

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.12.11

# 魏氏梭菌外毒素引起细胞死亡的作用机制

许崇利<sup>1</sup>,许崇波<sup>2\*</sup>

(1. 重庆医药高等专科学校医学技术学院,重庆 401331;2. 韶关学院英东生命科学院,广东韶关 512005)

[收稿日期] 2019-07-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2019)12-0057-09 [中图分类号] S852.61

**[摘要]** 魏氏梭菌可产生组织毒素和神经毒素等多种毒素蛋白从而引起食物中毒和坏死性肠炎等肠道疾病。其产生的主要毒素包括  $\alpha$  毒素、 $\beta$  毒素、 $\theta$  毒素、 $\varepsilon$  毒素、 $\iota$  毒素、肠毒素和坏死性肠炎毒素 B。 $\alpha$  毒素是魏氏梭菌主要的毒力因子,是一种依赖锌离子的多功能金属酶,具有磷脂酶 C 活性,可引起气性坏疽和食物中毒。 $\beta$  毒素能导致人类和动物的坏死性肠炎和肠毒血症, $\varepsilon$  毒素可引起绵羊和山羊的肠毒血症, $\iota$  毒素是导致兔子肠炎的主要因素,肠毒素能导致人类食物中毒和痢疾,而坏死性肠炎毒素 B 则主要引起鸡的坏死性肠炎。魏氏梭菌毒素通过与靶细胞膜上的受体相互作用从而激活细胞内信号通路导致细胞死亡。魏氏梭菌引起的细胞死亡主要包括细胞凋亡、细胞坏死和细胞程序性坏死。通过对魏氏梭菌引起细胞死亡机制的阐述以期对魏氏梭菌的深入研究提供参考。

**[关键词]** 魏氏梭菌;毒素;受体;细胞死亡;作用机制

## Mechanism of Action of *Clostridium welchii* Exotoxin on Cell Death

XU Chong-li<sup>1</sup>, XU Chong-bo<sup>2\*</sup>

(1. College of Medical Technology, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China;

2. Yingdong College of Life Sciences, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong 512005, China)

Corresponding author: XU Chong-bo, E-mail: xcb902@163.com

**Abstract:** *Clostridium welchii* produces a variety of toxin proteins such as tissue toxins and neurotoxins, causing intestinal diseases such as food poisoning and necrotic enteritis. The major toxins produced by it include  $\alpha$  toxin,  $\beta$  toxin,  $\theta$  toxin,  $\varepsilon$  toxin,  $\iota$  toxin, enterotoxin and necrotic enterotoxin B. Alpha toxin is the main virulence factor of *Clostridium welchii*. It is a multifunctional metalloenzyme that relies on zinc ions and has phospholipase C activity, which can cause gas gangrene and food poisoning. Beta toxin can cause necrotic enteritis and enterotoxemia in humans and animals. Epsilon toxin can cause enterotoxemia in sheep and goats, and iota toxin is

**基金项目:** 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20190838KJ);重庆医药高等专科学校自然科学技术研究项目(ygz2019306)

**作者简介:** 许崇利,博士,副教授,从事微生物分子生物学研究。

**通讯作者:** 许崇波。E-mail: xcb902@163.com

the main cause of enteritis in rabbits. Enterotoxin can cause human food poisoning and dysentery while necrotic enterotoxin B mainly causes necrotic enteritis in chickens. Toxins of *Clostridium welchii* cause cell death by interacting with receptors on the target cell membrane to activate intracellular signaling pathways. Cell death caused by *Clostridium welchii* mainly includes apoptosis, cell necrosis and necroptosis. This paper describes the mechanism of cell death caused by *Clostridium welchii* in order to provide valuable reference for the in - depth study of *Clostridium welchii*.

**Key words:** *Clostridium welchii*; toxin; receptor; cell death; mechanism

魏氏梭菌是普遍存在于土壤、腐败有机物和许多动物肠道中的一种革兰氏阳性厌氧菌,其产生的高抵抗力内生孢子使其能在土壤等环境中持久存在<sup>[1-3]</sup>。魏氏梭菌产生大量毒素使其成为人类和动物非常严重的病原体,导致组织毒性、肠炎和肠毒血症等疾病<sup>[4-5]</sup>。根据产生的毒素类型分为 A、B、C、D 和 E 型,最近 F 和 G 型被归为新的菌型, F 型产生肠毒素,但其不产生  $\beta$  毒素、 $\varepsilon$  毒素、 $\iota$  毒素而 G 型主要产生坏死性肠炎毒素 B<sup>[6-7]</sup>。魏氏梭菌毒素蛋白通过识别靶细胞膜上相应受体从而激活细胞内信号途径导致细胞病变最终引起细胞死亡<sup>[8-9]</sup>。近年对病原体诱导的宿主细胞死亡的研究揭示出这种过程涉及到各种复杂机制,而以前则认为其只是简单的偶然过程。除了坏死和细胞凋亡两种经典的细胞死亡途径外,目前广为所知的是许多病原体也可以触发相应的途径导致细胞死亡,包括细胞程序性坏死、自噬、细胞焦亡和细胞凋亡等途径。掌握病原体杀死宿主细胞的作用机制和相关因子对于破译细菌发病机制至关重要,是探索新型治疗方法的关键途径。

## 1 $\alpha$ 毒素

1.1  $\alpha$  毒素遗传学特性和结构特征 所有魏氏梭菌型均产生  $\alpha$  毒素,其由 370 个氨基酸组成的锌离子多功能金属酶,在有钙离子存在的情况下结合到宿主细胞的细胞膜上。 $\alpha$  毒素包括 N 端催化结构域和 C 端结合结构域,另外还包括一个含有神经节苷脂结合位点的中心环结构域<sup>[8]</sup>。 $\alpha$  毒素具有致死性,溶血性和皮肤坏死性,是人类气性坏疽最重要的毒力因子,其主要特征表现为骨骼肌坏死,皮下水肿和肺气肿,休克,多器官衰竭和死亡,此外在

气性坏疽中观察到胆固醇依赖性溶细胞素的家族成员产气荚膜梭菌溶素 O 与  $\alpha$  毒素协同作用从而导致病理效应<sup>[10]</sup>。然而产气荚膜梭菌溶素 O 在疾病中的所起的作用似乎很小,虽然 A 型魏氏梭菌与动物气性坏疽有关,但  $\alpha$  毒素作用机制尚未完全阐释清楚。 $\alpha$  毒素的活性非常复杂,因质膜中磷脂酰胆碱(PC)与鞘磷脂(SM)的比例等诸多因素的影响而产生变化,而且还受到局部毒素浓度的影响。因此许多  $\alpha$  毒素作用途径受这些因素影响。 $\alpha$  毒素水解细胞膜中的磷脂酰胆碱与鞘磷脂产生二酰甘油和神经酰胺。除了这些活性, $\alpha$  毒素还可通过与  $G_i$  型 GTP 结合蛋白的相互作用间接激活与磷脂酶和鞘磷脂酶类似的内源性宿主酶<sup>[11]</sup>。然而  $\alpha$  毒素的作用不仅局限于裂解细胞膜,其含有神经节苷脂结合位点的中心环结构域还可促进细胞膜上的原肌球蛋白受体激酶 A 的相互作用和联结,从而激活 MEK/ERK 途径<sup>[12]</sup>。有趣的是,缺乏神经节苷脂的 DonQ 或 GM95 细胞对  $\alpha$  毒素作用高度敏感。神经节苷脂是糖鞘脂,可降低细胞膜的流动性,导致磷脂更紧密堆积在一起,并且还与影响底物利用率的静电变化有关。这些作用可能会干扰  $\alpha$  毒素的膜破坏活性,从而保护细胞免受细胞损伤。唾液酸对于神经节苷脂的结构非常重要,如果用唾液酸酶除去唾液酸则可增加细胞对  $\alpha$  毒素的敏感性,这意味着  $\alpha$  毒素和唾液酸酶之间存在潜在的协同作用。唾液酸酶的这种协同作用也可以增加其他魏氏梭菌毒素如  $\beta$  毒素、 $\varepsilon$  毒素和肠毒素的结合活性。

如前所述, $\alpha$  毒素与细胞膜结合并作用于磷脂酰胆碱与鞘磷脂,除了激活  $G_i$  - GTP - BP 信号途

径,还根据细胞类型触发不同的信号途径。如马红血细胞由于  $\alpha$  毒素的磷脂酶水解膜上的磷脂酰胆碱而裂解,也可能是由于内源性的磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C 活化而裂解,而  $\alpha$  毒素对于含有微量磷脂酰胆碱的绵羊红细胞的影响主要通过激活 GTP - BPs 途径的鞘磷脂代谢。在兔中性白细胞和 DonQ 细胞中, $\alpha$  毒素诱导的超氧阴离子的产生主要通过内源性磷脂酶 C 的活化和经由 TrkA 受体的 PI3K 磷酸化,以及 PDK1、PKC $\theta$ 、MEK1/2、ERK1/2 系统和 NF -  $\kappa$ B 的磷酸化<sup>[13]</sup>。除了激活稳定 IL - 8 mRNA 的 p38MAPK 途径外,该途径对 A549 细胞产生 IL - 8 也很重要。另外气性坏疽感染组织中的中性粒细胞缺乏及其在血管内皮上的积累可能是由于升高的 IL - 8 促使中性粒细胞紧密粘附于细胞外基质蛋白而产生的影响。最近的研究还报道了由  $\alpha$  毒素诱导的外周血中性粒细胞的分化和补充受损主要归因于这些细胞中含有 GM1a 的脂筏的改变。此外,气性坏疽期间厌氧微环境的持续性被认为是  $\alpha$  毒素诱导的花生四烯酸代谢活化的结果,该过程由与炎症、肌肉收缩、血小板聚集和血管收缩密切相关的磷脂酶 A2、产生前列腺素、血栓和白细胞三烯来完成,从而最终导致灌注减少<sup>[14]</sup>。

**1.2  $\alpha$  毒素引起细胞死亡的作用机制**  $\alpha$  毒素溶解浓聚物可导致细胞膜的降解和乳酸脱氢酶大量释放,这是坏死的典型特征。亚溶解浓聚物的  $\alpha$  毒素能激活 MEK / ERK 信号途径并产生活性氧 (ROS),一定数量的活性氧可导致细胞氧化应激并启动内在的细胞凋亡。最近的一项研究表明在 GM95 细胞中,低剂量  $\alpha$  毒素诱导的鞘磷脂代谢与促凋亡介质如神经酰胺、N - 乙酰乙醇胺和饱和脂肪酸的产生,以及线粒体细胞色素 C 的释放,细胞凋亡蛋白酶 3 的激活以及磷脂酰丝氨酸的增加有关。之前的研究表明神经酰胺在细胞凋亡中充当第二信使的作用,神经酰胺被加工成鞘氨醇,其在胞内的蓄积可导致溶酶体破裂最终释放出大量的参与细胞凋亡的溶酶体酶。当  $\alpha$  毒素被含胆固醇的细胞质膜微囊吞噬时形成胞内体并激活相应的信号通路,产生的活性氧导致溶酶体的损伤。另外

胞浆内高水平的  $\text{Ca}^{2+}$  在细胞凋亡和坏死中扮演着关键的角色。 $\alpha$  毒素促使 1 - 磷酸 - 鞘氨醇和三磷酸肌醇的形成,二者都与胞浆内  $\text{Ca}^{2+}$  的运输和蓄积有关<sup>[15]</sup>。然而到目前为止,胞浆内  $\text{Ca}^{2+}$  作为与  $\alpha$  毒素相关的特定细胞死亡途径的触发器角色仍然没有被详细研究。

## 2 $\beta$ 毒素

**2.1  $\beta$  毒素遗传学特性和结构特征** 大毒力质粒携带  $\beta$  毒素基因 *cpb*,该质粒也含有其他的毒素基因 *cpe* 和 *tpeL*。 $\beta$  毒素是由 336 个氨基酸组成的强毒素,期中 27 个氨基酸的信号序列在分泌后被去除从而形成 35 kD 的成熟肽。推测的  $\beta$  毒素氨基酸序列与金黄色葡萄球菌的  $\delta$  毒素和  $\beta$  穿孔毒素具有显著的同源性。 $\beta$  毒素被归分类为  $\alpha$  - 溶血素家族中的梭状芽孢杆菌  $\beta$  穿孔毒素,其对胰蛋白酶和其他蛋白酶极为敏感。由于对胰蛋白酶的敏感性,在体内外  $\beta$  毒素只在胰蛋白酶抑制剂存在时才有活性。变种的  $\beta$  毒素可能拥有不同的胰蛋白酶敏感性和体外细胞毒性。 $\beta$  毒素由 B 型和 C 型魏氏梭菌产生并且是人和动物几种疾病主要的致病因素。B 型魏氏梭菌产生的  $\beta$  毒素可引起绵羊致命性出血性痢疾,而 C 型魏氏梭菌分泌的  $\beta$  毒素则可引起几种动物的坏死性肠炎和肠毒血症及人类的坏死性肠炎。使用等基因无效突变体技术研究表明, $\beta$  毒素可以重现兔小肠环中 C 型魏氏梭菌的病理学特征,同时也是山羊 C 型魏氏梭菌疾病的主要的毒力因子<sup>[16]</sup>。另外  $\beta$  毒素也是鼠肠毒血症模型中主要的致死因素<sup>[17]</sup>。

与  $\beta$  毒素相关疾病的病理学特征主要表现为小肠和大肠上皮细胞出血和坏死。 $\beta$  毒素引起的损伤始于肠粘膜但可发展到肠的所有层。阻塞粘膜固有层中存在的超级微血管的纤维蛋白血栓是与  $\beta$  毒素相关的肠道疾病的主要特征。粘膜上皮是毒素诱导损伤的主要目标还是继发于血管血栓形成一直是争论焦点。在兔肠环模型中,接种野生型魏氏梭菌 C 型分离株 CN3685 在血栓形成明显之前产生绒毛尖端坏死,意味着早期肠上皮细胞损伤。另一方面,在仔猪和人类患者的坏死性肠炎病

例以及早期血管病变的猪感染模型中的粘膜固有层上皮细胞中均通过免疫组织化学技术证实  $\beta$  毒素的作用。然而,在所有这些研究中,已经出现的组织坏死并未检测到  $\beta$  毒素与上皮细胞的结合,对猪空肠外植体  $\beta$  毒素免疫组织化学的进一步研究表明毒素与上皮细胞并没有结合,而且完整上皮细胞层的存在抑制肠内层  $\beta$  毒素的测定<sup>[18]</sup>。同样的研究显示,与重组  $\beta$  毒素共培养时,猪肠上皮细胞和原代空肠上皮细胞均没有出现细胞病变效应。在猪肠道模型中曾提出上皮细胞的最初损伤是源于  $\beta$  毒素到达粘膜固有层的微血管。但是,因为抗  $\beta$  毒素抗体并没有阻止两株 C 型魏氏梭菌菌株上清诱导的猪肠上皮细胞的损伤,从而可以推断  $\beta$  毒素并不是细胞病变效应的主要因素<sup>[18]</sup>。此外,观察到  $\beta$  毒素在小鼠皮肤中的间接血管作用,毒素能够诱导物质 P (一种来自感觉神经元的 NK1 激动剂) 的释放,最终导致 TNF- $\alpha$  和血浆外渗物的释放<sup>[19]</sup>。

作为寡聚体的穿孔毒素  $\beta$  毒素可在易感细胞的细胞膜上形成功能性孔道。通过这些孔道  $K^+$  流出胞外,  $Ca^{2+}$ 、 $Na^+$  和  $Cl^-$  流入胞内,同时细胞发生膨胀。 $\beta$  毒素诱导的钾离子流出促进 p38 MAP 和 JNK 激酶的磷酸化,从而激活与宿主细胞存活和适应相关的途径。已经在不同的人造血肿瘤细胞系中测试了细胞对  $\beta$  毒素作用的易感性,与 HL-60、BALL-1 和 MOLT-4 相比,THP-1 和 U937 细胞显示出最高的  $\beta$  毒素诱导的细胞毒性。使用原代猪主动脉内皮细胞,结果证明  $\beta$  毒素可诱导肌动蛋白细胞骨架的快速裂解、细胞边缘回缩和细胞皱缩。细胞易感性的差异清楚地表明毒素与特异性受体结合。最近研究表明  $\beta$  毒素可能与 ATP 门控的 P2X<sub>7</sub> 受体结合,之后 ATP 通过称为 Pannexin 1 的 ATP 通道从细胞中释放出来。与  $\beta$  毒素结合相关的 ATP 释放的方式尚不清楚;然而,它与细胞裂解无关。也许,通过  $\beta$  毒素 CPB 孔道的  $Ca^{2+}$  的初始流入能诱导线粒体 ATP 产生并且随后从受影响的细胞中释放出去。据推测,通过 Panx1 通道 ATP 从细胞释放并迅速达到峰值可刺激  $\beta$  毒素寡聚体的进一步形成,从而导致细胞毒性。Panx1 与结合

$\beta$  毒素的 P2X<sub>7</sub> 受体相互作用将影响 Panx1 通道开放并促进 ATP 释放<sup>[20]</sup>。肠细胞和内皮细胞均表达 P2X<sub>7</sub> 受体和 Panx1,但它们在体内与  $\beta$  毒素有关疾病中的作用需要进一步研究。

**2.2  $\beta$  毒素引起细胞死亡的作用机制** 使用猪内皮细胞的研究表明,重组  $\beta$  毒素能迅速诱导与坏死一致的特征,包括 LDH 释放和碘化丙啶的摄入。二者都可被钙蛋白酶抑制剂和 necrostatin-1 (受体相互作用蛋白激酶 1 抑制剂) 所抑制,这表明  $\beta$  毒素诱导的坏死性细胞死亡不是被动事件,而是通过程序化的生化途径完成的。研究人员推断 necrostatin 效应表明  $\beta$  毒素诱导细胞程序性坏死。然而值得一提的是 necrostatin 的作用靶标受体相互作用蛋白激酶 1 也可能参与细胞凋亡过程<sup>[21]</sup>。另一方面,研究同时检测到低水平的细胞凋亡蛋白酶-3 活化,但没有明显的 DNA 片段化,这表明在毒素浓度和孵育时间的条件下,细胞凋亡不是重要的细胞死亡途径。细胞凋亡蛋白酶-3 在这些细胞中是怎样被活化的并没有进一步研究,也许可以假设胞浆中钙离子上升可能起到关键作用,因为其通过活化钙激酶从而与细胞凋亡和细胞程序性坏死密切相关<sup>[22]</sup>。

### 3 $\epsilon$ 毒素

**3.1  $\epsilon$  毒素遗传学特性和结构特征**  $\epsilon$  毒素基因 *etx* 与其他毒素基因 *cpb2* 和 *cpe* 都位于质粒上, $\epsilon$  毒素先以无活性的前体形式分泌,分子量约为 33 kD,随后被宿主产生的肠蛋白酶所激活,这些酶主要有胰蛋白酶、 $\alpha$ -糜蛋白酶、羧肽酶类和  $\lambda$ -蛋白酶。利用胰蛋白酶、 $\alpha$ -糜蛋白酶去除  $\epsilon$  毒素前体 N 末端 13 个氨基酸残基和 C 末端 29 个氨基酸残基使其成为成熟的  $\epsilon$  毒素,毒性是其前体的 1000 倍。魏氏梭菌  $\lambda$ -蛋白酶仅去除 N-末端 10 个氨基酸残基。在使用山羊肠内容物的离体研究中, $\epsilon$  毒素前体通过 SDS-PAGE 逐步形成约为 27 kD 的稳定条带。该条带含有三种不同 C 末端的  $\epsilon$  毒素且每种都具有细胞毒性。这种  $\epsilon$  毒素 C 末端序列的加工显然是由肠羧肽酶来完成的。上述研究表明当仅使用纯化的蛋白酶时,体内  $\epsilon$  毒素活化比先前报

道的更为复杂<sup>[23]</sup>。鉴于其与气单胞菌产生的气溶素结构相似性,ε 毒素被归类为气溶素家族的七聚体 β 穿孔素,尽管它们之间没有显著的氨基酸序列相似性。ε 毒素是继肉毒菌毒素和破伤风毒素后已知的第三种最有效的梭菌毒素,由 B 型和 D 型魏氏梭菌合成。通过 *etx* 基因敲除的绵羊、山羊和小鼠模型研究证实 ε 毒素是 D 型魏氏梭菌引起的肠毒血症的主要致病因子<sup>[24]</sup>。

ε 毒素在肠道中产生,即使在羊肠毒血症中可能存在纤维坏死性结肠炎情况下,其作用靶标主要是中枢神经系统、肺和心脏等器官。ε 毒素通过增加肠通透性来促进其自身的吸收。这种效果尚未完全清楚,但它涉及粘膜紧密连接的断裂和肠道固有层的退行性变化。在显微镜下,脑部病变往往是多灶性的,其特征是血管周围和壁内血管水肿、出血,并且在多数慢性病例情况下,白质坏死和星形胶质细胞和轴突肿胀。后者通常是对称的和双边的。这些病变的起源被认为是毒素与脑-血屏障的内皮细胞的初始结合的结果,因为在小鼠中静脉内接种用绿色荧光蛋白标记的 ε 毒素显示出毒素结合到这些细胞上<sup>[25]</sup>。与 ε 毒素结合后,内皮细胞变得肿胀,空泡化和坏死。通过破坏脑-血屏障,发生液体和蛋白质的渗漏,导致水肿,引起神经薄壁组织的机械损伤和缺氧。为了应对这种水肿,大鼠和绵羊的星形胶质细胞过表达水通道蛋白-4,这也许是宿主试图从血管周围空间减少多余的液体。除了对大脑的这种间接影响外,ε 毒素还可直接影响某些神经元和少突胶质细胞,但不影响星形胶质细胞<sup>[26]</sup>。注射绿色荧光蛋白标记的 ε 毒素显示出肾脏发生严重改变,包括远端小管变性和髓质出血。使用来自不同物种的肾源的细胞系已经广泛研究了 ε 毒素的结合特性和细胞毒活性,其中尚未报道狗、小鼠和人的 D 型肠毒血症病例。ε 毒素作用的起始步骤涉及与未知细胞表面受体结合并在膜表面形成一个七聚体的前孔,随后插入到细胞膜以形成活性孔。最近的研究表明 ε 毒素激活中性鞘磷脂酶,其反过来通过在质膜中产生神经酰胺来促进寡聚体的形成。事实上,敲除中性鞘磷脂酶

阻断了 ACHN 细胞中的寡聚体形成和 ε 毒素诱导的细胞死亡。由于从魏氏梭菌培养物中分离的 ε 毒素可能含有 α 毒素杂质(其也可诱导神经酰胺的形成),由于 α 毒素也能产生这样的效应,从而表明两种毒素可以协同发挥作用,当然这种可能性尚未进行深入研究<sup>[27]</sup>。在体外,ε 毒素与 MDCK 和 ACHN 细胞中的甲型肝炎病毒细胞受体相结合促进细胞毒性。然而,在对 ε 毒素具有抗性的细胞中诱导甲型肝炎病毒细胞受体表达并不会导致其对毒素的敏感性。已发现几种细胞类型中的髓鞘质和淋巴细胞蛋白是 ε 毒素细胞毒性所必需的。髓鞘质和淋巴细胞蛋白是内皮细胞,肾细胞和少突神经胶质细胞等许多细胞的 ε 毒素靶标。髓鞘质和淋巴细胞蛋白也许是 ε 毒素特异性受体,其组装成多蛋白复合体用于 ε 毒素与细胞膜相互作用,甚至本身具有一套独立于孔形成的机制<sup>[28]</sup>。

3.2 ε 毒素引起细胞死亡的作用机制 与 ε 毒素作用相关的细胞内途径和细胞死亡的机制尚未完全被阐释清楚。然而毒素诱导的细胞内变化与坏死特征相一致,如显著的细胞肿胀、线粒体消失、起泡、膜破裂、ATP 消耗、核皱缩、碘化丙啶摄取增加及无 DNA 片段化。受感染细胞形成孔导致胞内  $K^+$  的快速流失,  $Cl^-$  和  $Na^+$  的流入,随后是胞浆内  $Ca^{2+}$  的增加。这种细胞内电解质的不平衡尽管看起来很有可能参与激活特定的下游信号事件最终导致细胞死亡,但是迄今为止并没有得到证实。受 ε 毒素影响的细胞失去了产生能量所需至关重要辅酶,特别是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和辅酶 A,有助于线粒体膜电位的消散和线粒体通透性转换孔的开放。与上述结果一致,AMP 激活的蛋白激酶(ATP 胞内感受器),在受 ε 毒素影响的细胞中受到影响。此外,凋亡诱导因子(一种有效的半胱天冬酶非依赖性细胞死亡因子)从线粒体转移到细胞核。在体外用 ε 毒素处理的肾细胞中,大分子的细胞旁通透性没有显著增加,并且肌动蛋白细胞骨架和粘着连接的组织不受影响。在大脑中,ε 毒素可与某些类型的神经元结合并导致膜电阻降低,这归因于孔形成。这诱导了与胞浆中  $Ca^{2+}$  增加相关的

膜去极化,随后释放出神经递质谷氨酸。有趣的是, $\epsilon$  毒素不会在少突神经胶质细胞膜中形成孔道;因此,相关的谷氨酸释放,通过不同机制发生的  $Ca^{2+}$  波动和脱髓鞘,如  $\epsilon$  毒素和髓鞘质和淋巴细胞蛋白相互作用的胞内途径。

## 4 $\iota$ 毒素

4.1  $\iota$  毒素遗传学特性和结构特征  $\iota$  毒素是由酶组分(Ia)和结合组分(Ib)组成的二元毒素。两种成分均由两个独立的基因 *iap* 和 *iab* 编码,两个基因位于大的接合质粒上。Ib 分子量为 100 kD,合成初期无活性,胰蛋白酶或糜蛋白酶水解除去 20 kD N-末端片段后变成有活性的蛋白体。 $\iota$  毒素由 E 型魏氏梭菌菌株分泌。许多动物的肠道疾病均与该毒素有关。然而,大多数病例的诊断仅基于从出血性肠炎动物的肠内容物中分离出的 E 型魏氏梭菌,但是这并不是 E 型魏氏梭菌感染的诊断标准。此外科赫原则尚未完全应用于 E 型疾病, $\iota$  毒素在疾病中的具体作用仍不清楚。在过去,基于在被感染动物的肠中检测到  $\iota$  毒素,将兔肠毒血症的归因于 E 型魏氏梭菌的感染。然而,据推测,这些病例可能是由梭状芽孢杆菌产生的类似  $\iota$  的毒素引起的,通过目前可用的毒素检测方法证实其与  $\iota$  毒素交叉反应。到目前为止,还没有可靠的诊断标准用于诊断与 E 型魏氏梭菌相关的肠道疾病已报道脂激活脂蛋白受体(LSR)是 Ib 的细胞受体,其介导毒素进入宿主细胞。研究表明  $\iota$  毒素进入宿主细胞涉及细胞表面抗原 CD44 相关的内吞作用<sup>[29]</sup>。一旦与受体结合,Ib 组装成七聚体并插入宿主细胞膜形成功能性通道,从而允许离子运输以及 Ia 的易位和内吞作用。Ia 酶组分也以无活性的形式分泌,需要蛋白水解除去 N 末端 9 至 11 个残基才能成为成熟蛋白体。Ia 的 C-结构域负责毒素的 ADP-核糖基化活性,其涉及肌动蛋白 177 位精氨酸残基与 ADP-核糖基化的供价连接,这导致肌动蛋白丝的解聚和 G-肌动蛋白单体的增加。肌动蛋白细胞骨架的解聚导致细胞形态的变化和细胞间紧密和基底外侧连接的解体,导致培养的肠细胞渗透性增加。两种  $\iota$  毒素组分都通过依赖  $\rho$  因子,

网格蛋白非依赖性途径内化于靶细胞中并到达内吞囊泡。一小部分 Ib 再循环回到细胞膜,使 Ia 的摄取进一步增强。内吞后 Ia 从晚期内体转移到细胞质中,在那里发挥 ADP-核糖基化活性,这种易位需要晚期内体具有酸性环境<sup>[30]</sup>。

4.2  $\iota$  毒素引起细胞死亡的作用机制 已有的研究证实 Ib 本身可以诱导细胞毒活性,特别是在两种人细胞系 A431(上皮癌)和 A549(肺腺癌)。这些细胞毒性作用涉及显著的细胞肿胀,线粒体功能障碍,ATP 消耗和 IP 摄入增加,所有特征均与坏死相一致。即使观察到促凋亡分子 Bax 和 Bak 的活化以及细胞色素 C 释放,但未检测到细胞凋亡蛋白酶-3 的活化,并且用泛半胱天冬酶抑制剂 Z-VAD-FMK 孵育细胞并不能保护细胞免受 Ib 诱导的细胞死亡。在该研究中,细胞存活需 Ib 的内吞,表明内吞作用在保护细胞免受与 Ib 相关的孔形成中扮演关键角色。而在另一项研究中, $\iota$  毒素处理 Vero 细胞在孵育 12~15 h 后诱导细胞凋亡蛋白酶-3 活化。这种凋亡细胞死亡的延迟诱导归因于 ADP-核糖基化 Ia 靶向肌动蛋白的细胞溶质稳定性<sup>[31]</sup>。

## 5 肠毒素

5.1 肠毒素遗传学特性和结构特征 *cpe* 基因既可以位于染色体上也可以位于质粒上,并且毒素仅在孢子形成期间表达。肠毒素由 319 个氨基酸组成的单链多肽。肠毒素的 C 末端没有细胞毒活性,但介导与受体的结合,其末端位于 30 个氨基酸中的酪氨酸残基起着关键作用。另一方面肠毒素的 N 末端具有细胞毒性且对于肠毒素的寡聚化和膜孔的形成尤为重要。肠毒素是 F 型魏氏梭菌孢子形成时期产生的成孔毒素,但 C 型和 D 型魏氏梭菌也产生肠毒素,另外 E 型魏氏梭菌携带有沉默的 *cpe* 基因或产生肠毒素变种。实验和流行病学证据表明肠毒素是与人类食物中毒相关的 F 型魏氏梭菌的主要毒力因子。在兔子中产生肠毒素的 F 型魏氏梭菌验证了科赫原则且 5%~10% 抗生素相关性腹泻与 F 型魏氏梭菌有关<sup>[32]</sup>。肠毒素引起的食物中毒主要症状包括腹泻和腹部痉挛,并且通常在

一两天后自发消退。然而在便秘或粪便嵌塞等一些因素诱发下则成为致命性的。在上述条件下减少腹泻影响,毒素会延长其与肠的接触,促进吸收以及与肠外器官的作用。这种肠毒性作用在结扎小鼠的肠环中得到验证,接种的肠毒素进入循环并引起高血钾导致死亡。肠毒素的细胞受体属于紧密连接蛋白家族(claudins)成员,位于上皮细胞和内皮细胞之间的顶端接触区域。已经证实 claudins 3、4、6、8 和 14 是肠毒素受体,肠毒素与 claudin 受体的初始结合形成约 90 kD 的“小复合物”。几种小复合物的相互作用导致肠毒素的寡聚化和细胞膜表面形成前孔,最终形成约 450 kD 的 CH-1 大复合物,包括六聚体的肠毒素,受体和非受体的 claudins。肠毒素  $\beta$  发夹环组装成  $\beta$  桶并迅速插入靶细胞膜从而启动阳离子穿透孔的形成,钙离子通过穿透孔注入细胞从而在肠毒素诱导的细胞死亡中起着关键作用<sup>[33]</sup>。

**5.2 肠毒素引起细胞死亡的作用机制** 当用低剂量肠毒素孵育 Caco-2 细胞时,形成少量的孔随后钙离子适度流入,导致钙蛋白酶活化和凋亡,伴随着细胞色素 C 释放和细胞凋亡蛋白酶-3 活化。然而随着肠毒素剂量的增加,形成更多孔导致大量钙离子的涌入和更强钙蛋白酶活化,导致极少量的细胞凋亡蛋白酶-3 活化和与坏死一致的细胞形态变化。延长体外孵育时间加剧了细胞形态变化,导致基底外侧细胞表面外露,从而结合更多的肠毒素并形成约 600 kD 的更大的复合体 CH-2,包括紧密连接蛋白和闭合蛋白<sup>[34]</sup>。在小鼠和兔子的小肠环中,肠毒素诱导的剂量依赖性组织学损伤表现为严重的绒毛缩短,脱屑以及和坏死特征相一致的上皮细胞变化。在兔结肠中也发生组织学损伤,与先前的体外发现相反,用肠毒素处理小鼠肠环能够诱导剂量和时间依赖性的细胞凋亡蛋白-3 的活化。然而这种激活对于肠道病变的发展并不是必需的,因为使用泛半胱天冬酶抑制剂 Q-VD-OPh 并不能防止肠道损伤或肠毒血症死亡。目前为止尚未进一步探索钙蛋白酶激活的作用和细胞程序性死亡在肠毒素相关疾病中的潜在作用。

## 6 坏死性肠炎毒素 B

**6.1 坏死性肠炎毒素 B 遗传学特性和结构特征** 坏死性肠炎毒素 B 基因 *netB* 位于名为 NELoc1 的 42 kb 致病性基因座上,存在于大的接合质粒上。与  $\beta$  毒素一样,坏死性肠炎毒素 B 与来自金黄色葡萄球菌的  $\beta$ -PFT( $\alpha$  溶血素)具有部分序列相似性。根据新近的毒素分型方案,坏死性肠炎毒素 B 由 G 型魏氏梭菌菌株产生。对于这种毒素的科赫法则已经在鸡疾病模型中得到验证,研究表明坏死性肠炎毒素 B 是导致禽类坏死性肠炎发展的主要毒力因子,这也得到了强有力的流行病学证据的支持。禽流感坏死性肠炎病例中肠细胞的死亡是由于粘膜固有层、细胞外基质和细胞间连接破坏引起的。坏死性肠炎毒素 B 形成中心直径约为 26 的七聚体亲水性孔。然而坏死性肠炎毒素 B 的特异性受体尚未被鉴定出来<sup>[35]</sup>。

**6.2 坏死性肠炎毒素 B 引起细胞死亡的作用机制** 与其他成孔毒素相比,坏死性肠炎毒素 B 形成的孔允许  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  和  $\text{Ca}^{2+}$  的流入并导致渗透细胞的裂解,该毒素诱导 LMH 细胞的变圆和裂解,随后释放 LDH,虽然这与坏死特征相一致,但其涉及的细胞死亡特定途径及在肠道上的作用并没有被深入研究<sup>[36]</sup>。

## 7 展望

过去几年对于魏氏梭菌毒素作用的分子机制进行诸多研究,但主要集中在少数物种,比如马和绵羊为对象研究  $\alpha$  毒素的溶血活性,在山羊中  $\epsilon$  毒素诱发肠毒素症作用机制。在研究魏氏梭菌感染的发病机理时,宿主和细胞易感性是需要考虑的关键因素,因此魏氏梭菌相关疾病的体外或动物模型的选择应该解决这些变化。由于大多数魏氏梭菌毒素结合并作用于宿主细胞膜上的受体,因此发病早期是治疗魏氏梭菌相关疾病的有效靶标。例如已显示 Mepacrine 治疗剂通过干扰孔形成和毒素插入来保护肠细胞样细胞免于体外肠毒素作用。目前正在小鼠模型中研究 Mepacrine 对于肠毒素的潜在作用。大多数魏氏梭菌毒素作用的最终结果是细胞死亡。过去几年通过使用不同的方法,在阐释

复杂的细胞内途径方面取得了显著进展。然而在这方面仍存在许多空白,剖析魏氏梭菌毒素和靶细胞之间的复杂相互作用可能会发现其他的药理学靶标。笔者课题组一直从事魏氏梭菌外毒素研究工作,主要集中在对  $\alpha$  和  $\beta$  毒素的基因克隆、表达及免疫原性方面的研究,利用定点突变技术不但使其生物学活性发生了改变,而且揭示了其二级和三级结构并且构建的  $\alpha$ 、 $\beta$  融合蛋白具有良好的免疫原性,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] Kiu R, Hall L J. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens* [J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1): 141.
- [2] Grenda T, Grabczak M, Kwiatek K, et al. Prevalence of *C. botulinum* and *C. perfringens* spores in food products available on Polish market[J]. J Vet Res, 2017, 61(3): 287-291.
- [3] Kheravii S K, Swick R A, Choct M, et al. Effect of oat hulls as a free choice feeding on broiler performance, short chain fatty acids and microflora under a mild necrotic enteritis challenge[J]. Anim Nutr, 2018, 4(1): 65-72.
- [4] Lacey J A, Allnutt T R, Vezina B, et al. Whole genome analysis reveals the diversity and evolutionary relationships between necrotic enteritis-causing strains of *Clostridium perfringens* [J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 379.
- [5] Yadav J P, Das S C, Dhaka P, et al. Pulsed-field gel electrophoresis of enterotoxic *Clostridium perfringens* type A isolates recovered from humans and animals in Kolkata, India[J]. Int J Vet Sci Med, 2017, 6(1): 123-126.
- [6] Blanch M, Dorca-Arévalo J, Not A, et al. The cytotoxicity of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* on lymphocytes is mediated by MAL protein expression[J]. Mol Cell Biol, 2018, 38(19). pii: e00086-18.
- [7] Gao J, Xin W, Huang J, et al. Research article Hemolysis in human erythrocytes by *Clostridium perfringens* epsilon toxin requires activation of P2 receptors[J]. Virulence, 2018, 9(1): 1601-1614.
- [8] Uzal F A, Freedman J C, Shrestha A, et al. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease[J]. Future Microbiol, 2014, 9(3): 361-377.
- [9] Uzal F A, Vidal J E, McClane B A, et al. *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases [J]. The Open Toxinology Journal, 2010, 3(2): 24-42.
- [10] Takagishi T, Oda M, Kabura M, et al. *Clostridium perfringens* alpha-toxin induces Gmla clustering and Trka phosphorylation in the host cell membrane [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0120497.
- [11] Oda M, Matsuno T, Shihara 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.
- [12] Oda M, Terao Y, Sakurai J, et al. Membrane-binding mechanism of *Clostridium perfringens* alpha-toxin [J]. Toxins (Basel), 2015, 7(12): 5268-5275.
- [13] Monturiol-Gross L, Flores-Díaz M, Campos-Rodríguez D, et al. Internalization of *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxin leads to ERK activation and is involved on its cytotoxic effect [J]. Cell Microbiol, 2014, 16(4): 535-547.
- [14] Titball R W, Naylor C E, Basak A K. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin [J]. Anaerobe, 1999, 5(2): 51.
- [15] Blom T, Slotte J P, Pitson S M, et al. Enhancement of intracellular sphingosine-1-phosphate production by inositol 1,4,5-trisphosphate-evoked calcium mobilisation in HEK-293 cells: endogenous sphingosine-1-phosphate as a modulator of the calcium response [J]. Cell Signal, 2005, 17(7): 827-836.
- [16] Garcia J P, Beingesser J, Fisher D J, et al. The effect of *Clostridium perfringens* type C strain CN3685 and its isogenic beta toxin null mutant in goats [J]. Veterinary Microbiology, 2012, 157(3/4): 412-419.
- [17] Uzal F A, Saputo J, Sayeed S, et al. Development and application of new mouse models to study the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C enterotoxemias [J]. Infection and Immunity, 2009, 77(12): 5291-5299.
- [18] Roos S, Wyder M, Candi A, et al. Binding studies on isolated porcine small intestinal mucosa and *in vitro* toxicity studies reveal lack of effect of *Clostridium perfringens* beta-toxin on the porcine intestinal epithelium [J]. Toxins, 2015, 7(4): 1235-1252.
- [19] Nagahama M, Kihara A, Kintoh H, et al. Involvement of tumour necrosis factor-alpha in *Clostridium perfringens* beta-toxin-induced plasma extravasation in mice [J]. Br J Pharmacol, 2008, 153(6): 1296-1302.
- [20] Seike S, Takehara M, Kobayashi K, et al. Role of pannexin 1 in *Clostridium perfringens* beta-toxin-caused cell death [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1858(12): 3150-3156.
- [21] Humphries F, Yang S, Wang B, et al. RIP kinases: key deci-

- sion makers in cell death and innate immunity [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2015, 22(2): 225 – 236.
- [22] Zhivotovsky B, Orrenius S. Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community [J]. *Cell Calcium*, 2011, 50(3): 211 – 221.
- [23] Freedman J C, Li J, Uzal F A, *et al.* Proteolytic processing and activation of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by caprine small intestinal contents [J]. *mBio*, 2014, 5(5): e01994 – 14.
- [24] Garcia J P, Giannitti F, Finnie J W, *et al.* Comparative neuropathology of ovine enterotoxemia produced by *Clostridium perfringens* type D wild – type strain CN1020 and its genetically modified derivatives [J]. *Vet Pathol*, 2015, 52(3): 465 – 475.
- [25] Soler – Jover A, Dorca J, Popoff M R, *et al.* Distribution of *Clostridium perfringens* epsilon toxin in the brains of acutely intoxicated mice and its effect upon glial cells [J]. *Toxicon*, 2007, 50(4): 530 – 540.
- [26] Finnie J W, Manavis J, Blumbergs P C. Aquaporin – 4 in acute cerebral edema produced by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin [J]. *Veterinary Pathology*, 2008, 45(3): 307 – 309.
- [27] Manni M M, Valero J G, Pérez – Cormenzana, Miriam, *et al.* Lipidomic profile of GM95 cell death induced by *Clostridium perfringens* alpha – toxin [J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2017, 203: 54 – 70.
- [28] Rumah K R, Ma Y, Linden J R, *et al.* The myelin and lymphocyte protein MAL is required for binding and activity of *Clostridium perfringens* epsilon – toxin [J]. *Plos Pathogens*, 2015, 11(5): e1004896.
- [29] Wigelsworth D J, Ruthel G, Schnell L, *et al.* CD44 promotes intoxication by the clostridial iota – family toxins [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51356.
- [30] Gibert M, Marvaud J C, Pereira Y, *et al.* Differential requirement for the translocation of clostridial binary toxins: iota toxin requires a membrane potential gradient [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(7): 1287 – 1296.
- [31] Hilger H, Pust S, Von F G, *et al.* The long – lived nature of *Clostridium perfringens* iota toxin in mammalian cells induces delayed apoptosis [J]. *Infection & Immunity*, 2009, 77(12): 5593 – 5601.
- [32] Carman, Robert J. *Clostridium perfringens* in spontaneous and antibiotic – associated diarrhoea of man and other animals [J]. *Reviews in Medical Microbiology*, 1997, 8: S43 – S45.
- [33] Chakrabarti G, McClane B A. The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo – 2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin [J]. *Cell Microbiol*, 2005, 7(1): 129 – 146.
- [34] Singh, U, Van Itallie C M, Mitic L L, *et al.* CaCo – 2 Cells treated with *Clostridium perfringens* enterotoxin form multiple large complex species, one of which contains the tight junction protein occludin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 18407 – 18417.
- [35] Prescott J F, Parreira V R, Mehdizadeh Gohari, *et al.* The pathogenesis of necrotic enteritis in chickens: What we know and what we need to know. Review [J]. *Avian Pathology*, 2016, 45: 288 – 294.
- [36] Rood J I, Keyburn A L, Moore R J. NetB and necrotic enteritis: the hole movable story [J]. *Avian Pathol*, 2016, 45(3): 295 – 301.

(编辑:李文平)