

艰难梭菌粘附的研究进展

厦门大学生物系 厦门 361005 王隽 苏文全

艰难梭菌(*Clostridium difficile*)是重要的肠道致病厌氧菌。它是抗生素疗法所引起的伪膜性结肠炎的致病菌,并且是引起抗生素相关的腹泻的最主要病原菌之一,同时还与一些非抗生素疗法引起的疾病相关^[1,2]。由于在健康成年人的肠道菌群中一般不存在艰难梭菌,所以艰难梭菌要实现其致病作用需要二个步骤:首先是在肠道中繁殖生成毒素,其次是毒素对肠道粘膜发挥病理作用。艰难梭菌的毒素已有较为深入的研究,其中毒素A(肠毒素)和毒素B(细胞毒素)已被克隆、测序,并经过碱基突变技术对毒素的结构与功能关系进行了研究^[3-10]。粘附(Adhesion)是细菌肠道定植的第一步。由于实验模型方面的原因,过去对艰难梭菌的肠道定植研究仅仅停留在群体水平,已了解到艰难梭菌的肠道定植能力与菌株的性质相关^[11],且肠道正常菌群可拮抗艰难梭菌的肠道定植,但机理未明^[12]。最近,由于培养细胞技术的应用,使艰难梭菌的肠道粘附在细胞和分子层次上的研究取得显著进展。现将有关研究进展介绍如下。

1. 艰难梭菌对肠道细胞粘附的证明

早在1979年,Borriello就发现在人肠道洗脱物中存在有艰难梭菌^[13],随后,他又发现艰难梭菌可结合于仓鼠盲肠的上皮组织,且强毒株对肠道粘膜的粘附明显优于弱毒或无毒株^[14],但尚缺乏直接证据证明艰难梭菌能粘附于人的结肠组织。直到1993年,Eveillard发现在细菌培养基中添加血液和对艰难梭菌细胞进行加热处理能提高艰难梭菌对人结肠上皮细胞Caco-2和人粘液分泌细胞HT29-MTX的粘附能力^[15]。对细菌进行60℃,10分钟的热刺激,虽然只有10%的细菌能存活下来,但此时细菌的粘附能力要比未处理的细菌细胞(37℃)的粘附力高11倍,从而使粘附在

Caco-2细胞上的细菌数达最大值;而当热刺激温度为100℃时,细菌全部死亡,则无粘附现象发生,这表明只有活细菌细胞才可能实现粘附过程。这些现象充分证实了艰难梭菌的确存在粘附于人肠道细胞的能力。

2. 艰难梭菌对肠道细胞粘附的特点

人结肠上皮细胞Caco-2分离自人结肠腺瘤^[16],由于在培养过程会出现自发的分化,并经历成熟的肠细胞所具有的形态学功能分化特征,因而被广泛应用于致病菌的肠道粘附研究^[17-19]。HT29-MTX细胞来源于人结肠癌细胞HT-29,但经过培养和筛选后,已具有正常肠细胞的特征,且可分泌粘液^[20],因而适用于艰难梭菌粘附肠细胞的研究。

研究表明,艰难梭菌对Caco-2细胞的粘附随着时间的延长而逐步增强,在加入艰难梭菌120分钟后,粘附在细胞上的细菌数达到最大值,之后趋于稳定。扫描电镜观察结果表明,艰难梭菌对Caco-2细胞的粘附始于粘膜表面:细菌先与微绒毛紧密接触,随之出现明显的胞外聚纤维网的合成,最后才出现艰难梭菌与Caco-2细胞的相互粘连。新合成的胞外聚合物还可促进细菌与细菌的接触,从而有利于形成细菌簇,因此,在Caco-2单层培养细胞的凹处可看到不少细菌簇^[15]。而在HT29-MTX培养细胞,其表面覆盖有一层粘液层,艰难梭菌的粘附则以分散或成簇的方式出现。艰难梭菌的粘附力随Caco-2细胞的培养时间而变化,提示了细胞艰难梭菌受体的表达与细胞的生长相关。通过对Caco-2细胞的刷状缘蔗糖酶-异麦芽糖酶进行免疫标记来观察细胞的生长分化状况,发现当细胞未出现分化而缺乏刷状缘和刷状缘水解酶时,艰难梭菌无法粘附于该细胞;而在细胞培养9天后,出现了顶端蔗糖酶-异麦芽糖酶的免疫反应,同时也伴随

着艰难梭菌的细胞粘附,表明艰难梭菌的粘附力与培养细胞的分化程度直接相关。

3. 艰难梭菌粘附的影响因素

早期研究表明,艰难梭菌的粘附与培养基成分和细菌有无经物理处理有关^[15]。在添加血的细菌培养基中培养后不对细菌进行热刺激,仅有相对少数细菌细胞表现出粘附能力;但如果在与 Caco-2 细胞混合前不洗涤细菌细胞,粘附能力则会明显提高。不管细菌在与 Caco-2 细胞混合前有无被洗涤,60℃10 分钟的热刺激均可明显提高细菌的粘附。这提示了细菌在血液存在生长时可生成一与细菌粘附力密切相关、而又对热刺激敏感的物质,热刺激使该物质对粘附的贡献成为不可逆。然而,进一步的研究表明,细菌培养基成分对粘附影响不大,热刺激则是重要的条件^[21]。

艰难梭菌的粘附究竟有无细胞类型的特异性呢?有人对此进行了研究^[21]。结果表明,艰难梭菌对不同类型的组织培养细胞的粘附能力有所不同,经热刺激处理的细菌可粘附于 Vero 细胞(猴肾上皮细胞)、Hela 细胞(人子宫颈癌上皮细胞)、KB 细胞(人舌上皮细胞)、MDCK 细胞(狗肾上皮细胞),但程度不同(表 1),估计与不同细胞表达的艰难梭菌受体量不同有关。

在粘附前,用抗艰难梭菌的抗血清(1:1000)与艰难梭菌混合培养一小时,可有效地抑制细菌的粘附,来自无菌小鼠粘液成分也能破坏细菌的粘附。此外,有些糖类对细菌的粘附具有抑制作用,其抑制效果按顺序排列如下:葡萄糖>蜜二糖>蜜三糖>半乳糖>乳糖>核糖(表 2)。明胶和 N-乙酰半乳糖胺对粘附也有部分抑制作用。

4. 艰难梭菌粘附因子的性质研究

艰难梭菌中的何种成分为粘附介导体,即粘附因子,该方面研究已取得较大进展。已有证据表明,艰难梭菌的粘附因子为蛋白质成分。

在添加血液的培养基上生长的艰难梭菌细胞在 60℃热刺激后用胰蛋白酶处理,粘附可

完全被破坏,表明粘附因子为一蛋白质成分^[15]。

经热刺激处理的艰难梭菌细胞表面有大量的粘附因子,而未处理的艰难梭菌的粘附力弱,即表面粘附因子少,所以,用经热处理的细菌来吸收抗 60℃热刺激处理细菌的抗血清就可得到较纯的抗粘附因子抗体。免疫电镜观察结果表明,如此制备的抗体能很疏松地结合位于细菌表面的蛋白。在 Western-blot 中,抗体能识别艰难梭菌裂解物和培养上清液中的大量蛋白,能识别后者可能是因其含有细菌裂解物成分^[21]。

用 SDS 分别抽提不同培养条件下艰难梭菌 CD79685 的表面结合蛋白(有血或无血培养,经热刺激或未经热刺激),再进行 SDS-PAGE 电泳,电泳图谱表明:在无血培养基中生长,未受热刺激的细菌有两种主要蛋白质,分子量分别为 48KDa 和 31KDa;受热刺激的细菌,上述两种蛋白质消失。在添加血液的培养基中生长、未受热刺激的细菌,不仅含 48KDa 和 31KDa 的蛋白质,还增加了一种 12KDa 的蛋白;受热刺激的细菌,无 48KDa 和 31KDa 蛋白,但有 12KDa 和 27KDa 的蛋白。为证实该现象是否为 Cd79685 所特有,又对 Wilkins 菌株,FD 菌株和 Cd4789 菌株做了同样的试验,结果与 Cd79685 的结果相同。因血液培养基或热刺激都会提高艰难梭菌的粘附力,因此推测 12KDa 和 27KDa 蛋白与粘附有关。应用这两种蛋白的多克隆抗体 PAb12 和 PAb27 来分析 12KDa 和 27KDa 在粘附中的作用,结果发现任一种抗体都能强烈抑制细菌(有含血培养基中培养,受热或未受热刺激)对 Caco-2 细胞的粘附,而 PAb12 仅能检测 12KDa 蛋白,PAb27 只能识别 27KDa,说明 12KDa 与 27KDa 为两种抗原异质性蛋白,且它们在艰难梭菌中起相同作用。为确证粘附力的降低不是因为抗体介导的细菌聚集所致,又用木瓜蛋白酶处理抗体,得到的结果与未用蛋白酶处理的结果相同^[15]。

关于艰难梭菌细胞表面蛋白的主要成分已有少量报道。Masuda 等曾从 CdGA14131 中分离到两种钙敏感蛋白,分子量分别为 38KDa

和 42KDa^[22]。Kawata 等分析了多株艰难梭菌表面蛋白,将其分为两组:一组含 38KDa 和 42KDa 蛋白,另一组含 32KDa 和 47KDa 蛋白^[23]。最近又有人报道 CDGAI0714 表面有

32KDa 和 45KDa 两种主要蛋白^[24]。上述这些表面蛋白与 Eveillard 所分离到的 31KDa 和 48KDa 蛋白分子量相近,因而可能与粘附无关,其作用目前尚不清楚。

表 1 不同组织培养细胞和培养基对艰难梭菌粘附的影响

培养基 ⁽¹⁾ 或细胞株	热处理温度(℃)	粘附力(菌数/细胞)
培养基		
Columbia cysteine+血清+洗涤 ⁽²⁾	37	0.25±0.12
	60	2.70±0.25
Columbia cysteine+血液	37	0.92±0.03
	60	2.34±0.37
Columbia cysteine+血液+洗涤	37	0.62±0.31
	60	2.70±0.48
TGY 肉汤	37	0.44±0.06
	60	2.14±0.34
脑心浸汁	37	0.22±0.06
	60	1.34±0.25
细胞株		
Vero	37	0.42±0.08
	60	13.70±3.79
Hela	37	0.01±0.00
	60	4.40±1.84
KB	37	0.01±0.01
	60	11.90±5.13
MDCK	37	0.18±0.05
	60	0.59±0.29

注:(1)培养基的影响均用 Caco-2 细胞检测;(2)洗涤表示粘附实验前细菌均用 PBS 洗涤 2 次。

表 2 碳水化合物对 pCL6 克隆和艰难梭菌粘附的影响⁽¹⁾

	粘附力%	
	HB101/pCL6	60℃热刺激的艰难梭菌
PBS 对照	100	100
糖类		
阿拉伯糖、果糖、半肌醇、葡萄糖胺、甘露糖、木糖	100	100
D-(+)-葡萄糖	16	25
α-乳糖	36	58
蜜二糖	38	24
D-(+)-蜜三糖	33	38
D-(-)-核糖	58	57
粘液组分		
D-(+)-半乳糖	30	58
N-乙酰半乳糖胺	70	44
N-乙酰葡萄糖胺+墨角菜糖	100	100
其它		
明胶	43	46
D-阿拉伯糖酮、麦芽糖、蔗糖	不确定	不确定
唾液酸、鼠李糖		

注:(1)艰难梭菌与待测物共温育一小时后再进行粘附实验。

Karjalainen 运用 λ Zap I 表达载体建立了艰难梭菌的全基因文库,用上述抗体来筛选带有粘附因子的杂交克隆。在阳性杂交克隆中,命名为 pCL6 的克隆能迅速凝集血红细胞且有较强粘附 Vero 细胞的能力。电镜观察 HB101/pCL6,未发现菌毛,因此粘附因子不是菌毛,而是膜外蛋白质。用抗体检测该重组克隆所表达的蛋白质,可检测出两种蛋白质,分子量分别为 27KDa 和 40KDa。这两种蛋白都能被 PAb27 识别,推测 40KDa 的蛋白可能是 27KDa 的前体,或是这两种蛋白质具有相同的抗原决定簇。另外一些阳性杂交克隆不表达 27KDa 蛋白,可能这些克隆的粘附因子有别于 pCL6^[21]。

pCL6 携带的插入 DNA 长度为 10.5Kb,该插入 DNA 对几种比较常用的限制性内切酶有抗性,因此无法得到该插入 DNA 的酶切图谱。用 SacI 酶切插入 DNA 得到一个 4.3Kb 片段,将其克隆到 pBluescript 中,HB101/p4.3Kb 具有比 HB101/pCL6 更强的粘附力,且也能表达 27KDa 蛋白^[21]。

5. 艰难梭菌粘附受体的研究

众所周知,人的胃肠粘膜在正常情况下都覆盖着一层粘液。很难想象细菌能不粘附于粘液层而直接粘附于肠细胞。为此,Karjalainen 提出一模型,设想艰难梭菌的粘附因子有两个受体,一个在粘液层,一个在上皮细胞表面^[21]。艰难梭菌对细胞与粘液粘附的抑制归因于肠粘液蛋白中碳水化合物与细菌粘附因子的特异性结合,证据如下:

热处理过的艰难梭菌能粘附于覆盖有一层粘液的 HT-29MTX 细胞株,镜检发现细菌存在于单层培养细胞的粘液层^[15]。热处理过的艰难梭菌和克隆 pCL6 还可粘附分离自无菌小鼠的粘液。该粘附能被乳糖、乙酰半乳糖胺部分抑制。

将来自无菌小鼠的粘液粗提物分别与艰难梭菌和克隆 pCL6 一起温育,能严重破坏艰难梭菌和 pCL6 的粘附。表明粘液中有粘附抑制因子存在。

艰难梭菌对组织培养细胞的粘附能被半乳糖、葡萄糖以及由这些单糖组成的多糖部分抑制,这意味着粘液与上皮细胞的受体含有相同的糖基成分。细菌粘附没有完全被抑制,意味着粘附受体含一个以上的糖残基。

克隆 pCL6 能特异地使人类 A 型和 B 型血红细胞凝集,而人类 A、B 血型细胞的特异性是分别由寡糖链末端的 N-乙酰半乳糖胺和半乳糖决定的。细菌对组织培养细胞、上皮细胞、血细胞的粘附受体具有相同的糖残基^[21]。

6. 艰难梭菌粘附的病理学意义

正常情况下,肠细胞被一层粘液保护着,而艰难梭菌在正常环境下低水平表达粘附因子,仅能微弱地与粘液相粘,且往往与肠粘液一起被洗脱至肠腔。但经抗生素或其它未知因子的刺激下,粘附因子过量表达,导致细菌能与粘液层受体牢固结合^[21]。或者抗生素使得肠道菌群平衡失调,而在正常情况下屏障菌群占据了艰难梭菌所需的同一粘附受体。或通过其它酶系的作用将粘蛋白降解,从而使艰难梭菌失去粘蛋白上的受体,不能大量定植于肠上皮细胞。而抗生素破坏了屏障菌群,使艰难梭菌有机会与粘附受体结合^[12]。在其它细菌的降解作用下,粘液层对艰难梭菌提供最初的营养,使其迅速增殖形成微菌落,分泌毒素,导致疾病。另还存在着在另一水平上进行的对胶原的粘附,它可能与持续感染有关,在破坏了上皮细胞后,可向周围邻近组织扩散。

7. 展望

艰难梭菌是机会致病菌,且普遍存在于新生儿和儿童的正常菌群。已有资料表明 24% 一岁以下的儿童携带艰难梭菌,且产毒菌株居多。而健康成年人中艰难梭菌的分离率远低于儿童且为非毒性菌株^[1]。目前艰难梭菌粘附机理的研究才刚刚起步,有待解决的问题仍很多,如:艰难梭菌有多少种蛋白参与粘附,对体外组织培养细胞的粘附是否完全与正常肠细胞的粘附机制相同,肠道内复杂的生理环境对粘附的影响,病理条件对艰难梭菌可能产生的刺激作用,粘附因子的 DNA 序列及调控机理如何等,这些均需更加广泛深入的研究才能解决。

参考文献

- [1] 苏文金. 中国微生物学杂志, 1992, 4(4): 57-64
- [2] Delmee M, Bull Soc Fr Microbiol, 1995, 10: 105-108
- [3] Dove C H et al, Infect Immun, 1990, 58: 480-488
- [4] Barroso L A et al, Nucl Acid Res, 1990, 18: 4004
- [5] Von Eichel-Streiber C et al, Mol Gen Genet, 1992, 233: 260-268
- [6] Barroso L A et al, Microbiol Pathol, 1994, 16: 297-303
- [7] Bongaerts G P A and Lysterly D M, Microbiol Pathol, 1994, 17: 1-12
- [8] Just I et al, J Biol Chem, 1994, 269: 10706-10712
- [9] Tucker K D and Wilkins T D, Infect Immun, 1991, 59: 73-78
- [10] Rhin B et al, Gastroenterol Clin Biol, 1988, 12: A110

(下转第 10 页)

PRELIMINARY RESEARCH ON THE ANTITUMOR EFFECT AND IMMUNOLOGICAL EFFECT OF BIFIDOBACTERIUM ADOLESCENTIS DM8504 STRAIN ON THE MOUSE WITH HEPATOCARCINOMA.

Yi Qing, et al. Dept. of Microecology, Dalian Medical University, Dalian 116027

Abstract The effect of Bifidobacterium adolescentis DM8504 strain on the growth of the mouse with transplantable hepatocarcinoma and its immunological system was studied. The effect was evaluated according to following indicator: the mean transplantable weight (MTW); death ration (DR); survival time (ST) and immunological test. The results showed that this DM8504 Vaccine injected by subcutaneous way could inhibit the growth of the transplantable mouse hepatocarcinoma and also prolonging the ST and the living ratio, whether it was injected before or after the inoculation of the tumor cells. By this injecting way, we found that DM8504 Vaccine could enhance the macrophagocytic phagocytosis, the activity of neutral killer cell, the reproducing response of the spleen lymphocyte to ConA and increase the content of TNF- α in serum statistically. It is suggested that DM8504 Vaccine possesses a certain promotion on antitumor effect and the immunological modifying effect. The results were efficient.

Key words Bifidobacterium Macrophage Natural killer cell Reproducing response to ConA TNF- α Antitumor effect

(上接第 53 页)

- [11] Seddon S V and Borriello S P, J Med Microbiol, 1992, 36, 307—311
- [12] 苏文金和 Bourlioux P, 上海实验动物科学, 1994, 14, 200—203
- [13] Borriello S P et al, Rec Clin Forums, 1979, 1, 33—35
- [14] Borriello S P et al, J Med Microbiol, 1988, 25, 191—196
- [15] Eveillard M et al, Mol Microbiol, 1993, 7, 371—381
- [16] Fogh J et al, J Natl Cancer Res, 1977, 59, 221—226
- [17] Zweibaum A et al, Handbook of Physiology IV Bethesda, American Physiology Society, 1991, pp223—255
- [18] Gaillard J L et al, Cell, 1991, 65, 1127—1141
- [19] Aube D et al, Infect Immun, 1991, 59, 1290—1299
- [20] Lesuffleur T et al, Int J Cancer, 1991, 49, 731—737
- [21] Karjalainen T et al, Infect Immun, 1994, 62, 4347—4355
- [22] Masuda K et al, Microbiol Immun., 1989, 33, 287—298
- [23] Kawata T et al, FEMS Microbiol Lett, 1984, 24, 323—328
- [24] Tareoka A et al, J Gen Microbiol, 1991, 137, 261—267

(收稿日期: 95—11—7)