

葡 萄 球 菌 A 蛋 白

郁 庆 福

(上海第一医学院卫生微生物学教研室)

金黄色葡萄球菌的细胞壁含有三种主要成份:核糖醇磷酸、粘肽及A蛋白(SPA)。因A蛋白具有能与免疫球蛋白的Fc段相结合的特性,已广泛应用于细菌、病毒等病原诊断、分型(如肺炎双球菌和链球菌的分型)、免疫球蛋白提取和测定、细胞的分离、分析淋巴细胞表面结构及免疫理论研究等方面,并具有广泛的应用前途。

葡萄球菌A蛋白的研究至今已有22年历史,1958年Jenson首先报告金黄色葡萄球菌含有一种抗原能与人血清起反应,并推测此抗原是一种多糖。以后,Löfkrist与Sjöquist发现此抗原不是多糖而是蛋白质。1964年Grosv建议命名为A蛋白。它与1940年Verway报道的金黄色葡萄球菌中的蛋白抗原是一致的。

A蛋白的来源

90%以上的金黄色葡萄球菌具有A蛋白,其含量在各菌株之间相差悬殊。A蛋白不仅存在于此菌的细胞壁内,而且在它生存的培养基中也能发现,有的菌株能释放出几乎全部的A蛋白^[1]。

Galinski从临床病例和带菌者分离到的495株菌中测定A蛋白,发现从脓汁中分离到的金黄色葡萄球菌有53%含A蛋白,从带菌者分离到的菌株有27%含A蛋白。另外,A蛋白的含量与金黄色葡萄球菌的噬菌体类型、血清学型别有关。Kronall等报告,从人及牛的急性乳腺炎患者分离到的金黄色葡萄球菌中含A蛋白较多,而慢性乳腺炎患者中则很低。

L-型金黄色葡萄球菌也能产生A蛋白,仍存在于细胞壁和培养基中,浓度大约比无细胞

壁缺损的细菌低20倍。

A蛋白的化学组成及分子结构

A蛋白可从细胞壁中提取和纯化。在Cowan I株细胞的干重中含A蛋白1.7%,细胞壁中含6.7%。A蛋白的纯化对其分子结构、物理化学性状的研究有很大促进。用加热法或胰酶、脱氧核酸酶消化的金黄色葡萄球菌细胞壁,从中所提取的A蛋白分子量为12000—15000。用溶菌酶及溶葡萄球菌素消化得到的A蛋白分子量为42000^[2]。

Grov分析了A蛋白化学组成,其中含氮15.38%,不含磷酸。并含有10种氨基酸即丙氨酸、亮氨酸、脯氨酸、苏氨酸、丝氨酸、甘氨酸、赖氨酸、门冬酰胺、谷氨酰胺。据Forgren等报道,A蛋白组成中缺乏色氨酸及半胱氨酸。

Sjöquist等报告A蛋白共价结合于金黄色葡萄球菌细胞壁上的肽多糖^[3],并均匀的分布于整个细胞壁。Movitz研究提出,在核糖体上合成后,A蛋白连接到肽多糖上的过程,只需一分钟时间就能完成。而且当A蛋白分子离开核糖体后,不经过可溶性细胞浆阶段,可直接合并到肽多糖上^[1]。

A蛋白结构大致是:从蛋白质氨基端开始,顺次排列着四个Fc结合段,每个结合段有58—62个氨基酸残基。蛋白质羧基端大约有100个残基的长度。氨基端是封闭的,羧基端连接在细菌的细胞壁上。如把整个A蛋白用胰蛋白酶消化,则残基部分仍然连接于葡萄球菌细胞壁,需要用溶葡萄球菌素加以切割。利用溶葡萄球菌素37℃2小时处理后,300g湿的细菌可获得450—500mg A蛋白^[4]。

通过上述二个步骤处理后, A 蛋白被分解为 A、B、C、D'、X 各片段, 它的氨基酸排列顺序也已确定^[5](如图 1)。

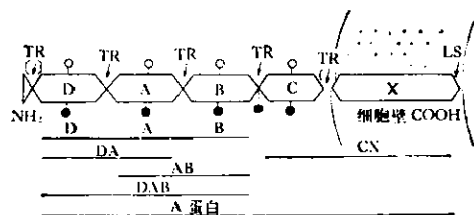


图 1 A 蛋白结构示意图

圆圈为 Fc 受体; 圆点为结合在所有 Fc 结合段的马兔抗 A 蛋白血清致沉淀结构; 黑方块为只在多价片段上出现的上述致沉淀结构; TR 为胰蛋白酶; LS 为溶葡萄球菌素。

A 蛋白的流体动力学研究发现摩擦比为 2.1—2.2, 特性粘度 29ml/g。上述各参数提示了 A 蛋白是长形而不是圆球形^[2]。

A 蛋白的紫外吸收系数 $A_{280}^{1\%} = 1.65$

A 蛋白无肠毒素作用, 无致病作用^[6], 也无磷酸脂合成酶、脱氧核糖核酸酶、脂酶、凝固酶或蛋白酶那样的活性。

A 蛋白应用的基本原理

1966 年 Forsgren 及 Sjöquist 认为人血清与 A 蛋白的反应是通过免疫球蛋白 IgG 的 Fc 段进行的, 而不是 Fab 段, A 蛋白与 Fc 段有亲和性^[7]。所以不是真正的抗原抗体免疫反应, 而是一种“假免疫反应”。A 蛋白与 Fc 段结合是非特异性的, 并不改变 IgG 的结构, 它的 Fab 段仍保留与特异性抗原相结合的特性。一个 A 蛋白分子能结合 2 个以上的 IgG 分子^[4]。

A 蛋白只能与人的 IgG 亚群 1, 2, 4 结合, 但不能与亚群 3 结合, 这可能是 IgG 3 缺少结合 A 蛋白的结构^[8]。利用这一原理可将 A 蛋白作为颗粒吸附剂, 提取并纯化人的 IgG 3。除人血清外, A 蛋白还能与豚鼠、狗、猪、猴、水貂、小白鼠等动物的血清反应产生典型的沉淀线。Kronvall 等用 A 蛋白研究哺乳动物 IgG 的 Fc 段进化时, 发现大多数哺乳动物血清(除两栖纲、爬虫纲及鱼类外)均能与 Fc 段起反应。

一般认为 IgG 除外的其它免疫球蛋白与 A 蛋白不起反应^[7], 但 McDowell 等证明, A 蛋白能与正常人初乳 IgA 发生沉淀反应, 也能与兔抗 A 蛋白血清的 IgM 起反应^[9]。另外, Grov 还报道 A 蛋白能与巨球蛋白血症者的血清 IgM 反应, 其机制尚不明瞭^[10]。

A 蛋白的生理活性

一、引起过敏反应

Cluff 报告家兔重复感染金黄色葡萄球菌可使皮肤出现速发型过敏反应, 反应大小与血清内相应抗体效价无关。Custafson 等发现小量的 A 蛋白可使未致敏的豚鼠产生过敏反应, 大量则引起出血、Arthus 现象。同样, 将 A 蛋白使用于事先用人的 γ 球蛋白致敏的家兔, 可产生 Arthus 样反应。关于 A 蛋白引起过敏的机制可能与血小板受损, 释放出组织胺有关。Hawiger 等研究认为 A 蛋白可引起血小板损害。关于血小板受损, 一般有两种原因: 一是由细菌内毒素或免疫复合物在补体参与下引起; 一是某些细菌外毒素如链球菌溶血毒素 O 及溶血毒素 B 或葡萄球菌 α 毒素, 可直接作用于血小板膜, 而不需要补体参加。A 蛋白引起血小板损害是有补体参加的。

用试验动物从不同角度研究 A 蛋白引起过敏机制。Hawiger 等归纳为二阶段: ① A 蛋白、血浆及血小板参加使动物致敏; ② 在补体参与下, 血小板受损, 释放出组织胺。当 A 蛋白浓度过高时, 过敏反应可被抑制。这很可能是高浓度 A 蛋白引起多聚物于 Fc 段上的缘故, 不会是由于 A 蛋白与免疫球蛋白 Fc 段结合而封闭补体结合点, 因 A 蛋白分子小(分子量 15000)而家兔的 IgG 分子大(分子量 55000)。

家兔及豚鼠的这种过敏反应在致敏或未致敏的动物中均可发生, 但致敏比未致敏动物反应更强烈。Martin 等研究证明, 成人对葡萄球菌也可产生过敏反应。用 A 蛋白注射于皮内可引起立即过敏反应或 Arthus 现象。

二、激活补体

A 蛋白可激活补体引起肾小球肾炎。免疫荧光技术证明抗原及补体 (C_3) 在病人肾小球内。金黄色葡萄球菌抗原能直接激活补体系统免疫复合物沉积于肾小球基底膜或肾小球膜^[11]。

此外, Sjöquist 及 Stålanheim 还研究了 A 蛋白与补体的关系。当 A 蛋白与 IgG 结合为复合物后, 能激活豚鼠补体。人的血清也可引起这种补体结合反应。而在丙种球蛋白缺乏症的患者血清中不产生此反应^[8]。将 A 蛋白加到新鲜的人、豚鼠、狗、鸽血清中, 补体明显地消耗。如加入 A 蛋白过多(如相当引起沉淀反应的量)则补体作用被抑制^[8]。Arthus 现象也说明 A 蛋白具有激活补体能力。Sveen 等认为 A 蛋白可使白细胞产生趋化性。但 A 蛋白是一种细胞趋化素元, 而不是一种细胞趋化素。A 蛋白细胞趋化性的产生依赖于补体的存在, 如果 A 蛋白与加热灭活的血清混合, 则不会产生多形核细胞的移动。A 蛋白既可激活经典途径, 也可激活旁支途径。在葡萄球菌感染中, A 蛋白与 IgG 的 Fc 段在血液或组织中反应, 激活补体系统使脓汁积聚于感染部位。在这一过程中补体 C_3 似乎起决定性作用^[12]。

三、抑制吞噬作用

吞噬细胞有 IgG 的 Fc 段受体, IgG 能固定补体及粘附吞噬细胞。加 A 蛋白到吞噬系统中(包括细菌、调理素、多型核白细胞)观察 A 蛋白对调理吞噬作用的影响, 结果证明 A 蛋白能抑制吞噬作用。含有丰富 A 蛋白的金黄色葡萄球菌菌株, 其抑制作用比含少量 A 蛋白的菌株要强。如将 Cowan I 株培养于甘露醇-盐琼脂平板上, 则 A 蛋白的产量降低, 其抑制吞噬作用特性也随之丧失。调理素吞噬作用与 A 蛋白反应的部位也在 Fc 段。A 蛋白抑制吞噬作用机制可能是因为 A 蛋白与非特异性的 IgG 的 Fc 段相结合而封闭了吞噬作用的作用点。金黄色葡萄球菌 A 蛋白的抗吞噬性质, 在葡萄球菌感染

机制中也会引起一定作用。

A 蛋白与 T 和 B 淋巴细胞的关系

T 淋巴细胞在体外受非特异性促有丝分裂因子刺激后, 能转化为淋巴母细胞。植物血凝素 (Phytohemagglutinin, PHA) 即是其中之一。但它对 B 淋巴细胞无刺激作用。Forsgren 等发现, 含 A 蛋白的金黄色葡萄球菌对 B 淋巴细胞有刺激作用, 能促其有丝分裂, 而对 T 淋巴细胞无作用。SPA 对 B 淋巴细胞刺激作用的强度与 PHA 对 T 淋巴细胞的相似。金黄色葡萄球菌细胞壁的其他成分(如粘肽、磷壁酸)无此作用^[13]。

如将 A 蛋白加入淋巴细胞培养物内, 同时加刺激量的兔抗人淋巴细胞血清或 PHA 或商陆致有丝分裂因子能干扰淋巴细胞转化。因为 A 蛋白与具有抗淋巴抗体活性的家兔球蛋白相互作用阻碍了它们结合到淋巴细胞表面。作者认为金黄色葡萄球菌 A 蛋白可以作为一种免疫抑制剂^[13]。据 Sakane, Ringden 等报道, SPA 对 T 淋巴细胞也有刺激作用。Sakane 实验中指出, 将丝裂霉素处理过的 T 淋巴细胞加到非 T 淋巴细胞培养物内, 可显著增加非 T 淋巴细胞对 SPA 的反应, 反过来也一样。故认为 T 与 B 淋巴细胞间有相互协作作用^[14]。基于球蛋白的 Fc 段与 SPA 反应的原理, 又根据细胞表面标记不同, 还能用于细胞分离^[15,16]。

Ghetie 用金黄色葡萄球菌或 SPA 覆盖的羊 RBC (SPA-SRBC) 与小鼠淋巴细胞共同培养, 使淋巴细胞形成玫瑰花形, 用密度梯度离心法与未形成玫瑰花的淋巴细胞分开, 此法曾用于分离人淋巴细胞。用 SPA 分离具 Ig 的细胞大约可达 84%, 细胞纯度约 83%, 存活达 89%。Ghetie 报道, 用有荧光的金黄色葡萄球菌分离人淋巴细胞的方法, 特异性好, 敏感性高^[17]。1978 年又报道, 将 SPA 共价结合于 Sepharose 6MB, 再结合于带抗体细胞, 未结合的细胞可洗涤除去^[16]。关于 A 蛋白对淋巴细胞的作用以及 A 蛋白应用于分离细胞的问题, 目前尚未取得一致意见, 正在研究中。

A 蛋白在诊断上的应用

六十年代已把研究 A 蛋白的某些成果开始用于细菌及病毒的诊断上。Edwards 等曾提出用 A 蛋白直接从分离细菌的平板上鉴定沙门氏菌和志贺氏菌。此法可用于快速诊断上^[18]。Хазенсон 等用 A 蛋白协同凝集反应鉴定大肠杆菌的血清型。此法特异性强,制备方便,价格低廉。诊断液可在 4℃ 冰箱中保存 134 天^[19]。分枝杆菌的血清分型过去沿用试管凝集反应,此法缺点是特异抗血清用量大,使用的是活菌,某些菌株还会出现自然凝集使之难以分型。Juklin 等利用 A 蛋白与 Fc 段结合的原理,将金黄色葡萄球菌悬液与不同型别的抗分枝杆菌抗体结合,对分枝杆菌分型。此试验可用死菌进行,避免了上述方法的一些缺点^[20]。

Sophianou 等将 A 蛋白结合于白喉杆菌特异性抗体,用于检测白喉毒素。张颖悟、董阳达等将此法试用于钩端螺旋体的鉴定,结果表明具有良好的特异性。凝集的速度与菌量有关,认为用 A 蛋白协同凝集反应的敏感性与常用的凝溶试验一样^[21]。协同凝集反应还应用于链球菌^[22]、淋球菌^[23]、沙门氏菌^[24]、脑膜炎双球菌等多种^[25,26]细菌的鉴定与分型。1976 年 Zalan 等用抗流感特异血清致敏金黄色葡萄球菌,作流感病毒鉴定,证明此法具有型特异性^[27]。在另一试验中证明,65 株分离的流感病毒中只有 2 株同时凝集 A、B 型病毒,特异性较强。不但能区别型别,也可区别 A 型病毒中的亚型^[28]。

到目前为止,较多报道是用 A 蛋白测定抗原,但也可测抗体。Brunner 等曾提到用金黄色葡萄球菌的荧光免疫分析法测定肺炎支原体抗体,敏感性与放射免疫沉淀法相仿^[29]。Christensen 等介绍了用¹²⁵I 标记的金黄色葡萄球菌 A 蛋白测定奈瑟氏菌表面抗原相应的血清抗体^[30]。Figenschau 等用 A 蛋白的放射免疫分析测定乙型肝炎的抗原和抗体^[31]。Soergel 等用 A 蛋白测定嵌环病毒抗体^[32]。

近来有文献报道,测定风疹特异免疫球蛋白 M 的方法,先用金黄色葡萄球菌 Cowan I 株

吸收免疫球蛋白 G,然后测定 IgM^[33,34]。Handsher 报道将 IgG 用金黄色葡萄球菌吸附后,留下的抗体用 2 巯基乙醇处理,效果较好,67 个对照者均阴性,131 个风疹恢复期病人(发病开始 4—49 天)血清有 125 个阳性(95%)^[35]。Field 等报告用 A 蛋白-Sepharose 吸收可去除 IgG 98%,比用葡萄球菌吸收法好^[35]。有关此问题正在研究中。

参 考 文 献

- [1] Movitz, J.: *Eur. J. Biochem.*, **48**: 131, 1974.
- [2] Bjork, I. et al.: *ibid*, **29**: 579, 1972.
- [3] Bjöquist, J. et al.: *ibid*, **30**: 190, 1972.
- [4] Sjöquist, J. et al.: *ibid*, **29**: 572, 1972.
- [5] Sjödal, J.: *ibid*, **73**: 343, 1977.
- [6] Lind, I.: *Acta Pathol. Microbiol. Scand*, Sect. B, **80**: 702, 1972.
- [7] Kronvall, G. et al.: *J. Immunol.*, **104**: 140, 1970.
- [8] Kronvall, G. et al.: *Clin. Exp. Immunol.*, **7**: 211, 1970.
- [9] McDowell, G. et al.: *Acta Pathol. Microbiol. Scand*, Sect. B, **79**: 801, 1971.
- [10] Grov, A.: *ibid*, Sect. C, **83**: 173, 1975.
- [11] Pertschuk, L. P. et al.: *Am. J. Clin. Pathol.*, **66**: 1027, 1976.
- [12] Sveen, K. et al.: *Acta Pathol. Microbiol. Scand*, Sect. B, **86**: 369, 1978.
- [13] Forsgren, A. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **6**: 207, 1976.
- [14] Sakane, T. et al.: *J. Immunol.*, **120**: 302, 1978.
- [15] Nash, A. A.: *J. Immunol. Method*, **12**: 149, 1976.
- [16] Ghetie, V. et al.: *ibid*, **21**: 133, 1978.
- [17] Ghetie, V. et al.: *Scand. J. Immunol.*, **3**: 397, 1974.
- [18] Edwards, E. A. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **3**: 339, 1976.
- [19] Хазенсон, Л. Б. и др.: *ЖМЭИ.*, №1:77, 1980.
- [20] Juklin, I. et al.: *Acta Pathol. Microbiol. Scand*, Sect. B, **81**: 179, 1973.
- [21] 张颖悟等: *遵义医学院学报*, **3**: 18, 1980.
- [22] Tebbutt, G. M. et al.: *J. Clin. Pathol.*, **29**: 1085, 1976.
- [23] Sandstrom, E. et al.: *Acta Pathol. Microbiol. Scand*, Sect. B, **88**: 27, 1980.
- [24] Bo Svenungsson et al.: *ibid*, Sect. B, **87**: 29, 1979.
- [25] Dirks-Go, S. I. S. et al.: *J. Clin. Pathol.*, **31**: 1167, 1978.
- [26] Per Oien et al.: *Acta Path. Microbiol. Scand*, Sect. B, **83**: 387, 1975.
- [27] Zalan, E. et al.: *Canad. Med. Ass. J.*, **115**: 1002, 1976.
- [28] Zalan, E. et al.: *Arch. Virol.*, **56**: 177, 1978.

(下转第 175 页)

(上接第 185 页)

- [29] Brunner, H. et al.: *Med. Microbiol. Immunol.*, 163: 25, 1977.
- [30] Christensen, K. K. et al.: *J. Infect. Dis.*, 134: 317, 1976.
- [31] Figenschau K. J. et al.: *Acta Path. Microbiol. Scand.*, Sect B, 82: 422, 1974.
- [32] Soergel M. E. et al.: *Arch. Virol.* 57: 271, 1978.
- [33] Mallinson, H., et al.: *J. Clin. Path.* 29: 999, 1976.
- [34] Skaug. K. et al.: *Acta Path. Microbiol. Scand.* Sect C, 86: 33, 1978.
- [35] Handsheer, R. et al.: *J. Clin. Microb. ol.* 5: 588, 1977.
- [36] Field, P. H. et al.: *J. Immunol. Method*, 32: 59, 1980.