



研究报告

产气荚膜梭菌 ϵ 毒素导致多器官组织损伤耿志军^{1,2} 辛文文² 黄静² 康琳² 袁媛² 王景林^{*1,2}

1 安徽医科大学研究生院 安徽 合肥 230032

2 军事医学研究院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071

摘要:【背景】产气荚膜梭菌 ϵ 毒素(ϵ toxin, ETX)是由 B 型和 D 型产气荚膜梭菌产生的一种肠毒素,具有迅速的致命性和经济上的破坏性。【目的】研究 ETX 对小鼠多个脏器的损伤情况及其在不同小肠肠段的结合情况。【方法】构建纯化偶联红色荧光蛋白的 mScarlet-ETX,使用小动物活体成像观察其小鼠体内的累积情况;使用病理学技术观察 ϵ 毒素对小鼠各个脏器和不同肠段的结合情况,以及对脏器的损伤情况。【结果】产气荚膜梭菌感染后,产生的 ETX 能累积于脑、肾、肺、肝、脾和心脏组织中,并能导致这些脏器的损伤。ETX 在小鼠的小肠中主要累积于结肠中。【结论】产气荚膜梭菌 ϵ 毒素导致多器官组织损伤,并主要在结肠上被吸收,为治疗和预防携带 ϵ 毒素的产气荚膜梭菌感染提供了理论依据。

关键词: 产气荚膜梭菌, ϵ 毒素, 器官损伤, 出血, 水肿Multiple organ damage induced by *Clostridium perfringens* ϵ toxinGENG Zhi-Jun^{1,2} XIN Wen-Wen² HUANG Jing² KANG Lin² YUAN Yuan²
WANG Jing-Lin^{*1,2}

1 Graduate School of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China

2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, china

Abstract: [Background] *Clostridium perfringens* ϵ toxin (ETX) is an enterotoxin produced by *C. perfringens* type B and D, which is rapidly fatal and economically destructive. [Objective] Our study aimed to investigate the damage of ETX on multiple organs in mice and the difference of binding capability in different intestinal segments. [Methods] The mScarlet-ETX coupled with red fluorescence was constructed and visualized with *in vivo* imaging system to observe its accumulation *in vivo*. The combination of ϵ toxin on various organs and different intestinal segments of mice and the damage to organs were analyzed by pathological sectioning. [Results] It was found that after infection with *C. perfringens*, the produced ETX could accumulate in the brain, kidney, lung, liver, spleen, heart tissues and caused damage to these organs. ETX in the small intestine of mice was mainly accumulated in the colon. [Conclusion] These results indicated that *C. perfringens* ϵ toxin could cause damage to multiple organs and mainly absorbed in the colon, which provided a theoretical basis for the treatment and prevention of *C.*

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2017YFC1200900)

*Corresponding author: Tel: 86-10-66948643; E-mail: wjlwjl0801@sina.com

Received: 21-10-2019; Accepted: 12-12-2019; Published online: 23-12-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1200900)

*通信作者: Tel: 010-66948643; E-mail: wjlwjl0801@sina.com

收稿日期: 2019-10-21; 接受日期: 2019-12-12; 网络首发日期: 2019-12-23

perfringens containing the epsilon toxin gene infection.

Keywords: *C. perfringens*, ϵ toxin, Organ damage, Bleeding, Edema

产气荚膜梭菌是一种广泛存在于土壤、沉积物、人和动物肠道中的革兰氏阳性菌,是产孢子的厌氧棒状菌,携带有可编码 17 余种外毒素的基因^[1],依据所携带的一种或者多种主要毒素基因(α 、 β 、 ϵ 或者 ι),其被分为 A-E 五种毒素型^[2]。产气荚膜梭菌 ϵ 毒素是一种仅由 B 和 D 型产气荚膜梭菌编码产生的 33 kD 成孔毒素^[3-4]。ETX (ϵ toxin)是一种毒力仅次于肉毒毒素和破伤风神经毒素的有效细菌毒素,在反刍家畜中引起致命性肠道血症,其特征是急性神经系统症状和猝死,被美国疾病预防控制中心列为潜在的 B 类生物战剂^[5-6]。虽然 1972 年由美国发起的“生物和有毒武器公约”禁止在常规战争中使用生物武器,但许多国家仍特别关注 ETX 是否有可能威胁国家安全。

ETX 作为一种原毒素在肠道中被分泌,其氨基和羧基的末端肽经宿主的胰蛋白酶或者产气荚膜梭菌的金属蛋白酶(λ 毒素)水解切割而被激活^[7]。激活后的 ETX 会被肠道吸收,通过血液传播影响脏器^[8]。小鼠被广泛用于研究 ETX 的毒性作用,并为实验室控制的中毒研究提供了有用的模型^[9]。目前的研究发现经静脉注射或者腹腔注射到小鼠体内,ETX 主要累积在肾脏和神经系统中,并且会导致肾脏和脑明显的病理性改变,包括出血、细胞质空泡化及水肿^[10]。最近的研究发现 ETX 能通过血脑屏障,利用血管周围水肿的形成和毒素扩散到神经组织中,并且导致中枢神经系统脱髓鞘^[11]。然而对其他的脏器研究得较少,因此本研究以小鼠为实验材料,探讨 ETX 对小鼠不同脏器的结合和毒性作用,为 B 型和 D 型产气荚膜梭菌感染的治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小鼠

SPF 级 C57BL/6 小鼠购自北京华阜康生物科技公司。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 琼脂粉(固体培养基) 15.0, 1.03 MPa 灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

His 抗体, Abcam 公司; 辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG、二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒, 北京中杉金桥有限公司; 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI), Thermo 公司。蛋白纯化仪, GE 公司; 小动物活体成像仪, Bruker 公司; 激光共聚焦显微镜、正置显微镜、脱水机, Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 ETX 及 mScarlet-ETX 的纯化

构建重组质粒 pTIG-His-ETX 和 pTIG-mScarlet-ETX-His, 编码生成 6 \times His-tagged ETX (剪切 C 末端的 22 个残基和 N 末端的 13 个残基序列)和 mScarlet-ETX 蛋白。将重组质粒转化到 BL21 感受态细胞,挑取单克隆菌落于 LB 中 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养测序验证。再经过 IPTG 诱导培养,超声(频率 55%, 超声 3 s, 暂停 2 s, 50 min)破碎,蛋白纯化仪纯化收集重组的 His-ETX 和 mScarlet-ETX 蛋白。最后通过 15%的 SDS-PAGE 电泳对纯化蛋白进行纯度验证。

1.2.2 小动物活体成像

将 SPF 级 C57BL/6 小鼠固定在小鼠的固定架上,取 100 μ L 的 PBS 缓冲液或 2 μ mol/L 重组 mScarlet-ETX 经尾静脉注射到小鼠体内。时刻观察小鼠的状态,待小鼠死亡立即置于小动物活体成像仪中采集图片,并快速地取出小鼠的各个脏器置于小动物活体成像仪中观察拍照。

1.2.3 HE 染色

将 SPF 级 C57BL/6 小鼠固定在小鼠的固定架上,取 100 μ L 的 PBS 缓冲液或 2 μ mol/L 重组 His-ETX 经尾静脉注射到小鼠体内。待小鼠死后,取出各个脏器于 4%的多聚甲醛中固定。将组织置于脱水机中脱水浸蜡,石蜡包埋。切取 5 μ m 厚度

的切片, 将切片经 63 °C 烘烤、脱蜡、苏木素和伊红染色, 最后将染色好的切片置于显微镜下观察病理损伤情况并采集图片。

1.2.4 免疫组化

将脱蜡后的切片置于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液中抗原修复, PBS 洗涤 3 次后经 3% 的 H₂O₂ 室温孵育 15 min 以破坏内源性过氧化物酶。再用 5% 的山羊血清室温封闭 30 min, 按照抗体说明书稀释 His 抗体, 4 °C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次, 稀释辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG, 室温孵育 1 h, 再用 PBS 洗涤 3 次, 滴加 DAB 显色剂进行显示。最后苏木素对细胞核进行复染, 置于显微镜下观察拍照。

1.2.5 免疫荧光

取注射 PBS 处死后的老鼠组织切片, 经抗原修复和封闭后, 滴加 0.2 μmol/L 的 mScarlet-ETX, 室温孵育 30 min。PBS 洗涤 3 次, 滴加 DAPI 对细胞核进行着色, 最后将切片置于激光共聚焦显微镜下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 小动物活体成像观察 mScarlet-ETX 在小鼠不同脏器的累积情况

mScarlet-ETX 经尾静脉注射小鼠体内, 1 h 后

小鼠出现抽搐和角弓反张等症状, 并开始出现死亡。死后的小鼠立即置于小动物活体成像整体观察, 发现 mScarlet-ETX 主要累积于小鼠的脑部, 而在对照组的脑部无红色荧光信号。然后取出不同的脏器分别置于小动物活体成像仪中观察, 发现 mScarlet-ETX 组中的脑、肾、肺、肝、脾和心脏中荧光信号的强度明显高于对照组, 说明 mScarlet-ETX 不仅在脑部累积, 还在小鼠的肾、肺、肝、脾以及心脏中都有累积(图 1)。

2.2 His-ETX 在小鼠不同脏器组织中的结合情况

由于 mScarlet-ETX 在小鼠的各个脏器都有累积现象, 因此我们想进一步了解毒素在不同脏器的结合情况。将 His-ETX 经尾静脉注射到小鼠体内, 在 1 h 后出现临床症状, 待小鼠死后立刻取出各个脏器组织, 置于固定液中固定并进行切片。His-ETX 免疫组化的结果显示: 对照组的脑、肾、肺、肝、脾和心脏组织中未发现阳性表达; ETX 处理组中发现肾脏组织中的肾小管和肾小体上、脑组织中的白质部分、肺组织的肺泡周围、肝脏的肝小叶周围、脾脏的实质中以及心脏的心肌膜中都有 ETX 的结合(图 2)。

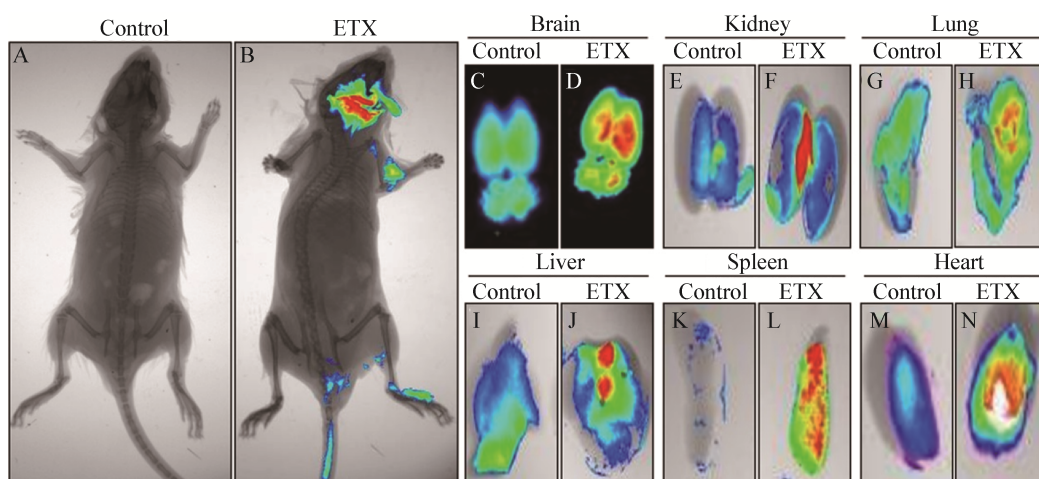


图 1 小动物活体成像观察 mScarlet-ETX 在小鼠各个器官的累积情况

Figure 1 Observing the accumulation of mScarlet-ETX in various organs of mice by *in vivo* imaging system

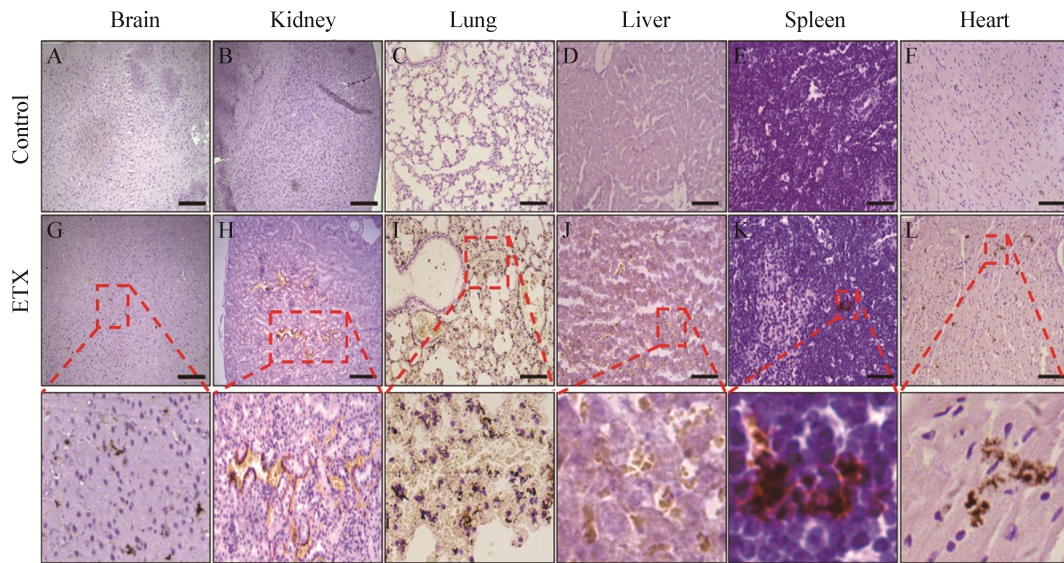


图 2 免疫组化分析 ETX 在脑、肾、肺、肝、脾和心脏组织中的结合情况
Figure 2 The binding of ETX in brain, kidney, lung, liver, spleen and heart tissue was analyzed by immunohistochemistry

2.3 His-ETX 导致小鼠不同脏器的病理性改变情况

上述结果已证实在各个脏器组织上都有 ETX 结合, 因此进一步观察毒素是否导致这些脏器的病理性损伤。HE 染色结果表明, 与对照组中相对应的正常组织相比 ETX 对小鼠的不同脏器都有病理

性损伤(图 3): 肾组织的远端小管上皮细胞中出现致密核, 并伴有出血; 脑组织中出现水肿; 肺组织中肺支气管周围明显扩张, 渗出大量的浆液; 肝脏中肝小叶出现坏死, 在坏死区域附近观察到肝细胞变性; 脾脏中脾细胞变性, 并伴有出血; 心脏有明显的水肿和出血。

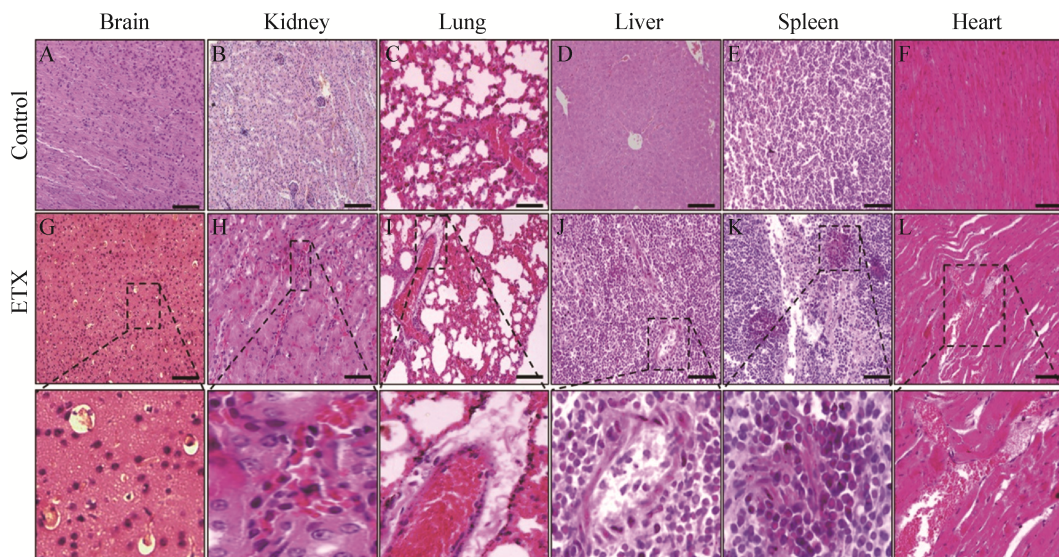


图 3 观察 ETX 对脑、肾、肺、肝、脾和心脏组织的病理学改变
Figure 3 ETX induces pathological changes in brain, kidney, lung, liver, spleen and heart tissue

2.4 ETX 在小鼠不同小肠肠段的结合情况

肠道是产气荚膜梭菌 ϵ 毒素合成、活化以及吸收的部位^[12]。对注射 ETX 死后的老鼠小肠不同解剖肠段进行免疫组化分析, 主要观察 ETX 在不同肠段的结合情况。与对照组相比较, 发现 His-ETX 主要结合在结肠部位, 在直肠、空肠和回肠部位有少量的结合,

而在十二指肠和盲肠中未发现结合(图 4)。

随后取正常老鼠的不同肠段进行切片, mScarlet-ETX 与这些正常组织进行孵育, 同样与对照处理组相比较, 发现 mScarlet-ETX 主要结合在结肠部位, 在直肠、空肠和回肠部位有少量的结合, 而在十二指肠和盲肠中未发现结合(图 5)。

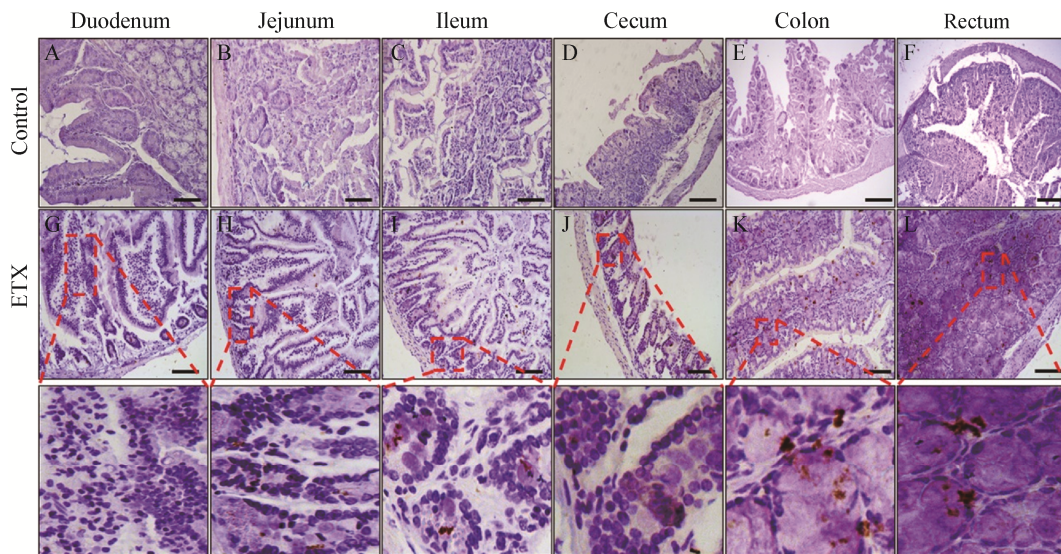


图 4 免疫组化分析 ETX 在不同小肠肠段的结合情况

Figure 4 The binding of ETX in different intestinal segments was analyzed by immunohistochemistry

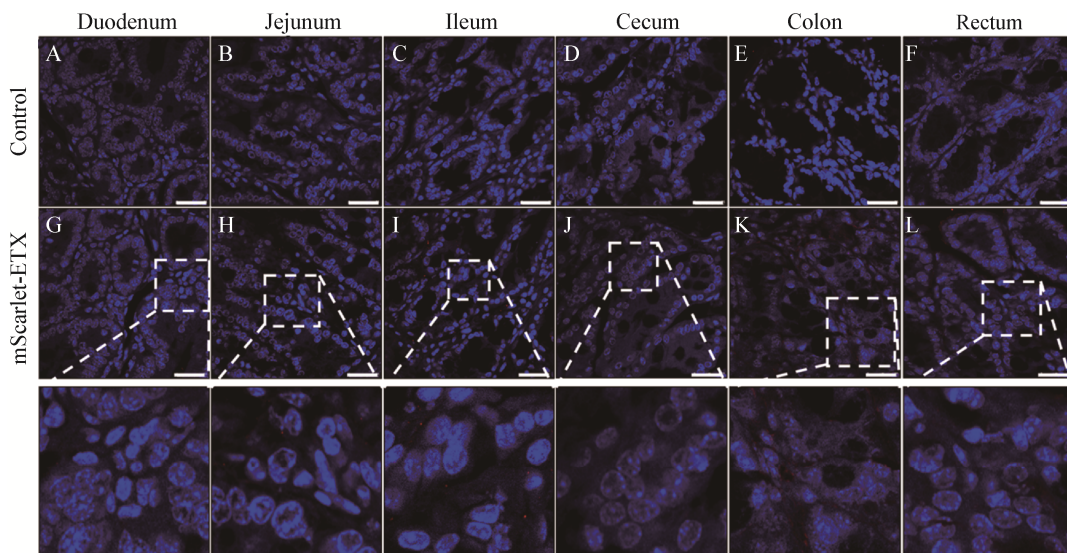


图 5 分析 mScarlet-ETX 在小鼠不同小肠肠段的结合情况

Figure 5 The binding of mScarlet-ETX to different intestinal segments of mice

3 讨论与结论

ETX 会引起绵羊、山羊肠炎和肠毒血症, 对畜牧业造成严重的经济损失^[13]。在本文研究中, 我们通过小动物活体成像发现 mScarlet-ETX 不仅累积于小鼠的脑部, 还在小鼠的肾、肝、肺、脾以及心脏都有累积。同样对 His-ETX 作用死后的小鼠的脏器进行免疫组化分析, 发现在小鼠的脑、肾、肝、肺、脾和心脏中都有 ETX 的结合。说明不只是脑和肾脏中有产气荚膜梭菌 ϵ 毒素结合的受体, 肝、肺、脾和心脏组织中也有毒素结合的受体。

随后对 ETX 处理死亡后小鼠的各个脏器进行病理学分析发现, 与对照组相比, ETX 会导致小鼠的脑、肾、肺、肝、脾和心脏明显的病理学改变, 证实 ETX 不只是针对脑和肾有毒害作用, 而是对整体性内脏器官有损伤, 从而导致被感染动物的死亡。有研究发现, 接种含有 ETX 的 D 型产气荚膜梭菌培养上清液的羊羔和山羊, 30 min 后观察到神经症状和死亡^[14]。类似地, 在小鼠口服 ETX 2 h 后观察到致死效应^[15]。ETX 引起接种动物快速死亡的原因可能是导致多个脏器共同损伤的结果。

在 B 型和 D 型产气荚膜梭菌感染期间, ETX 在肠道中产生并被激活, 活化的毒素吸收到血液中并传播到靶器官中^[16]。产气荚膜梭菌存在于胃肠道中, ϵ 毒素在肠道中生成^[17], 已经证实纯化的 ETX 很容易地从小肠吸收进入体循环中^[18]。通过免疫组化及免疫荧光分析显示, ETX 主要结合在小鼠小肠的结肠上, 表明产气荚膜梭菌在肠道可能主要定殖于结肠上, 并且 ETX 可能主要在结肠上产生、活化且被吸收。小肠的结肠部位在携带 ϵ 毒素基因的产气荚膜梭菌的致病过程中起着重要作用。

总之, 我们发现 ETX 能累积于小鼠的脑、肾、肺、肝、脾和心脏中, 并且能导致这些脏器病理学损伤, 而且 ETX 在肠道中主要结合在结肠上, 这些结果为治疗和预防携带 ϵ 毒素产气荚膜梭菌的感染提供了一定理论依据。

REFERENCES

- [1] Gao J, Xin WW, Huang J, et al. Hemolysis in human erythrocytes by *Clostridium perfringens* epsilon toxin requires activation of P2 receptors[J]. *Virulence*, 2018, 9(1): 1601-1614
- [2] Rumah KR, Ma YH, Linden JR, et al. The myelin and lymphocyte protein MAL is required for binding and activity of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin[J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(5): e1004896
- [3] Nagahama M, Itohayashi Y, Hara H, et al. Cellular vacuolation induced by *Clostridium perfringens* epsilon-toxin[J]. *The FEBS Journal*, 2011, 278(18): 3395-3407
- [4] Savva CG, Clark AR, Naylor CE, et al. The pore structure of clostridium perfringens epsilon toxin[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 2641
- [5] Navarro MA, McClane BA, Uzal FA. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins[J]. *Toxins*, 2018, 10(5): 212
- [6] Adler D, Linden JR, Shetty SV, et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin compromises the blood-brain barrier in a humanized zebrafish model[J]. *iScience*, 2019, 15: 39-54
- [7] Babele P, Verma S, Kumar RB, et al. Elucidation of protein biomarkers in plasma and urine for epsilon toxin exposure in mouse model[J]. *Anaerobe*, 2019, 59: 76-91
- [8] Uzal FA, Navarro MA, Li JH, et al. Comparative pathogenesis of enteric clostridial infections in humans and animals[J]. *Anaerobe*, 2018, 53: 11-20
- [9] Uzal FA, McClane BA, Cheung JK, et al. Animal models to study the pathogenesis of human and animal clostridium perfringens infections[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 179(1/2): 23-33
- [10] Yao WW, Kang JJ, Kang L, et al. Immunization with a novel clostridium perfringens epsilon toxin mutant rET^{XY196E}-C confers strong protection in mice[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 24162
- [11] Wioland L, Dupont JL, Doussau F, et al. Epsilon toxin from *Clostridium perfringens* acts on oligodendrocytes without forming pores, and causes demyelination[J]. *Cellular Microbiology*, 2015, 17(3): 369-388
- [12] Popoff MR. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin[J]. *The FEBS Journal*, 2011, 278(23): 4602-4615
- [13] Blanch M, Dorca-Arévalo J, Not A, et al. The cytotoxicity of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* on lymphocytes is mediated by MAL protein expression[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2018, 38(19): e00086
- [14] Uzal FA, Kelly WR, Morris WE, et al. The pathology of peracute experimental *Clostridium perfringens* type D

- enterotoxemia in sheep[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2004, 16(5): 403-411
- [15] Fernandez-Miyakawa ME, Sayeed S, Fisher DJ, et al. Development and application of an oral challenge mouse model for studying *Clostridium perfringens* type D infection[J]. Infection and Immunity, 2007, 75(9): 4282-4288
- [16] Alves GG, Machado de Ávila RA, Chávez-Olórtegui CD, et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: the third most potent bacterial toxin known[J]. Anaerobe, 2014, 30: 102-107
- [17] Wagley S, Bokori-Brown M, Morcrette H, et al. Evidence of *Clostridium perfringens* epsilon toxin associated with multiple sclerosis[J]. Multiple Sclerosis Journal, 2019, 25(5): 653-660
- [18] Losada-Eaton DM, Uzal FA, Fernández Miyakawa ME. *Clostridium perfringens* epsilon toxin is absorbed from different intestinal segments of mice[J]. Toxicon, 2008, 51(7): 1207-1213

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年，月刊，是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办，国内外公开发行，以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括：工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展，以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊，中国科技核心期刊，CSCD核心期刊，曾获国家优秀科技期刊三等奖，中国科学院优秀科技期刊三等奖，北京优秀科技期刊奖，被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计，本刊2012年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”，并入选“中国精品科技期刊”，成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买，2020年每册定价130元，全年1560元，我们免邮费寄刊。

邮购地址：(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413