

# 白喉杆菌外毒素及其致病机理

(综述)

微生物学教研室 姜 训

近50年来,由于获得了白喉杆菌外毒素的纯化制剂,从而对其性质、化学结构、功能及其致病机理的研究,也取得了迅速的进展。本文就白喉杆菌外毒素的有关问题概述如下。

## 一、 $\beta$ 棒状杆菌噬菌体与白喉杆菌外毒素之间的关系

$\beta$ 棒状杆菌噬菌体是感染白喉杆菌温和性噬菌体的一种。该噬菌体有一粗糙的球状头部和一条长的尾巴,每个噬菌体颗粒约含有分子量为 $2.2 \times 10^7$ 的DNA,足以合成30~40个普通大小的蛋白质编码。

白喉杆菌的毒性与某些温和性噬菌体感染有关,即非毒性菌株由携带 $\text{tox}^+$ 基因噬菌体的溶原化(Lysogenization)成为产毒菌株,而一旦失去此种噬菌体的感染,则又转为非毒性菌株。经遗传学和分子生物学研究,已确证 $\beta$ 棒状杆菌噬菌体中的 $\text{tox}$ 基因是白喉杆菌外毒素的结构基因。当该噬菌体感染白喉杆菌并发生溶原化时,其 $\text{tox}$ 基因便整合至原不产毒素的白喉杆菌染色体中,成为前噬菌体,再以其特有的 $\text{tox}$ 基因构成白喉杆菌外毒素的结构基因,从而使这种带有前噬菌体的白喉杆菌发生溶原性转换,获得具有产毒素的能力。白喉杆菌外毒素是在菌细胞内核糖体膜合成,并于细菌发生溶解或由带有 $\text{tox}$ 基因的噬菌体溶原化后释放至菌细胞外<sup>(1)</sup>。Smith用 $^{125}\text{I}$ 标记完整白喉杆菌的细胞外多肽,证明白喉毒素的形成及分泌均与膜结合的多核糖体有关<sup>(2)</sup>。

Matsuda<sup>(3)</sup>指出,每个被感染的菌细胞

可释放40~50个感染性噬菌体,同时可合成20,000以上分子的毒素,这种毒素产量并不超越正常基因表达的范围。在体外非重型菌株可产生约3MLD/ml白喉毒素,而重型菌株则可产生40MLD/ml毒素。

用家兔皮肤试验观察毒素合成的动态,发现毒素最早在感染后20~30分钟即开始合成,且95%以上的毒素合成在感染后60~90分钟内<sup>(3)</sup>。

## 二、铁在毒素产生过程中的作用

铁在白喉毒素产生过程中,主要有三方面作用:

1.白喉杆菌外毒素为该菌的含铁呼吸酶—细胞色素b的蛋白质部分。细胞色素b是由4个铁原子、4分子卟啉和1分子毒素蛋白组成。因此,白喉毒素的产量与培养基中铁的含量有关。若培养基中缺乏铁,则因不能合成细胞色素b,致使细菌新陈代谢发生障碍,以致不能产生毒素;反之,如铁浓度过高时,由于毒素蛋白与卟啉及铁全部组成了细胞色素b,培养基中无游离的毒素蛋白。仅当铁浓度适量时,一部分毒素蛋白与铁、卟啉结合,形成菌细胞本身代谢所必需的细胞色素b,而多余的毒素蛋白因无足量的铁结合,呈游离状态,分泌至菌细胞外,即为白喉外毒素<sup>(1)</sup>。

2. Barksdale指出,大部分毒素产生较迟,因此,在导致菌细胞溶解感染的过程中,凡能推延细胞溶解的因素均有利于毒素的产生,当铁浓度较低时,可延缓菌细胞的溶解,故含铁较少的菌细胞比含铁丰富的菌

细胞能合成更多的毒素<sup>(4)</sup>。

3. 毒素不能在菌体内积聚, 因此, 菌细胞为了合成更多的毒素, 需将细胞内已合成的毒素及时排出, 否则可通过反馈作用抑制毒素继续产生, 故阻碍菌细胞膜释放毒素的任何超微结构, 均将抑制毒素的产生。如培养基中含有丰富的铁, 则菌细胞膜可成为阻碍细胞释放毒素的屏障。当菌细胞中铁耗尽时, 引起细胞膜结构的改变, 此等改变有利于毒素的释放<sup>(5)</sup>。

此外, 为了有利于毒素的产生, 培养基内需含适量的含氮物质(如氨基酸)及氧。而蛋白胨的质量和血清种类的影响也较大。34℃、pH7.2~7.8对毒素产生最适宜。

### 三、白喉杆菌外毒素的结构及其性质

白喉杆菌外毒素为分子量62,000~63,000的多肽链, 含有两个二硫键。完整毒素为无活性的酶原性质。胰酶将其消化后分成两个多肽片段, 即与完整毒素N-端相一致的A片段, 及与C-端相一致的B片段。彼此借二硫键相连接。经胰酶消化后的毒素称为缺损毒素, 再进一步经硫醇还原或发生变性时(如经6M尿素或0.1%十二烷基硫酸钠处理), 则分裂成独立的A片段和B片段。

A片段分子量为24,000, 由三条多肽链组成, 可借聚丙烯酰胺(PAGE)凝胶电泳将其分开, 等电点分别为4.56、4.72及4.85, 性质稳定。在pH7.0时经煮沸, 或在pH2~12时于室温下短时间内仍保留其酶的活性, 且能拮抗胰蛋白酶或糜蛋白酶的消化作用。它是白喉毒素的中心部分, 不能与膜受体结合, 单独不能通过完整的真核细胞膜, 必须借助于B片段才能进入细胞内, 发挥酶的毒性作用。A片段抗原性弱, 其毒性不被抗毒素所中和。

B片段分子量为38,000, 性质不稳定, 因其肽链中含有疏水基团, 可自发形成聚合物, 此种聚合物易吸附于玻璃制品及其它物

品的表面。B片段可与敏感的真核细胞膜上特异性受体结合, 以协助A片段通过细胞膜。B片段抗原性强, 其抗体能阻止毒素与膜受体结合<sup>(6,7)</sup>。

### 四、白喉杆菌外毒素的致病机理

已发现人类、猴、家兔、豚鼠以及家禽等的组织细胞对白喉毒素均敏感。这些动物若按0.1μg/kg体重给予纯化毒素即可致死。而小白鼠、大白鼠的组织细胞对毒素不敏感, 毒素对此等动物的致死量为上述的10,000倍<sup>(8)</sup>。大白鼠及小白鼠组织中的延长因子-2(Elongation factor-2-EF-2)与上述各种敏感动物的组织细胞的EF-2对毒素具有同样的活性, 但大白鼠及小白鼠对毒素却有较强的抵抗力。Goto等认为这些鼠类细胞表面有一种阻止毒素进入细胞的屏障, 或由于这些细胞缺乏敏感动物细胞膜上所具有的对毒素的特异性受体<sup>(8)</sup>。

Pappenheimer等用<sup>125</sup>I标记的毒素作放射自显影研究证明, 在Hela细胞膜上有10,000~20,000个毒素进入部位, 而一个Hela细胞至少可结合50个以上的毒素分子, 此量足以引起Hela细胞死亡<sup>(9)</sup>。Proia指出这种特异性受体可能是高分子量的糖蛋白<sup>(10)</sup>。

至于白喉毒素进入敏感动物细胞的问题, Cill等证实首先必须通过敏感细胞膜上特异性受体识别毒素后, 再与毒素B片段C-端结合, 一旦毒素与膜结合后, 经过细胞酶作用, 使毒素分子中的二硫键裂解, 游离出A片段, 进入细胞内<sup>(11)</sup>。Pappenheimer认为在白喉毒素的两个亲水区之间有疏水带, 当其暴露时, 即可迅速插入细胞膜的小泡中。毒素进入细胞的过程, 包括可逆和不可逆阶段, 后一阶段系由蛋白的水解作用, 分离出B片段, 从而使毒素分子中的疏水蛋白质进入脂质双层, 形成通道, 而A片段则以其伸长形式由此通道进入细胞内<sup>(12)</sup>。

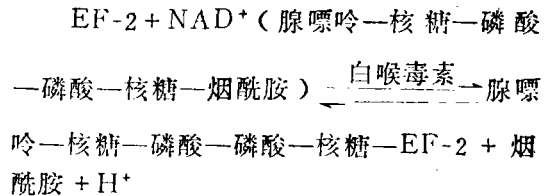
毒素并不引起细胞膜的损伤,因当蛋白质合成被抑制之后,并无钾或无机磷自中毒的细胞中漏出。中毒的细胞仍能吸收荧光素醋酸盐,如向单层Hela细胞培养中加入高浓度的毒素后,于几小时内发现有形态学改变,首先颗粒增加,继之细胞聚集、脱落,但在脱落后几小时内未见到细胞溶解或崩解。

Murphy指出,有几种化学制剂可阻止白喉毒素进入敏感细胞,包括铵盐、麦酰胺(glytamine)、1-氨基-1-脱氧-山梨醇(glycamine)、醇溶谷蛋白(prolamin)、荧光钠(sodium fluoride)。其中以铵盐为最有效,4 mM浓度的氯化铵就可完全防止HEP-2细胞中毒。近来证明,氯化铵的浓度与抑制蛋白质合成的毒素浓度之间的关系呈“S”形,说明氯化铵与毒素之间无直接关系。在有4 mM氯化铵时, $^{125}\text{I}$ 标记的白喉毒素虽可结合在HEP-2细胞的细胞膜上,但不能进入细胞内,而结合在细胞膜上的毒素可被抗毒素所中和。若从混合物中除去铵盐,再将HEP-2细胞经毒素作用30分钟,毒素即可进入细胞内,则抗毒素不能再中和毒素<sup>(6)</sup>。Dorper等指出,白喉毒素与细胞膜上受体结合后,再进入细胞内小泡中,只有当小泡内处于酸性环境时,毒素才能从小泡扩散至胞浆中,进而抑制蛋白质合成。而氯化铵等一些亲溶酶体物质,虽不能阻止毒素与受体结合,但可升高细胞内小泡(如溶酶体)的pH值,使毒素局限在小泡内,不能向细胞浆扩散,也就不能抑制蛋白质合成,从而保护了细胞<sup>(13)</sup>。Middlebrook等指出,Con A对白喉毒素结合的受体虽无明显作用,但可阻止毒素进入细胞内,故对细胞亦具保护作用<sup>(14)</sup>。

Norman等首先报道白喉毒素能抑制蛋白质合成,例如Hela细胞中毒后,蛋白质合成完全被抑制。如毒素浓度较低,则潜伏期较长,对蛋白质合成的抑制率也较低<sup>(15)</sup>。

Uchida等证明,蛋白质合成的抑制率与毒素的浓度成正比<sup>(16)</sup>。

近年来发现,白喉毒素在哺乳类动物体内可特异的抑制EF-2的活性,从而抑制蛋白质的合成,在白喉毒素的催化下,EF-2与 $\text{NAD}^+$ (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)发生特异作用而失活。因为白喉毒素的A片段具有酶活性,能使 $\text{NAD}^+$ 中腺嘌呤部份转给EF-2,并释出烟酰胺,导致EF-2失活。



由于此反应是可逆的,若将烟酰胺加入游离细胞的蛋白质合成系统中,在体外不仅可抑制毒素催化EF-2的灭活作用,而且在高浓度时平衡点向左移动,可重新活化EF-2。然而在生理条件下,此反应的平衡点远远移向右侧<sup>(17)</sup>。Coor等曾用烟酰胺处理,但并未能防止被毒素作用细胞的损害<sup>(18)</sup>。

某些与 $\text{NAD}^+$ 有关的化合物,可以竞争毒素活性片段上的结合部位而抑制毒素的毒性反应,腺嘌呤为其最强烈的抑制剂<sup>(18)</sup>。Middlebrook等指出,核苷酸为细胞膜上毒素受体的竞争性抑制剂。Con A及抗体由于阻止了毒素的内在作用而保护了细胞,氯喹也能保护细胞不受白喉毒素的影响<sup>(19)</sup>。

Baseman等用 $^{125}\text{I}$ 标记的白喉毒素和 $^{125}\text{I}$ 标记的牛血清白蛋白(BSA)分别注入豚鼠血管后,迅速固定于组织中,在4小时以内,仅有25%标记的毒素和30~40%标记的BSA仍留在循环中。由于 $^{125}\text{I}$ 毒素和 $^{125}\text{I}$ BSA在豚鼠体内的分布基本相似,因此,未发现毒素对任何肌肉组织或靶器官有特殊亲和力的证明<sup>(20)</sup>。

Collier对所有中毒动物的中毒机理进行广泛的研究,通过大体和显微镜观察,发现各种内部器官(心肌、肾上腺、肾脏、肝

脏、腺、横膈、神经组织及其他)的组织均有损伤,虽在不同种的动物之间稍有不同,但均有普遍的形态学和生理学改变,如肌肉中磷酸减少、乳酸和糖代谢能力降低、增加了对胰岛素的抵抗力、血钾增加和心肌功能减弱<sup>(21)</sup>。Bonventre等通过组织培养证实,动物的各种不同器官细胞培养物,对毒素的敏感性均相似,如胚胎心肌细胞、成纤维细胞及上皮细胞对毒素的敏感性无明显区别,说明白喉毒素对许多共同环节均有毒性作用<sup>(22)</sup>。

Baseman等向豚鼠静脉内注入5MLD毒素,死亡后取其组织作切片,测定蛋白质合成的情况,发现在所有试验的器官中蛋白质合成均降低<sup>(20)</sup>。Bonventre等发现肌肉(心肌、骨骼肌、膈肌)先受影响,这可解释对毒素有较高的敏感性,此种敏感性仅在低浓度毒素时才表现出来<sup>(23)</sup>。

(罗海波审校)

### 参 考 文 献

1. Singer R A: In Mechanisms in Bacteriol Toxinology p1, Bernheimer, A W, 1976
2. Smith W P, et al: J Bacteriol 141(1): 184, 1980
3. Mastuda M and L Barksdale: Nature 210(5098): 911, 1966
4. Barksdale L: Bacteriol Rev 34(4): 378, 1970
5. Barksdale L and S B Arden: Ann Rev Microbiol 28: 265, 1974

6. Murphy J R: In Mechanisms in Bacteriol Toxinology p31, Bernheimer, A W, 1976
7. 董竟亚: 中华微生物学和免疫学杂志 1(4):294, 1981
8. Goto N, et al: Jpa J Exp Med 38: 185, 1968
9. Pappenheimer A M and R Brown: J Exp Med 127(6): 1073, 1968
10. Proia R L, et al: Infect Immunol 25(3): 786, 1979
11. Gill D M and A M Pappenheimer: J Biol Chem 246(5): 1485, 1979
12. Pappenheimer A M: Clin Biol Res 31: 669, 1979
13. Draper R K and Simon M I: J Cell Biol 83(31): 849, 1980
14. Middlebrook J L, et al: Exp Cell Res 121(1): 95, 1979
15. Norman S and H D Edelmria: J Exp Med 109(2): 145, 1979
16. Uchida T, et al: J Biol Chem 248(11): 3838, 1973
17. 北京医学院主编: 生物化学, 全国高等医药院校试用教材, p273, 人民卫生出版社, 1978
18. Goor R S, et al: J Exp Med 126(5): 923, 1967
19. Middlebrook J L, et al: Toxicon 17 supp(1): 125, 1979
20. Baseman J B, et al: J Exp Med 132(6): 1138, 1970
21. Collier R J: J Bacteriol Rev 39(1): 54, 1975
22. Bonventre P F and J G Imhoff: J Exp Med 126(6): 1097, 1967
23. Bonventre P F and J G Imhoff: J Exp Med 124(6): 1107, 1966

## 遗传性睑裂狭小综合征

### (三个家族的调查)

(秦文清等, 中华医学杂志 63(3): 157, 1983)

遗传性睑裂狭小综合征的主要特征是先天性上睑下垂、睑裂狭小、倒转型内眦赘皮及两内眦距离宽。作者等报道的三个家族24例病人中,有12例曾经过检查,其中9例均具有上述四种特征。根据家谱分析,本综合征属显性遗传。眼滞症状可能为一基因多效应现象。家族1的三个姐妹尚合并月经不调和

婚后未育,弟弟有乳房发育现象。这些改变和眼部症状在遗传学上是否有连系,有待阐明。作者等曾对三姐妹做过染色体组型G显带检查,并无异常发现。过去认为本征是罕见病,但作者等在短时间内,在杭州市的一个区中竟先后发现三个家族,足见这一综合征并非十分罕见。