

霍乱肠毒素研究的概况

司马蕙兰

戚正武

(上海市卫生防疫站) (中国科学院生物化学研究所)

1961年副霍乱病自印尼传出后,引起世界性的大流行已有17年。最近波及到亚洲、非洲、欧洲引起第七次大流行,从而引起对霍乱研究的重视。霍乱肠毒素的毒性极高,其致毒剂量与激素的水平相当,对组织器官又有很强的专一性,是研究活性蛋白结构与功能的理想材料,因此对霍乱肠毒素的研究不论在理论和实践上都有重要意义。

由霍乱引起的急剧的上吐下泻,其发病机制虽在一个多世纪前已开始有所议论,但直到最近才明确霍乱引起激烈腹泻的主要物质基础是霍乱弧菌所产生的外毒素,现称为霍乱肠毒素或称霍乱外肠毒素、霍乱毒素、霍乱原(cholera-gen)等。此外在精制过程中分离出一种在免疫性上有交叉但无毒性的类毒素,称之为类霍乱原(cholera-genoid)。霍乱肠毒素除能使动物腹泻外,还具有使血管通透性亢进的性能。

本文对霍乱肠毒素的提纯、物化性质、化学结构、生物活性及其作用机制等方面加以叙述。

一、霍乱肠毒素的提纯

在培养霍乱菌时其肠毒素的产生可因菌株不同而不同。有的菌株在体外不能产生霍乱原,但在体内可以产生。有的菌株用活菌灌喂实验动物时可引起腹泻,但在体内或在体外未被证明能产生霍乱原。这可能是由于在肠腔内产生的毒素与粘膜上皮细胞结合,因此在腹泻粪便中未能查到,或在体外产生的毒素由于被菌自身所产生的蛋白酶分解所致。

霍乱肠毒素的提纯目前大多采用Finkelstein等^[1]方法,此法简便并可得到一定量的制剂。每次从9升霍乱菌培养液开始,先离心去菌体,上

清液用超滤膜浓缩,然后在葡聚糖凝胶G-75上分离。活性部分再用超滤膜浓缩并在生物凝胶A-5 m上分离。所得活性部分浓缩后再通过由两根层析柱联在一起的葡聚糖凝胶G-75,这样就可把毒素和类毒素分开。不同批数的得率在28.7%至62.5%之间。每批平均得肠毒素72毫克,其中毒素28毫克,类毒素44毫克。在等电聚焦电泳中表明,毒素的纯度较高而类毒素则含有较多杂质。此后Finkelstein等(1972)进一步得到霍乱肠毒素及类毒素的结晶。毒素结晶大部分呈板块状或长斜方形,兼有针状结晶,总的结晶形状不很规则。类毒素虽也能结晶,但无定形较多,形状与毒素的晶体相似。

除上述方法外,霍乱肠毒素也可用氢氧化铝凝胶(pH 6.4),葡聚糖硫酸脂凝胶及6偏磷酸钠(pH 4.6)凝胶等来吸附,再配合离子交换层析及凝胶过滤等方法加以提纯。

Cuatracasas等^[2]利用霍乱肠毒素能与神经节苷脂专一结合的特性,将神经节苷酯通过大分子“手臂”(白蛋白或赖氨酸与丙氨酸的共聚体)与琼脂相连结进行亲和层析,能高效率地专

表1 霍乱原及类霍乱原的物化性质

特 性	霍 乱 原	类 霍 乱 原
分 子 量	82,000—84,000	57,000—58,000
$S_{20}^0, W \times 10^{13}$ (秒)	5.54	4.25
$D_{20}^0, W \times 10^7$ (厘米 ² /秒)	5.97	6.65
f/f_0	1.25	1.24
V (毫升/克)	0.722	0.731
$E_{1\%}^{1\text{厘米}}$ 0.2M Tris pH 7.5	11.41	9.56
等 电 点	6.60	7.75

一吸附霍乱肠毒素,然后用 5—7 M 胍基盐酸盐洗脱,回收率可达99%。

经提纯的霍乱肠毒素及类毒素不含脂肪或碳水化合物,它们的物化性质^[3]如表 1 所示。

二、霍乱肠毒素的结构

霍乱肠毒素的化学结构虽还未全部清楚,但在生物活性中起与细胞膜受体结合作用的亚基B,其氨基酸排列顺序已完全阐明^[4-6]。另一起毒性作用的亚基 A,其结构也部分清楚^[7]。今后随着肠毒素化学结构及立体构型的深入研究将会大大促进对其功能的理解。目前各实验室对肠毒素结构研究的结果虽有出入,命名也颇混乱,但总的描述是一致的,即霍乱肠毒素是由亚基 A (有时也称之为重链 H) 以非共价键结合的形式与亚基 B 的多聚体相联结而组成。亚基 B 的多聚体即 Finkelstein (1969) 所指的类霍乱原。亚基 A 分子内有两条分子量不同的肽链,称之为 A₁ 及 A₂ 肽链(也有人称为 α 及 γ

肽链),两者通过一对二硫键联结。亚基 B (有时也称之为轻链 L 或 β 肽链) 由一条肽链所组成,整个毒素分子可以 $\alpha \gamma \beta_n$ 表示 (Kurosky, 1977)。由于各实验室所用的毒素制剂及分子量测定的方法条件等不同, n 的测定从 4 到 8 都有报道,但目前有较多的证据,并为大多数所接受的, n 应为 5 或 6。亚基 A 与 B 在 5% 甲酸, 8 M 尿素或 5 M 胍基盐酸盐条件下都能迅速解离,甚至在缓和的中性条件下也能缓慢解离,因此可在霍乱弧菌的培养液中找到亚基 A 或亚基 B 的多聚体。亚基 B 的多聚体在 0.03% SDS (十二烷基磺酸钠) pH 4 或 0.1% SDS pH 6.2 条件下也能完全解离为单体。亚基 A 中一对二硫键经还原及羧甲基化后,其 α 及 γ 肽链可彼此分开。不同实验室所测定的分子量范围 α 肽链在 20,000 至 27,000 之间,较多的结果偏向于 23,000。 γ 肽链的分子量在 5,000 至 9,700 之间,其中以 7,500 左右的居多数。 α , γ 肽链 N 末端附近的氨基酸排列顺序已部分阐明,如表 2 所示。

表 2 α 、 γ 肽链 N 末端氨基酸排列顺序*

α 肽链	NH ₂ -Asn-Asn-Asn-Lys-Leu-Tyr-Arg-Ala-Asp-Ser-Arg-Pro-Pro-Asn-Glu-Ile-Lys.....Gly
γ 肽链	NH ₂ -Met-Ser-Asp-Thr.....Asn-Glu-Lys-Thr-Glx.....Leu-Gly-Val-Lys-Phe-Leu-Glx-Glu-Tyr

* 上述结果由亚基 A 直接用氨基酸顺序仪测定而得,从裂解所得的氨基酸回收率推测,回收率低的应为分子量较小的 α 肽链的排列顺序,另一组则为 γ 肽链的顺序

亚基 B 中共有 103 个氨基酸,也有一对二硫键,在肽链中呈内环。有三个实验室几乎同时报道了全部氨基酸的排列顺序,彼此所测定

的结果基本一致,只是在酰胺上有些差别。今引 Kurosky 等(1977)的结果如下表。

在 Lai 等的报道中(1977)第 3, 49, 56 及

1	5	10	15	20	21	25
NH ₂ -Thr-Pro-Gln-Asn-Ile-Thr-Asp-Leu-Cys-Ala-Glu-Tyr-His-Asn-Thr-Gln-Ile-His-Thr-LeuAsn-Asp-Lys-Ile-Phe-						
30		35	40 41	45		
Ser-Tyr-Thr-Glu-Ser-Leu-Ala-Gly-Lys-Arg-Glu-Met-Ala-Ile-IleThr-Phe-Lys-Asn-Gly-Ala-Thr-Phe-Gln-						
50	55	60 61	65	70		
Val-Glu-Val-Pro-Gly-Ser-Gln-His-Ile-Asp-SerGln-Lys-Lys-Ala-Ile-Glu-Arg-Met-Lys-Asn-Thr-Lea-Arg-Ile-						
75	80 81	85	90	95		
Ala-Tyr-Leu-Thr-Glu-AlaLys-Val-Glu-Lys-Leu-Cys-Val-Trp-Asn-Asn- Lys-Thr-Pro-His-Ala-Ile-Alr-Ala-Ile-						
100 101						
Ser Met-Ala-Asn						

61 位残基上的谷氨酰胺被置换为谷氨酸,第 44, 70 位上的门冬酰胺被置换为门冬氨酸。在 Nakashima 等的报道中 (1976) 第 49, 56 位上的谷氨酰胺被置换为谷氨酸,第 51, 66, 79 及 83 位上的谷氨酸被置换为谷氨酰胺,第 70 位上的门冬酰胺被置换为门冬氨酸,此外第 52 位的缬氨酸与 55 位上的丝氨酸相对换。

值得指出的是,亚基 B 分子中近 N 末端 40 个氨基酸的排列顺序与一些糖蛋白激素如促甲状腺素,促黄体素,促滤泡素及人绒毛膜促性腺激素等 β 亚基 N 端的结构相似 (Kurosky, 1977), 尤其是从残基第 8—12 位的肽段大多类同。这些激素也都有 α 及 β 亚基,而它们的 β 亚基认为是与激素的组织专一性有关。特别是促甲状腺素经证实也是与细胞膜上的神经节苷脂相结合 (Mullin, 1976)。这与霍乱肠毒素亚基 β 的性质相似 (Kurosky, 1977)。也即说明结构上的相似反映在功能上的相似。至于肠毒素与上述这些激素究竟有何内在的联系,从分子进化及演变的角度令人深思。

霍乱肠毒素通过亚基 B 与小肠粘膜上皮细胞膜上的受体相结合,此受体中含有神经节苷脂特别是 GM₁ [Gala ctosyl-N-acetylgalactosaminyl (siolasy) lactosyl ceramide], 因此后者能竞争性抑制肠毒素或其类毒素与细胞膜的结合 (Cuatrecasas, 1973)。亚基 B 本身并无毒性,不直接作用于腺苷环化酶的激活系统,它仅是使毒素在细胞膜上高度聚集。肠毒素的毒力通过亚基 A 来体现 (Kurosky, 1977; Heyning, 1976)。从皮内反应测定 (Ohtomo, 1976) 单独的亚基 A 仍具有约 2% 的活力。此活力能被过量的抗肠毒素血清所中和,但不被抗类毒素血清所中和 (Heyning, 1976)。Gill (1976) 认为亚基 A 中的毒性中心位于 A₁ 肽链上(即 α 肽链),而 A₂ 肽链(即 γ 肽链)的作用是使亚基 A 能正确地与亚基 B 相联结,从而形成高活力的完整的毒素分子。并进一步推测,当毒素与细胞膜上的受体结合时,亚基 B 通过疏水键使在细胞膜上形成一通道,这样亚基 A 便能脱离亚基 B 而进入膜内,两条肽链间的二硫键被细胞内容

胱甘肽还原后拆开,从而释放出 A₁ 肽链,后者即参与腺苷环化酶的激活系统。

Lai 等 (1976) 认为亚基 B 的多聚体排列成环状,而亚基 A 即位于其中。Ohtomo 等 (1976) 在电镜下观察到霍乱肠毒素由颗粒状小球绕成环状,有的带核,有的无核,环状小球即为类毒素。除环状外,也有呈 V 形或 Y 形的,在两侧内也有的带核,有的不带核。

三、霍乱肠毒素的生物活性及其作用机制

1. 生物活性

将霍乱活菌或毒素经口投与乳兔及乳鼠可引起致死性的腹泻。腹泻是由于水的吸收及分泌的差别所引起的,也即水的分泌远大于吸收。但依存葡萄糖的钠离子及水的吸收机能仍能正常进行。因此患霍乱的动物或人可用含有葡萄糖的电解质经口给予作补液疗法。De 用兔肠段结扎作为毒素活性的定量测定(即在肠段内接种活菌或毒素,观察结扎肠段内的液体贮留量(表 3)。Craig (1971) 指出小白鼠静脉内注射毒素后导致死亡,但反应较迟,要在 48 小时之后,并不伴有腹泻。霍乱肠毒素除有致泻作用外,对动物(主要是豚鼠及兔)及人经皮内接种后还可引起局部浮肿及血管通透性亢进,因此可借此测定局部肿胀部分的直径而作为毒素的定量法(表 3)。毒素的这种血管通透性亢进作用,不仅在皮内注射时可观察到, Tsuchiya (1972) 发现当毒素局部作用于肠间的小血管时也可观察到自静脉内注入的色素向血管外漏出,此作用约从 3 分钟开始,主要部位是细静脉,此后散在血管周围的肥大细胞也出现脱颗粒现象。

目前有较多的实验证据认为上述两种活性不能分开,致泻作用及血管通透性亢进作用来源于同一的毒素。例如霍乱患者大便或小肠内容物中这两种活性的强度相平行。患者血清对两种活性的中和能力也相平行,两者活力都随着发病过程而上升,随着毒素的提纯,此两种活性也都一致提高,用高纯度毒素免疫的特异抗

表 3 精制霍乱毒素的生物活性

动 物 种 类	给 毒 途 径	生 物 活 性	有 效 量 (微 克)
乳 兔	经 口	腹 泻	0.25—0.5
乳 鼠	经 口	致 死	14
成 鼠	经 口	腹 泻	4
成 鼠	静脉内注射	致 死	5
成 兔	小肠结扎	液体贮留	0.2 (2.0)
成 兔	皮内注射	血管通透性亢进 (BD)	0.00006—0.001
成 兔	皮内注射	血管通透性亢进 (Lb)	0.038
成熟豚鼠	皮内注射	血管通透性亢进 (BD)	0.0002
成 鼠	足 蹠	浮 肿	0.4
大白鼠 (副睾脂肪细胞)		脂肪分解	0.14

血清对这两种活性均有很好的中和作用。

霍乱毒素作用于小肠粘膜引起水的过度分泌认为是由于促进了上皮细胞中环磷酸腺苷(cAMP)浓度的升高,至于血管通透性的亢进是否也与环磷酸腺苷浓度的升高有关,至今还不清楚。大桥诚等^[8]曾将 cAMP 经皮内注射未观察到血管通透性的亢进。最近 Bhattacharjee 及 mosley (1973) 报道将精制的霍乱肠毒素用 pH 2.0 处理 1 小时,则血管通透性亢进作用的活性失去 85—96%,但致腹泻活性,对小白鼠的致死活性及对脂肪细胞的脂肪分解作用却能很好的保持。这可能是致泻作用或血管通透性亢进作用虽来源于同一毒素,但两者的活性中心位于毒素分子的不同部位,其中之一对酸敏感而失活。

2. 作用机制

1968 年 Field 等取兔小肠段,从浆膜侧及粘膜侧的不同方向观察电解质运行情况,当在小肠粘膜的浆膜侧加入 cAMP 或茶叶硷 (theophylline $C_7H_8N_4O_2$) 可观察到氯离子的分泌亢进和钠离子的吸收受阻。继而 Field (1972) 在同样条件下在粘膜侧给以霍乱肠毒素也观察到有氯离子的能动性分泌亢进及钠离子的吸收受阻。若已被肠毒素充分作用的小肠粘膜,再用茶叶硷, cAMP 作用,就不再引起比此更高的反应,由此认为霍乱肠毒素的作用机制可能与体内局部的 cAMP 浓度升高有关。

Pierce 等(1971)报道用狗的“莆爱鲁拉”瘘管 (Thiryvella fistulae), 在肠系膜上动脉注入

前列腺素则其作用与在瘘管内注入肠毒素是同样的,都导致水的过度分泌。已知前列腺素作用于哺乳动物各脏器是使局部的 cAMP 浓度升高。Field 等及 Pierce 等进一步证明经霍乱肠毒素作用后小肠上皮细胞内 cAMP 浓度的升高与腺苷环化酶活力的提高有关。随后各实验室都相继证实了上述结果。霍乱肠毒素的作用机制见图 1。

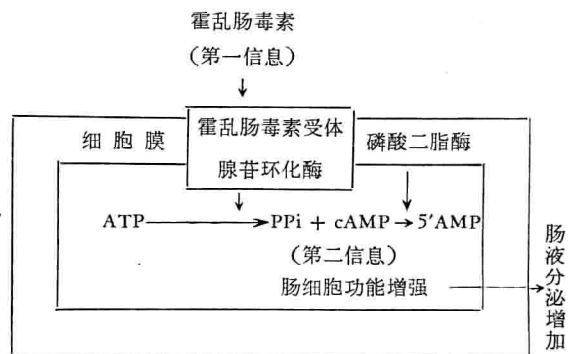


图 1 霍乱肠毒素对小肠粘膜细胞的作用机制

既然霍乱肠毒素的作用机制是使小肠上皮细胞中 cAMP 浓度升高,毒素是否也影响其它与 cAMP 有关的生理效应? Vaughan 等(1970)用霍乱肠毒素作用于大白鼠副睾脂肪细胞也有促进脂肪分解的作用,因此也可用作毒素或抗毒素的定量测定。Cuatrecasas (1973) 认为毒素对脂肪细胞的作用也是使 cAMP 浓度升高,并可用胰岛素或四氧嘧啶来拮抗。但前列腺素的阻断或 RNA 或蛋白合成阻断剂就无此作用。Gorman 等(1972)报道霍乱肠毒素也可使小白

鼠肝脏的腺苷环化酶活性升高。Pierce 等报道狗静脉注射霍乱肠毒素后,血中肝糖元、谷氨酸-草乙酸转氨酶的活力上升,钠离子浓度减少,但腹泻却不发生。Lichtenstein 等(1973)报道霍乱肠毒素可阻断组织胺的释放,在此同时cAMP浓度上升。Bourne 等指出由霍乱肠毒素而引起的cAMP升高与前列腺素 E_1 的作用不同,两者有不同的结合受体。Donta及King用极微量的霍乱肠毒素作用于培养的小白鼠肾上腺细胞(Y-1),可使其变形而成球形, Δ^4 ,3-甾酮素的量也增高,此形态变化与腺苷环化酶的活化即与cAMP浓度增加有关。

综上所述,霍乱肠毒素由于使细胞内cAMP浓度升高而使小肠粘膜上皮细胞中水及电解质的输送受阻。不仅如此,由cAMP所控制的其他有关的生理效应也受到影响。但毒素与细胞膜结合后,细胞内cAMP的浓度并非立即增高,而有一潜伏期,此过程的全貌至今还不清楚。至于霍乱肠毒素与激素或其他化学物质所导致的cAMP浓度升高彼此有何异同,各种拮抗物质有何影响等,还有待于进一步的研究。

四、霍乱肠毒素的专一性

1. 器官专一性

Carpenter 等(1968)及Banwell 等(1970)观察霍乱患者腹泻时的水分丧失大部分在小肠,肠管单位长度排出液量以十二指肠最多,其次是空肠和回肠。

Peterson 等(1972)用免疫组织技术证明霍乱毒素是与小肠粘膜上皮细胞的微绒毛的表面相结合,不进入到细胞内。Holmpren 等(1976)用同位素标记的霍乱肠毒素与胸腺细胞作用,指出每一细胞能很快结合5,000左右的毒素分子,而细胞内的标记毒素约为结合的百分之一或更低。在一般霍乱感染的情况下,菌在肠管腔内繁殖,未见到活菌侵入到粘膜上皮细胞内。肠腔内产生的毒素在胸导管淋巴液中也未能找到。并如前述,若毒素直接经静脉注射可引起全身或远离脏器的影响,例如促进肝的糖代谢或谷氨酸-草乙酸转氨酶活力的上升,这些现象

在霍乱患者却未见到,也即体内毒素无明显吸收。同样若直接注射毒素则血中抗毒素效价容易上升。但将狗的小肠结扎段用毒素攻击则抗毒素效价未见上升。

另一方面也有实验表明霍乱肠毒素被肠粘膜吸收,并通过血循环流向远处或发出致泻信息。Serobro 等用毒素作用于兔小肠结扎段时,在无毒素作用的肠段中也可引起液体的吸收阻断。Vaughan-Williams 等(1969)将乳兔用外科方法使空肠段与全肠隔离,并用霍乱菌569B攻击,肠段的其它部分未见有菌的增殖,但却可引起致死性腹泻。感染乳兔的血与非感染动物的血进行交换灌流,在兔肠腔内也可引起液体的贮留。上述两种不同的结果还有待于进一步阐明。

2. 毒素的受体

霍乱肠毒素在很短的时间内能和细胞膜上的受体相结合,Mosley 等(1969)将兔小肠结扎段经毒素作用5分钟后再加入抗毒素就无抑制作用。从毒素作用后至有效果出现约需30分钟到1小时以上的潜伏期,其作用可持续很长的时间。Van Heyningen (1971)首先指出,作为细胞膜构成成分之一的神经节苷脂 GM_1 可以抑制毒素的活性,但若毒素先与小肠作用5分钟后再加 GM_1 就不再有抑制作用,因此说明毒素与细胞膜上作为受体结合点的神经节苷脂的结合非常迅速。破伤风毒素的受体也是神经节苷脂,但它们是对唾液酸敏感的 GD_{1b} (GG_n SSLC, disialoganglioside)及 GT_1 (SGG_n SSLs, trisialoganglioside),霍乱肠毒素与这些物质都不结合,也即在神经节苷脂中唾液酸的含量及位置影响不同毒素的结合能力。脂肪细胞若经 GM_1 处理后,其对霍乱毒素的感受性可增高,说明 GM_1 可自然地成为细胞膜的组成成分。

毒素与受体结合后如何使cAMP的浓度升高,其机制还不清楚。毒素与上皮细胞的刷状缘结合,但这里没有腺苷环化酶,后者主要存在于细胞侧面及基底的细胞膜,并以结合形式存在。与细胞表面上受体结合的毒素怎样将信息传递给腺苷环化酶将是继续研究的课题。

Cuatracasas 认为毒素先在细胞膜表面形成无活性的毒素受体复合物,经变构效应后才具有生物活性而存在于膜的内侧。

本文叙述了以霍乱肠毒素的结构功能及作用机制为主的国外科研动态,今后的研究方向将是阐明毒素的整个分子结构及毒素与细胞膜结合后怎样使腺苷环化酶活化的机制。细菌所产生的毒素和高等动物的激素有相似的作用,这在学术界引起很大的兴趣,今后无论对毒素或对激素的研究彼此都将提供有益的借鉴。

对霍乱肠毒素作用机制的研究,将有利于设计相应的有效治疗药物,例如如何使腺苷环化酶的活力受到抑制或使细胞内 cAMP 浓度不上升或阻断小肠粘膜上皮细胞受体与毒素结合。此外与抗毒免疫有关的霍乱类毒素也有待研究。此外用肠毒素来提高细胞内 cAMP 浓度有可能作为防治恶性肿瘤的重要手段。

随着霍乱肠毒素研究的进展,发现不凝集性弧菌及大肠菌也能产生与霍乱肠毒素性质相似的肠毒素,这样就可以解释一些原因不明的腹泻。

主要参考文献

[1] Finkelstein, R. A. et al.: *J. Infect. Dis.*, 121, Suppl., S. 63, 1970.
[2] Cuatracasas, P., et al.: *Biochem.*, 12, 4253, 1973.
[3] Lospalluto, J. J. et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 257, 158, 1972.
[4] Kurosky, A. et al.: *Science*, 195, 299, 1977.
[5] Lai, C. Y. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74, 215, 1977.
[6] Nakashima, Y. et al.: *FEBS Lett*, 68, 275, 1976.
[7] Kurosky, A. et al.: *J. Infect. Dis.*, 133, Suppl, S. 14, 1976.
[8] 大桥诚:《日本细菌学杂志》29, 354, 1974。

[本文于 1978 月 2 月 21 日收到]

勘 误

现将本刊 1978 年第 1 期、第 3 期和第 4 期中的错误更正如下:

期	页	栏	行	误	正
1	19	右	20	经过低温阶段	经过秋末低温锻炼阶段
1	20	左	10	vious	virus
1	24	左	8	Q→细胞色素 c	QH ₂ →细胞色素 c
1	24	左	图 9	NADH ↓ NADH	NADH ↓ NADPH
1	25	右	5	脱氧酶	脱氢酶
1	26	右	倒 8	COQH ₂	CoQH ₂
3	41	左	倒 13	生物和无生产	生物和无生物
3	44	右	4	开窍于目和二阴	开窍于耳和二阴
4	46	右	7	缓冲溶	缓冲液