

细菌性疾病的预防

(Bacterial Vaccines)

René Germanier 编 著

卫生部长春生物制品研究所

國際性組織的興起

國際性組織的興起

國際性組織的興起

國際性組織的興起

细菌性疾病的预防

(Bacterial Vaccines)

译者 肖锡岭 叶璟珍 王 钧

荣风山 孙风至 刘增余

曾繁启 马尔瞻 杨钟祺

周景中 洪超明 叶世德

高晓明 田春生

审校 周景中 张嘉铭

卫生部长春生物制品研究所

一九八五年六月

译 者 的 话

利用疫苗使机体产生抵抗力来达到控制并最终导致消灭传染病是八大类之一。牛痘苗的应用,最终在地球上消灭天花,这是生物制品应用的光辉范例。但是,世界上仍然有许多传染病还没有得到控制包括许多由细菌引起的疾病,尚有待解决。

随着物理、化学、生物化学技术的发展;随着生物学、免疫学知识的不断更新、充实,给研究疫苗提供了新的技术、新概念,也引起疫苗生产、检定等方面深刻的变革。当前、细菌性疫苗正处于一个转折时期,一些经典的、传统的方法制备的全细胞疫苗正逐步被提纯的、合成的或重组DNA疫苗所代替。

R. Germanier博士编辑的“细菌性疾病的预防”一书,是1984年下半年出版的一本新书,由国际著名的各方面研究专家撰写有关的专章。文章回顾疫苗的历史、发展以及目前在分子水平上的成就,并展望控制该病的前景,对从事这方面的教学、科研和计划免疫人员是一本有用的介绍近代细菌性疫苗的参考书。

长春生物制品研究所为了将本书贡献给从事这方面工作的专业人员,组织了从事该领域的研究人员,在短期内全文翻译出版,为了节省篇幅,将每章的参考文献移至书后。希望他们的努力将对从事这领域的人员有所裨益,并对关心这一领域发展的人员有所启发。

张 嘉 铭

一九八五年六月

序 言

传染病研究的最终目标是它的预防，而达到这目标最有效的手段之一是对敏感的宿主进行免疫。

在过去的百年中已经应用了抗细菌性疾病的疫苗，其中许多已经应用很久，但迄今尚无明显的改进；某些具有良好的保护作用认为适宜推广应用；其他由于引起副作用而效果又不理想，必须进行改进。

免疫学和细菌遗传学领域的急剧进展，大大的鼓舞和有利于开发新的和更佳的疫苗研究。这有两种截然不同的方向，第一是探索精制抗原以代替全菌体，这样可以消除许多和保护性反应无关物质引起的副作用。而且应用纯的成分对发展多价疫苗是大有有利的。第二个方向是基于适当的抗细菌性免疫只能用减毒活的细菌来获得，那是最近似由于传染引起的免疫。利用新的DNA重组技术可能发展遗传学稳定的变异菌株，可以使用活疫苗又不必担心菌株的毒力恢复。

编辑本书的目的是提供人类抗细菌性疾病免疫的信息。针对这些细菌病已有疫苗在使用，有的将要用新的疫苗。尽管各种疫苗的历史有本质上的差异以及目前免疫制剂和建议的制剂具有极大的多样性，但著者尽可能将各章节按同样的格式书写。主要是叙述疫苗的成分，生产和检定，以及它的效益和缺点。每一章同样包括病原学特别注意它的抗原成分，发病机理和免疫机理。

本书提供给从事防疫和疫苗工作的人员，使其概括了解人类抗细菌性疾病的现状。另外对一些采用疫苗的决策人来说也会从本书中得到一些有用的信息。

在世界范围内对控制细菌性疾病最近作了很大的努力，并期待在今后十年内取得辉煌的成就。编者希望这本书对参与这项工作的人也有所裨益。

René Germanier

(张嘉铭译 周景中校)

目 录

译者的话		(i)
序 言		(ii)
1 白 喉	A.M.PAPPENHEIMER, JR.	(1)
	参考文献 (251)	
2 破伤风	BERNARD BIZZINI	(24)
	参考文献 (256)	
3 百日咳	CHARLES R. MANCLARK AND JAMES L. COWELL	(42)
	参考文献 (281)	
4 霍 乱	RICHARD A. FINKELSTEIN	(63)
	参考文献 (269)	
5 伤 寒	RENÉ GERMANIER	(80)
	参考文献 (278)	
6 细菌性痢疾	SAMUEL B. FORMAL AND MYRON M. LEVINE	(97)
	参考文献 (280)	
7 大肠埃希氏菌感染	MYRON M. LEVINE	(108)
	参考文献 (284)	
8 脑膜炎球菌性脑膜炎	EMIL C. GOTSCHLICH	(137)
	参考文献 (293)	
9 肺炎球菌感染	ROBERT AUSTRIAN	(147)
	参考文献 (297)	
10 乙型流感杆菌感染	JOHN B. ROBBINS, RACHEL	

SCHNEERSON, AND MARGARET PITTMAN (168)

参考文献 (301)

11 绿脓杆菌的传染 STANLEY J. CRYZ, JR. (185)

参考文献 (304)

12 淋 病 EMIL C. GOTSCHLICH (205)

参考文献 (312)

13 结 核 FRANK M. COLLINS (216)

参考文献 (316)

14 麻 风 TORE GODAL (244)

参考文献 (322)

1 白 喉

A. M. PAPPENHEIMER, JR.

- I. 绪言
 - II. 白喉的历史
 - III. 白喉的生物学
 - A. 棒状白喉杆菌及相关的棒状杆菌
 - B. 白喉和白喉的传染
 - C. 毒素产生的遗传学
 - IV. 白喉毒素和类毒素
 - A. 毒素的生产
 - B. 白喉毒素的精制
 - C. 白喉毒素的分子
 - D. 白喉类毒素
 - V. 抗白喉免疫
 - A. 毒素——抗毒素反应
 - B. 抗毒素的物理化学性质
 - C. 毒素决定簇的位置和特异性
 - D. 人的免疫
 - E. 反应
 - VI. 大规模免疫对白喉流行病学的作用
 - A. 使用类毒素前的白喉流行病学
 - B. 类毒素对流行病学的作用
 - VII. 结论和前景
 - A. 精制
 - B. 合成抗原
 - C. 克隆化tox基因片段的应用
 - D. CRM_s (突变tox基因的非毒性产物)
- 参考文献

Department of Cellular and Developmental Biology
The Biological Laboratories Harvard University
Cambridge Massachusetts

I. 绪 言

在二十世纪初,估计大约每10~12名儿童就有一名在15岁以前死亡。大多数死亡的原因可归于细菌性传染病。肠内传染病大概是第一位,其次便是白喉,猩红热,肺炎等。

现在,除某些发展中国家外,在所有国家中死于细菌传染病是比较少的。虽然疫苗发展了,对大多数细菌传染病也有一定的保护作用,但细菌传染病发病率的降低,一方面主要是由于环境卫生和一般卫生措施的改善,另一方面则是由于抗菌素的治疗,而不是由于用细菌疫苗进行自动免疫的结果。

唯独白喉是一个明显的例外,白喉大概是唯一的直接由于使用白喉类毒素自动免疫人群而几乎完全消灭的主要致死传染病。这种明显的成功是容易解释的:白喉类毒素所引起的保护性免疫是直接特异地对抗白喉毒素,并且不需要抗菌的免疫接种。幸运的是,所有白喉杆菌菌株所产生的毒素是一致的,在免疫学上是没有区别的,也不需要担心像其他大多数细菌疫苗和其他某些细菌毒素的型特异性免疫问题。

II. 白喉的历史

从过去发生的许多流行病的早期记载中能够得出结论,即白喉和哮喘甚至在古代亦必广泛地流行过。但当时白喉和其他咽喉传染病是区别不清的,直到1826年Tours的Brettoneau根据精确的临床观察才把白喉作为一种独立的传染病,并给以命名。早期白喉流行病学和最终导致应用类毒素大规模免疫的历史,读者可参考Andrewes (1923) Caufield (1939), Wilson等 (1946) 的文章。

白喉的病原学是Loeffler (1884) 确定的,Loeffler分离到现已知其为棒状白喉杆菌的纯培养,1883年Klebs从白喉伪膜的涂片上已看到了这种杆菌。Loeffler证明,所培养的杆菌能使豚鼠、家兔和鸽子致死,其许多器官的损伤和人类死亡病例解剖所见相似。Loeffler另一重要发现是杆菌仅存在于接种的局部损伤部位,远部器官损伤中总是无菌的。4年后Roux等 (1888) 证明,杆菌无菌滤液中对热不稳定的致死性毒素亦能使这些动物产生同样的损伤。仅二年后, Von Bechring等 (1890) 用氯化碘处理毒素制备的“类毒素”免疫动物成功。次年,开始应用抗毒马血清治疗患者。在上世纪末, Paul Ehrlich (1897) 公布了他的毒素和抗毒素之间定量关系的研究结果,并给毒素、抗毒素单位及其分析方法以定义,其中许多一直至今仍在应用。

到了20世纪后,注意力转向发展抗白喉自动免疫方法方面。1913年Bela Schick提出一种皮肤试验来区分那些人对白喉毒素的作用具有免疫力,那些人还是敏感的。在大城市如维也纳, Schick首次于1913年监测的时候,有93%以上的婴儿在初生时是锡克氏阴性,这是因为抗毒素通过母体胎盘被动转移所致。2~5岁的儿童37%是有免疫力的。1922年, W. H. Park给纽约的学龄儿童进行大规模毒素—抗毒素混合液接种时,锡克氏试验变得特别有用。毒素—抗毒素混合液作为一种免疫制剂是1909年Theobald Smith

建议,首次试验1 Behring于1913年进行的。这种制剂不是没有危险性的(Wilson, 1967),不久便 醛类毒素所代替(Glenny等, 1923; Ramon, 1924)。第二个重要 展是25年后, Freeman(1951)用从毒原菌分离的噬菌体作用于非毒原菌的方法, 喉杆菌非毒原株转化为溶原株并具有毒原性。Uchida等(1971)最终证明, 毒素生 成的结构基因为噬菌体基因组所携带。

Ⅲ. 白喉的生物学

A. 棒状白喉杆菌及相关的棒状杆菌

为了详细描述杆菌的分类学、形态学和生化特点,读者可参考Barksdale (1970)和Saragea等(1979)极好的评论。

根据菌落的形态学和生化特点,白喉杆菌有三种主要型别:轻型、重型和中间型。之所以如此命名这些型别,是因为原来认为重型菌比轻型菌感染病症重且死亡率高。后来证明这些关系是不正确的。追究偶尔在发达国家暴发白喉的来源时,噬菌体分型和细菌素分型已证明无价值了。Saragea等(1979)发展了现代应用的分型系统,他们把白喉杆菌至少分成33种不同的溶菌型和20多种细菌素原菌株。

某些与棒状杆菌有关的“种属”已证明对毒原棒状杆菌噬菌体敏感并能引起白喉。虽然大多数白喉杆菌能还原硝酸盐成为亚硝酸盐,但现已从典型的白喉病例分离出硝酸盐还原酶阴性的菌株,常称为C.belfantt (Chang等, 1978)。棒状溃疡杆菌能引牛马的溃疡性损伤,偶尔也能从人类分离到该菌,这种菌能转化为毒原性并产生白喉毒素。棒状绵羊杆菌(假结核菌)不像白喉杆菌,因为能产生一种与白喉毒素无关的第二种毒素,所以任何途径注射皆可使小鼠致死。

B. 白喉和白喉的传染

典型的白喉是由白喉杆菌产毒株侵袭鼻咽组织所引起的传染病。病原菌生长在疼痛、出血和坏死损伤面上的一层硬纤维蛋白膜中,此等伪膜可仅局限于鼻咽部的扁桃体上或该部的其他部位。虽然心肌损伤是人类白喉常见的主要特征,但人类并没有白喉毒素特异的靶器官。死亡病例解剖表明,和鼻咽部的伪膜损伤不同,在身体大多数器官皆可见到坏死性损伤,并证明总是无菌的。病人活存数日或更长时,软腭麻痹和斜视等神经症状也是常见的,这是由于末梢神经脱髓鞘损伤所致。

在过去白喉的典型流行过程中,疾病经飞沫传染,常常是通过一个健康免疫的中间媒介一带菌者传播(Andrewes, 1923)。除非用抗菌素积极的治疗,恢复期病人在其鼻咽部携带毒原菌可达数周甚至数月之久。

白喉伪膜并不总是在鼻咽部。作者一次曾见到一个婴儿白喉死亡病例,其伪膜局限在肚脐中。在热带,深度的界限分明长期不愈的溃疡是常见的。这种出血性溃疡具有“钻出来”的出现过程,在其底部有一层长满白喉毒原菌的膜。我们没公布的试验证明,注射白喉轻型毒原菌于豚鼠皮内,可产生与在人类所见极相似的溃疡,后来这些豚鼠变成对白喉毒素迟发性超敏感状态(Uhr等, 1957)。患有白喉溃疡的人通常有

高效价的循环抗毒素(Liebow等,1946; Riddel,1950),且组织损伤常限于溃疡区本身。但心肌炎和神经炎亦偶尔在白喉溃疡患者中发现。白喉杆菌毒原株和非毒原株皆可在各类型感染的皮肤损伤中(擦伤,虫咬等)与葡萄球菌及链球菌等同时发现。在贫困地区, Belsey等(1969)曾观察到, 20~50%的病例其呼吸道感染与皮肤损伤之间相互关联。

白喉杆菌非毒原株的致病性

在发现白喉毒素(Roux等,1888)一年以前, Loeffler(1887)曾注意到,从健康人分离出来的白喉杆菌只有一点与从病人分离出来的不一样,即这些菌株对豚鼠是无毒的,其他方面皆一致。自此,白喉杆菌的毒原株与非毒原株在人群中,甚或在一次流行中同时存在,曾使研究这种病的学者感到迷惑(Andrewes,1923; Brooks等,1974)。甚至在Freeman(1951)证明溶原性转换产生毒原性以后, Uchida等(1971)证明棒状杆菌噬菌体基因为毒素分子编码以后,白喉杆菌毒原株和非毒原株的关系亦未完全弄清。

白喉杆菌一般不认为是一种侵入型的病原菌。但在第二次世界大战过程中的一些研究结果表明,白喉杆菌毒原株在完全免疫的人们中可引起“类白喉”(Diphtheria-Like)疾病,具有伪膜但没有基底的坏死组织,和非毒原株在没有循环抗毒素人们中引起的疾病类似。轻型、重型和中间型三型非毒原株皆已从“类白喉”病人中分离出来(Ipsen, 1946; Harley等, 1959; Edwards等, 1951; Jephcott等, 1975)。从免疫过又感染毒原株病人愈后数周采取的血清样品表明,其抗毒素效价已升高到很高的水平,然而感染过白喉杆菌非毒原株后,其抗毒素效价并无升高。

没有几个试验室研究过白喉杆菌非毒原株的致病性。Barksdale等(1960; 其评论,1970)表明,注射轻型无毒株C7(-)和C7(r)^{tox-}于家兔和豚鼠皮内,可产生化脓性损伤,与致病性葡萄球菌所引起的损伤类似,且白喉抗毒素并无保护作用。在予先免疫过C7株细菌疫苗的动物中,是否能引起类似的损伤并未进行过研究。Barksdale等还报导过,有二例误吞和吸入C7(-) ^{tox-}菌株的病例,只有轻度的喉痛和发烧,他们皆早已免疫并具有比较高效价的循环抗毒素。

据我们所知,感染白喉杆菌非毒原株从来是不能致死的。但是他们对存在于白喉类毒素制品中的棒状杆菌蛋白变得敏感,已知这种含棒状杆菌蛋白的制品给成人注射能引起不良反应。

C. 毒素产生的遗传学

虽然早已公认经常出现白喉杆菌非毒的原株,但直到Freeman(1951)用现在已知^{tox+}棒状杆菌噬菌体发现溶原性转换产生毒原性以前,它们在分类学上的位置是不明确的。Freeman(1951)是用一株典型的现已知为C7(-) ^{tox-}的非毒原性轻型菌株(从白喉接触者分离得到)和另外一个试验室的一毒原株的噬菌体溶解物滤液共同作用,来实现转换。虽然毒素生产的研究皆用非典型的中间型PW8株,但几乎以后所有关于tox基因的研究皆使用C7株。尽管在培养和代谢方面该二菌株有许多不同,但1942对碱基DNA片段的核苷酸顺序,其中包括tox基因,它的启动子和前导顺序基因,二菌株是一致的(Greenfield等,1983; Ratti等,1983)。

虽然Freeman的研究证明了 β 噬菌体携带的tox基因对于其细菌宿主毒素产生是不可缺少的,但直到20年以后, tox才被证明为毒素结构基因编码(Uchida等, 1971)。当复制性 β^{tox+} 用突变剂如亚硝基胍处理,使用的亚硝基胍的量足以使99%的噬菌体颗粒失活时,大约2~3的所有活存噬菌体皆携带变性的tox基因。当在其细菌宿主(即C7株)表达时,这些活存者产生的蛋白(CRM=血清学交叉反应物质),或是完全无毒的或是大大减低了毒性的,但是同白喉抗毒素仍然起交叉反应。表1对比了CRMs、毒素本身、A片段、B片段和白喉类毒素的若干特点。从抗白喉自动免疫的观点来看,许多已被分离

表1. 白喉毒素和有关蛋白的若干特点

蛋白结晶	近似分子量	毒 性 ⁽¹⁾ (MLD/微克)	酶活性 ⁽²⁾ (%)	结合力 ⁽³⁾	半胱氨酸 数目
毒 素	58,350	25~30	100	+	4
类 毒 素	-	0	0	-	4
A 片 段	21,150	0	100	-	1
B 片 段	37,200	0	0	+	3
CMR ₄₅	42,000	微量 ⁽⁴⁾	100	-	2
CMR ₁₀₇	58,350	0	0	+	4
A ₄₅ B ₁₀₇	58,350	25~30	100	-	4

(1). 1个MLD, 在第4或第5天使250克豚鼠致死的毒素量。

(2). “缺口”和还原后ADP—核糖基化活性, 以A片段活性为100%。

(3). 同毒素(或¹²⁵I—毒素)在敏感细胞膜上竞争受体的能力。

(4). 如脑内注射则死亡(致死量为1~2微克/公斤动物)(Pappenheimer等, 1982)。

出来的CRMs中最有兴趣的是CRM₁₀₇。虽然CRM₁₀₇因为在其A片段上有一错义突变而无酶活性,但它在血清学上和毒素似乎是不能互相区分的。接种家兔和豚鼠,甲醛处理的CRM₁₀₇所产生的抗毒素恰如甲醛类毒素所产生的抗毒素效价同样高(Pappenheimer等, 1972; Porro等, 1980)。

β —噬菌体有一多角形的头部,直径约45Å,尾长240Å。 β —噬菌体的基因组由大约35Kb(千信息单位)的双股DNA所组成。形态学上, β —噬菌体与研究最多的 λ 大肠杆菌噬菌体类似。当提取并在电子显微镜中检查时,其染色体可见为一直线形

缺乏活性的抑制物蛋白。还有一类构成 $\beta\text{ct}^{i^{ox}}$ 噬菌体突变体的操纵子缺乏和铁抑制物接和的能力 (Murphy等, 1976; Welkos等, 1981)。

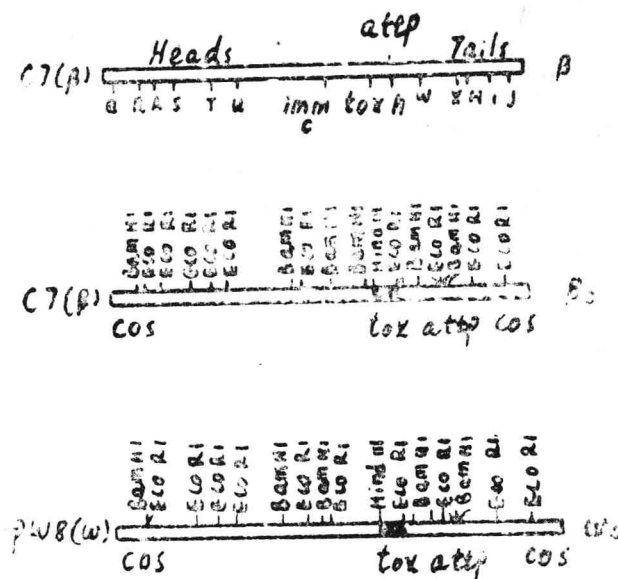


图1 C7(β) $^{i^{ox}}$ 白喉杆菌β-噬菌体DNA和PW8菌株ω-噬菌体DNA的基因和物理图谱, 表明了tox操纵子的位置。(上) β-噬菌体基因图谱 (Singer, 1976)。(中) 透明斑突变体βc的物理图谱 (Costa等, 1981)。(下) ωc的物理图谱 (Rappuoli等, 1983a), 注意ω噬菌体比β噬菌体稍大, 由于后者tox操纵子两端具有短小的嵌入顺序。

棒状杆菌β噬菌体的简化基因和物理图谱如图1所示。已经检查的所有毒原性棒状杆菌噬菌体, 不论其地理来源如何, 皆与β噬菌体密切相关。白喉杆菌轻型、重型和中间型的毒原株, 其DNA的限制酶消化物在琼脂糖胶电泳上的斑点吸印到硝基纤维素上 (Southern法), 用 ^{32}P 标记的缺口翻译的 (^{32}P -nick translated) β-DNA探针与之杂交, 这些斑点 (指DNA片段—译者) 表现了高度的同种性 (Pappenheimer, 1982)。

利用分子生物学技术和基因工程, 现在能使我们回答若干与毒素产生有关的从来令人迷惑的问题, 并能让我们创造出高产无毒蛋白 (作为免疫制剂用) 的溶原菌。例如, Rappuoli等 (1983a) 最近发现PW8菌株含有双套tox操纵子, 这部分地说明了这一非典型中间型菌株产毒能力高的原因。诱导C7(β)菌株的基因成为双倍或三倍已成可能, 故此其每个细胞的毒素产量亦变为二倍和三倍 (Rappuoli, 1983b)。在还远的将来, 克隆为B片段上的无毒抗原决定簇 (产生中和毒素的) 编码的tox基因部分将成为可能。这些无毒蛋白的基因, 假在克隆在大肠杆菌中, 即将不受铁抑制物的支配。用无毒蛋白作原料来制备人用免疫制剂的优点是不需要进一步解释的。

IV. 白喉毒素和类毒素

A. 毒素的生产

由于甲醛白喉类毒素的发现, 认识到一种自动无毒免疫制剂终于可用于白喉的预防, 因此生产大量的高效价毒素来制备类毒素就成为急需。不久便出现了大量的制造白喉毒素经验式方法的文献。很明显, 从一开始白喉杆菌生长的良好条件就与其产毒条件不一致。常常因为不能确定的原因, 某个试验室高产量的培养基在另一试验室则产量不高。直到30年代末期Mueller等进行了关于白喉杆菌营养的工作以前, 白喉毒素的制备与其说是科学不如说是艺术。一旦解决了细菌最优生长条件, 最适的高产量产毒条件便能研究成功 (Mueller等, 1941)。现在每立升培养基可常规获得高达0.5克的毒性蛋白 (Edwards, 1960; Righelato等, 1969)。

进一步讨论下述的条件对优良的生长和产毒都是十分重要的。

1. 必须选择适宜的菌种。
2. 因为白喉杆菌是严格的好气菌, 因之氧的供应不能使细菌利用受到限制。
3. 作为能源的葡萄糖必须不断供应, 但应在生长允许的浓度内, 以便使pH永不低于6.5~7.0。
4. 最后, 培养基的无机铁离子含量必须低并要小心地控制。

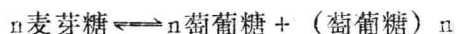
仅仅携带tox结构基因噬菌体的溶原性细菌才能产生白喉毒素。1896年ParK和Williams从一例白喉轻症病人咽喉分离到的白喉杆菌非典型菌株 (N0.8) 能产生大量的白喉毒素。实际上, 自此并未发现较该株产毒更高的菌株。从白喉病例分离到的典型菌株, 甚至在流行过程中引起死亡率特别高的菌株, 每个菌细胞也很少能产生PW 8株产毒量的5~10%。因此数世纪来传代的PW 8株, 一直在全世界用于生产毒素来制备类毒素。

在培养基中的铁浓度使细菌生长受到限制, 细菌体内铁含量在下降, tox操纵子解除抑制之后, 细菌在生长的终末直线期, 白喉杆菌才合成和释放毒素。因此为获得高产毒素, 应该选择在培养基中铁耗尽之前, 允许细菌尽可能生长的那些条件。很明显, 除铁以外, 其他主要营养成分都必须过量存在。Raghelato等 (1969) 用一种恒化器限制铁的供应, 当菌细胞铁含量为1.2微克原子Fe/克细菌蛋白之际, PW 8菌株的变异株CN2000的毒素合成的速度最高。

与其他典型白喉杆菌不同, PW 8株利用黄素蛋白而不用细胞色素 $a+a_3$ 作为末端氧化酶。因此细菌的氧消耗速度与氧分压 (PO_2)、甚至达到或高于大气压的氧分压成正比 (Pappenheimer等, 1962)。为了保证氧气的适量供应, 空氧或氧气在压力下通入毒素发酵罐内, 并用高速搅拌的方法使其分散。假如有其他生长因素过量存在, 保持34~35°C适宜的温度, 那么最后的细菌产量每立升可达20~30克干重!

另外决定产量的重要因素是pH控制和作为能源的葡萄糖的供应方式。假如葡萄糖过量存在或者氧利用受到限制, 那么氧化是不完全的, 醋酸、丙酸和乳酸堆积, pH下降而生长停止。在任何时候pH降到6.0~6.5, 毒素是不能产生的。因此葡萄糖的供应

必须以生长允许的量有限，这可用一种恒化器来完成。但经典的方法是采用无葡萄糖的精制麦芽糖作为主要的能源。Gale (1959) 的工作证明了为什么麦芽糖是一种优良的能源。她证明，PW 8 株的提取物中含有一种特异的多聚麦芽糖酶，和从大肠杆菌、脑膜炎球菌以及某些其他细菌分离出来的淀粉麦芽糖类似，可催化如下反应：



麦芽糖对酶的亲和力十分弱 ($K_m=0.7M$)，因此甚至当培养基中含 2 % 麦芽糖 (0.06M) 的情况下，葡萄糖也是缓慢地被释放并在生长允许限度范围以内。Righelato 等 (1969) 用恒化器中的葡萄糖来限制细菌生长的速度，高产量的毒素可持续产生达数周之久。当细菌群体的密度保持在相当于 3.15 克细菌蛋白/立升，而生长速度仅仅是 0.05 克/小时的时候，每克细菌蛋白可持续产生多于 0.3 克的毒素蛋白。换言之，毒素合成的比率大约是所产生的全部蛋白的 30%！将 PW 8 株的浓菌悬液培养在无铁培养基中，以琥珀酸盐作为唯一的能源，可获得更高的毒素合成比率。

B. 白喉毒素的精制

在前节所述条件下，白喉毒素可构成白喉杆菌 PW 8 株合成全部蛋白的 5~10%，细胞外蛋白的 75%。因此分离高纯度和高收率的毒素蛋白是比较容易的。因为近年来精制细菌毒素的一般方法在另处已有评论，故在此节将不讨论操作细节 (Alouf 等, 1970; Pappenheimer 等, 1972; Chung 等, 1977)。最近 Collier 等 (1982) 已成功地制备出适于三维 X 光分析用的白喉毒素结晶。

关于精制的若干一般注意事项在下面提一提还是有价值的。细菌合成并释放白喉毒素于细胞外培养基中，是在生长发育的终末期，它是一种单纯的多肽链。当细菌铁含量降低且生长速度减慢到低水平的时候，菌体变得越来越易碎且不可避免地会发生某种程度的自溶，这导致各种类型的降解酶如蛋白酶、核酸酶和过氧化物酶的释放。因此在生长将要完全停止之前应当收获毒素，在精制前应当将粗培养滤过液的保存时间减低到最短。即使保存在冷处，粗培养滤过液中的毒素也将以不同方式缓慢降解并丧失毒性。

Paul Ehrlich (1897) 早已观察到，毒素培养滤过液缓慢丧失毒性可达 80% 或更多，而与抗毒素的结合力无明显损失。Ehrlich 命名此种非活化产物为“类毒素”。这种自然类毒化大概是过氧化过程的结果。这种现象和 Agner (1950) 研究的结果类似。Agner 观察到，在微量过氧化氢和某种可透析基质（培养液中的）存在的情况下，精制毒素可被各种过氧化物酶迅速转化为黄褐色的类毒素。PW 8 菌株已知含有活性过氧化物酶和高浓度触酶，且过氧化氢是其黄素蛋白末端氧化酶不断自家氧化的产物

(Pappenheimer, 1962)。任何曾经精制白喉毒素的人都知道，分离出完全无色的产物，特别是用保存过久的培养滤过液作原料，是十分困难的。经过单纯的硫酸铵沉淀随后进行透析，毒素即变得稳定，并可在冷处保存很久而毒性没有损失。

粗制品在保存过程中也发生蛋白降解。为 168 位胱氨酸所环封的 14 个氨基酸暴露环含有三个精氨酸残基 (Delange 等, 1976)，此环对丝氨酸蛋白酶的“裂口”作用十分敏感。长期贮存后毒素分子进一步

C. 白喉毒素分子

1. 对动物的毒性

Paul Ehrlich给最小致死量(MLD)下的定义是,注射一定量的毒素于250克的豚鼠皮下,在第4或第5天使动物致死的毒素量叫最小致死量。每个剂量只用一只动物,测定的MLD准确性大约在20%误差范围以内。图2表明豚鼠的静脉注射剂量活存曲线(Baseman, 1970)。可注意到,低剂量的毒素,注射量一点小的变化便对活存时间

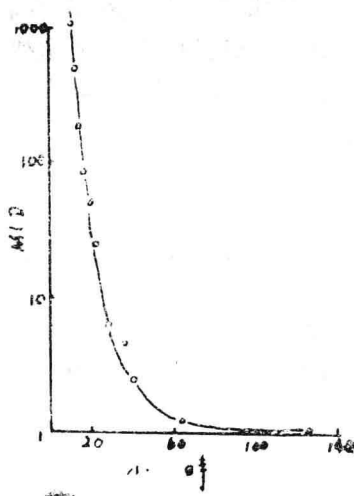


图2 豚鼠中毒活存时间。注射递增量的白喉毒素于动物(300克)静脉内,注后120~125小时引起动物死亡的毒素量作为一个MLD。每一点代表至少二只动物的平均值(Baseman等1970)。

具有比较大的作用,然而甚至特大剂量也不能使动物在注射后10~12小时以前死亡。最纯的精制毒素大约含25MLD/微克蛋白。根据体重,鸽子、家兔和人类皆大致与豚鼠同等敏感($LD \leq 0.1$ 微克毒素/公斤体重)。而另一方面,一般途径注射大鼠与小鼠,其抵抗力大于豚鼠数千倍,但假如注射脑内,则比较小的剂量即能使鼠类致死(Agarwal等, 1959, Pappenheimer等, 1982)。

皮内注射敏感动物,微小剂量的白喉毒素便能产生可见的损伤。用于检查人们对白喉是否有免疫力的锡克氏试验,其毒素剂量($1/50$ MLD或少于1毫微克)便可在无循环抗毒素人们的皮肤上,产生直径大约为2厘米的出血坏死区。 10^8 的毒素分子这样的微量毒素便可引起可见的反应!

※注：因为在世界各地有若干不幸的事件，例如误把毒素当作等价毒素—抗毒素中和液 (Dallas, Texas, 1919; Belgium, 1922; Baden, Austria, 1924; Tashkent, Russia, 1926) 或当作类毒素 (Italy, 1933; Kyoto, 1948) 接种儿童，使我们对人类白喉毒素中毒情况了解很多。这些意外的事故，大约涉及1000名儿童，其中至少130名死亡。Wilson (1937) 对此已作出评论。在这些事件中，活存是年令亦即体重的函数。当剂量/公斤体重大时，几天之内便可死亡，症状有呕吐，腹泻，最后昏迷和抽搐 (大概是低血糖性的)。全部病例局部反应严重，难以忍受的痛苦并变成坏死。活存7~10天以上的儿童，常见有多发性神经炎，悬雍垂和软腭麻痹。一种共同的症状是集聚性斜视。如死亡延迟到10天以上或达到42天，儿童死于心肌变性和隔肌麻痹。注射毒素后所观察到的这些症状，具有白喉疾病的所有特点，亦即在局部损伤处生长的细菌缓慢释放毒素从而引起各种症状的特点。

2. 细胞毒性

Placido等 (1957) 和Lennox等 (1957) 证明，小量的白喉毒素对来自敏感种属哺乳动物细胞培养具有致死作用。Strauss等 (1959) 证明，毒素阻断标记氨基酸掺入到培养中Hela细胞合成的蛋白质中，如此便提供了一种定量研究中毒动力学的方法。如表Ⅱ所示，肾细胞似乎是特别敏感的，所培养的非洲绿猴肾细胞，暴露在仅仅 10^{-13} M的

表Ⅱ 白喉毒素对某些细胞系的细胞毒性作用⁽¹⁾

种属 (组织来源)	细胞株	细胞毒性剂量 ⁽²⁾	每个细菌受体数目的近似值
非洲绿猴 (肾)	Vero, CV-1, BSC	0.1~0.2	150,000
小鸡	成纤维细胞	1.5	—
乳仓鼠 (肾)	成纤维细胞	2.5	7.300
中国仓鼠卵巢	CHO	4	—
人 (宫颈)	Hela	25	—
大鼠 (神经鞘细胞)		500~1,000	少许
大鼠成纤维细胞	Y-1	710,000	无?
小鼠 (脂肪组织)	1929	>10,000	无?

(1)：引自Middlebrock等 (1977) 和Pappenheimer等 (1982)。

(2)：24小时内减少蛋白合成50%所需毒素的微微克分子/立升。
毒素中，24小时后其蛋白合成速度便减少50%。作为一种近似值，细胞毒性的剂量依赖于每个细胞表面上结合毒素受体的数量 (Middlebrock等, 1977)。