

# 腐败梭菌 $\alpha$ 毒素的研究进展

彭国瑞, 蒋玉文\*, 彭小兵, 李旭妮, 王秀丽

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2013-06-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2013)10-0053-04 [中图分类号] S852.61

**[摘要]** 就腐败梭菌  $\alpha$  毒素的理化性质、生物学特性、结构与功能、致病机制、免疫原性和应用等方面国内外的研究进展进行了概述, 以期对腐败梭菌病的防治以及其病原的其他研究提供借鉴。

**[关键词]** 腐败梭菌;  $\alpha$  毒素; 结构; 功能; 致病机制; 免疫原性

## Research Progress of *Clostridium septicum* Alpha-toxin

PENG Guo-Rui, JIANG Yu-Wen\*, PENG Xiao-Bing, LI Xu-Ni, WANG Xiu-Li

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

**Abstract:** The domestic and international research progress on the physicochemical properties, biological characteristics, structure and function, pathogenesis, immunogenicity and applications of *Clostridium septicum* alpha-toxin are reviewed in this article. It may provide reference for preventing and curing the disease caused by *Clostridium septicum*, and for other research on its etiology.

**Key words:** *Clostridium septicum*; alpha-toxin; structure; function; pathogenesis; immunogenicity

腐败梭菌(*Clostridium septicum*)是一种革兰氏阳性厌氧杆菌, 可引起多种动物的恶性水肿、肌肉坏死、气性坏疽以及坏死性肠炎等疾病。该菌能够产生  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$  四种外毒素, 其中  $\alpha$  毒素是其主要的致死性毒力因子<sup>[1-2]</sup>。 $\alpha$  毒素的研究对由腐败梭菌引起的疾病的防治、致病机理以及相关分子生物学的研究都具有重要的意义。本文从理化性质、生物学特性、结构与功能和致病机制等方面就当前  $\alpha$  毒素的研究进展进行了概述。

### 1 理化及生物学特性

$\alpha$  毒素是一种蛋白质性外毒素, 等电点(PI)为 8.4, 以分子量 46 ~ 48 kD 的低活性或无活性的前体毒素形式分泌后, 经胰蛋白酶、蛋白酶 K 和糜蛋白酶等蛋白酶在其 C 端水解 45 个氨基酸后, 形成大小约 41 ~ 44 kD 的活化形式<sup>[3-4]</sup>。 $\alpha$  毒素可形成浓度依赖性的分子量大约 230 kD 的寡聚体<sup>[5]</sup>, 这

种寡聚体对温度和十二烷基磺酸钠(SDS)均耐受而不解聚<sup>[6]</sup>。该毒素易受热失活, 经 0.5% ~ 0.8% 的甲醛溶液 37 °C 处理 3 ~ 6 d 后可脱毒成为类毒素。

$\alpha$  毒素具有溶血、细胞毒性、坏死和致死等生物活性<sup>[7]</sup>, 对常见试验用细胞如 CHO、Vero、MDCK 和人的上皮细胞等均有毒性<sup>[8-9]</sup>, 消化道内能使消化道粘膜(尤其是真胃粘膜)发生炎症和坏死, 经血液循环进入体内, 刺激中枢神经系统, 会引起羊只急性休克而迅速死亡。 $\alpha$  毒素的溶血活性约为  $1.5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$  U/mg, 静脉注射对小鼠的  $LD_{50}$  约为 10  $\mu$ g/kg 体重<sup>[4, 6]</sup>。温度和蛋白酶均会影响其溶血活性。胰蛋白酶、糜蛋白酶和氨酰酞内切酶等处理后可提高毒素的溶血活性<sup>[10]</sup>; 当温度  $\leq 15$  °C 时, 溶血活性明显受到抑制, 4 °C 条件下仅少部分甚至完全不溶血, 当温度  $\geq 25$  °C 时, 可以充分溶血<sup>[11]</sup>。Catherine L Kennedy<sup>[1]</sup>报道,  $\alpha$  毒素对有核

作者简介: 彭国瑞, 硕士研究生, 从事兽医微生物与免疫学研究。

通讯作者: 蒋玉文。E-mail: jiangyuwen@ivdc.gov.cn

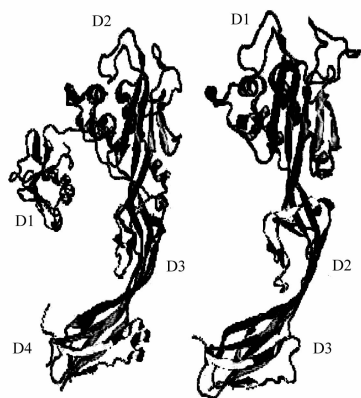
细胞的细胞毒性与其毒力具有良好的相关性,而溶血活性与毒力的相关性则较差。因而,体外细胞毒性试验可以替代小鼠毒性试验用于毒素毒力的测定<sup>[8]</sup>。Imagawa T 等通过原核表达系统获得的重组  $\alpha$  毒素,多数都能保持与天然毒素相似的生物学特性<sup>[12]</sup>。

## 2 结构与功能

$\alpha$  毒素的基因含有 1329 bp 编码序列,编码 443 个氨基酸,表达分子量大约 49 kD 的蛋白质<sup>[12]</sup>,氨基端的前 31 个氨基酸为信号肽序列。该毒素与嗜水气单胞菌的气溶素在序列、晶体结构和生物学功能等方面均相近,二者 DNA 序列的相似度达 72%。就其功能位点研究表明,KKRRGKR<sub>398</sub>SVD 片段上第 398 位的精氨酸,对于  $\alpha$  毒素蛋白酶的体外活化是必不可少的,这一位点的显著特点是含有 RGKR 真核弗林蛋白酶(furin)识别位点,前体毒素被胰蛋白酶或是弗林蛋白酶水解后形成 41~44 kD 的活化形式<sup>[3]</sup>,和一个小分子的前肽。前肽作为分子伴侣不仅可以维持  $\alpha$  毒素前体的稳定,还能促使  $\alpha$  毒素在细胞膜上穿梭运动来发挥细胞穿孔活性<sup>[5]</sup>。靠近 C 端富含色胺酸的 302NGYSEWDWKWV312 上的 WDW\_W 片段是  $\alpha$  毒素与受体糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定蛋白的结合位点<sup>[9]</sup>,第 86 位的半胱氨酸也决定  $\alpha$  毒素与其受体的结合,若该位点突变将失去受体结合的能力<sup>[13]</sup>。双亲性跨膜结构 204KIGVKTSTFKVGLAIDSKVETSFEFNAE231 是  $\alpha$  毒素在细胞膜上穿孔的主要功能区<sup>[1, 14]</sup>。另外,研究表明将 S189C/S238C 两个氨基酸突变后,  $\alpha$  毒素失去细胞毒性<sup>[15]</sup>,因而这两个氨基酸同样对毒素生物活性的维持意义重大。

$\alpha$  毒素含有与气溶素相近的大结构臂,却不包含气溶素相应区域的小结构臂。Diep 等<sup>[16]</sup>将气溶素的小结构臂重组到  $\alpha$  毒素上,获得了类气溶素的七聚体,并具备与气溶素相同的功能,证明  $\alpha$  毒素和气溶素的大结构臂都是可以作为与 GPI 结合的配体。以气溶素晶体结构为模型,预测  $\alpha$  毒素的空间结构,得到 D1、D2 和 D3 三个结构域(图 1)<sup>[13]</sup>。通过定点突变推测  $\alpha$  毒素的受体结合位点、寡聚体形成活性位点和穿孔细胞毒性位点以及跨膜结构域的研究发现:删除位于 D2 的双亲性  $\beta$  发夹跨膜区不会明显改变  $\alpha$  毒素分子的正常折叠,且能保持完整的受体结合、蛋白酶水解活化以及形成膜穿孔

复合物等功能,但失去了形成细胞膜  $\beta$  孔道和溶细胞的作用,并完全丧失了其在腐败梭菌引起的疾病中的作用<sup>[1]</sup>。 $\alpha$  毒素与细胞膜相互作用时, D2 的跨膜环必须移动并发生构象改变,以远离毒素的骨架结构,  $\beta$  发夹才能插入细胞膜<sup>[14]</sup>。D1 的 L2 环通过调节  $\beta$  发夹的跨膜作用同样影响  $\alpha$  毒素的穿孔活性,此外, D2 上的 G369 对于穿孔活性也是必需的。而 D1 的功能不仅如此,还包含有与 GPI 结合的位点,和影响与受体结合的 86 位的半胱氨酸,以及有与 D3 类似的单体与单体的接头(图 2)<sup>[13]</sup>,由此推测是 D1 和 D3 的单体结合位点通过共价结合形成了耐温度和 SDS 的寡聚体。



A. 气溶素的晶体结构; B.  $\alpha$  毒素的空间结构

图 1 气溶素的晶体结构和以气溶素为模型预测得到的  $\alpha$  毒素的蛋白质空间结构

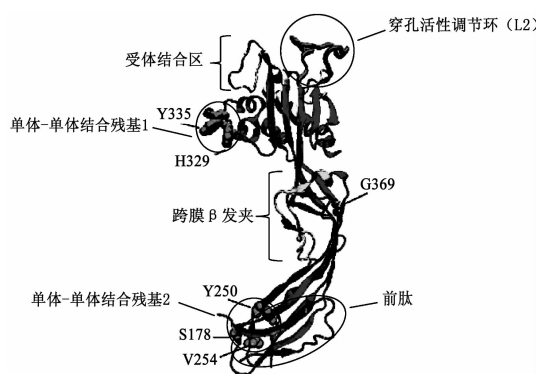


图 2  $\alpha$  毒素的蛋白结构模型

## 3 致病机制及免疫原性

经蛋白酶水解活化后,前肽从  $\alpha$  毒素上脱落<sup>[3]</sup>,前肽作为分子伴侣,在细胞膜表面糖的弱结合力作用下,促使  $\alpha$  毒素在细胞膜上作穿梭运动并识别受体。与气溶素类似,  $\alpha$  毒素通过共价键与 GPI 识别和结合<sup>[17]</sup>,不同之处在于  $\alpha$  毒素与 GPI 的结合不依赖 N 聚糖(N-glycan)<sup>[18]</sup>,且结合 GPI 的

亚基位点也不同。与受体结合后,  $\alpha$  毒素锚定在细胞膜上, 与膜相互作用形成膜穿孔复合物<sup>[11,13]</sup>, 导致  $\alpha$  毒素单体或是寡聚体构象发生改变, 其 D2 区域上的跨膜环移动并远离毒素的骨架结构<sup>[14]</sup>, 双亲性的  $\beta$  发夹插入细胞膜, 在细胞膜上形成直径 1.3 ~ 1.6 nm 的离子渗透性  $\beta$  孔道, 这一孔道长期处于高流速开放状态, 导致细胞内  $K^+$  离子和细胞胶质的大量渗出以及 ATP 的消耗, 致使细胞膜电阻迅速降低和细胞快速死亡<sup>[1,4]</sup>。Kennedy 等<sup>[19]</sup>认为形成的孔道引发  $Ca^{2+}$  离子的大量涌入,  $Ca^{2+}$  离子不会直接造成细胞的死亡, 却能诱发串联性细胞程序性凋亡, 钙蛋白酶激活, 释放溶酶体内组织蛋白酶, 活性氧水平(ROS)升高, ATP 急剧降低, 炎症反应相关细胞的细胞核释放炎症因子高迁移率族蛋白(HMGB1), 随后机体发生炎症反应, 细胞开始凋亡。由  $\alpha$  毒素引起的这样一种多层面的细胞凋亡或是死亡, 是腐败梭菌造成肌肉坏死、气性坏疽以及坏死性肠炎等病症的主要原因。

腐败梭菌不同 O 抗原血清型之间不具有交叉保护<sup>[20]</sup>, 各菌株  $\alpha$  毒素的基因序列也不完全相同, 但研究证实, 不同型的菌株产生的  $\alpha$  毒素制成类毒素免疫动物后, 机体对不同型的腐败梭菌<sup>[21]</sup>及其孢子均有抵抗力<sup>[22]</sup>, 可产生完全的交叉免疫保护<sup>[23]</sup>。因此,  $\alpha$  毒素是腐败梭菌重要的保护性抗原。张燕等<sup>[24]</sup>通过原核表达系统获得重组  $\alpha$  毒素制成类毒素免疫小鼠后, 用腐败梭菌攻击, 可实现同天然类毒素相似的免疫效果。关于血清效价的测定, 传统方法是小鼠血清中和试验, 近来有不少学者尝试体外细胞毒性抑制试验以及 ELISA 检测试验<sup>[21]</sup>, 结果与小鼠血清中和试验相关性良好<sup>[25]</sup>, 同时避免了大量活体试验动物的使用。

## 4 应用

4.1 诊断 Ballard J 等<sup>[6]</sup>用抗  $\alpha$  毒素的多克隆抗体检测产气荚膜梭菌、梭状芽孢杆菌、韦氏梭菌以及其他梭菌的培养上清, 都没有发现可以与之反应的蛋白质, 而七株来源不同的腐败梭菌均检测出分子量相近的毒素蛋白, 表明通过检测  $\alpha$  毒素可对腐败梭菌作出诊断。 $\alpha$  毒素基因在腐败梭菌各株中均特异且保守, PCR 可用于检查其基因的最低量是  $3.8 \times 10^3$  cell/mL, 所以, 获得病料模版进行 PCR 扩增  $\alpha$  毒素的特异性序列, 也可以作为快速诊断和鉴定腐败梭菌的方法<sup>[26]</sup>。Shin DJ 等利用  $\alpha$  毒素能够

与 GPI 结合的特点, 对其作突变改造, 制成无细胞毒性, 但能区分缺乏 GPI 的突发性血红蛋白尿(PNH)病人血细胞的突变型  $\alpha$  毒素, 替代商品化的单克隆抗体, 用于 PNH 病的检测<sup>[15]</sup>, 取得了一定的进展。

4.2 用于 GPI 锚定蛋白的研究 GPI 是一种广泛存在于真核细胞经脂质和多聚糖修饰的蛋白质, 主要分布在细胞膜上。多种蛋白质或是糖类可通过 GPI 锚定在细胞膜上发挥生物学功能。当前有不少学者利用  $\alpha$  毒素与 GPI 结合的特性, 研究 GPI 的生物合成、转运和分布<sup>[27]</sup>。Dong - Jun Shin 等<sup>[28]</sup>将其用于突变 GPI 后的 CHO 细胞的筛选。Zhifeng Zheng 等用表面活性剂去除细胞膜上的 GPI 后, 利用免疫荧光标记的  $\alpha$  毒素, 定位不同的 GPI 在大利斯曼原虫体内的分布<sup>[17]</sup>。为了识别 GPI 锚定蛋白和了解这些蛋白质在乳腺癌发展过程中的作用, Zhao P 等用  $\alpha$  毒素捕获血清、细胞和人乳腺癌组织中的 GPI<sup>[29]</sup>。

## 5 展望

$\alpha$  毒素作为腐败梭菌主要的致病性毒力因子和免疫保护性抗原, 有关它的生物合成、转运和分泌, 及其与另外三种外毒素的相互关系等方面的研究较少, 若能在这些领域有所进展, 将为腐败梭菌病的治疗和  $\alpha$  毒素的制备提供有力的理论指导。 $\alpha$  毒素的结构与功能的研究是当前的热点, 并取得了一些成果, 但对单体与单体形成耐 SDS 和温度的寡聚体, 毒素与受体的结合, 单体或是寡聚体与细胞膜形成膜穿孔复合物, 以及毒素穿孔和细胞死亡过程中  $\alpha$  毒素的连锁反应、构象变化和完整机制等都是值得进一步研究的内容。

通过基因工程技术获得重组  $\alpha$  毒素, 并制备类毒素疫苗的研究和应用目前还比较少。笔者认为, 通过破坏穿孔位点、保留受体结合位点和亲水性抗原表位以及利用融合表达技术制备多联疫苗等相关的研究均是十分有意义的。疫苗质量控制方面, 运用体外细胞毒素抑制试验来替代小鼠血清中和试验方法的研究进展较快, 但仍需通过大量的试验来证明其确切性和稳定性。此外, 利用  $\alpha$  毒素与 GPI 结合的偏好性, 将其用于肿瘤的研究, 制成生物导弹的配体靶向微量细胞给药; 依据  $\alpha$  毒素对大利斯曼原虫和岗地弓形虫具有毒性的研究, 将其制成抗寄生虫和植物保护类药物都具有十分广阔的研究前景。

## 参考文献:

- [1] Kennedy C L, Lyras D, Cordner L M, *et al.* Pore-forming activity of alpha-toxin is essential for *Clostridium septicum*-mediated myonecrosis[J]. *Infect Immun*, 2009, 77(3): 943-951.
- [2] Kirchner S, Matz-Rensing K, Dorner MB, *et al.* Necrotizing endometritis and isolation of an alpha-toxin producing strain of *Clostridium septicum* in a wild sooty mangabey from Côte d'Ivoire[J]. *J Med Primatol*, 2013, 26: 12047.
- [3] Gordon VM, Benz R, Fujii K, *et al.* *Clostridium septicum* alpha-toxin is proteolytically activated by furin[J]. *Infect Immun*, 1997, 65(10): 4130-4134.
- [4] Ballard J, Sokolov Y, Yuan WL, *et al.* Activation and mechanism of *Clostridium septicum* alpha toxin[J]. *Molecular Microbiology*, 1993, 10(3): 627-634.
- [5] Sellman B R, Tweten R K. The propeptide of *Clostridium septicum* alpha toxin functions as an intramolecular chaperone and is a potent inhibitor of alpha toxin-dependent cytolysis[J]. *Mol Microbiol*, 1997, 25(3): 429-440.
- [6] Ballard J, Bryant A, Stevens D, *et al.* Purification and characterization of the lethal toxin(alpha-toxin) of *Clostridium septicum*[J]. *Infect Immun*, 1992, 60(3): 784-790.
- [7] Oliver Knapp, Elke Maier, Sanae Ben Mkaddem, *et al.* *Clostridium septicum* alpha-toxin forms pores and induces rapid cell necrosis[J]. *Toxicon*, 2010, 55: 61-72.
- [8] Roth F, Jansen K, Petzke S. Detection of neutralizing antibodies against alpha-toxin of different *Clostridium septicum* strains in cell culture[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1999, 24(3): 353-359.
- [9] Mukamoto M, Kimura R, Hang'ombe M B, *et al.* Analysis of tryptophan-rich region in *Clostridium septicum* alpha-toxin involved with binding to glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins[J]. *Microbiology and immunology*, 2013, 57(3): 163-169.
- [10] Hang'ombe M B, Kohda T, Mukamoto M, *et al.* Relationship between *Clostridium septicum* alpha-toxin activity and binding to erythrocyte membranes[J]. *J Vet Med Sci*, 2005, 67(1): 69-74.
- [11] Sellman B R, Kagan B L, Tweten R K. Generation of a membrane-bound, oligomerized pre-pore complex is necessary for pore formation by *Clostridium septicum* alpha toxin[J]. *Mol Microbiol*, 1997, 23(3): 551-558.
- [12] Imagawa T, Dohi Y, Higashi Y. Cloning, nucleotide sequence and expression of a hemolysin gene of *Clostridium septicum*[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, 117(3): 287-292.
- [13] Melton-Witt J A, Bentsen L M, Tweten R K. Identification of functional domains of *Clostridium septicum* alpha toxin[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(48): 14347-14354.
- [14] Melton J A, Parker M W, Rossjohn J, *et al.* The Identification and Structure of the membrane-spanning domain of the *Clostridium septicum* alpha toxin[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(14): 14315-14322.
- [15] Shin D J, Cho D, Kim Y R, *et al.* Diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by fluorescent *Clostridium septicum* alpha toxin[J]. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2006, 11(1/2): 20-27.
- [16] Diep D B, Nelson K L, Lawrence T S, *et al.* Expression and properties of an aerolysin-*Clostridium septicum* alpha toxin hybrid protein[J]. *Mol Microbiol*, 1999, 31(3): 785-794.
- [17] Zheng Z, Tweten R K, Mensa-Wilmot K. Intracellular glycosylphosphatidylinositols accumulate on endosomes: toxicity of alpha-toxin to leishmania major[J]. *Eukaryot Cell*, 2005, 4(3): 556-566.
- [18] Hong Y, Ohishi K, Inoue N, *et al.* Requirement of N-glycan on GPI-anchored proteins for efficient binding of aerolysin but not *Clostridium septicum* alpha-toxin[J]. *EMBO J*, 2002, 21(19): 5047-5056.
- [19] Kennedy C L, Smith D J, Lyras D, *et al.* Programmed cellular necrosis mediated by the pore-forming alpha-toxin from *Clostridium septicum*[J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(7): e1000516.
- [20] 蒋玉文, 文希喆. 腐败梭菌的血清学分型及交互免疫[J]. *兽医药品通讯*, 1987, 2: 16-21.
- [21] Cortiñas T I, Mattar M A, Stefanini de Guzmán A M. Alpha-toxin production by *Clostridium septicum* at different culture conditions[J]. *Anaerobe*, 1997, 3(2-3): 199-202.
- [22] 文希喆, 王太建. 腐败梭菌产生毒素的初步试验[J]. *微生物学通报*, 1981, 4: 171-173.
- [23] Katsuhiko Amimoto, Yoshimasa Sasaki, Shin-ichi Fukuyama, *et al.* Genetic variation and cross-reactivity of *Clostridium septicum* alpha-toxin[J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 114: 51-59.
- [24] 张燕, 边艳青, 赵宝华. 腐败梭菌 alpha 毒素基因的克隆表达及其类毒素的免疫原性研究[J]. *生物工程学报*, 2007, 1: 67-72.
- [25] Woolums A R, Ensley D T, Tanner P A, *et al.* Humoral immunity and injection-site reactions in cattle vaccinated with a multivalent clostridial vaccine administered via subcutaneous injection or via transdermal needle-free injection[J]. *Am J Vet Res*, 2011, 72(8): 1124-1129.
- [26] Neumann A P, Dunham S M, Rehberger T G, *et al.* Quantitative real-time PCR assay for *Clostridium septicum* in poultry gangrenous dermatitis associated samples[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2010, 4(24): 211-218.
- [27] Wichroski M J, Melton J A, Donahue C G, *et al.* *Clostridium septicum* alpha-toxin is active against the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii* and targets members of the SAG family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface proteins[J]. *Infect Immun*, 2002, 70(8): 4353-4361.
- [28] Shin D J, Choy H E, Hong Y. Use of *Clostridium septicum* alpha toxins for isolation of various glycosylphosphatidylinositol-deficient cells[J]. *J Microbiol*, 2005, 43(3): 266-271.
- [29] Zhao P, Nairn A V, Hester S, *et al.* Proteomic identification of glycosylphosphatidylinositol anchor-dependent membrane proteins elevated in breast carcinoma[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(30): 25230-25240.

(责任编辑:李文平)