

焦炳华 主编

MOLECULAR
ENDOTOXINOLOGY

分子内毒素学



上海科学技术文献出版社

4222 / 5

分子内毒素学

主编 焦炳华

上海科学技术文献出版社

(沪)新登字 301 号

分子内毒素学

主编 焦炳华

*

上海科学技术文献出版社出版发行

(上海市武康路 2 号 邮政编码 200031)

全国新华书店经销 上海市印刷十二厂印刷

*

开本 850×1168 1/32 印张 12 字数 333,000

1995 年 10 月第 1 版 1995 年 10 月第 1 次印刷

印数: 1—3,000

ISBN 7-5439-0758-5/R·225

定价: 18.00

《科技新书目》367—265

【内容提要】

本书着重介绍了细菌内毒素(脂多糖)的分子结构、生物合成、生物学活性、免疫学特性,及其与机体的相互关系、在临床疾患中的作用,内毒素的制备、检测与去除等方面的基础与临床研究。反映了 80 年代,特别是近年来有关内毒素方面的研究进展,可供医学院校师生、临床医生、微生物学和免疫学工作者,以及食品卫生和兽医工作者参考。

分子内毒素学

主 编 焦炳华

副主编 余伟明 周炳荣

编 者(按姓氏笔划为序)

王梁华	王 路	李鸿勋	李德懿	朱玉平
余伟明	严 烽	何炬斌	周炳荣	周 凯
赵 薇	赵 虎	娄永华	徐道荣	席先成
崔竹金	焦炳华	蔡燕刚	虞喜豪	綦 莉

序

革兰氏阴性菌的致病性以及革兰氏阴性菌脓毒血症时出现的毒性表现是与牢固结合在其细菌外膜中的一种大分子物质即内毒素密切相关的。内毒素介导了感染期间所出现的众多病理生理学反应。早期对革兰氏阴性菌内毒素活性分子提取的尝试得到了含有碳水化合物、脂质、蛋白质、核酸以及细菌其它产物的混合物,但对混合物中活性成分的本质仍然不知。自 50 年代介绍了酚水法作为提取手段后,使得对内毒素化学和生物学特性的系统研究成为可能。主要是对沙门氏菌所进行的化学研究已证实内毒素为脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)成分,由脂质(称为类脂 A)、核心寡聚糖和 O-特异性多糖组成。后一成分一般讲由相同的寡聚糖单位重复联结而成,并作为 LPS 分子的血清学和免疫学决定簇结构。从而已经阐明了 LPS 分子的一般结构特征。

LPS 中的内毒素活性部位为类脂 A 成分,这一点在 50 年代就已作出了推测,并在以后的二十年间得到不断证实。对于类脂 A 作为 LPS 生物学活性分子重要性的认识促进了类脂 A 化学结构的研究。在很早以前就已认识到许多革兰氏阴性细菌的类脂 A 结构具有很大的相似性。在过去的十年间类脂 A 的化学结构得到了全面的阐述。今天,已经非常详细地了解了肠道菌和其他细菌的类脂 A 结构,并且阐明的总数还在不断地增加。

对类脂 A 及其生物合成过程中前体分子化学结构的阐明使得化学合成完全、不完全类脂 A 及其同类物成为可能。大肠杆菌的天然类脂 A 及其合成产物已被证实表达一致的化学、免疫学和生物学特性。合成品无论是现在还是将来对于结构——活性的研究均是极有价值的。

一般认为,内毒素表达生物学活性并不是直接的,而是通过与

合适靶细胞的相互作用从而引起内源性介质的诱导和/或释放而实现的。已经证明肿瘤坏死因子和白细胞介素可介导内毒素的毒性和其他活性。

临床医生对内毒素的兴趣主要是它的毒害作用,工作的重点则集中于预防和治疗休克。特别感兴趣的就是应用许多革兰氏阴性致病菌 LPS 交叉反应性抗体的免疫治疗。对于核心以及类脂 A 共同结构抗体保护作用的研究已证实疗效不大。

除了毒性反应外,内毒素还可发挥许多对宿主有益的生物学活性。其中,诱导对感染的非特异性抵抗力、佐剂活性以及肿瘤坏死活性是很显著的。但是内毒素的高度毒性一直影响了它们治疗应用的开展,并且这也是临床应用不能深入开展下去的主要原因。随着类脂 A 结构的阐明以及化学合成的开展,已有可能针对这一问题采取新的方法。已合成了许多类脂 A 部分结构及其同类物,并且还会有更多的合成产物出现。这些制品目前正在许多实验室进行试验,其目的是找到具有低毒性但仍然保留有显著药理和免疫刺激作用的结构。合成的方法将成为今后十年中内毒素研究中一个令人瞩目的领域。

这篇序言将被译成中文,有关分子内毒素学的专著将以中文出版。这一点是很有价值的,我们希望它将在中国发现感兴趣的读者。

国际内毒素学会名誉主席、
原联邦德国 Max-Planck
免疫生物研究所所长
吕特里茨

前 言

大约于 100 年前(1892~1895 年),德国 Robert Koch 的学生 Richard Pfeiffer 在研究霍乱弧菌感染的发病机理时,发现该菌可产生两种具有不同性质的毒性物质,一种为由活菌合成并释放出来,对热敏感的蛋白质成分即外毒素(exotoxin),另一种为对热抵抗,并且只有当细菌崩解后才能释放出来的非蛋白质成分,他将后一种毒性物质称为内毒素(endotoxin)。

紧接着,意大利的 Engenio Centanni 通过自溶的方法从各种革兰氏阴性杆菌中提取到了类似的毒性物质,他称其为致热毒素(pyrotoxina),因为这类物质在表达毒性的同时始终亦表达显著的发热反应活性。

同时期,德国的 Hans Buchner 证实从多种细菌提取得到的内毒素物质除引起发热外,可引起白细胞数目的改变,并可显著增强机体对细菌感染的抵抗力,从而 Buchner 开创了“非特异性疗法”或“发热疗法”。

纽约的外科医师 William B. Coley 将加热杀死的灵杆菌和化脓性链球菌上清滤液应用于各种恶性肿瘤(特别是肉瘤)的治疗,并取得了较为满意的疗效。他将其应用的细菌上清液称为 Coley 氏毒素。继后,Murray J. Shear 证实 Coley 氏毒素中发挥抗肿瘤作用的物质为内毒素。

但是,内毒素化学本质的阐明是到了 50 年代后才开始的。德国的 Otto Westphal 和 Otto Lüederitz 首先介绍了提取高纯度内毒素的方法——酚水法,使得内毒素的化学和结构分析成为可能,从而开创了内毒素化学和内毒素分子生物学的新时代。

现今已经清楚内毒素(endotoxins)系存在于革兰氏阴性菌细胞壁外膜中的脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)成分。在结构及

功能上具有三个“两性”特征,即属于两性(亲水性、疏水性)分子,携带两极(正、负)电荷,及发挥两相(有益、毒害)作用。内毒素是一类具有高度活性的分子,对机体具有广泛的生物学作用,故而在革兰氏阴性菌感染的发病机制中起着十分重要的作用。革兰氏阴性菌感染时释放的内毒素或静脉注射提取的内毒素,可发生严重的致死性内毒素休克(endotoxin shock),其特征是从休克可逆期到不可逆期的转变期相极短,往往只有数分钟至 2h。故而临床医生常常来不及采取有效的治疗措施。除此之外,如果体内少量应用内毒素,可观察到有显著抗肿瘤、增强机体非特异性抵抗力、抗放射及移植物对宿主的排斥反应等有益作用。

内毒素在化学结构上有两部分具有不同理化性质的成分组成,即多糖成分及脂类——类脂 A(lipid A),前者又可以分为 O-特异性多糖链及核心寡聚糖。O-特异性多糖即先前所称的 O-抗原或 O-因子,由多个寡聚糖重复单位(每个重复单位含 3~6 个糖残基)组成。对于不同细菌产生的内毒素来讲其重复单位的数目(决定链的长短)可由 0(粗糙型内毒素,R-LPS)到 70 个以上不等。O-多糖侧链是革兰氏阴性菌及其内毒素分子中最易变异的表面抗原成分,各种不同种属的细菌其 O-抗原的结构不同,故而它们之间无血清学交叉反应性。正是根据这一点,革兰氏阴性菌(特别是肠道菌)可进行 O-抗原分类。应用 O-抗原相对应的抗体,临床上可以快速进行细菌鉴定。

核心多糖是内毒素组成成分中结构较为恒定的部分,一般由 7~11 个糖残基组成,其中含有内毒素的特征性成分——2-酮-3-脱氧-D-甘露型辛酮糖酸(2-keto-3-deoxy-D-mannooctonate, KDO)及 L-甘油型庚糖。一般讲,同一种细菌,其核心寡聚糖的变异较小,如沙门氏菌属只含一种类型的核心,而大肠杆菌属亦只存在六种核心类型。内毒素中核心寡聚糖的免疫决定基,取决于核心成分末端的糖残基结构,不同种属的细菌,甚至不同类型的微生物,只要其产生的内毒素核心结构一致,即具有血清学交叉反应性。如沙眼衣原体产生的 Re-型内毒素与明尼苏达沙门氏菌 R₅₉₅

的 Re 内毒素结构一致,故而它们具有交叉反应性。

内毒素的活性部位为类脂 A,它可以介导几乎所有的内毒素生物学反应。类脂 A 为一种特殊类型的磷脂,它通过核心的 KDO 成分而与内毒素的多糖部分结合。应用温和酸控制水解可将类脂 A 从内毒素分子中裂解出来,此称为游离类脂 A(free lipid A),而存在于完整 LPS 中的类脂 A 称为结合类脂 A(bound lipid A),游离类脂 A 在自然界中是不存在的。类脂 A 的骨架是由一个 $\beta 1'-6$ -糖苷键相联的 D-氨基葡萄糖双糖单位所组成,骨架还原端的 C_1 位及非还原端的 C_4' 位均有磷酸基团所取代。骨架的羟基及氨基可由羟基脂肪酸或脂肪酰脂肪酸所取代。许多不同种属的细菌甚至在分类学上相差甚远的细菌,均具有基本一致的类脂 A 骨架,它们间的主要差别则是在骨架上取代脂肪酸碳原子数目或/和磷酸基团的取代不尽一致。随着细菌的进化,其所合成的类脂 A 结构愈为复杂,故而研究类脂 A 结构对于了解细菌的进化具有重要的意义。许多不同种属细菌所产生的类脂 A 具有较好的血清学反应性。类脂 A 为一种半抗原,但如与载体结合(复合抗原)则可诱导高滴度抗体的产生。

由于分析与合成化学家的密切合作,肠道菌(如沙门氏菌及大肠杆菌)的类脂 A 已进行了全分子化学合成。化学合成的类脂 A 与天然类脂 A 在许多生物学系统中均能发挥一致的生物学反应。随着其它类脂 A 及其众多衍生物或同类物的化学合成,目前已有可能从分子/细胞水平上研究类脂 A 结构与功能的关系。

故而目前内毒素方面的研究进入了一个新的篇章。近期及今后一段时间内国内外内毒素研究领域大致集中于下列几方面:

一、表达不同的生物学活性的分子基础

如上所述,内毒素一方面表达有益作用,另一方面又可表达毒害作用,故而应用内毒素及其类脂 A 的化学降解片段,特别是化学合成的衍生物,可从分子水平了解内毒素(类脂 A)结构中分别表达有益和毒害作用的最小结构片段。例如,已经合成了类脂 A 一种称为 GLA-27 的衍生物,这一分子系携带 3 个脂肪酸残基及

1 个磷酸基团的 D-氨基葡萄糖单糖结构,不表达明显的毒性,但可发挥显著的抗肿瘤及抗病毒感染活性。这类衍生物从而可进行临床试验,应用于临床抗肿瘤及抗病毒治疗。

二、内毒素诱导的内源性调节因子

体内应用内毒素,可直接地或间接地刺激免疫活性细胞产生多种内源性调节因子,如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF),干扰素(interferons, IFNs),白细胞介素(interleukins, ILs),集落刺激因子(colony-stimulating factors, CSFs)等。这类内源性因子可发挥免疫调节从而起到增强机体抵抗力的作用。TNF 系由激活的单核巨噬细胞系统所产生的一种分子量为 17KD 的蛋白质。体内直接应用 TNF 时可见到实体肿瘤发生出血坏死,最终肿瘤消失,动物或病人得到彻底痊愈。如果以刺激剂诱导荷瘤动物或人产生内源性 TNF,则可观察到肿瘤的消失现象与体内 TNF 水平成正相关关系。故而,深入了解这类内源性因子的产生、作用机理,特别是探索临床应用的可能性,可为临床抗肿瘤治疗找到新的方法,具有重要的现实意义。

三、内毒素与机体免疫系统的相互关系

我们生活在充满内毒素的环境中,自我们出生的那天起,我们就受到内毒素细菌(特别是正常肠道菌)的感染,并与内毒素的“共生”状态将持续整个人生。即使是消毒的食物亦含有内毒素,因为内毒素相当耐热,200℃干烤亦需 2~4h 才能使内毒素彻底破坏,因而我们不可能创造一个严格的“无内毒素”生命。动物实验已证明,所谓的“无菌动物”对内毒素及细菌感染高度敏感,因而这种动物患细菌感染时的死亡率极高,而一般的动物则对细菌感染及应用内毒素有相当的基础免疫力。这一事实说明内毒素对于机体免疫系统的发育成熟起着重要的作用。我们的祖先在几千万年的进化过程中与自然界作斗争的结果形成了我们现在的“内毒素适应状态”。故而内毒素在人类进化史上具有重要的意义。可以设想,日常生活中体内极微量内毒素的不断进入,将伴随人类整个生命过程,并成为一种具有高度活性的“外激素”(exo-hormone)。

四、内毒素在高级动物体内的动力学变化及其意义

内毒素注入机体后即可见到众多生物学作用的出现。但在自然条件下细菌胞壁中存在的内毒素所发挥的作用并非如此典型。内毒素自感染的细菌释放后,将受到体内酶系统的作用而发生一系列结构及功能的改变,最终以无毒性、无活性的终产物而分泌出体外。在这一动力学变化过程中内毒素所形成的许多中间产物可发挥不同于内毒素本身的许多生物学效应(当然亦取决于中间产物产生的部位)。中间产物中有的发挥毒害作用,另外一些则可发挥有益作用。对于这些中间产物的分离、鉴定及应用人工化学合成的中间产物,则能更好地了解内毒素在体内的动力学变化及生物学作用。

五、内毒素的检测

鲎试验(limulus test)或应用特异性抗体的放射免疫测定,已成功地应用于与人类生活密切相关的环境及临床病材中内毒素含量的测定。但必须记住的一点是,对于临床病人内毒素检测的敏感性必须提高到 $1\text{pg}(10^{-12}\text{g/ml})$ 的水平,并必须更深入地了解内毒素检测的意义。

我们希望本专著的出版,将有助于促进国内内毒素及相关学科研究事业的不断发展。

焦炳华

1995年1月于上海

目 录

第一章	细菌细胞壁外膜的结构与功能	(1)
第二章	细菌内毒素的物理特性	(11)
第三章	细菌内毒素的化学结构	(19)
第四章	类脂 A 的化学合成以及结构与活性的关系	(56)
第五章	内毒素的化学合成	(76)
第六章	内毒素的基因及其生物合成	(83)
第七章	内毒素的内源异质性	(104)
第八章	内毒素刺激的信号传递过程	(118)
第九章	内毒素和血浆高密度脂蛋白的相互作用	(131)
第十章	内毒素在体内的分布和脱毒	(139)
第十一章	内毒素的生物学活性——概述	(151)
第十二章	内毒素对心脏的抑制作用	(157)
第十三章	内毒素与休克肺	(167)
第十四章	内毒素与口腔疾病	(178)
第十五章	内毒素及内源性介质与氧自由基	(200)
第十六章	内毒素的抗肿瘤作用	(213)
第十七章	低毒内毒素及其衍生物的抗肿瘤作用	(220)
第十八章	内毒素与肿瘤坏死因子	(225)
第十九章	内毒素诱生的内源性调节因子	(232)
第二十章	肿瘤坏死因子介导内毒素的生物学效应	(254)
第二十一章	内毒素耐受作用	(263)
第二十二章	内毒素的拮抗剂	(270)
第二十三章	内毒素抗体在防治内毒素致病作用上的意义	(279)
第二十四章	鲎凝集系统与内毒素	(286)

第二十五章	鲎制剂中的抗内毒素因子.....	(310)
第二十六章	内毒素的检测与鲎试验.....	(315)
第二十七章	内毒素(热原)的去除.....	(343)
第二十八章	内毒素的制备.....	(352)
附录一	缩略语.....	(356)
附录二	参考读物.....	(364)

第一章 细菌细胞壁外膜的结构与功能

所有细菌的表面均具有一层称为细胞壁的结构,其组成成分主要为肽聚糖(peptidoglycan)。肽聚糖的存在在于提供了细菌细胞壁的强度,具有机械性保护意义。革兰氏阴性细菌在肽聚糖的外侧还含有一层称为外膜(outer membrane)的“单位膜”结构,细菌内毒素即脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)即存在于这一结构中(图 1-1)。

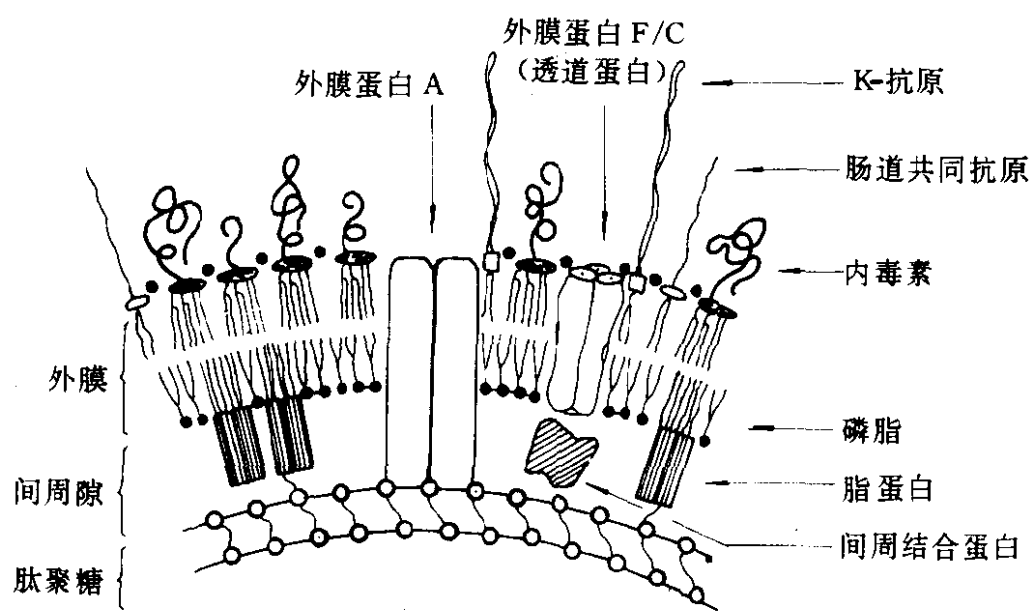


图 1-1 革兰氏阴性菌细胞壁外膜的构成

一、细菌外膜的组成

应用现代分子生物学方法,可以将细菌外膜完整地从小细胞壁中抽提出来,而不受细菌其他结构及成分的影响。细菌外膜主要含有磷脂、蛋白质及 LPS。与细胞膜比较,外膜中所含的蛋白质种类甚少,但存在的总量却很高。外膜所含的磷脂种类亦很少,其中以磷脂酰乙醇胺为主。某些野型细菌(如鼠伤寒沙门氏菌)外膜中所

含的磷脂量极少,甚至不足以组成外膜的一个单层。另一方面,外膜中含有一种特征性的成分即内毒素,每个菌细胞所含的内毒素分子数可达 2.5×10^6 ,这些分子全部分布于外膜的外叶中,约占外膜总表面积的 45%。

应当指出的一点是,不同种属的细菌,它们外膜的化学组成可有不同。某些粗糙型突变株细菌外膜中的磷脂含量极高,而蛋白质成分极低,但内毒素分子数目却基本保持恒定。

外膜中存在的某些蛋白质可与胞壁中的肽聚糖层发生共价交联,从而维持了整个细胞壁的稳定性的。

(一) 磷脂

细菌外膜所含的磷脂成分与真核细胞膜的成分极为相似,唯一一点有意义的区别在于细菌(如鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌等)外膜含有高量的磷脂酰乙醇胺。其他的成分有磷脂酰甘油及心磷脂等。根据细菌培养条件的不同磷脂中脂肪酸的组成可发生改变。

外膜中正常磷脂分子处于一个动态的过程。磷脂在单层膜中的侧向扩散速度极快,其扩散常数约为 $3.2 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$,亦即每秒钟可移动 $3.5 \mu\text{m}$ 的距离。但是外膜中两叶间磷脂的交叉移动却是不常见的。

磷脂是组成外膜内叶的主要分子,而外膜的外叶则是由内毒素及磷脂分子共同组成的,亦即由磷脂-磷脂所形成的双层膜结构仅局限于外膜的局部区域。由于细菌内毒素与磷脂分子在结构上具有高度的相似性,故而这种由磷脂—磷脂,磷脂—内毒素所组成的外膜结构并不影响外膜的稳定性。

(二) 内毒素

内毒素为细菌外膜的特征性组成成分,对于细菌外膜的结构与功能起着十分重要的作用,有关内毒素的化学结构与功能将在以后的章节中作详细的讨论,这里我们仅简述一下内毒素与磷脂分子在结构上的差别。

(1) 内毒素的类脂 A 部分在 D-氨基葡萄糖骨架上联结 6~7 个脂肪酰残基,而一般的磷脂仅联结有两个脂肪酸。

(2) 一般的磷脂其脂酰基可为饱和或不饱和脂肪酸,而类脂 A 含饱和或 3-羟基脂肪酸,后者中的羟基可被饱和脂肪酸进一步酰化而形成 3-脂酰基脂肪酸,这是内毒素(类脂 A)的特有成分。

(3) 内毒素在类脂 A 分子上的磷酸基团及核心中的 KDO 成分可携带多量的负电荷,因而内毒素与阳离子可发生强烈的相互作用。因此阳离子的存在对于内毒素的物理特性及生物学功能可发挥显著的影响。

(4) 许多革兰氏阴性菌突变株可产生不完全的内毒素结构,如 rfb 突变产生 Ra 型内毒素,这种内毒素仅含有完整的核心及类脂 A 分子,但缺失 O-特异多糖链;rfaC 突变株则产生 Re 型内毒素,这种内毒素分子仅含有类脂 A 及 2~3 个分子的 KDO,大部分的核心成分及 O-特异性多糖侧链均缺失。

(三) 多糖成分

肠杆菌科在外膜中含有一种特征性的多糖成分称为肠道共同抗原(enterobacterial common antigen, ECA)。这是一种酸性多糖。含有 N-乙酰-D-氨基葡萄糖, N-乙酰-D-甘露糖酸及 4-乙酰氨基-4,6-脱氧-D-半乳糖。一般的 ECA 结合于外膜的磷脂分子上,而在所谓的 ECA-免疫原性菌株 ECA 则联结于内毒素的核心部位。

许多细菌在最外层具有一层称为荚膜(capsule)的结构,通常由酸性多糖组成,其中的一些含有少量的脂质成分。

(四) 蛋白质

细菌外膜分子组成中的一半为蛋白质,外膜中所含的蛋白质种类较多,但仅存在几种称为主要蛋白(major proteins)的分子成为外膜蛋白的主要成分,这类蛋白质包括透道蛋白(porins)和外膜 A 蛋白(Outer membrane protein A, Omp A),这两类蛋白质的分子量均为 35,000d 左右。此外外膜中还含有胞壁脂蛋白,但其分子量要小得多(7,200d)。如果细菌培养环境改变,则主要蛋白的组成可发生变化。如当肠杆菌在富含麦芽糖的培养基中培养时, LamB 蛋白(λ 噬菌体的受体)便成为一种主要蛋白,而当细菌在无