

综述

C型、D型肉毒梭菌毒素的研究进展

苏文金

肉毒中毒 (Botulism) 是由肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*, 下简称 Cb) 引起的, 以中枢神经系统症状为主的一种人兽共患疾病, 其发病是由 Cb 所产生的神经毒素所致。肉毒中毒可分为食物肉毒中毒, 创伤肉毒中毒和婴儿肉毒中毒^[1], 其中婴儿肉毒中毒自 1976 年首次报道以来, 已在除非洲外的各大陆皆有报告^[2]。虽然肉毒中毒以欧、美大陆发病较多, 但我国不少省份也有发现, 其死亡率较高, 毒性强烈, 仍应引起人们的高度重视^[3]。

要防治肉毒中毒症, 了解 Cb 毒素生成的生物学是非常重要的。根据 Cb 神经毒素的抗原特异性, 可将 Cb 菌株分为 A、B、C、D、E、F 和 G 等 7 型, 其产生的神经毒素分别为 A、B、C₁、D、E、F 和 G 等 7 种血清型。一般 1 菌株只产生 1 种神经毒素, 少数可产生多种神经毒素, 而有些菌株除产生神经毒素外, 还可产生其他毒素。如 C、D 型菌株除分别产生 C₁ 和 D 神经毒素外, 还可产生两种 ADP-核糖酰转移酶 (ADP-Ribosyltransferase) C₂^[4] 和 C₃^[5]。关于早期肉毒梭菌神经毒素的研究结果, 可参阅 Sugiyama 的综述^[1], 本文重点介绍 C、D 型肉毒梭菌毒素的研究进展。

一、TOX⁺噬菌体与 Cb 神经毒素的生成

噬菌体在 Cb 毒素生成中的重要作用首先是在 C、D 型菌株中得到证实的。电镜观察表明, 各种类型的 Cb 中都存在噬菌体, 使宿主对同种噬菌体的感染有免疫力^[6,7]。在 C 型或 D 型菌株中, 一般有 1~3 种噬菌体。在实验室传代培养中, 有些菌株会自发失去产生神

经毒素的能力, 同时失去某种或全部噬菌体。如果在培养基中加入吖啶橙, 或将培养物暴露于紫外线辐射, 则可获得较多的不产生神经毒素的后代菌株。要了解所失去的噬菌体类型, 只需检验这些无噬菌体、不产神经毒素的菌株对产神经毒素的亲代菌株裂解物或其他含噬菌体、但不产神经毒素菌株裂解物的敏感性即可, 进而可纯化噬菌体。当用纯化的噬菌体感染无毒株时, 发现有两类性质不同的噬菌体: 一种可诱导宿主细菌产生神经毒素和对同种噬菌体感染具有免疫力, 称为 TOX⁺噬菌体; 另一种不能诱导宿主细菌产生神经毒素, 称为 TOX⁻噬菌体。能诱导 C 和 D 型 Cb 菌株产生神经毒素的 TOX⁺噬菌体都具有相似的形态学, 头部为多面体, 直径为 65~100nm, 尾部长 455nm, 并包有鞘^[7]。分离自 C 型菌株的 TOX⁺噬菌体可诱导产生 C₁ 神经毒素, 分离自 D 型菌株的 TOX⁺噬菌体可诱导产生 D 神经毒素。

当不产神经毒素菌株用 TOX⁺噬菌体重新感染后, 可分离到产毒株和不产毒株, 产毒株必携带 TOX⁺噬菌体, 可产生神经毒素, 并对 TOX⁺噬菌体感染免疫。反之亦然。而且, 不产神经毒素菌株在连续 4 年的实验室传代培养中, 由于不与 TOX⁺噬菌体接触, 每一传代培养物都对 TOX⁺噬菌体敏感, 也不产生神经毒素^[8], 这更进一步证实了噬菌体与神经毒素生成的关系。

作者单位: 厦门大学生物学系

此外,将正常的产神经毒素菌株培养在含有抗 TOX⁺噬菌体抗血清的 TGY 培养基中,也可从中分离到不产神经毒素、对 TOX⁺噬菌体敏感的菌株。随着在上述培养基中传代次数的增加,对 TOX⁺噬菌体敏感的后代细胞数也随着增多,这说明噬菌体与宿主菌的关系并不是真正的溶源关系,而是假溶源关系。在这样的条件下,有些后代细胞随着细胞分裂失去噬菌体,而抗血清则能保护这些已消除噬菌体的细胞免受游离噬菌体的感染。这些噬菌体敏感菌株在遭受 TOX⁺噬菌体感染后会被诱导产生神经毒素^[9]。

根据神经毒素 C₁ 氨基末端的氨基酸顺序,反推出其核苷酸编码顺序,制备成探针,再与 TOX⁺和 TOX⁻噬菌体 DNA 杂交,证明了分离自 C 型菌株的 TOX⁺噬菌体基因组确实含有神经毒素 C₁ 的编码片段。由于 C₁ 毒素和 D 毒素的氨基末端氨基酸顺序有一定的相关性,所以该 C₁ 探针也可与 D 型菌株的 TOX⁺噬菌体 DNA 杂交^[10]。最近,Hauser 等报道了 C₁ 毒素编码基因全序列的测定结果^[11]。

二、ADP-核糖酰转移酶 C₂ 当用消毒剂去除 C 型 486 菌株和 D 型 1873 菌株的 TOX⁺噬菌体时,它们就失去了生成神经毒素的能力。可是,在用胰蛋白酶处理这些无神经毒素培养物的上清液后,却发现了另一种具有 ADP-核糖酰转移酶活性的毒素,命名为 C₂^[12]。用 C₂ 毒素腹膜接种小鼠,所表现的症状不同于神经毒素所引起的症状。另外在 5 种不同的 C 型抗血清中,仅有 1 种(后发现含有抗 C₂ 毒素成分)能中和 C₂ 毒素,而 D 型抗血清均不能中和 C₂ 毒素。进一步研究表明,除了含抗 C₂ 组分的 C 型抗血清外,所有 A 至 G 型抗血清均不能中和 C₂ 毒素。这是 C₂ 毒素不同于 C₁、D 及其他神经毒素的进一步证据。

利用上述不产神经毒素菌株制备的抗 C₂ 毒素抗血清,可中和由 C、D 型菌株产生的 C₂ 毒素;而不含 C₂ 组分的 C、D 型抗血清,可

中和 C₁ 或 D 神经毒素,从而使得被神经毒素所掩盖的 C₂ 毒素得以表现出来,因此成为确定不同的 C、D 型菌株产生毒素方面是否有差异的有用工具。在从瑞典、法国、荷兰、英国、南非、日本和美国分离的 30 株 C 型菌株中,共有 28 株可产生 C₂ 毒素,其中 3 株 C₂ 毒素滴度很低,只有利用 TGY 培养基的透析浓缩培养才可检出。与此相反,5 株 D 型菌株中,仅有 1 株可产生 C₂ 毒素^[7]。

研究表明,C₂ 毒素的生成与 TOX⁺噬菌体无关。产神经毒素的 C、D 型菌株,在消除了 TOX⁺噬菌体后,就失去了产生 C₁ 或 D 神经毒素的能力,但仍可继续生成 C₂ 毒素。用 TOX⁺和 TOX⁻噬菌体感染不产 C₂ 毒素的菌株以诱导生成 C₂ 毒素均未获成功。曾有学者认为,C₂ 毒素的生成与芽孢形成有关,其滴度与细胞的芽孢形成率成正比^[13]。然而,Eklund 等工作表明,C 型 Cb 菌株 164 的 C₂ 毒素生成与芽孢形成和感染性的噬菌体无关,但暂时仍无法排除缺失性噬菌体或质粒的作用^[7]。

三、TOX⁺噬菌体与 ADP-核糖酰转移酶 C₃ 的生成 曾有不同研究者报告了 Cb 神经毒素 C₁ 和 D 也具有 ADP-核糖酰转移酶活性。然而,随后的工作表明,毒素样品中的 ADP-核糖酰转移酶活性并非由 C₁ 和 D 神经毒素所引起,而是由另一具有 ADP-核糖酰转移酶活性的胞外酶所产生,并将其命名为 C₃,它与肉毒神经毒素和另一具有 ADP-核糖酰转移酶活性的 C₂ 毒素有着本质的不同^[14,15]。

研究表明,与具有相同酶活性的 C₂ 毒素不同,C₃ 毒素的生成与 TOX⁺噬菌体相关。产 C₁ 或 D 神经毒素的菌株同时也产生 C₃ 毒素。当产毒菌株消除了 TOX⁺噬菌体后,同时停止产生 C₁ (或 D) 神经毒素和 C₃ 毒素。当菌株用 TOX⁺噬菌体再感染后,可诱导菌株再产生 C₁ (或 D) 和 C₃ 毒素。这表明特异的 TOX⁺噬菌体在控制 C₁ 和 D 神经毒素生成的同时,也介导 C₃ 毒素的生成。最近,Poppof 等

报道了编码 C₃ 毒素的 TOX⁺ 噬菌体核苷酸的全序列^[16]。生化研究表明,由 C 和 D 型菌株产生的 C₃ 毒素并无差别存在^[14,15]。

四、C、D 型菌株的产毒素类型及 C、D 型的相互转换 根据上述研究,可以推算出,C、D 型 Cb 菌株的毒素生成有 4 种不同的组合:(1) C₁ (或 D) + C₂ + C₃; (2) C₁ (或 D) + C₃; (3) C₂; (4) 无任何毒素生成。具体例子见表 1。

表 1 C、D 型 Cb 菌株产生的毒素类型(据[7]修改)

菌株(噬菌体*)	毒素种类		
	神经毒素	C ₂	C ₃
C 型菌株			
468C(1C,2C)	C ₁	+	+
468C-UV171(2C)	-	+	-
468C-A208(-)	-	+	-
165(9C)	C ₁	-	+
165-HS31(-)	-	-	-
165-HS31(9C)	C ₁	-	+
D 型菌株			
1873(2D)	D	+	+
1873-AOA113(-)	-	+	-
1873-AOA(2D)	D	+	+
8265(4D)	D	-	+
8265-AO12(-)	-	-	-
8265-AO12(4D)	D	-	+

* () 为菌株所携带的噬菌体,其中 1C、9C、2D、4D 为 TOX⁺ 噬菌体,2C 为 TOX⁻ 噬菌体,- 为无噬菌体。

就生理生化特征而言,C 型和 D 型菌株是不可区别的。由于 C、D 型菌株产生的 C₂ 和 C₃ 毒素生化性质相同,区别这两种不同型菌株的主要特征就是其神经毒素的抗原特异性,C 型菌株产生 C₁ 毒素,D 型菌株产生 D 毒素。然而,在消除了 TOX⁺ 噬菌体之后,这一鉴别特征也就随之消失了。而且,如果用分离自 C 型菌株的 TOX⁺ 噬菌体感染对其敏感、不产神经毒素的 D 型菌株,或用分离自 D 型菌株的 TOX⁺ 噬菌体感染对其敏感、不产

神经毒素的 C 型菌株,还会出现菌型的转换现象(表 2)。在每一情况下,Cb 菌株产生的神经毒素类型仅对应于其携带的特异噬菌体,同时,在所有宿主中,C、D 型 TOX⁻ 噬菌体还可介导 C₃ 毒素的生成,而与 C₂ 毒素生成无关。

表 2 C、D 型 Cb 菌株菌型的相互转换

菌株(噬菌体)	毒素种类		
	神经毒素	C ₂	C ₃
出发菌株: C 型			
153(4C)	C ₁	+	+
153-HS15(-)	-	-	-
153-HS15(2D)	D	+	+
153-HS15(4C)	C ₁	+	+
出发菌株: D 型			
1873(2D)	D	+	+
1873-AOA113(-)	-	+	-
1873-AOA113(4C)	C ₁	+	+
1873-AOA113(2D)	D	+	+

综上所述,C、D 型 Cb 菌株至少可产生 3 种不同毒素,其中神经毒素 C₁、D 和 ADP-核糖酰转移酶 C₃ 的生成由 TOX⁺ 噬菌体基因组所决定。当菌株消除了 TOX⁺ 噬菌体后,将变得对 TOX⁺ 噬菌体敏感,再次被感染后所产生的神经毒素类型将由 TOX⁺ 噬菌体的类型所决定。因此可出现 C、D 型菌株的相互转换现象。由于动物和人类对不同肉毒神经毒素的敏感性有很大的差别^[17],因而,TOX⁺ 噬菌体决定了 Cb 菌株的毒性,在肉毒中毒中起重要作用。

参考文献

1. Sugiyama, H; Microbiol Rev 1980; 44: 419
2. Arnon, SS; Infant Botulism, in Clinical and Molecular Aspects of Anaerobic Bacteria, Wrightson Biomedical Publishing, 1990, P41-48
3. 杨暑伏; 中华流行病学杂志 1988; 9 (特刊 2 号): 277
4. Simpson, L L; J. Pharmacot Exp Ther 1982; 223: 695
5. Aktories K, et al; Eur J Biochem 1988, 172: 445
6. Eklund M w, et al; J Virol 1969; 3: 270
7. Eklund, M W; Phages and Plasmids in C. botulinum-C. novyi Toxino- (下转第 45 页)

则判为阳性。

(三) 病原体分离与鉴定: 取病人病变组织或/及血液接种于脑心浸液双相琼脂或血琼脂等, 待长出菌落作生化反应, 分析其细胞脂肪酸和 16SrDNA 序列等加以鉴定。后者亦可对病人组织标本直接作出检定。

(四) 血清学检查

用间接免疫荧光试验, 恢复期病人血清滴度比急性期者呈 4 倍增长为阳性; 单份血清滴度至少达 1:64 方可考虑现在症诊断。用 17KD 重组体抗原作 ELISA 检测人血清抗汉塞氏罗沙利马体 IgG, 有助诊断。

四、临床学

(一) 临床表现:

1. CSD: 典型 CSD 开始在被动物抓、咬部位形成丘疹或脓疱, 继而在 5~50 日后发生局部淋巴结炎, 常出现头、颈或上肢的淋巴结肿大, 多有触痛, 少数化脓。部分病人有发热、全身不适、肝脾大的表现。通常病程维持 2~4 月即自愈。在约 10% 左右的非典型 CSD 病例中, 其临床表现不一, 可有 Parinaud' 氏眼腺体综合征、肉芽肿性结膜炎、骨质溶解、肺炎及中枢神经系统损害等。

2. BAP: 主要表现为皮肤损害和内脏发生紫癜。开始皮肤表面出现单个或多个红丘疹, 逐渐增大可达数 cm 直径, 偶有溃疡。深部皮肤损害为皮下出现肉色结节, 自由活动或固定于

皮下组织。杆菌性血管瘤可在任何实质性器官发生, 包括脑部, 除非经活体组织检查, 很难与分枝杆菌和真菌感染或恶性肿瘤相鉴别。杆菌性紫癜多见于肝脏和脾脏, 临床上可有或无杆菌性血管瘤存在; 病人有发热、体重减轻、腹痛或腹胀、肝或脾大等。

(二) 诊断: 临床诊断一般依以下 4 项中有 3 项即可: (1) 动物 (多为猫或狗) 接触史, 有抓伤或眼睛损伤; (2) CSD 皮肤试验阳性; (3) 其他有关淋巴结病病因的实验室检查阴性 (如结核病、布鲁氏菌病、传染性单核细胞增多症、性病淋巴肉芽肿、何杰金氏病、淋巴肉瘤等); (4) 淋巴结或皮肤活检的组织病理学特征。确诊应有特异性抗体检查和病原体分离的结果。

(三) 治疗: CSD 一般不需治疗而自愈。虽然体外药物敏感试验发现汉赛氏罗沙利马体对许多抗生素有较高敏感性, 但临床治疗常无效。与 CSD 不同, 对 BAP 则抗生素如红霉素、四环素类、利福平等有疗效。

关于防制, 目前尚缺乏有效的特异预防措施。应注意避免被猫等宠物抓伤。

参考文献

1. 俞树荣: 国外医学微生物学分册, 1994; 17 (1): 27
 2. 钱小毛 罗海波: 国外医学微生物学分册 1993; 16 (3): 125
 3. Schwartzman, W A: Clin Infect Dis 1992; 15: 893

(上接第 42 页) genesis, in Genetics and Molecular Biology of Anaerobic Bacteria, Springer-Verlag, 1993, P. 179-194
 8. Hariharan H, et al: Appl Environ Microbiol 1976; 32: 145
 9. Eklund M W, et al: Appl Microbiol 1974; 27: 251
 10. Fujii M, et al: Appl Environ Microbiol 1988; 54: 69
 11. Hauser D, et al: Nucleic Acids Res 1990; 18: 4924
 12. Eklund M W, et al: Appl Microbiol 1972; 24: 108

13. Nakamura S, et al: Microbiol Immun 1978; 22: 591
 14. Aktories K, et al: Feb Eur Biochem Soc, Lett 1987; 212: 109
 15. Rubin E J, et al: Mol Cell Biol 1988; 8: 418
 16. Poppof M R, et al: Nucleic Acids Res 1990; 18: 1291
 17. Smith L. D, et al: Botulism Thomas 1988