

# 温和气单胞菌毒素的生物学活性研究

胡圣尧 马子行

(上海职工医学院, 上海 200237)

倪语星

(上海第二医科大学瑞金医院, 上海 200025)

**摘要** 从腹泻病人粪便中分离到的 4 号温和气单胞菌(As-4)产生溶血素(H)、肠毒素(E)和细胞毒素(C, 简称 HEC 毒素。粗制的 HEC 毒素在家兔肠祥试验和乳鼠灌胃试验中使家兔和乳鼠小肠积液, 引起 Vero 细胞和中国仓鼠(CHO)细胞的细胞毒反应, 可使不同动物种类的红细胞溶血, 尾静脉和腹腔注射导致小白鼠死亡。上述生物学活性均可被抗-HEC 毒素血清中和而失效。纯化毒素经 56℃ 10min 处理, 其肠毒性、细胞毒性及溶血毒性也将失去。

**关键词** 温和气单胞菌,  $\beta$ -溶血毒素, 肠毒素, 细胞毒素

气单胞菌(*Aeromonas*)以往多被认为是一种低毒力的条件致病菌, 可引起免疫功能低下者的机会感染<sup>[1]</sup>。但近年来, 有关该菌引起成人和儿童腹泻、败血症等时有报道<sup>[2~4]</sup>, 且呈上升趋势。该菌已成为引人注目的肠道新病原。气单胞菌所产生的肠毒素是其重要的致病因子。新近文献资料表明<sup>[5~7]</sup>, 致病性气单胞菌产生的溶血素(H)、肠毒素(E)和细胞毒素(C)可能是同一种物质, 简称 HEC 毒素。其提纯品均为单一的多肽分子。

国外对同属中的嗜水气单胞菌 *A. hydrophila*(Ah)的致病性研究颇多, 而对温和气单胞菌 *A. sobria*(As)研究则较少。我们对温和气单胞菌产生的 HEC 毒素进行了研究, 其结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和待检菌株

**1.1.1 温和气单胞菌 As-4 株:**产 HEC 毒素, 由作者在上海第二医科大学瑞金医院检验科筛选得到。

**1.1.2 待检菌株:**嗜水气单胞菌 10 株和温和性气单胞菌 10 株均分离自临床标本。

### 1.2 培养基

**1.2.1 心脑浸出液肉汤(BHI):**按文献[8]配制。

**1.2.2 改良 MG 培养基:**按文献[9]配制。

**1.2.3 心浸出液(HI)琼脂平板和斜面:**按文献[8]配制。

**1.2.4 改良 CAYE 培养基:**按文献[9]配制。

### 1.3 As-HEC 毒素的产生条件

将试验菌株转种于 BHI 肉汤中, 32℃ 过夜; 移种 HI 平板, 32℃ 过夜。用 6ml 0.075 mol/L pH7.2 PBS 洗涤 HI 平板上的培养物, 吸取 0.6ml 细菌悬液分别加入 60ml 改良 MG, BHI, CAYE 培养基, 37℃ 振荡培养 24~48h, 4℃ 5000r/min 离心 15min。取上清液, 测其溶血活性。

### 1.4 As-HEC 毒素提纯

采用 Asao 等推荐的溶血素纯化法<sup>[10]</sup>, 用 SP-Sephadex C-25 提纯 HEC 毒素。

### 1.5 生物分析法

**1.5.1 不同动物种类的红细胞对  $\beta$ -溶血毒素的敏感性:**见文献[11, 12]。

**1.5.2 乳鼠灌胃试验:**方法见文献[13]。选用 2

~4d龄,体重1.2~1.8g乳鼠(本院实验动物中心提供)。

**1.5.3 兔肠祥结扎试验:**方法见文献[14]。采用体重1.5~2.0kg的大白兔(瑞金医院实验动物中心提供)。

**1.5.4 小白鼠尾静脉注射毒素试验:**方法见文献[15]。选用体重15~20g小白鼠(本院提供)。

**1.5.5 细胞毒性试验:**方法见文献[15]。选用传代后2~5d的CHO细胞和Vero细胞(上海市卫生防疫站提供)。

毒素阳性对照选用霍乱肠毒素(CT)(日本,生化学工业株式会社产)。

抗-HEC毒素血清由作者在瑞金医院制备。

## 2 结果

### 2.1 不同动物红细胞对气单胞菌 HEC 毒素的敏感性

溶血试验测出不同动物红细胞对 HEC 毒素的敏感性为 55~100%(表 1)。表明 HEC 毒素对动物红细胞有选择性作用。以小白鼠红细胞最为敏感(100%)。依次为豚鼠、兔、人类 O 型血,分别为 85%、80%和 70%。而绵羊红细胞较差,为 55%。

表 1 不同动物红细胞对气单胞菌 HEC 毒素的敏感性

红细胞 种类	敏感性*	悬液溶血滴度**				合计
		嗜水气单胞菌(Ab)		温和气单胞菌(As)		
		范围	均数	范围	均数	
小白鼠	100	16~256	75.2	32~128	70.4	72.8
豚鼠	85	0~128	39.8	0~64	35.2	37.5
兔	80	0~128	23.2	0~32	15.6	19.4
人类 O 型血	70	0~64	19.6	0~32	8.0	13.8
绵羊	55	0~32	7.8	0~16	4.4	6.1

\* 敏感性: 试验阳性结果数 / 试验数

50%溶血为一个溶血单位

\*\* 溶血滴度均数 = 每组溶血滴度总数 / 试验菌株数, 嗜水气单胞菌 10 株, 温和气单胞菌 10 株

### 2.2 乳鼠灌胃试验

乳鼠对 As-HEC 毒素很敏感。注入毒素 3h 后处死鼠,取肠观察发现肠子明显水肿、充血。As-4 菌株在不同培养基上均能产生肠毒素,导致乳鼠小肠积液(表 2)。其 FA 率都高于 0.9,表现出良好的肠毒素效应。如预先与抗-HEC 血清混合,抗体 5 $\mu$ g/ml 以上即有中和效应(表 3)。

### 2.3 家兔肠祥试验

试验结果见表 4。As-4 菌的培养液、培养上清液和纯化毒素均能引起程度不同的小肠积液。HEC 毒素经 56 $^{\circ}$ C 10min 热处理后,不再产生肠积液。

### 2.4 小鼠尾静脉注射

小鼠尾静脉注射 HEC 毒素试验结果(表 5)表明:毒素剂量越高则小鼠死亡时间越短,反之亦然。说明小鼠静脉注入 HEC 毒素,致死时间极短。

### 2.5 HEC 毒素对 Vero 细胞和 CHO 细胞的毒性试验

HEC 毒素对细胞的毒性尤为明显(表 6)。经传代后 2~5d 的单层细胞(Vero 细胞和 CHO 细胞)加入粗制 HEC 毒素后 16h,细胞即表现出固缩和溶解现象,溶细胞效价高达 256~512。

表2 As-HEC 毒素乳鼠灌胃试验结果

样 本	液体积累率(FA)**				X ± SD	C.V%	死亡比例*	备注
	(n=4)							
MG 培养上清液(24h)	0.102	0.108	0.112	0.098	0.105 ± 0.0062	0.051	4/4	试验组
MG 培养上清液(48h)	0.114	0.108	0.123	0.119	0.116 ± 0.0064	0.059	4/4	试验组
BHI 培养上清液(24h)	0.097	0.105	0.108	0.112	0.106 ± 0.0063	0.060	4/4	试验组
CAYE 培养上清液(24h)	0.115	0.101	0.104	0.118	0.110 ± 0.0083	0.075	4/4	试验组
CT(1ng/ml)	0.134	0.125	0.124	0.130	0.128 ± 0.0064	0.036	4/4	阳性对照
PBS	0.045	0.056	0.061	0.042	0.051 ± 0.0089	0.18	0/4	阴性对照
纯化 HEC 毒素(5ng/ml)	0.121	0.118	0.116	0.120	0.119 ± 0.0022	0.019	4/4	试验组
HEC 毒素+抗体	0.055	0.063	0.058	0.066	0.061 ± 0.0049	0.080	0/4	中和试验
纯化 HEC 毒素 56℃ 10min	0.061	0.065	0.058	0.071	0.064 ± 0.0056	0.088	0/4	试验组

\*: 死亡比例 = 死亡小白鼠数 / 感染小白鼠总数(包括死鼠与活鼠)

\*\* : FA = 全肠鼠重 / 全肠以外体重, FA 值高于 0.09 为阳性

工作用量: 每只乳鼠注入 0.1ml

表3 乳鼠灌胃 HEC 毒素中和试验

抗体 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	死亡数 / 小白鼠总数		液体积累率(FA)	
	(n=4)		mean	(SD)
0	4/4		0.104	(0.0053)
2	4/4		0.108	(0.0039)
5	2/4		0.088	(0.010)
10	0/4		0.071	(0.0080)
20	0/4		0.063	(0.0059)
50	0/4		0.059	(0.0036)

注: 1. As-4 株在 MG 培养基中 24h 培养物上清液和上述抗体浓度混合, 乳鼠灌胃剂量为 0.1ml

2. FA 值高于 0.09 为阳性

表4 As-4HFC 毒素引起家兔小肠积液的情况

样 本	蛋白质含量	积液*	结果
	( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	(ml/cm)	
PBS	0	0.4	阴性
MG 培养上清液	44.67	1.1	阳性
纯化 HEC 毒素	90.66	1.3	阳性
纯化 HEC 毒素(56℃ 灭活 10min)	90.66	0.55	阴性
纯化 HEC 毒素+抗体	90.66	0.6	阴性
培养液(含菌)	未知	1.4	阳性
CT	2	1.9	阳性
MG 培养基	0	0.4	阴性

\* 积液 > 1ml/cm 结果判断为阳性

表5 小鼠尾静脉注射 HEC 毒素试验结果

HEC 毒素剂量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	死亡时间 (min)	死亡数 / 未注射数 (n=3)	死亡时间
			(min: mean $\pm$ SD)
20	1.06, 1.08, 1.06	3 / 3	1.07 $\pm$ 0.012
10	1.37, 2.09, 2.22	3 / 3	1.89 $\pm$ 0.21
5	2.56, 3.28, 3.26	3 / 3	3.03 $\pm$ 0.41
2.5	26.40, 28.32, 27.55	3 / 3	27.42 $\pm$ 1.43
1	88.21, 90.44, 86.50	3 / 3	88.38 $\pm$ 1.98
0.5	165, 0 0	1 / 3	—
0.25	—	0 / 3	—
阳性对照 CT1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.14, 0.95, 1.22	3 / 3	1.10 $\pm$ 0.14
阴性对照 PBS	—	0 / 3	—

工作用量: 每只小白鼠注射 0.1ml

表6 HEC 毒素对 Vero 细胞和 CHO 细胞毒性试验结果

菌 株	培养基	培养时间 (h)	细胞毒效价			备 注
			CHO 细胞	Vero 细胞		
				2d	2d	
As-4 株	MG	24	256	256	256	试验组
同上	MG	48	256	512	256	同上
同上	BHI	24	128	256	128	同上
同上	CAYE	24	64	64	64	同上
抗 As-4 血清+培养上清液	MG	48	0	0	0	中和试验
<i>E.coli</i> O157H7 产 LTST 毒素*	CAYE	24	2	2	0	阳性对照
<i>E.coli</i> 142 产 LTST 毒素**	CAYE	24	8	8	4	阳性对照
<i>E.coli</i> 129 产 LT 毒素**	CAYT	24	8	4	4	阳性对照
对 照	MG BHI GAYE		0	0	0	阴性对照

\* 由上海市卫生防疫站细菌室提供

\*\* 由日本竹田美文夫人提供

CHO 细胞和 Vero 细胞均经传代后 2—5d 用作实验

### 3 讨论

气单胞菌的致病机理目前尚未有定论, 虽然有报道表明, 该菌的 O 抗原、菌毛及一些细胞表面的非特异性粘附因子与其致病性有关<sup>[16-18]</sup>。然而更多的报道指出, 嗜水气单胞菌和温和气单胞菌的致病株所产生的肠毒素、溶血素、溶细胞毒素以及一些酶是其重要的致病因子。

我们的动物实验表明, As-HEC 毒素如同

霍乱肠毒素 (CT) 一样, 能引起家兔肠祥和乳鼠小肠的液体蓄积, 具有致死小白鼠作用。将 As-4 株 100 $\mu\text{l}$  未经稀释的培养上清液, 经尾静脉注入小鼠后数分钟, 即导致小鼠死亡。若将 HEC 毒素预先与抗 HEC 血清中和后再注射, 则对小鼠有保护作用。

HEC 毒素的细胞毒作用尤为明显。我们选用的 Vero 细胞和 CHO 细胞由日本引进, 为传代培养 2~5d 的单层细胞。加入粗制 HEC 毒素后 18h, 显微镜检查显示, CHO 细胞受到毒

素作用后,表现出细胞膜贴于胞核的固缩现象。此即细胞毒肠毒素引起细胞膜损伤,形成孔洞,使细胞内容物漏出,致使细胞皱缩。Vero细胞则在 HEC 毒素作用下溶解殆尽。作为阳性对照的 2 株产毒素大肠杆菌,细胞毒最高效价仅为 1:8,而 As-4 菌株的细胞毒效价竟高达 256~512,是前者的 32~64 倍之多。此外,HEC 毒素能溶解多种动物红细胞,表现其溶血活性。不过,对不同种类动物红细胞的溶解活性有所差异。如对小白鼠红细胞,温和气单胞菌和嗜水气单胞菌参与的 20 株均能不同程度地产生溶血,但对绵羊红细胞敏感性下降至 55%,且溶血滴度亦低。从而表明,HEC 毒素对动物红细胞的作用有一定的选择性。

上述各项生物学试验表明,As-4 株产生的 HEC 毒素具有溶血毒性,细胞毒性和肠毒性的作用,与国外文献<sup>[5,6,15]</sup>报道的致病性气单胞菌产生的毒素生物效应一致。从而表明,温和气单胞菌与嗜水气单胞菌在临床上引起病人腹泻具有同等的重要性。

### 参 考 文 献

[1] McCracken A W, Barkley R J Clin Pathol, 1992, 25: 970~975.

- [2] Moyer N P, J Clin Microbiol, 1987, 25(9): 2044~2048.  
 [3] Holmberg S D, Farmer J J. Rev Infect Dis, 1984, 6: 633~639.  
 [4] Singh S J, Sanyal S C. J Med Microbiol, 1992, 36: 269~272.  
 [5] Rose J M, Houston C M, Coppenharer DH, et al. Infect Immun, 1989, 57: 1165~1169.  
 [6] Asao T, Y Kinoshita, S Kozaki, et al. Infection and Immunity, 1984, 46: 122~127.  
 [7] 陈怀青. 国外医学《微生物学分册》, 1992, 6: 256~259.  
 [8] 张颖悟, 兰鸿泰, 郑家齐等主编. 临床微生物学下册, 第一版, 大连: 大连出版社, 1990, p37.  
 [9] Kozaki S, T Asao, Y Kamata, et al. J Clin Microbiol, 1989, 27(8): 1782~1786.  
 [10] Asao T, S Kozaki, K Kato, et al. J Clin Microbiol 1986, 24: 228~232.  
 [11] Rita Frenden et al. Med Microbiol 1987, 24: 247~257.  
 [12] Kozaki S, K kato, T Asao. J Infection and Immunity 1987, 55(1): 1594~1599.  
 [13] Burke V, Robinson J, Berry R J, et al. Med Microbiol, 1987, 14: 401~408.  
 [14] 罗海波等主编. 细菌毒素研究进展, 第一版, 北京: 科学出版社, 1983, 109.  
 [15] Potomski J, V Burke, I Watson, et al. J Med Microbiol, 1987, 23: 171~177.  
 [16] Carrelle A, Silburn K A, Budden J R, et al. J Med Microbiol, 1988, 26: 19~27.  
 [17] Hokama A, Iwanaga M. Infect and Immunity, 1991, 59: 3478~3483.  
 [18] Iwanaga M, A Hokama. Journal of General Microbiology, 1992, 138: 1913~1919.

## STUDY ON BIOLOGICAL ACTIVITY OF *AEROMONAS SOBRIA* TOXIN

Hu Shengyao Ma Zixing

(Shanghai Medical College for Continuing Education Shanghai, 200237)

Ni Yuxing

(Shanghai Second Medical University, Rui Jin Hospital Shanghai, 200025)

**Abstract** Hemolysin, enterotoxin and cytotoxin. (HEC toxin) were produced by *Aeromonas sobria* 4 (As-4) isolated from a patient with diarrhea. The crude HEC toxin produced fluid accumulation in rabbit ileal loops and in infant mice, and caused cytotoxicity to Vero and CHO cells, was haemulation to erythrocytes of different animal species and was lethal to mice after intravenous and abdomen injection. All these activities were neutralised by antiserum to HEC toxin. The three activities of haemolysis, cytotoxicity and enterotoxicity were also inactivated after incubation for 10 min at 56°C.

**Key words** *Aeromonas*, hemolysin, enterotoxin, cytotoxin