

嗜水气单胞菌 HEC 毒素对鲤内皮细胞的毒性

丁磊, 吴康, 蔡春芳, 倪建国, 吴萍

(苏州大学 生命科学院, 江苏 苏州 215006)

摘要: 体外培养鲤血管内皮细胞(EC), 取 10 000 ml 嗜水气单胞菌悬液, 盐析和层析后获得 HEC 毒素(外毒素), 测定分析不同质量浓度 HEC 毒素(1 024.00, 256.00, 64.00, 16.00, 4.00, 1.00, 0.25 $\mu\text{g/ml}$)对鲤 EC 的半感染浓度(TCID₅₀)及观察在工作浓度(16TCID₅₀)下内皮细胞的损伤和亚显微变化。结果表明: 1) HEC 毒素对鲤科鱼类的红细胞有很强的破坏性(溶血价 $> 8 \times 10^3$ HU/mg); 2) 对鲤 EC 的 TCID₅₀ 为 5.85 $\mu\text{g/ml}$; 3) 在 16 TCID₅₀ HEC 毒素诱导下, 6 h 的 EC 单层出现空斑, 12 h 的 EC 有部分脱落, 24 h 的 EC 全部脱落; 超薄切片中 12 h 的 EC 微绒毛有部分丢失, 细胞器和核质严重病变, 细胞膜完整性被破坏, 24 h 的 EC 核肿胀, 微绒毛、细胞器和核质均丢失。

关键词: 嗜水气单胞菌; HEC 毒素; 鲤; 内皮细胞; 毒性

中图分类号: S943.116.42

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)02-0117-03

内皮细胞(EC)的生理和病理研究是当代生物学热点。哺乳类 EC 与心血管疾病、机体免疫功能、肿瘤的发生、出血的关系已有大量的报道^[1], 但有关鱼类 EC 的研究较少。近年来鱼类细菌性出血症呈蔓延趋势, EC 作为衬贴于心血管内腔面的单层扁平细胞, 其状态与血管的完整性有直接关系, 而血管的完整性又与出血有直接关系^[1]。

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah) 是鱼类细菌性出血症的主要病原。涂小林等^[2]通过体外溶血实验发现, HEC 毒素对红细胞有很大的破坏作用, 是导致鱼类出血症的原因之一。但 HEC 毒素对血管的损伤出血鲜有报道。由于难以区分病变属于 EC 还是其他细胞, 故体内 EC 的损伤较难反映真实的 EC 动态变化。而体外 EC 培养则可以提供无其他细胞干扰的大量 EC。为此, 作者以体外鲤 EC 培养为模型, 以能引起鱼类典型出血症状的 HEC 毒素为诱导剂, 体外模拟 EC 的损伤过程, 在细胞的层面上探索其出血机制, 为研究 HEC 毒素对血管的损伤提供直接依据。

收稿日期: 2001-06-18.

基金项目: 江苏省 1995 年农业重大攻关课题(96369-2).

作者简介: 丁磊(1965-), 男, 讲师, 从事动物病理生理学研究.

通讯作者: 吴康.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 嗜水气单胞菌株 Ah-J-1 由南京农业大学陆承平教授惠赠。

1.1.2 试验材料 鲤(500 g/尾)、鲫(20 g/尾)、鳊(250 g/尾)、鲢(250 g/尾)、鳖(250 g/只)购于苏州市游关农贸市场。小白鼠(20 g/只)和家兔(500 g/只)购于苏州医学院实验动物中心。

1.1.3 试剂和器材 人 O 型红细胞、绵羊红细胞购于苏州第七人民医院。胎牛血清(FBS)、胶原酶 I(SIGMA)、胰酶(日产分装 1:250)、丙烯酰胺(SIGMA)、甲叉丙烯酰胺(SIGMA)、细胞培养瓶(50 ml, NUNC)、细胞培养板(8×12 孔, NUNC)、RPMI-1640(GIBCO)、DEAE-Cellulose 32(FULKA)和 Sephadex G-100(PHARMACIA)均购于中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 HEC 毒素的提纯和毒性分析 配制 Ah-J-1 菌悬液, 用紫外光吸收法^[3]测定其蛋白含量。之后取该菌悬液 10 000 ml, 按涂小林等^[2]方法进行提纯和毒性分析。

1.2.2 鲤血管内皮细胞的体外培养 细胞培养与传代按吴康等^[2]方法进行。

1.2.3 HEC 毒素的 TCID₅₀测定 将 1.2.1 所得纯 HEC 毒素以 4 倍稀释为系列浓度加到长满单层 EC 的细胞培养板上,培养 24 h 后判读结果并按 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。

1.2.4 HEC 毒素对 EC 的损伤及亚显微结构 以 16 TCID₅₀ 为工作浓度接种于单层 EC,继续培养。每 6 h 观察 1 次,并于染毒后 12 和 24 h 取样,用预冷的 3% 戊二醛 pH 7.2 (0.01 mol/L PBS 配制)固定作超薄切片,在透射电镜下观察。

2 结果与分析

2.1 HEC 毒素的提纯和毒性 (图版见附页 4)

10 000 ml 菌悬液盐析后得 350 mg 粗提 HEC 毒素,经层析得 58 mg 纯 HEC 毒素。SDS-PAGE 电泳发现纯 HEC 毒素仅有 1 条蛋白带(图版 I-1),用比移率计算其分子量为 52.5 kD,与涂小林等^[2]的结果完全一致。HEC 毒素对小白鼠和鲫 24 h 半致死剂量 LD₅₀ 分别为 3.42 μg 和 3.89 μg;对 8 种动物红细胞的溶血价见表 1。

表 1 HEC 毒素对 8 种动物红细胞的溶血价

Table 1 Hemolytic titer of HEC toxin to animal erythrocytes

红细胞来源 Erythrocytes	溶血价 Hemolytic titer/($\times 10^3$ HU·mg ⁻¹)
鲫 Crucian carp	8.76
鳊 Bream	8.34
鲢 Silver carp	8.38
鲤 Common carp	8.76
鳖 Soft-shelled turtle	2.83
人 Human	3.65
绵羊 Sheep	0.12
小白鼠 Mouse	3.43

由表 1 可知,HEC 毒素对鲤科鱼类的红细胞有很强的破坏性(溶血价 $>8 \times 10^3$ HU/mg)。

2.2 HEC 毒素对鲤 EC 的 TCID₅₀

系列质量浓度的 HEC 毒素染毒 EC 24 h,结果见表 2。经计算 TCID₅₀ 为 5.85 μg/ml。

2.3 内皮细胞的损伤及亚显微结构的变化

16 TCID₅₀ HEC 毒素攻毒 6 h 时 EC 收缩,EC 单层出现空斑(图版 I-2),12 h 时空斑加大,部分 EC 脱落(图版 I-3),24 h 时 EC 全部脱落,而对照 EC 正常,呈明显鹅卵石状(图版 I-4);电镜观察,12 h 时 EC 微绒毛有部分丢失,细胞质出现空洞,内质网肿胀,线粒体受损,部分核质丢失,细胞膜完整

性被破坏(图版 I-5),24 h 时细胞核肿胀,细胞器和核质完全丢失(图版 I-6),对照 EC 的绒毛正常,细胞结构清晰和完整,细胞器丰富(图版 I-7)。

表 2 系列质量浓度的 HEC 毒素对鲤 EC 的损伤孔数

Table 2 Harmful pore nos. of HEC toxin at different concentration on endothelial cells

HEC 质量浓度/(μg·ml ⁻¹) Concentration of HEC Toxin	试验孔数 Testing pore nos.	正常孔数 Normal pore nos.	病变孔数 CPE pore nos.
1024.00	12	0	12
256.00	12	0	12
64.00	12	0	12
16.00	12	1	11
4.00	12	9	3
1.00	12	10	2
0.25	12	12	0

3 讨论

16 TCID₅₀ HEC 毒素攻毒后 12 h EC 有部分脱落,24 h EC 已全部脱落,细胞结构遭严重破坏。正常 EC 形成血液和组织之间的界面,并调节体内血液进出的流量及血细胞和血管壁之间的相互作用。因此在体内,单层 EC 脱落被认为是 EC 损伤的最严重表现,会不可避免地增加血管对大分子的通透性。实验证明,当 EC 物理性脱落时,血浆中的白蛋白或其他蛋白漏到血管壁深层的量明显增加^[1]。

EC 含特有的 Weibel-Palade 小体,该小体是血管性血友病因子(vWF)储存与加工的场所,血浆 vWF 主要来自 EC^[5]。vWF 是血小板黏附于胶原纤维上的桥梁,此外还能与抗血友病因子(因子Ⅲ)形成复合物,防止因子Ⅲ的降解。如果血浆 vWF 缺乏,可造成血小板黏附功能受损和出血性 von Willebrand' 病^[6]。因此 EC 的损伤可能会造成 vWF 减少,引起血小板黏附于内皮下层的作用下降,使鱼类产生出血倾向。

参考文献:

- [1] 盛民立. 血管内皮细胞与疾病[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1993. 30-31.
- [2] 涂小林, 陆承平. 嗜水气单胞菌毒素的提纯及其特性分析[J]. 微生物学报, 1992, 32(4): 432-438.
- [3] 孙志贤. 现代生物化学理论与研究技术[M]. 北京: 军事医学科学院出版社, 1995. 394-396.
- [4] 吴康, 薛明强, 吴海琴, 等. 鲤血管内皮细胞的分离培养及初步鉴定[J]. 水生生物学报, 2001, 25(2): 174-178.

[5] 李家增. 血液实验学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997.

[6] 姚 泰. 生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 60-63.

286-287.

Toxic effects of HEC toxin from *Aeromonas hydrophila* on endothelial cells of *Cyprinus carpio*

DING Lei, WU Kang, CAI Chun-fang, NI Jian-guo, WU Ping

(College of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 215006, China)

Abstract: HEC toxin was separated from *Aeromonas hydrophila* Ah-J-1 strain by ammonium sulfate precipitation DEAE-cellulose chromatography and sephadex G-100 gel filtration, and its 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) was detected by analyzing different concentrations of HEC toxin. The HEC toxin concentrations were prepared at 1 024.00, 256.00, 64.00, 16.00, 4.00, 1.00 and 0.25 µg/ml. Using reverse microscope and electron microscope, the changes of the endothelial cells (EC) with HEC toxin concentrations at 16 TCID₅₀ were observed. The results show that: 1) the erythrocytes of cyprinidae is destroyed strongly by HEC toxin, and its hemolytic titer is more than 8×10^3 HU/mg; 2) the TCID₅₀ for common carp EC is 5.85 µg/ml; 3) under the stress of HEC (16 TCID₅₀), the plague appears in EC monolayer in 6 h, and EC begin to suspend in 12 h and all EC suspend in 24 h. Under the electron microscope, the EC has some changes that ① some microvilli lost, and abnormal organelles, euchromatins and swollen nuclears are obvious in 12 h; ② swollen nucleus is found, and all the microvilli, organelles and euchromatins lost in 24 h.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; HEC toxin; *Cyprinus carpio*; endothelial cells; toxic effects

Corresponding author: WU Kang

图版 I 说明 Caption for Plate I

(图版见附页 4 For Plate I see attached P4)

① EC 单层出现空斑 The plague in EC monolayer.

④ EC 核 Nucleus of EC.

② EC 收缩变圆 EC become small and round.

⑤ 微绒毛 Microvilli.

③ EC 脱落呈悬浮态 The desquamate EC become floating.

⑥ 内质网 Endoplasmic reticulum.

1. HEC 毒素的 SDS-PAGE 电泳分析, A~C—粗提的 HEC 毒素, D~F—纯化的 HEC 毒素, G—标准蛋白。SDS-PAGE analysis of crude and purified HEC toxin, A~C—Crude HEC toxin, D~F—Purified HEC toxin, G—Marker.

2. HEC 毒素攻毒后 6 h 的 EC 病变, $\times 212$ 。CPE of HEC toxin on EC in 6 h.

3. HEC 毒素攻毒后 12 h 的 EC 病变, $\times 170$ 。CPE of HEC toxin on EC in 12 h.

4. 正常 EC 显微结构, $\times 170$ 。The normal EC.

5. HEC 毒素攻毒后 12 h 的 EC 亚显微结构, 示内质网肿胀, $\times 17\ 000$ 。Electronmicrography of CPE of HEC toxin on EC in 12 h, showing swollen endoplasmic reticulum.

6. 攻毒后 24 h EC 的亚显微结构, 示核肿胀, 微绒毛、常染色质和细胞器丢失, $\times 5\ 100$ 。Electronmicrography of CPE of HEC toxin on EC in 24 h, showing swollen nucleus, microvilli and euchromatin and organelles missing.

7. 正常 EC 的亚显微结构, $\times 5\ 100$ 。Electronmicrography of the normal EC.