

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

綠膿桿菌外毒素 A 誘發大鼠腹腔巨噬細胞質內顆粒組成成份分析及其產生機制的探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-377-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學獸醫學系暨研究所

計畫主持人：龐飛

計畫參與人員：龐飛、黃彥智、秦紹儒

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 13 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：綠膿桿菌外毒素 A 誘發大鼠腹腔巨噬細胞質內顆粒組成成份分析及其產生機制的探討

Content analysis and mechanism of formation of the cytoplasmic granules induced by exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* in rat peritoneal macrophages

計畫編號：NSC 91-2313-B-002-377

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：龐飛 國立臺灣大學獸醫學系

摘要

綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)為常見的機緣性病原,對人和動物均有致病性及免疫干擾作用,其致病機制十分複雜,目前已有多種成份被證實具有致病或影響免疫力的作用。外毒素 A (Exotoxin A, ETA) 為其產生最多的有毒物質,與致病及免疫干擾有關。小鼠腹腔注射之 LD₅₀ 為 0.2 μg,對宿主細胞之主要致害是抑制其蛋白質之合成。巨噬細胞是炎症反應及免疫系統中的重要成員,有關 ETA 對巨噬細胞影響的資料極為有限,為了對 ETA 所導致的免疫干擾作用有更完整的認識,而以大鼠腹腔巨噬細胞(RPM)為對象,針對 ETA 的可能致害及作用機制進行探討。本研究室之前已發現 ETA 在 50-100 ng/ml 高劑量下會導致 RPM 的壞死及凋亡,但在 10 ng/ml 低劑量下則出現偽足先收縮再回復,細胞質內出現大量大小不一的顆粒,穿透式電顯檢查初步判定為膨大的 RER。由於這些質內顆粒對 hemocolor 和 Alcian blue 均呈陽性,對 OsO₄ oil red 及 Sudan III 卻皆為陰性,而在顆粒形成前 RPM 的 RNA 及蛋白質合成能力有明顯的短暫回升,因此判定其成份應屬醣蛋白。文獻指出 ETA 可誘發小鼠腹腔巨噬細胞分泌 IL-1,經分析 RPM 培養上清液及細胞萃取物,初步顯示在細胞萃取物中具 IL-1 活性,但上清液中則無。為進一步探討這些質內顆粒是否含有 IL-1 及其種

陽性反應,但對 IL-1β IL-1Ra IL-6 或 TNF-α 不是沒有反應就是反應極弱。ELISA 及活性檢測結果顯示,經 ETA 處理的 RPM,其細胞萃取物中雖含有少量的 IL-1α IL-6 及 MCP-1 但無 IL-1β、IL-8 及 TNF-α,且僅有極低的 IL-1 活性;其上清液中亦無法偵測到 IL-1α 和 IL-1β 及其活性,而僅有少量的 IL-6、IL-8、TNF-α 及含量稍多的 MCP-1。反之,在 LPS 處理的 RPM,其細胞萃取物及上清液中均有 IL-1 活性及 IL-1α 和 IL-1β 的存在,但以 IL-1β 為主;此外,在其上清液中尚有相當大量的 IL-6、IL-8、TNF-α 及 MCP-1。當以 LPS 刺激曾接受 ETA 處理過的 RPM,無論在其上清液或細胞萃取物中均含有大量的 IL-1α、IL-6、IL-8、TNF-α 及 MCP-1,但獨缺 IL-1β,而 IL-1 的活性亦明顯提升。另免疫螢光染色亦發現,ETA 處理的 RPM 其 F-actin 的量及分佈均明顯異於正常。因此,ETA 不僅會造成 RPM 的死亡,也會選擇性的誘發富含低活性 IL-1α 前驅物的質內顆粒產生,而此等質內顆粒的形成可能和細胞骨架受損有關;此低活性的 IL-1α 前驅物可藉 LPS 的協同作用而轉為成熟具生物活性並能分泌至細胞外。由於巨噬細胞在炎症及免疫反應中均扮演著重要的角色,因此推測 ETA 對巨噬細胞所產生的各種干擾均會影響宿主整體防禦體系的正常運作。

類、顆粒內是否亦含有其他的細胞激素及質內顆粒形成的可能機制，因此以免疫螢光和免疫金染色、ELISA 及生物活性測定，檢測經 ETA 誘發產生的 RPM 質內顆粒中是否含 IL-1，屬 IL-1 α 、IL-1 β 及 / 或 IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist)，是否有其他的細胞激素及生物活性；並以免疫螢光染色探討質內顆粒的形成是否因細胞骨架受損所致；由於先導實驗發現細胞萃取物中 IL-1 活性很低，因此亦探討 lipopolysaccharide (LPS) 是否對 ETA 處理過的 RPM 功能恢復，具協同刺激的作用，特別是在細胞激素產生能力部分。免疫螢光染色結果顯示，這些質內顆粒有很強的 IL-1 α

previous study has shown that ETA at 50-100 ng/ml could cause necrosis and apoptosis in rat peritoneal macrophages (RPM). However, ETA at 10 ng/ml induced a reversible pseudopodia contraction and formation of cytoplasmic granules due to dilatation of rough endoplasmic was hemocolor and Alcian blue positive but negative for OsO₄, oil red, and Sudan III. When compared at the level of per viable cell, the RNA and protein synthesis became enhanced at 10-100 ng/ml ETA after 12-24 h post-incubation (HPI). ETA could induce murine peritoneal macrophages to secrete IL-1. Our preliminary result of IL-1 bioassay also showed that there was IL-1 activity in cell lysate but not in culture supernatant of ETA-treated RPM. To further characterize the content of the dilated RER and its underlying mechanism, the possible involvement of IL-1 α , IL-1 β , IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), and/or other cytokines in the cytoplasmic glycoprotein accumulation; whether the accumulated cytokine(s) possessing normal function; and the role of cytoskeleton-related secretion dysfunction in granular formation were evaluated in

關鍵詞：綠膿桿菌、外毒素 A、質內顆粒、細胞激素、腹腔巨噬細胞、大鼠

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a common opportunistic pathogen. Exotoxin A (ETA) is the major determining factor among all of the substances secreted by *P. aeruginosa* associated with its virulence. It inhibits mammalian cell protein synthesis and can also influence the host immune function. The LD₅₀ of ETA in mice following intraperitoneal injection is approximately 0.2 μ g. Macrophages are essential for host defense and immune regulation. However, information regarding the effects of ETA on macrophages is rather limited. Our macrophages play an important role in both inflammation and immune regulation, it is reasonable to speculate that these ETA-induced effects on macrophages may certainly interfere with the normal operation of the host defense system.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, exotoxin A, cytoplasmic granule, cytokine, peritoneal macrophage, rat

計畫緣由與目的

綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)為常見的機緣性病原，在環境中分佈極為廣泛。它不僅會感染人和動物造成疾病，尤其是在患有代謝性、免疫性、惡質性疾病或燒傷時感受性更高，也會對人和動物的免疫力造成干擾。該菌的作用機制十分複雜，目前已有多種成份被證實具有致病或影響免疫力的作用。外毒素 A (Exotoxin A, ETA)為綠膿桿菌產生最多的有毒物質，其對小鼠腹腔注射之百分之五十致死劑量為 0.2 μ g，對宿主細胞之主要致害是抑制其蛋白質之合成。在免疫學方面，Holt 和 Misfeldt (1984)發現 10⁻⁶-10⁻² ng 低劑量 ETA 可抑制正常

ETA-treated RPM by immunofluorescent stain, bioassay, and ELISA. The effects of LPS on the recovery of ETA-treated RPM functions, particularly on cytokine production, were also studied. The indirect immunofluorescence staining for IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, and TNF- α revealed that the granules were strongly positive for IL-1 α but weak or no signals for IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, and TNF- α . The results of ELISA and IL-1 bioassay of ETA-treated RPM showed that there was only a small amount of IL-1 α , IL-6, and MCP-1 and minimal IL-1 bioactivity, but no detectable IL-1 β , IL-8, and TNF- α in the cell lysate; no detectable IL-1 α and IL-1 β , but a small amount of IL-6, IL-8, TNF- α and relatively more MCP-1 in the supernatant. On the contrary, evident IL-1 bioactivity and both IL-1 α and IL-1 β were detected in the cell lysate and supernatant of the LPS-treated RPM with IL-1 β predominant besides a relatively large amount of IL-6, IL-8, TNF- α , and MCP-1 in the supernatant. However, when the ETA-treated RPM were further stimulated with LPS, a large amount of bioactive IL-1 was produced; its cytotoxicity to A375.S2 cells could be neutralized by the addition of anti-rat IL-1 α antibody but not by anti-rat IL-1 β , anti-rat TNF- α , and anti-ETA antibodies. The results indicated that ETA could not only cause death in RPM but also selectively induce the formation of low-bioactivity IL-1 α precursor-rich cytoplasmic granules in RPM and the IL-1 α precursor could become mature and secreted with the subsequent help of LPS. Since TNF 產量 (Staugas et al., 1992)。巨噬細胞是炎症反應及免疫系統中的重要成員, 有關 ETA 對巨噬細胞影響的資料極為有限, 其中更缺乏小鼠的資料, 為了對 ETA 所導致的免疫干擾作用

小鼠對 dinitrophenylated keyhole limpet hemocyanin (DNP-KLH) 所誘發之 T-dependent 免疫反應及對 trinitrophenylated-Ficoll (TNP-Ficoll) 所誘發之 T-independent 免疫反應, 但 10-100 ng 高劑量 ETA 卻增強上述兩種免疫反應; 若用 anti-Thy1.2 抗血清去除 T 細胞, 則上述低劑量 ETA 抑制免疫反應現象會消失; 在無正常功能 T 細胞的裸鼠, 低劑量 ETA 反而增加其免疫反應, 且前述高劑量 ETA 增強免疫反應分泌 TNF 和 lymphotoxin, 而降低其免疫反應 (Staugas et al., 1992)。此外, 50-100 ng ETA 可明顯地抑制小鼠多型核白血球 (PMN) 吞噬綠膿桿菌的能力, 且造成 PMN 數量明顯的減少 (Miyazaki et al., 1995)。ETA 有品系感受性的差異, 如 DBA/2J 小鼠較 C57BL/6J 小鼠有耐受性, 而此差異可能是由於 DBA/2J 小鼠能產生較大量的抗體所致 (Preston et al., 1991)。巨噬細胞是宿主對入侵病原防禦的第一道防線, 且又是免疫系統中的重要成員, 然而有關 ETA 對巨噬細胞所可能造成影響的資料卻極為有限。Pollack 及 Anderson (1978) 發現 30-120 ng/ml ETA 對人類巨噬細胞具有毒殺作用, 並會抑制其 DNA 的合成和吞菌力。在 500-1000 ng/ml 高劑量下, ETA 會抑制小鼠腹腔巨噬細胞蛋白質的合成 (Weber et al., 1982)。Misfeldt 等 (1990) 發現, 50 ng/ml 的低劑量 ETA 可以刺激小鼠腹腔巨噬細胞分泌細胞間素-1 (interleukin-1, IL-1); 相反地, 100 ng/ml ETA 會抑制人類貼附性血液單核球之 IL-1 及

處理組, 於攻毒後 48 小時其移行力卻有短暫的提升。組織化學染色結果顯示, 這些質內顆粒對 hemocolor 和 Alcian blue 均呈陽性, 對 OsO₄, oil red 及 Sudan III 卻皆為陰性, 由於在

有更完整的認識，而以大鼠腹腔巨噬細胞 (RPM)為對象，針對 ETA 的可能致害及作用機制進行探討。本研究室先前曾將 RPM 與 0, 1, 10, 50 及 100 ng/ml ETA 於體外共同培養 3 至 60 小時後，分別檢測其細胞存活率、MTT 代謝率、大分子 (含 DNA、RNA 及蛋白質) 合成能力、細胞形態、吞菌力、殺菌力、移行能力，以及自由基產生能力的變化情形。以 trypan blue 色素排除法進行檢測，發現 RPM 的細胞存活率隨 ETA 劑量和培養時間的增加而下降。當就總量進行比較時，類似的下降情形也出現於 MTT 代謝率和 DNA、RNA 及蛋白質合成能力，雖然在 1-50 ng/ml ETA 處理組於攻毒 24-36 小時間，於 RNA 及蛋白質合成能力上有短暫的提升現象。然而就存活細胞的平均值而言，在以 10-100 ng/ml 劑量攻毒 12-24 小時以後，其 MTT 代謝率和 DNA、RNA 及蛋白質合成能力均呈現較對照組顯著為高的現象。於形態學上，在以 50 或 100 ng/ml 劑量攻毒 24 小時之後，大多數的 RPM 均已呈現壞死或凋亡 (apoptosis)。在以 10 ng/ml 攻毒 24 小時後細胞存活率雖亦明顯下降，但在存活細胞的質內出現大量大小不一的顆粒。經穿透式電顯檢查，發現這些顆粒是源自於粗糙內質網的擴張與融合而成的泡狀物，其內並蓄積有具高電子密度的物質，而有些細胞因內容物的排出呈空洞狀；此外偽足亦出現可逆性的塌陷和重疊。雖然 1 ng/ml ETA 對 RPM 並無明顯的形態學影響，但其蛋白質合成能力仍是隨 ETA 攻毒時間的延長而明顯的受到抑制。在吞菌力及殺菌力方面，ETA 處理組具吞菌力的細胞數及所吞的念珠菌芽胞總數均隨攻毒劑量的增加及作用時間的延長而有明顯的減少，其中以 50 及 100 ng/ml ETA 處理組最為顯著，且在攻毒後 12-24 小時間幾乎已完全喪失吞菌力，殺菌力的喪失似乎較吞菌力稍早些，兩組於攻毒 12 小時後殺菌力即已完全喪失；就存活細胞的實際吞菌力及殺菌力而言，除了在 100 ng/ml ETA 處理

這些質內顆粒形成前 RPM 的 RNA 及蛋白質合成能力均有明顯的短暫回升，因此判定其成份應屬醣蛋白。文獻指出，ETA 可誘發小鼠腹腔巨噬細胞分泌 IL-1，經分析 ETA 處理的 RPM 培養上清液及其細胞萃取物，初步顯示在細胞萃取物中具 IL-1 活性，但上清液中則無。為進一步探討這些質內顆粒是否亦含有 IL-1、其所含的 IL-1 種類為何、是否還有其他的細胞激素參與，以及質內顆粒形成的可能機制，在本研究中，藉由免疫螢光染色、ELISA 及生物活性檢測等方法探討(1)經 ETA 誘發產生的 RPM 質內顆粒中是否含 IL-1，屬 IL-1 α 、IL-1 β 及/或 IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist)，是否有其他的細胞激素及生物活性；(2)細胞骨架受損與質內顆粒形成的可能關係；(3) lipopolysaccharide (LPS)是否對 ETA 處理過的 RPM 功能恢復，特別是細胞激素產生能力部分，具協同刺激的作用。

結果與討論

先前的實驗發現，RPM 與 10 ng/ml ETA 共同培養 36 至 48 小時後，在光學顯微鏡下即可見其細胞質內有大量嗜伊紅性、具醣蛋白組織化學染色特性的顆粒產生，經由穿透式電顯的觀察，此質內顆粒係因粗糙內質網的擴大及融合而形成。本實驗目的在針對該質內顆粒的成份及其功能作進一步的分析。首先，選用數種巨噬細胞所分泌的主要細胞素，含 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)、IL-6 及 TNF- α ，進行免疫染色，包括免疫螢光染色以及前包埋、後包埋及銀增強超小金粒等免疫電顯技術，以確認該等顆粒的組成及其在細胞內的分佈位置。實驗結果顯示，雖然有散發的點狀 IL-1ra 及 IL-6 陽性反應出現於某些細胞的質內顆粒中，但所有的質內顆粒中均呈現全面性的強 IL-1 α 陽性螢光反應，此證明質內顆粒的主要成份應為 IL-1 α 。另以 ELISA 檢測法來定量 RPM 分泌於培養液中 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、

組於攻毒初期其吞菌力在殺菌力受影響前已下降外，於各劑量及作用時間下，殺菌力普遍較吞菌力所受的影響為明顯。在移行力方面，具通過 5 μm 孔徑 transwell 培養盤能力的細胞數隨著 ETA 劑量的增加及作用時間的延長而逐漸減少，其中亦以 50 及 100 ng/ml ETA 處理組的降幅最大，於攻毒後 3 小時已大幅降低，至 12 小時則完全喪失；反之，在 1 ng/ml ETA

IL-8、TNF- α 、MCP-1 含量及存在細胞內的 IL-1 α 含量，並用對 IL-1 具感受性之 A375.S2 細胞株來分別測定細胞內、外 IL-1 α 之生物活性。由於 ETA 可誘發 RPM 產生大量富含醣蛋白之質內顆粒，因此選擇 10 ng/ml 劑量及 36 至 48 小時的作用時間，來偵測細胞素的產生。於培養 36 至 48 小時的培養液對照組能自發性分泌大量的 MCP-1 及少量 IL-8。相對地，以 10 ng/ml ETA

攻毒相同時間後，發現 MCP-1 的產生受到明顯地抑制，IL-8 的產生量亦減少，卻促使 IL-6 及 TNF- α 短暫的增加。至於 IL-1 α 及 β ，於上清液內並無 IL-1 α/β 的存在，細胞內容物中亦僅含少許的 IL-1 α 活性。當再用 lipopolysaccharide (LPS) 進行刺激，結果上述存活的細胞可產生大量並具有活性之 IL-1；經以抗大鼠 IL-1 α 抗體進行中和作用後，可明顯降低其對 A375.S2 細胞株的毒殺作用，而抗大鼠 IL-1 β 或 TNF- α 抗體以及抗 ETA 抗體的添加則效果不明顯。根據此結果，推測質內顆粒可能主要含有不具活性的 IL-1 α 前驅物。為與 IL-1 α 質內顆粒的形成作比較，而以 ELISA 分析巨噬細胞所產生的主要細胞素，包括 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 及 MCP-1。在先前實驗中發現，培養 36 至 48 小時未經刺激 RPM 能自發性分泌大量 MCP-1 及少量 IL-8，也有少量 IL-6 存在細胞內；反之，10 ng/ml ETA 處理組卻出現 MCP-1 和 IL-8 分泌量的下降，及短暫的 IL-6 和 TNF- α 分泌量的提升，同時在培養上清液中均測不到 IL-1 α/β 。此外，於本實驗中亦針對細胞內容物成份進行分析，結果發現 10 ng/ml ETA 處理組的 IL-6 含量增加，但卻僅有少量的 IL-1 α 存在。在單純的 LPS 刺激陽性對照組，除了 MCP-1 分泌量較培養液對照組少外，其他多種細胞素的分泌量皆較培養液對照組及 ETA 處理組為多，其中 IL-1 β 大量的聚集在細胞內僅少量分泌於細胞外，IL-1 α 與 IL-1 β 類似但含量較少。反之，若將經 ETA 處理 36 小時後產生大型質內顆粒之 RPM 以 LPS 再行刺激，除了 IL-1 α 的分泌量會增加外，TNF- α 和 IL-8 的分泌量也大增，同時 MCP-1 的分泌量也為之提升。上述細胞素的分泌總量除較 ETA 攻毒組多外，甚至比 LPS 陽性對照組還多，但原來單純 LPS 處理組分泌量較多的 IL-1 β 和 IL-6 反而減少。此外，更令人驚訝的是細胞內容物中可偵測到大量的 IL-1 α ，同時也有較 LPS 處理組稍高的 TNF- α 、IL-6、IL-8 及 MCP-1 含量。以上結果顯示，先前實驗所發現由 ETA 誘發產生的大型

在本研究中，運用多種免疫螢光和免疫金染色、ELISA 及生物活性測定等方法，對 ETA 所誘發 RPM 產生的細胞質內顆粒的內容物成分進行分析，並針對其可能的產生機制作了初步的探討。在現有的文獻報導中，有關 ETA 對巨噬細胞影響的資料極為有限，本研究不僅提供了較為完整的可能影響資料，更發現了過去所未曾被報導過的現象，即 ETA 可誘發 RPM 產生大量的 IL-1 α ，而此 IL-1 α 可能為不具活性的 IL-1 α 前驅物，並因 ETA 會造成細胞骨幹損傷，導致在其細胞質內堆積及引發細胞質內顆粒的形成。雖然此現象的產生機制仍有待釐清，但在文獻中尚未看到有類似且完整的研究報告，而本研究室先前及本計畫中所獲得的部分結果，已經整理並發表於 Cellular Immunology (參考文獻 6)，目前正整理另一部分結果中，相信該成果亦將可發表於相關的國際性學術雜誌。

參考文獻

1. 趙曉年,何憲武,賴美淑,謝維銓.1985. 綠膿桿菌之血清型分佈--院內感染與非院內感染菌株之比較. 中華微免雜誌.18:37-43.
2. Cusumano, V., Tufano, M.A., Mancuso, G., Carbone, M., Rossano, F., Fera, M.T., Ciliberti, F.A., Ruocco, E., Merendino, R.A., and Teti, G. 1997. Porins of *Pseudomonas aeruginosa* induce release of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human leukocytes. Infect. Immun. 65: 1683-1687.
3. Grigis, A., Goglio, A., Parea, M., Gneccchi, F., Minetti, B., and Barbui, T. 1993. Nosocomial outbreak of severe *Pseudomonas aeruginosa* infection in haematological patients. Euro. J. Epidemiol. 9:390-395.
4. Grundmann, H., Kropec, A., Hartung, D., Berner, R., and Daschner, F. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: reservoirs and ecology of the nosocomial pathogen. J. Infect.

顯示, 先前實驗所發現由 ETA 誘發產生的大型質內顆粒的醣蛋白成份應主要是 IL-1 α , 且為不具活性的 IL-1 α 前驅物; ETA 除會選擇性的刺激 IL-1 α 的產生外, 亦會影響多種 RPM 細胞素的產生; LPS 除可協助或抑制經 ETA 處理後存活的 RPM 多種細胞素的分泌, 並會促使 IL-1 α 成熟而具有生物活性。由於巨噬細胞在炎症及免疫反應中均扮演著重要的角色, 因此推測 ETA 對巨噬細胞所產生的各種干擾應, 均會直接或間接的影響宿主整體防禦體系的正常運作。

計畫成果自評

- elongation factor 2 in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* 15:138-149.
8. Kristin, A., Hogquist, A., Unanue, E.R., and Chaplin, D.D. 1991. Release of IL-1 from mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* 147:2181-2186.
9. Liu, P.V. 1966. The roles of various fractions of *Pseudomonas aeruginosa* in its *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 31: 387-392.
10. Misfeldt, M.L., Legard, P.K., Howell, S.E., Fornella, M.H., and LeGrand, R.D. 1990. Induction of interleukin-1 from murine peritoneal macrophages by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Infect. Immun.* 58:978-982.
11. Miyazaki, K., Matsumoto, T., Tateda, K., Ohno, Y., and Yamaguchi, K. 1995. Role of exotoxin A in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *J. Med. Microbiol.* 43:169-175.
12. Pollack, M. and Anderson, S.E. 1978. Toxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A for human macrophages. *Infect. Immun.* 19:1092-1096.
13. Preston, M.J., Berk, J.M., Hazlett, L.D., and

the nosocomial pathogen. *J. Infect. Dis.* 168:943-947.

5. Holt, P.S. and Misfeldt, L. 1984. Alteration of murine immune response by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Infect. Immun.* 45: 227-233.
6. Huang, Y-T., Jeng, C.R., Cheng, C.-H., Chueh, L.-L., Liu, J. J., and Pang, V.F. 2003. Morphological and immunological evidence of a unique selective production and endoplasmic reticular accumulation of interleukin-1 α in rat peritoneal macrophages induced by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Cell. Immunol.* 221: 143-156.
7. Iglewski, B.H., Liu, P.V., and Kabat, D. 1977. Mechanism of action *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian

- Berk, R.S. 1991. Serum antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* antigens during corneal infection. *Infect. Immun.* 59:1984-1990.
14. Staugas, R.E., Harvey, D.P., and Ferrante, A. 1992. Induction of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) by *Pseudomonas aeruginosa* and exotoxin A-induced suppression of lymphoproliferation and TNF, lymphotoxin, gamma interferon, and IL-1 production in human leukocytes. *Infect. Immun.* 60:3162-3168.
15. Ulmer, A.J., Pryjma, J., Tarnok, Z., Ernst, M., and Flad, H.D. 1990. Inhibitory and stimulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanine on human T and B lymphocytes and human monocytes. *Infect. Immun.* 58:808-815.
16. Vidal, D.R., Garrone, P., and Banchereau, J. 1993. Immunosuppressive effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on human B-lymphocytes. *Toxicon* 31:27-34.
17. Weber, B., Nickol, M.M., Jagger, K.S., and Saelinger, G.B. 1982. Interaction of *Pseudomonas* exoproducts with phagocytic cells. *Can. J. Microbiol.* 28:679-685.

