



产肠毒素大肠杆菌诱导肠上皮细胞凋亡的研究进展

李保良^{1,2,3}, 庞胜美^{1,2,3}, 吕林芬^{1,2,3}, 朱国强^{1,2,3*}, 段强德^{1,2,3*}

1 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009

2 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心 教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室, 江苏 扬州 225009

3 江苏省动物重要疫病和重要人兽共患病防控技术国际合作联合实验室, 江苏 扬州 225009

李保良, 庞胜美, 吕林芬, 朱国强, 段强德. 产肠毒素大肠杆菌诱导肠上皮细胞凋亡的研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(6): 2340-2349.

LI Baoliang, PANG Shengmei, LÜ Linfen, ZHU Guoqiang, DUAN Qiangde. Research progress in enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced apoptosis of intestinal epithelial cells[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(6): 2340-2349.

摘要: 产肠毒素大肠杆菌(enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)是引起人和动物腹泻的重要病原菌之一, 其中黏附素和肠毒素是其感染引起腹泻的主要毒力因子。首先, 黏附素介导 ETEC 与宿主小肠上皮细胞的黏附和定殖。随后, 定殖的细菌产生肠毒素, 导致水、电解质代谢紊乱, 最终引起水样腹泻。传统的观点认为 ETEC 属于非侵袭性大肠杆菌, 并不会引起肠上皮细胞凋亡和破坏肠道的屏障结构。但是越来越多的研究证据表明, 在体外和体内 ETEC 感染均可诱导肠上皮细胞凋亡, 破坏宿主肠黏膜屏障的完整性, 促进疾病发展。本文将就 ETEC 不同毒力因子诱导细胞凋亡的具体机制、细胞凋亡与疾病发展的相关性以及在临床如何利用抗凋亡治疗预防 ETEC 感染等方面进行综述, 旨在为进一步深入阐明 ETEC 的分子致病机制提供参考, 为防治 ETEC 引起的腹泻提供新策略。

关键词: 产肠毒素大肠杆菌; 致病机制; 凋亡

资助项目: 国家自然科学基金(32273002); 江苏省重点研究计划(BE2022348)

This work was supported by the National National Science Foundation of China (32273002) and the Jiangsu Science and Technology Bureau Project (BE2022348).

*Corresponding authors. E-mail: ZHU Guoqiang, yzqzhu@yzu.edu.cn; DUAN Qiangde, dqd@zu.edu.cn

Received: 2022-09-21; Accepted: 2023-01-28; Published online: 2023-02-02

Research progress in enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced apoptosis of intestinal epithelial cells

LI Baoliang^{1,2,3}, PANG Shengmei^{1,2,3}, LÜ Linfen^{1,2,3}, ZHU Guoqiang^{1,2,3*}, DUAN Qiande^{1,2,3*}

1 College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

2 Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-Product Safety, Ministry of Education, Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

3 Jiangsu Joint Laboratory for International Cooperation in Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: Adhesins and enterotoxins are the main virulence factors produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), one of the major pathogens causing diarrhea in both humans and animals. Adhesins mediate the initial adhesion of ETEC to intestinal epithelial cells, which leads to ETEC colonization of the host small intestine. Subsequently, the ETEC produces enterotoxins, which result in the loss of electrolytes and culminates in watery diarrhea. ETEC is typically regarded as a non-invasive pathogen, which does not induce the apoptosis of intestinal epithelial cells or destroy intestinal barrier structure. However, more and more evidence indicates that ETEC is able to induce the apoptosis of intestinal epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. The cell apoptosis would destroy the integrity of the intestinal mucosal barrier of the host and lead to ETEC-caused diarrhea. We introduce the mechanisms of apoptosis induced by different virulence determinants produced by ETEC, the correlation between intestinal epithelial cell apoptosis and ETEC-caused diarrhea, and the potential of using anti-apoptosis therapy to prevent ETEC infection in piglets, aiming to provide a reference for deciphering the molecular pathogenic mechanism of ETEC and provide new measures for preventing and treating diarrhea caused by the pathogen.

Keywords: enterotoxigenic *Escherichia coli*; pathogenic mechanism; apoptosis

产肠毒素大肠杆菌(enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)目前仍是引起低收入国家儿童(特别是年龄小于5岁的婴幼儿)和到这些地方的旅行者腹泻的主要病原菌之一^[1-2]。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)最新统计,每年发生腹泻的儿童有数亿例,30.4%的旅行者也出现腹泻症状^[3]。ETEC每年引起的腹泻病例逾1.28亿例,造成超过84万人死亡^[4]。尽管在一些国家,卫生条件的改善已将风险降低至8%–20%,但是在全球旅行者腹泻病例中,由ETEC引起

的病例占到总数的70%^[5],此外,ETEC也是引起新生幼畜腹泻的主要病原菌。其中ETEC感染所引起的新生仔猪和断奶仔猪腹泻(post-weaning diarrhea, PWD)严重影响仔猪的成活率和生产水平,一直是困扰全球养猪业的主要疾病之一^[6-8]。ETEC表达的众多异质性黏附素和肠毒素(热敏肠毒素和热稳定肠毒素)是其引起腹泻的主要毒力因子。对ETEC致病机理的研究表明,在黏附素的介导下,ETEC首先黏附、定殖至宿主小肠上皮细胞,然后通过释放肠毒素导致肠黏膜

通透性增加并刺激肠液过度分泌, 最终引起腹泻。EPEC 感染所致的腹泻不仅严重威胁着人类的健康, 而且也给全球养殖业造成了巨大的经济损失。在很长一段时间内, 抗生素在防治 EPEC 感染中发挥了至关重要的作用。但是, 由于长期滥用抗生素而导致的细菌耐药、药物残留、环境污染等问题层出不穷, 已经成为了全球公共卫生和食品安全领域关注的焦点^[9]。由于 EPEC 血清型与毒力因子众多、毒力因子异质性以及分泌的肠毒素本身具有强的毒性等问题, 现有的 F4/F5/F6 三价和 F4/F5/F6/F41 四价灭活苗, Coliprotec[®]F4 单价和 Coliprotec[®]F4/F18 二价活疫苗的免疫保护效果均还有待提高^[10]。因此, 进一步阐明 EPEC 的致病机制、研制高效和广谱疫苗、挖掘药物靶点迫在眉睫。

凋亡(apoptosis)是细胞程序性死亡的一种严格控制模式, 它包括半胱天冬酶(caspase)依赖性和 caspase 非依赖性两种途径, 其中 caspase 依赖性途径是体内的细胞凋亡的主要途径^[11]。caspase 依赖性途径包括由死亡受体和死亡配体相互作用介导的外源性凋亡途径以及由线粒体介导的内源性凋亡途径。在外源性凋亡途径中, 死亡配体与死亡受体结合后, 使 caspase-8 酶原通过自身切割转化为具有活性的 caspase-8, 并激活下游的 caspase-3 途径, 从而诱导细胞凋亡^[12]。在内源性凋亡途径中, 线粒体收到凋亡信号后会向细胞质中释放细胞色素 c (cytochrome, Cytc)。Cytc、凋亡酶激活因子(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)和 caspase-9 酶原形成复合体并激活 caspase-9, 活化的 caspase-9 切割并激活 caspase-3, 最终引起细胞凋亡^[13]。机体可以通过诱导自身细胞凋亡来抵御病原体的入侵, 但是另一方面, 病原体既可以通过诱导过度的细胞凋亡引发机体损伤, 也可以干扰细胞凋亡途径实现免疫逃避^[14]。一定程度的细胞凋

亡是肠上皮细胞再生、自我修复和维持内环境稳定所必需的, 但是过度的细胞凋亡会导致肠黏膜的通透性和渗透性增加, 造成肠道黏膜屏障的损伤, 从而导致炎症和腹泻。

虽然 EPEC 属于非侵袭性大肠杆菌, 但是越来越多的研究表明, EPEC 感染在体内、外模型中, 均可诱导宿主肠上皮细胞过度凋亡, 造成肠黏膜屏障损伤。本文重点总结了 EPEC 不同毒力因子诱导肠上皮细胞凋亡的具体分子机制, 并就抗凋亡物质在预防 EPEC 感染的潜在应用进行了分析, 旨在为临床上有效防治 EPEC 感染提供新的思路。

1 EPEC 全菌诱导肠上皮细胞凋亡

肠黏膜是肠道病原微生物的主要栖息地和最初定殖的场所。肠道病原菌常通过诱导宿主肠上皮细胞凋亡的方式来帮助其入侵和免疫逃逸, 从而有利于它们在宿主体内的生存和扩散^[15]。Johnson 等^[16]研究表明, 尽管猪源 EPEC 感染可以激活仔猪小肠上皮细胞 IPEC-J2 细胞凋亡信号途径中的 caspase-3 信号通道, 但是用 TUNEL 染色后并没有观察到明显的 DNA 双链断裂现象。DNA 双链断裂现象是细胞凋亡后期的主要特征, 以上结果表明, EPEC 感染主要诱导肠上皮细胞早期的凋亡, 在细胞凋亡后期作用有限。越来越多的研究也表明, 不管是在体外细胞模型还是体内, EPEC 感染均可以诱导肠上皮细胞凋亡, 导致肠道黏膜屏障的破坏, 从而有利于 EPEC 的定殖和毒素输入。Zhou 等^[17]在仔猪小肠上皮细胞 IPEC-J2 体外细胞模型中通过转录组学分析 F4ac⁺ EPEC 感染组和未感染组差异表达基因发现, 主要差异表达基因均与细胞凋亡过程相关, 表明 EPEC 感染可以诱导体外肠上皮细胞凋亡。Wang 等^[18]利用蛋白

质组学分析 F4ac⁺ ETEC 感染组和未感染组中仔猪空肠中差异表达蛋白发现, 两组主要差异表达蛋白均与细胞凋亡和细胞代谢相关, 表明 ETEC 感染在体内同样可以诱导肠上皮细胞凋亡。进一步研究表明, F4ac⁺ ETEC 感染仔猪后可以激活 caspase-8 和 caspase-3 信号通道, 并且抑制 caspase-9 信号通道, 表明 ETEC 在体内诱导仔猪小肠上皮细胞凋亡主要是通过激活外源性凋亡途径^[19]。为防止宿主细胞死亡, 确保病原体在体内增殖、传播和存活, 病原体已经进化出多种方法来干扰细胞凋亡途径。例如肠致病性大肠杆菌的 NleF 蛋白能够抑制 caspase-8 和 caspase-9 的活化, 从而有利于其在机体内的存活^[14]。因此, ETEC 感染后抑制 caspase-9 信号通路或许同样与其免疫逃避有关。Liu 等^[20]虽然同样证明了 ETEC 感染在体内可以诱导仔猪肠道上皮细胞凋亡, 但是认为其主要是通过激活内源性细胞凋亡途径。而在另一项研究中则表明, ETEC 感染仔猪后可以同时激活外源性和内源性途径, 从而诱导仔猪空肠和回肠上皮细胞的凋亡, 加剧仔猪腹泻^[21-22]。不同 ETEC 菌株诱导仔猪小肠上皮细胞凋亡信号途径有所差异可能主要与它们表达的毒力因子不同相关, 具体原因有待深入研究。当前关于 ETEC 感染诱导肠上皮细胞凋亡的研究主要集中于 F4⁺ ETEC 感染诱导仔猪小肠上皮细胞凋亡, 人源 ETEC 感染是否可以诱导人小肠上皮细胞凋亡, 以及表达不同菌毛黏附素的猪源 ETEC 感染是否也能够诱导小肠细胞凋亡均有待进一步的研究。

2 ETEC 黏附素诱导肠上皮细胞凋亡

黏附素是介导 ETEC 最初黏附、定殖至宿主小肠上皮细胞的重要毒力因子。ETEC 表达

的黏附素种类繁多, 人源 ETEC 表达的定殖因子种类就多达 20 多种, 猪源 ETEC 表达的菌毛黏附素包括 5 种(F4、F5、F6、F18 和 F41 菌毛)。此外, ETEC 还能表达多种非菌毛黏附素。ETEC 黏附、定殖于宿主小肠上皮细胞是其感染的第一步, 也是随后毒素分泌入细胞内的必须条件。对 ETEC 致病机理深入研究发现, 黏附素除了介导 ETEC 与宿主小肠上皮细胞的黏附和定殖外, 也是引起小肠上皮细胞凋亡的重要毒力因子^[23-24]。F4 菌毛黏附素是猪源 ETEC 表达的主要黏附素, 在体外仔猪肠上皮细胞模型 IPEC-J2 中研究表明, 与野生株相比, F4acΔ*faeG* 缺失株感染的 IPEC-J2 细胞中 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 的酶活性均显著降低, 致使小肠上皮细胞凋亡和肠道黏膜屏障损伤程度均减轻, 表明了 F4 菌毛是 ETEC 感染诱导肠上皮细胞凋亡的重要毒力因子^[25]。在最新的研究中, Li 等^[26]发现 F4⁺ ETEC 感染可以刺激 IPEC-J2 细胞中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-8 和 IL-6 炎性基因表达显著升高。TNF- α 是细胞凋亡通路外源性途径中经典的死亡配体。因此, F4 菌毛可能是通过刺激肠上皮细胞 TNF- α 的产生, 从而诱导宿主肠上皮细胞凋亡。但是 F4 菌毛在体内是否也能诱导仔猪小肠上皮细胞凋亡, 以及诱导细胞凋亡的具体分子机制均有待进一步的研究。鞭毛作为一种黏附素, 在介导 F4⁺ ETEC 和 F18⁺ *E. coli* 与仔猪肠道上皮细胞的黏附过程中发挥重要的作用^[27-28]。同时作为一种重要的病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 鞭毛蛋白在胞内可以激活 NLRP3 信号途径, 刺激 IL-1 β 和 IL-18 细胞因子的分泌, 从而诱导细胞凋亡^[29-31]。鞭毛是否参与了 ETEC 感染引起肠上皮细胞凋亡目前还没有相关报道。

3 肠毒素诱导肠上皮细胞凋亡

3.1 热敏肠毒素(heat-labile enterotoxin, LT)诱导的细胞凋亡

依据 LT 的抗原性和基因序列的不同, LT 肠毒素可以分为 LTI (通常表述为 LT)和 LTII (LTIIa、LTIIb 和 LTIIc)两种血清型^[32]。LT 肠毒素是 ETEC 分泌的两类肠毒素之一, 属于典型的 AB₅ 毒素, 全毒素包括一个 A 亚基和 5 个 B 亚基组成的五聚体。LT 肠毒素与霍乱弧菌分泌的霍乱毒素(cholera toxin, CT)在结构、免疫原性、生物学活性以及作用机理上均高度相似^[33]。已有研究表明, CT 毒素可以诱导 CD8⁺ T 细胞、人肺癌细胞、鼠骨髓单核白细胞病细胞和小鼠脾细胞等多种细胞发生凋亡^[34-35]。此外, AB₅ 家族毒素的另一成员, 由志贺氏菌分泌的志贺毒素(Shiga toxins, Stxs)也可以通过激活多种信号途径诱导内皮细胞等多种细胞凋亡, 但是在不同的细胞中的机制并不完全相同^[36-37]。以上结果揭示 AB₅ 家族毒素可以通过诱导细胞凋亡而促进病原菌感染, LT 肠毒素也可能与 ETEC 诱导的肠上皮细胞凋亡相关。

近年来研究发现, LT 肠毒素不仅具有强的细胞毒性, 在促进细菌黏附、免疫调节等方面同样发挥重要的作用^[38-39]。已有研究表明, ETEC 分泌的 LT 肠毒素可以诱导淋巴细胞凋亡。LT 肠毒素在体内可以诱导 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞凋亡, 并且 LT 肠毒素诱导未成熟淋巴细胞和成熟淋巴细胞凋亡的机制不相同^[40-44]。LT 诱导未成熟淋巴细胞凋亡是通过激活线粒体 caspase 依赖性凋亡途径, 并且在糖皮质激素的参与下完成的。LT 诱导成熟淋巴细胞凋亡则是依赖于其 B 亚基与 GM1 受体的结合。LTB 亚基与 GM1 受体结合后会激活 CD8⁺ T 细胞的 caspase-3 和 NF- κ B 信号途径, 使 Myc 蛋白的

表达量升高, 进而诱导 Cytc 释放和激活 caspase 蛋白水解级联反应, 从而诱导细胞凋亡。LT 毒素诱导未成熟淋巴细胞和成熟淋巴细胞凋亡的机制的不同主要是因为不同成熟期的淋巴细胞表面表达的分子不一样。

LT 肠毒素不仅可以诱导淋巴细胞凋亡, 还可以诱导机体小肠上皮细胞凋亡。Johnson 等^[16]在体外仔猪小肠上皮细胞 IPEC-J2 模型中研究发现, LT 肠毒素刺激虽然可以激活 caspase-3, 但是并未观察到细胞 DNA 断裂现象。以上结果表明, 在 ETEC 感染诱导的小肠上皮细胞凋亡过程中, LT 肠毒素在细胞凋亡早期发挥作用。最近的一项研究发现, LT 肠毒素在体外还可以诱导人结直肠腺癌细胞 HCT-8 和人结肠腺癌细胞 Caco-2 发生细胞凋亡^[45]。LT 肠毒素诱导肠上皮细胞凋亡依赖于激活内质网应激信号通路(PERK-eIF2-ATF4-CHOP)。而利用 RNA 干扰技术抑制 CHOP 蛋白的表达后, LT 诱导肠上皮细胞凋亡也明显得到抑制。本课题组前期在利用转录组学分析 F4ac⁺ ETEC 野生株和 F4ac Δ eltAB 缺失株感染 IPEC-J2 细胞前后基因表达的变化发现, 感染缺失株的 IPEC-J2 细胞中多种与细胞代谢和细胞凋亡信号通路相关的基因表达量显著降低, 进一步表明 LT 肠毒素是 F4ac⁺ ETEC 感染诱导仔猪小肠上皮细胞凋亡的重要毒力因子。

此外, LTII 肠毒素也能够诱导多种细胞发生凋亡。LTII 肠毒素诱导不同细胞凋亡的能力主要依赖于其 LTB 亚基与细胞表面表达的受体的结合能力。Arce 等^[46]证明 LT-IIa 肠毒素可以诱导 CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡。LT-IIa 诱导 CD8⁺ T 细胞凋亡主要依赖于 LTB 亚基与 CD8⁺ T 细胞表面的 GD1b 受体的结合。LT-IIb 由于与 GD1b 受体的亲和力较低, 所以并不引起 CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡。最近, Masso-Welch 等^[47]证明 LT-IIc 刺激可以激活三阴性乳腺癌(triple-negative

breast cancer, TNBC)细胞 BT549 和 MDA-MB-231 细胞中 caspase 3/7 信号通路, 从而诱导细胞凋亡。虽然 LTII 可以诱导 CD8⁺ T 淋巴细胞和 TNBC 细胞凋亡, 但是其是否可以诱导肠上皮细胞凋亡还不清楚。此外, 不同血清型 LT 肠毒素诱导不同细胞凋亡的具体分子机制, LT 的 2 个亚基在诱导细胞凋亡中的作用, 以及 LT 肠毒素诱导细胞凋亡与 ETEC 致病机制的关系等均有待深入研究。

3.2 热稳定肠毒素(heat-stable enterotoxin, ST)诱导的细胞凋亡

ST 肠毒素是 ETEC 分泌的一种少于 50 个氨基酸的多肽分子, 具有热稳定性, 包括 STa (猪源的 STp 和人源的 STh)、STb 和 EAST1。STa 通过结合和激活肠上皮细胞上的鸟苷酸环化酶 C (GC-C), 使细胞内环一磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)浓度升高, 从而激活 cGMP 依赖性蛋白激酶 II (cGMPKII), 导致囊性纤维化跨膜传导因子(cystic fibrosis transmembrane conduction factor, CFTR)磷酸化进而诱导 Cl⁻和 HCO₃⁻以及肠腔内的净液体分泌, 最终引起腹泻^[6]。除引起腹泻外, STa 肠毒素的产生也可引起细胞凋亡。Zhou 等^[48]研究发现, STp 肠毒素刺激可以引起小鼠小肠上皮细胞系 MODE-K 和仔猪小肠上皮细胞系 IPEC-J2 细胞凋亡。STp 肠毒素可以通过抑制 Wnt/β-catenin 的膜受体 Frizzled7 (FZD7)的表达水平, 阻断 Wnt/β-catenin 信号途径, 从而诱导细胞凋亡。因为 Wnt/β-catenin 信号通路是肠上皮细胞的有序更新的重要信号通路, 该研究为我们临床上有效防治 ETEC 感染引起的肠损伤提供了一种新的靶点和策略。最近另一项研究表明, 利用人源的尿鸟苷素(STa 类似物)处理人源的结肠癌腺细胞 T84, 可以刺激细胞内 cGMP 升高, 进而诱导细胞发生凋亡, 并且激活 cGMP 信号

级联的激素和神经递质都能使靶细胞发生凋亡^[49]。因此, STa 诱导细胞凋亡的机制可能与其刺激细胞内 cGMP 升高有关。

除了 STa 肠毒素, STb 肠毒素也可以诱导细胞凋亡。利用纯化的 STb 肠毒素处理人回盲肠癌细胞系 HRT-18 和大鼠回肠细胞系 IEC-18 后, 可以刺激细胞内 caspase-9 和 caspase-3 的表达量增加, 而 caspase-8 的表达量没有变化, 表明了 STb 肠毒素是通过激活内源性细胞凋亡途径诱导细胞凋亡^[50]。EAST1 肠毒素是否可以诱导细胞凋亡目前还没有相关报道。

4 抗凋亡物质在预防 ETEC 感染中的潜在应用

ETEC 感染诱导的肠上皮细胞大量凋亡会损伤宿主肠道黏膜屏障, 从而有利于菌株的定殖和肠毒素分泌进入胞内, 使其致病性增强。在畜牧业中, 大多数国家都限制在 ETEC 感染中预防性使用抗生素, 越来越多的抗生素替代品正在开发中, 以减轻肠道炎症, 保护肠道健康^[26]。目前一些研究发现, 在饲料中添加某些抗凋亡物质可以有效减轻 ETEC 感染过程中引起的机体肠道损伤。Gong 等^[51]的研究表明, 在仔猪饲料中添加 L-茶氨酸(LTA; γ-谷氨酰胺)能够显著提高肠道细胞中抗凋亡分子 Bcl-2 的表达水平, 同时降低促凋亡分子 Bax 和 caspase-3 切割产物蛋白的表达, 从而抑制 ETEC 感染诱导的肠道上皮细胞凋亡。Wan 等^[21]的研究表明, 海藻酸寡糖(alginate oligosaccharide, AOS)能抑制 TNFR1、caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 的表达, 同时抑制内源性和外源性细胞凋亡途径, 从而减轻 ETEC 引起的断奶仔猪肠道黏膜损伤, 保护肠道黏膜屏障。AOS 作为一种多糖, 本身具有抗氧化、抗炎、抗凋亡和抗微生物作

用。因此,其可能具有作为“替抗”产品添加于仔猪饲料的潜力,以用于防治 ETEC 感染引起的仔猪腹泻。此外,该团队发现在基础日粮中添加 100 mg/kg 的另一种寡糖低分子量的壳聚糖(LMWC)同样能抑制仔猪空肠和回肠细胞的凋亡率,减轻肠上皮细胞损伤,从而保护仔猪肠道的屏障功能,减轻仔猪的腹泻症状^[52]。厚朴皮质是一种用于治疗胃肠功能障碍的中药,它的功能性成分厚朴酚与和厚朴酚被报道可以通过抑制炎症细胞因子过度产生而延缓细胞凋亡过程,从而保护肠道黏膜完整性和调节胃肠功能紊乱^[24]。此外,Liu 等^[20]报道在饲料中添加黑水虻幼虫可以抑制 ETEC 感染引起的仔猪回肠细胞凋亡,保护肠道屏障不受损害。越来越多证据表明,饲料中添加抗凋亡物质能有效拮抗 ETEC 感染诱导的肠上皮细胞凋亡,保护肠道黏膜屏障的完整性,减轻 ETEC 感染引起的腹泻症状。因此,利用抗凋亡治疗来防治 ETEC 感染可能是临床上的一种新策略。

5 小结与展望

一定程度的细胞凋亡是机体抵御外源性病原体侵袭的一种“自我保护”反应,但是另一方面过度的细胞凋亡会损伤机体肠道黏膜屏障,破坏机体的免疫防御屏障。目前还不明确,ETEC 感染诱导肠上皮细胞凋亡到底是机体的一种自我防御行为,还是 ETEC 逃避宿主免疫反应一种策略。另外,虽然已经发现 ETEC 产生的多种黏附素和肠毒素均可以诱导细胞凋亡,但是具体哪种毒力因子发挥主导作用、各种毒力因子诱导细胞凋亡的信号通路和具体分子机制等仍不清楚。明确 ETEC 诱导细胞凋亡的机制和意义,有利于进一步深入阐明 ETEC 与宿主细胞相互作用的机理和致病机制。在当前全国饲料中全面禁止添加抗生素、人 ETEC

感染无疫苗可用和兽用 ETEC 疫苗免疫保护效果不佳的大背景下,抗凋亡治疗可能为研制防治 ETEC 感染的高效药物和新型菌苗提供了一种新的靶点和策略。

参考文献

- [1] FLECKENSTEIN JM. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections[J]. *Current Infectious Disease Reports*, 2019, 21(3): 9.
- [2] LAMBERTI LM, BOURGEOIS AL, FISCHER WALKER CL, BLACK RE, SACK D. Estimating diarrheal illness and deaths attributable to *Shigellae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* among older children, adolescents, and adults in south Asia and Africa[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014, 8(2): e2705.
- [3] REN LL, ZHOU JY, LIANG SJ, WANG XQ. Impaired intestinal stem cell activity in ETEC infection: enterotoxins, cyclic nucleotides, and Wnt signaling[J]. *Archives of Toxicology*, 2022, 96(5): 1213-1225.
- [4] KHALIL I, WALKER R, PORTER CK, MUHIB F, CHILENGI R, CRAVIOTO A, GUERRANT R, SVENNERHOLM AM, QADRI F, BAQAR S, KOSEK M, KANG G, LANATA C, ARMAH G, WIERZBA T, HASSO-AGOPSOWICZ M, GIERSING B, LOUIS BOURGEOIS A. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) vaccines: priority activities to enable product development, licensure, and global access[J]. *Vaccine*, 2021, 39(31): 4266-4277.
- [5] WANG HX, ZHONG ZF, LUO Y, COX E, DEVRIENDT B. Heat-stable enterotoxins of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their impact on host immunity[J]. *Toxins*, 2019, 11(1): 24.
- [6] DUBREUIL JD, ISAACSON RE, SCHIFFERLI DM. Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. *EcoSal Plus*, 2016, 7(1): 10.
- [7] LUPPI A. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance[J]. *Porcine Health Management*, 2017, 3: 16.
- [8] LAIRD TJ, ABRAHAM S, JORDAN D, PLUSKE JR, HAMPSON DJ, TROTT DJ, O'DEA M. Porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*: antimicrobial resistance and development of microbial-based alternative control strategies[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 258: 109117.
- [9] KOTLOFF KL. Bacterial diarrhoea[J]. *Current*

- Opinion in Pediatrics, 2022, 34(2): 147-155.
- [10] DUBREUIL JD. Pig vaccination strategies based on enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2021, 52(4): 2499-2509.
- [11] NAGATA S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells[J]. Annual Review of Immunology, 2018, 36: 489-517.
- [12] RODRIGUEZ DA, QUARATO G, LIEDMANN S, TUMMERS B, ZHANG T, GUY C, CRAWFORD JC, PALACIOS G, PELLETIER S, KALKAVAN H, SHAW JJP, FITZGERALD P, CHEN MJ, BALACHANDRAN S, GREEN DR. Caspase-8 and FADD prevent spontaneous ZBP1 expression and necroptosis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(41): e2207240119.
- [13] XIONG YA, TANG YD, ZHENG CF. The crosstalk between the caspase family and the cGAS-STING signaling pathway[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2021, 13(10): 739-747.
- [14] SAITZ W, MONTERO DA, PARDO M, ARAYA D, deLa FUENTE M, HERMOSO MA, FARFÁN MJ, GINARD D, ROSSELLÓ-MÓRA R, RASKO DA, del CANTO F, VIDAL RM. Characterization of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) outer membrane proteins provides potential molecular markers to screen putative AIEC strains[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(16): 9005.
- [15] TUMMERS B, GREEN DR. The evolution of regulated cell death pathways in animals and their evasion by pathogens[J]. Physiological Reviews, 2022, 102(1): 411-454.
- [16] JOHNSON AM, KAUSHIK RS, ROTELLA NJ, HARDWIDGE PR. Enterotoxigenic *Escherichia coli* modulates host intestinal cell membrane asymmetry and metabolic activity[J]. Infection and Immunity, 2009, 77(1): 341-347.
- [17] ZHOU CL, LIU ZZ, JIANG JC, YU Y, ZHANG Q. Differential gene expression profiling of porcine epithelial cells infected with three enterotoxigenic *Escherichia coli* strains[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 330.
- [18] WANG WW, LIU Y, TANG H, YU Y, ZHANG Q. *ITGB5* plays a key role in *Escherichia coli* F4ac-induced diarrhea in piglets[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 2834.
- [19] XIA YY, BIN P, LIU SJ, CHEN S, YIN J, LIU G, TANG ZY, REN WK. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection promotes apoptosis in piglets[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 125: 290-294.
- [20] LIU MM, YUAN BY, JIN XX, ZHU MQ, XU HD, XIE GJ, WANG ZF, ZHANG X, XU ZY, LI B, HUANG YH, LV YT, WANG W. Citric acid promoting B lymphocyte differentiation and anti-epithelial cells apoptosis mediate the protective effects of *Hermetia illucens* feed in ETEC induced piglets diarrhea[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8: 751861.
- [21] WAN J, ZHANG J, CHEN DW, YU B, MAO XB, ZHENG P, YU J, HUANG ZQ, LUO JQ, LUO YH, HE J. Alginate oligosaccharide alleviates enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced intestinal mucosal disruption in weaned pigs[J]. Food & Function, 2018, 9(12): 6401-6413.
- [22] FLYNN AN, BURET AG. Caspases-3, -8, and-9 are required for induction of epithelial cell apoptosis by enteropathogenic *E. coli* but are dispensable for increased paracellular permeability[J]. Microbial Pathogenesis, 2008, 44(4): 311-319.
- [23] XIAO K, YANG Y, ZHANG Y, LV QQ, HUANG FF, WANG D, ZHAO JC, LIU YL. Long-chain PUFA ameliorate enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced intestinal inflammation and cell injury by modulating pyroptosis and necroptosis signaling pathways in porcine intestinal epithelial cells[J]. British Journal of Nutrition, 2022, 128(5): 835-850.
- [24] DENG YL, HAN XF, TANG SX, LI CJ, XIAO WJ, TAN ZL. Magnolol and honokiol attenuate apoptosis of enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced intestinal epithelium by maintaining secretion and absorption homeostasis and protecting mucosal integrity[J]. Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 2018, 24: 3348-3356.
- [25] XIA PP, WU YP, LIAN SQ, QUAN GM, WANG YT, ZHU GQ. Deletion of FaeG alleviated enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ac-induced apoptosis in the intestine[J]. AMB Express, 2021, 11(1): 44.
- [26] LI Q, LI LY, CHEN YH, YU CN, AZEVEDO P, GONG J, YANG CB. *Bacillus licheniformis* PF₉ improves barrier function and alleviates inflammatory responses against enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 infection in the porcine intestinal epithelial cells[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2022, 13(1): 86.
- [27] 周明旭. K88ac+产肠毒素大肠杆菌相关新毒力因子的研究[D]. 扬州: 扬州大学博士学位论文, 2016.

- ZHOU MX. New virulence factors involved in K88ac+ enterotoxigenic *Escherichia coli*[D]. Yangzhou: Doctoral Dissertation of Yangzhou University, 2016 (in Chinese).
- [28] DUAN QD, ZHOU MX, LIANG H, ZHU XF, GUO ZY, LI Y, HARDWIDGE PR, ZHU GQ. Contribution of flagellin subunit FliC to piglet epithelial cells invasion by F18ab *E. coli*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 166(1/2): 220-224.
- [29] 庞胜美, 吴文文, 丁雪燕, 刘思国, 王晓钧, 段强德, 朱国强. 细菌鞭毛蛋白免疫佐剂活性作用机制及应用研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(8): 850-855.
- PANG SM, WU WW, DING XY, LIU SG, WANG XJ, DUAN QD, ZHU GQ. Research on the mechanism and application of flagellin in immune adjuvant activity[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 42(8): 850-855 (in Chinese).
- [30] FRANCHI L, AMER A, BODY-MALAPEL M, KANNEGANTI TD, ÖZÖREN N, JAGIRDAR R, INOHARA N, VANDENABEELE P, BERTIN J, COYLE A, GRANT EP, NÚÑEZ G. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 β in *Salmonella*-infected macrophages[J]. *Nature Immunology*, 2006, 7(6): 576-582.
- [31] FRANCHI L, KAMADA N, NAKAMURA Y, BURBERRY A, KUFFA P, SUZUKI S, SHAW MH, KIM YG, NÚÑEZ G. NLRC4-driven production of IL-1 β discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense[J]. *Nature Immunology*, 2012, 13(5): 449-456.
- [32] DUAN QD, XIA PP, NANDRE R, ZHANG WP, ZHU GQ. Review of newly identified functions associated with the heat-labile toxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 292.
- [33] ZALEM D, JUHÁS M, TERRINONI M, KING-LYONS N, LEBENS M, VARROT A, CONNELL TD, TENEBERG S. Characterization of the ganglioside recognition profile of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LT-IIc[J]. *Glycobiology*, 2022, 32(5): 391-403.
- [34] LIU T, WEI Y, LIU G, SHI BY, GIOVANNI S, PETERSON JW, CHOPRA AK. A mutated cholera toxin without the ADP-ribosyltransferase activity induces cytokine production and inhibits apoptosis of splenocytes in mice possibly *via* Toll-like receptor-4 signaling[J]. *Molecular Immunology*, 2016, 75: 21-27.
- [35] OLOOMI M, MOAZZEZY N, BOUZARI S. Protein kinase signaling by shiga toxin subunits[J]. *Journal of Medical Signals and Sensors*, 2021, 12(1): 57-63.
- [36] MENGE C. Molecular biology of *Escherichia coli* shiga toxins' effects on mammalian cells[J]. *Toxins*, 2020, 12(5): 345.
- [37] PARK JY, JEONG YJ, PARK SK, YOON SJ, CHOI S, JEONG DG, CHUNG SW, LEE BJ, KIM JH, TESH VL, LEE MS, PARK YJ. Shiga toxins induce apoptosis and ER stress in human retinal pigment epithelial cells[J]. *Toxins*, 2017, 9(10): 319.
- [38] VERBRUGGHE E, van PARYS A, LEYMAN B, BOYEN F, ARNOUITS S, LUNDBERG U, DUCATELLE R, van den BROECK W, YEKTA MA, COX E, HAESBROUCK F, PASMANS F. Heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* promotes intestinal colonization of *Salmonella enterica*[J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2015, 43: 1-7.
- [39] DUAN QD, PANG SM, FENG LL, LIU JQ, LV LF, LI BL, LIANG YX, ZHU GQ. Heat-labile enterotoxin enhances F4-producing enterotoxigenic *E. coli* adhesion to porcine intestinal epithelial cells by upregulating bacterial adhesins and STb enterotoxin[J]. *Veterinary Research*, 2022, 53(1): 88.
- [40] SALMOND RJ, PITMAN RS, JIMI E, SORIANI M, HIRST TR, GHOSH S, RINCÓN M, WILLIAMS NA. CD8⁺ T cell apoptosis induced by *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit occurs *via* a novel pathway involving NF-kappaB-dependent caspase activation[J]. *European Journal of Immunology*, 2002, 32(6): 1737-1747.
- [41] TAMAYO E, MERINO R, GONZÁLEZ-ROJAS J, MARQUINA R, SANTIUSTE I, AMADO JA, RAPPUOLI R, del GIUDICE G, MERINO J. The *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin induces apoptosis of immature lymphocytes *in vivo via* a glucocorticoid-dependent pathway[J]. *European Journal of Immunology*, 2005, 35(12): 3505-3515.
- [42] TAMAYO E, POSTIGO J, del GIUDICE G, RAPPUOLI R, BENITO A, YAGITA H, MERINO R, MERINO J. Involvement of the intrinsic and extrinsic cell-death pathways in the induction of apoptosis of mature lymphocytes by the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin[J]. *European Journal of Immunology*, 2009, 39(2): 439-446.
- [43] SALMOND RJ, WILLIAMS R, HIRST TR, WILLIAMS NA. Selective induction of CD8⁺ CD4⁻

- thymocyte apoptosis mediated by the B-subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin[J]. Immunology Letters, 2003, 88(1): 43-46.
- [44] SORIANI M, WILLIAMS NA, HIRST TR. *Escherichia coli* enterotoxin B subunit triggers apoptosis of CD8(+) T cells by activating transcription factor c-myc[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(8): 4923-4930.
- [45] LU X, LI CM, LI CC, LI PC, FU EQ, XIE YH, JIN FG. Heat-labile enterotoxin-induced PERK-CHOP pathway activation causes intestinal epithelial cell apoptosis[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 244.
- [46] ARCE S, NAWAR HF, RUSSELL MW, CONNELL TD. Differential binding of *Escherichia coli* enterotoxins LT-IIa and LT-IIb and of cholera toxin elicits differences in apoptosis, proliferation, and activation of lymphoid cells[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(5): 2718-2727.
- [47] MASSO-WELCH P, GIRALD BERLINGERI S, KING-LYONS ND, MANDELL L, HU J, GREENE CJ, FEDEROWICZ M, CAO P, CONNELL TD, HEAKAL Y. LT-IIc, A bacterial type II heat-labile enterotoxin, induces specific lethality in triple negative breast cancer cells by modulation of autophagy and induction of apoptosis and necroptosis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 20(1): 85.
- [48] ZHOU JY, HUANG DG, GAO CQ, YAN HC, ZOU SG, WANG XQ. Heat-stable enterotoxin inhibits intestinal stem cell expansion to disrupt the intestinal integrity by downregulating the Wnt/ β -catenin pathway[J]. Stem Cells, 2021, 39(4): 482-496.
- [49] PRASAD H, MATHEW JKK, VISWESWARIAH SS. Receptor guanylyl cyclase C and cyclic GMP in health and disease: perspectives and therapeutic opportunities[J]. Frontiers in Endocrinology, 2022, 13: 911459.
- [50] BUTT S, SALEH M, GAGNON J. Impact of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) on gut health and function[J]. Toxins, 2020, 12(12): 760.
- [51] GONG ZH, LIU QL, LIN L, DENG YL, CAI SX, LIU ZY, ZHANG S, XIAO WJ, XIONG S, CHEN D. L-theanine prevents ETEC-induced liver damage by reducing intrinsic apoptotic response and inhibiting ERK1/2 and JNK1/2 signaling pathways[J]. European Journal of Pharmacology, 2018, 818: 184-190.
- [52] WAN J, ZHANG J, WU GZ, CHEN DW, YU B, HUANG ZQ, LUO YH, ZHENG P, LUO JQ, MAO XB, YU J, HE J. Amelioration of enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced intestinal barrier disruption by low-molecular-weight chitosan in weaned pigs is related to suppressed intestinal inflammation and apoptosis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(14): 3485.