

金黄色葡萄球菌致病毒素的研究进展

姚 蕾 综述,徐元宏 审校

(合肥市滨湖医院检验科,安徽合肥 236000)

关键词:金黄色葡萄球菌; 溶血素; PV-杀白细胞素; 炎症; 成孔毒素**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.22.034**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2014)22-3080-03

金黄色葡萄球菌是一种重要的革兰阳性致病菌,广泛存在于人的体表、鼻咽部及肠道,可引起人的局部化脓性感染、肺炎、伪膜性肠炎、心包炎及败血症等,既能引起医院感染,又能造成社区感染。其致病性主要是能产生多种外毒素和酶^[1],特别是金黄色葡萄球菌分泌大量的外毒素,包括一组能够破坏宿主细胞质膜的多肽,这些多肽包括成孔毒素(PFT): α -溶血素和双组分杀白细胞素(γ -溶血素)、PV-杀白细胞素(PVL)/LukED 和 LukGH/AB、 β -溶血素,以及酚可溶性调控蛋白(PSM)^[2]。在上个世纪 20 年代,金黄色葡萄球菌所具有的杀白细胞(主要为粒细胞类)以及致红细胞的溶血现象就已经被观察并研究,但是对各种毒素的生理作用的探索仍未完成。本文总结了金黄色葡萄球菌的一些主要致病因子,在宿主正常组织中传播,并造成宿主细胞的免疫损伤以及其在金黄色葡萄球菌感染中活化宿主炎症反应的部分机制。

1 α -溶血素

金葡菌溶血素有 4 种类型: α 、 β 、 γ 、 δ ,对人类有致病作用的主要是 α -溶血素(Hla)。 α -溶血素是一种成孔蛋白类溶血素,可损伤人和动物的红细胞、血小板,促使小血管平滑肌收缩、痉挛,毛细血管血流阻滞和局部缺血坏死。大剂量 Hla 可引起大脑生物电的迅速停止而导致死亡^[3]。Hla 前体由 319 个氨基酸构成,其中包括 N 端 26 个氨基酸残基的信号肽。分泌的成熟 Hla 或其前体是亲水性分子,包含 293 个残基,等电点大约为 pH8.5,主要由 β -片层结构(占 65%)组成,缺乏半胱氨酸残基,相对分子质量大约为 33×10^3 ^[4]。在质膜上,Hla 前体装配成含有 3 个特殊结构域的蘑菇状七聚体,相对分子质量约为 232×10^3 。Hla 七聚体的帽子和边缘结构域位于质膜的表面,茎结构域则形成跨膜通道。Hal 以可溶性的单体形式分泌到菌体细胞外,然后以七聚体的形式聚集在多种细胞膜上^[5]。Hla 破坏细胞膜经过 3 个步骤,首先 Hla 前体必须通过非确定性高亲和力受体或双分子质膜表面的非特异性底物,如磷脂酰肌醇或胆固醇的吸引,结合于靶细胞膜;然后,结合于膜表面的 Hla 前体经过寡聚化,形成不溶性的七聚复合物前体;最后,Hla 七聚体经过一系列的构象变化形成茎结构域嵌入细胞膜内。Hla 形成的孔道允许小分子物质和离子的进出,细胞质内小分子物质如 ATP 经孔道渗漏到细胞外,不可逆地改变细胞渗透压,破坏细胞膜的完整性^[6-7],导致有核细胞膨大、死亡,红细胞渗透性溶解。与此同时, Ca^{2+} 的流入引发一系列的次级反应,包括类花生四烯酸的产生,细胞内 ATP、镁离子和 GTP 等分泌,核酸内切酶的激活,IL-2 等细胞因子的释放,膜结构的改变^[8-9]、Hla 介导的上皮细胞死亡、干扰 $\beta 1$ 整合素介导的病原体-宿主细胞相互作用而抑制金葡菌的黏附和内化等^[10-14]。

另有研究结果表明,不同物种个体之间以及不同细胞之间

对于 α -溶血素的结合存在亲和力差异。例如兔红细胞较人红细胞对 α -溶血素敏感,而人肺上皮 A549 细胞则表现出对 α -溶血素相对不敏感^[15];同样 Hla 可以溶解多种类型的细胞,包括人单核细胞、淋巴细胞、红细胞、血小板和内皮细胞等^[8,16-18]。对人白细胞的敏感度也各不相同,淋巴单核细胞(最大溶解剂量只需 100 ng/mL)较粒细胞敏感(10 $\mu\text{g/mL}$ 仍能够维持细胞完整性)^[19]。早期的研究表明 α -溶血素对于细胞膜的溶解破坏需要磷酸卵磷脂的参与^[20],这一现象目前已经通过 α -溶血素与磷酸胆碱类物质结合过程中的变化得到了证明。通过干预给予磷酸卵磷脂表达能够增强 α -溶血素的溶血作用,反之则降低 α -溶血素的溶血作用,这些研究表明磷酸卵磷脂参与了 α -溶血素对靶细胞溶解破坏作用。近期研究表明,金黄色葡萄球菌感染靶细胞细胞膜上的 ADAM10 蛋白参与 α -溶血素的结合^[15],敲除人肺上皮 A549 细胞上 ADAM10 蛋白的表达则可以减小 α -溶血素的结合,并降低细胞的溶解;ADAM10 蛋白在 A549 细胞与兔红细胞细胞膜表面表达较人红细胞丰富,而其在人粒细胞系中的表达目前还未有报道,粒细胞对 α -溶血素的不敏感还被观察到无相应的膜复合物形成。

2 β -溶血素

金黄色葡萄球菌 β -溶血素是由 330 个氨基酸组成的单链多肽,相对分子质量为 $(37 \sim 39) \times 10^3$,具有白细胞毒性、溶血活性等特性。 β -溶血素是一种 Mg^{2+} 依赖神经酯酶,具有磷脂酶 C(PLC)活性,可以分解甘油磷酸胆碱, β -溶血素依靠这种酶活性,水解组成细胞膜的磷脂双分子层,从而破坏细胞膜的完整性,导致细胞裂解,引起溶血^[21]。 β -溶血素最适宜水解底物是卵磷脂和鞘磷脂,而磷脂酰乙醇胺、磷脂酸、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰甘油等不会被其水解。在 Mg^{2+} 的存在下, β -溶血素水解卵磷脂,产生一个带电荷的磷脂酰基团和非极性二酰甘油(水解鞘磷脂时,产生神经酰胺)。不同个体的细胞膜对 β -溶血素的敏感度的差异,是与红细胞中神经鞘磷脂的浓度有直接的关系,浓度越高,溶解力越强。 β -溶血素是一种热冷毒素,“热冷反应”即毒素在 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用后,伴随一段时间的低温(4 $^{\circ}\text{C}$),可以使其溶血能力显著提高。研究表明,通过显微电镜扫描,在 Mg^{2+} 在下,金黄色葡萄球菌 β -溶血素的“热冷”培养可以导致红细胞和淋巴细胞表面结构形态上的改变,这种改变在红细胞主要体现在膜表面形成内陷,白细胞则丧失了膜表面的皱褶并呈现膜的全部瓦解^[22]。说明含有神经鞘磷脂的白细胞和淋巴细胞在有金黄色葡萄球菌 β -溶血素的存在下,存活能力降低,也就是说,金黄色葡萄球菌 β -溶血素天然具有白细胞毒性。

3 γ -溶血素和双组分杀白细胞素

金黄色葡萄球菌除了 α -溶血素外还具有其他几个成孔毒素。与 α -溶血素不同,其他成孔毒素成熟孔的形成包括两种多肽。基于它们的电泳迁移率的不同分别命名为 S(慢速)和 F

(快速)。不同的金黄色葡萄球菌的成孔毒素具有显著的同源性。成孔毒素包括: γ -溶血素对应于 S 成分(HlgA 或 HlgC)和 F 成分(HlgB)的两个组合;杀白细胞素,由 LukS-PV 和 LukF-PV 组成;LukED;LukGH,也被称为 LukAB^[23]。

1932 年,研究者发现金黄色葡萄球菌可产生一种与引起兔死亡的溶血毒素明显不同的杀白细胞素^[24]。此杀白细胞素,后来命名为 PVL,是属于双组分毒素家族的一种金黄色葡萄球菌特有的外毒素。它由两种邻近和共转录的称为 lukF-PV、lukS-PV 基因所编码,这两种基因各自产生相对分子质量为 32×10^3 和 38×10^3 大小的蛋白质^[25]。像其他所有的杀白细胞素一样,PVL 通过在细胞膜上形成孔来杀伤白细胞。除了能在白细胞膜上形成孔外,其 LukS-PV 信号肽最近也被视为一种可与细胞外基质相关的硫酸类肝素相互作用的黏附分子^[26]。

4 δ -溶血素

δ -溶血素是由 26 个氨基酸组成同时具有疏水性和亲水性的多肽,其通过结合于靶细胞表面,从而改变细胞膜表面的张力,导致细胞膜发生破坏,这种具有双水性的溶血素在金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌中都发现存在。

事实上,相对于其他溶血素, δ -溶血素能溶解大多数物种的红细胞和细胞器,以及细菌的原生质体和球状体^[27]。由于它的两亲性 α -螺旋结构, δ -溶血素具有脂类天然的亲和力,相比细胞膜上的有序结构域,其能更优先结合无序结构域,其能通过与原核和真核细胞膜上的脂质成分结合发挥溶解细胞膜结构的功能^[28]。

5 致病物质介导的炎症信号活化途径

5.1 Ca^{2+} 介导的 NF- κ B 和 PLA2 活化 Ca^{2+} 浓度在细胞膜内外差异巨大(细胞膜外大于 1 mmol/L,细胞膜内却小于 100 nmol/L),毒素在细胞膜中形成小孔后,会导致细胞膜内钙离子水平快速升高,刺激细胞内质网等细胞器释放相关活化物质,这种现象在用 α -溶血素刺激兔多型核细胞(PMNs)的研究中报道^[29]。 Ca^{2+} 浓度的变化同时可活化多种转录调控因子^[30], Ca^{2+} 浓度升高可首先活化细胞内的钙调蛋白,活化的钙调蛋白可同多种蛋白结合,进一步活化其他信号途径。钙调蛋白可活化钙调磷酸酶,后者活化可活化激酶 I κ B(IKKb)^[31],催化 I κ B 失活后与 NF- κ B 分离,NF- κ B 在细胞质中活化并入核,参与多种炎症因子的转录调控。IL-8 为 NF- κ B 的一种主要调控炎症因子,可诱导粒细胞活化,有报道 α -溶血素和 PVL 可诱导 IL-8 水平升高,这种诱导导致的 IL-8 水平升高同样在肺上皮细胞存在^[32]。NF- κ B 同时可调控磷脂酶 A2(PLA2)水平,PLA2 在细胞质中水解花生四烯酸为前列腺素 E2(PGE2)和白细胞三烯 B4(LTB4), Ca^{2+} 浓度升高也可通过激活钙调蛋白直接活化磷脂酶 A2。采用 α -溶血素刺激人粒细胞和肺上皮细胞,都可导致白细胞三烯 B4 合成水平升高;反之,通过螯合剂去除细胞膜的 Ca^{2+} 后,用 α -溶血素刺激 PMNs,白细胞三烯 B4 的合成水平无变化。

5.2 K^+ 介导的 MAPK 活化 K^+ 浓度在细胞膜内外的分布与 Ca^{2+} 相反(胞内浓度为 143 mmol/L,胞外浓度为 5 mmol/L),毒素在细胞膜中形成小孔后,细胞内的 K^+ 通过小孔外流,水平降低。当低水平的细胞内的 K^+ 产生后,同样可活化一系列相关免疫调控途径。采用 α -溶血素刺激人角质化细胞后,发现 MAPK p38 磷酸化水平升高;通过调节细胞外 K^+ 水平至高浓度,阻止细胞内 K^+ 外流至低水平,这种 MAPK p38 磷酸化现象被终止^[33]。在没有外界细菌毒素刺激的环境,给予 K^+ 载体在细胞膜上的数量,同样可以活化 p38。也有报道 α -溶血

素作用产生的细胞膜内外渗透压改变能够活化 MAPK p38,这些证据证明 K^+ 外流可活化 MAPK p38。MAPK p38 可进一步活化 NF- κ B,调控 IL-8 合成^[34]。 K^+ 减少在活化 MAPK p38 途径的同时,还能够活化半胱天冬酶-1(caspase-1),后者可以裂解 IL-1 β 和 IL-18 前体,促进这些细胞因子分泌;半胱天冬酶-1 同时作为蛋白酶,可诱导细胞肿胀坏死凋亡^[35]。多项研究表明金黄色葡萄球菌的致病因子在感染宿主细胞后,能够促进 IL-1 β 分泌,IL-1 β 可以促进中性粒细胞趋化,清除细菌体数量^[36]。PFT 在炎症反应中发现可以活化信号途径 NLRP3,进一步活化 ASC;这种金黄色葡萄球菌感染后导致的胞内 K^+ 减少以及随后 NLRP3 信号途径活化,通过给予胞外高浓度 K^+ 干预阻断^[37]。

6 小结和展望

金黄色葡萄球菌感染正常机体的组织靶细胞后,能合成并释放其一系列致病物质,这些致病物质分别对靶细胞的不同受体具有敏感度,通过与靶细胞受体结合,破坏靶细胞细胞膜空间结构,诱导细胞内物质外流或者细胞外物质内流,使细胞溶解、膨大、死亡;在破坏靶细胞结构的同时,致病物质所引起的细胞内信号传递因子的改变,则可活化相关免疫信号途径,介导免疫炎症反应。金黄色葡萄球菌致病物质在感染中的这些研究,对我们揭示其感染的机制,以及进一步研究其感染的炎症反应提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] 李冬野,崔玉东,侯喜林,等.金黄色葡萄球菌 β -溶血素的原核表达及其溶血活性检测[J].中国人兽共患病学报,2007,23(2):136-139.
- [2] Vandenesch F, Lina G, Henry T. Staphylococcus aureus hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2012, 2: 12.
- [3] 刘瑞田.金黄色葡萄球菌外毒素的研究进展[J].国外兽医学:畜禽疾病,1994,15(1):12-14.
- [4] Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of Staphylococcus aureus[J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(1): 16-34.
- [5] 李闰婷,朱战波,崔玉东.金黄色葡萄球菌 α -溶血素基因表达及溶血活性检测[J].中国人兽共患病学报,2009,25(3):229-233.
- [6] 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]. J Clin Microbiol, 2002, 40(3): 857-862.
- [7] Jayasinghe L, Miles G, Bayley H. Role of the amino latch of staphylococcal alpha-hemolysin in pore formation: a co-operative interaction between the N terminus and position 217[J]. Biol Chem, 2006, 281(4): 2195-2204.
- [8] Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Alpha-toxin of Staphylococcus aureus[J]. Microbiol Rev, 1991, 55(4): 733-751.
- [9] Schmitt C K, Meysick K C, O'Brien A D. Bacterial toxins: friends or foes? [J]. Emerg Infect Dis, 1999, 5(2): 224-234.
- [10] Haslinger B, Strangfeld K, Peters G, et al. Staphylococcus aureus alpha-toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor-alpha and the mitochondrial death pathway[J]. Cell Microbiol, 2003, 5(10): 729-741.
- [11] Bantel H, Sinha B, Domschke W, et al. alpha-Toxin is a mediator of staphylococcus aureus-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor

signaling[J]. J Cell Biol, 2001, 155(4): 637-648.

[12] Essmann F, Bantel H, Totzke G, et al. Staphylococcus aureus alpha-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation[J]. Cell Death Differ, 2003, 10(11): 1260-1272.

[13] Liang X, Ji Y. Involvement of alpha5beta1-integrin and TNF-alpha in Staphylococcus aureus alpha-toxin-induced death of epithelial cells[J]. Cell Microbiol, 2007, 9(7): 1809-1821.

[14] Liang X, Ji Y. Alpha-toxin interferes with integrin-mediated adhesion and internalization of Staphylococcus aureus by epithelial cells[J]. Cell Microbiol, 2006, 8(10): 1656-1668.

[15] Wilke GA, Bubeck Wardenburg J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in Staphylococcus aureus alpha-hemolysin-mediated cellular injury[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 107(30): 13473-13478.

[16] Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of staphylococcus aureus[J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 3(1): 16-34.

[17] Song L, Hohaugh MR, Shustak C, et al. Structure of staphylococcal hemolysin, a heptameric transmembrane pore[J]. Science, 1996, 274(5294): 1859-1866.

[18] Blomqvist L, Thelestam M. Early events in the action of staphylococcal alpha toxin on the plasma membrane of adrenocortical Y1 tumor cells[J]. Infect Immun, 1986, 53(3): 636-640.

[19] Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, et al. Staphylococcus aureus panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(1): 1000715.

[20] Galdiero S, Gouaux E. High resolution crystallographic studies of alpha-hemolysin-phospholipid complexes define heptamer-lipid head group interactions; implication for understanding protein-lipid interactions[J]. Protein Sci, 2004, 13(6): 1503-1511.

[21] Gow JA, Robinson J. Properties of purified staphylococcal beta-hemolysin[J]. J Bacteriol, 1969, 97(3): 1026-1032.

[22] Wiseman GM. The nature of staphylococcal beta hemolysin. II. Effect on mammalian cells[J]. Can J Microbiol, 1968, 14(2): 179-181.

[23] Dumont AL, Nygaard TK, Watkins RL, et al. Characterization of a new cytotoxin that contributes to Staphylococcus aureus pathogenesis[J]. Mol Microbiol, 2011, 79(3): 814-825.

[24] Kobayashi SD, Deleo FR. An update on community-associated MRSA virulence[J]. Curr Opin Pharmacol, 2009, 9(5): 545-551.

[25] Deurenberg RH, Stobberingh EE. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. Curr Mol Med, 2009, 9(2): 100-115.

[26] Tristan A, Benito Y, Montserret R, et al. The signal peptide of Staphylococcus aureus panton valentine leukocidin LukS component mediates increased adhesion to heparan sulfates[J]. PLoS One, 2009, 4(4): 5042.

[27] Kreger AS, Kim KS, Zaboretzky F, et al. Purification and properties of staphylococcal delta hemolysin[J]. Infect Immun, 1971, 3(3): 449-465.

[28] Cheung GY, Duong AC, Otto M. Direct and synergistic hemolysis caused by Staphylococcus phenol-soluble modulins; implications for diagnosis and pathogenesis[J]. Microbes Infect, 2012, 14(4): 380-386.

[29] Suttorp N, Habben E. Effect of staphylococcal alpha-toxin on intracellular Ca²⁺ in polymorphonuclear leukocytes[J]. Infect Immun, 1988, 56(9): 2228-2234.

[30] Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression[J]. Nature, 1998, 392(6679): 933-936.

[31] Frantz B, Nordby EC, Bren G, et al. Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B[J]. EMBO J, 1994, 13(4): 861-870.

[32] Rose F, Dahlem G, Guthmann B, et al. Mediator Generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by S-aureus alpha-toxin[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 282(2): L207-L214.

[33] Kloft N, Busch T, Neukirch C, et al. Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular Potassium[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 385(4): 503-506.

[34] Ratner AJ, Hippe KR, Aguilar JL, et al. Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins[J]. Biol Chem, 2006, 281(18): 12994-12998.

[35] Brodsky IE, Monack D. NLR-mediated control of inflammation some assembly in the host response against bacterial pathogens[J]. Semin Immunol, 2009, 21(4): 199-207.

[36] Miller LS, Pietras EM, Uricchio LH, et al. Inflammasome-mediated production of IL-1 beta is required for neutrophil recruitment against Staphylococcus aureus in vivo[J]. J Immunol, 2007, 179(10): 6933-6942.

[37] Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP[J]. Nature, 2006, 440(781): 228-232.

(收稿日期: 2014-05-16)

• 综 述 •

心力衰竭标志物中段肾上腺髓质素原测定的意义及应用前景

徐胜男 综述, 张秀明 审校
(中山市人民医院, 广东中山 528403)

关键词: 心力衰竭; 中段肾上腺髓质素原; 肾上腺髓质素
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 22. 035 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2014)22-3082-03

肾上腺髓质素(ADM)是1993年日本学者由从肾上腺嗜铬细胞瘤的组织提取液中分离的一种血管活性多肽^[1]。目前研究表明, ADM具有扩张血管、降压、排钠、利尿、减少氧化应

激导致的血管内皮细胞凋亡、抑制血管平滑肌细胞迁移、对抗肾素-血管紧张素系统等多种生物学作用, 可减少血管损伤, 延缓动脉粥样硬化斑块形成, 抑制血管重构。在高血压、急性心

作者简介: 徐胜男, 女, 检验技师, 主要从事临床检验研究。