DOI:10.16016/j.1000-5404.1987.01.001

绿脓杆菌外毒素A靶细胞的实验研究

胡福泉 周善章（微生物学教研室）

提 要 本文自PA-103株纯化了绿脓杆菌外毒素A，用I^{125}标记，然后在BALB/C小鼠体内进行放射自显影示踪、病理组织学检查、超微结构观察及抗血清保护实验。结果表明，肝脏是绿脓杆菌外毒素A的靶器官，肝细胞及枯否氏细胞是靶细胞，它们的严重变性坏死可能与动物急性死亡有关。

关键词 绿脓杆菌外毒素A；靶细胞；肝细胞；枯否氏细胞

绿脓杆菌是目前临床感染中很棘手的病原菌，它可产生粘液质、胞外酶、内毒素、外毒素A（Pseudomoans aeruginosa Exotoxin A，缩写PEA）等十余种与致病有关的物质[1][2]。其中，PEA是毒性最强者，称为致死性毒素[3][4]。它具有NADase活性，可分解NAD（尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸）为ADPR（腺苷二磷酸核糖）及尼克酰胺两部份，并将ADPR转移给延长因子EF_{-2}，使后者核糖基化而失去生物活性，进而导致蛋白质合成受阻[5][6]。但是在体内，PEA于器官水平损害的仅仅是肝脏还是多种器官？在细胞水平损害的仅仅是肝细胞还是多种细胞？目前尚不清楚[7-9]。本研究中，纯化了PEA，用I^{125}标记，采用放射自显影示踪，结合病理组织学检查、超微结构观察及抗血清保护实验以确定PEA的靶器官及靶细胞。

材料与方法

一、PEA的纯化鉴定与标记

培养基选用胰酶酪蛋白大豆肉汤透析液，并加入1%甘油及0.05M的谷氨酸一钠，使营养更加丰富[10]。制备好的培养基pH7.0。细菌采用PA-103株（由美国Louisville大学Pinghui. V. Liu教授赠与）。毒素纯化采用DEAE纤维素（DE_{52}）分段层析、70%饱和硫酸铵沉淀、DEAE纤维素梯度层析、羟基磷灰石梯度层析的四步法，具体参照文献[11-13]。用改良Lowry氏法测定样品蛋白质含量，聚丙酰胺凝胶电泳测定样品纯度，用琼脂双向免疫扩散测定样品的抗原特异性（抗血清分别由Pinghui. V. Liu及美国国防卫生大学的Matthew Pollack教授赠与），用荧光探针非啶溴红微量法监测样品中有无核酸，然后测定样品致死作用的耐热性及半数致死量（LD_{50}）。PEA及BSA（牛血清白蛋白，供对照用）的I^{125}标记采用氯胺T法。标记后再做小鼠致死性实验，测定标记毒素的生物学活性。

二、动物分组及处理

实验用小鼠为BALB/C纯系小鼠，体重18±2g，雌雄不限。所有动物在试验前禁食24小时，饮水中加0.002%的KI，饱和封闭甲状腺，避免试验中碘标毒素浓缩于甲状腺中。动物随机分为三组：

^{125}I-PEA致毒组（下称致毒组）：30只小鼠，每只自尾静脉注射8 LD_{50}的^{125}I-PEA。

抗血清保护组（下称保护组）：20只小鼠，在注射标记毒标前2小时，每只小鼠腹腔注射一个保护剂量的PEA抗血清（Dr. P. V. Liu赠与）。

^{125}I-BSA对照组（下称对照组）：20只小鼠，用^{125}I-BSA取代^{125}I-PEA注射动物，其余一切处理同致毒组。

三、放射自显影及病理组织学检查

致毒组小鼠于濒死时活杀，本组最后一只杀毕，相继活杀其余两组。取心、肺、肝、肾按病理常规制成5μ厚的切片。用浸片法涂上核-4型乳胶，收置于暗盒，放4℃冰箱曝光72小时，D-19b显影液显影4分钟，酸性坚膜定影液定影15分钟，然后再按常规HE染色。此过程中，平行制做各正常组织片（来自未接受过毒素及I^{125}的小鼠）20张，作为正常组织参照片及放射自显影的本底片。

在光镜下对各切片的组织病理学改变进行观察，记录结果。自显影银盐颗粒计数在40倍物镜、16倍目镜的光镜下进行。目镜中放置目微格。每张切片计数五个视野。视野按系统抽样原则确定，即利用载物台游标，首先确定组织正中心一视野，然后向上、下、左、右分别推进1.5mm，得其余四视野。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

每个视野计数目微格正中九个方格。求出每平方毫米内的银盐颗粒数。自显影颗粒的分布服从Poisson分布，统计资数按Poisson分布处理。

四、超微结构观察

另用8只小鼠，每只注射8LD_{50}的未标记I^{125}的毒素。濒死时活杀动物，取心、肝组织制成超薄切片，经负染后在电镜下观察超微结构改变。

结　果

一、PEA的纯化鉴定与标记

本文中提纯的PEA在聚丙烯酰胺凝胶电泳上只有一条带，不含核酸及内毒素。可与Liu及Pollack提供的两份抗血清发生反应，在双向免疫扩散中仅有一条沉淀线。用寇氏法测定，对18±2g体重的BALB/C小鼠的LD_{50}为202ng。毒素的致死作用不耐热。经I^{125}标记后，8LD_{50}的攻击量同样可使小鼠在48小时内死亡，表明毒素标记后致死活性无明显损失。

二、动物濒死率及组织病理改变

致毒组小鼠在注射毒素3～4小时后开始发病，表现为耸毛，精神萎靡，活动力差，不进食。症状逐渐加重，最后极度衰竭，呼吸微弱，在17.5～48小时期间，全部分别进入濒死状态。保护组及对照组小鼠外观无一发病。在光镜下，致毒组小鼠心、肺组织结构清晰完整。少数肾小管上皮细胞有轻度浊肿，未见明显有意义的病理变化。但肝脏则可见广泛而严重的病理改变，表现为肝小叶结构紊乱，肝索破坏，肝细胞显著变性坏死。变性表现为细胞显著浊肿，胞浆疏松、空泡变性及气球样变。细胞坏死现象严重，可为灶性坏死或大块坏死，有的呈带状坏死。坏死表现为嗜酸性小体形成，核固缩或核碎裂，细胞破裂溶解，内容物释放。坏死灶中可见白细胞浸润。变性与坏死多同时参杂存在，未见细胞增生现象。曾试图在光镜下观察枯否氏细胞及内皮细胞有无改变，但因肝小叶结构关系紊乱后难以辨认。保护组中有5只小鼠的肝细胞可见浊肿、胞浆疏松或空泡变性，但未见坏死现象。保护组心、肺、肾以及对照组各种组织中均未见病理改变。

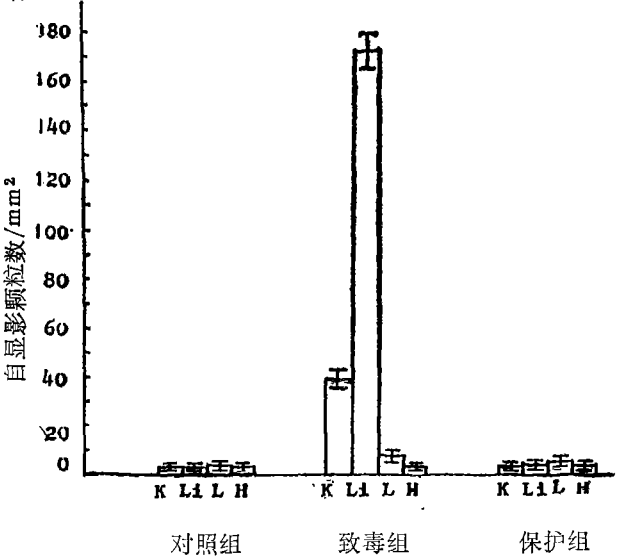
三、自显影颗粒计数

根据统计结果，致毒组小鼠肝组织中银盐颗粒数居第一位，肾组织居第二位，两者均非常显著地高于本组心、肺组织及保护组与对照组的相应组织和本底(P值均<0.001)，而肝脏又非常显著地高于肾（P<0.001）。致毒组心、肺组织与保护组、对照组相应组织的颗粒数无显著差异（P值均>0.05），同处于本底水平。详见下表与条图。

各组织中自显影颗粒计数（$\bar{X}\pm SD/mm^2$）

	致毒组 (n=30)	对照组 (n=20)	保护组 (n=20)
肝（Li）	172.7±13.1	3.1±1.7	3.8±1.9
肾（K）	38.3±6.2	3.3±1.8	3.8±1.9
心（H）	3.3±1.8	3.2±1.8	3.6±1.9
肺（L）	7.2±2.7	3.7±1.9	4.5±2.1

注：本底=3.61±1.9；肝肾互比，P<0.001
肝肾与其它各组织比，P值均<0.001
肝肾外其它各组织及本底互比，P值均>0.05



各组织中自显影颗粒数复方条图

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

四、超微结构改变

电镜下，可见致毒组肝细胞内质网显著扩张，偶见指纹样结构。线粒体明显肿胀变性，嵴模糊或消失，基质电子密度降低；也有部份线粒体呈固缩变性，基质电子密度增加。胞浆内脂质小体及髓鞘样结构比较多见。核周间隙增宽，可见核膜内陷或核膜溶解破裂，偶可见到核内髓鞘样结构。灶性胞浆内变性（Focal Cytoplasmic degeneration，即FCD）十分引人注目，这是一种细胞坏死的前驱变化。枯否氏细胞的改变亦十分明显，超微改变类似肝细胞中之所见，此外尚可见到吞噬溶酶体增加，有的整个细胞呈溶解状态。肝内皮细胞、贮脂细胞及心肌未见有意义的病理改变。

讨　论

一般认为，外毒素的作用具有一定特异性，人们通常将外毒素特异作用的细胞称为靶细胞，但目前尚未见到对靶细胞的详细定义及一致公认的判定标准。根据柯霍氏原则及目前已知几种外毒素的作用特点，作为靶细胞似应具备以下条件：（1）毒素到达并作用于该细胞，此细胞表面具有该毒素的特异受体；（2）毒素可在该细胞引起与其作用机制相符的病变；（3）这种病变与宏观病变有联系；（4）特异阻断措施可保护靶细胞免受毒素攻击。

要确定靶细胞须直接证实毒素到达了该细胞。Pavlovskis曾研究过标记毒素在器官水平的分布[7]，但器官水平的研究不能显示毒素是否进入细胞或进入了哪些细胞。在我们的实验中，自显影示踪结果表明，致毒组肝脏中的颗粒数居第一位，肾脏居第二位，且肝又大大高于肾，自显影颗粒大部份位于胞浆中。而心、肺组织，对照组与保护组各种组织都与本底无显著差异。毒素进入细胞后，应在该细胞引起与其作用机制相符的病变。组织病理学观察表明，病理改变仅见于肝脏，病变以广泛急性变性坏死为特征。超微结构观察进一步表明，肝内受损细胞为肝细胞及枯否氏细胞，而内皮细胞及贮脂细胞未见有意义病理改变。对照组各组织中均未见病变，说明致毒组肝内损害并非I^{125}的放射性所致。细胞病理改变应与宏观病象有联系。致毒组小鼠接受绝对致死量的毒素后3～4小时开始发病，全部分别于17.5～48小时间进入濒死状态，模型重复性极好。经抗血清保护的小鼠，有5只的肝脏在光镜下有细胞浊肿、胞浆疏松及轻度空泡变性，然未见坏死现象。分析抗血清保护后少数动物仍出现轻度病变的原因可能有三：其一可能是抗血清用量不够，保护不够完全；其次，保护剂量虽够，但毒素分子进入血流时，并不能被抗体完全中和，而有少数毒素分子进入了靶细胞；三是毒素分子与抗体的结合一度是处于结合与解离的平衡过程中，自结合物中解离出来的毒素仍有生物活性，以致进入靶细胞引起病变。但在抗血清保护下，仅少数动物中发现了轻度病变，宏观未见发病，保护效果是肯定的。这说明肝脏的病变是PEA特异的。但同时也提示，医疗实践中通常使用的抗血清治疗，虽可见在个体宏观水平取得良好保护效果，但并不意味着没有镜下轻微病变。

值得注意的是，致毒组肾组织中虽可见到一定数量的自显影颗粒，然而却未见到有意义的病理改变。导致这种分离现象的原因可能是多方面的。首先，PEA进入细胞原本有两条途径，一种是“受体介导的进入”途径，另一种是不依赖于受体的“液相细胞摄取”（Fluid-phase endocytosis），即胞饮作用，经后一途径进入的毒素不能显示毒性[14][15]，但在自显影中同样可以显影。其次，标记毒素可能在进入细胞之前已降解为碎片及游离I^{125}。其三，标记毒素进入肝脏，引起病变，细胞变性坏死，再由其它吞噬细胞吞噬降解，释放出游离I^{125}，后者经肾脏排泄时被肾小管上皮细胞摄入导致显

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

影。这是一个较为费时的过程，后期肾组织中的自显影颗粒可能大多来自这一途径。最后，还应考虑进入肾脏的毒素量可能没有达到引起细胞病变的阈值量或细胞内微环境不适于毒性表现。由于种种原因，在肾脏虽有一定数量的自显影颗粒出现，但未见有意义的病理改变。因此，从细胞病理学这一层次来讲，很难认为肾组织细胞是PEA的靶细胞。来自自显影及光镜、电镜的结果，也未能显示心肌作为靶细胞的可能性。

通过本研究，我们在肝组织细胞中直接显示了毒素的存在，同时观察到广泛而严重的病变，且自显影颗粒的分布及病变可为抗血清所阻断。超微结构观察进一步表明肝内受损细胞为肝细胞及枯否氏细胞。故有理由认为，肝脏是PEA的靶器官；肝细胞及枯否氏细胞是靶细胞，它们的严重损害可能与动物急性死亡有关。

参 考 文 献

1. Young LS. J Infect Dis 1980; 142:626
2. Pollaek M. Rev Infect Dis 1984; 6(Suppl 3):S617
3. Liu PV. Pseudomonas aeruginosa (Ed by Doggett RG)1979:63
4. Woods DE, Iglewski BH. Rev Infect Dis 1983; 5(Suppl 5):S715
5. Iglewski BH, Kabat D. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72:2284
6. Iglewski BH, et al. Mechanism of Action of Pseudomonas Aeruginosa Exotoxin A: Adenosine Diphosphate-Ribosylation of Mammalian Elongation Factor 2 in Vitro and in Viro. Infect Immun 1977; 15:138
7. Pavlovskis OR, Shackelford AH. Infect Immun 1974; 9:540
8. Liu PV. J Infect Dis 1974; 130(Suppl):S 94
9. Pavlovskis OR, et al, J Infect Dis 1976; 133:253.
10. Liu PV. J Infect Dis 1973; 128:506
11. Liu PV, et al. J Infect Dis 1973; 128:514
12. Leppla SH. Large-Scale Purification and Characterization of the Exotoxin of Pseudomonas Aeruginosa. Infect Immun 1976; 14:1077
13. Iglewski BH, Sadoff JC. Methods in Enzynology. 1979; 60:780
14. FitzGerald DJ. Receptor-Mediated Internalization of Pseudomonas Toxin by Mouse Fibroblasts, Cell 1980; 21:867
15. FitzGerald DJ.et al. Rev Infect Dis 1983; 5(Suppl 5):S985

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

• Abstracts •

Experimental Study on Target Cells of Pseudomonas aeroginosa Exotoxin A

Hu Fuquan, Zhou Shangzhang (Department of Microbiology, Third Military Medical College)

Pseudomonas aeroginosa exotoxin A(PEA) was purified from the strain PA-103 and labelled with I^{125}. Then autoradiographic tracing, histopathological observations with light and electron microscopes, and antiserum protestion test were carried out on inbred mice BALB/C. The results indicate that the liver is the target organ of PEA, and both the hepatocytes and kupffer cells the target cells, on which the severe damage may be responsible for the acute death of the toxicated animals.

Key words: Pseudomonas aeroginosa exotoxin A; Target cell; Hepatocyte; Kupffer cell (p.1)

Study of the Changes of Langerhans in Cultured Human Epidermal Cells

Zhang Shijun, et al(Burn Center, Third Miliitary Medical College)

It has been shown that epidermal Langerhans cells (LCs) were antigen presenting cells in cutaneous cell-mediated immuneresponse, and they were implicated in skin allograft rejection[1][2]. If LCs can be depleted from skin grafts, the survival period of the allografts may be prolonged[3~6]. Therefore, we observed the changes of LCs in cultured human epidermal cells (ECs) by ATPase staining, HLA-Dr monoclonal antibody indirect immunofluoresence and enzyme labelling avidin-biotin complex (ABC) staining. And the capacity of ECs to stimulate allogeneic lymphocyte proligeration before and after cultures was tested by mixed epidermal cell-lymphocyte culture response (MEcLR). We found that LCs in original skin explants were significantly decreased and deformed three days after culture. LCs were reduced more than 90 percent after 7 days of culture. LCs in original skin explants were approximately eliminated 14 days or more of culture. LCs were never seen within epidermal outgrowth in culture. The Ecs gained from the original skin explants which were cultured after 7 days and from epidermal outgrowth lost their ability to stimulate allogeneic lymphocyte transformation in MEcLR. These results indicate that LCs bearing HLA-Dr

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

1|2
3|4
5|6
7|8

图1　神经细胞滑面内质网增多、扩张（白↑），尼氏小体变小，数目减少（黑↑），高尔基体体积增大，囊腔扩张，游离核糖体显著增多，溶酶体增加。接种后2天，×15,000

图2　神经细胞胞浆内含有大量的多泡体，其中部分复制小泡含有电子密度高的核心（↑）。接种后3天，×40,000

图3　神经细胞，一部分多泡体内以复制小泡和类复制小泡为主（白↑），而另一部分则以病毒粒子为主，并且泡壁有溶解（黑↑），胞浆基质中的游离多聚核糖体崩解。接种后4天，×54,000

图4　神经细胞内多泡体崩解，复制小泡与类复制小泡亦然，病毒粒子进入胞浆基质（内释放↑）。游离多聚核糖体破坏、消失，线粒体也遭破坏。接种后5天，×56000

图5　神经细胞高尔基体扁平囊内病毒粒子成串珠状排列，其囊壁部分溶解（黑↑），扁平囊内还含有复制小泡（白↑）。接种后5天，×36,000

图6　神经细胞、多泡体之间散在有微泡微管聚合体（MMAB），后者周边小泡和中间微泡有传行关系（黑↑）。聚合体和多泡体可以融合，融合处的复制小泡出现密度增高的核心（白↑）。接种后5天，×36,000

图7　神经细胞胞浆内出现大量的多泡体（MVB）和微泡微管聚合体（MMAB）。其一可见明显的微管状突起（白↑）。核周间隙不规则扩张，内含病毒粒子（黑短↑）和核膜局部溶解（黑长↑）。接种后5天，×16,000

图8　神经细胞胞浆内多泡体溶解（黑短↑），细胞膜局灶溶解，病毒粒子从该处逸出（黑长↑）。神经纤维网内也可见病毒粒子（白↑）。接种后5天，×24,000

绿脓杆菌外毒素A靶细胞的实验研究　（正文见第1页）

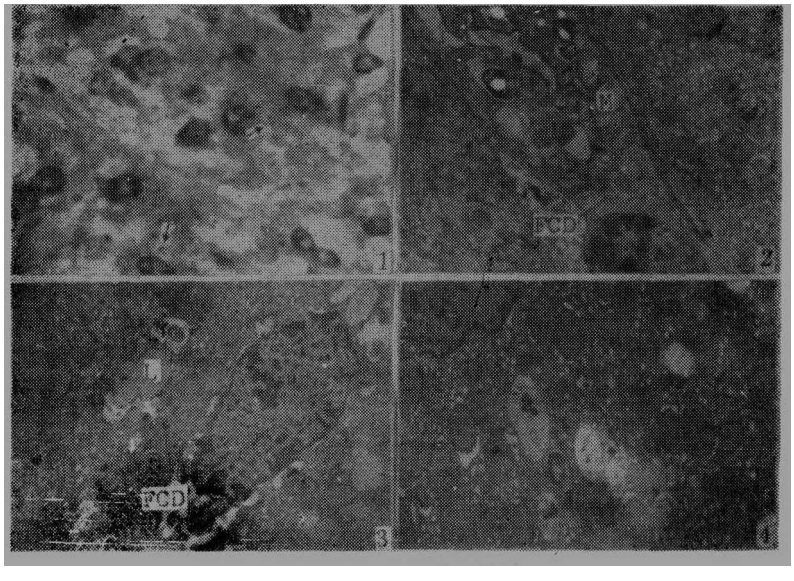


图1　肝索结构破坏、浊肿及空泡变性显著，胞浆内有自显影银盐颗粒出现（↑），HE染色，光镜1,000倍。

图2　靶肝细胞内质网显著扩张，可见多个髓鞘样结构（M）及FCD灶。电镜6,000倍。

图3　肝细胞内质网显著扩张，核周间隙扩大，可见脂质小体（L），髓鞘样结构（M）及灶性胞浆内变性（FCD）。电镜3,000倍。

图4　肝细胞内质网显著扩张，线粒体肿胀变性，脊模糊，可见多个FCD灶。电镜5,000倍。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n