

魏氏梭菌外毒素的研究进展

许崇利

(吉林化工学院 生物与食品工程学院,吉林 吉林 132022)

摘要:魏氏梭菌广泛分布于食物、人畜肠道、土壤等自然环境,分为A,B,C,D和E型并产生多种毒素.对魏氏梭菌外毒素的结构、作用机制、遗传学特性和动物疾病中的作用进行阐述,以期对魏氏梭菌产生的各种外毒素深入研究提供有价值参考.

关键词:魏氏梭菌;外毒素;遗传学特性;致病性

中图分类号:S852;Q78

文献标志码:A

魏氏梭菌是革兰氏阳性菌,分为A,B,C,D和E型^[1-4]并产生 α , β , ϵ 和 ι 4种主要毒素.在5种毒素型中可产生多达16种的毒素,如 θ 毒素、肠毒素和 β 毒素等致命毒素,而且这些毒素无论单一存在还是多种毒素组合都可导致多种疾病^[5-7].

魏氏梭菌能引起多数哺乳动物的肠道感染,称为肠毒血症,这些感染是由于该菌在肠内产生的毒素进入体液循环后被吸收引起的^[8-10].另外,魏氏梭菌也可造成皮肤疾病,如皮下和肌肉组织病变(气性坏疽和恶性水肿)^[11-13].多数情况下,魏氏梭菌引起的疾病是由一种或多种魏氏梭菌强毒素所致.下面对魏氏梭菌产生的主要致病毒素的结构和作用机制、遗传学以及动物疾病中的致病作用做一综述.

1 α 毒素(CPA)

1.1 α 毒素的结构和作用机制

所有型魏氏梭菌皆可产生 α 毒素(CPA),但A型毒素菌株通常比其他毒素型菌株产量要高^[14]. α 毒素是一个由370个氨基酸组成的43 kDa的单链多肽.它包括两种结构域,一个是携带磷脂酶C(PLC)活性且为 α 螺旋的N末端结构域,另一个是参与膜绑定的C末端结构域.对于来自梭状芽孢杆菌、诺维梭状芽孢杆菌和不同梭菌的磷脂酶C,其 α 毒素氨基酸水平有50%一致性. α 毒素是一种依赖锌离子的磷脂酶C,能水解真核细胞膜的磷脂酰胆碱,同时具有鞘磷脂酶活性^[15]. α 毒素也可引起多种动物内皮细胞或其他细胞损伤. α 毒素能激活一些其他细胞膜和内部细胞机制导致溶血^[16-17].另外,结合 θ 毒素作用, α 毒素可使魏氏梭菌远离巨噬细胞吞噬体并且存活于宿主组织中,同时 α 毒素通过包括外周病变的不同机制下,造成大量损伤白细胞的迁移和促进白细胞的积聚,随后造成组织缺氧和坏死,促进魏氏梭菌增殖的厌氧环境.

1.2 α 毒素的遗传学

所有型魏氏梭菌株具有编码 α 毒素的基因,该基因位于染色体上且接近细菌染色体最稳定的区域——复制起始区. α 毒素编码基因受到许多其他魏氏梭菌的毒素编码基因质粒影响^[18-19]. α 毒素基因的核苷酸序列首先报道是来自于A型魏氏梭菌ACTC 13124菌株,该菌株是一个魏氏梭菌 α 毒素高产菌株,核苷酸序列分析显示 α 毒素编码基因有一个开放阅读框架和公认的原核细胞信号序列^[20].来自于A型魏氏梭菌和B,C,D,E型魏氏梭菌的 α 毒素编码基因具有相同的基因特征,显示它们也参与染色体的定位.一种名为VirS/VirR双成分调节系统是由一个称为VR-RNA的RNA分子调节系统积极在体内调节 α 毒素基因转

收稿日期:2015-07-10;修回日期:2015-12-17.

基金项目:国家自然科学基金(30972188);吉林化工学院博士启动基金(2015001).

作者简介(通信作者):许崇利(1974-),男,黑龙江鸡东人,吉林化工学院教授,博士,从事微生物与基因工程研究,

E-mail: xcl902@163.com

录^[21]。 α 毒素基因转录和 α 毒素蛋白的产生也通过魏氏梭菌感应系统处理,该系统是否具有相同的调节 α 毒素基因转录的机制仍需要进一步研究。

1.3 α 毒素在动物疾病中的作用

A型魏氏梭菌仍然被认为是牛、马、羊和猪的肠炎、皱胃炎和/或肠毒血症的病因。然而,在自然发病中这种微生物的作用依然存在争议且很少报道。尽管提出 α 毒素可引起这些疾病的一些临床症状和病理变化,但尚无明确的实验证据来证明 α 毒素在病理过程中的具体作用。在自然感染牛粪便中检测到大量 α 毒素,但 α 毒素也出现在许多健康的肠道中,通过检测患病动物肠道内容物中的 α 毒素还不能确诊为A型魏氏梭菌病。A型魏氏梭菌的有关实验结果显示这种细菌或许是 α 毒素可能导致一些哺乳动物产生疾病,但是无明显的因果关系,所以这种细菌及其主要毒素在肠病中的致病作用仍有争议。健康小牛管腔内注射A型魏氏梭菌可引发厌食症、抑郁、膨胀、腹泻,有时导致死亡。通过在牛小肠大剂量接种魏氏梭菌来复制肠道疾病,结果肠道疾病没有复制成功。但是在新生仔猪中接种A型魏氏梭菌,却能够促进肠下垂并且 α 毒素在仔猪胃内引发的疾病症状与被认为是毒素型魏氏梭菌产生的自然感染疾病症状相似。通过把A型魏氏梭菌接种在结扎的绵羊回肠和结肠中产生 α 毒素,结果显示 α 毒素是引起绵羊肠道疾病的根源。

A型魏氏梭菌单独作用或结合其他梭菌能引起绵羊、山羊、牛和马等饲养动物的气性坏疽(恶性水肿)。虽然最常见的病例是引起皮下组织和肌肉的气性坏疽,但是A型魏氏梭菌也能引起牛和绵羊的坏疽性乳腺炎。尽管 α 毒素被一致认为是动物恶性水肿的主要毒力因子,但尚无可靠证据来证明 α 毒素在恶性水肿的病理作用。魏氏梭菌气性坏疽和恶性水肿的主要区别特点是无明显炎症细胞和白细胞聚集,最有可能的作用机制是 α 毒素具有抑制白细胞的迁移作用。动物实验表明 α 毒素能导致小鼠死亡、皮肤坏死和溶血。当静脉注射 α 毒素后,其能抑制心肌收缩和诱发低血压、心动过缓、休克和多器官衰竭,这可能是 α 毒素直接激活肌肉细胞膜和局部血流改变和/或由 α 毒素刺激内皮细胞产生炎性介质所致。 α 毒素对于气性坏疽的致病性可以通过重组 α 毒素免疫小鼠来获得机体保护,并且通过注射魏氏梭菌 α 毒素基因敲除突变体来降低毒素的致病性。笔者课题组一直从事 α 毒素的克隆与表达工作,并且通过定点突变技术改变了其生物学活性,不但去除了 α 毒素的磷脂酶C活性,而且保留了 α 毒素的免疫活性,从而为研究 α 毒素分子结构与作用机制关系以及进一步研制 α 毒素基因工程亚单位疫苗奠定了坚实基础^[22-23]。

2 β 毒素(CPB)

2.1 β 毒素的结构和作用机制

β 毒素基因编码336个氨基酸的多肽,包含在 β 毒素分泌期间去掉的27个氨基酸的信号肽,其成熟分子量为35 kDa。纯化的 β 毒素加热分解,50℃加热1 h或100℃加热10 min可失去90%以上的致死活性。 β 毒素对于体外胰蛋白酶和胃蛋白酶处理高度敏感。低pH值不会影响其活性。 β 毒素氨基酸序列与穿孔毒素相似,与金黄色葡萄球菌 α 毒素的氨基酸组成有28%的同源性,金黄色葡萄球菌毒素能使一些动物红细胞产生溶血反应,而 β 毒素对兔红细胞和绵羊红细胞无溶血作用。

2.2 β 毒素的遗传学

β 毒素基因是由质粒编码的,从B型和C型魏氏梭菌中克隆的 β 毒素基因大小为1000 bp的ORF,而且核糖体结合位点位于在ATG起始密码子上游7 bp处。尽管已证明 β 毒素在C型和B型魏氏梭菌病致病性的重要角色,但对于 β 毒素基因的调控机制尚不清楚。研究表明VirS/VirR双成分调控系统(TCRS)可通过上调 β 毒素基因转录,来参与 β 毒素蛋白的早期合成。魏氏梭菌至少编码两种不同的群体感应系统,包括Lux和Agr系统,这两种群体感应机制可以提供分子信号从而激活TCRS。

2.3 β 毒素在动物疾病中的作用

β 毒素主要由B型和C型魏氏梭菌产生,B型魏氏梭菌能引起绵羊及其他家畜致死性出血性痢疾。C型魏氏梭菌可导致人坏死性肠炎并且几乎可引起所有牲畜坏死性肠炎和肠毒血症。B型和C型魏氏梭菌引起的动物疾病常伴随突然死亡或者急性神经系统症状。B型魏氏梭菌病的临床症状主要是腹泻、神经系统相关症状或者两者都出现,组织病理学检测与C型魏氏梭菌感染相类似。C型魏氏梭菌引起的多种家畜感染的临

床症状和组织病理学检查结果相似,发病过程可以是极急性、急性和慢性。极急性 and 急性病例的临床症状包括强烈的腹部疼痛、抑郁和血性腹泻,慢性病例发生持续的无血性、无脱水性持续腹泻。小肠可观察到病变,但是有时也涉及盲肠和结肠,少数病变位于大肠。各肠段的病变相似,急性病例发生肠和肠系膜充血、肺气肿等特点,有时肠系膜存在纤维蛋白,发生肠粘连。

B型魏氏梭菌病主要是由菌体产生的 β 毒素和 ϵ 毒素所致,均可引起致死性病变,且有协同作用。C型魏氏梭菌病的发病机制尚未完全清楚,但通过兔回肠的实验动物模型证实 β 毒素是C型魏氏梭菌病不可或缺的成分。C型魏氏梭菌引起的肠道疾病与内源性胰岛素分泌不足有关,可能是摄入的蛋白酶发生了抑制作用。 β 毒素对胰蛋白酶高度敏感,所以低胰岛素水平或者胰岛素抑制剂的存在都会有利于 β 毒素在胃肠道内持续存。B型和C型魏氏梭菌引起的动物疾病主要发生在新生动物,而其他年龄段的动物较少发病。其原因主要是由于新生动物年龄段恰好与初乳对肠道胰蛋白酶的抑制作用有关。研究表明,C型魏氏梭菌加上蛋白酶抑制剂可导致几内亚猪产生坏死性肠炎病变。近年来通过注射方式,把C型魏氏梭菌及一种蛋白酶抑制剂接种到新生绵羊肠道内,成功地复制出C型魏氏梭菌引起的肠炎病变。另外通过注射辅以胰蛋白酶抑制剂的天然 β 毒素到兔回肠,结果成功地复制出C型魏氏梭菌病的病理学动物模型。用 β 毒素诱导肠道病变的动物模型复制出来的肠道病变与C型魏氏梭菌自然感染动物引起疾病的病理学特征相类似,该动物模型可在1h内引起一系列肠道损伤,从而证实纯化的 β 毒素在兔肠道内具有很强的毒性,对研究其致病机制具有重要的学术价值和理论意义。

综上所述,C型魏氏梭菌感染动物后,引起动物致死的因素是由 β 毒素造成的,一系列研究表明纯化的 β 毒素对小鼠具有高致死率,通过建立的小鼠静脉注射致死模型也表明 β 毒素是C型魏氏梭菌感染动物主要致死因素。C型魏氏梭菌感染动物初期是大量增殖,后期产生大量的 β 毒素,而且C型魏氏梭菌培养上清液或者纯化的 β 毒素致死作用可通过预孵育抗 β 毒素单克隆抗体得到保护。为更全面研究C型魏氏梭菌感染情况,建立了两种C型魏氏梭菌感染的小鼠动物模型,一种是直接把C型魏氏梭菌进行小鼠灌胃接种或者接种于十二指肠,另一种是把C型魏氏梭菌突变体的 β 毒素或者纯化的天然 β 毒素并辅以胰蛋白酶抑制剂进行小鼠灌胃接种或者接种于十二指肠。C型魏氏梭菌或者纯化的 β 毒素能成功复制出神经系统症状和小鼠致死模型。而无 β 毒素的C型魏氏梭菌突变体对小鼠不产生致死作用,表明 β 毒素是C型魏氏梭菌的主要致死因素。另外,突变体研究发现 β 毒素212位精氨酸残基对于其致病性起着关键作用。

3 ϵ 毒素(ETX)

3.1 ϵ 毒素的结构和作用机制

ϵ 毒素的生物学特性与气单胞菌穿孔毒素相似,具有极强的细胞溶素作用,能在细胞膜上形成小孔,但魏氏梭菌 ϵ 毒素与气单胞菌穿孔毒素在氨基酸序列上无明显同源性。 ϵ 毒素是B型和D型魏氏梭菌的主要毒力因子^[24-25],可造成血压升高、平滑肌收缩性和血管通透性增加以及多种动物大脑和肺水肿,同时 ϵ 毒素还能引起山羊结肠炎。 ϵ 毒素的毒性仅次于肉毒梭菌毒素和破伤风毒素,小鼠的致死剂量为100 ng/kg。 ϵ 毒素前体分子量大小约为33 kDa,胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和具有金属蛋白酶活性的魏氏梭菌 λ 毒素都可以激活 ϵ 毒素前体,成熟的 ϵ 毒素的毒性比原毒素强1000倍。 ϵ 毒素可激活MDCK细胞和分化程度较低的平滑肌细胞瘤G-402细胞, ϵ 毒素也可杀伤豚鼠和兔体内的腹膜巨噬细胞,但尚无法证实 ϵ 毒素对豚鼠、兔、小鼠、绵羊或者山羊的其他细胞具有毒性。另外,大剂量的 ϵ 毒素还可损坏脑实质微血管内皮并产生严重病变,出现广泛性血管源性脑血肿甚至死亡。 ϵ 毒素作用于脑内皮细胞特定的受体,造成血管内皮细胞退化,改变了血流动力学,进而造成神经胶质细胞膨胀和破裂,血清蛋白和红血细胞渗漏并出现脑水肿、出血和实质坏死,这是急性绵羊病例出现中毒的临床神经症状。总之, ϵ 毒素通过影响血管渗透率,直接作用于神经来影响大脑,但是关于宿主内精确的靶向细胞和 ϵ 毒素对神经细胞的作用机制尚需进一步研究。

3.2 ϵ 毒素的遗传学

ϵ 毒素基因(etx)位于接合质粒上,多数B型魏氏梭菌分离株拥有相同的大小为65 kb的质粒,而且该质粒还携带编码 β 2毒素的基因。B型魏氏梭菌中的 ϵ 毒素基因和一些D型魏氏梭菌中的 ϵ 毒素基因都位于

IS1151 侧翼,并且在 ϵ 毒素基因上游有一个来自 Tn3 转座子的转座酶(*tnpa*)相关基因,在其下游有一个类似于金黄色葡萄球菌和乳球菌的转座酶基因。

3.3 ϵ 毒素在动物疾病中的作用

D 型魏氏梭菌 ϵ 毒素是绵羊和山羊魏氏梭菌肠毒血症的主要致病毒素,对由其导致的肠毒血症进行病理组织检测,其形态学变化与通过在绵羊和山羊静脉内接种 ϵ 毒素复制的动物模型观察到的变化相同。D 型魏氏梭菌引起的绵羊急性和慢性神经系统疾病其临床症状主要表现为突然死亡或神经和呼吸系统出现相关症状,如失明、抽搐、口角起泡和死亡前震颤,偶尔观察到腹泻。肠道发生小肠粘膜充血并有微红色内容物。有时可见心包、胸膜和腹部积液、浆膜瘀点和肺水肿。

D 型魏氏梭菌感染绵羊中 90% 病例的脑组织出现特征性变化,主要表现为大脑血管水肿和白质坏死。病变通常以白质变性、出血、神经胶质细胞和轴突肿胀为主要特点。病变有时见于大脑其他部分,如皮层和海马体。通常死于肠毒血症的绵羊肠部无明显组织学病变。D 型魏氏梭菌感染山羊也能引起急性、亚急性、慢性病例。山羊急性病例常见于未接种疫苗的年轻个体,亚急性病例更常见于接种或未接种过疫苗的成年山羊,并且以出血性腹泻、严重休克、抽搐为特点,这种病例有时 2~4 d 后导致死亡。通常接种过疫苗的成年动物出现慢性病例,以水样腹泻、腹部不适、虚弱、厌食症为特点,这种慢性症状可持续数天或数周。山羊 D 型魏氏梭菌引起的急性肠毒血症病变与绵羊发病症状相似,山羊和绵羊的慢性病例通常是在亚急性病例基础上形成,在急性或亚急性肠毒血症山羊观察到的血管周水肿和白质变性,在绵羊中也发现类似变化。另外,D 型魏氏梭菌引起的山羊亚急性和慢性肠毒血症特点是纤维坏死性结肠炎,大量革兰氏阳性杆菌聚集于病灶。

通过在绵羊、山羊、小鼠和大鼠静脉内注射 ϵ 毒素的方式来研究 ϵ 毒素的致病性,结果 ϵ 毒素能引起多种组织血管渗透性增加,最明显的特点是急性胃水肿、脑水肿并伴随白蛋白外泄,而且通过免疫组化试验证实,血管水肿免疫反应非常强烈。 ϵ 毒素的调节抑制实验表明,通过静脉注射 ϵ 毒素的小鼠最常见的影响是小脑颗粒层,出现血管源性水肿同时伴随白质病变。超微结构检测发现星形胶质细胞肿胀,尤其是其血管周扩展,提示对 ϵ 毒素对小脑星状细胞尤为敏感。免疫组织化学研究证实注射 ϵ 毒素后的小鼠,血脑屏障对白蛋白迅速开放。

4 ι 毒素

4.1 ι 毒素的结构和作用机制

ι 毒素是一种二元毒素,由两种独立蛋白组分通过非共价键连接组成,一种是结合组分(Ib, 100 kDa),另一种是酶组分(Ia, 45 kDa),两种组分都有各自的生物学活性。Ia 晶体结构显示,它与 ADP-核糖基化的蜡状芽孢杆菌植物杀虫蛋白结构相似。 ι 毒素家族组分在细菌对数生长期合成并且通过信号肽活性蛋白分泌,经酶水解去除结合组分 20 kDa 的氨基端和酶组分 9 至 11 位氨基端,才成为具有蛋白水解活性的酶组分。通过受体介导内吞作用,Ib 触发 Ia 内化进入细胞,研究发现成熟结合组分识别特异细胞膜受体,然后形成离子渗透通道,使酶组分避免内吞作用的囊泡进入胞液。一旦被胰蛋白酶激活,Ib 形成七聚体插入细胞膜并且形成小孔,允许分子如离子通过。Ib 停留在细胞表面 3 h 以上并且介导 Ia 分子内吞作用。 ι 毒素最突出的作用包括肌动蛋白丝 G-肌动蛋白单体增加的解聚,在 Agr-177 存在时 Ia 介导 G-肌动蛋白 ADP-核糖基化。形态学变化结果是白细胞迁移的抑制和活化、抑制平滑肌收缩、内吞损伤、胞外分泌和胞质分裂。通过 ι 毒素诱导的紧密连接混乱和基底细胞间连接肌动蛋白骨架解聚并伴随肠道细胞渗透率增加。

4.2 ι 毒素的遗传学

ι 毒素的组分由两种基因编码,分别是 *iap* 基因(1160 bp)和 *iab* 基因(2630 bp)。两种基因都形成一个含有 243 bp 非编码中间区的操纵子,两种基因都是通过位于 *iap* 基因上游的启动子启动 ι 毒素基因转录,但至今仍未发现调控 ι 毒素基因转录的分子。在一些 97 kb 或 135 kb 的接合质粒中发现了 *iap* 基因和 *iab* 基因,这些质粒都携带静默的肠毒素(*cpe*)基因 IS1151 成分和转座酶基因。Li 等^[26]的一项研究提示携带 *iap* 和 *iab* 基因的遗传学元件可以插入到携带转座酶的肠毒素质粒,从而在该质粒上编码 ι 毒素前体。质粒通过接合方式进行传播,结果使 A 型魏氏梭菌转化为 E 型魏氏梭菌。

4.3 ϵ 毒素在动物疾病中的作用

E型魏氏梭菌引起家畜肠道感染最初报道于20世纪40年代,起初认为这些感染是由A型魏氏梭菌感染后产生的 α 毒素引起的,后来才发现是由E型魏氏梭菌感染且由其产生 ϵ 毒素引起的。E型魏氏梭菌可引发兔肠毒血症。E型魏氏梭菌病临床特点是腹泻和特征性坏死,包括盲肠浆膜和粘膜出血,有时出现在近端结肠和回肠末端,并且有大量水样粘液物。

5 肠毒素(CPE)

5.1 肠毒素的结构和作用机制

肠毒素是一种35 kDa的单一肽链毒素,含有319个氨基酸,其二级结构80%为 β 折叠,20%为无规则卷曲,其抗原性均一,对热和pH不稳定,60℃加热10 min即可破坏;对碱有抵抗,在pH4.0以下迅速灭活;对胰蛋白酶、胰凝乳酶、木瓜酶等蛋白分解酶较稳定。肠毒素主要是由A型魏氏梭菌在芽孢期产生,部分C型、D型、E型菌也可产生。研究发现,芽孢和肠毒素的产生依赖于pH、温度和碳源,在芽孢生长的IV期末和V期可产生肠毒素,在此之前不产生或很少产生。肠毒素系魏氏梭菌芽孢细胞壁成分,在芽孢形成期之前即已形成,当芽孢形成最后阶段,即菌体细裂解及芽孢游离时,才将其释放于菌体外,引起A型魏氏梭菌食物中毒和那些非食物感染的胃肠道疾病^[27]。

肠毒素有两个功能域:氨基端功能域(N-端细胞毒性域,N-CPE)和羧基端功能域(C-端受体结合域,C-CPE)。N-CPE介导细胞毒性,C-CPE含有受体Claudins蛋白结合区域,且无细胞毒性。肠毒素通过结合细胞表面受体Claudin3和Claudin4诱导毒性。肠毒素与受体蛋白结合之后,形成由肠毒素和Claudins蛋白组成的小复合物,该小复合物寡聚化形成大复合物,该复合物在细胞膜上形成小孔,从而改变细胞膜通透性,导致分子量小于200 Da的分子膜通透性大大增加,造成小分子的流失。这表明肠毒素作为复合物的组成部分,可以部分整合到细胞质膜上,导致膜孔的形成。通过肠毒素小孔,流入的钙离子(Ca^{2+})会损伤细胞并进一步引发肠毒素诱导的胃肠道腹泻类疾病。

5.2 肠毒素的遗传学

编码肠毒素基因位于染色体或质粒上,多数人类食物中毒分离株染色体携带肠毒素,这些分离株与其他魏氏梭菌分离株存在不同。相反从死亡动物或者患过无食物负荷人类胃肠疾病得到的肠毒素阳性分离株提取的大量质粒上均携带肠毒素基因。A型魏氏梭菌分离株有75 kb和70 kb两种主要的肠毒素质粒家族。这两种肠毒素质粒家族均含有保守的35 kb核苷酸序列。研究表明并非所有A型魏氏梭菌分离株能够经接合途径在魏氏梭菌之间转移,也许因为其有相同的转座酶基因来介导四环素耐药型魏氏梭菌质粒pCW3的转移。一些C型和D型魏氏梭菌分离株也携带质粒和肠毒素基因,尽管那些质粒与A型魏氏梭菌分离株肠毒素质粒无紧密联系。另外,多数E型魏氏梭菌分离株携带静默肠毒素基因且位于其 ϵ 毒素编码质粒上,通常与A型魏氏梭菌分离株肠毒素质粒相关。

5.3 肠毒素在动物疾病中的作用

利用等位基因突变体实验证实,肠毒素在A型魏氏梭菌引起的食物中毒或者非食物传播的肠炎中发挥重要作用,而且能引起实验动物产生腹泻症状。流行病学调查也表明肠毒素在A型魏氏梭菌引起的人类食物中毒或者非食物传播的肠炎有重要的毒性作用。虽然肠毒素在A型魏氏梭菌引起的人类食物中毒发挥重要的致病作用,但在动物腹泻中却很难从粪便中检测到肠毒素。但也有些病例报告肠毒素可在家畜(包括狗、猪、马和山羊)和野生动物(如企鹅、豹子、乌龟)造成胃肠道疾病。近期研究表明在患有坏死性肠炎的幼山羊小肠内和狗腹泻的粪便中均检测到肠毒素。另外在伴有腹泻的20%成年动物和30%马驹的粪便中也都检测到肠毒素。上述报道说明粪便中肠毒素能促进动物发病,然而在健康的成年马或者马驹的粪便中均未检测到肠毒素。

6 θ 毒素

6.1 θ 毒素的结构和作用机制

θ 毒素(也称裂解素,PFO)是结合在真核细胞膜上的54 kDa溶细胞毒素。 θ 毒素在插入细胞膜之前先在

细胞膜表面形成一个大的寡聚穿孔复合物。 θ 毒素由4个结构域组成,C末端结构域结合胆固醇后改变其构型,暴露3个 β 发卡结构,插入脂质双分子层。 θ 毒素对胆固醇具有高度亲和力,从而有利于积聚在靶细胞膜上,促使寡聚物形成并插入细胞膜。 θ 毒素通过C末端结构域介导其单体结合到胆固醇, θ 毒素单体结合到胆固醇后,垂直于细胞膜表面并进行寡聚体化,形成穿孔复合物。寡聚物由40~50个单体组成,在细胞膜表面形成大弧形和环形,插入细胞膜后,组成3个loop环并形成直径在30.0~45.0 nm之间的孔隙。

6.2 θ 毒素的遗传学

所有魏氏梭菌分离株均产生 θ 毒素且由pfoA基因编码,该基因位于染色体DNA复制起点位置。 θ 毒素基因通过VirS/VirR双组分调节系统调控,通过VirS传感器激酶激活,VirR结合至启动子上游的特异VirR盒(VirR1和VirR2)激活转录。激活VirS/VirR双组分调节系统信号机制目前还不清楚,经相同的VirS/VirR双组分调节系统,肠细胞调控 θ 毒素基因转录。

6.3 θ 毒素在动物疾病中的作用

θ 毒素和 α 毒素共同引起人类和动物气性坏疽和恶性水肿。利用基因敲除技术,构建了A型魏氏梭菌 α 毒素和 θ 毒素突变体小鼠模型,结果由 α 毒素和 θ 毒素引起的典型梭菌肌坏死病理组织学特征消失了。重新加上 α 毒素结构基因这些功能又被完全修复。 θ 毒素基因敲除的魏氏梭菌突变体表明 θ 毒素能诱导肌肉坏死和抗炎反应。然而与通过 α 毒素和所有毒素协同作用引起的坏疽病变相比,其生物学效果不够明显,且该突变体造成小鼠肌坏死的严重程度低于野生型A型魏氏梭菌,故认为 θ 毒素不是引起该病必需的。相反, θ 毒素能影响宿主细胞炎性反应,尤其是能导致中性粒细胞大量进入肌坏死病变区。 θ 毒素和 α 毒素能刺激白细胞粘附,主要是通过增加血管粘附和局部缺血来实现。在高剂量和亚致死浓度下, θ 毒素明显刺激细胞间黏附分子-1的产生和糖蛋白CD11B/CD18附着于内皮细胞,促进其粘附在毗邻坏疽病变的血管。 θ 毒素破坏内皮细胞完整性引起局部水肿最终导致系统休克和多器官衰竭。

7 展望

多年来一直认为动物和人类感染魏氏梭菌后中毒是由一种或多种菌体产生的强毒素引起的,通过纯化魏氏梭菌培养上清液中的毒素使研究人员初步了解了这些毒素介导细胞损害的机制。但是魏氏梭菌介导疾病的单一毒素的特定致病机制还不是十分明确。魏氏梭菌感染的动物模型表明,通过基因突变技术获得的失去毒素活性的突变体证实魏氏梭菌在人和动物疾病中这些毒素具有特定的病理作用。这些实验结果均可在包括 α 毒素、 β 毒素、肠毒素和其他毒素等减毒或无毒基因敲除魏氏梭菌菌株中观察到。采用基因突变技术获得的基因突变体对今后从事类似的研究具有很好的启发:1)可以确定在魏氏梭菌感染人类或动物疾病中某种毒素型;2)可以研究毒素在体内的激活机制;3)可以研发出更有效的疫苗来预防魏氏梭菌引起的疾病。笔者课题组一直从事魏氏梭菌外毒素 α 和 β 的克隆与表达工作,不但通过定点突变技术改变了其生物学活性,而且通过基因融合技术构建了具有良好免疫原性的 α 和 β 融合蛋白,从而为预防由魏氏梭菌引起的相关疾病提供了免疫效果良好的基因工程亚单位疫苗。

参 考 文 献

- [1] Yonogi S, Matsuda S, Kawai T, et al. BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks[J]. *Infect Immun*, 2014, 82(6): 2390-2399.
- [2] Bokori-Brown M, Hall C A, Vance C, et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin mutant Y30A-Y196A as a recombinant vaccine candidate against enterotoxemia[J]. *Vaccine*, 2014, 32(23): 2682-2687.
- [3] Tobin C A, Sanger J R. *Clostridium perfringens* infection following carpal tunnel release[J]. *Hand (N Y)*, 2013, 8(1): 64-66.
- [4] Silva R O, Santos R L, Pires PS, et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Minas Gerais, Brazil[J]. *Braz J Microbiol*, 2013, 44(1): 133-137.
- [5] Uzal F A, Vidal J E, McClane B A, et al. *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases[J]. *Open Toxicology*, 2010, 2: 24-42.
- [6] Oda M. New insight from basic research of *Clostridium perfringens* alpha-toxin[J]. *Nihon Rinsho*, 2012, 70(8): 1313-1317.
- [7] Lee K W, Lillehoj H S, Park M S, et al. *Clostridium perfringens* alpha-toxin and NetB toxin antibodies and their possible role in protec-

- tion against necrotic enteritis and gangrenous dermatitis in broiler chickens[J]. Avian Dis, 2012,56(1):230-233.
- [8] Stanley D, Wu S B, Rodgers N, et al. Differential responses of cecal microbiota to fishmeal, Eimeria and Clostridium perfringens in a necrotic enteritis challenge model in chickens[J]. PLoS One, 2014,9(8):e104739.
- [9] Antonissen G, Van Immerseel F, Pasmans F, et al. The mycotoxin deoxynivalenol predisposes for the development of Clostridium perfringens-induced necrotic enteritis in broiler chickens[J]. PLoS One, 2014,9(9):e108775.
- [10] Li J, McClane B A. Contributions of NanI sialidase to Caco-2 cell adherence by Clostridium perfringens type A and C strains causing human intestinal disease[J]. Infect Immun, 2014,82(11):4620-4630.
- [11] Lee H L, Cho S Y, Lee D G, et al. A Fatal Spontaneous Gas Gangrene due to Clostridium perfringens during Neutropenia of Allogeneic Stem Cell Transplantation: Case Report and Literature Review[J]. Infect Chemother, 2014,46(3):199-203.
- [12] Brzywczy-Włoch M, Bulanda M. Analysis of genetic similarities between Clostridium perfringens isolates isolated from patients with gas gangrene and from hospital environment conducted with the use of the PFGE method[J]. Pol Przegl Chir, 2014,86(3):141-146.
- [13] Kitterer D, Braun N, Jehs MC, et al. Gas gangrene caused by clostridium perfringens involving the liver, spleen, and heart in a man 20 years after an orthotopic liver transplant; a case report[J]. Exp Clin Transplant, 2014, 12(2):165-168.
- [14] Oda M, Matsuno T, Shiihara R, et al. The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and the hemolysis of sheep erythrocytes induced by Clostridium perfringens alpha-toxin[J]. J Lipid Res, 2008,49(5):1039-1047.
- [15] Sakurai J, Nagahama M, Oda M. Clostridium perfringens alpha-toxin: characterization and mode of action[J]. J Biochem, 2004,136(5):569-574.
- [16] O'Brien D K, Melville S B. Effects of Clostridium perfringens alpha-toxin (PLC) and perfringolysin O (PFO) on cytotoxicity to macrophages, on escape from the phagosomes of macrophages, and on persistence of C. perfringens in host tissues[J]. Infect Immun, 2004,72(9):5204-5215.
- [17] Fatmawati N N, Sakaguchi Y, Suzuki T, et al. Phospholipase C produced by Clostridium botulinum types C and D: comparison of gene, enzymatic, and biological activities with those of Clostridium perfringens alpha-toxin[J]. Acta Med Okayama, 2013,67(1):9-18.
- [18] Okumura K, Ohtani K, Hayashi H, et al. Characterization of genes regulated directly by the VirR/VirS system in Clostridium perfringens[J]. J Bacteriol, 2008,190(23):7719-7727.
- [19] Vidal J E, Chen J, Li J, et al. Use of an EZ-Tn5-based random mutagenesis system to identify a novel toxin regulatory Locus in Clostridium perfringens Strain13[J]. PLoS One, 2009,4(7):e6232.
- [20] Songer J G, Miskimins D W. Clostridial abomasitis in calves: case report and review of the literature[J]. Anaerobe, 2005,11(5):290-294.
- [21] Ohtani K, Hirakawa H, Tashiro K, et al. Identification of a two-component VirR/VirS regulon in Clostridium perfringens[J]. Anaerobe, 2010,16(3):258-264.
- [22] 许崇利,许崇波. 产气荚膜梭菌 α 毒素基因的定点突变与表达[J]. 江苏农业学报, 2010,26(2):258-263.
- [23] 宫语晨,许崇利,钱爱东,等. A型魏氏梭菌 α 毒素 Asp-56 基因定点突变与结构分析[J]. 中国兽药杂志, 2014,48(6):1-7.
- [24] Freedman J C, Li J, Uzal FA, et al. Proteolytic processing and activation of Clostridium perfringens epsilon toxin by caprine small intestinal contents[J]. MBio, 2014,5(5):e01994-1914.
- [25] Alves G G, Machado de Àvila R A, Chávez-Olórtegui C D, et al. Clostridium perfringens epsilon toxin: The third most potent bacterial toxin known[J]. Anaerobe, 2014,30C:102-107.
- [26] Li J, Miyamoto K, McClane BA. Comparison of virulence plasmids among Clostridium perfringens type E isolates[J]. Infect Immun, 2007,75(4):1811-1819.
- [27] Minamoto Y, Dhanani N, Markel M E, et al. Prevalence of Clostridium perfringens, Clostridium perfringens enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea[J]. Vet Microbiol, 2014,174(3-4):463-473.

Development of Clostridium Welchii Exotoxin

XU Chongli

(College of Biology and Food Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, China)

Abstract: Clostridium welchii is widespread in food, human and animal intestines, soil and other natural environments. Clostridium welchii strains are classified into five toxinotypes A, B, C, D and E based on the production of toxins. In this research, we mainly elaborated the structure of the exotoxin, mechanism of action, genetic characteristics and the role of animal diseases. We expect to provide valuable information for the in-depth study of various exotoxin of Clostridium welchii.

Keywords: Clostridium welchii; exotoxin; genetic characteristics; pathogenicity