

弓形虫 *TgHly-III* 蛋白诱导虫体从宿主细胞逸出

张倩^{1,2}, 金郁¹, 姚湧¹, 计永胜¹, 汪学龙¹

摘要 目的 检测外源性弓形虫三型溶血素(*TgHly-III*)蛋白诱导弓形虫逸出的效果和分子机制。方法 通过在线软件预测*TgHly-III*的功能与结构,外源表达*TgHly-III*蛋白,并用其孵育感染弓形虫的宿主细胞,用流式细胞仪在不同时间点检测逸出虫体数目;用免疫印迹检测宿主细胞凋亡相关蛋白的表达水平;用不同阻断剂阻断虫体钙离子、运动能力和细胞凋亡、程序性坏死通路,检测*TgHly-III*诱导虫体逸出效果。结果 *TgHly-III*在序列上具有较高的保守性,具有膜穿孔功能;外源表达的*TgHly-III*可有效诱导弓形虫从宿主细胞逸出,并且此种逸出依赖于虫体内钙离子和虫体的运动能力;阻断宿主细胞凋亡途径后,*TgHly-III*诱导虫体逸出效率显著降低,并且*TgHly-III*孵育可以提高宿主细胞凋亡相关蛋白 Bax 的表达和 JNK、p38 的磷酸化水平。结论 *TgHly-III*可以通过细胞凋亡途径诱导虫体从宿主细胞逸出,这类逸出与虫体钙离子和运动能力有关。

关键词 弓形虫;三型溶血素蛋白;逸出;细胞凋亡

中图分类号 R 382.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)01-0010-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.003

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是一种细胞内寄生原虫,世界人群的隐性感染率约为 30%^[1]。弓形虫逸出时破碎宿主细胞是虫体损伤机体的主要原因。课题组在弓形虫基因组(<http://toxodb.org/toxo/>)中发现一个与细菌三型溶血素(Hemolysin III)同源的弓形虫三型溶血素(*TgHly-III*)基因。研究^[2]显示蜡样芽孢杆菌的三型溶血素可以结合到人红细胞表面,形成微孔道,造成红细胞裂解。弓形虫*TgHly-III*基因在虫体入侵细胞后 33~44 h 达到

转录峰值,与虫体逸出时间以及另一调节物质脱落酸的合成峰值时间吻合。但*TgHly-III*在弓形虫逸出过程的作用尚未明确。该研究通过生物信息学分析了*TgHly-III*的结构和进化,并对*TgHly-III*进行了外源表达,用*TgHly-III*诱导了弓形虫的逸出。结果显示,外源性*TgHly-III*可以诱导弓形虫从宿主细胞提前逸出,此类逸出和宿主细胞凋亡途径相关。该研究从弓形虫自身蛋白角度解析了弓形虫致病作用,为弓形虫病的防治提供了新的线索。

1 材料与方法

1.1 细胞、虫株与主要试剂 虫体细胞质表达黄色荧光蛋白的弓形虫 RH 株(*TgMic-Yfp*)由中国农业大学国家动物寄生原虫实验室索勋教授课题组惠赠,并在液氮保存。实验所用人包皮成纤维细胞(human foreskin fibroblast, HFF)购自中国医学科学院细胞资源中心。BAPTA-AM、Z-VAD-FMK、Nec-1 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; anti-Bax、anti-JNK、anti-pJNK、anti-actin、anti-p38、anti-p-p38 抗体购自上海生工生物工程股份有限公司。蛋白纯化试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于南京碧云天生物科技有限公司。

1.2 生物信息学分析和蛋白表达 本研究所用蛋白序列比对网站为欧洲生物信息研究所 <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; 蛋白三级结构预测网站为华盛顿大学 Baker 实验室 <http://roberta.bakerlab.org/>。转化有 pET28a-*TgHly-III* 载体的 BL21 感受态以菌液形式保存于本实验室 -80 °C 冰箱。将此菌液接种于含卡那霉素的 Luria-Bertani (LB) 液体培养基中, 37 °C 培养过夜, 约 12 h, 次日用异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达, 分时间段收集菌液, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。用 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒对蛋白进行纯化, 并用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行浓度测定。

1.3 虫体逸出实验 弓形虫 *TgMic-Yfp* 速殖子培养于 HFF 细胞, 36 h 后, 向细胞培养基中加入重组 *TgHly-III* 至终浓度 10 μg/ml (以不加蛋白和 10 μg/ml BSA 作为对照组), 分别孵育 0、30 和 60 min。收

2018-09-28 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1708085QH222); 安徽高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2016A353)

作者单位: ¹安徽医科大学基础医学院人体寄生虫学教研室, 合肥 230032

²合肥市第五人民医院检验科, 合肥 230000

作者简介: 张倩, 女, 硕士研究生;

计永胜, 男, 讲师, 责任作者, E-mail: jiyongshengkey@hotmail.com;

汪学龙, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wan-gxl1964@163.com

集细胞培养上清液,流式细胞仪对培养基中的速殖子进行计数,体积为每个处理计数 50 μl 培养基。为检测逸出是否与虫体钙离子、运动能力有关,*TgHly-III* 孵育前先用 BAPTA-AM (5 $\mu\text{mol/L}$, 10 min)、细胞松弛素-D (Cytochalasin-D, Cyto-D, 5 $\mu\text{mol/L}$, 20 min) 进行预处理;为检测逸出是否与宿主细胞凋亡或程序性坏死通路有关,感染细胞用 Z-VAD-FMK (10 $\mu\text{mol/L}$, 20 min) 或 Nec-1 (20 $\mu\text{mol/L}$, 20 min) 进行预处理^[3];然后用 10 $\mu\text{g/ml}$ *TgHly-III* 孵育 60 min,用流式细胞仪对逸出虫体进行计数。

1.4 Western blot 实验 弓形虫 *TgMic-Yfp* 速殖子培养于 HFF 细胞,36 h 后,向细胞培养基中加入 *TgHly-III* 蛋白至终浓度 10 $\mu\text{g/ml}$,分别孵育 0、30 和 60 min。收集细胞总蛋白,用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白(20 $\mu\text{g/孔}$),转膜至 PVDF 膜,按顺序孵育抗体显色。抗体稀释比例按照文献报道^[4],做相应调整为:Anti-Bax (1 : 2 000)、anti-JNK (1 : 1 000)、anti-pJNK (1 : 1 000)、anti-actin (1 : 5 000)、anti-p38 (1 : 1 000)、anti-p-p38 (1 : 500)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,作图软件为 GraphPad Prism 6.0。组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *TgHly-III* 蛋白的生物信息学分析和表达 克隆得到了 *TgHly-III* 基因片段,并提交到美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库(GenBank: KF651011.1),对 *TgHly-III* 蛋白序列进行了生物信息学分析。结果显示,*TgHly-III* 属于溶血素蛋白家族成员,氨基酸序列同诺氏疟原虫溶血素蛋白(PkHly)和夏氏疟原虫溶血素蛋白(PcHly)、蜡样芽孢杆菌三型溶血素(SaHly-III)存在很大相似性,尤其是 80 个氨基酸以后的三型溶血素蛋白功能区域,进化上也比较相近。见图 1A。对 *TgHly-III* 三级结构进行预测显示其为跨膜蛋白,可能存在细胞膜穿孔功能。*TgHly-III* 大小约为 30 ku,与预测结果相近。见图 1B。

2.2 外源性 *TgHly-III* 蛋白诱导虫体逸出 用弓形虫 *TgMic-Yfp* 感染 HFF 细胞 36 h 后,用 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 *TgHly-III* 孵育细胞不同时间(0、30、60 min),收集细胞培养液,用流式细胞仪分析 50 μl 培养液中虫体数目,计算逸出效率。结果显示,随着外源表达的 *TgHly-III* 蛋白孵育时间延长,培养基中虫体数目

升高($F = 254.4$, $P < 0.05$),差异有统计学意义,而无蛋白添加组和 BSA 组虫体数目无明显变化,显示 *TgHly-III* 蛋白可以有效诱导虫体逸出。用钙离子螯合剂 BAPTA 螯合虫体内钙离子后,*TgHly-III* 诱导虫体逸出比率显著下降(*TgHly-III* 组 vs *TgHly-III* + BAPTA 组: 22 470 \pm 4 203 vs 2 164 \pm 666.1),差异有统计学意义($F = 69.33$, $P < 0.05$)。同样结果出现在 Cyto-D 处理组,虫体逸出比率下降(*TgHly-III* 组 vs *TgHly-III* + BAPTA 组: 21 514 \pm 3 157 vs 2 250 \pm 871.6),差异有统计学意义($F = 104.8$, $P < 0.05$)。此结果提示 *TgHly-III* 诱导虫体逸出与钙离子和虫体运动能力有关。见图 2。

2.3 宿主细胞凋亡蛋白的表达 用细胞死亡抑制剂对 *TgHly-III* 诱导虫体逸出进行阻断。结果显示:细胞凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 能有效抑制 *TgHly-III* 诱导性虫体逸出(*TgHly-III* 组 vs *TgHly-III* + Z-VAD-FMK 组: 25 455 \pm 3 244 vs 6 218 \pm 938.4),差异有统计学意义($F = 81.51$, $P < 0.05$)。但是,细胞程序性坏死抑制剂 Nec-1 对 *TgHly-III* 诱导性虫体逸出的阻断效果不明显(*TgHly-III* 组 vs *TgHly-III* + Nec-1 组: 25 455 \pm 3 244 vs 20 117 \pm 4 412),差异无统计学意义($F = 81.51$, $P > 0.05$)。此外,检测了 *TgHly-III* 孵育细胞后主要凋亡相关蛋白的表达。结果显示:促凋亡蛋白 Bax 随着 *TgHly-III* 孵育时间增加表达量上升。同时 JNK 蛋白和 p38 蛋白的磷酸化水平提高。见图 3。

3 讨论

弓形虫对宿主的致病性多是在胞内增殖末期逸出时破碎被感染细胞引发的。因此,研究虫体逸出的调控机制有助于解析虫体的毒力及其致病机制^[5]。

早期研究^[6]表明,诱导弓形虫从宿主细胞逸出的是钙离子载体 A23187。钙离子载体诱导虫体逸出依赖于虫体细胞骨架的重组和虫体的运动能力。用膜通透性钙离子螯合剂 BAPTA-AM 处理虫体感染的细胞后,钙离子载体诱导虫体逸出就不会发生。诱导弓形虫逸出的虫体效应蛋白也多与钙离子相关,例如弓形虫穿孔素样蛋白(*TgPLP-1*)^[5]、弓形虫肌球蛋白 H(*TgMyoH*)^[7]、弓形虫钙依赖蛋白激酶 1(*TgCDPK1*)^[8]和弓形虫钙依赖蛋白激酶 3(*TgCDPK3*)^[9]等。本研究建立了用流式细胞仪检测弓形虫逸出的实验平台,发现外源表达纯化的 *TgHly-III* 蛋白可以有效诱导弓形虫从宿主细胞逸出,提示此

蛋白在弓形虫致病过程中的作用。同时, *TgHly-III* 蛋白诱导弓形虫逸出与虫体内钙离子以及虫体运动能力有关, 提示逸出过程是虫体主动的。弓形虫虫体钙离子调节通路主要有 IP3 依赖途径^[10] 和脱落酸途径^[11], *TgHly-III* 蛋白诱导弓形虫逸出所依赖的信号通路仍有待于进一步研究。*TgPLP-1* 是弓形虫

经典的膜穿孔蛋白, 在弓形虫逸出细胞前释放, 定位于虫体微线体。本文所研究的 *TgHly-III* 蛋白生物信息学分析也合成于虫体逸出前期, 但具体虫体定位需要进一步实验确定。

此外, 死亡受体 Fas 与其配体的结合以及穿孔素孵育、一氧化氮^[12]、肿瘤坏死因子- α 等宿主细胞

A CLUSTAL O(1.2.0) multiple sequence alignment

SaHly-III	-----MMSKSTKKS-----	9
TgHly-III	MGGKGVQARGDASSEKTQEP-SQLRARQTQEGKDAKLSRTEEKQTSEATPSLLGKLQHPT	59
PkHly	MDAI----ETDVTNTSYKKAINYLKERS-QNIDIFDVTGTTDINDETITEFIRSNILSPN	55
PcHly	MDLI----RNSVTIESCKKALNYLKERY-QNVDIFDVIIDINDETISEFIKSSILSPN	55
	: : : .	
SaHly-III	NDTIVETFK-----DIPLSFGEEIGNAASHGVAALLTLLVLPYAAVHSYIA---HGTLA	61
TgHly-III	QRSLTDKVRLRSHSSDVKVEEGALVVRPVLRGKIHLTLLILSPA--WIFFILSACSSPSS	117
PkHly	DKQIVELFNEKKINKIMLINYMERKVKTILQGKIHLTLLVLTSPV--WIAYMLLISKTLKT	113
PcHly	DRQIVEMFNEKRINKIMLINYMERKVKTILQGKIHLMLVLASPI--WITYMLHVSKTVWA	113
	: : : : : . : : . : * * : : * : : :	
SaHly-III	SVSMSIYVISIFMMFISSTIYHSMQNE--TPHKYILRIIDHSMIYVAISGTYTPILLTVV	119
TgHly-III	FVAAAIISCFVFNFMASALLHCFEWHTRPGIYQLLHKLDHAGIFMVISGTTPIPMMLL	177
PkHly	KIFTSIAALCMFFNFASFLLHNFWEK--PELYFLIEKIDHIGIFLMISGSCLPVPALLF	171
PcHly	KVFISIAALCMFFNFASFLLHNFWEK--PELFFLIEKIDHIGIFLMISGSCLPVPAMIF	171
	: : * : : . * : * : * : : : : : * * * : * : : .	
SaHly-III	GGWIGWTVFILLWGTTLWGILYKSIA--VKVNQKLSLIVYLVMGWVGILLPIIFRTSW	177
TgHly-III	DAGSSCWLLLVQLAATIYGFCSHIFGDLTSTGRARRAYTYIFVGLLHALFLSEYYRVLKS	237
PkHly	NKIQFLYIILQGLTSLFGCLFICFRFSTGNRITRACTYVIAGLLHVLFLKDYIMGLIP	231
PcHly	NKIKFLYIIVILQGLTSLFGCLFICFRFSTGNRITRALTYVIAGFLHATFLKDYIMGLIP	231
	: : : : : * : : . : : . * : * : : *	
SaHly-III	IFILFIFLGGVSYIIGAWFYAQKNRPY-----FHMIWHIFVIASLLHLIAILYFM---	228
TgHly-III	SELIAVFALASLYVVGALVYSCKRPDPFPLVYGFHEVFHSCFLSFLLLWLDYVVIKRV	297
PkHly	KEIAFLIFLATLYCLGATFYSMKKPNPIKGNET-----	264
PcHly	QEIMFFIFLASLYCLGAVIYSMKKPNLIKIGIFHDIFHICCLGSLFTMALNCSVIRRN	291
	: : . : * : * * : * :	
SaHly-III	---	228
TgHly-III	EWG	300
PkHly	---	264
PcHly	T---	292

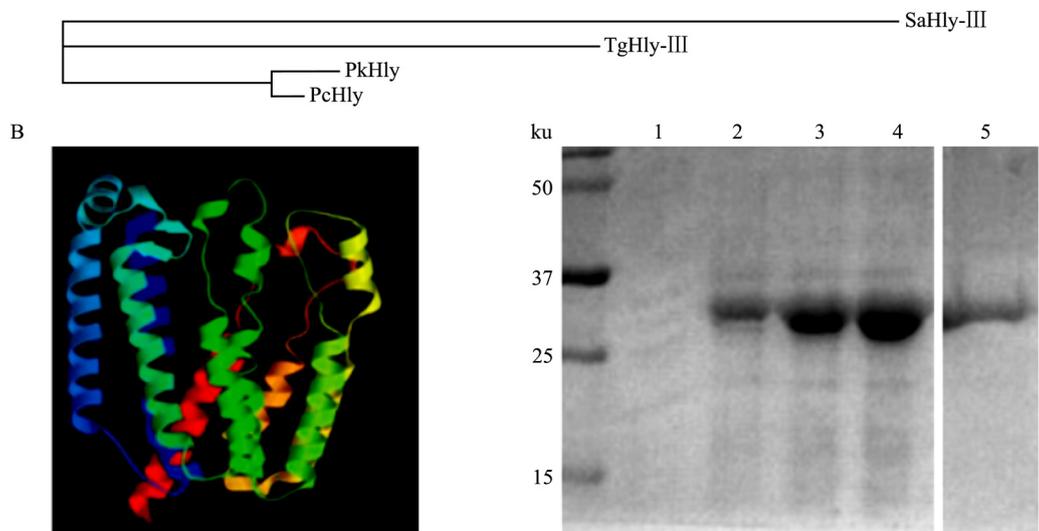


图1 *TgHly-III* 蛋白的生物信息学分析和蛋白表达

A: *TgHly-III* 的氨基酸序列对比; B: *TgHly-III* 蛋白的三级结构预测和原核表达; 1: 诱导前; 2: 诱导 1 h; 3: 诱导 3 h; 4: 诱导 5 h; 5: 纯化后

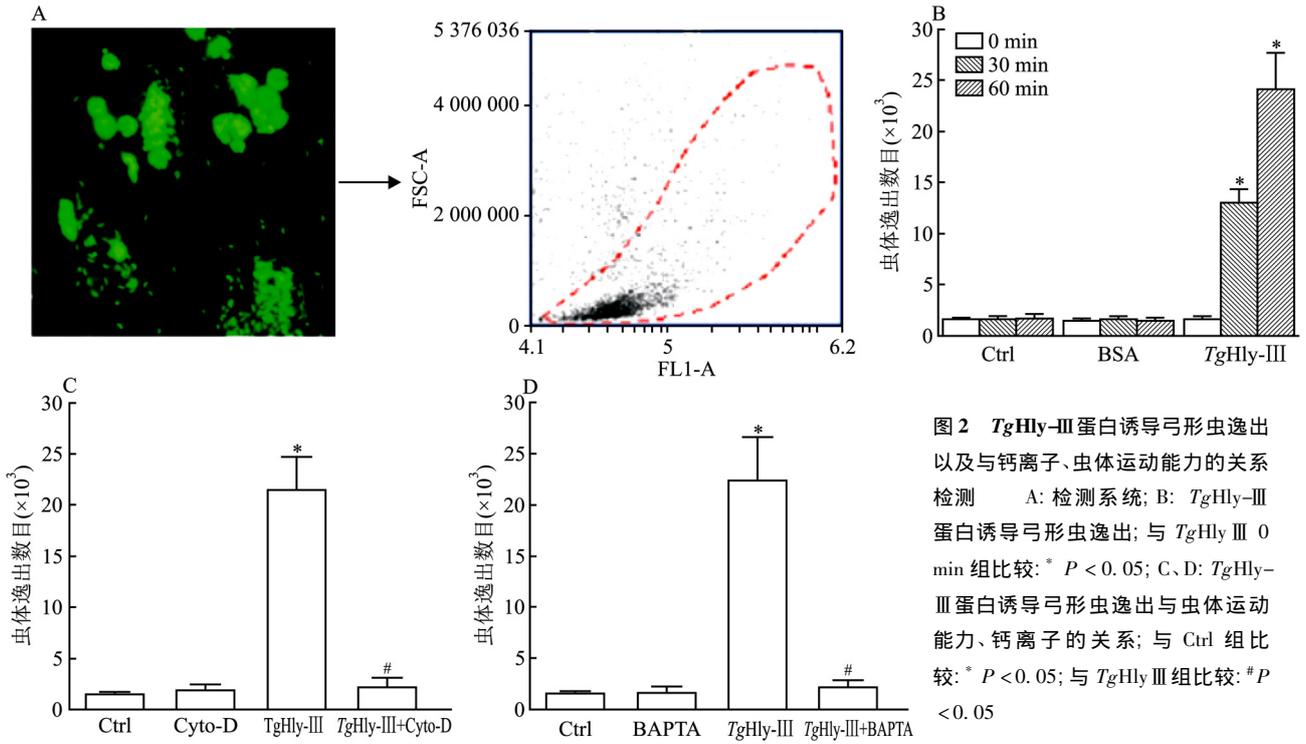


图2 *TgHly-III*蛋白诱导弓形虫逸出以及与钙离子、虫体运动能力的关系检测 A: 检测系统; B: *TgHly-III*蛋白诱导弓形虫逸出;与 *TgHly-III* 0 min 组比较: * $P < 0.05$; C、D: *TgHly-III*蛋白诱导弓形虫逸出与虫体运动能力、钙离子的关系;与 Ctrl 组比较: * $P < 0.05$;与 *TgHly-III* 组比较: # $P < 0.05$

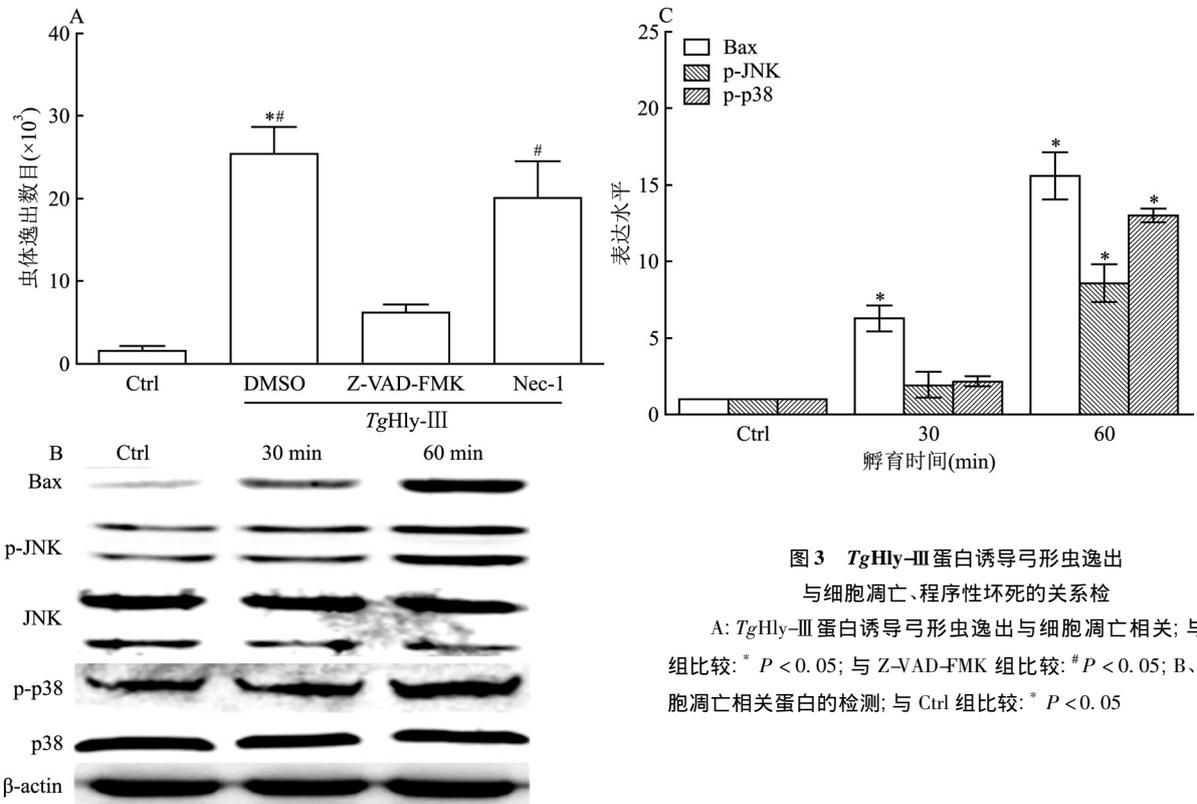


图3 *TgHly-III*蛋白诱导弓形虫逸出与细胞凋亡、程序性坏死的关系检测

A: *TgHly-III*蛋白诱导弓形虫逸出与细胞凋亡相关;与 Ctrl 组比较: * $P < 0.05$;与 Z-VAD-FMK 组比较: # $P < 0.05$; B、C: 细胞凋亡相关蛋白的检测;与 Ctrl 组比较: * $P < 0.05$

免疫因子都能激发虫体从感染细胞中逸出,与含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteiny l aspartate specific proteinase ,caspase)介导的宿主细胞钙离子释放有关^[13],并引发细胞凋亡。细胞凋亡分为内源

性凋亡和外源性凋亡两种。本研究显示,*TgHly-III*蛋白诱导弓形虫逸出依赖于宿主细胞凋亡途径,并且凋亡相关蛋白 JNK 和 p38 的表达或磷酸化水平提高,与蜡样芽孢杆菌非溶血性肠毒素诱导非洲绿

猴肾细胞(Vero 细胞) 凋亡的模式相似^[3]。需要说明的是, 本研究结果显示, *TgHly-III* 蛋白诱导弓形虫逸出依赖于宿主细胞凋亡途径的完整以及虫体的运动能力, 两者缺一不可。虽然尚未检测 *TgHly-III* 蛋白对宿主细胞膜完整性的影响, 根据已得实验结果推测, 外源性 *TgHly-III* 蛋白孵育可能使宿主细胞膜产生微孔, 进而引起细胞稳态发生变化, 促进宿主细胞发生凋亡, 最后引发虫体逸出。阻断凋亡途径后, 虽说细胞膜产生微孔, 但虫体并不逸出, 提示宿主细胞凋亡途径的相关因子激发虫体运动逸出, 这个衔接因子值得进一步研究确定。本研究结果为进一步探讨虫体内源性 *TgHly-III* 在虫体逸出过程中的作用及其与宿主细胞蛋白的相互作用奠定基础。

参考文献

- [1] Karakavuk M, Aldemir D, Mercier A, et al. Prevalence of toxoplasmosis and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains isolated in wild birds of prey and their relation with previously isolated strains from Turkey [J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0196159.
- [2] Ramarao N, Sanchis V. The pore-forming haemolysins of bacillus cereus: a review [J]. *Toxins (Basel)*, 2013, 5(6): 1119–39.
- [3] Persson E K, Agnarsson A M, Lambert H, et al. Death receptor ligation or exposure to perforin trigger rapid egress of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* [J]. *J Immunol*, 2007, 179(12): 8357–65.
- [4] Liu X, Ding S, Shi P, et al. Non-hemolytic enterotoxin of *Bacillus cereus* induces apoptosis in Vero cells [J]. *Cell Microbiol*, 2017, 19(4): 1–10.

- [5] Kafsack B F, Pena J D, Coppens I, et al. Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells [J]. *Science*, 2009, 323(5913): 530–3.
- [6] Endo T, Sethi K K, Piekarski G. *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages [J]. *Exp Parasitol*, 1982, 53(2): 179–88.
- [7] Graindorge A, Frenal K, Jacot D, et al. The conoid associated motor MyoH is indispensable for *Toxoplasma gondii* entry and exit from host cells [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(1): e1005388.
- [8] Lourido S, Shuman J, Zhang C, et al. Calcium-dependent protein kinase 1 is an essential regulator of exocytosis in *Toxoplasma* [J]. *Nature*, 2010, 465(7296): 359–62.
- [9] McCoy J M, Whitehead L, van Dooren G G, et al. TgCDPK3 regulates calcium-dependent egress of *Toxoplasma gondii* from host cells [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(12): e1003066.
- [10] Lovett J L, Marchesini N, Moreno S N, et al. *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca²⁺ release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)/ryanodine-sensitive stores [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(29): 25870–6.
- [11] Nagamune K, Hicks L M, Fux B, et al. Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii* [J]. *Nature*, 2008, 451(7175): 207–10.
- [12] Ji Y S, Sun X M, Liu XY, et al. *Toxoplasma gondii*: effects of exogenous nitric oxide on egress of tachyzoites from infected macrophages [J]. *Exp Parasitol*, 2013, 133(1): 70–4.
- [13] Yao Y, Liu M, Ren C, et al. Exogenous tumor necrosis factor- α could induce egress of *Toxoplasma gondii* from human foreskin fibroblast cells [J]. *Parasite*, 2017, 24: 45.

TgHly-III induces egress of *Toxoplasma gondii* from host cells

Zhang Qian^{1,2}, Jin Yu¹, Yao Yong¹, et al

¹Dept of Parasitology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Clinical Laboratory, The 5th People Hospital of Hefei, Hefei 230000)

Abstract Objective To investigate the molecular effect of *TgHly-III* on the egress of *Toxoplasma gondii* from infected host cells. **Methods** The structure of *TgHly-III* was predicted by online biological software, followed by prokaryotic expression and purification of *TgHly-III*. HFFs infected with *TgMic-YFP* tachyzoites were co-cultured with *TgHly-III* and at different time points egressed parasites were detected by flow cytometry. BAPTA and Cyto-D were used to block intra-parasitic calcium and parasite motility respectively; Z-VAD-FMK and Nec-1 were used to block host cell apoptosis or necroptosis pathway. Also, the expression levels of apoptosis-related proteins were evaluated using Western blot. **Results** *TgHly-III* was predicted to be a membrane pore-forming protein. Exogenous *TgHly-III* could efficiently trigger egress of *T. gondii* from infected HFFs in a time-dependent manner, which was dependent on the availability of intra-parasitic calcium and parasitic motility. After blocking host apoptosis pathway, the rate of *TgHly-III*-induced parasite egress decreased significantly. In addition, the expression level of pro-apoptotic protein Bax increased apparently in *TgHly-III* treatment group. And the same patterns were observed in the phosphorylation of JNK and p38. **Conclusion** Exogenous *TgHly-III* could induce egress of *T. gondii* from infected HFFs through activating host cell apoptosis pathway.

Key words *Toxoplasma gondii*; *TgHly-III*; egress; apoptosis