

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.01.042

金黄色葡萄球菌肠毒素研究进展*

韩乃寒 刘 映 赵燕英 陈 娟 唐俊妮[△]

(西南民族大学生命科学与技术学院 四川 成都 610041)

摘要:金黄色葡萄球菌肠毒素是由金黄色葡萄球菌分泌的一类胞外毒素,其中传统型为 SEA-SEE,具有催吐活性。目前也发现了一些催吐活性未知的新类型肠毒素,命名为 SEIs。所有肠毒素的分子量都在 22-28KDa 之间,由单一肽链组成,其稳定性好,可耐大多数蛋白水解酶。金黄色葡萄球菌肠毒素具有较强的超抗原特性,可促使 T 淋巴细胞大量增殖,同时表现出对组织相容性复合体 II 类分子(MHC II)等位基因的不同偏爱性。超抗原的产生和调控依赖 agr 系统,同时也受其它因素的调控,如一些氨基酸。因此在免疫治疗中具有着重要作用。本文从性质、组成、结构、功能、检测方法等方面对金黄色葡萄球菌肠毒素进行简要介绍,为肠毒素的研究提供依据。

关键词:金黄色葡萄球菌;肠毒素;食物中毒;超抗原

中图分类号:R378;Q939.91 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)01-181-07

Review on *Staphylococcus Aureus* Enterotoxin*

HAN Nai-han, LIU Ying, ZHAO Yan-ying, CHEN Juan, TANG Jun-ni[△]

(College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu, Sichuan, 610041, China)

ABSTRACT: *Staphylococcus* enterotoxins (SEs) are a series of exotoxin secreted by *staphylococcus* with molecular weights of 22-28 kDa. They include the traditional kinds with the vomiting activity named SEA-SEE and the new kinds with the unknown vomiting activity, which are named SEIs. SEs are made of a single peptide chain. They can resist digestion by the most of proteolytic enzymes. SEs belong to superantigen and can make T cells proliferate quickly. At the same time they show the different interaction with the different histocompatibility complex II class molecules (MHC II) alleles. The expression of SEs is regulated by agr system and other factors, such as the necessity of some amino acid. Due to the important role of SEs in immune therapy, they have grabbed the attention of research scientists. Therefore, here we provide an overview of the characteristics, compositions, structures, functions and detecting methods for SEs.

Key words: *Staphylococcus aureus*; Enterotoxin; Food poisoning; Superantigen

Chinese Library Classification(CLC): R378; Q939.91 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)01-181-07

前言

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种革兰氏染色阳性球形细菌,无芽孢、无鞭毛,大多数无荚膜。它是引起人类感染和细菌性食物中毒的一种重要致病菌,在自然界中广泛分布。由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒发生频率极高,在美国由此菌引起的食物中毒高居第二位,占整个细菌性食物中毒的 33%,加拿大则更多占 45%,我国每年发生的此类中毒事件也非常多见^[1]。其引起食物中毒的原因主要是金黄色葡萄球菌可产生一类胞外毒素,称为肠毒素。它的 N 端肽链具有催吐活性,可引起人呕吐甚至食物中毒。金黄色葡萄球菌产生肠毒素的适宜食品基质是含淀粉、蛋白质和水分较多的食品,如牛乳及乳制品、肉和蛋等。最适温度为 37℃,存放温度在 20℃ 以上,

温度越高,产毒时间越短;在通风不良、氧分压低时易形成肠毒素^[2-4]。肠毒素具有高度的耐热性,因此,它引起的食品污染和食物中毒的危险性就更大,可以造成肠道外感染,以至对全身各器官组织产生损伤作用,最后发展到多个器官功能障碍,危及患者生命。但是另一方面肠毒素又是一种超抗原,可促使 T 淋巴细胞大量增殖,具有重要的免疫治疗功能。因而肠毒素的研究分析显得尤为重要。本文将肠毒素的相关研究做简要介绍。

1 金黄色葡萄球菌肠毒素类型

目前从血清学上已经鉴定了 20 种金黄色葡萄球菌超抗原(SAGs),包括 TSST-1(原命名 SEF,后取消改为毒素休克综合征 1 型毒素,TSST-1),SEs A-E,SEs G-J 和金黄色葡萄球菌类肠毒素(SEI)K-R 与 SEU,还有近期被鉴定出的 SEI-U2 和

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31371781);教育部新世纪人才项目(NCET-11-0847)

作者简介:韩乃寒(1991-),女,本科,主要研究方向:食品安全,电话:15208296865,E-mail: biohnh@163.com

△ 通讯作者:唐俊妮,女,博士,副研究员,主要研究方向:食品安全,电话:028-85528272,E-mail: junneytang@aliyun.com

(收稿日期:2014-08-01 接受日期:2014-08-23)

SEI-V (如表 1 显示了不同血清型肠毒素的分子量及其是否具有催吐活性)^[5,9]。2004 年引进了一种新的命名法来对肠毒素类型进行区分, 那些已被证明具有催吐活动的肠毒素称 SEs, 目

表 1 不同血清型肠毒素的分子量及其催吐活性^[6]

Table 1 Molecular mass and vomiting activity of different kinds of serotype enterotoxin

SEs	分子量 (kDa)	催吐活性
SEA	27.1	Y
SEB	28.4	Y
SEC	27.5-27.6	Y
SED	26.9	Y
SEE	26.4	Y
SEG	27.0	Y
SHE	25.1	Y
SEI	24.9	Weak
SEIJ	28.5	Nd
SEIK	26.0	Nd
SEIL	26.0	N
SEIM	24.8	Nd
SEIN	26.1	Nd
SEIO	26.7	Nd
SEIP	27.0	Nd
SEIQ	25.0	N
SER	27.0	Y
SES	26.2	Y
SET	22.6	Weak
SEIU	27.1	Nd
SEIU2 (SEW)	Nd	Nd
SEIV	Nd	Nd

注: ND 代表目前催吐活性还无法证实, Y 代表有催吐活性, N 代表无。

Note: The letter l in SEIs indicates the activity of vomiting can't be confirmed(nd)

表 2 不同亚型肠毒素的氨基酸序列

Table 2 The amino acid sequence of different subtype enterotoxin

SEs	氨基酸序列 Amino acid sequence
sea	MKKTAFILLFIALTWTTSPVLNGSEKSEEINEKDLRKKSELQALGNLQIYYNEKAKTENKESHDQFLQ
	HTILFKGFFTNHSWYNDLLVDFDSKDIVDKYKGGKVDLYGAYYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLHDNN
	RLTEEKVPINLWLDGKQNTVPLETVKTNKKNVTQELDLQARRYLQEKYNLYNSDVDFGKVGRLIVFH
seb	TSTEPSVNYDLFGAQGQNSNTLLRIYRDNKTINSENMHIDIYLYTS
	MYKRLFISHVILIFALILVISTPNVLAESQDPKPDELHKSSKFTGLMENMKVLYDDNHVSAINVKSIDQFLY
	FDLIYSIKDTKLGNVDNVRVEFKNKDLADKYKDKYVDVFGANYYYQCYFSKKTNDINSHQTDKRKTCMY
sec	GGVTEHNGNQLDKYRSITVRVFEDGKNLLSFDVQTNKKKVTAQELDYLTRHYLVKNKKLYEFNNSPYETG
	YIKFIENENSFWYDMMPAGDKFDQSKYLMMYNDNMVDSKDVKIEVYLTTKKK
	ESQPDPTDELHKSSEFTGTMGNMKYLYDDHYVSATKVSVDKFLAHDLIYNISDKKLKNYDKVKTELLN
sec3	EDLAKKYKDEVDVYGSNYVNCYFSSKDNVKGVTGGKTCMYGGITKHEGNHFDNGNLQNVLRVYEN
	KRNTISFEVQTDKKSVAQELDIKARNFLINKKNLYEFNNSPYETGYIKFIENNGNTFWYDMMPAGDKF
	DQSKYLMMYNDNKTVDKRVKIEVHLTTKNG
sec3	MNKSRLFISCVILIFALILVFTPNVLAESQDPDPTDELHKSSEFTGTMGNMKYLYDDHYVSATKVMVSDKF
	LAHDLIYNISDKKLKNYDKVKTELLNEDLAKKYKDEVDVYGSNYVNCYFSSKDNVKGVTGGKTCMYG
	GITKHEGNHFDNGNLQNVLRVYENKRNTISFEVQTDKKSVAQELDIKARNFLINKKNLYEFNNSPYET
	GYIKFIENNGNTFWYDMMPAGDKFDQSKYLMMYNDNKTVDKSVKIEVHLTTKNG

前仍无法证实的称 SEIs^[10]。所有的肠毒素都是由单个无分支的多肽链所组成。一株金黄色葡萄球菌能产生一型、两型以上的肠毒素(在混合型中, 常以一型的肠毒素为主), 因此, 肠毒素的型别不能代表细菌的型别。

2 金黄色葡萄球菌肠毒素的结构

2.1 SEs 的氨基酸序列及其同源性对比

经过多年的研究, 不同亚型金黄色葡萄球菌肠毒素的氨基酸序列都被测定。表 2 显示了部分亚型肠毒素的氨基酸序列, 图 1 以同源树的形式表现了多序列间的同源性:

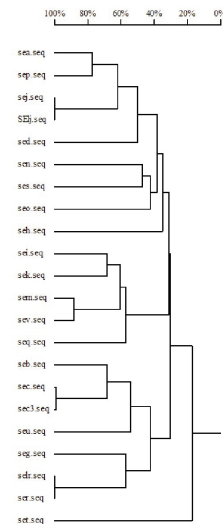


图 1 不同亚型 SEs 同源进化树

Fig. 1 The homologous evolutionary tree of different subtype SEs.

注: 其中 .seq 是文件名, 代表序列文件。(made by DNAMAN) 其中 sej 与 selj, sec 与 sec3, selr 与 ser 同源性较高

Note: Among them, seq is filename, on behalf of sequence file (made by DNA man). It indicates sej with selj, sec with sec3, sele with sea has higher homology

续表

SEs	氨基酸序列 Amino acid sequence
sed	MKKFNILIALFFTSLVISPLNVKANENIDSVKEKELHKKSELSSTALNNMKHSYADKNPIIGENKSTGQDF LENTLLYKFFFTDLINFEDLLINFNSKEMAQHFKSKNVDVYPIRYSINCYGGEIDRTACTYGGVTPHEGNK LKERKKIPINLWINGVQKEVSLDKVQTDKKNVTQELDAQARRYLQKDLKLYNNDTLGGKIQRGKIEFDS SDGSKVSYDLFDVKGDFPEKQLRIYSDNKTLSTEHLHIDIYLYEK
seg	MKKLSTVIIIILEIVFHNMMNYVNAQDPKLDLKNVSDYKNNKGTMGNMNLYTSPPVEGRGVINSRQF LSHDLIFPIEYKSYNEVKTELENTELANNYKDKKLDIFGVYPYFTCIIPKSEPDINQNFGGCCMYGGTLFNS SENERDKLITVQVTIDNRQSLGFTITTTNKNMVTIQELDYKARHWLTKEKKLYEFDGSASFESGYIKFTEKNN TSFWFDLFPKKELVPFVPYKFLNIYGDNKVVDSKSIKMEVFLNTH
seh	MINKIKILFSFLALLSFTSYAKAEDLHDKSELTDLALANAYGQYNHPFIKENIKSDEISGEKDLIFRNQGD SGNDLRVKFATADLAQKFKNKNVDIYGASFYKCEKISENISECLYGGTTLNSEKLAQERVIGANVWVDG IQKETELIRTNKKNVTQLQELDIKIRKILSDKYKIYKDEISKGLIEFDMKTPRDYSFDIYDLKGENDYEIDK IYEDNKTLSDDISHIDVNLTKKKV
sei	MKKFKYSFILVFIILLFNIKDLTYAQGDIGVGNLRNFYTKHDYIDLKGVTDKNLPIANQLEFSTGTNDLISES NNWDEISKFKGKKLDIFGIDYNGPCKSKYMYGGATLSGQYLSARKIPINLWVNGKHKTISTDKIATNKK LVTAQEIDVKLRRYLQEEYNIYGHNTGKGKEYGYKSKFYSGFNNGKVLFHLNNEKSFSYDLFYTGDLPL VSFLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVDSN
sej	MKKTIFILFSLTLTLLITPLVYSDSKNETIKEKNLHKKSELSSITLNNLRHIYFFNEKGISEKIMTEDQFLDYT LLFKSFFISHSQYNDLLVQFDSKETVNKFKGKQVDLYGSYGFQCSGGKPNKTACMYGGVTLHENNQLY DTKKIPINLWIDSIRTVVPLDIVKTNKKVTIQELDLQARYYLHKQYNLYNPSTFDGKIQKGLIVFHTSKEP LVSYDLFNVIGQYPDKLLKIYQDNKIIESENMHIDIYLYTSLIVLISLPLVL
sek	MKKLISILLINIILGVSNSASAQGDIGIDNLRNFYTKKDFVDLKDVKDNDTPIANQLQFSNESYDLISESK DFNKFSNFKGKKLDVFGISYNGQCNTKYIYGGVTATNEYLDKSRNIPINIWINGNHKTISTNKVSTNKKFV TAQEIDVKLRKYLQEEYNIYGHNGTKKGEEYGHKSKFYSGFNIGKVTFHLNNNDTFSYDLFYTGDDGLPK SFLKIYEDNKTVESEKFHLDVDISYKETI
sem	MKRILIVVLLFCYSQNHIAADVGVNLNRNYGSYPEDHQSINPENNLHSHQLVFSMDNSTVTAEFKNV DDVKKFKNHAVDVYGLSYSGYCLKNKYIYGGVTLAGDYLEKSRIPINLWVNGEHQTISTDKVSTNKKLV TAQEIDTKLRRYLQEEYNIYGFNDTNKGRNYGNKSKFSSGFNAGKILFHLNDGSSFSYDLFDGTGTGAES FLKIYNDNKTVESEKFHLDVEISYKDES
sen	IKNIKKLMRLFYIAAIIITLLCLINNNYVNAEVDKKDLKKSDLDSSKLFNLTSYYTDITWQLDESNKISTDQ LLNNTIILKNIDISVLKTSSLKVEFNSSDLANQFKGKNIDIYGLYFGNKC VGLTEEKTSCLYGGVTIHDGNQ LDEEKVIGVNVFKDGVQQEGFVIKTKAKVTVQELDTKVRFKLENLYKIYNKDTGNIQKGCIFHSHNHQ DQSFYYDLNVKGSVGAEFFQFYSDNRTVSSSNYHIDVFLYKD
seo	IKNSKVMLNVLLLILNLIAICSVNNAYANEEDPKIESLCKKSSVDPIALHNINDDYINNRFITVKSIVSTTEK FLDFDLFLKSNWLDGISAEFKDLKVEFSSAISKEFLGKTVDIYGVYKKAHCHGEHQVDTACTYGGVTPH ENNKLEPKNIGVAVYKDNVNVNTFIVTTDKKKVTAQELDIKVRTKLNNAYKLYDRMTSDVQKGYIKFHS HSEHKESFYDLFYIKGNLDPQYLQIYNDNKTIDSSDYHIDVYLFT
sep	VSKIKKTTFILLSFIALTLITSPFVNCSEKSEEINGKDLQKKSELQGTALSNLRQTYHNGSAIENKESNDQ FLKNTILFNDFFTGHQWYNDLLVDLGSKDTANIYKGGKVDLYGVYGYQCTGGTPFKTACMYGGVTLHD NNQLEEEKVPINLWIDGKQNTVPLGTVTNKKEVTQELDLQSRHYLHETYNLYNTDAFNGKIQRGLIE FHPSSGDSVGYDLFGAQGQYPDTQLRIYRDNKTIKSKNMHIDIYLYTT
seq	MNKIFRILTVSLFFFTFLIKNNLAYADVGVINLRNFYANYEPEKLQGVSSGNFSTSHQLEYIDGKYTLYSQF HNEYEAKRLKDHKVDIFGISYGLCNTKMYGGITLANQNLDPKNIPINLWVNGKQNTISTDKVSTQKK EVTAEIDIKLRKYLQNEYNIGFNKTKKGQYGYQSKFNSGFNKGKITFHLNNEPSFTYDLFYTGQTGA ESFLKIYDDNKTIDTENFHLDEISYEKTE
ser	MLNKILLLLFSVTFMLLFFSLHSVSAKPDPRPGELNRVSDYKKNKGTMGNVESLYKDKAVIAENVKNTRQF LGHDLIPIPYSEYKEVKSEFINKKTADKFKDKRLDVFIPYFYTCLVPKNESREEFIDGVCYGGVTMHS TADSISKNIIPVTVDNKQQSFTISTNKKTVTVQELDYKVRNWLNNKKLYEFDGSAYETGYIKFIEQNK DSFWYDLFPKKDLVPFIPYKFVNIYGDNKTIDASSVKIEVHLTMM

续表

SEs	氨基酸序列 Amino acid sequence
ses	MNYSKITVTLIILLCTFSFEFSFNRFVQADESRPKIESLKKKSELDSTALYNIKTSYSQDNILDIKNTNST QLLSNDLIFDDITLKEWNKNSLKTENFSSEIANHFKGKKVDIFGIYYGANCIGEVSKRTGCIYGGITLHEEE KIDQKNSIGVNVFKDGSQQKGFMITTDKKEPTIQELDLKTRKVIQNYKYIYNSETGNIQKGYMEFHSNSS SFYYDLFNFKGKYSVDFLKFYNDNKTINSSNLHIDVYLYSQ
set	MKKCILFIFSIILLVSISTLFIIPNAKSDSREGLKDFYSKKIDVYTNKKINEKDKYSVDIEVDNYVYRINTLDD KILNQFKVGDYVDAWGHINNKPIGKVIKFYDGDISKHSPLDKPTNISYRINLFKEQKQTEVTPEKELEIG NRYLTMKQIDYRIKSYLVKKQQLYTEFYNGKIEISMLDGGKHFIDLSTYYYDPSNFTLDYTKISHFDIYMEK
seu	MKLFAFIFICVKSCSLFLMLNGNPRPEQLNKASEFSGLMMDNMRYLYDDKHVSETNIKAQEKFQHDLLFKI NGSKIDGSKILKTEFNKSLSDKYKNKNVDLFGTNYNYQCYFSADNMELNDGRLEKTCMYGGVTEHDG NQIDKNLTDNSHNILIKVYENERNTLSFDISTNMKNITAQEIDYKVRNYLLKHKNLYEFNSSPYESGYIKF IEGNHGSFWYDMMPESEGEKFYPTKYLLIYNDNKTVESKSINVEVHLTKK
sev	MKRILIVVLLFCYSQNHIAADVGVNLNRNYGSPYIEDHQSINPENNHLSHQLVFSMDNSSITAEFKNV DDVKFKFKNHAVDVYGLSYSGYCLKNKYIYGGVTLAGDYLEKSRCPINLWVNGEHTISTDKVSTNKKLV TAQEIDVKLRRYLQEEYNIYGHNTTGKGEYGYKSKFYSGFNNGKVLFHLNNEKSFSYDLYFTGDGLPVS FLKIYEDNKIIESEKFHLDVEISYVDSN
selj	MKKRIFILFSLTLTLITPLVYSDSKNETIKEKNLHKKSELSSITLNNLRHIYFFNEKGISEKIMTEDQFLDY TLLFKSFFISHSQYNDLLVQFDSKETVNKFKGKQVDLYGSYYGFQCSGGKPNKTACMYGGVTLHENNQL YDTKKIPINLWIDSIRTVPPLDIVKTNKKKVTIQELDLQARYYLHKQYNLYNPSTFGGKIQKGLIVFHTSKE PLVSYDLFNVIGQYPDKLLKIYQDNKIIESENMHIDIYLYTSLIVLISLPLVL
selr	MLNKILLLLFSVTFMLLFFSLHSVSAKPDPRPGELNRVSDYKKNKGTMGNVESLYDKAVIAENVKNTRQF LGHDILFIPYSEYKEVKSEFINKKTADKFKDKRLDVFGIPYFYTCLVPKNESREEFIDGVCYIGGVMTMHS TADSISKNIIVPTVDNKKQFSFTISTNKKTVTVQELDYKVRNWLNNKKLYEFDGSAYETGYIKFIEQNK DSFWYDLFPKKDLVPFIPYKFVNIYGDNKTIDASSVKIEVHLTTM

2.2 SEs 的结构分析

有学者采用圆二色谱测定了 SEG、SEU 单体蛋白的结构,结合生物信息学分析,绘制出了 SEG、SEU 蛋白的二级结构图。SEG 蛋白二级结构中, α -螺旋由 35 个 aa 组成、 β -折叠约 89aa、 β -转角 35aa、无规则蜷曲为 74aa,SEU 成熟肽中 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角、无规则蜷曲分别为 33aa、71aa、22aa、106aa。并以已解析的肠毒素 SEC3 为模板,同源建模获得 SEU 的三级结构,氨基酸同源率达 56.5%。比较 SEU 与 SEB、SEC3 的氨基酸序列、二级结构和空间结构的差异,分析获得肠毒素超抗原活性发挥的分子基础。预测 Lys56、Asn60、Ala87、211-215 位氨基酸为 SEU 的功能位点,推断 SEU 存在潜在 TCR V β 结合域,与 MHC II 类分子的结合能力弱于 SEG^[10]。同样也有科学家测出了 SEB 蛋白结构,SEB 的氨基酸序列含有 239 个氨基酸残基,分子量为 28.23 kDa。SEB 蛋白具有高量的赖氨酸(13.4%)和天冬氨酸(10.1%)。含 22.27% 的 α -螺旋和 39.08% 的无规卷曲,SEA 和 SEB 的三维结构图见图 2、图 3。

3 SEs 的理化性质

肠毒素是一组具有超抗原活性的细菌毒素,易溶于水和盐溶液,分子量为 26~30 kDa。不同亚型之间有着相似的理化性质,并且极其耐热,其中以 B 型最耐热,C 型次之,A 型最差。这些毒素的效力只能通过延长煮沸时间或者高压灭菌法来逐步减弱。除了 TSST-1 外,它们都高度稳定且耐大多数蛋白水解

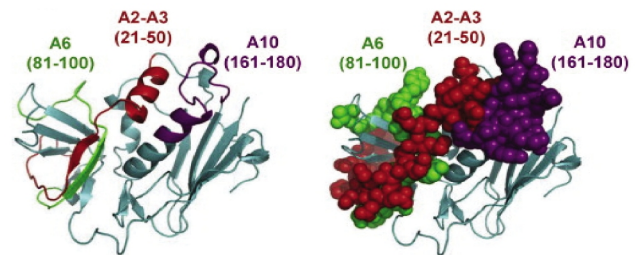


图 2 SEA 的三维结构指示了具有超抗原和催吐活性的区域^[12,14]
Fig. 2 The three dimensional structure of SEA indicates its areas which has super antigen and activity of vomiting.

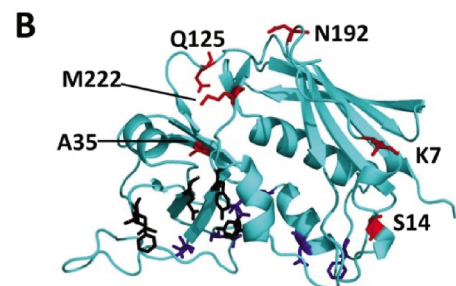


图 3 SEB 晶体图^[14]

Fig. 3 The crystallogram of SEB

注:蓝色部分代表 V β -TCR 区域结合的 SEB 区域,黑色部分代表与 MHC II DR1 结合的 SEB 区域。在不同的 SEB 中可能有变化的区域以红色标记。

Note: The blue area on behalf of combined SEB areas of V β -TCR, The black areas on behalf of SEB areas combined with MHC II DR1. Changeable areas possibly are marked by red in different SEB.

酶,即使在经消化道摄入后仍保留它们的生物学活性。目前人们最关注的 SEs 的性质是它们具有强大的激活淋巴细胞的能力,可使淋巴细胞产生强烈的细胞毒性作用和大量的细胞因子,如肿瘤坏死因子(TNF- α)等,对肿瘤细胞具有强大的杀伤作用。近来有人研究SE在治疗肿瘤中的作用,已有相关的临床药物出现。

4 SEs 的功能及临床意义

SEs一方面具催吐功能,可引发呕吐甚至食物中毒,另一方面又可作为“超抗原”来激活免疫系统。

4.1 SEs 的催吐功能

目前具有催吐活性的所有 SEs 的氨基酸组成都已经被测定,分子中富含赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸和酪氨酸。除 TSST 外,所有的 SEs 含有 2 个半胱氨酸残基形成的大约有 20 个氨基酸的胱氨酸环,SEA、SEB 和 SEC1 在这个区域有明显的相似性。由此推测此区域含有催吐部位。(值得一提的是:TSST 在化学上完全不同于其他肠毒素,它不含半胱氨酸,氨基酸排列顺序与其他肠毒素不完全一致,它含有 188 个氨基酸残基,末端氨基酸为丝氨酸)。有实验证据表明,SEA 的 21-50

和 81-100 位氨基酸区域对于 SEA 分子的超抗原和催吐活动是很重要的,而区域 161-180 位氨基酸只和超抗原行为有关而与催吐活动无关。根据几种蛋白质分子的氨基酸序列的比对可以做以下猜想,即在几种具有催吐活性的 SEs 分子中,它们的 21-50,81-100 氨基酸是控制这些 SEs 分子催吐活性的区域。如图 4 所示。

Spero 和 Morlock 用胰蛋白酶消化 SEC1 得到 2 个片段, 分子量分别是 22000 Da 和 6500 Da, 大片段含有 C 端肽链, 能引起猴腹泻, 但不引起呕吐。小片段含 N 端肽链, 内含一个高柔韧性的二硫化物环, 已证实与催吐活性有关, 但并没有表现出催吐绝对的必需性^[12]。另外 N 端肽段还可促进有丝分裂作用。Lang-ford 发现 SEA 在 3.5×10^{-10} ~ 3.5×10^{-13} mol/L 时能最大程度刺激人外周血淋巴细胞 DNA 和免疫干扰素的合成。SEI、SEK 相似, 分子中只含有一个半胱氨酸残基, 不能形成胱氨酸环, 它们的催吐活性比其它肠毒素弱。

有假设说 SEs 催吐的作用过程是:在腹部脏器中先分泌释放 5-羟色胺(5-HT),进而刺激迷走神经,然后传递信号到大脑的呕吐中枢^[13]。支持这个观点的证据是:位于迷走神经的传入神经元上的受体是 SEA 引发催吐的必需物^[6]。SEs 能够穿透肠

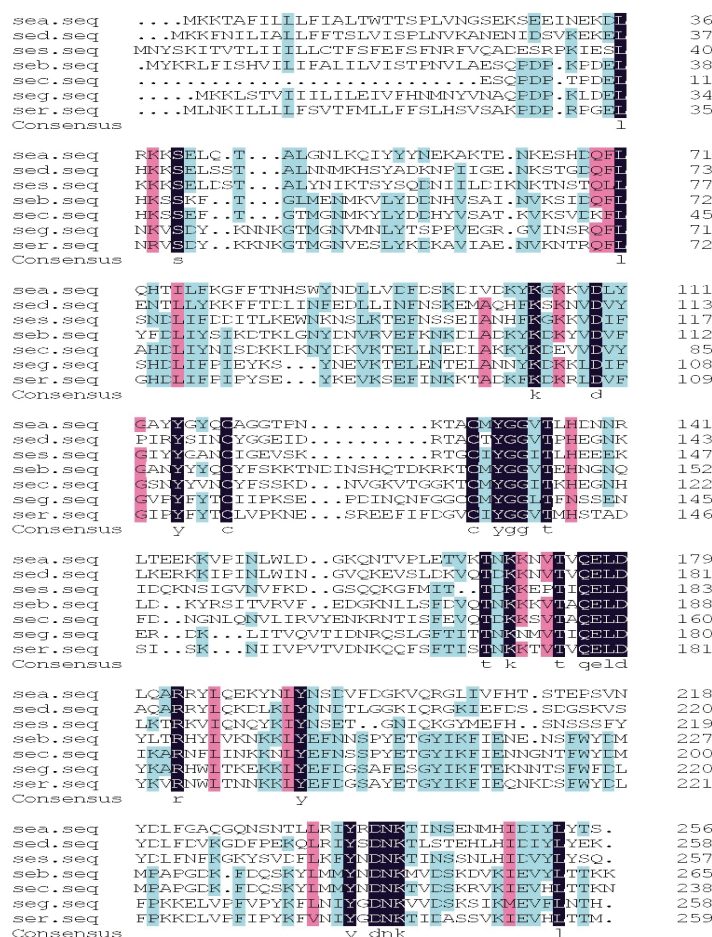


图 4 具有催吐功能的各型 SEs 序列比较

Fig. 4 Compare of different SEs sequence which has vomiting function

注:其中 seq 是文件名,代表序列文件。(made by DNAMAN)深蓝色代表同源性=100%,红色代表同源性 $\geq 75\%$,天蓝色指代表同源性 $\geq 50\%$ 。

Note: Among them, seq is filename, on behalf of sequence file (made by DNA man). Deep blue represent 100% homology, red represent $\geq 75\%$ homology, sky blue represent $\geq 50\%$ homology.

壁进而激活局部及全身免疫应答。局部免疫系统活性可由胃肠吸收肠毒素后被破坏来激发。胃肠区的很多地方可观察到炎症的发生,但是更多的服务机能障碍出现在胃和小肠的上部。有时由肠毒素中毒引起的腹泻可能是由于小肠对水和电解质的重吸收被抑制而引起的^[6]。

4.2 肠毒素的超抗原性作用

肠毒素属“超抗原”,具有强大的抗原刺激能力,且以 T 淋巴细胞为主要靶细胞,同时表现出对组织相容性复合物 II 类分子(MHC II)等位基因的不同偏爱性,产生具有区别的 T 淋巴细胞抗原受体 β 链 V 区(TCR V β)剖面(图 5)。与普通抗原相似,SEB 利用构成免疫突触的粘附和附属分子可与抗原提呈细胞表面的 MHC II 结合形成复合物。其结合部位位于抗原结合槽以外的区域,因此可不经加工直接与 TCR V β 结合。由于 TCR V β 区仅存在有限的基因,核苷酸序列非常保守,同一个体内的许多 T 淋巴细胞可具有相同的 V β 成分,因此,单一的肠毒素在极低浓度(1~10 $\mu\text{g/L}$)即可激活大量 T 淋巴细胞(可达全部 T 淋巴细胞的 5%~10%,甚至 40%)。但活化的 T 淋巴细胞释放大促炎细胞因子(如 TNF- α 、IFN- γ),最终导致炎症失控和多器官功能衰竭综合征(MODS)的发生。目前研究认为,SEB 诱导 T 淋巴细胞活化有两种方式,即 TCR V β 限制性方式和不依赖 TCR 的方式。在正常静息状态的 T 淋巴细胞不表达 MHC II 类分子,SEB 诱导方式为 TCR·V β 限制性方式,先与抗原提呈细胞上的 MHC II 类分子结合,形成毒素-MHC II 分子复合物,后者直接与 TCR 的特异性 V β 链结合,经磷酸酯肌醇二磷酸和环磷酸鸟苷等信号转导途径诱导 T 淋巴细胞的活化与增殖,导致炎性细胞因子的大量合成和释放。与内毒素所致脓毒症及 MODS 不同,T 淋巴细胞活化和增殖产生 TNF- α 、IFN- γ 是介导 SEB 损伤效应的关键环节,而 G- 菌脓毒症中 TNF- α 诱生主要由单核/巨噬细胞所介导^[15]。超抗原发挥作用的最佳时期是在感染的早期。此时超抗原的含量很低,只能激活局部细胞。在这个时期,宿主对金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌感染产生的应答完全依赖于骨髓细胞(例如中性粒细胞核巨噬细胞)。这一过程由炎症媒介物、Fc 受体以及补体介导机制引发,激活骨髓瘤细胞,吞没入侵的细菌。在感染部位的 T 细胞激活

优势可能是它可以产生 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子来抑制次区域炎症的发生^[16]。按促进 T 淋巴细胞增殖能力的强弱排序,常见肠毒素的超抗原活性由强至弱的顺序为:K、Q、A、G、O、U 型肠毒素不表现超抗原活性。

5 SEs 的表达与调控

5.1 影响 SEs 表达的 agr 系统

至于 SEs 的产生和调控,金黄色葡萄球菌是利用附属基因的重叠子来调节其它基因的表达。在金黄色葡萄球菌中,研究最清楚的调节子是 agr 系统(附属基因调节子),这是一个在高细胞密度时被激活的群体感应系统,agr 可以下调细菌某些表面蛋白的表达,同时上调部分胞外蛋白基因的表达,包括如 SEB/SEC/SED 和 TSST-1^[17]。然而 agr 并不是所有肠毒素的表达调控系统,因为 SEG 和 SEI 仅在低密度的菌体中产生,关于 SEG 和 SEI 产生的问题还存在争议,最直接的证据只表明它们的表达可被环境因子所引发^[19,20]。另外 SEA 可以在金黄色葡萄球菌生长不同时期持续表达^[18]。

5.2 SEs 表达的其他调控因素

在产生 SEA、SEB 或者 SEC 的 5 种金黄色葡萄球菌的菌株中,精氨酸和胱氨酸对于菌体的生长和肠毒素的产生也是必需的。但是其它的氨基酸的必需性也因菌种的不同而差异变化很大。相反,葡萄糖已被证明对于肠毒素的生产具有抑制作用,特别是对 SEB 和 SEC。这种抑制作用是由于葡萄糖代谢而使得 pH 降低所引发的。这些观察也可以与肠毒素 agr 依赖性系统相联系,葡萄糖和低的 pH 确实对于 agr 依赖系统具有抑制作用^[7]。

6 SEs 鉴定方法

传统的肠毒素鉴定方法是通过细菌培养,应用动物实验法、生物化学方法和血清学进行检验。但由于 SEs 是迄今已知的最有效的 T 细胞刺激剂,尤其人类 T 细胞对其最为敏感,在浓度达到 1 $\mu\text{g/mL}$ 即可刺激 T 细胞,这比任何生物化学或者血清学检验法的灵敏度要高出几个数量级。因此在关于肠毒素的疾病预防和抗癌产品的研发过程中对检测方法的灵敏度和特异性等提出了更高的要求。随后的鉴定方法有改进的免疫学方法,还有伴随着分子生物学发展而出现的如 PCR、荧光定量 PCR 以及 LAMP 等技术的应用,使检测灵敏度和特异性有了很大的提高。目前,按分离原理的不同,可分为四种方法:动物实验法、免疫血清法、核酸扩增法、仪器检测法^[21-24]。目前更多的研究是采用多重 PCR 方法,对不同的肠毒素基因设计相应的引物,优化退火温度、Mg²⁺ 以及循环次数选取对所有的引物都适应的条件,一次性处理所有样品,方便简单^[25]。

7 展望

目前由肠毒素引起中毒事件的严重性和它可以激活大量 T 淋巴细胞增殖的超抗原性,人们对于肠毒素的求知度要求越来越高。因此需要致力于肠毒素各方面的研究,可采用基因工程的方法来对其进行重组,表达进而做更深入的研究。SE 在治疗肿瘤中的作用也不断被报道,已有相关的临床药物出现。因此肠毒素的研究具有着重要的意义和广泛的应用前景。

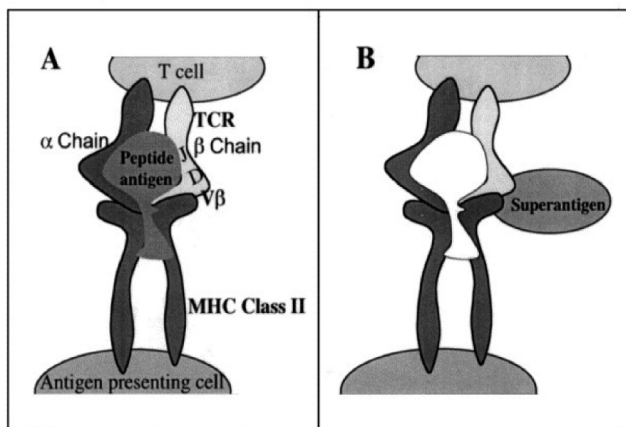


图 5 传统抗原(A)和超抗原(B)结合到 MHC-II 类分子和 TCR 分子的结构模型^[12]

Fig. 5 The structural model of MHC-2 molecule and TCR molecule combined with convectional antigen(A) and super antigen(B).

参 考 文 献 (References)

- [1] 何宏. 金黄色葡萄球菌肠毒素 B 编码基因的克隆及原核表达[D]. 青岛大学, 2008
He Hong. Molecular Cloning and prokaryotic Expression of Enterotoxin B Gene of Staphylococcus aureus Clinical Isolates in Escherichia coli DH5 α [D]. Qingdao University, 2008
- [2] 邹文燕. 对近年来本市分离的金黄色葡萄球菌进行肠毒素检测与分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 22(12): 2905-2907
Zou Wen-yan. Detection and analysis of enterotoxin in Staphylococcus aureus isolated from Suzhou city in recent years [J]. Chineses Journal of Health Laboratory Technology, 2010, 22(12): 2905-2907
- [3] 李毅. 金黄色葡萄球菌及其肠毒素研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(4): 392-395
Li Yi. Advancement in researches of Staphylococcus aureus and its enteroduxin [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2004, 14(4): 392-395
- [4] 刘进军, 刘芳, 岳利英. 金黄色葡萄球菌肠毒素的研究进展[J]. 河北北方学院学报, 2005, 22(5): 74-76
Liu Jin-jun, Liu Fang, Yue Li-ying. A Review on Staphylococcus Aureus Enterotoxin [J]. Journal of Hebei North University (medical edition), 2005, 22(5): 74-76
- [5] 张红河, 张卫英, 董晓勤, 等. 快速检测金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因方法的建立与应用[J]. 中国微生态学杂志, 2006, 28(1): 46-47
Zhang Hong-he, Zhang Wei-ying, Dong Xiao-qin, et al. Establishment and application of a rapid precise method to detect Staphylococcus aureus enterotoxins A [J]. Chinese Journal of Microecology, 2006, 28(1): 46-47
- [6] Marja Ángeles Argudín, Marja Carmen Mendoza, et al. Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins[J]. Toxins (Basel), 2010, 2(7): 1751-1773
- [7] Elena Ortega, Hikmate Abriouel, Rosario Lucas, et al. Multiple Roles of Staphylococcus aureus Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance [J]. Toxins (Basel), 2010, 2(8): 2117-2131
- [8] 柳旭伟, 葛文霞. 金黄色葡萄球菌肠毒素 [J]. 微生物学杂志, 2008, 28(5): 86-89
Liu Xu-wei, Ge Wen-xia. Enterotoxins of Staphylococcus aureus[J]. Journal of microbiology, 2008, 28(5): 86-89
- [9] Thomas D.Y, Jarraud S, Lemercier B, et al. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster[J]. Infect. Immun, 2006, 74(8): 4724-4734
- [10] Lina G, Bohach G.A, Nair S.P, et al. Standard nomenclature for the superantigens expressed by Staphylococcus[J]. Infect. Dis, 2004, 189 (12): 2334-2336
- [11] 王静思. 新型葡萄球菌肠毒素 SEG、SEU 的表达及结构功能分析[D]. 天津大学. 天津大学农业与生物工程学院, 2010
Wang Jing-si. Expression, Analysis on Structures & Bioactivities of Staphylococcal Enterotoxin G and Enterotoxin U [D]. Tian Jin university, 2010
- [12] Naomi Balaban, Avraham Rasooly. Staphylococcal enterotoxins[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 61(1): 1-10
- [13] Barrera C.A, Pinchuk I.V, Saada J.I, et al. Class II MHC-expressing myofibroblasts play a role in the immunopathogenesis associated with staphylococcal enterotoxins [J]. Ann. N. Y. Acad. Sci, 2004, 1029: 313-318
- [14] Kohler PL, Greenwood SD, Nookala S, et al. Staphylococcus aureus isolates encode variant staphylococcal enterotoxin B proteins that are diverse in superantigenicity and lethality [J]. PLoS ONE, 2012, 7(7): 1371
- [15] Sundberg E.J, Deng L, Mariuzza R.A. TCR recognition of peptide/MHC class II complexes and superantigens [J]. Semin. Immunol, 2007, 19(14): 262-271
- [16] Elena Ortega, Hikmate Abriouel, Rosario Lucas, et al. Multiple Roles of Staphylococcus aureus Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance [J]. 3-9Toxins (Basel), 2010, 2(8): 2117-2131
- [17] Tseng C.W, Zhang S, Stewart G.C. Accessory gene regulator control of staphylococcal enterotoxin D gene expression[J]. J Bacteriol, 2004, 186(6): 1793-1801
- [18] Munson S.H, Tremaine M.T, Betley M.J, et al. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from Staphylococcus aureus[J]. Infect. Immun, 1998, 66(7): 3337-3348
- [19] Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, et al. Detection of seg, seh, and sei genes in Staphylococcus aureus isolates and determination of the enterotoxin productivities of S. aureus isolates harboring seg, seh, or sei genes[J]. Clin. Microbiol, 2002, 40(3): 857-862
- [20] Pocsfalvi G, Cacace G, Cuccurullo M, et al. Proteomic analysis of exoproteins expressed by enterotoxigenic Staphylococcus aureus strains[J]. Proteomics, 2008, 8(12): 2462-2476
- [21] 张严峻, 张俊彦, 梅玲玲, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素基因的分型和分布[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(6): 682-684
Zhang Yan-jun, Zhang Jun-yan, Mei Ling-ling, et al. Typing and distribution of toxin genes among Staphylococcus aureus isolates from samples of raw milk [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2005, 15(6): 682-684
- [22] 范一灵. 金黄色葡萄球菌多重 PCR 和基因芯片检测方法的建立[D]. 上海: 上海交通大学, 2008
Fan Yi-ling. Development of Multiplex PCR and Gene Chip Methods for the Detection of Staphylococcus Aureus [D]. Shanghai Jiao Tong University, 2008
- [23] 梁毅珊. 金黄色葡萄球菌肠毒素及其检测方法的研究进展 [J]. 中国热带医学, 2008, 8(9): 1658-1659
Liang Yi-shan. Advance in the research of detection of endotoxin of Staphylococcus aureus [J]. China Tropic Medicine, 2008, 8 (9): 1658-1659
- [24] Di Pinto A, Ciccarese G, Tantillo G, et al. A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of Vibrio alginolyticus cholerae, and Vibrio parahaemolyticus [J]. J Food Prot, 2005, 68(1): 150-153
- [25] 彭国华, 胡主花, 薛琳, 等. 食物中毒样品中金黄色葡萄球菌及肠毒素检测[J]. 现代预防医学, 2008, 35(20): 3943-3945
Peng Guo-hua, Hu Zhu-hua, Xue Lin, et al. Detection of staphylococcus aureus and enterotoxin in food poisoning samples[J]. Modern Preventive Medicine, 2008, 35(20): 3943-3945