

内毒素 基础与临床

张顺财 主编



科学出版社

www.sciencep.com

内 毒 素 基 础 与 临 床

张顺财 主编

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

内毒素与临床的关系十分密切,越来越多的临床医师已开始关注疾病时内毒素血症对疾病的发展、转归及预后的影响。本书对内毒素的来源、结构、生物学效应、检测方法、作用机制及内毒素与临床各科疾病特别是肝病之间的关系,以及目前的治疗手段进行了系统的阐述。本书具有资料新、知识面广及系统性强的特点,对临床诊断及治疗具有重要的指导意义,适合临床各科医生参考。

图书在版编目(CIP)数据

内毒素基础与临床/张顺财主编.-北京:科学出版社,2003.1

ISBN 7-03-010182-0

I. 内… II. 张… III. 内毒素-研究 IV. R996

中国版本图书馆CIP数据核字(2002)第010133号

责任编辑:王 晖 黄 敏/责任校对:潘瑞琳

责任印制:刘士平/封面设计:卢秋红

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新 蕾 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2003年1月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2003年1月第一次印刷 印张:28

印数:1—2 000 字数:646 000

定价:98.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈杨中〉)

编写人员名单

主 编 张顺财

编 者 (以姓氏笔画为序)

王伟光	石 虹	石碧坚	乐 凡
朱 蕾	任卫英	刘红春	刘建军
何永成	张顺财	范建高	周 康
胡世红	徐正婕	曹中伟	慰文石

前 言

内毒素是革兰阴性杆菌生长时释放或死亡时裂解出来的细胞壁脂多糖成分。体内外实验早已证明,内毒素具有耐热、耐酸碱等特性。内毒素进入机体后可引起发热、血管扩张、血管通透性增加、中性粒细胞增多、补体激活、机体血压下降等病理生理反应,严重时可导致弥散性血管内凝血及多器官功能衰竭。由于基础研究和临床研究的深入开展,人们对内毒素的结构、功能、作用机制等有了进一步的了解,临床上也发现许多疾病的发生、发展与内毒素关系密切。内毒素血症在临床上可涉及外科、内科、妇产科、儿科、神经科、急诊科等,但是与之关系较为密切的仍然是败血症、多器官功能衰竭、急性呼吸窘迫综合征、弥散性血管内凝血、肝病等。因此,积极开展内毒素的基础及临床研究,对于阐明这些疾病的发生机制并进而建立相应的治疗措施有着重要的意义。

尽管对内毒素的研究已开展数十年之久,但是,目前国内尚无一部完整的书籍来专门阐述内毒素的基础与临床的关系。近年来,随着人们对内毒素的作用机制及信号转导途径认识的不断深化,建立和发展了抗内毒素血症的多种战略,这为以后治疗内毒素血症提供了新的思路。

内毒素进入机体后,可直接对细胞的生物膜产生毒性,但更为重要的是通过单核-巨噬细胞介导的细胞毒性作用使机体产生多种炎症介质,从而影响细胞的代谢,最后导致细胞死亡,影响脏器功能和屏障功能的完整性。Toll样受体家族的阐明使内毒素的信号转导途径更为完善。一般认为,内毒素进入机体后,与脂多糖结合蛋白结合形成复合物,将脂多糖传递给单核-巨噬细胞膜上的CD14受体,并与Toll样受体4的具有亮氨酸富集重复体的结构域发生物理接触,使Toll样受体4构象发生改变,通过其胞质结构域募集细胞内髓系分化蛋白88(MyD88)和白细胞介素-1(IL-1)受体相关激酶发生自身磷酸化,引发酶系级联反应,最终激活NF- κ B等多个转录因子,合成和分泌大量细胞因子发挥作用。许多炎症介质参与内毒素的生物学效应,如TNF- α 、白细胞介素类、NO、补体、前列腺素类、血小板激活因子等。肠细菌及内毒素移位是内毒素血症的主要因素之一,也是多器官功能衰竭及肝病内毒素血症致死的重要原因。重视对肠细菌及内毒素移位的处理是减少外科手术及其他危重患者发生多器官功能衰竭,减少肝病患者病死率的重要手段。至今,对内毒素血症的治疗仍无特效措施,抗生素的应用虽然能够有效地控制细菌感染,但有增加内毒素血症的危险。内毒素抗体曾经被认为对内毒素血症的治疗有效,但是临床研究却证明其无效;其他措施包括抑制脂质A合成、阻断内毒素信号转导以减少细胞因子分泌,可能对内毒素血症的治疗有效,但仍需经过临床实践证实。

笔者均为消化科临床医师,长期以来特别重视内毒素与肝病之间的基础与临床研究,在临床实践中积累了丰富的经验并搜集了许多有价值的资料。今在前辈们的鼓励和支持下,将有用的资料编写成书,希望本书能够给医学本科生、研究生、各级基础研究者及临床医师提供有价值的参考。同时,本人也希望有更多的临床医师重视对内毒素的研究。

由于近年来对内毒素的基础研究进展较快,因此本书的内容主要侧重于基础研究,宗旨是为广大研究人员提供新的思路。

本书编写人员大部分为我院(复旦大学医学院附属中山医院)硕士、博士及副教授,虽然我们对内毒素基础知识的掌握不够全面,但是均有研究内毒素的基础及临床经验,且认真好学、思路敏捷,能够较快接受新理论、新知识。

本书的出版得到许多同志的支持和鼓励。首先要感谢我的导师,著名消化病学专家朱无难教授,是他带我走上对肝病及内毒素的研究道路,正是由于他的帮助,才使我在学术上有了较大的发展和成就。同时,还要感谢我院实验研究中心周康老师,他对我开展内毒素研究及本书的编写给予了许多具体的帮助。

本书的出版还得到我院消化科王吉耀教授、刘厚钰教授、张希德教授以及其他许多医师的支持,在此一并致谢。

本书编写者均为临床一线工作者,因此虽然倾注了大量心血,付出了辛劳,但是由于时间仓促、水平有限、经验不足,书中不足之处和错误在所难免,恳请各位专家批评指正。

张顺财

2001年3月

目 录

第1章 内毒素的结构与生物遗传学特征	1
第1节 内毒素的结构	1
第2节 脂多糖的生物合成及遗传学	6
第3节 脂多糖的生物学功能	13
第2章 内毒素与脂多糖结合蛋白	24
第1节 LBP 的化学结构	24
第2节 LBP 的合成和分布	24
第3节 LBP 的生物学功能	25
第3章 CD14 分子与内毒素	31
第1节 CD14 基因的特点	31
第2节 CD14 表达调控	33
第3节 CD14 释放与细胞内分布	34
第4节 CD14 的作用	34
第4章 CD11/CD18 与内毒素	41
第1节 整联蛋白的基因结构	41
第2节 整联蛋白的基因表达调控	42
第5章 内毒素与清道夫受体、衰变加速因子及膜外突蛋白	46
第1节 清道夫受体作为内毒素的受体	46
第2节 衰变加速因子	49
第3节 膜组织性外突蛋白	51
第6章 Toll 样受体	53
第1节 Toll 基因及其家族成员的结构特点	53
第2节 TLR 的生物学表现	55
第3节 TLR 在内毒素耐受中的作用及今后的研究方向	59
第7章 内毒素信号转导途径和调节	64
第1节 内毒素信号转导途径	64
第2节 信号分子	66
第3节 机体对LPS 信号转导的调节	68
第8章 内毒素与肿瘤坏死因子	76
第1节 TNF- α 的来源和结构	76
第2节 TNF- α 的产生和调节	77
第3节 TNF- α 的受体	78
第4节 TNF- α 的生物学作用	80

第9章 内毒素与白细胞介素-1	87
第1节 IL-1 α	87
第2节 IL-1 β 的特点	89
第3节 IL-1的产生及调节	89
第4节 IL-1的生物活性	93
第10章 内毒素与白细胞介素-6	97
第1节 IL-6的结构及调节	97
第2节 IL-6的受体及其信号转导	100
第3节 IL-6的生物学作用	101
第11章 内毒素与白细胞介素-10	104
第1节 IL-10的结构及调节	104
第2节 IL-10的受体和信号转导	106
第3节 IL-10的生物学作用	108
第12章 内毒素耐受的分子机制	115
第1节 内毒素信号转导	115
第2节 内毒素耐受的分子机制	116
第13章 内毒素血症与氧自由基	121
第1节 自由基的定义、种类及特性	121
第2节 氧自由基的产生	122
第3节 氧自由基的生成途径	125
第4节 自由基的生理功能	125
第5节 氧自由基的毒性作用	128
第6节 内毒素血症时氧自由基产生的证据	129
第7节 内毒素血症致氧自由基产生的机制	131
第14章 内毒素与补体	134
第1节 补体概况	134
第2节 内毒素与补体激活	137
第3节 补体水平与内毒素血症的预后	138
第4节 补体与免疫防御	138
第15章 内毒素与左旋精氨酸途径	141
第1节 血管内皮细胞松弛血管平滑肌因子	141
第2节 内毒素激活左旋精氨酸途径的早期证据	143
第3节 左旋精氨酸-一氧化氮途径在细菌脂多糖诱导缩血管反应的体内实验证据	143
第4节 脂多糖刺激左旋精氨酸途径的体外实验	145
第5节 脂多糖激活左旋精氨酸途径的试管内实验证据	146
第6节 左旋精氨酸-一氧化氮途径可能参与脂多糖减弱扩血管反应的过程	147
第7节 总结	147
第16章 内毒素与类二十烷酸	150
第1节 类二十烷酸	150

第2节	花生四烯酸的环氧化酶产物	150
第3节	花生四烯酸的脂氧化酶代谢产物	152
第4节	类二十烷酸与内毒素血症的病理生理	153
第5节	内毒素耐受与类二十烷酸	156
第17章	内毒素与血小板激活因子	160
第1节	血小板激活因子	160
第2节	内毒素与PAF	161
第3节	PAF受体拮抗剂的作用	166
第18章	内毒素与神经肽	171
第1节	神经肽	171
第2节	内毒素与神经肽	172
第19章	内毒素与蛋白水解酶	186
第1节	蛋白水解酶	186
第2节	内毒素与蛋白水解酶	187
第3节	小结	193
第20章	体内内毒素的解毒和清除	194
第1节	单核-吞噬细胞系统对内毒素的解毒和清除	194
第2节	血浆对内毒素的解毒和中和功能	199
第3节	杀菌/渗透增强蛋白在内毒素解毒中的作用	200
第21章	内毒素与凋亡	204
第1节	凋亡概述	204
第2节	凋亡的形态学特征	205
第3节	凋亡的生化改变	206
第4节	凋亡的相关基因	209
第5节	细胞凋亡的发生机制	211
第22章	肠细菌及内毒素转位	215
第1节	概述	215
第2节	肠道是人体最大的细菌及内毒素贮存场所	215
第3节	肠道的屏障功能	216
第4节	细菌及内毒素转位与临床的关系	218
第5节	实验性细菌及内毒素转位证据	219
第6节	细菌及内毒素转位机制	220
第7节	肝巨噬细胞及其他免疫功能作用	224
第23章	内毒素与中毒性休克	227
第1节	中毒性休克的发生率	227
第2节	中毒性休克的临床表现	228
第3节	内毒素与微循环障碍	230
第4节	内毒素与细胞代谢	238
第5节	参与内毒素休克的调理介质和异化激素	240

第24章 内毒素与多器官功能障碍综合征	245
第1节 MODS的发生率	245
第2节 病因	246
第3节 MODS的分期及分型	248
第4节 MODS时重要系统器官的功能改变	249
第5节 内毒素致MODS的机制	251
第6节 小结	260
第25章 内毒素对肝脏的损害	262
第1节 肝微循环障碍	262
第2节 代谢改变	264
第3节 内毒素对肝细胞的直接毒性作用	267
第4节 单核-巨噬细胞介导的肝损害作用	268
第26章 肝病时的内毒素血症及其后果	277
第1节 各种肝病的ETM发生率	277
第2节 肝病时ETM的发生机制	278
第3节 内毒素血症的后果	281
第27章 内毒素与脂肪肝	292
第1节 内毒素与酒精性肝病	292
第2节 内毒素与非酒精性脂肪肝	298
第28章 内毒素与肝纤维化	304
第1节 肝纤维化的基本过程	304
第2节 内毒素所致肝损害在肝纤维化中的作用	308
第3节 内毒素与肝纤维化的关系	309
第29章 内毒素与急性胰腺炎	312
第1节 内毒素对正常胰腺内分泌和外分泌功能的影响	312
第2节 内毒素与胰腺损伤	312
第3节 内毒素引起胰腺损伤的机制	313
第4节 内毒素与急性胰腺炎并发症	314
第5节 内毒素血症与急性胰腺炎的预后	316
第6节 急性胰腺炎时内毒素血症产生的机制	316
第7节 急性胰腺炎时内毒素血症的治疗	317
第30章 炎症性肠病与内毒素	325
第1节 内毒素参与了IBD的发生与发展	325
第2节 IBD时内毒素血症发生的机制	326
第3节 内毒素诱发肠道炎症和全身损伤的机制	326
第4节 IBD时内毒素的清除	331
第31章 内毒素与急性呼吸窘迫综合征	333
第1节 内毒素在ARDS发病中的地位	333
第2节 参与ARDS发病的效应细胞	334
第3节 参与急性肺损伤的介质	336

第4节 肺表面活性物质	340
第5节 一氧化氮的作用	341
第6节 信号转导机制	342
第32章 内毒素在肾脏疾病中的作用	345
第1节 内毒素对肾脏形态学的影响	345
第2节 内毒素对肾脏血流动力学的影响	346
第3节 内毒素对肾脏代谢的影响	347
第4节 内毒素对肾功能的影响	348
第5节 内毒素在尿毒症患者及血液净化技术中的作用	350
第6节 防治对策	351
第33章 内毒素血症与弥散性血管内凝血	353
第1节 血栓与止血的基础理论进展	353
第2节 DIC的基本病因及诱因	356
第3节 内毒素血症在DIC发病机制中的作用	357
第4节 DIC的临床表现	361
第5节 DIC的诊断条件	363
第6节 DIC的治疗原则	364
第34章 内毒素与中枢神经系统感染性疾病的关系	368
第1节 中枢神经系统感染与解剖的关系	368
第2节 产内毒素性病原导致的神经系统疾病	371
第35章 内毒素的体外清除	379
第1节 内毒素污染的重要意义	379
第2节 选择性清除内毒素的方法	382
第3节 结语	390
第36章 抗内毒素治疗战略	394
第1节 抗内毒素治疗的重要性	394
第2节 特异性抗内毒素战略	395
第3节 结论及展望	406
第37章 鲎与内毒素检测	409
第1节 概述	409
第2节 鲎血变形细胞裂解物的制备	410
第3节 中国鲎凝固蛋白原的分离提纯及其生化性质	413
第4节 国内外内毒素检测的发展概况	417
第5节 内毒素检测方法论	419
第6节 内毒素标准品的稀释	425
第7节 内毒素与制药工业	425
中文名词术语索引	430
英文缩略语索引	433

第1章 内毒素的结构与生物遗传学特征

早在20世纪初, Richard Pfeiffer 研究霍乱弧菌时,发现革兰阴性菌(Gram-negative bacillus ,GNB)中有一种相对不溶性的成分,能够引起发热、休克、器官损害等病理反应,因其毒性效应和性质与外毒素(exotoxin)存在显著差异,就用内毒素(endotoxin)这一术语来描述该物质。随后多年对革兰阴性菌外膜的超微结构技术和生物分析技术的研究证明内毒素是磷脂双分子层结构,细胞膜的外部主要有结构易变的两性分子所组成,即脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)。LPS是内毒素的主要成分。

第1节 内毒素的结构

LPS的毒性中心为脂质A(lipid A),而多糖部分仅有少许或者根本没有生物效应。内毒素和外毒素的区别主要表现在:内毒素具有对热稳定的特点,而外毒素对热不稳定,而且外毒素能够在生长培养基或在急性感染中的活菌中所释放出来,相反,内毒素一般是在细菌崩解后释放出来。具体的区别如表1-1所示。

表1-1 内毒素与外毒素的区别

性 质	内毒素	外毒素
相对分子质量	<10 000	50~1 000 000
化学性质	主要为LPS	蛋白质
与细胞的关系	细胞外膜部分	胞外成分,弥散
煮沸变性	无	通常
抗原性	有	有
形成类毒素	否	可
毒性效力	相对较低	相对较高
菌种特异性	程度低	程度高
酶活性	无	通常有
致热性	有	偶尔

目前,LPS和内毒素这两个术语几乎混用,实际上两者有一定区别。LPS的毒性中心为脂质A,目前商品化的LPS中发现有“内毒素蛋白”的物质,后者进行信号转导的效应受体不同于纯化和合成的LPS作用的受体。纯化LPS或合成LPS只能通过Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)发挥信号转导,而“内毒素蛋白”是通过TLR2进行信号转导而发挥效应。因此内毒素若从其生物学的效应来说,应该包括“内毒素蛋白”,所以比LPS概念更广。

1933年,Boivin等用三氯乙酸粗提的方法首先在鼠伤寒杆菌中分离出一种耐热的致病因子,当时因其一般蛋白质反应呈阴性,故称为脂多糖抗原,后人称之为Boivin抗原。随

后其他学者采取其他不同方法(如热水酚、酚汽油、氯仿、石油醚等),从GNB中抽提出同Boivin抗原相似的物质,该物质无蛋白质和核酸污染,却具有多种生物学毒性效应,如发热、低血压、局部Shwartzman反应、休克、多器官功能衰竭、弥散性血管内凝血(DIC)等。细菌内毒素主要见于革兰阴性细菌(见图1-1),也可存在于革兰阳性细菌、真菌、支原体及某些动植物组织中。革兰阴性细菌死亡后,细胞壁崩解释放出胞壁上的脂多糖分子,起初曾认为在细菌生活时内毒素不会扩散到环境中,后来发现活菌在繁殖生长时也可以以发疱形式释放胞壁上的脂多糖,只不过释放的内毒素浓度与细菌死亡时所释放的内毒素浓度相比低得多。习惯上将GNB细胞外膜中LPS作为一个整体称为内毒素,现已经将内毒素和脂多糖作为同义语来使用。

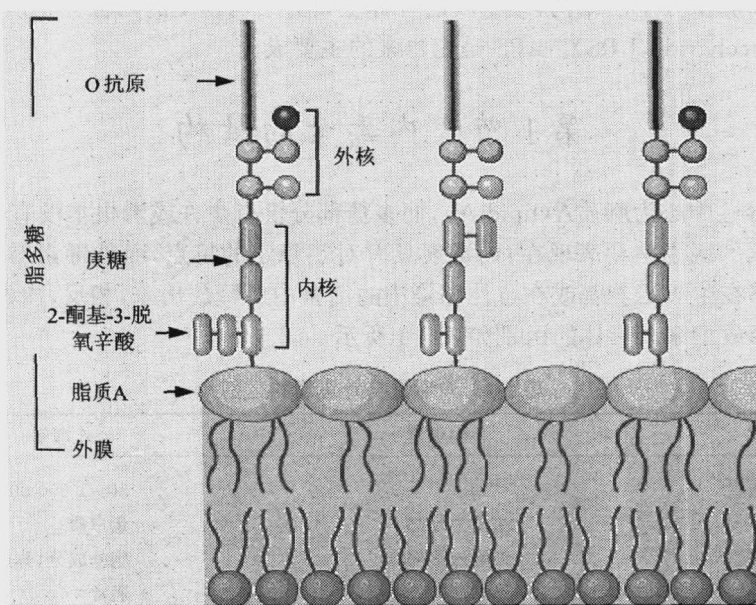


图1-1 革兰阴性细菌模式图

一、内毒素的化学结构

内毒素由脂多糖与蛋白质复合而成(图1-2)。脂多糖为革兰阴性细菌细胞膜表面的主要组成成分,在细菌和外界环境的相互作用中扮演着重要角色。脂多糖约占细菌干重的3.4%,每个细胞表面约有一百多万个脂多糖分子,它和蛋白质、磷脂、脂蛋白等共同组成革兰阴性细菌细胞壁的外膜。脂多糖分子由亲水性多糖和疏水性脂质结合组成,故为两性分子,其中多糖体为杂聚糖聚合而成,如己糖(葡萄糖、半乳糖、甘露糖等)、戊糖(pentose)、庚糖(heptose)、鼠李糖(rhamnose)等。因具有磷酸根基团,故表面带有负电荷,进行免疫电泳时,在电渗作用下移向阴极。脂多糖分子的基本结构由三部分共价连接而成,即O特异性抗原多糖(O-specific antigen polysaccharide)、核心多糖(core polysaccharide)及脂质A。脂多糖凭借其脂质A结构锚定在细菌外膜磷脂层的外侧部,在某些种属细菌中脂多糖甚至替代了磷脂。

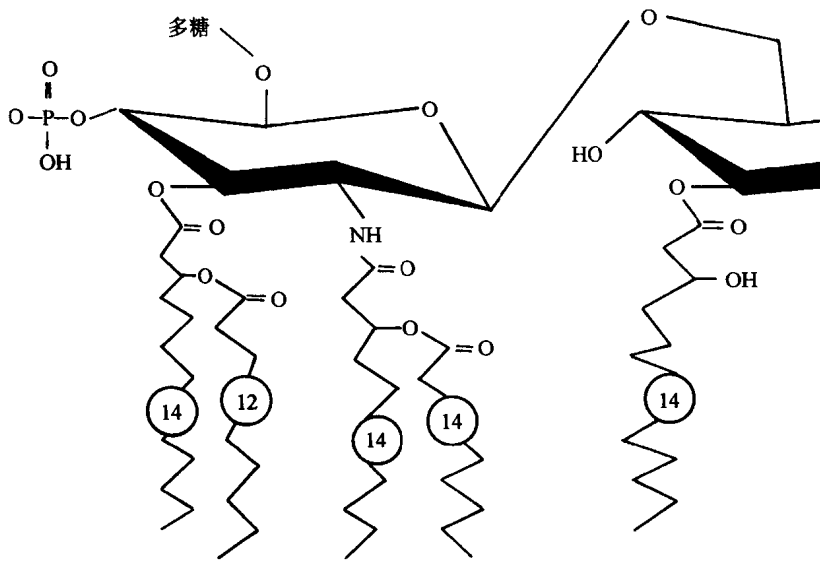


图1-2 内毒素的化学结构

由于细菌来源不同和提取方法不同,内毒素的结构形态和化学组成可以不同。不同学者报道的脂多糖颗粒大小以及形态差异较大,其相对分子质量约 $1 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ 。根据对大肠杆菌、百日咳杆菌及鼠沙门菌的脂多糖的电镜观察证实,脂多糖为各种形态的膜碎片,如线状、环状、带状、细丝状、小点状、小泡状以及板层状等,均具有相似的表面结构。

内毒素的成分不同可使细菌表现型存在三种形式,即光滑型菌落、粗糙型菌落以及中间型菌落(亦称黏液型菌落)。核心多糖成分减少或缺损时细菌培养菌落外观表现粗糙,故称为粗糙型变异株(rough-LPS, R),可根据其核心多糖缺损的程度不同分别称为Rb-LPS、Rc-LPS、Rd-LPS、Re-LPS,如图1-3所示。

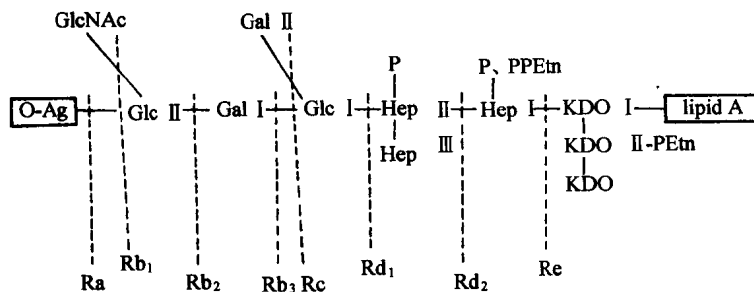


图1-3 细菌的表现型和内毒素核心多糖结构

Hep, L-甘油-D-甘露庚糖; Glc, 葡萄糖; Gal, 半乳糖; GlcNAc, N-乙酰葡萄糖胺;
P, 磷酸基团; PEtn, 磷酸乙醇胺; PPEtn, 焦磷酸乙醇胺

光滑型菌落的大肠杆菌LPS电镜为细长索状结构,粗糙型大肠杆菌LPS则以圆形结构多见,因其糖链长度不同而产生不同的空间位阻效应,影响机体免疫细胞对LPS和GNB的识别和吞噬,从而使宿主对其产生不同的免疫效应,影响机体对细菌的清除。粗糙

型糖链短,易被吞噬细胞所吞噬,如职业性吞噬细胞:中性粒细胞、巨噬细胞,其易清除粗糙型细菌;而光滑型糖链长,存在空间位阻作用,不易被吞噬细胞吞噬和补体所结合,易逃避机体对其免疫反应。如何影响GNB的LPS合成,使LPS和GNB能容易被宿主识别和清除,也是一种治疗内毒素血症的措施。在肠源性内毒素血症中,大肠杆菌(*E. coli*)多具有典型的LPS结构,易逃避宿主的吞噬清除反应,表现出强烈的内毒素生物学活性,引发各种毒性效应,所以在内毒素研究中,常常使用大肠杆菌的LPS进行评估内毒素的生物学效应和对各种干预措施的评价;而在外源性GNB感染时,其LPS结构缺乏典型的LPS结构,毒性相对较低,易被宿主清除。

德国学者Seydel等将LPS聚集体大分子置于生理盐水中,以巨噬细胞分泌的IL-6作为指示剂,用同步辐射X线衍射技术分析不同LPS的立体结构,发现锥体结构(cubic conformation)的LPS具有强烈的生物学毒性作用,而圆柱体(cylindrical conformation)的立方体化学结构缺乏毒性,或毒性较低。来自*E. coli*的六脂酰脂质A,为倒置立方体结构(inverted cubic conformation),而来自*E. coli*的五脂酰脂质A和四脂酰脂质A则形成多板层性结构(multilamellar structure),且向有轻微胶粒结构(micellar structure)的倾向发展;而*C. jejuni*脂质A为一个单层板层状结构(unilamellar structure),有轻微的向倒置立方体结构发展的趋向。其他脂质A无一例外地都形成多板层性结构。肠道细菌六脂酰的每个脂质A为圆锥形或凹面形,五脂酰的脂质主要为圆柱形,四脂酰脂质A为圆柱形,并存在向圆锥形或凸面发展的倾向(疏水区的横切面略小于亲水区的横切面)。目前资料显示,内毒素中LPS存在一个共同的原则,仅仅圆锥形或凹面的物理形状脂质A具有高度生物学活性,如肠道的*E. coli*。LPS缺乏激动剂活性,与脂质A的圆柱形具有相关性。缺乏脂酰基团的LPS并不说明能作为拮抗剂的前提,可能是当内毒素内化(internalization)到单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞后,由酰基羧基水解酶(acyloxyacyl hydrolase, AOA)酶解,生成去酰基脂质A,同时也改变其立体形态学,此时无毒性效应。可见LPS中有无酰基,并不能说明其有无毒性,需要了解其立体结构。内毒素的生物学效应与LPS的负电荷的多少、酰基链的数目,以及酰基的分布、酰基链的脂肪酸饱和程度、立体构象的改变等均影响内毒素的活性,该结论可为设计LPS的类似物创造理论依据,使之拮抗具有毒性的LPS的作用。

二、O 特异性抗原多糖

O 特异性抗原多糖,又称O 特异性多糖链,简称O 抗原或O 侧链,位于脂多糖分子的最外层,由数个至数十个(最多可达40个)寡糖重复单位(oligosaccharide repeat)构成,每个寡糖单位系由3~5个单糖组成的低聚糖,这些单糖通常为中性糖、氨基糖。O 抗原链结构是脂多糖组成中最易发生变异的部分,它的多样性决定了不同革兰阴性菌株的抗原特性。革兰阴性菌的O 抗原,具有种(species)的特异性,这是因其多糖链中单糖的种类、分布位置、排列方向和空间构型各不相同所致。O 抗原能与相应抗体起特异性反应,不同种类的大肠杆菌,O 抗原链的单糖种类及排列不同,形成特异的抗原性,故O 抗原链是不同菌种血清学特异性的结构基础。该结构也是革兰阴性菌株的主要抗原决定簇(determinant),大多具有革兰阴性菌型(type)的特异性,可引起菌型特异性反应。根据菌

落形态, O 抗原多糖链缺失时为粗糙型细菌(rough bacterium), 完整 O 抗原多糖链为光滑型细菌(smooth bacterium)。

三、核 心 多 糖

核心多糖, 又称核心区, 位于脂质 A 的外层, 由 2-酮基-3-脱氧辛酸(2-keto-3-deoxyoctonate, KDO)、庚糖、磷酸乙醇胺及己糖(葡萄糖、半乳糖等)所组成, 其外端以糖苷键与 O 抗原链相接(图1-4)。在一般革兰阴性杆菌脂多糖的核心多糖中, KDO 和庚糖是其特定的成分。核心多糖近端的庚糖通过三个 KDO 与脂质 A 以共价键相连, 该结合键易被弱酸所破坏。在 LPS 结构中核心多糖主要起着连接多糖与脂质 A 的作用。核心多糖有属(genus)特异性, 同一属细菌的核心多糖相同, 相对 O 特异性抗原而言核心多糖的变异性极小, 呈高度保守状态。

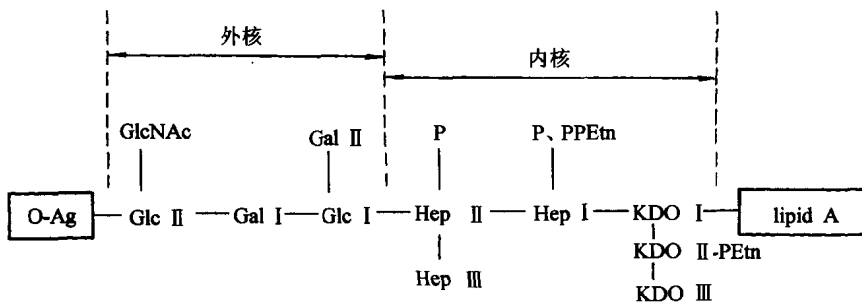


图 1-4 鼠伤寒沙门菌脂多糖的核心多糖

Hep, L-甘油-D-甘露庚; Glc, 葡萄糖; Gal, 半乳糖; GlcNAc, N-乙酰葡萄糖胺;
P, 磷酸; PEtn, 磷酸乙醇胺; PPEtn, 焦磷酸乙醇胺

KDO 和庚糖是一般革兰阴性杆菌的特定成分, 但黄单胞杆菌(*Xanthomonas*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)却缺少庚糖。厌氧的梭形杆菌(*Fusobacterium*)具有与沙门菌相似的化学成分, 而厌氧的类杆菌, 如黑色素类杆菌(*Bacillus melaninogenicus*)和脆弱类杆菌(*Bacillus fragilis*)则缺少 KDO 和庚糖。霍乱弧菌亦缺少 KDO。

四、脂 质 A

脂质 A (lipid A) 为一种糖磷脂, 具亲水性和疏水性的双嗜性的特点, 由氨基葡萄糖、脂肪酸和焦磷酸盐组成, 其骨架为两个氨基葡萄糖在 β -1, 6 位通过焦磷酸键聚合而成, 具亲水性, 多种长链脂肪酸和焦磷酸盐分别以脂键和酰胺键与双糖链相连, 其中长链脂肪酸的结构可使脂质 A 具有疏水特性。脂质 A 是内毒素的生物学活性主要组分。各种革兰阴性菌脂质 A 的化学结构极其相似, 虽然彼此可以有差异, 但无种属特异性。脂质 A 的化学结构见图 1-2。

脂质 A 分子中, 脂肪酸约占 70%~80%。各种细菌的脂肪酸性质和排列不一。肠道细菌含有羟化脂肪酸, 尤其是羟基化肉豆蔻酸(β -hydroxymyristic acid)为其特定成分, 而其他细菌则没有羟基化肉豆蔻酸, 或有其他羟基化脂肪酸。厌氧黑色素类杆菌的脂肪酸很独

特,可为环状或奇数碳链脂肪酸,缺少 β -羟基化肉豆蔻酸。脂质A不溶于水,而溶于酚、汽油、吡啶、三乙胺、二甲基亚砷以及氢氧化钠等。

1960年,Westplal等首先报道脂质A是内毒素的生物学活性成分,随后Otto Lüderitz等采用两种方法证实脂质A的活性,一种方法是将多糖链缺陷变异株的脂多糖中KDO残基的化学结构加以改变,脂多糖的活性(小鼠和鸡胚致死性、致热性、抗补体活性)不变,说明毒性不在脂多糖部分,而在脂质A;另一种方法是将灭活细菌进行分离提取,所得到的不溶性脂质A与水溶性载体如白蛋白等结合,成为稳定的可溶性的脂质A,并直接测定其活性。试验证实,脂质A对小鼠具有致死性、致热性、抗补体活性以及能引起骨髓坏死、鲎血溶解物试验阳性等生物学活性。脂质A活性虽然较原始粗提的脂多糖活性略低,但仍可以说明脂多糖的活性部位系脂质A。而多糖的存在却有助于不溶性的脂质A易溶解而发挥作用。脂质A的毒性主要在于其以脂键相连的脂肪酸,若后者被中性粒细胞、巨噬细胞内溶酶体酶,如AOAH水解,变成脱酰基脂质A,导致其空间结构发生改变,该脂质A或脂多糖即失去毒性。各种革兰阴性菌的脂质A的化学成分和结构虽然有差异,但彼此极其相似,这就解释了内毒素的活性,包括对人体所引起的反应基本相同的原因,但不排除在不同物种中,如人类和小鼠对有些内毒素反应相反的可能。

脂质A系LPS中最保守的部分。也是革兰阴性菌株脂多糖分子结构中固有的成分,目前认为是GNB的病原体相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP),由宿主天然免疫系统识别;如TLR、CD14等受体识别PAMP分子。研究发现,脂质A结构的完整性(如双磷脂酰脂质A)与LPS的毒性相关,而单磷脂酰基脂质A或单磷脂酰基脂质A前体(如脂质X、脂质Y)则不能引起发热、局部Shwartzman反应或者致死性休克。因此有人研究利用单体脂质A前体诱发机体对内毒素耐受的研究和治疗。目前认为在LPS结构中,脂质A和KDO结构部分是最具有毒性的成分,而并不需要O特异链和核心多糖的大部分参与,例如Bg-LPS,因其缺乏典型细菌内毒素所具有的KDO和 β -羟基化肉豆蔻酸,内毒素的活性就比较弱。脂质A和KDO结构部分也具有免疫原性,能激活机体免疫系统,引起机体产生相应的抗体。

一般方法提取的内毒素中有两种脂质形式,即脂质A和脂质B。脂质B与内毒素其他成分结合较弱,一般脂溶剂即可将其提出,其可能属于脑磷脂,无生物学活性。由于除去脂质B后对内毒素的活性没有影响,因此脂质B不是内毒素的真正的毒性成分。脂质A则与多糖牢固结合形成脂多糖。

典型的内毒素脂多糖分子是由以上三部分组成的,但在有一些革兰阴性细菌(如嗜血杆菌属、奈瑟菌属等)中,仅有少数几个糖基取代了O特异性多糖链,连接于核心多糖外侧部分,因此这类脂多糖通常被称为脂寡糖(lipooligosaccharide, LOS)。

第2节 脂多糖的生物合成及遗传学

脂多糖的生物合成极其复杂,不同种属细菌中控制脂多糖合成的基因或基因组存在着差异。合成脂质A、核心多糖有关的基因(组)位于染色体上;控制O抗原合成的基因(组)也主要位于染色体上,有些种属的某些基因则位于质粒上。本节以大肠杆菌(*E. coli* K-12)、鼠伤寒沙门菌(*S. typhimurium* LT-2)为例,阐述脂多糖的生物合成和遗传控制的特点。