

副溶血性弧菌肠道毒性物质研究进展(综述)

卫生部食品卫生监督检验所 周桂莲

自1950年日本发现副溶血性弧菌以来,对此菌引起食物中毒产生急性胃肠炎的报告很多。但此菌引起食物中毒的发病机理尚未探明,在60~70年代该课题是国际上研究的重点。关于副溶血性弧菌产生何种物质,为什么会以引起肠液大量分泌而造成严重腹泻?很多学者曾认为此菌可能产生肠毒素或具有肠道毒性的物质,并进行了大量提纯和鉴定。在70年代中期,认为副溶血性弧菌的耐热性溶血毒素是引起食物中毒的原因物质^[1,2,3]的见解已几乎成为定论。但自80年代以来,又有人提出反对意见^[4]。1983~1984年我国对此课题进行了研究^[5,6],证明了副溶血性弧菌的脂多糖内毒素对新生兔具有肠道毒性作用,能使乳兔肠道大量分泌肠液,为副溶血性弧菌引起食物中毒的原因物质提供了实验依据,为发病机理的研究开创了新的局面。

近30年来关于副溶血性弧菌的致病性和肠毒性物质的研究进展综述或分析报道较少,本文仅就此问题作一些概要的介绍。

关于副溶血性弧菌致病性的研究

1950年日本大阪发生沙丁鱼引起的一起暴发性食物中毒,患者272人,死亡20人,藤野恒三郎由尸体材料中分离出副溶血性弧菌(当时称为副溶血性巴斯德菌)和摩尔根变形杆菌,并认为这次中毒是混合感染⁽⁷⁾。当时对副溶血性弧菌的性质和致病性还不太清楚。1955年,日本国立横滨医院发生大量食物中毒患者,潼川岩等⁽⁸⁾用加4%NaCl的营养琼脂检查葡萄球菌时,由大批检品中意外地分离出多株副溶血性弧菌,由于生物学性状和抗原性相同,患者又有大量抗体,他们宣布了

此菌可能是这起暴发性食物中毒的致病菌,具有嗜盐性。并认为可能源于海水。由于日本经常发生鱼蟹类食物中毒,又往往能分离出此种嗜盐性细菌,因此它对人有致病性的见解为许多学者所接受,但由于从海水和海鱼中经常能分离到相同或类似的弧菌,鉴于其分布广和检出频率高,付溶血性弧菌受到重视并对其致病性产生疑问。有人提出两个问题,一是这些细菌是否都是具有致病性,如何鉴别致病性与非致病性,二是如何证明对人有致病性,发病机理如何等。通过大量患者菌株与海水及鱼蟹菌株的生物学性状的比较研究,建立了副溶血性弧菌和溶藻弧菌分类学定义与鉴别方法^[9],解决了第一个问题。关于第二个问题,曾试图建立副溶血性弧菌食物中毒的动物模型,经试用多种动物,均未成功^[10]。猴经口试验不如人敏感,以后动物经口中毒模型的研究陷于中断。志愿者经口试验^[4,11]出现了典型症状,口眼神奈川现象阳性菌株($2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^7$ 个菌),志愿者发生了腹部不适和腹泻,明确地证实了副溶血性弧菌对人有致病性,能引起食物中毒,但其发病机理仍未解决。对副溶血性弧菌产生何种致病物质能促使肠液大量分泌,出现水样腹泻,引起学者们的兴趣。

关于副溶血性弧菌肠毒素的研究

细菌性食物中毒可分为两类,一类是细菌侵袭肠道组织引起的,如肠道侵袭性大肠杆菌,其特点是不产生肠毒素,是菌毛侵入大肠上皮细胞内生长繁殖,在其内毒素的作用下,破坏细胞引起炎症和溃疡,其症状如菌痢。病理学检查证明副溶血性弧菌不具侵袭

性。另一类是细菌产生的肠毒素引起的,是指在肠道中能引起分泌性反应的细菌代谢产物(蛋白质),如霍乱弧菌的 CT 和大肠菌的 LT 和 ST 等^[13,14],它们的发病机理都已明确。

副溶血性弧菌引起食物中毒是否具有分泌至细胞外的肠毒素或具有肠道毒性的其他物质,迄今研究最深入的是副溶血性弧菌的耐热性溶血毒,此外还有一些关于有肠道毒性物质的报导。近来又提出了副溶血性弧菌脂多糖病因说,表明研究日渐深入。

耐热性溶血毒^[14,15,16]

日本学者发现副溶血性弧菌具有溶血和不溶血的菌株之后,将此菌在我妻氏血平板上分为溶血者为神奈川现象阳性,不溶血者为神奈川现象阴性两类。日本嗜盐菌中心为探讨神奈川现象与致病性的关系,进行了广泛的研究。结果表明由自然界包括海水和鱼蟹分离的菌株99%是神奈川现象阴性,而由食物中毒病人分离的菌株96.5%为神奈川现象阳性^[11],从而初步肯定了神奈川现象阳性菌是致病菌的学说。通过使用肠道模型研究的结果,在25株神奈川现象阳性株中23株能使兔肠祥试验出现明显的积液反应,在10株神奈川现象阴性株中,仅有2株引起肠内积液现象,此结果进一步说明神奈川现象阳性菌与致病性有关,这一发现引起许多学者的注意,并集中研究神奈川现象阳性物质——耐热性溶血毒,后来又因为有许多病人对此菌产生抗体^[17,18],更使其得到了重视。

耐热性溶血毒是外毒素,通过硫酸铵盐析,DEAE 纤维素柱层析,羟基磷灰石柱层析和葡萄糖 G-200 凝胶过滤四个步骤可从大量的培养滤液得到纯品^[4,19,20],是不含碳水化合物和脂类的单纯蛋白质,由分子量各为21000的两个亚单位所组成,不同实验室分析所得的氨基酸组成接近,N 端40个氨基酸的顺序已经鉴定,等电点约为 pH4.0,加热 100℃不能破坏,即其毒素有耐热性。

耐热性溶血毒对不同种类的红细胞的毒性相差悬殊,检定时常用人或家兔的红细胞。金属离子 Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} 等可促进溶血活性,肠粘膜细胞表面的 GM_1 , 神经节苷脂是耐热性溶血毒的主要受体,事先用 GM_1 神经节苷脂处理耐热性溶血毒,可明显降低或阻断其溶血性和致死毒性,马的红细胞接触耐热性溶血毒不发生溶血,原因在于其表面不存在这种受体。

耐热性溶血毒有细胞毒性^[21,24],能引起 Hela 细胞、L 细胞和 FL 等细胞明显的形态学变化和使其死亡,原因是大量 Ca^{++} 离子进入细胞内。耐热性溶血毒能使5~6日龄的小鼠小肠粘膜上皮细胞的胞浆产生许多空泡,使核变性,但对常规检定肠毒素用的中国地鼠卵巢(CHO)细胞没有作用,不能使之变形。

耐热性溶血毒有肠道毒性,12.5ug 即可使兔肠祥产生积液,曾有人认为耐热性溶血毒是引起副溶血性弧菌食物中毒的病因物质,但同时发现高效价的耐热性溶血毒抗体,能中和耐热性溶血毒,而不能中和或消除副溶血性弧菌活菌引起兔肠祥积液的能力^[23]。因此耐热性溶血毒又被认为只与血便和心肌损伤等有关。

耐热性溶血毒有致死毒性^[4,11,12],大白鼠投与耐热性溶血毒后可在心电图上发现活动电位振幅增大,27sec 时心脏搏动停止,动物死亡。用培养的心肌细胞亦可观察到很强的毒性,认为耐热性溶血毒主要是心脏毒,比其它毒素对心脏的作用强。

其它可滤过性肠道毒性物质

日本曾报道^[21],不论神奈川现象阳性或阴性副溶血性弧菌的培养滤液,用冷冻干燥法10倍浓缩物,大部分能引起兔肠液过量分泌,其中起作用的物质可透析,在100℃加热15min 即被破坏。因此证明并非耐热性溶血毒,此物质仅在浓缩后才表现活性,可能是原

培养中含量甚少。印度学者用副溶血性弧菌肉汤培养物滤液所得结果认为,除有促渗透性因子外并不存在任何肠毒素^{〔18〕},美国学者则证明类似副溶血性弧菌的细菌,其肉汤培养物滤液的硫酸铵沉淀物,可引起兔肠祥积液现象,但这类物质从致病性方面考虑意义是不大的。

本田武司在1977年报道中指出,副溶血性弧菌培养物滤液中,有能引起CHO细胞发生变化的物质^{〔23〕},其纯品的性状与耐热性溶血毒不同,不能溶血,200ng纯品可使40%CHO细胞变形,而耐热性溶血毒不能使CHO细胞变形,但此物质肠祥试验结果阴性,表明它没有使肠液过度分泌的能力,此外1980年MiyomoTo又报道重复试验结果,未见滤液中有此种引起CHO细胞发生变化的物质^{〔23〕}。

菌细胞内的肠毒素问题

近年来已知霍乱弧菌肠毒素主要存在于培养滤液中,但细胞内也有少部分。以前曾认为病原性大肠菌所产生的LT是典型的外毒素,现知菌体内的含量显著多于培养滤液^{〔14〕},因此对其存在部位目前在认识上有所改变。

在副溶血性弧菌的培养滤液中,除主要发现了耐热性溶血毒外,还有一些与病因无明显关系的酯酶和不耐热溶血素等物质。另外是否在细菌细胞内含有引起肠道过度分泌的物质研究较少。早在60年代初期,曾用兔肠祥试验研究副溶血性弧菌的致病性和发病机理,证明活菌能引起肠液过度分泌反应,神奈川现象阳性菌,90%以上为兔肠祥试验阳性。阴性菌亦有20%左右能引起兔肠祥试验阳性,这说明并不是只有产生耐热性溶血毒的神奈川现象阳性菌才能有致病性。日本宫本1980年报告^{〔23〕},副溶血性弧菌培养物所致的兔肠祥积液现象,不能被耐热性溶血毒的高价抗毒素所中和,这些问题有待进一步澄

清。

美国学者曾提出,副溶血性弧菌菌体内有不耐热的非滤过性肠毒性物质^{〔24〕},推测可能是一种不耐热的内毒素,但众所周知,内毒素是能耐100℃高热的。其溶解物及离心处理所得试样均属混合成分,不是纯品。未能查明此种不耐热物质是何种成分所构成。他们还提出培养基种类与肠道毒性有关。用胰酶消化黄豆培养基培养的细胞所制备的溶解物,其肠道毒性显著小于脑心培养基所制备者,认为营养上的差异影响特异毒性因子的质或量,此点很值得注意。

副溶血性弧菌致腹泻因子的研究

我国就国际上历经35年研究尚未阐明的课题——“副溶血性弧菌致腹泻病因”问题进行了探索,根据神奈川现象阴性菌能引起食物中毒的实际情况^{〔25,26〕},并吸取了国际上长期寻找肠毒素未能成功的经验教训,采用几种生物鉴定方法进行逐步分析,寻找与致腹泻有关的毒性物质及其存在部位。初步证实了副溶血性弧菌能使新生兔经口发病死亡,并进行了此菌致病毒性部分的定位^{〔5〕}。用小鼠肠祥试验和乳鼠灌胃试验,证明副溶血性弧菌脂多糖(内毒素)能引起肠液过度分泌现象^{〔6〕},是具有肠道毒性的致腹泻物质。并发现离心后的上清液无明显毒性,动物全部存活。而菌体内有耐自溶,耐100℃30min加热,耐胃酶消化的毒性物质,是脂多糖而不是蛋白质,用wespahl法提取出副溶血性弧菌和溶藻弧菌的脂多糖进行新生兔口服试验,证明两种细菌的毒性差别极大,这可能与性质有关。

由于副溶血性弧菌脂多糖不是肠毒素,为证实此种脂多糖的肠道毒性,就目前所知,能证明肠毒素活性的有肠祥试验和灌胃试验。用中毒来源的神奈川现象阴性和阳性副溶血性弧菌的肉汤培养物,脂多糖,进行小鼠肠祥和乳鼠灌胃试验,均获得了与肠毒素相

似的能促进肠液分泌的反应。

灌胃试验是样品经过胃及十二指肠之后,作用于肠道和机体与食物中毒较为近似。根据试验结果,发现乳鼠灌胃法比小鼠肠祥法更为敏感,可能是由于动物接触了具有毒素样活性物质,使肠内钾钠失调,分泌亢进,局部水肿,细胞变性等产生大量分泌积液,成为食物中毒时发生水样腹泻的原因。

1980年,日本大桥^{〔27〕}对经过食品传播疾病的细菌提出分类,其中大部分在行政上被列为细菌性食物中毒,并将细菌性食物中毒分为两大类,即中毒型和感染型。在感染型中又分为组织侵袭性和肠毒素性两类。已知副溶血性弧菌食物中毒是活菌所致的感染型,尸检结果并未发现局部溃疡等病变。证明副溶血性弧菌急性胃肠类不属于侵袭性感染。而过去绝大部分的研究工作是按照肠毒素型的思路进行探讨的。迄今没有找到肠毒素,因此在他的分类表中对副溶血性弧菌未明确归属,有待研究。

副溶血性弧菌食物中毒是水样腹泻为主^{〔4〕}。经分析大阪1068例患者,水样腹泻占78.1%,粘液便占13.2%,血便为5.1%,粘液血便为2.2%,此菌的菌体成分(脂多糖)有促进乳兔和小鼠肠液过度分泌的作用,这对本菌所致的腹泻原因,提供了实验依据,推进了今后深入研究此菌的致病机理的工作。

参 考 文 献

1. 本田武司,他·肠炎ビブリオの产生すち致死毒の作用机序·日本细菌学杂志 1976;31(1):182。

2. 竹田美文,他·肠炎ビブリオの病原因子·日本细菌学杂志 1977;32(1):63。

3. 三轮谷俊夫·即时型致死毒——肠炎ビブリオの耐热性溶血毒を中心に。日本细菌学杂志 1979;34(1):57。

4. 三轮谷俊夫,本田武司·肠炎ビブリオ即时型致死的作用机作·代谢 1982;19(3):225。

5. 周桂莲等,副溶血性弧菌致病性的研究Ⅰ·中华预防医学杂志 1984;18(2):65。

6. 周桂莲等,副溶血性弧菌致病性的研究Ⅱ·中华微生物学和免疫学杂志 1985;(5):294。

7. 藤野恒三郎·シテス中毒事件の细菌学检查报告·日本传染病学杂志 1951;25;11。

8. 潼川岩·好盐菌中毒の临床·食品卫生研究 1960;10(2):13。

9. 善养寺浩·肠炎ビブリオ第Ⅰ集·藤野恒三郎,福见秀雄编·纳谷书店,1967,61。

10. 相和和嘉·肠炎ビブリオ第Ⅱ集·藤野恒三郎,福见秀雄编·纳谷书店,1967,247。

11. Miwatani T, et al · Vibrio Parahaemolyticus CoLT_o, KOKYO 1976。

12. 童竞亚·霍乱肠毒素研究进展·中华微生物学和免疫学杂志1981;1(4):294。

13. 许新强·产肠毒素大肠杆菌及其所致传染性腹泻的研究进展·国外医学(流行病学传染病学分册) 1983;10(3):111。

14. 司马惠兰,等·霍乱弧菌及产肠毒素大肠菌的毒素研究进展·国外医学(微生物学分册) 1983;6(5):198。

15. Miyamoto Y, et al · invitro hemolytic characteristic of vibrio Parahaemolyticus. J. Bacteriol 1969;100:1147-1149。

16. 三轮谷俊夫,他·肠炎ビブリオの产生する致死毒(耐热性溶血毒)の标的脏器·日本细菌学杂志 1976;31(1):81。

17. 三轮谷俊夫·细菌の产生する即时致死毒の病态生理学的研究·日本细菌学杂志 1982;37(1):39。

18. 竹田美文,三轮谷俊夫·肠炎ビブリオ·日本细菌学杂志 1981;36(4):617。

19. 宫本泰,他·肠炎ビブリオの神奈川现象溶血因子の抽出の患者血清中の中和抗体·食品卫生研究 1969;19(8):758。

20. 坂崎利一·国际肠炎ビブリオシンポジウムフソテ·食品卫生研究1974;24(2):11。

21. 本田武司·肠炎ビブリオの产生する耐热性溶血毒の致作用に する 研究·日本细菌学杂志 1977;32(6):777。

22. 竹田美文,三轮谷俊夫·肠炎ビブリオ·日本细菌学杂志 1981;36(4):617。

23. 本田武司·肠炎ビブリオガ产生するCHO 细胞整形变化すせの因子の精制と性状·日本细菌学杂志 1977;32(1):137。

24. Twedf R. Wet al · Toxicity of vibrio Parahaemolyticus. Microbiology 1974; 241 ASM. AP