

Edwardsiella tarda 導致紅血球的形態變化

The Morphological Changes of Human Erythrocytes in the Culture of *Edwardsiella tarda*

任曉旭* · 陳家全* · 房錫廷** · 王成德**

Hsiao-Hsu Jen, Jia-Chyuan Chen,
Shyi-Tyng Faung and Chen-Teh Wang

Abstract

The hemolysis of human erythrocytes by pathogen *Edwardsiella tarda* was investigated by: 1) analyzing the leakiness of hemoglobin; and 2) observing the morphological changes of erythrocytes with scanning electron microscopy (SEM). Erythrocytes were incubated with the whole culture of *Edwardsiella tarda* at the log growth phase. In the incubation of 5, 15, and 30 min., the leakiness of hemoglobin was 0%, 5% and 13% of the total hemoglobin. The morphology of erythrocytes changed to echinocytes at 5 min., and then to stomatocytes at 30 min. The morphological changes, indicates that *Edwardsiella tarda* caused a serial alterations of membrane structure of erythrocytes prior to hemolysis.

緒 論

Edwardsiella tarda 由 Sadazaki 和 Murata 於 1959 在日本首先被發現，而後陸續由鰻魚、河魨、鳥、兩棲類、爬蟲類、哺乳類甚至人類身上均可分離得到此菌種 (Meyer & Bullock 1973; Iveson 1971; Berg & Anderson 1972; Bockemuhl *et al.* 1971)，而其中最引人注意的是它能引起養殖鰻魚重要的細菌疾病——愛德華氏病 (Edwardsiellosis)。根據林等 (Lin *et al.* 1977) 對臺灣養殖鰻魚疾病之統計分析報告指出，愛德華氏病單獨發生或與 *Aeromonas hydrophila* 混合感染病例佔所有引致鰻魚死亡疾病的 37%，高居首位，造成臺灣養殖鰻魚業重大損失。當魚受感染後常引發腸胃潰瘍症，其症狀通常是皮膚紅腫、敗血、溶血等現象。至於其致病機制，Robert (1978) 認為可能之感染途徑，是經由皮膚潰瘍開始，由外向內入侵造成腸膜炎後，再波及內臟器官。在對本菌之病原性研究中發現，該菌能產生溶血素 (hemolysin) (Ullah & Aria 1983; Watson & White 1978)；除此之外，Ullah 及 Aria (Ullah & Aria 1983) 認為一些蛋白質如蛋白溶解酶 (protease)、磷脂酶 (lipase) 等可能是導致 *E. tarda* 具有病原性的主要外毒素。

紅血球的溶血現象導因於細胞膜的漲破，而細胞膜在漲破之前細胞的形態會先發生改變。細胞的形態取決於三個因子：(1) 細胞膜的脂雙層 (lipid bilayer)；(2) 細胞膜骨架 (membrane skeleton)

* 國立臺灣大學理學院電子顯微鏡室 (Laboratory of Electron Microscopy, College of Science, National Taiwan University)

** 國立清華大學生命科學研究所 (Institute of Life Science, National Tsing Hua University)

以及(3)細胞內的骨架 (cytoskeleton)。正常紅血球的形態是雙凹圓盤形 (biconcave discocyte)，一旦發生病變，或外物影響到細胞膜時，紅血球馬上變形 (參考 Elgsaeter *et al.* 1986 的 review paper)。至今仍無報告描述 *E. tarda* 造成溶血時，紅血球如何變形。本報告乃利用掃描式電顯技術來顯示 *E. tarda* 菌液所引發的紅血球的形態變化。

材料與方法

材料

Edwardsiella tarda 800123-6K 菌種由臺大動物系魚病研究室鍾虎雲教授提供。細菌培養基 Tryptic Soybean Broth (TSB) 以及 Bacto-agar 購自 DIFCO (Detroit, Michigan, USA)。Salmonella-Shigella agar (SS agar) 購自 BBL R (Div: Becton, Dickinson & Co. B-D Cockeysville, MD 21030 USA)。化學藥品購自 E. Merck Chemicals (Darmstadt, German)。

方法

菌種培養：

Edwardsiella tarda 800123-6K 由冷凍乾燥管中取出，以 Tryptic soybean broth (TSB) 溶液 (30 公克溶於 1 公升，每公升含 Bacto-Tryptone 17 公克，Bacto-soytone 3 公克，Bacto-Dextrose 2.5 公克，Sodium chloride 5 公克，Dipotassium phosphate 2.5 公克) 沖散使之懸浮均勻，接種於 Salmonella-Shigella agar (60 公克溶於 1 公升，每公升含 Beef extractives 5 公克，Polypeptone TM peptone 5 公克，Lactose 10 公克，Bile salts mixture 8.5 公克，Sodium citrate 8.5 公克，Sodium thiosulfate 8.5 公克，Ferric citrate 1 公克，Neutral red 0.025 公克，Agar 13.5 公克，Brilliant green 0.33 毫克)。在 35°C 中培養 12-24 小時後，挑取單一菌落接種於 5 毫升 TSB 溶液中培養 6 小時，此時菌液的 O.D.₆₀₀ 在 0.4-0.7 之間，菌數為 $3-8 \times 10^7$ cells/ml，此為菌種 log growth phase 的中間點。

溶血 (hemolysis) 活性之測定：

自健康的捐血者抽出血液，立刻加入 1/9 倍體積的抗凝血劑 (0.11 mM Na-Citrate) 中，在室溫下離心 (600g) 10 分鐘得紅血球。將之以等體積 PBS (Phosphate buffered saline, pH 7.0) 沖洗三次後，稀釋成 0.25%。此時 O.D.₅₄₀ 為 0.5，RBC 數目為 5×10^6 cells/ml。取 1 毫升 0.25% 之紅血球加入 1 毫升菌液中，稱之為混合液，溫培於 37°C。在不同培養時間內，取一部份混合液以 Ependorf 離心機 (Sigma, model 202 CM) 離心 (15,000g) 1 分鐘，並取出上清液測定血紅素 (hemoglobin) 在波長 540 nm 的吸光度，以決定是否有溶血現象。沉澱物則經標本製備後以掃描式電顯技術觀察紅血球的形態變化。

掃描式電子顯微鏡技術：

紅血球樣本以 2.5% glutaraldehyde 在 4°C 下作前固定 1 小時，經 1000g 離心 20 分鐘後，以等體積 PBS 清洗，再以 1% OsO₄ 作後固定，經酒精系列脫水後，進行臨界點乾燥 (Hitachi HCP-2 Critical Point Dryer)，鍍金 (Eiko Engineering, Model IB-2)，並在掃描式電子顯微鏡 (Hitachi S-520) 下觀察。

結果與討論

E. tarda 菌液 (whole culture) 與等體積的紅血球懸浮液混合後，經溫培 5 分鐘、15 分鐘、30 分鐘，測得的血紅素溶解率依序為原紅血球的 0%、5%、13%，血紅素的溶出量可代表紅血球被破壞

瓦解的數目，所以 *E. tarda* 確實可導致紅血球的溶解。這三種處理的情況同時以掃描式電子顯微鏡技術觀察，顯示紅血球在菌液中會經歷不同的形態變化（圖 1）。紅血球懸浮於 PBS 溶液中，即使溫培一小時，仍為 discocytic shape（圖 1-A）。當加入等體積的 TBS 溶液後，在一小時的溫培中，有部份紅血球會漸漸變成扁平形態，但細胞表面平滑（圖 1-B 及圖 1-C）。當等體積的 *E. tarda* 菌液加入紅血球懸浮液中，則在 5 分鐘內全部變形為 echinocytes，即細胞縮圓，表面有孢膜凸增（圖 2-A）

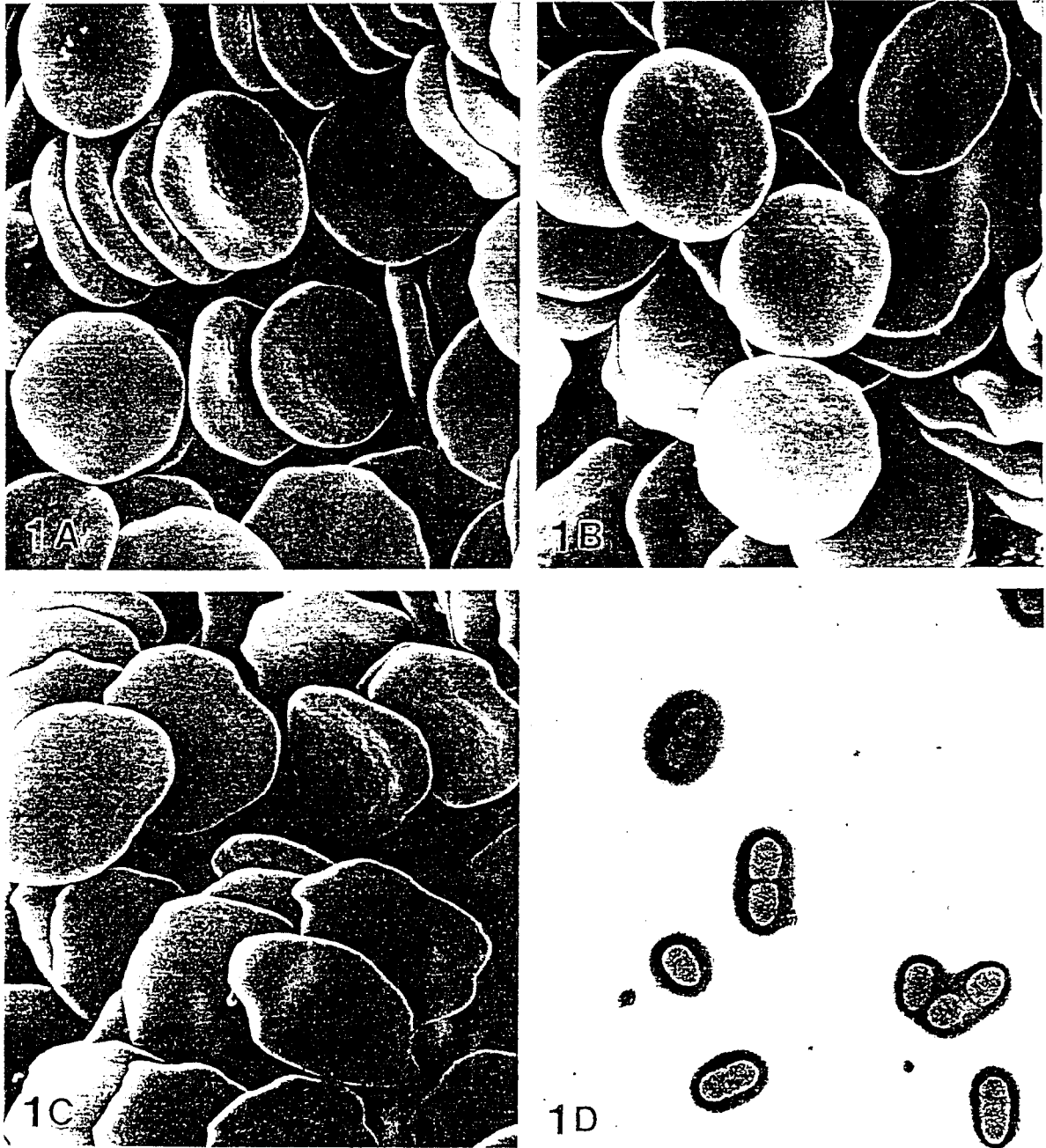


圖 1 分離的人體紅血球懸浮於 PBS 溶液中 37°C 1 小時 (1-A)，以及加上等體積 TSB 的混合溶液 1 分鐘 (1-B) 和 1 小時後 (1-C) 之掃描電顯圖 (×4000)。圖 1-D 則為以負染色 (2% PTA) 方式在 TEM 下所觀察到 *E. tarda* 之外型結構圖 (×8000)。

。溫培時間到 15 分鐘後，大約有 50% population 的紅血球由 echinocytes 轉變為不規則形態的 discoocytes (圖 2-B)。而溫培至 30 分鐘後則有 30% population 的紅血球變形為 cup shape 的 stomatocytes (圖 2-C)。所以 SEM 顯示 *E. tarda* 的菌液會引起紅血球隨溫培的時間而有一系列的形態轉變，即由原先的 discoocytes 轉變為 echinocytes，再變成 stomatocytes。

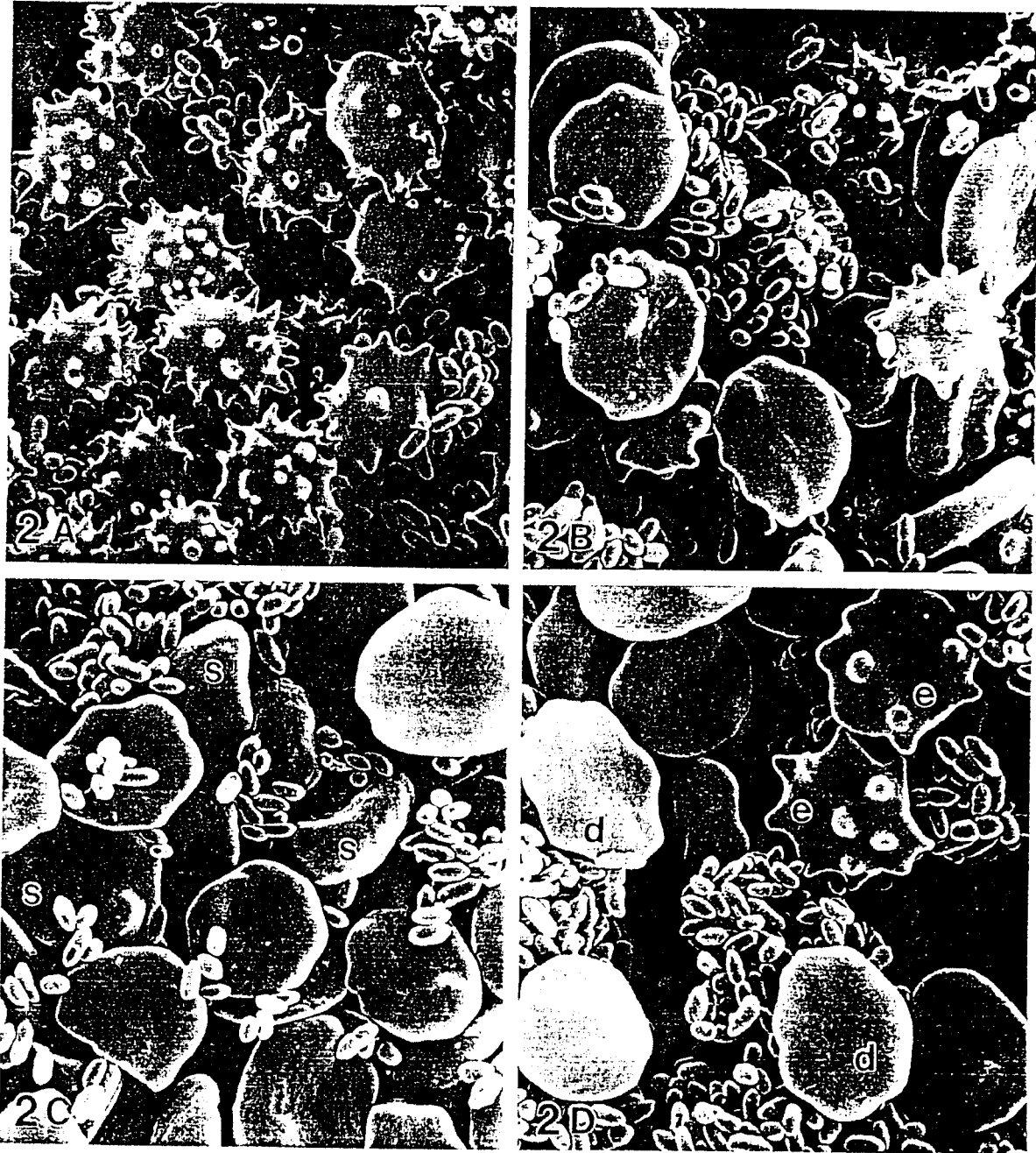


圖 2 掃描電顯圖顯示紅血球與含有 *E. tarda* 的菌液混合後，在 37°C 下溫培 5 分鐘 (2-A) 變形為 echinocytes、15 分鐘後 (2-B) 則轉變為 discoocytes、溫培 30 分鐘 (2-C) 則可見許多杯狀形的 stomatocytes (s)，而與 *E. tarda* 重新懸浮在新鮮 TSB 培養液中共同培養 1 小時 (2-D)，亦可見部份紅血球呈現 echinocytes (e) 及 discoocytes (d) 之現象。

為確定 *E. tarda* 導致紅血球的變形作用是由於 *E. tarda* 釋放出物質所致，又作了兩個實驗，一為將 log phase 的菌液 (whole culture) 離心，把離心下來的菌體重新懸浮在新鮮的 TSB 溶液中，再加入紅血球；另一為將上清液直接加入紅血球，兩組溫培一小時。發現並沒有血紅素的溶出，但在 SEM 下，可看到紅血球變成 echinocytes 及不規則的 discoocytes (圖 2-D)，此結果表示 *E. tarda* 能慢慢釋放出物質來影響紅血球的細胞結構，而造成溶血現象可能與釋放物質量的多寡有關。

紅血球的形態變化已廣被研究 (Elgsaeter *et al.* 1986 的 review paper)，而藥物 (Ferrell *et al.*, 1988) 和磷質 (Daleke & Huestis, 1985; Golan *et al.*, 1988) 都會使紅血球形態發生變化。由於這些特殊分子在紅血球胞膜脂雙層呈不對稱分佈，所以紅血球會有 echinocytes, stomatocytes 等不同形態顯現。更由於藥物或磷質在脂雙層翻轉 (flip-flop) 的時間約須 30 分鐘，所以隨溫培時間的延長紅血球會有不同形態的轉變而達到最後的平衡形態。已有報告指出 *E. tarda* 會釋放 hemolysin (Bochemiihl, 1971) 和 lipase (Berg & Anderson, 1972)，所以紅血球形態變化，也可能是由 hemolysin 和 lipase 所導致。另外 Golan *et al.* (1988) 曾提出寄生蟲 *Schistosoma mansoni* 會釋放出 lysophosphatidyl-choline 引起紅血球的溶血現象，而本實驗室 (Chen *et al.*, 1988 發表在本刊) 也發現 *E. tarda* 有 lysophosphatidyl-ethanoamine (lyso-PE) 存在，因此 *E. tarda* 的 lyso-PE 也可能是導致紅血球的溶血因子之一。由於紅血球在 *E. tarda* 菌液中，表現出隨著溫培時間的延長而有形態的轉變，很有可能是 lyso-PE 先插入紅血球胞膜脂雙層的外層使紅血球變形成 echinocytes；經過 30 分鐘溫培，lyso-PE 翻轉入脂雙層的內層才造成紅血球轉形為 stomatocytes。

摘 要

魚病細菌 *Edwardsiella tarda* 對紅血球的溶血性可使用兩種方法來探討：1) 分析血紅素的溶解度，及 2) 以掃描電顯技術觀察紅血球的形態變化。

人類紅血球與生長於 log phase 的 *Edwardsiella tarda* 的菌液混合溫培，在不同溫培時間 5 分鐘，15 分鐘，和 30 分鐘，分別測得血紅素被溶出的比率依序為 0%、5% 和 13%。而在掃描式電子顯微鏡下也顯示紅血球經歷一系列的形態轉變：即由 discoocytes 變成 echinocytes 再轉變成 stomatocytes。這種紅血球形態的變化表示 *Edwardsiella tarda* 先影響紅血球細胞膜的結構與生化功能，才導致溶血的發生。

誌 謝

本研究承蒙農委會提供研究經費 (編號 76 農建 -8.1- 漁 -20F) 特此誌謝。

參 考 文 獻

- Berg, R.W. and Anderson, A.W. (1972) "Salmonellas and *Edwardsiella tarda* in gull feces: a source of contamination in fish processing plants" *Appl. Microbiol.*, 24(3): 501-503.
- Bockemiihl, J.R. Pan-Urai and Burkhardt, F. (1971) "*Edwardsiella tarda* associated with human diseases" *Path. Microbiol.*, 37: 393-401.
- Chen, T.-R., Fang, S.-T. and Wang, C.-T., (1989) "Characterization of membrane phospholipids of *Edwardsiella tarda*" Reports on Fish Disease Research, in press.
- Daleke, D.L. and Huestis, W.H. (1985) "Incorporation and translocation of aminophospholipids in human erythrocytes" *Biochemistry*, 24: 5400-5416.
- Elgsaeter, A., Stokke, B.T., Mikkelsen, A. and Branton, D. (1986) "The molecular basis of erythrocyte shape" *Science*, Dec. 5: 1217-1223.

- Ferrell, J.E. JR. and Huestis, W.H. (1984) "Phosphoinositide metabolism and the morphology of human erythrocytes" *The Journal of Cell Biology*, 98: 1992-1998.
- Ferrell, J.E. JR., Lee, K.—J. and Huestis, W.H. (1985) "Membrane bilayer balance and erythrocyte shape: a quantitative assessment" *Biochemistry*, 24: 2849-2857.
- Ferrell, J.E. Jr., Mitchell, K. T. and Huestis, W.H. (1988) "Membrane bilayer balance and platelet shape: morphological and biochemical responses to amphipathic compounds" *Biochimica et Biophysica Acta*, 939: 223-237.
- Golan D.E., Brown, C.S., Cianci, C. M.L. Furlong, S.T. and Caulfield, J.P. (1986) "Schistosomula of *Schistosoma mansoni* use lysophosphatidylcholine to lyse adherent human red blood cells and immobilize red cell membrane components" *The Journal of Cell Biology*, 103: 819-828.
- Golan, D.E., Furlong, S. T., Brown, C. S. and Caulfield, J.P. (1988) "Monopalmitoyl-phosphatidylcholine incorporation into human erythrocyte ghost membranes causes protein and lipid immobilization and cholesterol depletion" *Biochemistry*, 27: 2661-2667.
- Iveson, J. B. (1971) "Strontium Chloride B and E.E. enrichment broth media for the isolation of *Edwardsiella*, *Salmonella* and *Arizona* species from tiger snakes" *J. Hyg. Camb.*, 69: 323-330.
- 林曜松、蕭世民 (1977) 「魚池生態環境與魚病關係之研究 (I)——臺灣鰻魚疾病之統計分析」, 魚病研究專集 (I), 57-61。
- Lin, Yan-Sung and Hsiao, Shyh-Nin (1977) "The statistics analysis of eel disease in Taiwan" *JCRR Fisheries Serris No. 29, Reports on Fish Disease Research (I)*, 57-61.
- Liu, C. Y. and Chien, M. C. (1986) "Studies on pathogenesis of *Edwardsiellsis* in experimentally infected eels." *C. O. A. Fisheries sevies No. 4 Fish Disease Research (VII)*, 68-78.
- Meyer, F. P. and Bullock, G. L. (1973) "*Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)" *Appl. Microbiol.*, 25(1): 155-156.
- Roberts, R. J. (1978) "Fish Pathology" *Builliere Tindall London* pp. 190.
- Ullah, M. A. and Aria, T. (1983) "Pathological activities of the naturally occurring strains of *Edwardsiella tarda*." *Fish Pathol.*, 18(2): 65-70.
- Watson, J. J. and White, F. H. (1978) "Hemolysins of *Edwardsiella tarda*." *Can. J. Comp. Med.*, 43: 78-83.