

杀弧菌素的研究进展

谢正畅

(第二军医大学微生物学教研室,上海)

杀弧菌素 (Vibriocin) 是杀细菌素 (Bacteriocin) 中的一种, 自 1925—1958 年间很多研究者陆续发现多种细菌能产生各自的杀菌物质 (杀细菌素) 以来^[1-8], Farkas-Himsley 及 Seyfried^[9] 在霍乱弧菌中发现产生类似杀细菌素的抗菌物质, 取名杀弧菌素 (Vibriocin)。其后, 他们及其他研究者在很多株霍乱弧菌及不凝集弧菌中也发现能产生这种杀弧菌素, 并对其形态结构及理化性状作了研究^[10-13, 18, 23], 本文就其研究进展作简要综述。

(一) 杀弧菌素的产生条件、诱生方法及检测方法

Farkas-Himsley^[10, 11] 指出, 诱使弧菌产生杀弧菌素必须有合适的条件: (1) 氧化还原电位 (Eh) 较低的环境 (培养弧菌时的氧化还原降低到 -265 — -270 mV 时, 产生杀弧菌素高)。(2) 需有一定的菌数及生长期。在加有巯基乙酸钠的培养基中培养弧菌, 当细菌繁殖到对数生长期, 菌数不少于 $7-9 \times 10^7$ /ml 且不多于 2×10^8 /ml 时, 才产生杀弧菌素。(3) 一定培养温度及时间。在含巯基乙酸钠的培养基中, 室温或 37°C 中培养弧菌, 杀弧菌素的释放和对指示菌的致死作用须在 37°C 培养 2 小时或在室温培养 6 小时。(4) 合适的培养基。培养基中含有柠檬酸钠及磷酸盐缓冲剂, 或用胰蛋白酶消化的大豆汤加入上述成分, 或用血琼脂及胰蛋白胨琼脂培养霍乱弧菌均可产生多量的杀弧菌素。

杀弧菌素的诱生法有以下几种^[10]: (1) 厌氧法: 将对链霉素敏感的 (SMs) 霍乱弧菌接种于营养肉汤中, 37°C 振荡培养 1.5—2 小时, 待细菌达到 8×10^7 /ml 时, 在肉汤中加入巯基乙酸钠 0.15%, 使氧化还原电位降至 -230

mV, 继续培养并测定肉汤浊度。当观察到浊度降低不再增长时, 将培养物以 $12800 \times G$ 离心 10 分钟, 弃去沉淀, 取上清液通过孔径 $> 140 \mu\text{m}$ 的分级滤膜过滤, 将滤液 (内含杀菌素) 保存于 8°C 。(2) 紫外线法: 按上述厌氧诱生法, 将弧菌培养于肉汤, 经高速离心沉淀, 取出沉淀的细菌重新悬浮于生理盐水中, 使其中菌数为 10^8 /ml, 取 15 ml 于平皿内, 暴露于波长为 2537 \AA 的紫外灯下, 相距 25 cm 持续 120 秒钟, 边照射边搅拌, 以杀死全部细菌, 然后置于暗处 37°C 45 分钟, 以防止光复活。取此菌液 1 份加营养肉汤 4 份混合, 再在暗淡光线下, 37°C 1 小时, 高速离心沉淀后, 取上清液通过如上分级滤膜过滤, 滤液储于冷处, 此液即含有杀菌素。(3) 冷休克法: 将由厌氧诱生法获得的弧菌培养物于 8°C 过夜, 次晨移入 37°C 培养 1—2 小时, 然后照上法离心沉淀, 取上清液用分级滤膜过滤, 滤液中含有杀弧菌素。(4) 温热及冰冻法: 将 SMs 的霍乱弧菌划线涂布于杀弧菌素分型培养基 (配方见后), 37°C 培养 54 小时, 放冰箱中冰冻 18 小时, 然后刮下生长的细菌, 将平皿开盖暴露于哥罗仿气体 2 小时后, 置空气中 2 小时让哥罗仿蒸发, 将平皿储于冷处。杀弧菌素即存留弥散于琼脂基中。

检测杀弧菌素的方法, 最早由 Farkas-Himsley 及 Seyfried^[9] 提出 3 种方法, 即: (1) 平板法: 用耐链霉素 (SMr) 霍乱弧菌 (指示菌) 在肉汤中培养 3 小时后, 涂布于琼脂平板上, 37°C 置 20 分钟, 然后将上述方法诱生的杀弧菌素滤液滴加于此平板培养基上, 37°C 培养过夜, 观察所滴位置有无抑制指示菌生长, 若无细菌长

本文呈蒙叶天星先生审校, 特致谢。

出,即表示有杀弧菌素存在。(2)混浊度测定法:将 SMr 的霍乱弧菌接种于肉汤中培养至对数期,然后加入杀弧菌素滤液(作一定稀释后)培养,观察肉汤混浊度,同时与未加滤液的肉汤对照比较,如有杀弧菌素存在,则抑制指示菌生长,浊度降低。(3)平板铺盖法:此法操作步骤繁锁,以后, Wahba^[12] 改良了检测杀弧菌素的方法,他的改良法是:将被检测的霍乱弧菌穿刺接种于 2 号琼脂 (Oxoid) 平板,37℃ 培养过夜后,4℃ 6 小时,然后暴露于哥罗仿气上 1 小时杀死细菌,将平皿开盖,于孵箱中经 1 小时烘干平皿中培养基表面的水,然后用培养 4 小时的指示菌肉汤培养物倾入平皿中,4℃ 经 18 小时后置 37℃ 培育 8 小时,观察菌落周围有无抑菌环。若指示菌出现有抑菌环,证明被检的霍乱弧菌产生了杀弧菌素。Wahba 的改良法,证明是一种较好的检测杀弧菌素法。但也有人认为不能常获得恒定的结果。因此后来 Takeya 及 Shimodori^[16] 建立了空窝形成法 (Lacuna formation method), Datta 和 Prescott^[17] 又建立了琼脂基打孔抑菌法。这两种方法是否比上述检测杀弧菌素的方法敏感和稳定,尚待进一步研究证实。

(二) 杀弧菌素的作用机理、方式和范围

1. 杀弧菌素的作用机理与一般杀细菌素的作用相同,致使敏感细菌死亡,杀弧菌素本身不繁殖,被杀死的细菌也不被裂解。对敏感细菌的作用包括两步:第一步是使敏感细菌的细胞膜损伤;第二步是降解细菌的遗传物质,导致细菌死亡^[18]。多数研究者^[14,18]认为杀弧菌素对敏感细菌的细胞膜的致伤过程是由杀弧菌素吸附于菌细胞表面,作用于胞浆膜,引起菌细胞膜结构改变,使其结构薄弱,导致细胞膜通透性增高,使胞内物质漏出,因此在细胞周围的液体中可以测出吸收紫外线的物质增多,同时细胞外液体中的钾增加;实验研究证明,杀弧菌素对敏感细菌的另一作用是对 DNA 的合成有显著抑制作用,对 RNA 和蛋白质的合成也有减速作用。由于以上两种作用的结果,导致敏感细菌死亡。

2. 杀弧菌素对敏感细菌的作用方式及影响因素:由于杀弧菌素如各种杀细菌素一样对胰蛋白酶等蛋白消化酶敏感,因此 Jayawardene 及 Farkas-Himsley^[19] 研究胰蛋白酶对杀弧菌素活性的影响,从而探讨杀弧菌素致死弧菌的方式。他们用杀弧菌素处理对数生长期的敏感弧菌 7—10 分钟后,加入胰蛋白酶再培养,结果发现敏感弧菌不死,却使杀弧菌素的作用逆转或失效,他们认为这是因胰蛋白酶已消化了粘附在敏感弧菌上的杀弧菌素,此时杀弧菌素尚未伤害弧菌细胞膜;他们发现如先用胰蛋白酶处理敏感弧菌,并不能改变该菌对杀弧菌素的敏感性。因此说明杀弧菌素只伤害菌细胞膜,但未能置菌于死地,当以胰蛋白酶及时消去杀弧菌素时,受伤的菌细胞膜可重新修复,从而该菌仍能存活。

根据氯霉素可抑制敏感细菌蛋白质的合成,但不直接影响能量产生及合成胞壁这一特性,他们又研究了杀弧菌素的杀菌作用与氯霉素抑制细菌蛋白质合成的关系。对敏感的霍乱弧菌先用氯霉素 (5 μg/ml) 处理,然后加入杀弧菌素进行培养,发现在含有杀弧菌素及氯霉素的培养基中,弧菌存活数多,在仅含有杀弧菌素的对照中,弧菌急剧死亡,这是因为氯霉素虽然能够阻止细胞蛋白的合成以修复损伤胞膜,但不能使弧菌不死,另一方面氯霉素能抑制细菌翻译合成,抑制破坏细菌遗传基因 DNA 脱氧核糖核酸酶,从而保护敏感细菌不受杀弧菌素的杀害作用。

从上述结果可见,杀弧菌素对敏感细菌的作用方式,首先是直接伤害细胞膜,若此时除去杀弧菌素,细菌则可修复,如进一步破坏菌体内核酸物质,细菌则死亡,但若用药物阻止细菌合成降解核酸的酶 (DNAs),可免除核酸被破坏,从而使细菌得到保护。

3. 杀弧菌素的作用对象及细菌谱: Welsch 等^[11,15,19,20] 发现若将对链霉素敏感和对链霉素具耐药性的葡萄球菌混合培养时,具耐药性的菌数比前者逐渐减少,此为 Welsch 氏现象。以后 Linz 等^[11,21] 研究发现在大肠杆菌、绿脓

杆菌及结核杆菌中也有这一现象,他们认为出现这一现象并非由于敏感细菌生长过速,或因耗去了养料,而是由于它产生了杀细菌素致使抗性菌死亡。以后研究证明霍乱弧菌也有类似现象,系由杀弧菌素所致^[11,14]。Farkas-Himsley 及 Seyfried^[10,11] 认为这一现象是由于这两株细菌急速生长后,使培养基中的氧化还原电位(Eh)降至一定程度呈厌氧状态时,敏感菌产生杀弧菌素所致,在厌氧情况下,由于抗性菌不受杀弧菌素作用从而刺激细菌生长,在继续培养时培养基中的Eh逐渐增高达需氧状态,此时由于抗性菌与敏感菌的表面电荷差异,杀弧菌素作用于抗性菌将其杀死,但对敏感菌无作用。

由此可见,弧菌对杀弧菌素的敏感性与对链霉素的敏感性相反,即对链霉素敏感的弧菌在有氧条件下对自身产生的杀弧菌素大多不敏感,而对链霉素耐药性的弧菌在有氧环境中生活时对杀弧菌素大多敏感,所以通常用耐链霉素的弧菌作为检测杀弧菌素试验的指示菌。

杀弧菌素作用的菌谱,杀弧菌素不仅能杀害古典型霍乱弧菌、埃尔托型霍乱弧菌及非O-1组弧菌,而且对肠杆菌科某些菌株也有作用。例如Farkas-Himsley 及 Seyfried^[11] 发现在8株大肠杆菌中有4株对杀弧菌素敏感;同时绿脓杆菌及荧光假单胞菌也对杀弧菌素敏感。Datta 及 Prescott^[14,17] 用一株对四环素耐药的古典霍乱弧菌小川型(NIHR41株)及另一株对链霉素具耐药性的古典霍乱弧菌稻叶型(NIHR35A₃)产生的两种杀弧菌素检测了对肠道菌科中各菌的抑菌作用,结果见表1。

(三) 杀弧菌素形态结构及理化特性

Farkas-Himsley 及 Seyfried^[10,11] 用电镜检查见杀弧菌素和其它种杀细菌素相似,均呈圆柱状颗粒;其颗粒不能通过孔径小于140 μm的滤膜。

Lang 等^[13]将杀霍乱弧菌素以磷钨酸负染色在电子显微镜下观察,发现杀弧菌素呈棒状颗粒,类似缺陷霍乱噬菌体,具有尾部结构,颗粒长短不一,长者1000 Å以上,可断裂成几个节片,各节片间距离400—1300 Å不等,每个颗

表 1 肠道杆菌对两种杀弧菌素的敏感性

试验菌株	菌株数	杀弧菌素抑制的菌株数		合计(株)
		NIHR ₄₁	NIHR _{35A₃}	
大肠杆菌	6	2	2	4
产气肠杆菌	4	1	3	4
克氏肺炎杆菌	2	0	1	1
阴沟杆菌	1	0	1	1
普通变形杆菌	2	1	2	2
福氏痢疾杆菌	4	1	2	3
鲍氏痢疾杆菌	3	0	2	2
志贺氏痢疾杆菌	1	1	0	1

粒具直径约200—250 Å的外鞘及100 Å直径的内心。有的外鞘较短,分成节片,似包有内芯,表明外鞘已部分降解。有些颗粒其内部呈空芯充满圆筒状小颗粒。

Jayawardene 及 Farkas-Himsley^[22] 用培养霍乱弧菌诱导释放的杀弧菌素,经超速离心浓缩并通过葡聚糖G-200凝胶过滤提纯,测定其对敏感指示菌的致死活性单位(Lu),后用磷钨酸负染色,在电子显微镜下发现有聚集的杆状颗粒,颗粒长约1,000 Å,有一外鞘(宽约240 Å)和一内芯(直径约90—100 Å,内芯中宽约45—50 Å),内芯空间含有某些可能是核酸物质。大多数颗粒呈收缩的杆状,也具有空芯或实体。作者^[22]对此观察了在产生杀弧菌素的霍乱弧菌。同时增殖的第IV组霍乱噬菌体其形态典型完整与杀弧菌素不同。

Farkas-Himsley^[11]对多株霍乱弧菌产生的杀弧菌素用电镜作了仔细的研究,发现杀弧菌素有伸长的鞘尾样结构,大小约1020×210 Å;收缩的外鞘宽约240 Å,长约450 Å;内芯直径约90 Å,长约1040 Å。此外还观察到在尾部的一端有清楚的形似颈部结构,在另一端有纤毛和附属物。因此认为它很像缺陷的霍乱噬菌体尾部。

Farkas-Himsley 和 Seyfried^[11] 用孔径22—360 μm的分级滤膜测定杀弧菌素的大小,证明孔径小于140 μm的滤膜能阻止杀弧菌素通过;用蔡氏石棉板过滤时,发现杀弧菌素易吸附于石棉板上,不能滤过。在用培养基铺盖平

板检测时,它能通过厚层琼脂并缓慢弥散。这些观察提示杀弧菌素有相当高的分子量,但分子量如何未见报告。

温度及 pH 对杀弧菌素的影响^[10,11], 56℃ 加热 3 小时或煮沸 1 分钟均不能破坏杀弧菌素,但煮沸 10 分钟(或以上),则使杀弧菌素失去作用。杀弧菌素在 pH 1.3—12.5 的范围内,于 30℃ 作用 30 分钟时,均不失去活性。在厌氧条件下弧菌于 8℃ 过夜时可诱生杀弧菌素较高的产量,用紫外线照射亦可促生杀弧菌素。

Jayawardene 及 Farkas-Himsley^[22] 对杀弧菌素的吸收光谱进行测定,部分纯化的杀弧菌素的最大生物活性存在于 260—280 μm 波长的吸收峰。纯化的杀弧菌素约 150000g 离心 6 小时后,其活性成分存在于沉淀物中,其中每毫克蛋白质杀弧菌素中含有 62.5×10^9 个致死单位(比活性为 62.5×10^9 Lu/mg, 它较粗制品提高 1000 倍)。

Farkas-Himsley 及 Seyfried (1965) 曾用梯度离心纯化杀弧菌素,其活性部分含有蛋白质及少量核酸,还可能有磷脂^[23],证明含有蛋白质,并推测它的化学成分免疫学性能可能与菌内毒素有关。

杀弧菌素对蛋白酶敏感,在 pH 8 和 37℃。下它可被 0.025% 胰蛋白酶水解。但不能排除可能有核酸;还发现杀弧菌素作用时敏感菌需有活跃的氧化磷酸化并合成蛋白质,才能发挥其致死作用^[22]。

(四) 弧菌的杀弧菌素分型方法及其实际意义

弧菌中杀弧菌素分型方法,一般用 Mitra 等^[23]改进的培养基及检测方法,可以得到满意的结果。培养基的处方及制备方法是: (1) 指示菌增殖培养基: 含 0.75% 蛋白胨“Difco”及 0.5% 氯化钠(分析纯),溶于蒸馏水中,调 pH 至 7.4—7.5, 灭菌使用。(2) 杀弧菌素分型培养基: 1.5% 胰蛋白酶消化的大豆汤(Difco)中含 1.5% 琼脂(Difco),经高压蒸气灭菌后,加入 0.5% 柠檬酸三钠, 0.5% K_2HPO_4 及 0.003% NH_4Cl , 用流通蒸汽灭菌 30 分钟,取 20 ml 倾

注于 80 mm 直径的培养皿内备用。

杀弧菌素分型检测方法: (1) 将待试菌 1 厘米宽划线,全皿长接种于分型培养基上。(2) 置于 37℃ 孵育 54 小时,使菌产生杀弧菌素,然后放入冰箱中冻 18 小时,促进细菌释放出杀弧菌素。(3) 刮取平皿上生长的菌苔,使之暴露于哥罗仿蒸汽 2 小时使弧菌灭活,空气中经 2 小时散发哥罗仿气体。(4) 取 8 株指示菌: 2 株福氏痢疾杆菌(#3189 及 #38), 一株大肠杆菌(Row), 4 株宋氏痢疾杆菌(#56, M2/2, #17 及 M56), 一株霍乱弧菌(#541) 等,在增殖培养基中生长物分别在培养基面上与已接种菌呈直角部位分别平行划线接种。(5) 培养于 37℃ 孵育 18 小时(必要时可延长后观察),根据在平皿培养基上原先接种待试菌部位及其两侧对某一指示菌株生长的抑制范围达 4、8、12 或 16mm 或以上者,分别判定结果(记以“+”至“++++”;显示狭小抑菌范围者记以“±”;“-”表明为耐性菌株)。

杀弧菌素分型: Chakrabarty 等^[24]采用一般检测法,根据缓慢拮抗试验,将 425 株 O-1 组霍乱弧菌分成 11 个杀弧菌素型,计 1A 型 82 株 (19.29%), 1B 型 41 株 (9.65%), 1C 型 5 株 (1.2%), 2A 型 68 株 (16.0%), 2B 型 34 株 (8.0%), 3 型 34 株 (8.0%), 4 型 17 株 (4.0%), 5 型 28 株 (6.58%), 6 型 10 株 (2.35%), 7 型 9 株 (2.1%), 8 型 9 株 (2.1%), 9—11 型为数少。另取 215 株非 O-1 群弧菌(NAG)用同法证明,亦可分成 10 个杀弧菌素型,计有 1A, 1B, 2B, 3—8 与 10 型,各型菌株数与霍乱弧菌各型菌数近似。Mitra 等^[23]用上述分型技术,根据待试弧菌产生的杀弧菌素对 8 株敏感指示菌的作用,检测了 O-1 组霍乱弧菌 743 株,发现 605 株可产生杀弧菌素,分别属于 Chakrabarty 等^[24]的 11 个杀弧菌素型和 6 个新型,对 293 株非 O-1 群不凝集弧菌,查出其中 285 株 (90.7%), 可分为 18 个杀弧菌型(包括 Chakrabarty 等的 10 个新型和新发现的 8 个型)。这两类弧菌产生的杀弧菌素型别,计有 1A、1B、1C、2A、2B、3—19 型,其中 13 个型在 O-1 及非 O-1 两

类弧菌中都有,但 O-1 组霍乱弧菌中未查出 15—19 型,非 O-1 群弧菌中未见有 7、8、11 及 14 型。

杀弧菌素分型的实际意义: Brandis^[14] 认为用杀弧菌素对霍乱弧菌分型,可为霍乱流行病学调查传染源提供一个工具,因为霍乱弧菌的血清学分型及噬菌体分型都有它的局限性,此两法只能分出少数几个型,而用杀弧菌素分型则能分辨出更多的型(目前已达 17 个型)。Mitra 等^[23]还证明 O-1 组霍乱弧菌及非 O-1 群弧菌的杀弧菌素型别都是稳定的,用于检测的指示菌也稳定,他们还发现当他们中有人不慎吞下霍乱弧菌引起轻度腹泻时,从感染者的粪便中分离出霍乱弧菌,用分型检测证明它仍保持原菌株的杀弧菌素型别;又发现不同杀弧菌素型别的双株霍乱弧菌通过家兔的迴肠结扎反复传代后也仍保持各自杀弧菌素型别(3 型与 6 型)。由此可见,弧菌的杀弧菌素分型在流行病学调查中有其优点,估计进一步作分型研究后,有可能发现更多的型别。

由于杀弧菌素是大多数弧菌属中的天然产物,它能否用于霍乱病的预防及治疗,以及它们与细菌的毒力和它们对机体免疫或发病有无关系,尚待深入研究。

(五) 结语

杀弧菌素是由弧菌产生的一种类似抗生素和噬菌体并具有独特性状的特殊杀菌物质,对同种以及某些异种菌有致死作用。它的成份主要是蛋白质;其颗粒长约 1000 Å,宽约 200—250 Å,对蛋白消化酶敏感;加热 56℃ 3 小时或煮沸 10 分钟,活性不被破坏;在 pH 1.3—12.5 的范围内,30℃ 作用 30 分钟后,均不灭活。

杀弧菌素用于霍乱弧菌的分型比血清学噬菌体分型优越,能将霍乱弧菌分成较多的型别

(现已有 17 个型),菌株性能稳定,因此,杀弧菌素分型用于流行病学调查可能是一个有力的工具。杀弧菌素能否用于预防和治疗尚待研究。

参 考 文 献

- [1] Amano, T. et al.: *J. Expl. Med.* 108: 731—752, 1958.
- [2] Ben-Gurion, R. and J. Hertzman, *J. Gen. Microbiol.* 19: 289—297, 1958.
- [3] Clowes, R. C.: *Nature*, 190: 988—989, 1961.
- [4] Holland, I. B.: *Biochem. J.* 78: 641—698, 1961.
- [5] Sait, J. L. et al.: *J. Bacteriol.* 161(3): 944—948, 1985.
- [6] Worsham, P. L. and J. Konisk, *J. Bacteriol.* 161 (1): 428—431, 1985.
- [7] Garcia-Quintana, H. G. et al.: *Can. J. Microbiol.* 29 (5): 471—475, 1983.
- [8] Rocout, J. Zentralbl: *Bak. Mik. Hyg.* 261(1): 12—18, 1986.
- [9] Farkas-Himsley, H. and P. I. Seyfried, *Nature*, 193: 1194—1195, 1962.
- [10] Farkas-Himsley, H. and P. I. Seyfried, *Can. J. Microbiol.* 9: 329—338, 1963.
- [11] Farkas-Himsley, H. and P. I. Seyfried, *ibid*, 9: 339—343, 1963.
- [12] Wahba, A. H.: *Bull WHO*, 33: 661—664, 1965.
- [13] Lang, D. et al.: *J. Bact.* 95(2): 708—709, 1968.
- [14] Brandis, H.: *Vibriocin typing*, in Bergan, T. and T. R. Norris (eds): *Method in Microbiology*, London: Academic press, 12: 117—126, 1978.
- [15] Farkas-Himsley, H. et al.: *Cytobios*, 3: 97—116, 1971.
- [16] Takeya, K. and S. Shimodori, *J. Bact.* 99(1): 339—340, 1969.
- [17] Datta, A. and L. M. Prescott, *J. Bact.* 98(2): 849—850, 1969.
- [18] Jaywarden, A. and H. Farkas-Himsley, *J. Bact.* 102 (2): 382—388, 1970.
- [19] Welsch, M.: *Bull WHO*, 6: 173—183, 1952.
- [20] Welsch, M.: *Compt. Rend. Soc. Biol. (Paris)*, 143: 1283—1284, 1949.
- [21] Linz, R.: *Compt. Soc. Biol. (Paris)*, 145: 146—148, 1951.
- [22] Jayawardene, A. and H. Farkas-Himsley, *Nature*, 219: 79—80, 1968.
- [23] Mitra, S. et al.: *Inf. Imm.* 30(1): 74—77, 1980.
- [24] Chakrabarty, A. N. et al.: *Inf. Imm.* 1: 293—299, 1970.