FADD-Caspase-8/3 途径和由线粒体损伤引起的 CytC-Caspase-9/3 途径^[6-8]。已有研究表明, 创伤弧菌溶细胞素可以诱导人脐静脉内皮细胞、人淋巴 (Jurkat T) 细胞、小鼠腹膜巨噬细胞及小鼠肺内皮细胞等细胞的凋亡^[9-14]。同时也有研究发现, 创伤弧菌溶细胞素能诱导肿瘤细胞的细胞凋亡, 如人肝癌细胞株 (SMMC-7721) 的凋亡^[15]。

2 创伤弧菌溶细胞素诱导细胞凋亡的机制

目前认为, 创伤弧菌诱导宿主的细胞凋亡的主要机制与线粒体途径有关。王波等^[16]在重组溶细胞素(rVvhA)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)凋亡的作用及机制的研究中发现: (1) rVvhA 可以抑制 HUVEC 的生长; (2) 通过测定 HUVEC 经 4.0 HU/ml rVvhA 作用 1 h 后 Caspase-3 Caspase-8 和 Caspase-9 的活性时, 发现 rVvhA 诱导 HUVEC 凋亡的过程中, Caspase-3 Caspase-9 活性均增加且有时间依赖性; (3) Caspase-3 Caspase-9 的抑制剂可以使 rVvhA 降低 HUVEC 的凋亡率, 同时也可导致 Caspase-3 Caspase-9 活性降低。这也进一步证明了 rVvhA 诱导 HUVEC 凋亡的机制可能与

线粒体有关, 也有其他类似研究报道。有研究者在实验中利用 1.5 HU/mL rVvhA 作用于人淋巴 (Jurkat T) 细胞 3~4 h 后, Jurkat T 细胞发生明显的凋亡反应, Caspase-3 酶的活性达到峰值, 其杀伤效果与杀伤 HUVEC 及人脐静脉内皮细胞株 (ECV304) 相比, 对淋巴细胞显得更为敏感。

更细致的研究表明, 创伤弧菌溶细胞素通过 3 种方式启动 CytC-c 释放以及 Caspase 激活的生物化学通路诱导细胞凋亡: (1) Vvc 诱导产生超氧阴离子, 引起细胞凋亡。Kwon 等^[17]在 Vvc 作用于 ECV304 细胞的研究中发现, 当 Vvc 的作用浓度达到 0.4 HU/ml 时, ECV304 细胞出现凋亡, 在凋亡的过程中细胞内产生大量超氧阴离子、释放 CytC-c, 同时 Caspase-3 被激活以及 DNA 发生了断裂。检测时还发现, 凋亡细胞的超氧阴离子、CytC-c 和 Caspase-3 的活性分别在 5 min、3 h 和 6 h 达到高峰。进而推测, 可能是 Vvc 可以诱导大量超氧阴离子的产生, 大量的超氧阴离子又可引起线粒体膜的通透性发生变化, 从而促进了 CytC-c 从线粒体中释放、激活 Caspase-3 并启动了由线粒体损伤引起的 CytC-c Caspase-9/3 途径的细胞凋亡机制, 最终导致 DNA 片段的断裂、裂解, ECV304 细胞发生凋亡。研究中用超氧阴离子的清除剂 TEMPO 或线粒体膜通透转运抑制剂环素 A (CSA) 进行预先阻断时, 则 ECV304 的凋亡可以得到抑制。同时实验也观察到, 如果加入 Caspase-3 抑制剂, 也可明显抑制细胞的凋亡, 但加入 Caspase-1 抑制剂, 细胞凋亡没有任何变化, 这表明 Caspase-3 是介导 Vvc 诱导细胞凋亡的关键因子。(2) Vvc 介导钙离子内流, 诱导细胞凋亡。钙离子是细胞凋亡的信号分子, 在很多因素诱导的凋亡的信号转导过程中都扮演着重要的角色。Vvc 可以通过在靶细胞膜上的形成微孔, 使大量膜外钙离子内流, 从而增加膜内的钙离子浓度, 启动细胞凋亡的机制; 如果加入糖皮质激素或钙离子透入剂 A23187 则可以诱导细胞凋亡证明 Vvc 是一种膜成孔毒素^[18]。(3) Vvc 可通过刺激细胞形成大量一氧化氮合酶 (NOS), 引起细胞凋亡。有研究者用纯化的 Vvc 作用于小鼠腹膜巨噬细胞使其产生 NOS 时发现, (1) Vvc 可诱导小鼠腹膜巨噬细胞产生 NO; (2) 如果将 Vvc 进行预热处理, 降低 Vvc 的活性, 则 Vvc 失去诱导 NO 产生的能力; (3) Vvc 的浓度在刚好使其具有在细胞膜上打孔并形成孔道的范围内, 诱导 NO 产生的能力最强, 而在较高的浓度时, 由于导致了细胞内大量的 ATP 丢失, 则 Vvc 没有诱导 NO 合成的作用^[19-22]。这些发现均表明 NOS 和 NO 可能作为一种毒性因子, 在创伤弧菌感染宿主过程中可能发挥重要作用。

3 创伤弧菌溶细胞素诱导细胞凋亡的研究展望

肿瘤特别是恶性肿瘤组织的快速增大不仅有细胞过度增生, 还有细胞死亡过低, 是细胞增生和死亡调控异常导致其平

衡失调的综合性结果。创伤弧菌溶细胞素对宿主细胞具有细胞毒性并能诱导宿主细胞凋亡。肺是创伤弧菌毒素作用的靶器官之一。那来自肺及支气管上皮细胞的肺癌细胞,是否也对创伤弧菌溶细胞素敏感并能被创伤弧菌毒素杀伤?探讨创伤弧菌溶细胞素对肺癌细胞的杀伤作用并对其作用机制进行深入的研究具有理论和临床意义。

参考文献

- [1] Boardman BK, Satchell KJ. *Vibrio cholerae* strains with mutations in an atypical type I secretion system accumulate RTX toxin intracellularly[J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(1): 8137-8143.
- [2] Grau BL, Henk MC, Garrison KL, et al. Further characterization of *Vibrio vulnificus* rugose variants and identification of a capsular and rugose exopolysaccharide gene cluster [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(4): 1485-1497.
- [3] Grau BL, Henk KL, Garrison, et al. Further characterization of *Vibrio vulnificus* rugose variants and identification of a capsular and rugose exopolysaccharide gene cluster [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(1): 1485-1497.
- [4] Kwon KB, Yang JY, Ryu DG, et al. *Vibrio vulnificus* cytotoxin induces superoxide anion-initiated apoptotic signaling pathway in human ECV304 cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(50): 47518-47523.
- [5] 于广丽, 王海磊, 程彦伟, 等. 细胞凋亡效应期的三个关键关卡 [J]. *河南师范大学学报: 自然科学版*, 2003, 31(4): 83-88.
- [6] Wei Y, Fan T, Yu M. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008, 40(4): 278-288.
- [7] Pinkoski MJ, Brunner T, Green DR, et al. Fas and Fas ligand in gut and liver [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 278(3): 354-366.
- [8] Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, et al. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(9): 1423-1433.
- [9] 桂静, 朱晔晶, 楼永良. 创伤弧菌溶细胞素 *vvhA* 融合蛋白细胞毒活性相关分子机制的探讨 [J]. *检验医学教育*, 2010, 17(2): 43-48.
- [10] 桂静, 肖美英, 楼永良, 等. 创伤弧菌溶细胞素融合蛋白重组、表达与细胞毒活性鉴定 [J]. *细胞生物学杂志*, 2008, 30(1): 89-94.
- [11] Zhao JF, Sun AH, Ruan P, et al. *Vibrio vulnificus* cytotoxin induces apoptosis in HUVEC, SGC-7901 and SMMC-7721 cells via

caspase-9/3-dependent pathway [J]. *Micro Pathog*, 2009, 72(7): 136-140.

- [12] 姚蔚, 谢旦立, 郭雅君, 等. 创伤弧菌溶细胞素融合蛋白诱导人 Jurkat-T 淋巴细胞凋亡的研究 [J]. *温州医学院学报*, 2011, 41(4): 332-336.
- [13] Lee YR, Park KH, Lin ZZ, et al. A calcium-calmodulin antagonist blocks experimental *Vibrio vulnificus* cytotoxin-induced lethality in an experimental mouse model [J]. *Infect Immun*, 2004, 72(10): 6157-6159.
- [14] Kashimoto T, Ueno S, Hanajima M, et al. *Vibrio vulnificus* induces macrophage apoptosis in vitro and in vivo [J]. *Immunology*, 2003, 71(1): 533-535.
- [15] 屠艳辉, 刘艳飞, 陈建林, 等. *rvvhA* 作用于 THP-1 细胞 NF- κ B 信号通路的研究 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2012, 34(2): 154-161.
- [16] 王波, 丁卉, 谢旦立, 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机制 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32(1): 103-105.
- [17] Kwon KB, Yang JY, Ryu DG, et al. *Vibrio vulnificus* cytotoxin induces superoxide anion-initiated apoptotic signaling pathway in human ECV304 cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(50): 47518-47523.
- [18] Kim BS, Kim JS. Cholesterol induces oligomerization of *Vibrio vulnificus* cytotoxin specifically [J]. *Exp Mol Med*, 2002, 34(3): 239-242.
- [19] Kim JS, Chae MR, Chang K, et al. Cytotoxicity of *Vibrio vulnificus* cytotoxin on rat peritoneal mast cells [J]. *Microbiol Immunol*, 1998, 42(12): 837-843.
- [20] Kang MK, Jhee EC, Koo BS, et al. Induction of nitric oxide synthase expression by *Vibrio vulnificus* cytotoxin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290(3): 1090-1095.
- [21] Yamanaka H, Sugiyama K, Furuta H, et al. Cytolytic action of *Vibrio vulnificus* haemolysin on mast cells from rat peritoneal cavity [J]. *J Med Microbiol*, 1990, 32(1): 39-43.
- [22] Kang MK, Jhee EC, Koo BS, et al. Induction of nitric oxide synthase expression by *Vibrio vulnificus* cytotoxin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290(3): 1090-1095.

(收稿日期: 2015-02-17)

• 综 述 •

深度烧伤创面细菌学检查及消毒剂的应用现状

王丽娟¹综述, 李武平²审校, 徐修礼²

(1. 西安医学院护理学院, 陕西西安 710021; 2. 第四军医大学西京医院, 陕西西安 710032)

关键词: 烧伤; 病原菌; 消毒剂

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.12.052

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)12-1760-03

烧伤是日常生活中最普遍和最具破坏性的外伤之一,泛指由热力、电流、激光、化学物质、放射线等所致的组织损害^[1]。美国国家烧伤和预防控制中心的统计数据表明,每年大概有 5 000 人死于烧伤相关性并发症,烧伤面积大于 40% 的严重烧伤患者死亡原因 75% 为烧伤创面感染、吸入性损伤和其他感

染性并发症^[2]。在我国,某军医大学统计资料显示,9 329 例烧伤患者中,死亡原因为感染的占死亡病例总数的 52%^[3]。烧伤面积越大、越深、程度越严重,感染的机会也越多、越重,并且感染的危险将持续至创面完全愈合^[4]。烧伤创面的清洁消毒在烧伤治疗控制感染中起着极其重要的作用^[5]。各医疗机构