

罗海波 鲍行康 主编

人民卫生出版社

(续篇)

细菌毒素研究进展

细菌毒素研究进展

续 篇

罗海波 鲍行豪 主编

方平楚	白增亮	邵传森	陈文建	编写
严佩珩	何浙生	吴清明	陆森泉	
项一萍	周丽萍	罗海波	祝文炯	
姜 训	赵瑞生	顾克洲	符锡春	
	章鑫明	蓝茂功	鲍行豪	

人 民 卫 生 出 版 社

细菌毒素研究进展

续 篇

罗海波 鲍行豪 主编

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

房山印刷厂印刷

新华书店北京发行所发售

787×1092毫米32开本 15 $\frac{7}{8}$ 印张 4插页 340千字

1987年9月第1版 1987年9月第1版第1次印刷

印数: 00,001—3130

ISBN 7-117-00436-3/R·437 定价: 3.75元

统一书号: 14048·5461

〔科技新书目148—87〕

序

《细菌毒素研究进展》一书于1983年问世以后，短期内即告售罄。对于广大读者的支持、鼓励与鞭策，我们表示衷心感谢。

为了将其他细菌毒素，尤其是近年来新发现的引起中毒性休克综合征的金黄色葡萄球菌中毒性休克综合征毒素 I、小肠结肠炎耶氏菌肠毒素、假膜性肠炎的艰难梭状芽胞杆菌外毒素与婴幼儿腹泻的空肠弯曲菌肠毒素等等的研究动态以及霍乱弧菌肠毒素和黄曲霉毒素新的检测方法予以介绍，我们又编写了《细菌毒素研究进展》续篇。

目前在细菌毒素的研究中，业已证实大部分外毒素具有 A-B 多肽链结构，B 链必须先与敏感宿主细胞膜上的特异性受体结合后，方能使 A 链进入细胞内发挥致病作用。为此，本书系统地记载了毒素及膜受体的性质及其相互作用的分子水平与亚细胞水平的研究进展，以便进一步深入了解毒素的致病机理。

晚近随着分子生物学的迅猛发展，某些毒素的基因结构、转移与重组已经阐明，其中以霍乱弧菌肠毒素及大肠杆菌耐热性肠毒素更为突出。

鉴于沿海居民素来喜食贝类及河豚等水产品，每每造成中毒。本书扼要描叙贝类毒素及河豚毒素的有关问题，以期引起警惕。

由于编者水平限制，如有错误及不当之处，敬请前辈、同道及广大读者批评指正。

目 录

第一章 细菌毒素及其膜受体	1
一、细菌毒素及其膜受体的性质	1
二、细菌毒素与膜受体的相互作用	16
三、细菌毒素的毒性效应	27
第二章 葡萄球菌α毒素	39
一、 α 毒素的制备和纯化	39
二、 α 毒素的理化特性与氨基酸组成	42
三、 α 毒素的生物学活性及致病作用	46
四、 α 毒素溶血作用的机理	48
五、 α 毒素的基因调控	52
六、 α 毒素的检测	58
第三章 葡萄球菌β、γ和δ毒素	62
一、 β 毒素	62
二、 γ 毒素	76
三、 δ 毒素	79
第四章 葡萄球菌剥脱毒素	86
一、概述	86
二、剥脱毒素的制备、分离与纯化	87
三、剥脱毒素的化学组成、理化性质与生物学特性	89
四、剥脱毒素的基因调控	93
五、剥脱毒素的免疫原性及抗体检测	96
六、剥脱毒素的致病机理	98
七、剥脱毒素的促有丝分裂活性	100

第五章 金黄色葡萄球菌中毒性休克综合征毒素 I ..103

- 一、概述103
- 二、致热性外毒素的制备与纯化104
- 三、影响致热性外毒素C产生的因素105
- 四、致热性外毒素的理化性质与化学组成106
- 五、致热性外毒素的生物学活性109
- 六、金葡菌肠毒素F112
- 七、致热性外毒素C与金葡菌肠毒素F的关系115
- 八、中毒性休克综合征的发病机理116
- 九、毒素的检测方法117

第六章 葡萄球菌杀白细胞素122

- 一、概述122
- 二、葡萄球菌杀白细胞素的制备与纯化123
- 三、葡萄球菌杀白细胞素的理化性状与化学组成 ..125
- 四、葡萄球菌杀白细胞素的生物学活性127
- 五、葡萄球菌杀白细胞素的致病性与免疫性140
- 六、葡萄球菌杀白细胞素的作用机理142
- 七、葡萄球菌杀白细胞素的研究意义与展望143

第七章 链球菌致热性外毒素146

- 一、提取链球菌致热性外毒素的常用培养基及影响因素146
- 二、链球菌致热性外毒素的制备与纯化148
- 三、链球菌致热性外毒素的理化性质151
- 四、链球菌致热性外毒素的生物学活性及致病作用 154
- 五、链球菌致热性外毒素的检测方法161
- 六、链球菌致热外毒素的免疫性164

第八章 大肠杆菌耐热性肠毒素167

一、耐热性肠毒素的制备与纯化	167
二、耐热性肠毒素的基因结构及其转移	170
三、耐热性肠毒素 I 的分子结构及理化性质	177
四、耐热性肠毒素的生物学活性和致病性	181
五、耐热性肠毒素的检测方法	184
六、耐热性肠毒素的免疫问题	186
第九章 霍乱弧菌肠毒素	190
一、霍乱弧菌肠毒素的作用方式与结果	190
二、霍乱弧菌肠毒素的生物学活性	192
三、霍乱弧菌肠毒素基因的遗传学研究	198
四、霍乱弧菌肠毒素检测的新方法	203
第十章 副溶血性弧菌溶血毒素	212
一、概述	212
二、副溶血性弧菌溶血毒素的分离及纯化	212
三、副溶血性弧菌耐热溶血毒素的理化性质	214
四、副溶血性弧菌耐热溶血毒素的溶血活性	216
五、副溶血性弧菌耐热溶血毒素的毒性作用	217
六、副溶血性弧菌溶血毒素的细胞膜受体	222
七、副溶血性弧菌溶血毒素的临床意义	223
八、副溶血性弧菌溶血毒素的检测方法	224
第十一章 小肠结肠炎耶氏菌肠毒素	227
一、肠毒素的制备、纯化	227
二、肠毒素的理化性质及生物学性状	229
三、影响肠毒素产生的因素	231
四、肠毒素的致病机理	235
五、肠毒素与其它致病因素的关系	236
六、肠毒素的测定方法	239

第十二章 艰难梭状芽胞杆菌毒素	242
一、艰难梭菌毒素的制备与纯化	242
二、毒素的理化性质	242
三、毒素的生物学活性	243
四、影响毒素产生的因素	246
五、毒素的检测方法	249
第十三章 蜡样芽胞杆菌毒素	258
一、概述	258
二、毒素的制备	258
三、毒素的种类、理化性质及生物学活性	260
四、毒素的致病作用	265
五、毒素的检测	266
第十四章 亲水气单胞菌毒素	270
一、亲水气单胞菌毒素的制备与纯化	270
二、亲水气单胞菌毒素的理化性状	273
三、亲水气单胞菌毒素的生物学活性	275
四、亲水气单胞菌肠毒素与霍乱肠毒素及大肠杆菌 LT 之间的抗原关联	280
五、亲水气单胞菌毒素的检测	282
第十五章 空肠弯曲菌肠毒素	286
一、概述	286
二、空肠弯曲菌肠毒素的制备	286
三、空肠弯曲菌肠毒素的性质	289
四、空肠弯曲菌肠毒素的检测方法	291
第十六章 百日咳杆菌毒素	294
一、毒素	294
二、百日咳菌苗的毒性及无细胞菌苗前景	316

第十七章 奇异变形杆菌毒素与酶	321
一、神经毒素	321
二、尿素酶	324
第十八章 沙门氏菌肠毒素	329
一、概述	329
二、肠毒素的制备与纯化	330
三、肠毒素的理化性状与致病作用	332
四、沙门氏菌肠毒素与霍乱肠毒素及大肠杆菌 LT间的抗原关联	335
五、沙门氏菌肠毒素的检测方法	336
第十九章 鼠伤寒沙门氏菌神经毒素	339
一、神经毒素的制备与纯化	339
二、影响神经毒素的产生因素与毒素的氨基酸组 成	341
三、神经毒素的致病作用	342
四、神经毒素的血清学特异性	343
五、神经毒素的免疫	344
第二十章 单核细胞增多性李氏菌毒素	346
一、概述	346
二、李氏菌毒性产物的作用	346
三、李氏菌溶血素的制备、性质及其生物学活性	349
四、李氏菌脂多糖样毒性物质	356
第二十一章 黄曲霉毒素	362
一、概述	362
二、黄曲霉毒素的种类与性质	363
三、黄曲霉毒素的制备与纯化	369
四、黄曲霉毒素产生的条件及其影响因素	374

五、黄曲霉毒素的生物学活性及致病作用	389
六、黄曲霉毒素的代谢与生化作用	401
七、黄曲霉毒素的检测方法	418
第二十二章 支原体毒素	445
一、概述	445
二、外毒素	446
三、内毒素	450
四、支原体细胞膜的毒性	455
五、支原体代谢产物的毒性作用	457
六、结语	459
第二十三章 贝类毒素	461
一、概述	461
二、贝类毒素的形成与分布	461
三、贝类毒素的分离与理化性质	463
第二十四章 河豚毒素	472
一、概述	472
二、河豚毒素的分布	472
三、河豚毒素的提取和理化性质	475
四、河豚毒素的毒性和解毒	477
五、河豚毒素的毒理作用	480
第二十五章 大肠杆菌α溶血素	483
一、概述	483
二、 α 溶血素的制备与纯化	484
三、 α 溶血素的化学组成与理化性状	486
四、溶血的动力学及作用机理	489
五、 α 溶血素的生物学效应	491
六、 α 溶血素的免疫	497
七、 α 溶血素产生的基因调控	497

第一章 细菌毒素及其膜受体

近数十年来，许多学者从细胞水平、分子水平和基因水平对细菌毒素进行了广泛而深入的研究，认为在细菌性疾病的致病因子和发病机理中，细菌毒素占有重要地位。迄今，如霍乱弧菌肠毒素、大肠杆菌耐热和不耐热肠毒素（ST、LT）、白喉杆菌外毒素、破伤风杆菌痉挛毒素等常见毒素的产毒条件、提纯方法、分子结构、理化生物学性质及检测技术均已阐明。此外，还发现了不少新的细菌毒素，如肠炎沙门氏菌肠毒素、非OI群霍乱弧菌肠毒素、弯曲菌外毒素和艰难梭状芽胞杆菌外毒素等。晚近，在细菌毒素的研究中，已进入毒素膜受体性质、毒素与膜受体相互作用等的分子水平与亚细胞水平。本文拟就近年来在这方面的研究进展作一简要综述。

一、细菌毒素及其膜受体的性质^[1-31]

细菌毒素多为蛋白质性质，大部分毒素具有A-B多肽链结构。其中有些毒素为单一多肽链，在二硫键连结处可被蛋白酶裂解为A-B分子，如白喉杆菌外毒素、绿脓杆菌外毒素、破伤风杆菌痉挛毒素、肉毒杆菌肉毒毒素和葡萄球菌肠毒素等。另一些毒素由单独合成的亚单位组成A-B结构，如霍乱弧菌肠毒素、大肠杆菌LT、百日咳杆菌外毒素和志贺氏痢疾杆菌外毒素等。此外，尚有一部分毒素分子量很小，不具有A-B结构，如大肠杆菌ST。

具有A-B结构的毒素，其A链(或A亚单位)为毒素的活性中心，它决定毒素的致病性与作用方式，不能直接进入细胞内；B链(或B亚单位)能与敏感细胞膜上特异性受体结合，它决定毒素对宿主细胞的选择亲和性。大部分毒素的A链具有酶的活性，作用于细胞内的靶点，此种靶点，有者在细胞质内，如白喉杆菌外毒素、绿脓杆菌外毒素A和志贺氏痢疾杆菌外毒素等；有者在细胞膜的内侧面，通过A链改变其活性而发生毒性作用，如霍乱弧菌肠毒素、大肠杆菌LT、沙门氏菌肠毒素和百日咳杆菌外毒素等。此种酶活性是游离A链的特性，但通常隐藏在完整毒素之内，只有当毒素被激活后，A链释放，酶活性才显露。不具有A-B结构的毒素，如大肠杆菌ST、葡萄球菌 β 毒素等也具有酶的活性。少数毒素不具酶的作用，但能阻止生理介质的释放或直接破坏敏感细胞，如破伤风杆菌痉挛毒素、链球菌溶血毒素O (SLO)等。

细胞表面的毒素受体指能与毒素特异结合而启动毒素使细胞中毒的膜成分。此种膜成分，作为某种毒素的受体，必须具有介导毒素的功能，通常用下述两法予以证明：①缺乏该毒素受体的变异细胞对该毒素不敏感，当用纯化的受体予以重建后，则对毒素敏感；②用毒素受体的抗体处理后，毒素反应受到抑制。

毒素受体的性质，约有下列数种：

1. 神经节苷脂 是机体细胞膜脂多糖的一种，由疏水性神经酰胺与亲水性的低聚糖构成，前者嵌入膜内，后者伸展于膜外。根据低聚糖中糖的种类、含量及唾液酸的含量与位置不同而分为多种，已知主要者有单唾液酸神经节苷脂（如 G_{M1} 、 G_{M2} 、 G_{M3} ）、双唾液酸神经节苷脂（如 G_{D1a} 、 G_{D1b} ）、

3. 蛋白质 如大肠杆菌ST受体。
4. 胆固醇 如链球菌溶血毒素O的受体。
5. 卵磷脂 如葡萄球菌杀白细胞素-F 组分的受体。
6. 脂肪酸 如葡萄球菌 δ 毒素受体。

下面介绍几种常见毒素及其受体的性质。

(一) 霍乱弧菌肠毒素

分子量为84,000, 由A亚单位(L链, 分子量29,000)和B亚单位(H链, 分子量55,000)经非共价键结合而成。A亚单位又分A1(分子量23,000)和A2(分子量6,000)两个片段, 两者由二硫键连结。B亚单位由5个相同的多肽链(B链, 分子量11,600)经非共价键连结组成。将毒素在4mol/L尿素中还原, A1片段可从A2-5B复合物中释放, 表明A亚单位是通过A2与B亚单位连结在一起的。A、B亚单位单独均不显示毒性。A1片段为毒素的酶活性部分, B亚单位则与敏感细胞的膜受体结合。

霍乱弧菌肠毒素的膜受体为神经节苷脂 G_{M1} , 霍乱毒素及类霍乱原能直接与 G_{M1} 结合, 其根据有: 霍乱毒素与类霍乱原①可与 G_{M1} 在双向琼脂扩散试验中出现沉淀线; ②可吸附于 G_{M1} -脑苷脂复合物上; ③可结合于包被 G_{M1} 的试管; ④可结合于连接有 G_{M1} 的硅珠和⑤可结合于含 G_{M1} 的脂质体。

G_{M1} 是否为霍乱毒素的功能受体, 必需证实其与毒素结合后能否介导毒性作用。Fishman等(1976)证明, 不能合成 G_{M1} 的小鼠纤维母细胞NCTC2071对霍乱毒素不起反应, 当将外源性 G_{M1} 插入该细胞膜后, 对霍乱毒素便产生明显的毒素反应, 而其它类型的神经节苷脂不能重建该细胞对毒素的敏感性。实验充分证实 G_{M1} 是霍乱毒素的受体。

除 G_{M1} 外, 有的学者提出细胞膜的糖蛋白亦为霍乱毒素

的受体。Critchley等(1979)用半乳糖氧化酶和 $[^3\text{H}]\text{Na-BH}_4$ 标记小鼠纤维母细胞(BALB/c 3T3)和小鼠淋巴样细胞(AT₈),加入霍乱毒素使之结合,并将毒素-受体复合物加以溶解,然后与抗毒素抗体作免疫沉淀反应,在所得免疫沉淀物中,除含大量G_{M1}外,还有少量分子量为80,000~90,000的糖蛋白,提示该种糖蛋白具有与G_{M1}相同的低聚糖结构。Morita等(1980)用同法证明了小鼠小肠上皮细胞亦存在糖蛋白性质的霍乱毒素受体。但关于糖蛋白作为霍乱毒素受体,尚未取得一致看法。

(二) 大肠杆菌LT

与霍乱毒素的结构相似,由分子量25,500~29,000的A亚单位和分子量59,000的B亚单位组成。A亚单位为一单链结构,受胰酶作用可转化成裂痕(nicked)形式,由具酶活性的A1链藉二硫键与A2链相连接。B亚单位由非共价键连接的5个相同的多肽链组成。大肠杆菌LT非但在分子结构、亚单位连结与霍乱毒素类似,且两种毒素的A、B亚单位具有共同抗原决定簇,以及大部分氨基酸序列具同源性。Dallas等(1980)、Spicer(1981)相继证实,大肠杆菌LT的B链、A1链末端氨基酸序列与霍乱毒素的相应部分有80%的同源性,但A2链的同源性较低,只55%。

关于大肠杆菌LT的受体有两种不同看法。一些学者认为与霍乱毒素受体一样,也是G_{M1},其根据为:①大肠杆菌LT在体外可结合于G_{M1};②低浓度的G_{M1}可以封闭LT对小鼠胸腺细胞、Y-1肾上腺细胞的毒素反应;③G_{M1}缺陷细胞(大鼠神经胶质瘤C6)如结合外源性G_{M1},LT对其的结合约可增加30倍;④对LT缺乏反应性的小鼠纤维母细胞NCTC2071加入G_{M1}后,LT可使该细胞的cAMP大量增加。另一些学者认

为，霍乱毒素与大肠杆菌LT的结合性质不同， G_{M1} 并非LT的天然或唯一的受体。首先，Clements等（1979）发现，大肠杆菌LT能紧密的粘附于含半乳糖的琼脂糖柱，而霍乱毒素不粘附；Holmgren等（1982）详细比较了家兔小肠上皮细胞上霍乱毒素和大肠杆菌LT的受体发现：在体内肠祥试验中，大肠杆菌LT的B亚单位能封闭大肠杆菌LT与霍乱毒素的液体分泌反应，而霍乱毒素的B亚单位只能封闭霍乱毒素的液体分泌，即使浓度增加100倍，也不能封闭大肠杆菌LT的液体分泌反应；在离体的小肠上皮细胞或刷状缘，结合大肠杆菌LT的活性比霍乱毒素高10倍；用氯仿-甲醇-水（4:8:3）提取十二指肠、空肠和回肠粘膜的霍乱毒素结合部位，提取物95%以上为 G_{M1} ，而大肠杆菌LT的结合部位留在去脂的组织中，具有糖蛋白的性质。据此，作者认为大肠杆菌LT受体除 G_{M1} 外，尚有糖蛋白，并证明作为大肠杆菌LT的受体，该糖蛋白比 G_{M1} 的数量多、作用强。如确认非 G_{M1} 的糖蛋白为大肠杆菌LT受体，此与 G_{M1} 缺陷细胞（小鼠纤维母细胞NCTC 2071和大鼠神经胶质瘤细胞C6）对大肠杆菌LT不敏感的事实将发生矛盾。对此种矛盾现象的解释，有些学者认为该 G_{M1} 缺陷细胞可能存在多向性变异或一种以上突变。如Fishman等（1976）报告NCTC2071细胞至少缺乏2种糖基转移酶，可能与 G_{M1} 、糖蛋白合成障碍有关。另一些学者则认为， G_{M1} 缺陷细胞对大肠杆菌LT不敏感系因非 G_{M1} 受体虽存在，但其与大肠杆菌LT的结合效能依赖于 G_{M1} ，一旦加入外源性 G_{M1} ，即可使非 G_{M1} 受体获得结合效能。

（三）大肠杆菌ST

根据对甲醇的溶解性和动物的敏感性，ST可分为两种：能溶于甲醇，并对乳鼠和幼猪有毒性，对断奶的猪无毒性的

为STa；不溶于甲醇并对断奶猪有毒性，而对乳鼠无毒性的为STb。STa和STb在免疫学和遗传学上各不相同。近年对STa开展了广泛的研究。STa为分子量2,000的小分子量蛋白质，除可溶于甲醇及耐热外，对酸、蛋白酶、核酸酶、脂酶、磷脂酶C以及淀粉酶的处理都不受影响。Chan等（1981）测定了一株人源STa的一级结构，由18个氨基酸组成，氨基端和羧基端均为精氨酸，第5、6、9、10、14和17位为半胱氨酸。人源STa之间，以及人源与猪源STa之间，氨基酸序列有很大的同源性，仅在氨基端少数氨基酸残基存在差别。如Dreyfus等（1983）发现，猪源STa（431、667）、牛源STa（B-41）和人源STa（213C2 HDS-1），在凝胶过滤柱出现单一对称峰、在SDS-PAGE上为单一荧光带、羧基端为酪氨酸、氨基端为天冬酰胺、抗431STa血清能中和同源431STa和其它异源STa。

大肠杆菌STa的受体与霍乱毒素、大肠杆菌LT的受体均不相同。Frantz等（1982、1983）证明， ^{125}I 标记的猪源STa能特异的结合于大鼠小肠上皮细胞和刷状缘膜，此种结合成分用链霉蛋白酶处理可降低 ^{125}I 标记的STa的结合，而用磷脂酶A2、C、神经氨酸酶或内源性糖苷酶P处理并不减少 ^{125}I 标记的STa的结合。Thomas等（1983）研究STa受体性质时发现， α -D-葡萄糖、甘露糖、1-O-甲基半乳糖吡喃苷、果糖、 α -甲基甘露糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、透明质酸、糖原、乳糖、半乳糖、纤维二糖、蜜二糖、甘露聚糖和淀粉等对STa与受体的结合无影响，葡萄糖氧化酶、神经氨酸酶、半乳糖氧化酶、乳糖酶、PWM、ConA、PHA、木瓜蛋白酶、脂酶、溶菌酶、透明质酸酶、 α -胰凝乳蛋白酶和磷脂酶A2、C、D等对STa与受体的结合亦无影响，但链霉