

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(5): 658-663; 4 May 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

猪水肿病毒毒素 Stx2e 的致 Vero 细胞凋亡作用

李灿^{1,3}, 冉雪琴¹, 王嘉福^{1,2*}

(¹ 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025)

(² 贵州省农业工程重点实验室, 贵阳 550025)

(³ 四川文理学院, 达州 635000)

摘要 【目的】研究猪水肿病的致病因子志贺毒素 2e (Shiga toxin 2e, Stx2e) 的致病机理。【方法】以 AO/EB 荧光染色法、琼脂糖凝胶电泳法和 Western blotting 等方法研究 Stx2e 对 Vero 细胞的致凋亡作用及其信号途径。【结果】从细胞形态学和染色质水平证明, Stx2e 能诱导 Vero 细胞凋亡, 并表现出时间和浓度依赖性; 同时引起 caspase-3 表达量明显上调, Bax、caspase-9 的表达量没有明显变化。【结论】Stx2e 对 Vero 细胞的致凋亡作用主要通过膜受体通路引起, 线粒体信号通路所起的作用较小。

关键词: Stx2e; 细胞凋亡; Vero 细胞; Bax; caspase-9; caspase-3

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)05-0658-06

大肠杆菌产生的志贺毒素(Shiga toxin, Stx)是人出血性结肠炎-溶血性尿毒综合征(hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome, HUS)牛腹泻和猪水肿病的重要致病因子^[1]。Stx 又名 Vero 细胞毒素(Vero toxin, VT), 是核糖体失活蛋白家族的成员之一。毒素由 A、B 二种亚基组成, 一个 A 亚基单体与 B 亚基的五聚体以非共价键结合构成全毒素。B 亚基与糖脂类受体球丙糖酰基鞘氨醇(globotriaosylceramide, Gb3)或球丁糖酰基鞘氨醇(globotetraosylceramide, Gb4)结合, 介导 A 亚基进入靶细胞内部^[2]。在胞质内 A 亚基被切割成 A1(约 27 kDa)和 A2(约 4 kDa)二个片段, A1 片段有酶活性, 作用于真核细胞的核糖体, 使大亚基 28S rRNA 第 4324 位腺嘌呤脱落, 使氨酰 tRNA 不能进入核糖体的 A 位点, 蛋白的合成受阻^[3-4]。

Stxs 分为 Stx1 和 Stx2 两种类型。从动物中检测到多种 Stx2 的变异体, 如 Stx2c、Stx2d、Stx2e 和

Stx2f, 各变异体与 Stx2 之间的同源性在 90% 以上, 但生物学活性不同^[5]; Stx2e 主要与受体 Gb4 结合, 只对 Vero 细胞(kidney cells of the African green monkey)有毒性; 其它变异体主要与 Gb3 结合, 对 Vero 和 HeLa 细胞都有毒性^[6]。Stx2e 又名猪水肿病毒素, 是断奶 2 周内仔猪出现水肿病的主要致病因子^[7]。猪水肿病的主要表现为: 胃壁、颈部、齿龈、眼睑、肠系膜、神经系统等部位水肿, 共济失调, 步态蹒跚, 全身抽搐等。猪水肿病的发病率通常为 30%~40%, 严重时高达 80%, 早期发现并及时治疗时约 50%~60% 死亡, 但晚期治疗的死亡率则在 90% 以上, 而且即使存活病猪的生长也很缓慢^[8]。近年来, 志贺毒素再次引起人们的关注, 其主要原因是由于志贺样毒素与细胞凋亡的关系密切。研究表明, Stx1、Stx2、Stx2e 等多种 Stxs 可诱导细胞凋亡^[9], 但 Stx2e 的致凋亡作用和途径不完全清楚, 因此本文以本地分离的产志贺样毒素大肠杆菌为基础, 研究

基金项目 国家自然科学基金(39660003), 贵州省优秀青年科技人才专项基金[黔科合人字(2002)20203号]

* 通信作者。Tel: +86-851-3863510, Fax: +86-851-8298005, E-mail: jifwang@gzu.edu.cn

作者简介 李灿(1987-), 女, 四川人, 硕士, 研究方向为微生物基因工程。E-mail: lican@hotmail.com

收稿日期 2008-12-27, 修回日期 2009-02-11

Stx2e 的细胞凋亡作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和菌株: Vero 细胞购自上海细胞生物所。产 Stx2e 大肠杆菌 NP9621 由本实验室自贵州猪水肿病粪样中分离^[10]。

1.1.2 试剂: 鼠抗人 caspase-3、兔抗人 caspase-9、鼠抗人 Bax(bcl2 associated X protein)、兔抗人 β -actin 多克隆抗体均为 Santa Cruz 公司产品, HRP 标记羊抗鼠 IgG、HRP 标记羊抗兔 IgG 购自 SABC 公司, BCA 蛋白定量试剂盒为上海申能博彩公司产品, Ladder 试剂盒由北京普利来基因技术公司生产。蓖麻毒素由本实验室制备。

1.1.3 细胞培养: Vero 细胞于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 取生长迅速、颗粒较少并处于对数生长期的细胞用于后续实验。

1.2 Stx2e 粗制品的提取

大肠杆菌 NP9621 接种于 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养 12 ~ 15 h, 转接 300 mL 产毒培养基^[11]。37℃ 振荡培养 24 h。5000 × g 离心 15 min 收集细菌, 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次, 于液氮中研磨 0.5 h, 当显微镜下观察到细菌壁大部分破裂时, 加入 50 mL PBS 4℃ 12000 × g 离心 15 min 去除细菌碎片, 上清以 40% ~ 60% 硫酸铵沉淀 4℃ 12000 × g 离心 30 min, 沉淀经适量 PBS 溶解后于 PBS 中透析, 聚乙二醇 (PEG10000) 浓缩获得 Stx2e 粗制品, 过滤除菌^[12], 以非变性 10% PAGE 检测毒素蛋白制品的纯度, 兔抗 Stx2e 抗血清鉴定毒素蛋白^[13]; 参照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定毒素蛋白的浓度。

1.3 Stx2e 粗制品作用 Vero 细胞

用无血清 DMEM 培养液培养 Vero 细胞 12 h, 以不同浓度的 Stx2e 粗制品作用 Vero 细胞 0.02、0.08、0.4、2 和 10 μ g/mL, 以确定产生最大凋亡率的 Stx2e 粗制品浓度。以此浓度的 Stx2e 粗制品作用 Vero 细胞 0、4、8、20、24、28、32 h, 确定最适作用时间。对照组 Vero 细胞中加入等体积的培养液。

1.3.1 AO/EB 荧光染色法检测细胞凋亡: 取毒素作用过的 Vero 细胞悬液 100 μ L 加入 AO/EB 染料 4 μ L 混匀, 取 1 滴于载玻片, 上覆盖玻片, 荧光显微镜下计数 200 个细胞, 按下列公式计算细胞的凋亡率:

$$\text{凋亡率} = \frac{VA + NVA}{VN + NVN + VA + NVA} \times 100\%$$

其中, VN 为正常 Vero 细胞数; VA 为早期凋亡细胞

数; NVA 为晚期凋亡细胞数; NVN 为非凋亡的死细胞数。

1.3.2 Vero 细胞总 DNA 的提取及片段化分析: PBS 洗涤毒素作用过的 Vero 细胞, 5000 × g 4℃ 离心 5 min 收集细胞, 10⁵ ~ 10⁶ 个细胞加入 100 μ L 裂解液, 冰浴 5 ~ 10 min, 振荡 10 s, 5000 × g 4℃ 离心 10 min, 于上清中加入 1% SDS, 2 μ L DNase-free RNase A, 37℃ 作用 1 h。加入 2 μ L 蛋白酶 K (10 mg/mL) 37℃ 作用 2 h。加入 1 μ L 核酸助沉剂 (# D1200) 1/10 (V/V) 3 mol/L 醋酸钠溶液、2.5 倍体积 100% 乙醇, -20℃ 沉淀 30 min。12000 × g 4℃ 离心 10 min, 弃上清, 室温干燥沉淀。用 17 μ L 双蒸水溶解沉淀, 加 3 μ L 6 × DNA 凝胶上样缓冲液, 取 20 μ L 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶成像系统照相。

1.3.3 Western blotting: 取 1 × 10⁷ ~ 5 × 10⁷ 个 Vero 细胞置入 500 μ L 细胞裂解液中, 加入 50 μ L 10 mmol/L 蛋白酶抑制剂 PMSF 4℃ 静置 1 h, 期间以 21 # 注射针头剪切细胞 5 次。4℃ 12000 × g 离心 20 min, 上清液即为总蛋白溶液, 取 20 μ L 以 12% PAGE 分离, 电转 1 h, 取出硝酸纤维素膜按 0.1 mL/cm² 加入封闭液, 室温封闭 3 h。分别加入各因子相应的多克隆抗体 (1:500 ~ 1:1000) 4℃ 慢摇过夜。PBS 洗膜 3 次, 每次 5 min。加入相应的第二抗体 (1:1000), 以 1% 小牛血清-TBS 稀释 (10 × TBS: Tris 碱 9.3 g, 氯化钠 90 g, 双蒸水溶解至 1000 mL, pH7.4) 室温反应 1 h。PBS 洗膜 3 次, 每次 5 min, TBS 漂洗一次, NBT-BCIP 显色^[5]。用 Quantity one 软件 (Bio-rad) 测定蛋白条带的灰度, 以 β -actin 蛋白表达量为内参照对各因子的表达量进行标准化, 毒素处理后凋亡因子的表达量与对照相比较, 表达量的单位为 %。

2 结果和分析

2.1 Stx2e 导致 Vero 细胞凋亡的形态学变化

大肠杆菌 NP9621 自本地水肿病猪粪样中分离, 产 Stx2e 毒素^[8]。将制备的 Stx2e 粗制品作用于长成单层的 Vero 细胞, 细胞变圆脱落 (图 1)。由于吖啶橙 (acridine orange, AO) 能透过胞膜完整的细胞, 嵌入细胞核 DNA, 经紫外光激发细胞核呈现绿色荧光, 溴乙锭 (ethidium bromide, EB) 只能透过细胞膜受损的细胞, 与核 DNA 结合, 在紫外光下发出橘红色荧光。经 AO/EB 复合染料染色后, 在荧光显微镜下可见 4 种形态的细胞 (图 2): 核呈均匀的绿色为正常 Vero 细胞, 核为绿色并呈分散的固缩状或团块为早期凋亡细胞, 部分早期凋亡细胞核膜周围有起泡现象, 核呈橘红色并呈固缩状或圆珠状则为晚期凋

亡细胞,核为均匀的橘红色为坏死细胞。

2.2 Stx2e 导致 Vero 细胞凋亡的动态变化

以不同浓度的 Stx2e 粗制品作用时, Vero 细胞的凋亡率表现出明显的浓度依赖性(图 3)。当粗制品的浓度低于 $0.08 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, Vero 细胞病变数量较少($< 15\%$);浓度增加到 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作用 24 h 时, 90% 的细胞发生脱落,此时光镜下可见 Vero 细胞的

间隙加大,胞内的颗粒增多,空泡化。Vero 细胞的比例上升, AO/EB 染色结果显示其中 50% 为晚期凋亡细胞。同时, Stx2e 粗制品诱导的 Vero 细胞凋亡还表现出明显的时间梯度(图 3)。用 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ Stx2e 粗制品处理 0~32 h, Vero 细胞的凋亡率逐渐增加: 8 h 凋亡率为 38%, 24 h 达到平台期, 凋亡率约为 90%, 28 h 达到最大值 93%。

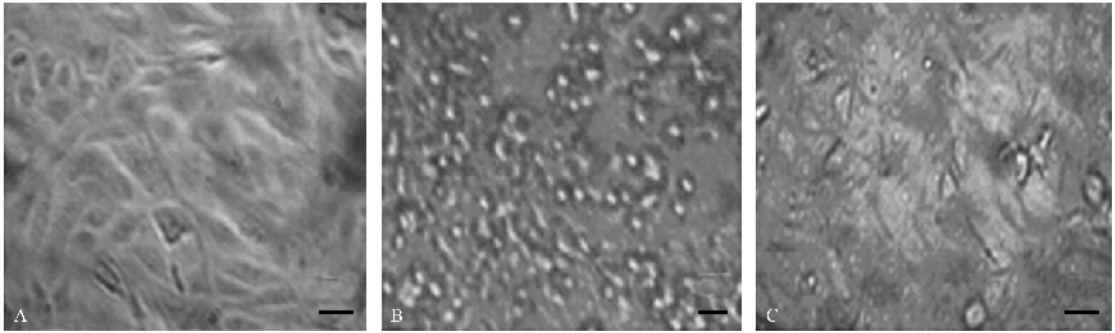


图 1 Stx2e 作用于 Vero 细胞所致的细胞病变

Fig. 1 Cytopathic effects of the Stx2e purified from *E. coli* NP9621. A: negative control; B: Vero cells treated with Stx2e for 24 h. C: Vero cells treated with ricin for 24 h. Bar = $100 \mu\text{m}$.

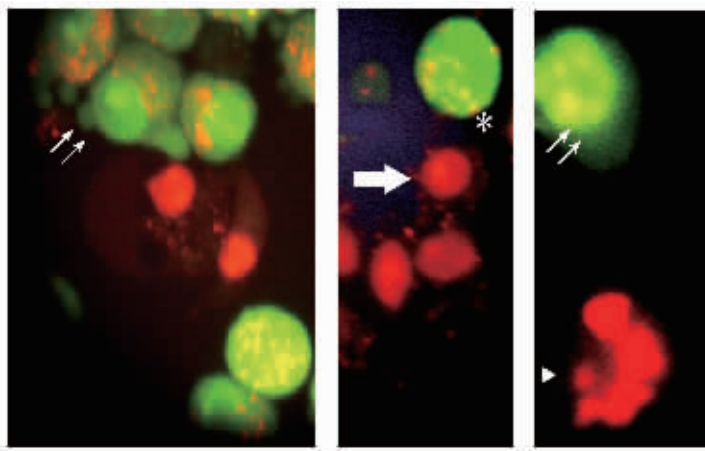


图 2 AO/EB 染色显示处于各个凋亡时期的 Vero 细胞

Fig. 2 Stx2e-induced apoptotic cells after acridine orange and ethidium bromide fluorescent dye staining. Early apoptotic Vero cell (double arrows, green) with green patches of fragmented and condensed chromatin and blebbing membrane. Late apoptotic cells (triangle, red) with partial condensed chromatin. Necrotic cells (thick arrow, red) with condensed chromatin. Viable cells are uniformly green (asterisk, green) ($\times 400$).

2.3 Stx2e 作用 Vero 细胞后染色质 DNA 的降解分析

以 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ Stx2e 粗制品作用 Vero 细胞 24 h, 提取 Vero 细胞总 DNA 经琼脂糖凝胶电泳呈现出梯状降解条带,各条带之间相差约 200 bp,对照组 DNA 未出现梯状条带(图 4)。

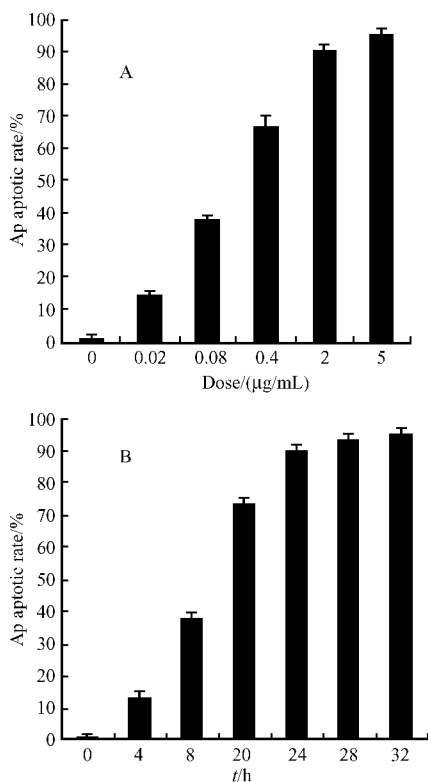
2.4 凋亡相关因子的表达量变化

以 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ Stx2e 粗制品作用 Vero 细胞 24 h, 提取 Vero 细胞总蛋白以 Western blotting 检测凋亡因子 caspase-9、Bax、caspase-3 的表达量,结果显示(图 5):在 β -actin 蛋白表达量标准化基础上,以对照组的表

达量为 100%, caspase-3 的表达量上调 120% ($P < 0.05$), caspase-9 和 Bax 的表达量与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。

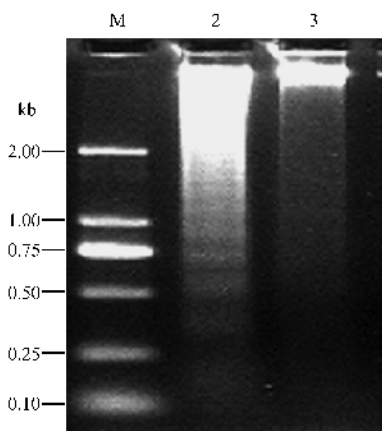
3 讨论

由于 Vero 细胞表面有 Gb4 受体,因此本文选择 Vero 细胞研究 Stx2e 的致凋亡作用。从大肠杆菌 NP9621 中提取的 Stx2e 粗制品作用于 Vero 细胞,基因组 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测表现出明显的梯状条带,各条带之间相差约 200 bp。细胞发生凋亡时,在核酸内切酶的作用下,核小体的连接 DNA 断



3 Stx2e 诱导 Vero 细胞凋亡的时间和剂量依赖性

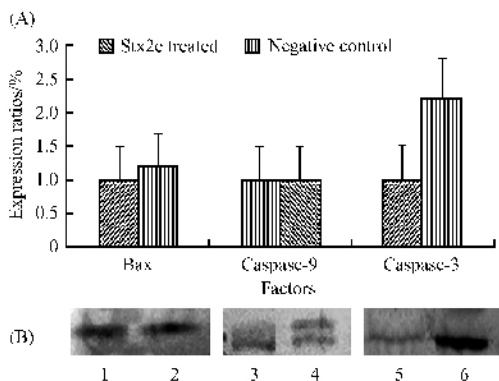
Fig.3 Time- and dose-dependent apoptotic effects of Stx2e on Vero cells. A : Vero cells treated with different concentrations of Stx2e for 24 h. Apoptotic cells were quantified by fluorescent dye staining using untreated cells as the negative control ($n \geq 6$; $P < 0.001$, as determined by ANOVA). B : Vero cells treated with Stx2e ($2 \mu\text{g/mL}$) for different times ($n = 3$ for each time point; $P < 0.005$, as determined by ANOVA).



4 凋亡细胞基因组 DNA 的片段化分析

Fig.4 The fragmentation of genomic DNA in Vero cells after treatment with $2 \mu\text{g/mL}$ Stx2e for 24 h. M. D2000 DNA marker ; 2. Vero cells treated with Stx2e ($2 \mu\text{g/mL}$) ; 3. Vero cells treated with ricin ($2 \mu\text{g/mL}$).

裂, 整个染色质发生可控降解, 产生的 DNA 片段为 $180 \sim 200 \text{ bp}$ 的整倍数^[14], 因此 Stx2e 作用后, Vero 细



5 Stx2e 对 Vero 细胞凋亡相关因子表达量的影响

Fig.5 The expression of apoptosis-associated factors in Stx2e-treated Vero cells. A : expression pattern of apoptosis-associated factors ; B : the expression of apoptosis-associated factors detected by Western blotting. 1, 3 and 5. negative controls ; 2. Bax expression in Vero cells treated with Stx2e ; 4. Caspase-9 expression in Vero cells treated with Stx2e ; 6. Caspase-3 expression in Vero cells treated with Stx2e.

胞基因组总 DNA 经琼脂糖凝胶电泳分离, 呈现出特征性的梯状条带; 蓖麻毒素主要与 Gb3 受体结合, 导致 Vero 细胞基因组的降解量较少, 形成的梯状条带不明显。同时采用 AO/EB 荧光染料进行细胞学检测, 观察到 Stx2e 粗制品作用后 Vero 细胞发生的各凋亡时期细胞形态, 并且细胞的凋亡率随着作用浓度的增加而增加, $2 \mu\text{g/mL}$ 时到达最大, 在 $4 \sim 24 \text{ h}$ 作用期间, 细胞凋亡率随时间的增加而增加, 24 h 到达平台期 (凋亡率 90%)。证实 Stx2e 导致了 Vero 细胞发生凋亡, 并表现出明显的时间和浓度依赖性。我们之前对大肠杆菌 NP9621 的研究结果表明, 其 Stx2e 基因编码的 A 亚基有 $7 \sim 9$ 个氨基酸变异, 并为强毒力类型^[8]。这种氨基酸改变可能与毒素的致凋亡作用较强有关。

抽提凋亡率最高时 Vero 细胞的总蛋白, 经特异性抗体检测, 与对照组相比, 凋亡相关因子中 caspase-3 的表达量明显增加 ($P < 0.05$), caspase-9 和 Bax 的表达量变化不显著 ($P > 0.05$)。细胞凋亡的信号通路主要包括膜受体通路和线粒体通路^[15]。二条通路都需要 caspases 的参与。Caspases 分为启动者和执行者两类^[16]。启动者包括 caspase-8、9、10; 执行者包括 caspase-3、6、7。caspase-8 和 10 主要经膜受体通路激活细胞膜受体 Fas, 依次激活 caspase-3、6、7 引发细胞的凋亡; caspase-9 主要参与线粒体通路。当细胞受到凋亡刺激时 Bax 进入线粒体, 使细胞色素 C 释放^[17], 后者与胞浆凋亡相关因子 1 (Apaf-1) 结合, 激活 caspase-9, 进一步激活 caspase-3 等诱导细胞发生凋亡^[18]。因此, Bax 和 caspase-9 都是线粒体通路所必需的因子, caspase-3 则是线粒体通路和

膜受体通路都要经过的凋亡执行者。本文的研究结果证实 Stx2e 作用后, Vero 细胞大量凋亡, 其中 Bax 和 caspase-9 的表达量没有明显变化, 提示 Stx2e 致 Vero 细胞的凋亡没有经过线粒体途径; 而 caspase-3 的表达量上调, 说明 caspase-3 在 Stx2e 诱导 Vero 细胞的凋亡过程中起关键作用, Stx2e 的致凋亡作用可能以膜受体通路为主, 线粒体通路所起的作用可能较小。应用小鼠成纤维细胞证明 Fas 介导的膜通路可以不依赖于线粒体途径导致细胞凋亡^[19]。然而 Stx1、Stx2、Stx2c 等毒素可使人喉表皮癌细胞(HEp-2)中 Bax 的表达量增加 1.9~3.2 倍, 通过依赖于线粒体通路引起细胞凋亡^[20]。本文的研究结果提示, 大肠杆菌 NP9621 产生的 Stx2e 致 Vero 细胞凋亡的途径与 Stx1、Stx2、Stx2c 致 HEp-2 细胞凋亡的途径不完全相同。

当产 Stx2e 大肠杆菌随着污染的食物或饮水进入仔猪肠腔时, 细菌的细胞壁破裂释放 Stx2e 毒素。在猪结肠、小脑、眼睑和红细胞表面分布着丰富的 Gb4 受体^[6, 21]。Stx2e 毒素以 B 亚基结合受体 Gb4, A 亚基进入肠上皮细胞, 在胞质内被蛋白酶消化, 形成的 A1 片段直接作用于核糖体, 影响蛋白的翻译过程^[4, 22], 同时毒素的 A 亚基或 A1 片段以不依赖于线粒体的方式活化膜受体通路中的 Fas 等信号分子, 最终激活 caspase-3, 引起结肠上皮细胞凋亡, 动物的肠壁屏障被打破, Stx2e 得以进入血液系统, 以相似的机制侵害神经系统等组织; 此外, caspase-3 还使 Ca²⁺ 大量释放^[23], 造成组织水肿、抽搐等。这一推测还需要进一步的实验验证。本文的研究结果有助于揭示 Stx2e 的凋亡作用机制和致病机理, 为猪水肿病的根治提供理论依据。

参考文献

- [1] Brigotti M, Carnicelli D, Ravanelli E, et al. Interactions between Shiga toxins and human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 2008, 84 : 1019 - 10127.
- [2] Lingwood CA. Verotoxins and their glycolipid receptors. *Advances in Lipid Research*, 1993, 25 : 189 - 211.
- [3] Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, et al. Site of action of Verotoxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, 1988, 171 : 45 - 50.
- [4] Schmidt H, Scheef J, Morabito S, et al. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 : 1205 - 1208.
- [5] Melton-Celsa AR, Kokai-Kun JF, O'Brien AD. Activation of Shiga toxin type 2d (Stx2d) by elastase involves cleavage of the C-terminal two amino acids of the A2 peptide in the context of the appropriate B pentamer. *Molecular Microbiology*, 2002, 43 : 207 - 215.
- [6] De Grandis S, Law H, Brunton J, et al. Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264 : 12520 - 12525.
- [7] Ling H, Pannu NS, Boodhoo A, et al. A mutant Shiga-like toxin IIe bound to its receptor Gb3 : structure of a group II Shiga-like toxin with altered binding specificity. *Structure*, 2000, 8 : 253 - 264.
- [8] 冉雪琴, 王红珍, 艾虎, 等. 猪水肿病大肠杆菌志贺样毒素 II 型突变体新基因的分子特征. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 2004, 4 : 167 - 171.
- [9] Ching JC, Jones NL, Ceponis PJ, et al. *Escherichia coli* Shiga-like toxins induce apoptosis and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase via *in vitro* activation of caspases. *Infection and Immunity*, 2002, 70 : 4669 - 4677.
- [10] 王嘉福, 冉雪琴, 吴拥军, 等. 贵州猪、牛志贺样毒素大肠杆菌的检出与鉴定. *畜牧兽医学报 (Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica)* 2000, 31(5) : 448 - 452.
- [11] 庄敬华, 杨长成, 高增贵, 等. 瓜类枯萎病菌粗毒素的致萎作用及其钝化研究. *沈阳农业大学学报 (Journal of Shenyang Agricultural University)* 2006, 37 : 177 - 181.
- [12] 陈希, 徐亮, 胡格, 等. 产单核细胞李斯特菌溶血素的纯化. *中国预防兽医学报 (Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine)* 2008, 30(8) : 605 - 607.
- [13] Ran XQ, Wang HZ, Liu JJ, et al. The immunogenicity of fusion protein linking the carboxyl terminus of the B subunit of Shiga toxin 2 to the B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin. *Veterinary Microbiology*, 2008, 127 : 209 - 215.
- [14] Compton MM. A biochemical hallmark of apoptosis : internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Reviews*, 1992, 11 : 105 - 119.
- [15] Eskes R, Desagher S, Antonsson B, et al. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20 : 929 - 935.
- [16] Tong X, Lin S, Fujii M, et al. Molecular mechanisms of echinocystic acid-induced apoptosis in HepG2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 321 : 539 - 546.
- [17] Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, et al. Bid, Bax and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 2002, 111 : 331 - 342.

- [18] Slee EA , Harte MT , Kluck RM , et al. Ordering the cytochrome C initiated caspase cascade : hierarchical activation of caspases 2 , 3 , 6 , 7 , 8 , and 10 in caspase 9 dependent manner. *The Journal of Cell Biology* , 1999 , 144 : 281 – 292 .
- [19] Nomura J , Matsumoto K , Iguchi-Arigo SM , et al. Mitochondria-independent induction of Fas-mediated apoptosis by MSSP. *Oncology Reports* , 2005 , 14 : 1305 – 1309 .
- [20] Jones NL , Islur A . , Haq R , et al. *Escherichia Coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the bcl-2 family. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* , 2000 , 278 : G811 – 819 .
- [21] Boyd B , Tyrrell G , Maloney M , et al. Alteration of the glycolipid binding specificity of the pig edema toxin from globotetraosyl to globotriaosyl ceramide alters in vivo tissue targetting and results in a verotoxin 1-like disease in pigs. *The Journal of Experimental Medicine* , 1993 , 177 : 1745 – 1753 .
- [22] Yoshimura K , Tanimoto A , Abe T , et al. Shiga toxin 1 and 2 induce apoptosis in the amniotic cell line WISH. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* , 2002 , 9 : 22 – 26 .
- [23] Willam CE , Luismm , Scott HK , et al. Mammalian caspases structure , activation , substrates and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* , 1999 , 68 : 383 – 424 .

The apoptosis of Vero cells induced by Shiga toxin 2e

Can Li^{1,3} , Xueqin Ran¹ , Jiafu Wang^{1,2*}

(¹ School of Animal Science , Guizhou University , Guiyang 550025 , China)

(² Key Laboratory of Agricultural Biotechnology for Guizhou Province , Guiyang 550025 , China)

(³ Sichuan University of Arts and Science , Dazhou 635000 , China)

Abstract [Objective] Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) causes edema disease in piglets and hemolytic uremic syndrome in human. Shiga-like toxins (Stxs) produced by STEC induce mammalian cells death via either necrosis or apoptosis. However , the ability of stx2e , separated from edema disease (Stx2e) , to trigger apoptosis and the sequence of intracellular signaling events have not yet been completely defined. In this study we investigated the apoptotic effects of Stx2e on Vero cells.

[Methods] Vero cells were treated with different concentrations of Stx2e for different time and the apoptotic cells were characterized by acridine orange and ethidium bromide fluorescent dye staining. The fragmentation of chromatin from Vero cells treated with Stx2e were detected by agarose gel electrophoresis. The expression patterns of apoptosis-associated factors were assayed by Western blotting. **[Results]** Stx2e-treated cells showed characteristic features of apoptosis , including membrane blebbing , DNA fragmentation , chromatin condensation , and the formation of apoptotic bodies , whereas ricin did not induce apoptosis of Vero cells even at a high dose. Fluorescent dye staining showed that Stx2e induced apoptosis of Vero cells in dose- and time-dependent manners. Caspase-3 was activated whereas expression levels of bcl2 associated X protein (Bax) and caspase-9 had no change compared with the negative control. **[Conclusion]** Stx2e induced intensively apoptosis of Vero cells , which was mediated through the mitochondrion-independent pathway and might be through a receptor-dependent pathway.

Keywords : Shiga toxin 2e ; apoptosis ; Vero Cell ; Bax ; capase-9 ; capase-3

(本文责编 张晓丽 , 谷志静)