

哈氏弧菌 345 III型分泌系统诱导鱼类细胞凋亡和变圆

吴颖^{1,2}, 邓益琴³, 张策^{1,2}, 李席席^{1,2}, 张晨^{1,2}, 梁思轩^{1,2}, 徐雪峰^{1,2}, 赵哲^{*1,2}

1 河海大学江苏省海洋生物资源可持续利用工程研究中心, 江苏 南京 210024

2 河海大学海洋学院海洋生物系, 江苏 南京 210024

3 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300

吴颖, 邓益琴, 张策, 李席席, 张晨, 梁思轩, 徐雪峰, 赵哲. 哈氏弧菌 345 III型分泌系统诱导鱼类细胞凋亡和变圆[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 779-791.

WU Ying, DENG Yiqin, ZHANG Ce, LI Xixi, ZHANG Chen, LIANG Sixuan, XU Xuefeng, ZHAO Zhe. Type III secretion system of *Vibrio harveyi* induces rapid apoptosis and cell rounding of fish cells[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 779-791.

摘要: 【背景】哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是一种革兰氏阴性细菌,也是海洋动物的重要条件致病菌之一。III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)是革兰氏阴性致病菌中保守存在的毒力装置,已被公认在细菌致病过程中起着关键作用。【目的】探索哈氏弧菌 T3SS 诱导鱼类细胞死亡的机制。【方法】采用基因敲除和回补手段获得了 T3SS 功能缺失的哈氏弧菌 345 的缺失突变和回补株。利用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色、原位末端转移酶标记技术(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteinylnyl aspartate specific proteinase, Caspase)活性测定和 lactate dehydrogenase (LDH)释放测定等技术揭示哈氏弧菌 T3SS 导致的细胞死亡特征。【结果】哈氏弧菌 345 依赖 T3SS 能迅速导致鱼类细胞变圆并脱落,细胞核皱缩,部分细胞呈现 DNA 片段化、形成凋亡小体,细胞凋亡关键分子 Caspase-3 被激活;此外,哈氏弧菌 T3SS 还导致鱼类细胞的细胞膜通透性改变,LDH 等内容物被释放,并且抑制凋亡途径的激活并不能阻止细胞内容物的释放和细胞变圆。【结论】哈氏弧菌利用 T3SS 体外诱导鱼类细胞发生细胞凋亡途径的激活和细胞变圆,最终导致细胞发生死亡。

关键词: 哈氏弧菌; III型分泌系统; *vcrD* 基因; 细胞凋亡

资助项目: 国家自然科学基金(31872597); 江苏省海洋科技创新项目(JSZRHYKJ202209); 江苏省农业科技自主创新资金(CX[23]1007)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31872597), the Innovation Project for Marine Science and Technology of Jiangsu Province (JSZRHYKJ202209), and the Jiangsu Agricultural Science and Technology Independent Innovation Fund (CX[23]1007).

*Corresponding author. E-mail: zhezhaoh@hhu.edu.cn

Received: 2023-09-09; Accepted: 2023-10-27; Published online: 2023-12-12

Type III secretion system of *Vibrio harveyi* induces rapid apoptosis and cell rounding of fish cells

WU Ying^{1,2}, DENG Yiqin³, ZHANG Ce^{1,2}, LI Xixi^{1,2}, ZHANG Chen^{1,2}, LIANG Sixuan^{1,2}, XU Xuefeng^{1,2}, ZHAO Zhe^{*1,2}

1 Jiangsu Province Engineering Research Center for Marine Bio-resources Sustainable Utilization, Hohai University, Nanjing 210024, Jiangsu, China

2 Department of Marine Biology, College of Oceanography, Hohai University, Nanjing 210024, Jiangsu, China

3 Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Development & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, Guangdong, China

Abstract: [Background] *Vibrio harveyi* is a Gram-negative marine bacterium that has been recognized as an opportunistic pathogen for marine animals. The type III secretion system (T3SS) is a highly-conserved virulence apparatus used by Gram-negative bacterial pathogens to cause infections. [Objective] To decipher the mechanism of T3SS of *V. harveyi* in inducing the death of fish cells. [Methods] The T3SS dysfunctional mutant was established by the in-frame deletion of *vcrD* in *V. harveyi* strain 345, and then its complemented mutant was constructed. The wild type and mutant strains were used to infect FHM cells, and then DAPI staining, *in situ* detection of fragmented DNA (TUNEL assay), Caspase activity assay, and lactate dehydrogenase (LDH) release assay were carried out to reveal the features of cell death. [Results] Dying cells exhibited the features such as cell rounding, nuclear condensation, and DNA fragmentation of apoptotic cells. Caspase-3 was activated by the T3SS, which confirmed that the infection with *V. harveyi* rapidly induced T3SS-dependent apoptosis in fish cells. Furthermore, the infection with *V. harveyi* strain 345 led to release of cellular contents including LDH from infected fish cells. Importantly, the inhibition of apoptosis did not prevent cells from releasing cellular contents or rounding. [Conclusion] *V. harveyi* uses T3SS to induce the activation of apoptosis pathways and the rounding of fish cells, ultimately leading to cell death.

Keywords: *Vibrio harveyi*; type III secretion system; *vcrD* gene; cell apoptosis

弧菌(*Vibrios* sp.)是一种广泛分布于海洋和河口环境中的革兰氏阴性细菌。弧菌属中被鉴定的成员已超过 120 种, 其中一些弧菌种类被认为是人类和海洋动物的病原体^[1], 它们在世界范围内引起了被称为“弧菌病”的细菌性疾病。哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)所引起的暴发性弧菌病是危害水产养殖动物最严重的疾病之一^[2], 其可感染多种野生及养殖海洋动物^[3], 包括鱼类和甲壳类^[4]等, 如哈氏弧菌感染杂交石斑鱼幼

体后在早期阶段表现出厌食、适应性和活力下降等症状, 造成的累积死亡率达 90%^[5]。然而, 目前关于哈氏弧菌毒力因子及其致病机理的研究相当有限, 也缺乏有效的防控策略来预防感染。因此, 开展哈氏弧菌与宿主细胞的相互作用对揭示其感染机制具有重要意义。

III 型分泌系统(type III secretion system, T3SS)是许多革兰氏阴性致病菌的关键毒力装置, 负责分泌与细菌毒力相关的多种效应蛋白,

将其从细菌直接转运到宿主细胞胞质内, 调节或干扰宿主细胞的正常代谢、免疫反应和生长死亡等信号通路进而发挥毒力作用^[6-7]。细胞死亡是病原菌 T3SS 对宿主致病过程中所引起最常见结果, 在耶尔森氏菌(*Yersinia*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、志贺氏菌(*Shigella*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等致病菌中都已经证实其编码的 T3SS 介导宿主细胞死亡^[8-10]。尽管 T3SS 的结构蛋白在不同细菌中相当保守, 但是效应蛋白存在较大差别, 甚至同一科或同一种的不同成员间也有一定差异; 因此, 不同细菌感染所造成细胞死亡的途径也不尽相同^[11]。目前有关病原细菌诱导宿主细胞死亡的途径有细胞凋亡(apoptosis)、坏死性凋亡(necroptosis)、自噬(autophagy)、细胞焦亡(pyroptosis)和坏死(necrosis)^[12-14]。

像其他革兰氏阴性病原菌一样, 弧菌也有 T3SS, 研究较早也较为清楚的为副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*) T3SS。在副溶血弧菌临床株 RIMD2210633 中发现存在两套不同的 T3SS 基因簇, 分别为 T3SS1 和 T3SS2^[15], 其中 T3SS1 负责细胞毒性^[16], 诱导细胞出现自噬性死亡; 而 T3SS2 负责副溶血弧菌的肠毒性^[17]。随后的研究证实 T3SS1 通过分泌至少 3 种效应蛋白(VopQ、VPA0450 和 VopS)相互协同发挥细胞毒性作用^[18]; 在感染早期, 效应蛋白 VopQ 在溶酶体膜上形成一个小孔, 破坏宿主细胞内的离子稳态和自噬流, 促使宿主细胞发生自噬^[19]; 在感染中期, 效应蛋白 VPA0450 水解质膜上磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(PIP₂)上的 5'磷酸, 进而影响膜结合肌动蛋白细胞骨架和降低膜稳定性而引起细胞膜起泡^[20]; 同时效应蛋白 VopS 将单磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)共价连接到 Rho 鸟苷三磷酸酶(GTP 酶)的苏氨酸残基羟基上, 使 Rho GTP 酶失活, 导致细胞骨架

塌陷和细胞变圆^[21-22]; 在感染晚期, 由于宿主细胞细胞膜的破裂使其细胞内容物释放, 最终表现出细胞变圆、自噬和细胞裂解等所观察到的细胞死亡现象^[23]。然而, 有关哈氏弧菌 T3SS 与细胞死亡互作研究鲜见报道。

哈氏弧菌 VcrD 是构成其 T3SS “针状结构”的内膜蛋白, 对 T3SS 结构组装是必需的。研究表明, 将副溶血性弧菌 RIMD2210633 的 *vcrD* 基因突变后 T3SS 效应蛋白分泌功能丧失^[24]。因此, 本研究通过对哈氏弧菌 *vcrD* 基因进行敲除和回补试验, 以研究哈氏弧菌 T3SS 与鱼类细胞死亡的关系, 并进一步通过 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色、原位末端转移酶标记技术(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)标记和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteinyI aspartate specific proteinase, Caspase)活性检测等不同方法分析哈氏弧菌 T3SS 诱导鱼类细胞死亡的机制, 研究结果为揭示哈氏弧菌感染机理和致病机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

哈氏弧菌 345^[25]由中国水产科学研究院南海水产研究所冯娟组惠赠; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) GEB883^[26]和质粒 pSW7848^[27]分别由 Annick Jacq 和 Didier Mazel 惠赠; 胖头鲤细胞(fathead monnow, FHM)和质粒 pMMB207 由本实验室保存。

LBS 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母膏粉 5.0, 葡萄糖 1.0, 氯化钠 30.0; M199 培养液(pH 7.0-7.4): 酚红, 2 200 mg/L 碳酸氢钠, 100 mg/L L-谷氨酰胺, 1 000 mg/L D-葡萄糖, Earle'S 混合盐。

PrimeSTAR[®] GXL Premix Fast Dye plus 高保

真聚合酶, TaKaRa 公司; Caspase 活性检测试剂盒、免疫染色强力通透液、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒和 Z-DEVD-FMK, 上海碧云天生物技术股份有限公司; 细菌基因组快速抽提试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 细胞毒检测试剂盒, Roche 公司; 星形孢菌素, MedChemExpress 公司。全波长多功能酶标仪, TECAN 公司; 微量紫外分光光度计, METTLER TOLEDO 公司; 倒置荧光显微镜, Carl Zeiss 公司。

1.2 哈氏弧菌基因缺失株和回补株的构建

参考文献[28]构建哈氏弧菌缺失突变菌株 $\Delta vcrD$ 。使用引物对 pSW7848-F/R (表 1) 扩增线性化自杀质粒 pSW7848, 同时使用引物对 *vcrD*-UP-F/R 和 *vcrD*-DOWN-F/R 扩增 *vcrD* 上、下游同源臂片段, 用细菌基因组快速抽提试剂盒提取哈氏弧菌 345 基因组 DNA 作为 PCR 模板, PCR 反应体系和条件按照 PrimeSTAR[®] GXL Premix Fast Dye plus 高保真聚合酶说明书操作。通过等温组装线性化质粒片段和上、下游同源臂片段的方法构建重组自杀质粒 pSW7848- $\Delta vcrD$, PCR 测序验证后, 利用接合型大肠杆菌 GEB883 通过 pSW7848- $\Delta vcrD$ 转移至哈氏弧菌 345 中。分别通过氯霉素和阿拉伯糖进行二次筛选, 最

终获得 *vcrD* 缺失突变株, 将其命名为 $\Delta vcrD$ 。

回补株构建过程: 使用特异引物 *vcrD*-F 和 *vcrD*-R 扩增哈氏弧菌 345 *vcrD* 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列, 并将其克隆到质粒 pMMB207 中, 构建得到重组质粒 pMMB207-*vcrD*。通过接合菌 GEB833 将重组质粒 pMMB207-*vcrD* 转移至缺失突变株 $\Delta vcrD$ 中, 获得回补突变株 $\Delta vcrD$:pMMB207-*vcrD*。

1.3 鱼类细胞系和感染

FHM 细胞用于哈氏弧菌 345 及其突变株的感染。FHM 细胞传代所用培养基为含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 M199 培养基, 培养温度为 28 °C; 细菌感染时 M199 培养基中补加 1% 4-羟乙基哌嗪乙磺酸和 1% FBS, 并根据需要将细胞传至细胞培养板中 28 °C 培养。培养过夜的哈氏弧菌用 LBS 稀释至 OD_{600} 约为 0.5 后, 取适量的菌液接种至长满单层的 FHM 中, 使感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 达到 100。

1.4 DAPI 染色

哈氏弧菌 345、 $\Delta vcrD$ 和 $\Delta vcrD$:pMMB207-*vcrD* 感染 FHM 细胞 2 h 后, 用 PBS 轻轻漂洗, 然后用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min。PBS 洗

表 1 哈氏弧菌 345 *vcrD* 缺失突变株与回补株构建所用引物

Table 1 The primers used for generating *vcrD* deletion mutant strain and the complemented strain in *Vibrio harveyi* 345

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
pSW7848-F	GTCTGATTCGTTACCAATTATGACAAC
pSW7848-R	GAATTCGATATCAAGCTTATCGATAC
<i>vcrD</i> -UP-F	CACTAGTGACGCGTACTCGAGTACGACTCAGCAGCGACTTCAG
<i>vcrD</i> -UP-R	CCCAGCGGTTGAATATCCAACTTTGTTTAGAATATCGAT
<i>vcrD</i> -DOWN-F	ATCGATATTCTAAACAAAGTTGGAATATTC AACCGCTGGG
<i>vcrD</i> -DOWN-R	GATACCGTCGACCCTCGAGGATACCTATCTTAAAGCGAAGCATC
check- <i>vcrD</i> -F	TCTGGTTCGTTACACA
check- <i>vcrD</i> -R	TCGTTGCCCGAGC
<i>vcrD</i> -F	GCTCGGTACCCGGGGATCCATGAATAAGTTGATCGATATTCTAAAC
<i>vcrD</i> -R	TCTAGAGGATCCTTACTTGTTCATCGTCATCCTTGTAATCTATTCTTA

涂细胞 2 次后, 使用荧光染料 DAPI 避光染色 30 min。星形孢菌素(staurosporine, STS)是一种非特异性蛋白激酶抑制剂, 能够诱导多种类型细胞凋亡^[29]。作为细胞凋亡的阳性对照, 2.5 $\mu\text{mol/L}$ STS 处理 FHM 细胞 2 h, 按同样步骤染色。使用倒置荧光显微镜观察细胞并拍照。

1.5 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放的测定

哈氏弧菌 345 和 $\Delta vcrD$ 分别感染 FHM 细胞, 并在不同时间点(0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 h)对感染后的细胞进行胞外 LDH 含量测定, 测定方法参考细胞毒检测试剂盒说明书。设置背景对照孔, 即只含有培养液; 最低对照孔, 即含正常细胞; 最高对照孔, 即加入细胞裂解液将细胞全部裂解, 内容物全部释放。在酶标仪上选择滤片 490 nm 测定吸光值。细胞毒性计算公式:

细胞毒性(%)=(试验组值-最高对照值)/(最高对照值-最低对照值) $\times 100$

1.6 原位末端转移酶标记技术

细胞核片段化检测使用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒。具体步骤如下: 哈氏弧菌 345 和 $\Delta vcrD$ 感染 FHM 细胞 2 h 后, 用 4%多聚甲醛室温固定 1 h, 然后用 PBS 漂洗 2 次, 每次 5 min。加入免疫染色强力通透液, 室温孵育 5 min, 用 PBS 再漂洗 2 次后加入 50 μL TUNEL 反应液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h。PBS 洗 3 次后在倒置荧光显微镜下观察。2.5 $\mu\text{mol/L}$ 星形孢菌素处理 FHM 细胞作为阳性对照。

1.7 Caspase-1 和 Caspase-3 活性的测定

使用 Caspase 活性检测试剂盒检测哈氏弧菌感染后细胞内 Caspase-1 和 Caspase-3 的活性。FHM 细胞收集细胞后 PBS 漂洗 1 次, 加入 100 μL /孔的细胞裂解液冰上裂解 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、17 000 r/min 离心 10 min, 取上清液直接测定或

-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。测定步骤如下: 取 50 μL 细胞裂解上清, 加入 40 μL 反应液检测, 然后再分别加入 10 μL DEVD-pNA 或 YVAD-pNA 底物, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1-2 h。细胞裂解液、反应液及底物均来源于 Caspase 活性检测试剂盒。在酶标仪上使用滤片 405 nm 测定吸光值。同时设置 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 星形孢菌素处理 FHM 细胞作为阳性对照, 未感染细胞作为阴性对照。

1.8 Caspase 抑制剂处理

哈氏弧菌感染前 1 h 使用 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Caspase-3 特异抑制剂 Z-DEVD-FMK 预处理 FHM 细胞; 然后按照 1.3 描述的细胞感染方法进行, 在感染不同时间点进行 TUNEL 和 LDH 检测, 以进一步分析 Caspase 对哈氏弧菌诱导鱼类细胞死亡中的作用。

1.9 统计分析

本研究所有试验均重复 3 次, 应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图, 数据用平均值 \pm 标准差表示, 利用 t 检验比较试验数据的差异。

2 结果与分析

2.1 哈氏弧菌 *vcrD* 的缺失突变株和回补株

T3SS 基因簇一般由 30-40 个基因组成, 分为结构蛋白基因、效应蛋白基因、调控蛋白基因和伴侣蛋白基因等。*vcrD* 是 T3SS 的结构蛋白基因, 编码 T3SS 的内膜蛋白 VcrD, 对 T3SS 的组装是必需的^[30]。为研究哈氏弧菌 T3SS 在诱导鱼类细胞死亡中的作用, 本研究首先构建了哈氏弧菌 345 *vcrD* 的缺失突变株和回补株。PCR 检测结果如图 1A 所示, 在 345 野生株中可扩增出预期大小的 2 370 bp 片段, 而 *vcrD* 缺失株仅扩增出 269 bp 的片段(图 1A), 表明已在哈氏弧菌 345 的基因组中成功敲除 *vcrD*。同时, 使用回补载体的引物进行 PCR 检测, 结果显示, 回补株可扩增得到 2 687 bp 的目的片段, 表明

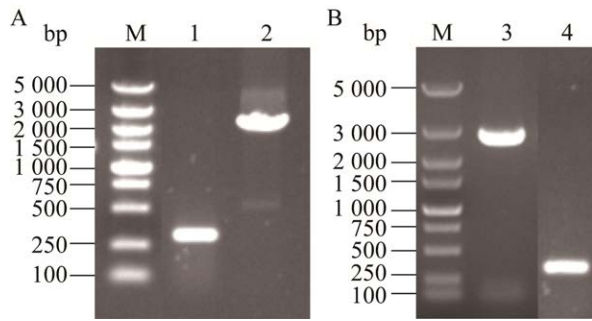


图1 *vcrD* 缺失株(A)和回补株(B)的 PCR 鉴定结果图

Figure 1 PCR identification of *vcrD* deletion (A) and complemented strains (B). M: DL5000 DNA Marker; 1: $\Delta vcrD$; 2: Wild type; 3: $\Delta vcrD$:pMMB207-*vcrD*; 4: GEB883:pMMB207.

其已含有重组表达载体 pMMB207-*vcrD*, 而带有空载质粒 pMMB207 的 GEB883 扩增出 317 bp 片段(图 1B)。

2.2 哈氏弧菌 T3SS 参与诱导鱼类细胞死亡

为研究哈氏弧菌 T3SS 是否参与诱导鱼类细胞死亡, 将 345 野生型菌株、缺失突变株 $\Delta vcrD$ 和回补株分别感染 FHM 2 h 后在倒置荧光显微镜观察显示, 野生型菌株感染的鱼类细胞几乎所有的细胞都出现皱缩和变圆的现象, 甚至出现聚团脱落, 并且许多细胞呈现破裂的表型(图 2A), 与阳性对照星形孢菌素所处理的细胞表现出的表型一致(图 2B)。但此时 $\Delta vcrD$ 感染的细胞仍然保持正常的细胞单层(图 2C), 与正常细胞对照的表型类似(图 2D); 而在缺失突变株中回补 *vcrD* 后恢复了野生型菌株诱导的细胞死亡表型(图 2E)。以上结果表明哈氏弧菌 345 的 T3SS 参与诱导鱼类细胞的死亡。

2.3 哈氏弧菌 T3SS 介导的鱼类死亡呈现出凋亡的特征

为进一步分析 T3SS 诱导鱼类细胞死亡的特征, 首先使用了细胞核染料 DAPI 染色感染细胞并观察细胞核形态变化。荧光显微镜观察

显示野生型菌株和回补菌株感染细胞 2 h 后, 其细胞核出现浓缩, 并且部分细胞的细胞核发生片段化(图 2F), 这与凋亡诱导剂星形孢菌素处理的细胞核形态类似(图 2G)。相反地, 缺失突变株 $\Delta vcrD$ 感染的细胞其细胞核与正常对照细胞保持完整(图 2H、2I), 且在缺失突变株中回补 *vcrD* 后恢复了野生型菌株诱导的细胞核片段化的表型(图 2J)。为了探究上述细胞核片段化的细胞是否发生 DNA 断裂, 我们进行了 TUNEL 检测。荧光显微观察显示(图 3), 其结果与 DAPI 染色一致, 正常对照细胞和 $\Delta vcrD$ 感染的细胞中几乎检测不到 TUNEL 阳性信号; 而在野生型菌株感染和星形孢菌素处理的细胞都有大量的 TUNEL 阳性信号, 阳性率分别约 64% 和 28%。综上所述, 哈氏弧菌 T3SS 诱导的鱼类细胞死亡呈现出凋亡的特征。

2.4 哈氏弧菌 T3SS 激活了鱼类细胞的 Caspase-3

除了凋亡细胞会出现核浓缩和 DNA 片段化特征外, 发生细胞焦亡(pyroptosis)的细胞也同样会有类似的表型^[31]。但激活 Caspase-1 是细胞焦亡的标志, 而激活 Caspase-3 是细胞凋亡的标志。因此, 为分析哈氏弧菌 T3SS 诱导的细胞死亡是激活了细胞凋亡途径还是细胞焦亡途径, 分别检测了感染细胞内 Caspase-1 和 Caspase-3 的活性。如图 4A、4B 所示, 野生型菌株感染的细胞内其 Caspase-3 活性是对照细胞(未感染)内的 4 倍, 而 $\Delta vcrD$ 感染的细胞中 Caspase-3 活性与对照细胞无明显区别。而对于同样样品检测 Caspase-1 活性, 在不同组中其活性相差无几。以上结果说明哈氏弧菌感染鱼类细胞通过 T3SS 激活了 Caspase-3, 而非 Caspase-1。为进一步确认 Caspase-3 的激活是否对哈氏弧菌 T3SS 诱导的 DNA 片段化必须,

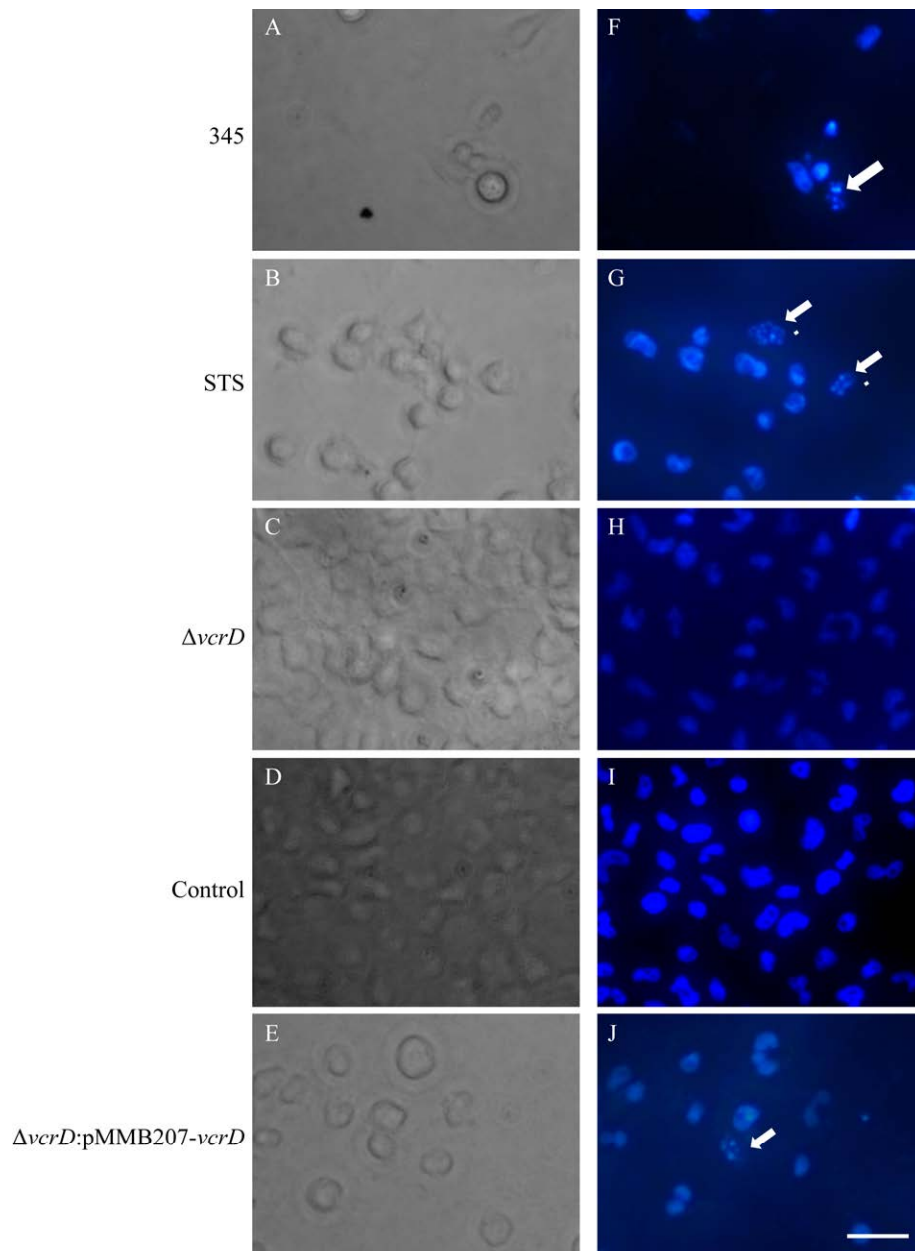


图 2 哈氏弧菌通过 T3SS 诱导鱼类细胞死亡的特征 A、F：细胞感染哈氏弧菌 345。B、G：星形孢菌素 (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 处理的细胞作为阳性对照。C、H： $\Delta vcrD$ 。D、I：正常细胞为阴性对照。E、J： $\Delta vcrD$:pMMB207-*vcrD* 感染细胞。感染 2 h 后，通过荧光染料 DAPI 染色指示细胞核浓缩、片段化，箭头所指为已发生片段化的细胞核。左侧图片所示为白光下观察，右侧图片所示为荧光下观察。标尺：10 μm

Figure 2 *Vibrio harveyi* infection of FHM cells induces nuclear condensation and fragmentation in a T3SS-dependent manner. FHM cells were uninfected (D, I), infected with the wild type 345 (A, F), $\Delta vcrD$ strain (C, H) and $\Delta vcrD$:pMMB207-*vcrD* strain (E, J), or treated with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ STS (B, G). Nuclear condensation and fragmentation were visualized using DAPI to stain nuclei (blue) at indicated time points after infection. Arrows indicate the fragmented nucleus. The image on the left shows the observation under white light, and the image on the right shows the observation under fluorescence. Scale bar: 10 μm .

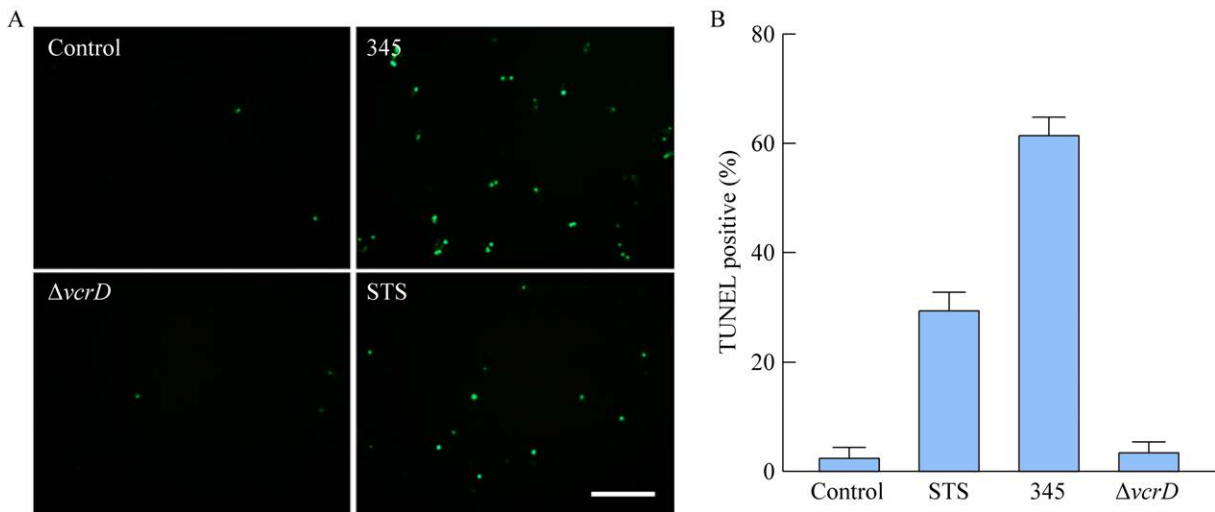


图 3 哈氏弧菌 T3SS 介导的细胞死亡呈现出凋亡细胞的特征 A: TUNEL 技术检测 DNA 片段化, 绿色荧光代表发生 DNA 片段化的细胞. 标尺: 5 μm . B: DNA 片段化的比率分析. 三次重复试验统计分析 DNA 片段化的比率, 每次至少计数 600 个细胞

Figure 3 Dying cells of FHM caused by *Vibrio harveyi* T3SS exhibits apoptotic feature. A: The detection of DNA fragmentation with TUNEL staining by fluorescence microscopy. FHM cells were uninfected, infected with wild type 345 and the $\Delta vcrD$ mutant strain, or treated with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ STS for 2 h. Green fluorescence indicates a positive TUNEL signal and the resulting DNA fragmentation. Scale bar: 0.1 μm . B: The TUNEL positive cells were quantified from three independent experiments, and the data are presented as mean \pm standard error (SE). A minimum of 600 cells were examined for each experiment.

使用 Caspase-3 特异性抑制剂(Z-DEVD-FMK) 预处理细胞后再感染。如图 4C 所示, Caspase-3 被抑制后阻止了哈氏弧菌 T3SS 诱导的 DNA 片段化, 以上结果说明, 哈氏弧菌感染鱼类细胞后利用 T3SS 诱导鱼类细胞死亡的过程, 激活了细胞凋亡途径。

2.5 哈氏弧菌 T3SS 引起不依赖于凋亡途径的 LDH 释放

在哈氏弧菌感染的鱼类细胞中, 部分死亡细胞呈现出裂解的表型(图 2), 提示其细胞膜可能不再完整。为验证上述推测, 我们测定感染不同时间点后培养上清中 LDH 的含量。结果显示在哈氏弧菌野生型菌株感染 30 min 后在培养上清中就检测到 LDH, 随着感染时间的延长, 胞外 LDH 浓度也不断增加; 到感染 2 h 时, LDH

浓度约达到总细胞 LDH 的 80% (图 5A)。与此相反, 在缺失突变株 $\Delta vcrD$ 感染的细胞或是 STS 处理的细胞中其培养上清中的 LDH 的浓度与正常细胞对照无明显差异, 这说明哈氏弧菌感染鱼类细胞时 T3SS 能导致细胞膜的通透性改变, 引起了胞内 LDH 的释放。根据前面结果显示, 哈氏弧菌 T3SS 还发挥诱导鱼类细胞凋亡的功能。为分析哈氏弧菌 T3SS 所引起的细胞凋亡和细胞膜通透性增加之间的相关性, 进一步分析了在哈氏弧菌感染的鱼类细胞中凋亡途径被抑制后(Caspase-3 抑制剂处理) LDH 的释放情况。结果如图 5B 所示, Caspase-3 被抑制后 LDH 仍然被释放到胞外。由此可见, 哈氏弧菌感染鱼类细胞时通过 T3SS 同时诱导的鱼类细胞凋亡与 LDH 释放的发生。

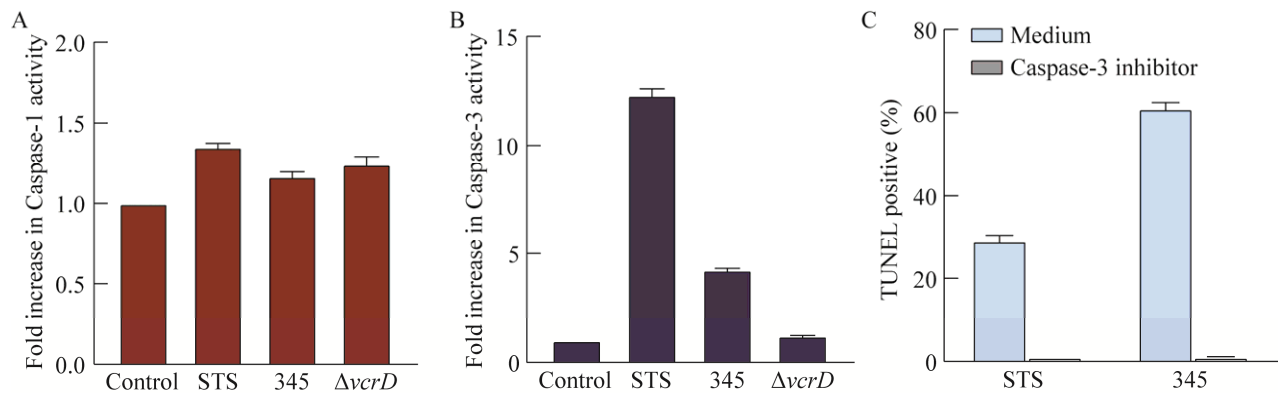


图 4 哈氏弧菌 T3SS 激活鱼类细胞凋亡途径 A: Caspase-1 活性测定. 横坐标分别为哈氏弧菌 345 和 $\Delta vcrD$ 株感染的细胞、STS 处理的细胞及对照细胞, 纵坐标数值表示相对于对照细胞的 Caspase-1 酶活性倍数. B: Caspase-3 活性测定. 横坐标分别为哈氏弧菌 345 和 $\Delta vcrD$ 株感染的细胞、STS 处理的细胞及对照细胞, 纵坐标数值表示相对于对照细胞的 Caspase-3 酶活性倍数. C: 定量分析 TUNEL 阳性率. 在哈氏弧菌感染或 STS 处理前用 100 $\mu\text{mol/L}$ Z-DEVD-FMK 预处理细胞, 随后使用 TUNEL 试剂盒进行检测. 统计分析来源于 3 组数据, 数值用平均数表示

Figure 4 *Vibrio harveyi* infection of FHM cells activates a T3SS-dependent apoptotic pathway. A: Caspase-1 activity assay. FHM cells that were uninfected, infected with wild type 345 and $\Delta vcrD$, or treated with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ STS, were collected at 2 h after infection, and the levels of cleaved Caspase-1 substrate were measured. B: Caspase-3 activity assay. FHM cells that were uninfected, infected with wild type 345 and $\Delta vcrD$, or treated with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ STS, were collected at 2 h after infection, and the levels of cleaved Caspase-3 substrate were measured. C: Inhibitory effect of Caspase-3 inhibitor on *V. harveyi*-induced DNA fragmentation. FHM cells were pre-incubated for 1 h with 100 $\mu\text{mol/L}$ of Caspase-3 inhibitor and then infected with 345 or treated with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ STS for 2 h. Inhibitory effects were evaluated using the TUNEL assay. The data are expressed as mean \pm SE from three independent experiments.

3 讨论与结论

细胞死亡是病原体感染宿主细胞后导致的最常见的结果, 在病原的致病性和病理发展中发挥重要作用^[31]. 细胞凋亡是一种细胞死亡的方式^[32]. 细胞凋亡依赖于 Caspase 分子的激活; 一旦被信号途径激活, 细胞内的许多蛋白质、核酸等底物被降解, 产生一系列典型特征, 如细胞膜泡状化、细胞核浓缩和 DNA 片段化等, 使细胞不可逆地走向死亡^[33-34]. 哈氏弧菌感染鱼类 FHM 细胞后, 细胞形态呈现凋亡特征: 细胞变圆、核染色质皱缩并形成凋亡小体, 以及 DNA 片段化. 与此同时, 敲除 T3SS 输出装置

内膜蛋白 VcrD 获得缺失突变株 $\Delta vcrD$, 该突变株感染的细胞像正常对照细胞一样在整个感染过程中细胞核保持完整, 提示哈氏弧菌 345 对宿主细胞侵染的过程依赖具有分泌功能的 T3SS. 以上结果表明哈氏弧菌感染 FHM 细胞并依赖其 T3SS 导致细胞呈现上述凋亡特征. 但是, 仅凭以上这些特征不足以证明哈氏弧菌诱导鱼类细胞发生凋亡. 因为细胞程序化死亡的另一个途径——细胞焦亡^[35]也会出现类似的表型特征, 因此, 界定哈氏弧菌 T3SS 诱导细胞死亡的途径是否是凋亡还需要测定细胞凋亡特征性指标, 如 Caspase-3 的激活或 PARP 分子的剪切^[36], 而细胞焦亡则依赖于 Caspase-1 的激活, 并伴有

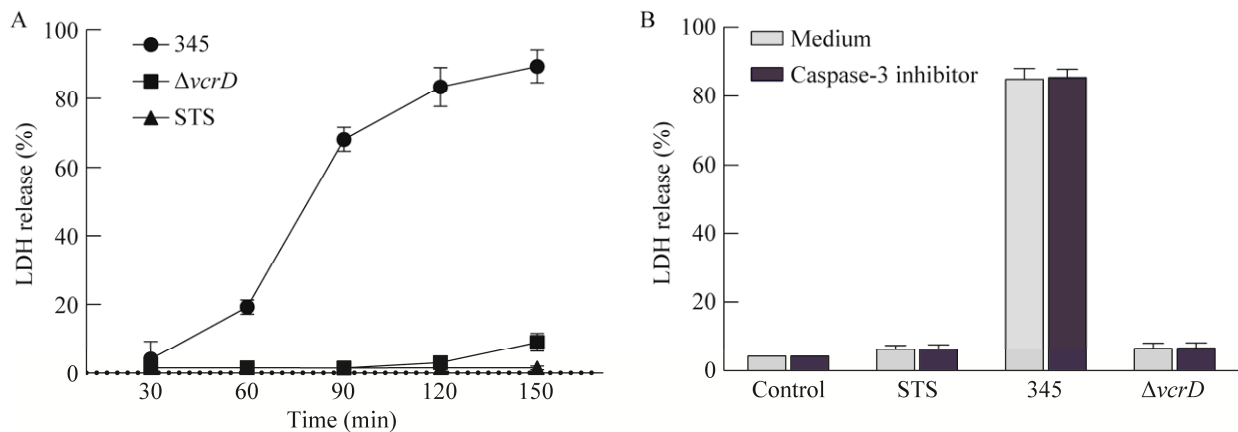


图 5 哈氏弧菌 T3SS 诱导 LDH 释放且不依赖于凋亡途径 A: 胞外 LDH 释放的测定. 哈氏弧菌感染或 STS 处理的细胞不同时间点(0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 h)收样, 测定培养基中 LDH 浓度; 纵坐标数值表示释放到培养基中的 LDH 浓度占细胞总 LDH 浓度的百分比. B: Caspase-3 抑制剂对 LDH 释放抑制效果. 在哈氏弧菌感染或 STS 处理之前用 100 $\mu\text{mol/L}$ Caspase-3 抑制剂处理细胞 1 h; 抑制效果按照 A 中测定 LDH 方法进行, 数值来源于 3 组数据的统计分析用平均数

Figure 5 LDH release mediated by T3SS of *Vibrio harveyi* is independent of Caspase activity. A: LDH release caused by *V. harveyi* infection. FHM cells were infected with *V. harveyi* 345 and $\Delta vcrD$, or treated with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ STS. LDH release was calculated as a percent of total lysis of cells with the lysis buffer provided in the kit. B: Inhibitory effect of Caspase-3 inhibitor on LDH release. FHM cells were pre-incubated for 1 h with 100 $\mu\text{mol/L}$ Caspase-3 inhibitor and then infected with *V. harveyi* 345 or treated with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ STS for 2 h. Inhibitory effects were evaluated using LDH release assays. The data are expressed as means \pm SE from three independent experiments.

大量促炎症因子的释放^[37]。与预期结果一致, 试验数据进一步证实哈氏弧菌 T3SS 在致病宿主细胞的过程中激活 Caspase-3 分子, 而不是 Caspase-1 分子。因此我们认为哈氏弧菌的感染利用其 T3SS 激活了 FHM 细胞的凋亡途径。

细胞凋亡区别于坏死的一个显著性差别就是不引起周围组织的破坏和炎症反应发生凋亡的细胞细胞膜保持完整性, 不会将细胞内容物释放到细胞外^[38]。但是, 发现在哈氏弧菌激活凋亡途径的同时, 细胞培养液中 LDH 浓度也不断增加。LDH 是稳定的胞浆酶^[38], 存在所有的细胞中, 当胞膜损伤时快速释放到细胞培养液中。这表明哈氏弧菌 T3SS 感染鱼类细胞导致了细胞膜失去完整性。重要的是, 抑制 Caspase

并不能阻止哈氏弧菌诱导鱼类细胞的细胞内容物释放和细胞变圆, 证明哈氏弧菌 T3SS 激活的凋亡途径并不参与诱导宿主细胞的 LDH 释放和变圆。因此可以得出以下结论: 哈氏弧菌利用其 T3SS 在感染的鱼类细胞时至少能够引起细胞凋亡和细胞变圆, 最终导致细胞在感染几小时内迅速死亡。长期以来, 细胞死亡途径被认为是平行发挥作用, 很少或无重叠。然而, 目前的研究表明, 凋亡、坏死性凋亡和焦亡之间存在着紧密的联系, 并且相互交叉调节^[39]。但是对于哈氏弧菌 T3SS 介导鱼类细胞死亡的两种机制如何联系还仍未知。

哈氏弧菌能够快速导致细胞死亡的一个可能原因是: 哈氏弧菌通过诱导细胞凋亡降解细

胞内的细胞器,产生“快餐式”营养成分,如核苷酸和氨基酸等。当细胞被裂解后这些物质被释放,哈氏弧菌就可以容易、迅速地获得这些物质,为自己快速的繁殖和生长提供有利的营养环境^[40]。作为条件致病菌,哈氏弧菌有机会利用上述的细胞死亡机制迅速在各种宿主的组织中建立一个适合于繁殖和生长的微环境,以利于侵入宿主的防线。

从我们测定的哈氏弧菌 345 T3SS 的序列分析结果显示,哈氏弧菌 T3SS 具有与副溶血性弧菌 T3SS1 同源性的效应蛋白 VopR 和 VopQ^[15,17]。除此以外,哈氏弧菌 T3SS 还具有一个潜在的效应蛋白 Afp17^[41]。但有趣的是哈氏弧菌利用 T3SS 介导鱼类细胞发生凋亡,与副溶血性弧菌 T3SS1 介导的死亡途径不同。副溶血性弧菌的 T3SS1 介导的死亡细胞保持着完整的细胞核,并未激活 Caspase 分子^[23,42]。除此以外,溶藻弧菌利用 T3SS 介导鱼类细胞发生细胞凋亡和细胞变圆,与我们之前的试验结果^[40]一致。这种死亡机制的不同或许是因为不同 T3SS 在效应蛋白编码的差别所造成的,但同时也不能排除是由于所感染的细胞系差别而造成的。

综上所述,哈氏弧菌利用其 T3SS 在鱼类细胞中诱导不同机制的死亡过程,包括激活凋亡途径和细胞内容物释放,为弧菌诱导宿主细胞死亡的机制研究提供新的视野。

REFERENCES

- [1] BAKER-AUSTIN C, OLIVER JD, ALAM M, ALI A, WALDOR MK, QADRI F, MARTINEZ-URTAZA J. *Vibrio* spp. infections[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2018, 4(1): 1-19.
- [2] 郭斯崖, 郑慧芳, 张森, 蔡静, 王鑫彤, 郭雷. 苦参抗水产病原哈氏弧菌活性物质的提取、鉴定及作用机制[J]. 水产学杂志, 2023, 36(4): 29-37.
GUO SY, ZHENG HF, ZHANG M, CAI J, WANG XT, GUO L. Extraction, identification and mechanism of action of antibacterial substances of Chinese herb medicine *Sophora flavescens* against aquatic pathogen *Vibrio harveyi*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2023, 36(4): 29-37 (in Chinese).
- [3] ZHANG XH, HE XX, AUSTIN B. *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture[J]. Marine Life Science & Technology, 2020, 2(3): 231-245.
- [4] CHEN T, WONG NK, JIANG X. Nitric oxide as an antimicrobial molecule against *Vibrio harveyi* infection in the hepatopancreas of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 42(1): 114-120.
- [5] SHEN GM, SHI CY, FAN C, JIA D, WANG SQ, XIE GS, LI GY, MO ZL, HUANG J. Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio harveyi*, the causal agent of skin ulcer disease in juvenile hybrid groupers *Epinephelus fuscoguttatus*×*Epinephelus lanceolatus*[J]. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(10): 1351-1362.
- [6] HUECK CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 1998, 62(2): 379-433.
- [7] COBURN B, SEKIROV I, FINLAY BB. Type III secretion systems and disease[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2007, 20(4): 535-549.
- [8] DACHEUX D, GOURE J, CHABERT J, USSON Y, ATTREE I. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages[J]. Molecular Microbiology, 2001, 40(1): 76-85.
- [9] FINK SL, COOKSON BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages[J]. Cellular Microbiology, 2006, 8(11): 1812-1825.
- [10] NONAKA T, KUWABARA T, MIMURO H, KUWAE A, IMAJOH-OHMI S. *Shigella*-induced necrosis and apoptosis of U937 cells and J774 macrophages[J]. Microbiology, 2003, 149(9): 2513-2527.
- [11] TROISFONTAINES P, CORNELIS GR. Type III secretion: more systems than you think[J]. Physiology, 2005, 20(5): 326-339.
- [12] MOUJALLED D, STRASSER A, LIDDELL JR. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases[J]. Cell Death & Differentiation, 2021, 28(7): 2029-2044.
- [13] GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON SA, ABRAMS JM, ADAM D, AGOSTINIS P, ALNEMRI

- ES, ALTUCCI L, AMELIO I, ANDREWS DW, ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI M, ANTONOV AV, ARAMA E, BAEHRECKE EH, BARLEV NA, BAZAN NG, BERNASSOLA F, BERTRAND MJM, BIANCHI K, BLAGOSKLONNY MV. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on Cell Death 2018[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2018, 25(3): 486-541.
- [14] KETELUT-CARNEIRO N, FITZGERALD KA. Apoptosis, pyroptosis, and necroptosis-Oh My! The many ways a cell can die[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2022, 434(4): 167378.
- [15] MAKINO K, OSHIMA K, KUROKAWA K. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*[J]. *The Lancet*, 2003, 361(9359): 743-749.
- [16] 薛娇, 廉乐乐, 李婉君, 任建鸾, 汤芳, 薛峰, 戴建君. 副溶血弧菌III型分泌系统 *vscG* 基因缺失株的构建及其生物学特性[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(6): 2101-2110.
- XUE J, LIAN LL, LI WJ, REN JL, TANG F, XUE F, DAI JJ. Construction and characterization of the *vscG* gene mutant strain of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(6): 2101-2110 (in Chinese).
- [17] PARK KS, ONO T, ROKUDA M, JANG MH, OKADA K, IIDA T, HONDA T. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(11): 6659-6665.
- [18] JULIA SG, DAVID RG, CHOUDHARY JS, FRANKEKL G. The type III secretion system effector network hypothesis[J]. *Trends in Microbiology*, 2022, 30(6): 524-533.
- [19] SREELATHA A, BENNETT TL, ZHENG H, JIANG QX, ORTH K, STARAI VJ. *Vibrio* effector protein, VopQ, forms a lysosomal gated channel that disrupts host ion homeostasis and autophagic flux[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(28): 11559-11564.
- [20] BROBERG CA, ZHANG LL, GONZALEZ H, LASKOWSKI-ARCE MA, ORTH K. A *Vibrio* effector protein is an inositol phosphatase and disrupts host cell membrane integrity[J]. *Science*, 2010, 329(5999): 1660-1662.
- [21] YARBROUGH ML, LI Y, KINCH LN, GRISHIN NV, BALL HL, ORTH K. AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling[J]. *Science*, 2009, 323(5911): 269-272.
- [22] WOOLERY AR, YU X, LABAER J. AMPylation of rho GTPases subverts multiple host signaling processes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(47): 32977-32988.
- [23] BURDETTE DL, YARBROUGH ML, ORVEDAHL A, GILPIN CJ, ORTH K. *Vibrio parahaemolyticus* orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and then cell lysis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(34): 12497-12502.
- [24] ONO T, PARK KS, UETA M, IIDA T, HONDA T. Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1[J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(2): 1032-1042.
- [25] DENG YQ, XU HD, SU YL, LIU SL, XU LW, GUO ZX, WU JJ, CHENG CH, FENG J. Horizontal gene transfer contributes to virulence and antibiotic resistance of *Vibrio harveyi* 345 based on complete genome sequence analysis[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 761-780.
- [26] NGUYEN AN, DISCONZI E, CHARRIÈRE GM, DESTOUMIEUX-GARZÓN D, BOULOC P, Le ROUX F, JACQ A. *csrB* gene duplication drives the evolution of redundant regulatory pathways controlling expression of the major toxic secreted metalloproteases in *Vibrio tasmaniensis* LGP32[J]. *mSphere*, 2018, 3(6): e00582-18.
- [27] VAL ME, SKOVGAARD O, DUCOS-GALAND M, BLAND MJ, MAZEL D. Genome engineering in *Vibrio cholerae*: a feasible approach to address biological issues[J]. *PLoS Genetics*, 2012, 8(1): e1002472.
- [28] 邓益琴, 冯娟, 贝蕾, 苏友禄. 一种基于热击的哈维弧菌同源重组基因敲除的方法: 中国, ZL201711295414.1[P]. 2022-09-06.
- DENG YQ, FENG J, BEI L, SU YL. A method for heat-based homologous recombinant gene knockout of *Vibrio harveyi*: China, ZL201711295414.1[P]. 2022-09-06 (in Chinese).
- [29] REN YJ, SHU T, WU D, MU JF, WANG C, HUANG MH, HAN Y, ZHANG XY, ZHOU W, QIU Y, ZHOU X. The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2020, 17(8): 881-883.
- [30] NOH HJ, NAGAMI S, KIM MJ, KIM J, LEE NK, LEE KH, PARK SJ. Role of VcrD1 protein in expression and secretion of flagellar components in *Vibrio*

- parahaemolyticus*[J]. Archives of Microbiology, 2015, 197(3): 397-410.
- [31] LABBÉ K, SALEH M. Cell death in the host response to infection[J]. Cell Death & Differentiation, 2008, 15(9): 1339-1349.
- [32] D'ARCY MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. Cell Biology International, 2019, 43(6): 582-592.
- [33] SAMALI A, ZHIVOTOVSKY B, JONES D, NAGATA S, ORRENIUS S. Apoptosis: cell death defined by caspase activation[J]. Cell Death & Differentiation, 1999, 6(6): 495-496.
- [34] ELMORE S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. Toxicologic Pathology, 2007, 35(4): 495-516.
- [35] LUO BY, WANG LM, GAO WJ, SU YD, LU Y, ZHENG J, YIN J, ZHAO Q, LI J, DA YR, LI L. Using a gene network of pyroptosis to quantify the responses to immunotherapy and prognosis for neuroblastoma patients[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 845757.
- [36] FINK SL, COOKSON BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(4): 1907-1916.
- [37] YU P, ZHANG X, LIU N, TANG L, PENG C, CHEN X. Pyroptosis: mechanisms and diseases[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021, 6: 1233-1253.
- [38] JURISIC V, RADENKOVIC S, KONJEVIC G. The actual role of LDH as tumor marker, biochemical and clinical aspects[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2015, 867: 115-124.
- [39] BERTHELOOT D, LATZ E, FRANKLIN BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2021, 18(5): 1106-1121.
- [40] ZHAO Z, CHEN C, HU CQ, REN CH, ZHAO JJ, ZHANG LP, JIANG X, LUO P, WANG QB. The type III secretion system of *Vibrio alginolyticus* induces rapid apoptosis, cell rounding and osmotic lysis of fish cells[J]. Microbiology, 2010, 156(9): 2864-2872.
- [41] WU C, ZHAO Z, LIU YP, ZHU XY, LIU M, LUO P, SHI Y. Type III secretion 1 effector gene diversity among *Vibrio isolates* from coastal areas in China[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020, 10: 301-312.
- [42] ZHOU XH, KONKEL ME, CALL DR. Type III secretion system 1 of *Vibrio parahaemolyticus* induces oncosis in both epithelial and monocytic cell lines[J]. Microbiology, 2009, 155(3): 837-851.