

论著·实验研究

肺炎链球菌对小鼠及儿童肺泡Ⅱ型 上皮细胞超微结构的影响

舒林华¹ 尚云晓¹ 张福会² 张晗¹ 马晓雪³ 杨男¹ 黄万杰¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院小儿呼吸科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 中国医科大学电镜中心, 辽宁 沈阳 110001;
3. 中国医科大学基础医学院病原微生物教研室, 辽宁 沈阳 110001)

【摘要】目的 研究肺炎链球菌(*S. p*)对昆明幼鼠和肺炎患儿肺泡Ⅱ型上皮细胞(AEC-Ⅱ)超微结构的影响,探究肺组织坏死的可能机制。**方法** 将从1例肺炎链球菌坏死性肺炎(PNP)患儿血中培养的*S. p*混悬液(CFU: 1×10^8 /L)0.3 mL注入昆明幼鼠的主支气管中(肺炎组),将等量生理盐水注入对照组鼠的主支气管内。92 h后处死,取鼠右肺下叶肺组织(1 mm³)于2.5%的戊二醛中固定。该患儿行左下肺叶肺空洞切除时,将坏死和正常的肺组织标本(1 mm³)置于2.5%的戊二醛中固定。用透射电子显微镜观察鼠与患儿AEC-Ⅱ超微结构。**结果** 在*S. p*作用下幼鼠与患儿AEC-Ⅱ的微绒毛减少,脱落。板层小体体积增大,排空加强,密度减低。线粒体数量减少。细胞核染色质浓缩,分布不均。**结论** *S. p*作用下幼鼠与患儿AEC-Ⅱ损伤变化相一致。AEC-Ⅱ超微结构的损伤可能是*S. p*导致肺组织坏死的重要原因之一。 [中国当代儿科杂志,2011,13(4):336-339]

【关键词】 肺炎链球菌; 电子显微镜; 坏死性肺炎; 儿童; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2011)04-0336-04

Effects of *Streptococcus pneumoniae* on the ultrastructure of alveolar epithelial cells type Ⅱ in the lung tissues of mice and children

SHU Lin-Hua, SHANG Yun-Xiao, ZHANG Fu-Hui, ZHANG Han, MA Xiao-Xue, YANG Nan, HUANG Wan-Jie. Department of Pediatric Pulmonology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: shulin-hua@126.com)

Abstract: Objective To explore the possible mechanisms of lung necrosis by examining the effects of *Streptococcus pneumoniae* (*S. p*) on the ultrastructure of alveolar epithelial cells type Ⅱ (AEC-Ⅱ) in the lung tissues of mice and children. **Methods** The suspended solutions of *S. p* strains cultured from the blood of a child with pneumococcal necrotizing pneumonia (PNP) (0.3 mL, CFU: 1×10^8 /L) were instilled into the trachea of pathogen-free mice to prepare PNP model. The same amount of normal saline was given for the control group (10 mice). The samples (1 mm³) from the lower lobe of right lung of the mice were obtained 92 hrs later and fixed in 2.5% glutaraldehyde. Normal and abnormal lung tissues (1 mm³) were obtained while operation for the left lower lobe pulmonary cavity excision in the child with PNP. The specimens were fixed in 2.5% glutaraldehyde and stored at 4°C. A transmission electron microscope was employed for the examination of the ultrastructure of AEC-Ⅱ in the lung tissues. **Results** Quantitative reduction and exfoliation of microvilli in *S. p*-infected AEC-Ⅱ were observed in both mice and this child compared with the control. Enlarged size, enhanced evacuation and reduced density of the lamellar bodies were also presented. The number of mitochondria was obviously reduced. The nucleolus chromatin concentrated and showed an inhomogeneous distribution. **Conclusions** *S. p* infection results in comparable damage to the ultrastructure of AEC-Ⅱ in mice and children that may represent one of the primary causes responsible for *S. p*-induced lung tissue necrosis. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (4):336-339]

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; Electron microscope; Necrotizing pneumonia; Child; Mice

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S. p*)是5岁以下儿童社区获得性肺炎(CAP)最常见的致病菌,30%~50%的小儿肺炎及50%重症肺炎由*S. p*所致^[1-2]。随着新型广谱抗生素的使用,*S. p*的耐药

性正逐渐呈上升趋势^[3-4]。目前,国内外对*S. p*肺炎的研究多集中在对其耐药机制的研究^[5-6]。近年,肺炎链球菌坏死性肺炎(pneumococcal necrotizing pneumonia, PNP)的发病率正逐年上升^[7]。PNP肺

组织坏死除与 *S. p* 的血清型^[8]及耐药性增强有关外,毒素在体内对肺泡 I 型上皮细胞(AEC-I)的直接损害也是肺组织坏死的重要因素之一^[9]。Rhodes等^[10]的动物实验表明肺泡 II 型上皮细胞(AEC-II)参与了 *S. p* 所致的肺泡上皮细胞的损伤与修复过程。作为肺组织功能细胞的 AEC-II 的损伤与坏死不仅影响肺表面活性物质的合成与分泌,还影响肺泡 AEC-I 的修复。AEC-II 的损伤与坏死可能是肺组织坏死的主要原因之一。迄今为止,*S. p* 在体内对 AEC-II 超微结构的影响未见报道,同时 *S. p* 作用下人体与动物体内 AEC-II 超微结构的变化是否一致国内外也尚未见报道。本研究用从 1 例 PNP 患儿血中培养出的 *S. p* 制成鼠肺炎模型,用透射电子显微镜观察肺炎鼠和该 PNP 患儿被切除的肺组织 AEC-II 超微结构的变化,以明确 *S. p* 感染后鼠与儿童 AEC-II 形态学变化的相关性,为研究儿童 *S. p* 感染后肺组织坏死奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源

S. p 菌株来自于 2009 年 4 月于我院小儿呼吸病房住院的 1 例急性 PNP 患儿血液中连续两次培养出的 *S. p*,经中国医科大学基础医学院病原微生物教研室采用荚膜肿胀法^[11]鉴定其血清型为 19 F (Statens Serum Institute,丹麦)。

1.2 动物模型建立及分组

将中国医科大学医学动物实验中心提供的清洁级昆明幼鼠 20 只(体重 20~22 g)随机分为肺炎组(10 只)和对照组(10 只)。将该菌株配制成 1×10^8 CFU/mL 混悬液用于建立模型。肺炎组用 20 mg/kg 的氯胺酮进行麻醉后,气管内滴注已配置的 *S. p* 悬液 0.3 mL,建立鼠急性肺炎链球菌肺炎模型^[12]。对照组滴注等量生理盐水。各组分别于滴注后 92 h 处死,取右肺下叶肺组织进行细菌培养和电子显微镜标本制备(每只小鼠取 5~6 块标本)。用 2.5% 戊二醛固定体积约为 1 mm^3 的肺组织标本,置于 4℃ 的冰箱中,用于透射电子显微镜(H-600 型电子透射显微镜,日本)进行细胞超微结构检查^[13]。肺炎组鼠出现寒战,数个鼠聚集成一团,少动,呼吸急促,口鼻发绀,呼吸深大,皮毛失去光泽、暗淡,其中 1 只于 92 h 前死亡。对照组无死亡。

1.3 幼鼠肺组织细菌培养

将取材后的幼鼠的肺组织切碎,并接种于血平板,37℃,5% CO₂ 过夜培养。待细菌生长后挑取

4~5 个典型菌落进行菌株和血清型鉴定(Statens Serum Institute,丹麦)。实验结果证明为 *S. p* 生长,血清型为 19 F。

1.4 患儿肺组织标本的制备

患儿,女,9 岁,诊断为急性 PNP(两次血培养为 *S. p* 生长)。出院后因反复患肺炎,肺空洞 4 个月未愈合而行左肺下叶(肺空洞)切除术。术中立即将离体的肺组织根据部位、颜色、质韧度分为正常肺组织和病变肺组织,进行分类切块(体积 1 mm^3),分别迅速置于 2.5% 戊二醛中固定,并放置于 4℃ 的冰箱中备检。病变标本获取经过中国医科大学附属盛京医院医学伦理委员会同意和患儿家长的书面知情同意。

2 结果

2.1 两组幼鼠肺组织 AEC-II 超微结构变化

正常对照组肺组织 AEC-II 超微结构形态无异常改变(图 1A)。肺炎组中 9 只存活鼠在 *S. p* 感染 92 h 时 AEC-II 形态及细胞器均发生显著变化,其中 9 例均出现微绒毛少,板层小体体积增大,排空加强;8 例出现线粒体体积增大,线粒体的嵴减少,细胞核染色质浓缩。

侵入肺泡腔内的 *S. p*(图 1B)被肺泡腔内的肺泡巨噬细胞吞噬在吞噬溶酶体内,吞噬溶酶体内可见较为完整的 *S. p*(图 1C)。

肺炎组 AEC-II 细胞超微结构发生了显著变化。微绒毛消失。线粒体肿胀,体积大于板层小体的体积。线粒体数量增多,线粒体呈指环状围绕细胞核排列。线粒体基质变浅,呈颗粒状。线粒体内嵴变短,数量减少,甚至消失。细胞核形态尚规整,边界清晰,染色质浓缩呈颗粒状,核仁居于细胞核边界(图 1D)。板层小体数量明显增多,体积增大,板层小体呈指环状围绕细胞核排列。板层小体内板层数量减少,电子密度普遍减低,内容物减少,排空加强,呈“空泡”样改变。细胞核边界清晰,核仁居于核边界,染色质略浓缩,分布尚均匀(图 1E)。

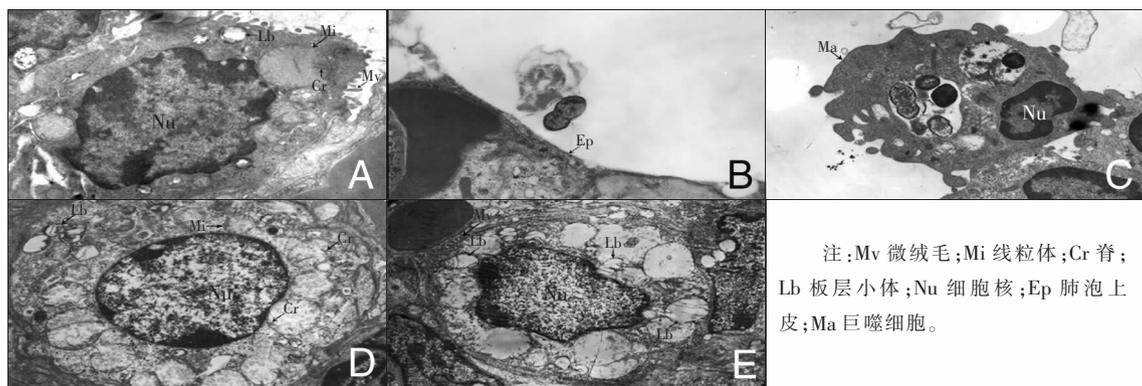
2.2 患儿正常肺组织 AEC-II 及 *S. p* 感染后 AEC-II 超微结构的变化

患儿正常肺组织 AEC-II 超微结构可见微纤毛排列紧密,疏密相间,长短均匀。细胞质内可见较多圆形板层小体。多数板层小体内电子密度相同,内容物较饱满。细胞核边界清晰,核内染色质分布均匀(图 2A)。

患儿肺组织 AEC-II 被 *S. p* 感染后,微绒毛脱落。板层小体数量明显减少,体积增大,出现巨大的

板层小体,部分呈“空泡”样改变。细胞核染色质浓缩(图2B)。从图2C可以看出,患儿肺组织 AEC-II 被 *S. p* 感染后,AEC-II 微绒毛脱落,微绒毛数量减少,变短,排列稀疏。板层小体数量明显减少,体

积大小不等,形态不规则,呈“空泡”样改变。细胞核体积增大,形态不规整,核膜曲折凹陷,染色质集中于核膜内,形成较大的高电子密度的染色质团块,部分核膜边界不清。



注:Mv 微绒毛;Mi 线粒体;Cr 脊;Lb 板层小体;Nu 细胞核;Ep 肺泡上皮;Ma 巨噬细胞。

图1 幼鼠肺组织 AEC-II 超微结构(电镜,×8400) **A:**鼠正常肺组织。Mv 排列整齐,Mi 形态规整,Cr 分布均匀,Lb 形态规整,密度均匀,Nu 边界清晰,染色质分布均匀;**B:***S. p* 侵入鼠肺泡腔内。可见 *S. p* 荚膜和 Ep;**C:***S. p* 在肺泡腔内被肺泡巨噬细胞吞噬;**D:**AEC-II 在 *S. p* 作用下 Mi 的变化。Mi 体积增大,基质变浅,Cr 数量减少,Mi 数量增多,呈指环状围绕细胞核排列;**E:**AEC-II 在 *S. p* 作用下 Lb 的变化。Lb 内板层小体数量减少,密度减低,呈“空泡”样改变。

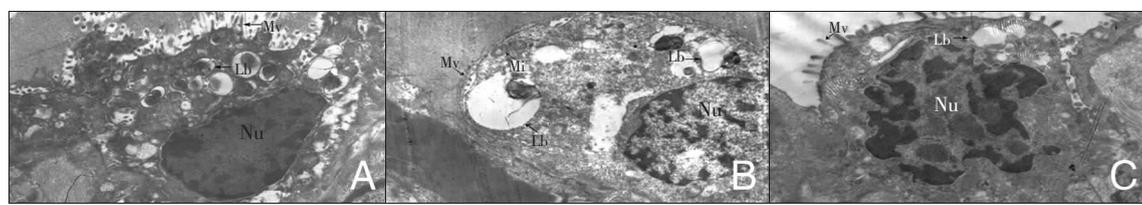


图2 患儿肺组织 AEC-II 超微结构(电镜,×8400) **A:**PNP 患儿正常肺组织。Mv 排列紧密,细胞质内可见较多 Lb,多数 Lb 内容物较饱满,Nu 边界清晰,染色质分布均匀;**B:***S. p* 感染后 AEC-II Lb 超微结构的变化。Mv 脱落,Lb 数量减少,体积增大,部分呈“空泡”样改变,Nu 染色质浓缩;**C:***S. p* 感染后 AEC-II 细胞核的变化。Nu 体积增大,染色质聚集成高密度团块,核膜曲折凹陷,核边界不清。注:Mv 微绒毛;Lb 板层小体;Nu 细胞核;Mi 线粒体。

3 讨论

S. p 侵入机体导致肺炎发生主要有直接经呼吸道侵袭和经其他途径入血液传播两种方式,儿童主要以前者为多。作为肺组织功能细胞的 AEC-II 不仅在维持正常肺脏功能和宿主局部非特异性免疫方面起着重要作用,且对于 AEC-I 的损伤与修复起着重要作用^[10]。

S. p 进入肺泡腔后,很快被肺泡腔内巨噬细胞 (Ma) 所识别,Ma 依靠在分布于肺泡上皮上的表面活性物质滑动向 *S. p* 聚集。当病原微生物被吸入后,肺泡 Ma 在数小时内将自身数量增加数倍,并发挥其强大的吞噬功能^[14]。

AEC-II 合成和分泌的肺表面活性蛋白 A 和 D (SP-A,SP-D) 具有趋化作用、调理吞噬作用和促杀菌作用^[15]。SP-A 和 SP-D 可以与 *S. p* 结合,并以

Ca^{2+} 依赖的方式增强中性粒细胞、肺泡 Ma 等对 *S. p* 的摄取。SP-A 和 SP-D 可使 Ma 生产大量超氧自由基、NO,促进 Ma 的杀菌作用。*S. p* 被 Ma 吞噬后,在细胞内形成吞噬溶酶体(Pl),经过溶菌酶、过氧化物酶等杀死,经蛋白酶、多糖酶等降解。最后不能消化的菌体残渣被排到 Ma 外。

线粒体和板层小体在 *S. p* 感染的 AEC-II 的系列变化中具有特征性改变(图 1C)。线粒体对各种损伤最为敏感,线粒体数量的增加是对细胞损伤的适应性反应或细胞功能升高的表现。AEC-II 损伤时最常见的改变为线粒体肿大。根据受累部位可分为基质型肿胀和嵴型肿胀两种类型,前者常见。基质型肿胀时线粒体变大变圆,基质变浅、嵴变短变少甚至消失。在极度肿胀时,线粒体可转化为小空泡状结构。此型肿胀为细胞水肿的部分改变。线粒体肿胀可由缺氧、微生物毒素、各种毒物、射线以及渗透压改变等多种因素引起。轻度肿大有时可能为其

功能升高的表现,较明显的肿胀则为细胞受损的表现。只要损伤不过重、损伤因子的作用不过长,肿胀仍可恢复。线粒体结构的改变是 *S. p* 作用下 AEC-II 内细胞器 线粒体变化的第三个特征。线粒体 嵴是能量代谢的明显指征。在急性细胞损伤时(大多为中毒或缺氧),线粒体的嵴被破坏,以致 线粒体几乎不再能形成新的嵴。当线粒体内出现高密度电子致密物时,乃线粒体成分崩解的产物(脂质和蛋白质),被视为线粒体不可复性损伤的表现,常见于细胞趋于坏死时出现。以上线粒体的变化,一方面是 AEC-II 损伤在细胞器层面的反应,另一方面也是机体在细胞水平代偿的一种方式。线粒体通过自身调节变化,为 AEC-II 合成表面活性蛋白提供大量能量。从图 1A、图 1E、图 2A、图 2B 可以看出,储存 SP-A 的板层小体在 *S. p* 作用下的系列变化。在线粒体提供能量的前提下,AEC-II 合成和储存了大量的 SP-A 于板层小体内,致使板层小体数量增多,体积增大,以容纳大量合成的 SP-A。板层小体呈“指环状”绕核排列^[16]。随着病情的进展,大量的 SP-A 被排空,致使板层小体呈“空泡”样变性,并产生“巨大的”板层小体^[17]。当失代偿时,板层小体数量开始减少,崩解、破溃,胞质内残留板层小体碎片^[18]。由此可见,AEC-II 中线粒体和板层小体等细胞器特征性变化构成了 *S. p* 作用下肺组织功能细胞中细胞质变化的核心,反映了 AEC-II 细胞能量代谢障碍和 SP-A 生理功能与防御功能的异常。

作为 AEC-II 重要组成部分的细胞核也发生了显著变化。在 *S. p* 作用下,AEC-II 细胞核中染色体在核浆内聚集成致密浓染的大小不等的团块状,染色质逐渐边集于核膜内层(即“染色质边集”),形成较大的高电子密度的染色质团块,核膜起初尚保持完整,以后乃在多处发生断裂,核逐渐变小,最后裂解为若干致密浓染的碎片(图 2C),实质上就是“核碎裂”。细胞核结构的改变在细胞损伤过程中的重要表征之一是核的改变,主要表现为核膜和染色质的改变。染色质边集、核浓缩、核碎裂、核溶解等核的结构改变为核和细胞不可复性损伤的标志,提示活体内细胞死亡(坏死)。

AEC-II 是肺组织肺泡上皮细胞的重要组成部分,AEC-II 超微结构的变化是 AEC-II 损伤和坏死的基础与前提。AEC-II 的损伤和坏死导致区域性“肺生理功能”障碍和防御功能下降,影响 AEC-II 对由 *S. p* 和炎症介质、细胞因子等造成的 AEC-I 损伤的修复^[10]。由此看来,AEC-II 的损伤与坏死在 *S. p* 感染后肺组织坏死过程中起着重要作用。因此,

在使用抗生素治疗 PNP 的同时,积极预防 AEC-II 坏死是临床治疗 PNP 过程中不可忽视的问题。

[参 考 文 献]

- [1] Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbell H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia[J]. Bull World Health Organ, 2008, 86(5):408-416.
- [2] Shibuya K, Fat DM. Background on Pneumonia[M]//Wardlaw T, Johansson EW, Hodge M. Pneumonia: The forgotten killer of children. UNICEF/WHO, 2006; 4-7.
- [3] Sung H, Shin HB, Kim MN, Lee K, Kim EC, Song W, et al. Vancomycin-tolerant streptococcus pneumoniae in Korea[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(10): 3524-3528.
- [4] 王传清,薛建昌,张泓,李万华,徐英春,孙宏莉,等. 2007 年全国 CHINET 链球菌属分布及耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2009,9(3):180-184.
- [5] 张在亭,刘恩梅,刘岚,谢晓虹,陈沅,黄英,等. 肺炎链球菌临床分离株耐药性与耐药机制研究[J]. 中国实用儿科杂志,2008,23(2): 136-138.
- [6] 王传清,王爱敏,张颖华,赵根明,王岱明. 呼吸道感染患儿肺炎链球菌血清分型及耐药性[J]. 中国抗感染化疗杂志,2002,2(4):180-220.
- [7] Sawicki GS, Lu FL, Valim C, Cleveland RH, Colin AA. Necrotizing pneumonia is an increasingly detected complication of pneumonia in children[J]. Eur Respir J, 2008, 31(6): 1285-1291.
- [8] Bender JM, Ampofo K, Korgenski K, Daly J, Pavia AT, Mason EO, et al. pneumococcal necrotizing pneumonia in utah: does serotype matter? [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(9): 1346-1352.
- [9] Rubins JB, Duane PG, Clawson D, Charboneau D, Young J, Niewoehner DE. Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells[J]. Infect Immun, 1993, 61(4): 1352-1358.
- [10] Rhodes GC, Tapsall JW, Lykke AW. Alveolar epithelial responses in experimental streptococcal pneumonia[J]. J Pathol, 1989, 157(4): 347-357.
- [11] Henrichsen J. Six newly recognized types of Streptococcus pneumoniae[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(10): 2759-2762.
- [12] Hsieh YC, Tsao PN, Chen CL, Lin TL, Lee WS, Shao PL, et al. Establishment of a young mouse model and identification of an allelic variation of zmpB in complicated pneumonia caused by Streptococcus pneumoniae[J]. Crit Care med, 2008, 36(4): 1248-1255.
- [13] 舒林华,魏克伦,薛辛东,韩晓华,尚云晓,蔡栩栩,等. 地塞米松对脂多糖诱导的急性肺损伤幼鼠肺泡 II 型上皮细胞超微结构的影响(英文)[J]. 中国当代儿志杂志,2007,9(6): 521-525.
- [14] 钟定. 巨噬细胞[M]//施煥中,林江涛. 肺脏免疫学及免疫相关性疾病. 北京:人民卫生出版社,2006: 100-103.
- [15] Sorensen GL, Husby S, Holmskov U. Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease[J]. Immunobiology, 2007, 212(4-5): 381-416.
- [16] 舒林华,魏克伦,尚云晓,吴红敏,李娟,韩晓华,等. 急性肺损伤幼鼠肺泡 II 型上皮细胞和 SP-A 变化相关性的研究[J]. 中国当代儿科杂志,2008,10(4): 504-508.
- [17] Fehrenbach H, Brasch F, Uhlig S, Weisser M, Stamme C, Wendel A, et al. Early alterations in intracellular and alveolar surfactant of the rat lung in response to endotoxin [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157(5 Pt 1):1630-1639.
- [18] 舒林华,薛辛东,舒林宏,刘春峰,吴红敏,韩晓华,等. 脂多糖诱导的急性肺损伤幼鼠肺泡 II 型上皮细胞超微结构研究(英文)[J]. 国际儿科学杂志,2007,34(3): 166-168.

(本文编辑:王 霞)