

沙门氏菌病发病机理和肠毒素

路文彬

(北京市卫生防疫站)

沙门氏菌是肠杆菌科的一个属。近年分子生物学的发展,将该属细菌分为六个亚属(或亚群)。至今沙门氏菌属包括 2107 个血清型。有对人致病的,也有对动物致病的,其中也有人畜共患的。对人能引起肠热症,败血症,慢性肠炎,食物中毒和腹泻。引起肠炎和败血症的发病机理人们已有所认识,但对沙门氏菌引起腹泻的认识还不十分清楚。据国内外的研究表明,沙门氏菌培养物滤液中存在外毒素(Exotoxin),尤其是肠毒素(enterotoxin)与腹泻关系相当密切。本文就沙门氏菌的发病机理及肠毒素的特性做一介绍。

(一) 肠道病原菌的生物学分类

肠道病原菌被敏感机体摄入后,根据最终宿主机体生理学和解剖学的变化,与摄入细菌的特点,肠道病原菌可分为五类^[1]。

1. 细菌吸附在粘膜上和产生肠毒素,如霍乱弧菌和毒素原性大肠杆菌(ETEC)。

2. 细菌粘附在粘膜上的刷状缘部位,引起组织病理学损伤,导致腹泻,如致病性大肠杆菌(EPEC)。

3. 侵入肠管粘膜,并在上皮细胞内增殖,如志贺氏痢疾杆菌。

4. 细菌在固有层和肠系膜淋巴结内增殖,使粘膜易位,如伤寒和副伤寒以外的沙门氏菌,空肠弯曲菌,一般不导致全身感染。

5. 细菌粘附在粘膜上,侵入固有层和肠系膜淋巴结内进行增殖,若遇免疫缺陷宿主,进一步导致全身感染,引起肠热症,如伤寒沙门氏菌。

目前对鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌研究较多,认为这些细菌不是一个引起简单肠炎

的细菌,而是能引起具有类似霍乱和志贺氏菌病的病原微生物。

(二) 实验性沙门氏菌病

用人源鼠伤寒沙门氏菌,通过口、胃感染罗猴来研究致病过程^[2]。被感染而患腹泻的猴,根据临床症状有轻、重之分。全部腹泻患者有严重的结肠炎或有明显的抑制水的吸收和分泌,或仅结肠分泌。在轻度腹泻的猴有明显的空肠损伤而回肠仅有运输功能的轻度损伤。细菌不侵入空肠,因而空肠内细菌数较低。而回肠和结肠内细菌数的变化从 $3.6-5.5 \times 10^6$ 个/g 内容物。回肠和结肠组织被细菌侵入,而造成损伤和多核细胞(PMNs)浸润;在严重腹泻者中,空肠、回肠和结肠均显示液体分泌。空肠组织有较小的形态学改变而无细菌侵入。但是回肠和结肠组织损伤增加,而呈现出炎症反应。由于细菌的侵入,而使肠管内细菌的数量,大约增殖到 7.5×10^8 个/g 内容物。这个模型与人尸检所见完全相符。

用猴、家兔回肠结扎术(RILTs),鼠LD₅₀和Hela细胞来测定鼠伤寒沙门氏菌的生物分型。从临床分离的两株鼠伤寒沙门氏菌(TML, W118)能引起猴的腹泻。在家兔回肠结扎试验中,细菌侵入回肠粘膜,7小时绒毛肿胀,杯状细胞变空,但腺囊部位接近正常;然后扩散到心、肝和脾,而18小时后引起块状炎症反应和液体积留。另外有两个菌株侵入家兔回肠粘膜或从肠内组织培养出细菌,而无肠液积留,或在RILTs中无明显的组织病变。M206菌株不能感染猴。SL1027和LT-7菌株,通过实验证明有侵入性,可是在RILTs中无液体积留;SL1027仅1/13感染的猴有中等炎症反应。

RILTs 的实验过程适合作为猴回肠感染的模型。

(三) 病理生理学

从预感染的 RILTs 中家兔回肠粘膜脱落来研究病理生理学发病机理。如 TML(++) 菌株能引起 Cl^- 的分泌和降低 Na^+ 的吸收;而 SL1027(+-) 菌株对 Cl^- 的分泌和 Na^+ 的吸收无影响,使之均无改变。这个情况被后来的学者证实。当腺苷环化酶受到较大刺激能引起液体分泌过程,否则 Cl^- 的分泌和 Na^+ 的吸收均无变化。

沙门氏菌引起分泌性腹泻可能受内生性促分泌剂的合成和释放有密切关系。

1. 由于沙门氏菌和 PMN 之间的相互作用而产生吲哚甲烷素。吲哚甲烷素有很强的抑制前列腺素的合成,从而能抑制鼠伤寒沙门氏菌的分泌性腹泻。如在 RILTs 试验中就证明这一点,而用同样的方法,以 F_{2a} 、霍乱弧菌和霍乱毒素,在不改变侵入方式和炎症反应中仅部分抑制分泌。

2. Giannella 等^[2]指出吲哚甲烷素能迅速提高猴空肠、回肠和正常动物的结肠吸收力。相反,鼠伤寒沙门氏菌在小肠和大肠内导致分泌性腹泻。

3. Giannella 等^[2]在 RILTs 模型中,用氮气处理而降低 PMNs 的汇集和抑制液体分泌;但对回肠形态学或酶的活性无关或对霍乱毒素或鼠伤寒沙门氏菌也无反应。在这些试验中,液体分泌反应的介质包括前列腺素; Peterson 证实^[2](+-)反应的菌株能引起同(++)反应菌株的一样炎症反应。Giannella^[2]在 RILTs 不同生物分型中 PMN 反应的强度,用定量区别与对照相比是有意义的;而低浓度的前列腺素将不引起反应。

在实验中,一般感染 8 小时后,开始液体分泌,这时 PMNs 被吸附在绒毛上的数量是有意义的,而且 PMNs 与侵入的沙门氏菌相互作用,而使 PMNs 数量随时间的延长而增加。在未结扎段中几乎不能观察这个现象。三个生物型(++、+-、--)不同的 PMN 反应和两个

侵袭性生物型菌株的侵入程度的定量估价是有临床意义的。

实验观察,用荧光标记对感染肠结扎段进行检查,在两个生物型间侵入细菌量是有区别的。

(四) 沙门氏菌毒素

近年来沙门氏菌研究的重点从炎症反应转移到液体分泌的中间介质——毒素的作用上来。沙门氏菌在体外培养产生毒素,其试验方法和部分特性,与霍乱毒素和志贺氏菌毒素相似,在腹泻中有一定作用。

菌群沙门氏菌的某些菌株中产生肠毒素,在未浓缩的培养物滤液中有某些相关的生物活性,或浓缩的培养物滤液或部分提纯,或膜过滤提取物,或细菌超声波处理物,或丝裂霉素 C 裂解物,均有生物活性物质存在。培养基成分和培养条件对毒素的产生是有重要影响的。

各种检测毒素的试验方法较为广泛使用,常规 RILTs 已为 Sakazaki 应用,其改良方法,即用粘液溶解剂先洗涤回肠而后做 RILTs 试验,家兔皮肤通透性试验,乳鼠试验,各种组织细胞试验。近年来 Peterson 介绍 ELISA 试验,认为可作沙门氏菌肠毒素粗筛的一个可靠的方法。

在腹泻疾病的研究中,其腹泻的成因与沙门氏菌的肠毒素有密切关系。在培养物的滤液中或细菌提取物,应用 RILTs 检查肠毒素的活性;这个试验被认为比组织培养有较大的生物学相关性(见表 1)。

从表 1 结果看出:(1) 菌株中除 Thax-1 外,均产生具有一定活性的肠毒素。

(2) 采用多粘菌素 B 破坏细菌细胞,来提取肠毒素,但不用培养物滤液。

(3) 某些家兔对已知阳性沙门氏菌提取物无反应,而对霍乱毒素肠结扎试验在 24 小时后呈阳性反应。

(4) 在每个家兔反应中,肠结扎 24 小时后阳性的 3/4 实验中,霍乱毒素能中和液体积留。肠结扎段液体为水样而无血液。在组织学上很少或无有粘膜损伤,扫描电镜下所见绒毛弯曲,

表 1 多粘菌素 B 提取的鼠伤寒沙门氏菌肠毒素活性

菌株 ^a	提取物阳性数 ^b	阳性提取物	
		家兔	肠结扎
TML	9/9	11/13 ^c	26/32 ^d
W118/2	4/6	8/13	8/18
LT-7	3/3	3/5	5/12
SL ₁₀₂₇	3/3	3/5	5/10
M ₂₀₆	4/6	3/8	9/19
Thax-1	1/3	1/6	1/10

注 a: 试验菌株在 CYE 肉汤中, 37°C 摇床培养 16 小时。

b. 培养物用离心法除菌, 而收集上清液, 过滤灭菌, 4°C 保存

c. 11/13: 表示用 13 支家兔做试验, 而有 11 支是阳性反应。

d. 26/32: 家兔肠结扎段 32 个中, 有 26 段阳性反应。其他依此类推。

但不显示顶端损伤。

(五) 肠毒素部分特性

沙门氏菌肠毒素已部分纯化。其与霍乱毒素等电点 6.6 比较, 等电点为 4.5, 可分为迟缓渗透因子 (DPF) 或称为 LT, 对热不稳定, 75°C 30 分钟完全破坏; 其分子量与霍乱毒素分子量 84000 比较, 大约为 110000; 在碱性条件下比较稳定。另一个因子为快速渗透性因子 (RPF), 或称 ST, 对热具有相当的稳定性, 在 100°C 作用 4 小时, 不被破坏。上述两种因子可用家兔皮肤测定其通透性。快速渗透因子可使家兔皮肤呈现海绵状水肿现象。迟缓渗透因子, 于实验 18 至 24 小时后, 使家兔皮肤出现硬结水肿现象。其现象与霍乱弧菌和大肠杆菌不耐热肠毒素反应一样而不能区别。

抗霍乱毒素、抗霍乱毒素 B 碎片和 GM1 能中和家兔皮肤渗透性因子 (DPF) 和对 CHO 细胞的效果。用霍乱毒素 B 碎片免疫家兔, 然后用鼠伤寒沙门氏菌攻击, 能部分中和液体分泌和 DPF 的作用。Ketyi 等^[4]指出沙门氏菌肠毒素和 *E. coli* LT 间有部分抗原关系。近年来, Kaper 用代表菌株 TML、W118、SL1027、LT-7、M206 和 Thax-1, 以分子杂交基因探针, 检查霍乱毒素和 *E. coli* ST 毒素, 均说明沙门氏菌肠毒素与霍乱肠毒素有相类似之处。

沙门氏菌 DPF 和霍乱肠毒素在家兔肠粘膜上的结合点的竞争性已被进一步观察。已知霍乱毒素和热不稳定性大肠杆菌肠毒素能结合到 GM1 神经节苷脂上。Peterson 等^[5]发现沙门氏菌 DPF 活性能被 GM1 阻断。所以霍乱毒素, 热不稳定性大肠杆菌毒素和沙门氏菌肠毒素有共同分享结合点上感受器的特性, 因此三种因素对同一结合点有竞争性。

一般沙门氏菌培养上清液, 不易检出肠毒素。在 CYE 培养中, Syncase 或蛋白胨盐水中加入 0.5 μg/ml 丝裂霉素 C, 在 37°C 培养是较理想的产毒条件; 1983 年 Sobek 等^[6]用肠炎沙门氏菌摸索最适宜的产毒条件时指出, 在 Syncase 培养基中, pH7.3, 37°C 至 40°C 培养 18 小时, 能产生较大量毒素。如果在 Syncase 培养基中加入 0.5% 葡萄糖, 通气培养更能提高毒素产量^[5-7]。

Ketyi 等指出某些沙门氏菌在 AV₃ 细胞试验中产生细胞毒性毒素, 部分抗原性与 *E. coli* LT 毒素相似, 并和志贺氏菌样毒素有交叉反应。O'brien 等指出鼠伤寒沙门氏菌 W118 株产生志贺氏菌样毒素, 与志贺氏痢疾杆菌相比产量较少。Koo^[8]和 Peterson 证明鼠伤寒沙门氏菌产生一种抑制蛋白合成的绿猴细胞剥离毒素。该氏 1984 年又证明鼠伤寒沙门氏菌 (TML) 裂解物能抑制绿猴细胞蛋白合成, 而家兔回肠上皮细胞在体内和体外均能产生一种志贺氏样毒素。

在含有适量铁的培养基上, 能提高志贺氏菌样毒素的产量。在毒素的作用下, 大量 PMN 流进肠管, 绒毛缩短, 出现炎症反应。

(六) 毒素在疾病中的作用

在疾病中沙门氏菌毒素有一定作用。但如何进一步解释它的作用及产生过程还有待进一步研究。

1. 沙门氏菌产生的肠毒素, 可能是多功能的毒素。但在三个不同的生物分型间 (++, +-, --) 的沙门氏菌, 其产生的毒素无相互关系。在体外也能产生霍乱样毒素或志贺氏菌样毒素, 而生物分型 (++) 的沙门氏菌, 能产

生更多的志贺氏菌样毒素和肠毒素。

2. 志贺氏痢疾杆菌和 $F_{2,}$ 在 HeLa 细胞和 Henle 407 细胞中能抑制蛋白合成。并对外源性志贺氏毒素呈高度抗性。即使沙门氏菌能产生志贺氏菌样毒素,其毒素的性质和志贺氏菌产生的毒素也不完全一样。因为志贺氏菌引起肠管粘膜的损伤比沙门氏菌更严重。

3. 目前在沙门氏菌毒素产生的问题,最主要是毒素的产生与细菌侵袭,组织损伤和导致液体积留的关系及其毒素是在细胞内产生还是在亚细胞水平上产生。

4. 用家兔回肠结扎研究沙门氏菌感染是正确的。但不能作为空肠炎症反应发病机理的解释。沙门氏菌导致腹泻可能是多种因素决定。

(七) 讨论

1. 沙门氏菌不同菌株引起的腹泻通过不同途径,其结果也不一样。如产生肠毒素者以分泌性腹泻为主,有的却以炎症反应为主等。像 SL/027 和 LT-7 菌株具有侵袭性,而不引起分泌性腹泻。

2. 有些沙门氏菌侵入肠系膜淋巴结后,引起炎症反应,使 PMNs 汇集,二者相互作用引起前列腺素的合成和释放,达到较高水平时,导致分泌性腹泻。

3. 沙门氏菌与产毒素原性大肠杆菌相似,不是所有的沙门氏菌都能产生肠毒素,它具有一定的范围。而沙门氏菌产生肠毒素的量也没有大肠杆菌产生的多。如从 40L 培养物中,仅获得纯化沙门氏菌 LT 毒素不到 1mg。毒素可能产生于细胞内,需要高度敏感的方法,才能具

体测定。

4. 有些沙门氏菌能产生对细胞具有毒性的毒素,如 W118 株,但产生的量极少。

5. 沙门氏菌的肠毒素,仅是引起腹泻的一个因素,而不是所有腹泻症状均与沙门氏菌毒素有关。因为沙门氏菌引起的腹泻是多种因素决定的。

6. 从沙门氏菌生理性腹泻动物模型中看出:在粘膜表面成熟细胞的绒毛顶端开始损伤,减少吸收能力,增加液体分泌,构成分泌性腹泻或生理性腹泻。此时细菌一般容易粘连在肠道敏感细胞的特定感受器上。用荧光标记的方法,可观察到细菌开始粘连在粘膜细胞绒毛顶端,而后进入固有层,引起机体一系列临床症状。

参 考 文 献

- [1] Stephen, J. et al.: Microbial toxins and diarrhoeal disease. Pitman, London (Ciba Foundation symposium 112) p 175—192, 1985.
- [2] Giannella, R. A. et al.: *Infect Immun*, 17: 136—139, 1977.
- [3] Peterson, J. W.: Salmonella toxin. *Pharmacol Ther.* 11: 719—724, 1980.
- [4] Ketyi, I. et al.: *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 26: 217—223, 1979.
- [5] Peterson, J. W. et al.: *Infect Immun*, 32: 232—242, 1981.
- [6] Soebh, F. Y. et al.: *Indian J. Med. Res.*, 78: 170—176, 1983.
- [7] Wallis, T. S. et al.: *J. Med Microbiol.* 21: 19—23, 1986.
- [8] Koo, F. C. W. et al.: *Infect Immun*, 32: 93—100, 1984.