

罗海波 鲍行豪 主编

人民卫生出版社

细菌毒素研究进展

细菌毒素研究进展

罗海波 鲍行豪 主编

朱智勇 何浙生 吴清明 项一萍

陆淼泉 罗海波 祝文娴 姜训 编写

谢占泰 鲍行豪

刘秉阳 审阅

人民卫生出版社

细菌毒素研究进展

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)

人民卫生出版社印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行

787×1092毫米32开本 10 $\frac{1}{2}$ 印张 226千字
1983年6月第1版 1983年6月第1版第1次印刷
印数: 00,001—5,900
统一书号: 14048·4332 定价: 1.10元
〔科技新书目46—36〕

序

近二十年来,尤其是七十年代以来,免疫化学及分子生物学的不断发展,促使各国学者对细菌毒素的本质及其致病机理进行了广泛深入的研究。基本上搞清了毒素的超微结构、化学组成、理化性状、制备与纯化、毒素的致病作用、发病机理、毒素的检测方法与毒素的免疫问题。为了帮助临床医师、微生物学及生物制品工作者提高对白喉、破伤风、小儿腹泻、脑膜炎、中毒性菌痢、霍乱、肉毒中毒、葡萄球菌食物中毒等疾病发病机理的认识,以及掌握毒素的性质,以便进一步发展新的免疫制剂与提供有效的防治措施,我们参考了Montie 主编的“Microbiol Toxins”及 Bernheimer 主编的“In Mechanism In Bacterial Toxinology”著作,并参阅了七十年代迄今国内外发表的有关文献资料试编《细菌毒素研究进展》一书。鉴于南方各省因蛇毒中毒者为数不少,特邀请上海化工学院蛇毒研究组谢占泰讲师撰写蛇毒一章以供参考。

蒙中国医学科学院流行病学微生物学研究所所长魏曦教授对本书的书名及编写计划提出了许多宝贵意见,刘秉阳教授对全书进行了审阅,在此表示衷心的感谢。

编者等才疏学浅,内容方面难免有不妥及错误之处,尚祈读者批评指正。

编 者

目 录

第一章 细菌内毒素	1
一、内毒素的性质.....	1
二、内毒素的制备和纯化.....	7
三、内毒素的生物学活性.....	9
四、内毒素的检测方法.....	28
五、内毒素的解(减)毒和免疫.....	32
第二章 葡萄球菌肠毒素	41
一、葡萄球菌肠毒素的型别.....	41
二、葡萄球菌肠毒素的制备与纯化.....	42
三、影响葡萄球菌肠毒素产生的因素.....	44
四、葡萄球菌肠毒素的结构、化学组成与理化 性质.....	46
五、葡萄球菌肠毒素的测定方法.....	48
六、肠毒素的致病作用及其机理.....	51
第三章 链球菌溶血毒素O	55
一、链球菌溶血毒素O的一般特性.....	55
二、链球菌溶血毒素O的制备与提纯.....	56
三、链球菌溶血毒素O的生物学特性与致病作用.....	58
四、链球菌溶血毒素O溶血机理与影响因素.....	65
五、抗链球菌溶血毒素O抗体的测定方法及临 床评价.....	68
第四章 链球菌溶血毒素S	74
一、SLS 的类型.....	74

二、SLS 的合成及影响毒素产生的因素·····	77
三、SLS 的纯化及其化学本质·····	81
四、SLS 的毒性作用及机理·····	83
五、SLS 的致病作用·····	90
六、SLS 的免疫问题·····	92
第五章 大肠杆菌肠毒素·····	96
一、概 述·····	96
二、大肠杆菌肠毒素的种类·····	97
三、大肠杆菌肠毒素的分离、纯化及理化特性·····	98
四、大肠杆菌肠毒素与霍乱弧菌肠毒素之间的 相互关系·····	103
五、大肠杆菌肠毒素的致病机理·····	105
六、大肠杆菌肠毒素与大肠杆菌血清型别的关系··	107
七、大肠杆菌肠毒素的测定方法·····	109
八、大肠杆菌肠毒素的免疫问题·····	115
九、大肠杆菌 K ₉₉ 抗原与产肠毒素的关系·····	116
第六章 志贺氏痢疾杆菌外毒素·····	120
一、概 况·····	120
二、毒 力·····	121
三、毒素的制备和纯化·····	122
四、毒素的理化性质·····	124
五、影响毒素合成的因素·····	125
六、毒素的作用方式与机理·····	127
七、毒素的免疫学和测定方法·····	131
八、致病性·····	132
第七章 霍乱弧菌肠毒素·····	135
一、霍乱肠毒素的制备与纯化·····	135

二、霍乱肠毒素的结构与理化性质·····	141
三、霍乱肠毒素的生物学特性·····	145
四、霍乱肠毒素的致病作用——霍乱的发病机理··	148
五、霍乱肠毒素的测定方法·····	152
六、霍乱的免疫·····	156
第八章 白喉杆菌外毒素·····	164
一、 β 棒状杆菌噬菌体与白喉杆菌外毒素之间 的关系·····	164
二、白喉杆菌外毒素的提取及纯化·····	166
三、铁在白喉杆菌外毒素产生过程中的作用·····	167
四、白喉杆菌外毒素的结构及其性质·····	169
五、白喉杆菌外毒素的毒性作用·····	171
六、白喉杆菌外毒素的检测方法·····	178
第九章 绿脓杆菌外毒素·····	182
一、绿脓杆菌外毒素的制备与纯化·····	182
二、绿脓杆菌外毒素的结构、活性与理化性状·····	185
三、影响绿脓杆菌外毒素产生的一些因素·····	189
四、绿脓杆菌外毒素的致病作用与机理·····	189
五、绿脓杆菌外毒素的测定方法·····	192
六、绿脓杆菌外毒素的免疫问题·····	193
第十章 鼠疫毒素·····	196
一、概 况·····	196
二、鼠疫毒素的纯化和性质·····	197
三、鼠疫毒素检测方法·····	204
四、鼠疫毒素的合成和代谢·····	205
五、鼠疫毒素的作用机理和方式·····	209
第十一章 炭疽杆菌毒素·····	218

一、炭疽毒素的命名及活性·····	218
二、炭疽毒素的制备与提纯·····	220
三、炭疽毒素的理化性状·····	222
四、炭疽毒素的测定方法·····	224
五、炭疽毒素的致病作用与机理·····	227
第十二章 破伤风毒素·····	232
一、破伤风毒素的制备与纯化·····	232
二、破伤风毒素的理化性质·····	236
三、破伤风毒素的结构和作用·····	238
四、破伤风毒素的作用方式与机理·····	247
五、破伤风毒素的测定方法·····	250
六、破伤风毒素的免疫·····	252
第十三章 A型产气荚膜杆菌外毒素·····	257
一、概 述·····	257
二、 α 毒素·····	257
三、 θ 毒素·····	265
四、 κ 毒素·····	267
五、 μ 毒素·····	268
六、 ν 毒素·····	269
七、其它活性成份·····	269
八、A型产气荚膜杆菌致病特点·····	270
九、产气荚膜杆菌毒素的免疫问题·····	273
第十四章 肉毒杆菌神经毒素·····	277
一、神经毒素的分子结构与理化特性·····	277
二、神经毒素的制备与提纯·····	279
三、神经毒素的作用机理·····	282
四、肉毒中毒的临床类型及流行病学·····	283

五、肉毒杆菌和神经毒素的检测方法·····	288
第十五章 蛇 毒 ·····	293
一、蛇毒的一般性质·····	293
二、蛇毒的化学组成·····	296
三、蛇毒的药理作用及其作用机制·····	306
四、蛇毒的免疫·····	321

第一章 细菌内毒素

细菌毒素分内毒素和外毒素。内毒素主要见于革兰氏阴性菌，也存在于革兰氏阳性菌、真菌、支原体及某些动植物组织中。内毒素在细菌生活时不扩散到环境中，仅当细菌死亡裂解后释放出来。

细菌内毒素首先由 Boivin 等 (1933) 用三氯醋酸自鼠伤寒杆菌中提出。当时因其一般蛋白质反应呈阴性，故称为脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) 抗原，后人称为 Boivin 型抗原。随后其他学者用不同方法从各种革兰氏阴性菌中提出与 Boivin 型抗原相似的物质，该物质具有多种毒性反应，如致热性、白细胞增多（小剂量）或减少（大剂量）、血糖增高以及对小白鼠致死作用等，因而称为内毒素，以别于外毒素。另一些学者则因其具有 O 型菌的特异抗原性，命名为 O 抗原或菌体抗原，以别于 H 抗原或鞭毛抗原。目前似乎将内毒素与脂多糖作为同义语。虽然两者活性基本上相似，但实质上其化学成分和生物学活性均有所差别。

一、内毒素的性质^[1~11]

1. 内毒素的一般特性

(1) 毒性较小，且具耐热性，一般需煮沸或更高温度才能破坏。

(2) 作用无特异性。内毒素致病症状和病理变化大致相同，如发热、白细胞增高等。小儿暴发性脑膜炎与中毒性痢疾虽然病原不同，但其发病基础均系由内毒素所引起的急性

微循环障碍，尤其是小动脉痉挛，用阿托品或茛菪硷等血管扩张药进行治疗，可取得一定疗效，即所谓异病同治。少量内毒素所产生的免疫力可增强机体的防御功能，属非特异性免疫。

(3) 免疫动物时，形成抗体的量较少，所产生的抗体主要为 IgM。

2. 内毒素的物理性质及电镜下的形态结构 内毒素为细菌细胞壁的最外层结构，系类脂、多糖、蛋白质的复合物。由亲水性多糖和疏水性类脂结合成为一大分子的脂多糖，故为两性物质(amphoteric)。因具有磷酸根基团，故表面带有阴电荷，但在进行免疫电泳时，因电渗作用，移向阴极。

由于细菌的来源不同和提取方法不一，各学者报导的脂多糖颗粒的大小、形态差异较大，其分子量约 $1 \sim 20 \times 10^6$ 。根据对大肠杆菌、百日咳杆菌及沙门氏菌的脂多糖的电镜观察，证实为各种形态的膜碎片：线状或细丝状、带状、小点状、蛇样、环状、碟状、小泡状以及板状等，均具有相似的表面结构。

Fukushi (1977) 发现明尼苏达沙门氏菌的脂多糖由分散的、相同的小叶均匀排列组成，而其粗糙型变异株（基核多糖成分减少或缺如）的小叶直径缩小且排列成洋葱样结构。Acker 等(1976)指出，结肠炎耶氏菌、鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌提取的脂多糖中，含有两股相同的双螺旋亚单位，后者又由四条细丝组成。

Shands (1971) 等提出脂多糖在水溶液中以双层脂多糖形态存在，非极性类脂位于内部。脂多糖颗粒的一半含有基核多糖，类脂 A 以共价键连于其一侧，O 抗原多糖链则从对侧伸出如毛发。两个相同的结构合并成双层，类脂位于中央，

即成脂多糖颗粒 (图 1-1)。

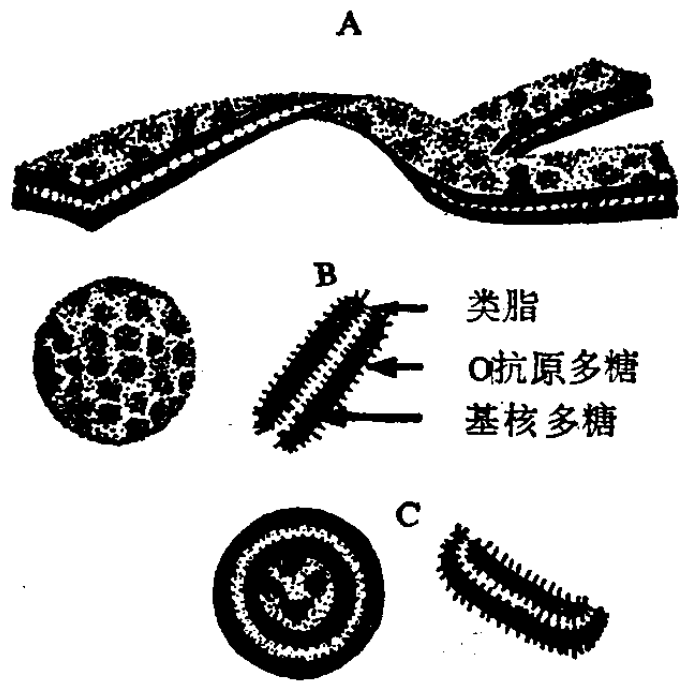


图1-1 脂多糖双层结构的模式图
A 带状构造； B 螺旋构造； C 环状构造

3. 内毒素的化学组成及其功能 内毒素由脂多糖与蛋白质复合而成，而脂多糖又由化学和生物学性质不同的三部份组成，即O抗原多糖链、基核多糖及类脂A，其结构见图1-2,3。

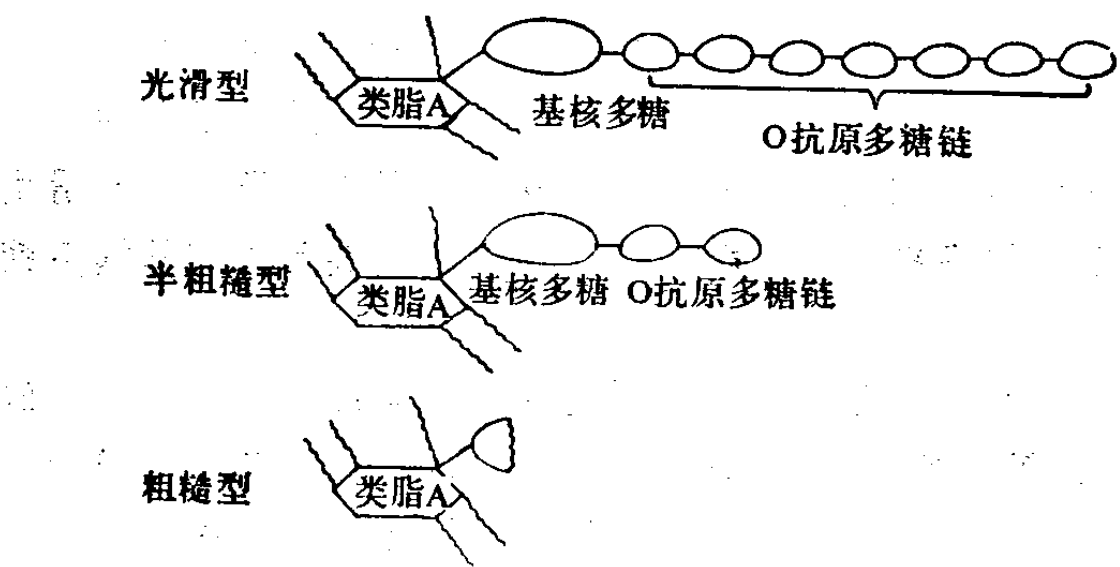


图1-2 细菌脂多糖的基本结构

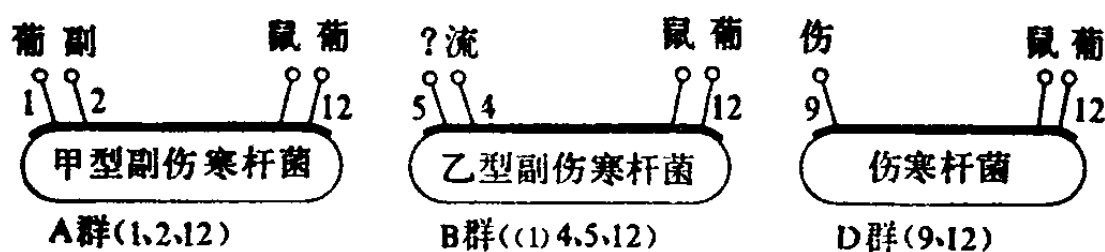


图1-4 末端单糖与O抗原特异性关系的模式图

葡：葡萄糖 副：副伤寒杆菌糖 鼠：鼠李糖 流：流产杆菌糖
伤 伤寒杆菌糖

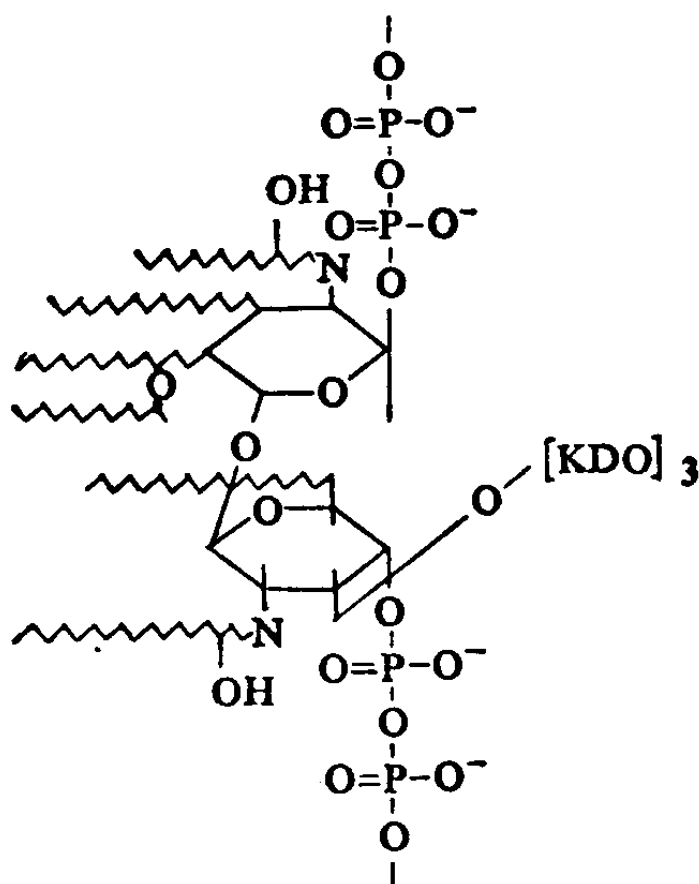


图1-5 类脂A的化学结构

脓杆菌缺少庚糖。厌氧的梭形杆菌(*Fusobacterium*)具有与沙门氏菌相似的化学成分；但厌氧的类杆菌，如黑色素类杆菌(*B. melaninogenicus*)和脆弱类杆菌(*B. fragilis*)则缺少KDO和庚糖。霍乱弧菌缺少KDO。基核多糖近端的庚糖通过三个KDO与类脂A以共价键相联，该结合键易被弱酸所破坏。基核多糖的化学结构为一大群细菌所共有。Nowotny等

(1975) 首次报导基核多糖具有骨髓细胞集落形成刺激活性 (bone marrow cell colony formation stimulation)。

(3) 类脂 A: 一般方法提取的内毒素中有两种类脂, 即类脂 A 和类脂 B。类脂 B 与内毒素其他成分结合较弱, 一般脂溶剂即可将其提出; 可能属于脑磷脂, 无生物学活性。除去类脂 B 对内毒素活性无影响, 因此类脂 B 不是内毒素真正成分。类脂 A 则与多糖链牢固结合形成脂多糖。类脂 A 的结构如图 1-5 所示: 系由二个氨基葡萄糖 (glucosamine) 在 β 1-6 位相连作为骨架, 连以长链脂肪酸和焦磷酸盐而成; 前者分别以酯键和酰胺键与氨基葡萄糖相连。

类脂 A 成分中, 脂肪酸约占 70~80%。各种细菌的脂肪酸性质和排列不一。肠道细菌类脂 A 的脂肪酸中含有羟化脂肪酸, 尤其羟化肉豆蔻酸 (β -hydroxymyristic acid) 为一特定成分, 而其他菌则无或有其他羟化脂肪酸。厌氧黑色素类杆菌的脂肪酸很独特, 可能为环状链或奇链脂肪酸, 同时缺少 β -羟化肉豆蔻酸。类脂 A 不溶于水, 而溶于吡啶、三乙胺、二甲基亚砷及氢氧化钠等。

Westphal 等 (1960) 实验报导类脂 A 是内毒素的生物活性成分。Otto lüderitz 等 (1973) 采用两种方法证实类脂 A 的活性。其一为将多糖链缺陷变异株的脂多糖中的 KDO 残基的化学结构加以改变, 脂多糖的活性 (小白鼠和鸡胚致死性、致热性、抗补体活性) 不变, 说明毒性不在多糖部分, 而在类脂 A; 其二是将分离制得的不溶性类脂 A 和水溶性载体如血清白蛋白等结合, 成为稳定的可溶性的类脂 A, 则可直接测定其活性。试验证实类脂 A 具有小白鼠致死性、致热性、抗补体性以及能引起骨髓坏死、鲎珠试验阳性。类脂 A 活性虽较原始脂多糖略低, 但仍说明脂多糖的活性中心系类脂 A;

而多糖的存在有助于不溶性的类脂A易于溶解而发挥作用。类脂A的毒性主要在于其以酯键相连的脂肪酸，若后者被水解，类脂A或脂多糖即失去毒性。各种革兰氏阴性菌的类脂A的化学成分和结构虽有差异，但极相似，这可能与内毒素的活性，包括对人体所引起的反应基本相同有关。

类脂A具有免疫原性，注入动物体内可以产生相应抗体。如以整个菌细胞或脂多糖进行免疫，类脂A抗体的产生将受到很大限制，必须使类脂A在菌细胞表面充分暴露，方能刺激动物产生特异性抗体，抗体形成时间与多糖抗体相似。类脂A抗体虽不能由脂多糖诱导产生，却能与之结合，且有明显种间交叉反应。类脂A抗体与细菌外层脂多糖的反应，可能起调理作用，促进吞噬。如大肠杆菌经类脂A抗血清处理后，易被吞噬和杀灭。类脂A抗体能增强血液对肠炎沙门氏菌的清除作用。

(4) 蛋白质：蛋白质以共价键连于类脂A。Westphal (1952)、Webster(1955)等先后证明蛋白质与内毒素活性无关。近年则认为蛋白质也具有活性。Homma(1976)报导绿脓杆菌内毒素的蛋白质具有抗感染的活性。Morrison(1976)和 Sultz(1976)证实大肠杆菌蛋白质是B细胞的有丝分裂原。Woker(1971)指出粘质沙雷氏菌的蛋白质显示较强的毒性。然而Galanos(1979)以不含脂多糖的蛋白成分进行研究，认为蛋白成分无原始毒性。

二、内毒素的制备和纯化〔1,4,12,13〕

内毒素或脂多糖的制备方法甚多，各种方法所得的制品在纯度、活性、产量等方面均有所差异。目前应用较多的是 Boivin 和 Mesrobian (1935) 的三氯醋酸法和 Westphal 等

(1952)的水酚法。此外，有 Morgan (1937)的二乙二醇法、Ribi 等(1959)的水乙醚法、Leive等(1968)的 EDTA提取法、Galanos等(1969)的PCP 提取法以及 Morrison 等(1975)的水丁醇法等，兹择数法作简要介绍。

1. 三氯醋酸法 一般应用于从光滑型细菌或其分离的细胞壁提取内毒素，所得制品主要为脂多糖，也含蛋白质和脂质。其方法各书均有介绍，此处从略。

2. 酚水法 有热酚水法和冷酚水法。用于光滑型和粗糙型细菌的提取。该法的粗提物常含大量非脂多糖物质，需经透析、超速离心以及核糖核酸酶处理等步骤进行纯化。

3. PCP 提取法 专门适用于从粗糙型变异株中提取粗糙型脂多糖。该法系在 10~20℃ 条件下，将杆菌以 PCP 混合物（石炭酸、氯仿、石油醚混合物）进行提取。此法提取的脂多糖系水溶性形式，沾有的蛋白质和核酸很低。

4. 水丁醇法 Morrison 等(1975)所设计的水丁醇法较酚法简便、温和，适用于提取大肠菌和沙门氏菌的脂多糖；对其性质影响很小，所得制品含蛋白量少，约 1%（重量）。由于丁醇不能灭活制品中酶类，致在制备过程和储存时，类脂 A 常发生降解。同时，制品所含还原磷酸盐在储存中易丧失，宜加注意。

水丁醇法步骤如下：提取过程在 0~4℃ 进行。将细菌悬于 0.85% NaCl 中，浓度约 0.25 g/ml。用磁搅拌器搅拌，使之完全分散。加入等量（体积）H₂O 饱和的丁醇，边加边搅，加毕，继续搅 15 分钟，然后以 35000 g 离心 20 分钟，取出下层水相保存。丁醇相和不溶性沉淀物重复提取两次（每次只用半量的 0.85% NaCl）。混和三次提取的水相提取物，经离心去沉淀，于上清液中加入蛋白酶（以 0.2M 磷酸钠缓