

产气荚膜梭菌 ϵ 毒素的研究进展

岳楠, 康琳, 李佳欣, 王菁, 高姗, 辛文文*, 王景林*

军事科学院军事医学研究院 微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全全国重点实验室, 北京 100071

岳楠, 康琳, 李佳欣, 王菁, 高姗, 辛文文, 王景林. 产气荚膜梭菌 ϵ 毒素的研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2289-2300.

YUE Nan, KANG Lin, LI Jiaxin, WANG Jing, GAO Shan, XIN Wenwen, WANG Jinglin. Research advance of *Clostridium perfringens* epsilon toxin[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2289-2300.

摘要: 产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*) ϵ 毒素(epsilon toxin, ETX)可导致牛羊等宿主动物的坏死性肠炎, 以及肺脏、肾脏和脑部等多器官的损伤, 导致感染动物的生产效能下降, 还因为毒性较强被列入生物战剂和生物恐怖剂清单。ETX 通过在靶细胞膜上形成孔道, 导致内容物的异常释放, 从而损伤细胞, 其中髓鞘和淋巴细胞蛋白(myelin and lymphocyte, MAL)是 ETX 发挥毒性效应的特异性受体。目前 ETX 的防治手段有限, 仅适用于动物的粗制疫苗, 适用于人类的疫苗仍在研发之中, 并且潜在治疗药物在探索中。近年来, 研究者在 ETX 的成孔机制、特异性受体、疫苗和治疗药物的研究方面取得了较多的进展。本文对上述几个方面进行综述, 旨在为 ETX 的进一步研究提供有价值的参考。

关键词: 产气荚膜梭菌 ϵ 毒素; 成孔毒素; 髓鞘和淋巴细胞蛋白; 疫苗

Research advance of *Clostridium perfringens* epsilon toxin

YUE Nan, KANG Lin, LI Jiaxin, WANG Jing, GAO Shan, XIN Wenwen*, WANG Jinglin*

State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: *Clostridium perfringens* epsilon toxin (ETX) can cause necrotic enteritis and injuries in the lungs, kidneys, and brain to the host animals such as cattle and sheep, affecting the development of animal husbandry. Due to its potent toxicity, ETX has been categorized as a biological warfare and bioterrorism agent. ETX damages the target cells by forming pores in the cell membrane, resulting in abnormal release of cell contents, during which myelin and lymphocyte (MAL) is a specific receptor for ETX to exert toxic effects. There are only crude ETX vaccines for use in

资助项目: 国家自然科学基金(31970127)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31970127).

*Corresponding authors. E-mail: XIN Wenwen, xinwenwen@bmi.ac.cn; WANG Jinglin, wangjlin@bmi.ac.cn

Received: 2023-10-16; Accepted: 2023-12-28; Published online: 2024-03-18

animals, while the vaccines for human application are still under development, and potential treatments are actively being explored. In recent years, researchers have achieved significant progress in understanding the pore-forming mechanism of ETX, identifying specific receptors, and developing vaccines and therapeutic drugs. This paper reviews the progress in the aforementioned aspects, aiming to offer valuable references for further ETX research.

Keywords: *Clostridium perfringens* epsilon toxin; pore-forming toxin; myelin and lymphocyte; vaccine

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)旧称魏氏梭菌(*Clostridium welchii*),是一种革兰氏阳性厌氧菌^[1]。该菌广泛分布于土壤、粪便及污水中^[2],并且在自然环境中能产生芽孢,具有极强的抗逆性。产气荚膜梭菌是人畜共患病致病菌,可以分为A-G共7种血清型,能够分泌至少17种外毒素^[3]。产气荚膜梭菌会使乳牛、绵羊、山羊出现腹泻症状,严重时甚至会导致动物宿主发生坏死性肠炎、肠毒血症及气性坏疽^[4]等疾病,每年给养殖业带来的经济损失高达数十亿美元^[5],严重制约了畜牧养殖业的健康发展。在日本,产气荚膜梭菌是排名第五的食源性致病菌,每年有20-40起该菌引起的食源性疾病的暴发^[6]。该菌也被我国国家卫生健康委员会列为食源性疾病致病菌监测对象之一。除此之外,该菌可以通过土壤或灰尘等介质污染蔬菜或生肉,患者食用被污染且未熟透的食物后,引起腹泻、肝肾损伤、胃肠紊乱等疾病^[7-8],甚至导致死亡。

产气荚膜梭菌 ϵ 毒素(epsilon toxin, ETX)是由产气荚膜梭菌B型和D型分泌的一种成孔毒素,也是目前发现毒力最强的产气荚膜梭菌毒素^[9-10],其毒性仅次于肉毒杆菌和破伤风梭菌神经毒素^[11-12]。在战争中ETX可被雾化以产生急性肺水肿^[13],被美国疾病控制和预防中心(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)列为潜在的生物恐怖剂或生物战剂。ETX的天然蛋白和带荧光标签的融合蛋白已实现在实验室的成熟表达及纯化,并且广泛应用于ETX

的相关研究中^[14-16]。随着研究的深入,近年来研究者在ETX的很多方面都取得了重要进展。目前已基本确定ETX的结构和活性,以及它在细胞膜上形成孔的简单过程和特异性受体;ETX除了能造成肺脏和肾脏的损伤外,还能造成人红细胞溶血和神经系统的损伤;在ETX的防治研究中,多种免疫原性强的突变体可以作为候选疫苗,一些潜在的治疗药物也被发现。本文将从ETX的成孔机制、机体的损伤、疫苗和治疗药物的研究进展等方面进行综述,以期为ETX引起的损伤机制、预防及治疗提供参考和研究方向。

1 ETX的结构与成孔机制

ETX是由产气荚膜梭菌分泌的成孔毒素,分子量为32-33 kDa^[17],由3个基本的结构域组成(图1)。毒素开始为前体形式,或称原毒素,需被蛋白酶(特别是 α -胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和 λ -蛋白酶)去除11N端(或13N端)和第29个C端残基氨基酸,将无活性原毒素(proETX)转化为完全活性形式,接着活化的毒素去除羧基末端肽(carboxyl terminal peptide, CTP)^[12,18],然后在靶细胞膜上先形成一个低聚复合物再形成孔,引起内容物的释放和离子不受调节的跨膜运动,最终导致细胞的死亡和器官损伤(过程结构图如图2所示)。小窝蛋白1(caveolin-1, CAV1)和小窝蛋白2(caveolin-2, CAV2)是ETX在敏感细胞质膜上形成低聚复合物的关键^[19]。Jiang等^[20-21]研究

发现,当去除 ETX 第 3 结构域中第 71 位点处的芳香族氨基酸后,ETX 在小鼠体内失去了致死性,说明该氨基酸是 ETX 在体内毒性的决定因素。除此之外,ETX 分子结构的 C 端负责完成毒素的活化,并对其在膜内的七聚体化至关重要^[12]。犬的肾上皮细胞(madin-darby canine kidney, MDCK)对 ETX 敏感,因此该细胞被广泛应用于 ETX 的研究中。ETX 首先会在 MDCK 细胞膜上形成一个巨大的七聚体复合物(约 155 kDa)的预孔,之后伴随着细胞内 K^+ 的外流、 Na^+ 和 Ca^{2+} 的内流^[22-23],破坏了细胞膜内外渗透压的平衡,最终导致 MDCK 细胞的肿胀、起泡和裂解^[24]。在这里值得注意的是,形成跨膜孔的两亲性 β 发夹环中 β 链中心位置的残基控制通道的大小和离子选择性^[25]。除了 MDCK 细胞系外,ETX 还对一些上皮细胞和内皮细胞敏感。这些细胞都有一个共同的特性,即细胞膜上都含有髓鞘和淋巴细胞蛋白(myelin and lymphocyte, MAL)^[10],这是 ETX 的活化所必需的。一项研究证明了这一观点,即在正常 ETX 敏感细胞系中 MAL 表达

的缺失消除了 ETX 结合和细胞毒性^[11]。

然而,ETX 在不同脂质环境中形成孔的机制是复杂的,同时形成的孔也不对称^[26]。ETX 上的酪氨酸 43 (Y43)被确定是 ETX 与 MDCK 细胞结合的关键残基^[27],但是 Y43 在 ETX 与人细胞的结合中不起作用;而 Y42 对 CHO-hMAL (表达人 MAL 的 CHO 细胞)与 ETX 的结合至关重要;ETX 突变体 H162A 无法裂解 CHO-hMAL 细胞,反而可以裂解 hRBC,同时能够在合成双层中形成孔。这表明 ETX 受体结合域中的表面暴露酪氨酸残基以物种特异性方式影响 ETX 与表达 MAL 的细胞结合的效率^[28],也说明了对 ETX 结合很重要的氨基酸在不同物种之间有所不同^[29-30]。Ji 等^[31]近期利用原位原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)辅以分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟,将 ETX 在人红细胞表面成孔的过程可视化,发现孔分两个阶段形成:ETX 单体首先附着在膜上并在非特殊条件下形成预孔,然后在受体存在的情况下在高于临界温度下发生构象变化以形成跨膜孔。

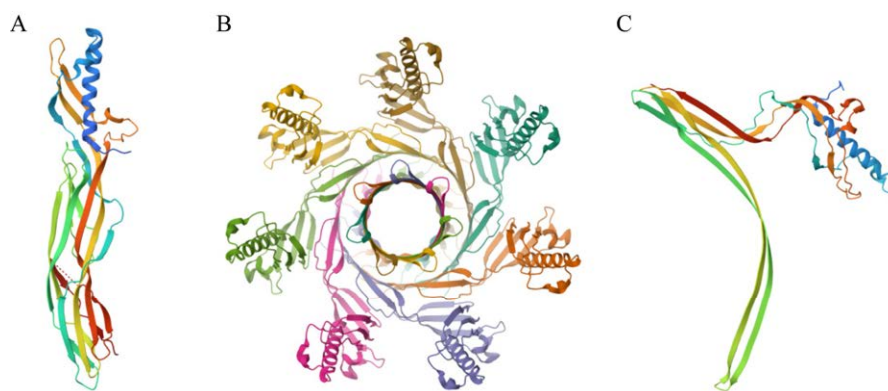


图 1 ETX 在细胞膜上形成孔之前和之后的结构 A: 单体 ETX 原毒素的示意图(PDB ID: 1UYJ); B: ETX 形成七聚体复合物的结构图(PDB ID: 6RB9). C: 七聚体孔隙结构中 A 链结构示意图(PDB ID: 6RB9-1). 其中,受体结合域为蓝色; β 发夹域为绿色(深绿、浅绿);帽域为橙、红色

Figure 1 ETX structures before and after pore formation in the target cell membrane. A: Schematic representation of the monomeric ETX protoxin (PDB ID: 1UYJ). B: Structural diagram of the heptamer complex formed by ETX (PDB ID: 6RB9). C: Schematic representation of the A-chain structure in the heptamer pore structure (PDB ID: 6RB9-1). The receptor binding domain is blue; The β -hairpin domain is green; The cap domain is shown in orange and red.

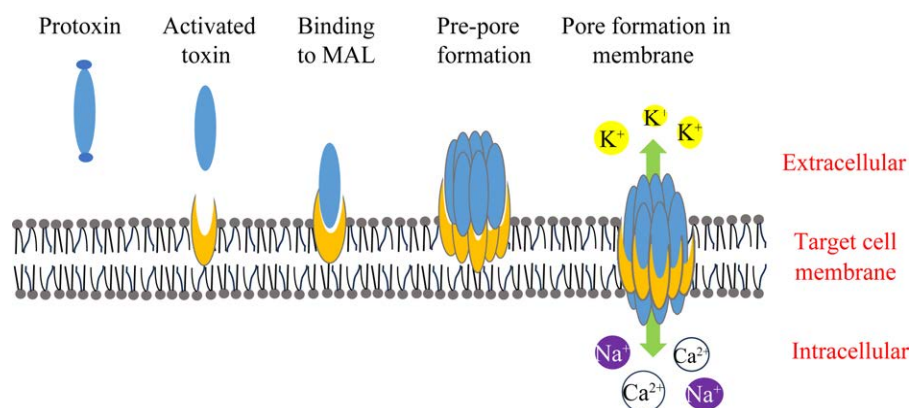


图 2 ETX 的孔形成过程模式图 原毒素通过去除 N 端和 C 端肽被激活, 活化的毒素与靶细胞上的 MAL 受体(以黄色显示)结合. 接着, 毒素的 7 个单体组装成一个预孔, 然后在插入膜时经历构象变化, 孔允许阳离子在膜上不受调节地运动(绿色箭头), 最终导致细胞死亡

Figure 2 Diagram of the pore formation process pattern of ETX. The prototoxin is activated by removal of the N-and C-terminal peptides, and the activated toxin binds to the MAL receptor, shown in yellow, on the target cell. Next, the seven monomers of the toxin assemble into a pre pore, which then undergoes a conformational change upon insertion into the membrane, and the pore allows the unregulated movement of cations across the membrane (green arrows), ultimately leading to cell death.

2 ETX 引起多种损伤和疾病

ETX 对动物展现出极强的致死毒性。有报道称 ETX 对小鼠的半数致死量为 65–110 ng/kg^[9,18,32]。ETX 被认为是导致动物发生快速致死性肠炎和肠毒血症的重要原因^[33]。在体内, ETX 可以被肠道吸收, 但是不能被胃吸收^[34], 并在局部引起毒性反应, 而后引发身体多器官的病变。当毒素积累到一定程度, 会引发多器官水肿、充血, 从而导致动物死亡^[35-36]。ETX 与肾脏系统特异性结合, 引发肾脏系统的损伤^[37]。例如, 在患有肠毒血症的绵羊中发现了毒素在肾脏中的损伤和积累^[38], 但是 ETX 在肾脏中的病理机制尚不明确^[39]。已经有研究证实了 ETX 对人肾小管上皮细胞(human renal tubular epithelial cell, HRTEC)具有细胞毒性, HRTEC 与 ETX 的共孵育以剂量和时间依赖性的方式降低了细胞活力^[40]。除此之外, ETX 还会损伤微血管系统和内皮细胞, 导致肺脏的损伤。研究者发现了一

种肺内皮细胞系——1G11 对 ETX 高度敏感^[41], ETX 会与该细胞特异性结合并在细胞膜上形成孔道, 另外也确定了 MAL 蛋白在小鼠肺内皮细胞上的存在。这些有助于阐明 ETX 在肺脏损伤中的分子机制。在感染了 ETX 的大鼠体内还发现脑损伤和视网膜微血管的损伤^[42]。曾经也出现过 ETX 导致人中毒的报道^[36]。

还有部分研究表明, ETX 可以作用于红细胞表面的嘌呤能受体 P2X7 和 P2Y13, 导致人红细胞溶血。值得注意的是, 这样的溶血现象仅在人类的红细胞中出现, 在山羊、小鼠等动物中却并不存在^[43]。Geng 等^[44]的进一步研究证明, ETX 介导的溶血与人红细胞中的 MAL 受体活化有关, 这与人类红细胞表达 MAL, 但其他动物的红细胞不表达的发现一致。Shokrzadeh 等^[45]还研究了 ETX 对人血液中淋巴细胞的细胞毒性, 发现当 ETX 浓度高于 25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 它对人淋巴细胞具有明显的氧化应激作用, 并且这种细菌毒素显著增加了淋巴细胞中形成的微核数量, 说明

ETX 具有遗传毒性, 会干扰细胞分裂过程。

ETX 对神经系统也能产生影响, 引起脑损伤和一些神经系统的疾病。研究者发现 ETX 引起肠毒血症的动物同时也表现出神经系统损伤。例如, 动物在中毒后发生的角弓反张和低张力是锥体外运动的症状, 表明参与身体姿势和运动的中枢结构(如壳核、丘脑和尾状核等)受损, 或连接这些结构的连接束改变^[46]。腹泻和里急后重是 ETX 对肠道作用的临床体征, 可能是 ETX 对肠道神经系统作用的结果^[47]。事实上, 越来越多的证据表明, 一些肠毒素不仅直接作用于肠细胞, 而且还会通过干扰肠道神经系统来介导腹泻^[48]。Dorca-Arévalo 等^[49]观察到 ETX 与神经系统中髓磷脂结构特异性结合, 而这种结合主要与髓磷脂的蛋白质结构有关, 这为 ETX 作用于哺乳动物的神经系统提供了有力的数据支持。在 Cases 等^[50]的研究中, 证明了 ETX 可以导致小鼠视神经释放 ATP, 而这些视神经由从中枢神经系统延伸的髓鞘纤维组成。Morris 等^[51]通过组织学分析, 证明了 ETX 可以引起大鼠和小鼠的海马体、纹状体和下丘脑神经元的退行性变化, 并且在具有神经丝和脱髓鞘的轴突中观察到坏死神经元和凋亡细胞, 这表明 ETX 可以对神经元或神经胶质细胞产生损伤。另外有研究报道, ETX 可以导致成熟少突胶质细胞选择性死亡, 说明 ETX 的敏感性受到发育调节; ETX 诱导中枢神经系统脱髓鞘, 并且依赖于 MAL 的表达, 但是不会攻击神经元、新胶质细胞和小胶质细胞等其他神经元件; 同时发现 ETX 的中和抗体可以抑制少突胶质细胞的死亡和脱髓鞘^[52]。与传统的孔形成形式不同的是, ETX 作用于少突胶质细胞是通过一种受体介导的途径, 并不依赖于孔的形成^[53]。另有研究证实, ETX 还可以靶向小鼠小脑的颗粒细胞并促进 Ca^{2+} 升高和谷氨酸释放^[54]。小鼠静脉注射 ETX 后, 在中枢神经系统(central

nervous system, CNS)的微脉管系统中观察到强大的 ETX 结合, 但在周围的其他脉管结构中未观察到结合, 表明 ETX 特异性靶向 CNS 内皮细胞^[55]。以上这些研究为 ETX 作用于中枢神经系统的机制提供了更全面的见解, 但是仍需进一步探索。

3 MAL 是 ETX 活化的关键受体

MAL 是高度疏水的跨膜脂蛋白, 是 ETX 与靶细胞结合和激活的必要条件^[56]。MAL 在极化的上皮细胞^[57]、少突胶质细胞^[58]和人 T 淋巴细胞^[59]表面都有存在, 说明多种免疫细胞是 ETX 在生物体内引发炎症反应的关键靶细胞。最近, 有研究证明 ETX 可以结合并杀死表达 MAL 的 T 细胞谱系的癌细胞系, 但不能杀死不表达 MAL 的 B 细胞谱系的癌细胞系, 更加说明了 MAL 在 ETX 活化中的关键地位, 也说明了 ETX 可以作为区分淋巴细胞系的工具^[11]。多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)是一种免疫介导的人类中枢神经系统疾病。最近有研究在 MS 患者的血清中检测到了对抗 ETX 的抗体, 怀疑 ETX 可能与人的多发性硬化症有关, Titball 等^[60]进一步研究发现, ETX 可以与人的 MAL 受体结合, 破坏血脑屏障并表达 MAL 的脑细胞, 这说明 ETX 在 MS 中起到了一定的作用。在 Shetty 等^[61]的研究中, 首次证明了人类原代细胞对 ETX 结合和诱导的细胞死亡敏感, 并与 CD4⁺, CD8⁺和 CD19⁺淋巴细胞中的 MAL 基因表达呈正相关。这项研究也支持了 MAL 是 ETX 的受体这一假设。ETX 对大鼠甲状腺细胞(fisher ratthyroid cell, FRT)产生细胞毒性时并不会在细胞膜表面形成质膜微囊^[62], 证明了质膜微囊蛋白与 ETX 的毒性并无直接的关系, 支持 MAL 蛋白参与 ETX 作用的观点。Adler 等^[63]将斑马鱼的内皮细胞(endothelial cell, EC)设计成表达人类 MAL

(human MAL, hMAL)后,发现 ETX 可以引起血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性增加,上述证据共同说明 MAL 是 ETX 受体。

4 ETX 疫苗的研究现状

关于 ETX 疫苗的研究一直是人们关注的问题。比起中毒后的救治,为高危人群接种相应的疫苗才是更有效的防御措施。目前,尚未研制出关于 ETX 的人类疫苗,但是应用于动物的疫苗可能为人类疫苗的研发提供依据。然而,动物疫苗对牲畜的保护力也是有限的,接种多价商业梭菌疫苗的牛体内中和抗体在接种后一年内消失^[64],因此需要多次加强接种才能起到有效的保护,耗费大量的人力物力。尽管在未接种过任何梭菌疫苗的山羊体内分离到过天然的 ETX 抗体,但是其产生的具体机制仍不清楚^[65]。在畜牧业中,ETX 可以导致动物的肠毒血症,给畜牧养殖带来了巨大的损失,因此很多动物都接种了粗制的类毒素疫苗^[66]。粗制的动物疫苗一般都使用氢氧化铝作为佐剂,也有人尝试使用脂质体提高疫苗的免疫效价但并未成功^[67]。Santos 等^[68]发现,母羊在接种氢氧化铝佐剂的 ETX 疫苗 5 d 内口服补充东京芽孢杆菌(*Bacillus toyonensis*) BCT-7112T 后,其体内的中和抗体滴度高于未补充母羊($P<0.05$),且血清总 IgG 水平较对照组相比升高 3.2 倍,说明菌株 BCT-7112T 可以改善母羊体内重组 ETX 疫苗引起的体液免疫,菌株 BCT-7112T 也可以作为一种免疫调节剂使用。

近年来,人们对 ETX 的疫苗研制大都集中在突变体上,在测试的 10 余个突变体中,H106P 突变体对 MDCK 细胞完全无毒性,静脉注射入小鼠体内也不会产生毒性反应^[69-70]。因此,引入突变体或者氨基酸的修饰也无疑是 ETX 疫苗研制的一种思路。Bokori-Brown 等^[71]在 2014 年的

研究中,用丙氨酸替代 Y30 和 Y196 产生了稳定的 ETX 突变体(Y30A-Y196A),极大地降低了 ETX 对 MDCK 细胞的细胞毒性。杜吉革等在 ETX 中同时引入包括第 30 和 196 位酪氨酸突变为丙氨酸,及第 106 位组氨酸突变为脯氨酸共 3 个氨基酸突变,使 ETX 的毒力基本消失,并且保留了良好的免疫原性,使该突变体成为理想候选抗原蛋白^[72]。此外,在兔体培养的针对 Y30A-Y196A 的多克隆抗体在体外中和测定中提供了对野生型毒素的保护,证明了 Y30A-Y196A 突变体可能构成针对肠毒血症的改进重组疫苗的基础^[73]。后来,Morecette 等^[29]发现,Y30A-Y196A 突变体虽然能降低 ETX 对 MDCK 细胞的毒性,但是对中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cell, CHO)的毒性并未显著降低,于是他们对该突变体的另一个受体结合位点加以突变,构建出 Y30A-Y196A-A168F 突变体,与先前的突变体相比,它对 MDCK 细胞的毒性降低至原来的三分之一,对小鼠的毒性降低为原来的四分之一,对表达绵羊 MAL 的 CHO 细胞的毒性至少降低至原来的二百分之一;用 Y30A-Y196A-A168F 对兔子或绵羊进行免疫接种,诱导了高水平的 ETX 中和抗体,这种抗体持续了至少 1 年,该突变体是 ETX 的更适候选疫苗。Singh 等^[74]开发了一种具有免疫显性 B 细胞表位和通用 T 细胞表位的基于 ETX 的嵌合表位构建体,并在小鼠和兔中评估其免疫原性,这项研究中的嵌合蛋白可以作为候选疫苗的潜在应用。Pilehchian 等^[75]将产气荚膜梭菌 ϵ - β 融合毒素在大肠杆菌中表达为可溶性蛋白,重组细胞裂解物用于小鼠免疫,可以分别在兔体内诱导产生 ϵ 和 β 抗毒素,从而证明了大肠杆菌是产气荚膜梭菌免疫原性 ϵ - β 融合毒素的合适表达宿主。Kang 等^[76]发现 F199E 取代通过剥夺 ETX 的受体结合能力来降低毒性,表明突变 rETX^{F199E} 是

一种很好的候选疫苗。

使用表面表达 H151P 的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)-ETX 肠胃外疫苗接种的小鼠能够引发强烈的体液免疫反应,而口服免疫的小鼠产生 IgG 的抗体滴度显著高于肠胃外接种组^[77]。因此,干酪乳杆菌-ETX 可被视为 ETX 中毒和肠毒血症的口服候选疫苗。此外,腐败梭菌 α 毒素(*Clostridium septicum* alpha toxin, CSA)也是一种致死性和坏死性毒素, Du 等^[78]合成了一种二价嵌合蛋白 rETXm3CSAm4/TMD 可以有效地保护小鼠免受 ETX 和 CSA 的攻击,并且不具有细胞毒性,是一种 ETX 和 CSA 的潜在亚单位候选疫苗,国内的一项相似的研究也得到了良好的免疫效果^[79-80]。

5 ETX 治疗药物的研究现状

针对 ETX 的治疗药物研究也取得了重要进展。研究者使用本氏烟草产生的中和单克隆抗体 (c4D7) 可以有效地预防 ETX 中毒,并且在 ETX 中毒后 15–30 min 给药时也能提供保护和治疗作用^[81]。Geng 等^[44]的研究表明,影响局部 MAL 介导的自分泌和旁分泌信号传导的干预措施可能会预防 ETX 介导的红细胞损伤。有研究发现了糖苷-4 通过破坏寡聚化、阻断孔形成、恢复钙稳态和稳定线粒体膜,有效阻断 ETX 处理过的原代细胞的细胞死亡并维持细胞稳态,而且单剂量的糖苷-4 保护了 ETX 攻击的小鼠并恢复了多个器官的正常功能^[82]; 人们使用蛋白酶或阻断糖基化成功阻断了 ETX 与大鼠大脑和小鼠肾脏的结合^[37,83], 这些无疑为 ETX 的救治带来了新的福音。

一些抑制剂也可以显著抑制 ETX 产生的毒性作用。Lewis 等^[84]筛选到了 N-环烷基苯甲酰胺 (N-cycloalkylbenzamide) 和 呋喃 [2,3-b] 喹啉 (furo[2,3-b]quinoline), 这 2 种化合物虽然都不会

抑制 ETX 与 MDCK 细胞结合的能力,但是却可以降低 ETX 的毒性,抑制 MDCK 细胞的死亡,这为 ETX 的救治提供新策略。Huang 等^[85]发现 zaragozic acid (ZA) 显著破坏了 ETX 在 MDCK 细胞中形成孔或低聚物的能力; 此外, ZA 减少了磷脂酰丝氨酸在质膜上的暴露,增加了细胞的 Ca^{2+} 内流; 并且 ZA 在小鼠体内对 ETX 的攻击具有显著的保护作用,表明 ZA 是预防和治疗 ETX 引起疾病的潜在候选药物。

6 展望

ETX 是一种潜在的生物战剂和生物恐怖剂,同时它会导致动物的肠毒血症、肝肾损伤等疾病,严重威胁人和动物的生命健康安全,损害牧民的经济利益。由于其毒力极强、危害范围广,受到世界各国的持续关注和研究。目前虽然尚无应用于人体的 ETX 疫苗和治疗药物的出现,但是随着研究的深入,对 ETX 的致病机理的认识也越来越清晰,并且随着各种有效的抑制剂、突变体等治疗候选品的发现,让我们离研制出 ETX 的救治方法和药物的目标越来越近。

有研究^[85]表明,当以一定浓度的 ETX 注射小鼠后,小鼠血液里的白细胞数、单核细胞数、单核细胞比和中性粒细胞比等都极显著升高,说明 ETX 可以导致机体的炎性反应,并导致免疫激活,但是其具体的防御机制仍不清楚。因此,关于 ETX 的致病机理和炎性反应机制等方面的问题还需要科研工作者的持续研究,争取早日研制出能有效保障人类安全健康的 ETX “防御武器”。

REFERENCES

- [1] PETIT L, GIBERT M, POPOFF MR. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype[J]. Trends in Microbiol, 1999, 7(3): 104-110.
- [2] DOLAN GP, FOSTER K, LAWLER J, AMAR C,

- SWIFT C, AIRD H, GORTON R. An epidemiological review of gastrointestinal outbreaks associated with *Clostridium perfringens*, North East of England, 2012-2014[J]. *Epidemiology and Infection*, 2016, 144(7): 1386-1393.
- [3] ROOD JI, ADAMS V, LACEY J, LYRAS D, McCLANE BA, MELVILLE SB, MOORE RJ, POPOFF MR, SARKER MR, SONGER JG, UZAL FA, van IMMERSEEL F. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme[J]. *Anaerobe*, 2018, 53: 5-10.
- [4] LI GX, LILLEHOJ HS, LEE KW, JANG SI, MARC P, GAY CG, RITTER GD, BAUTISTA DA, PHILLIPS K, NEUMANN AP, REHBERGER TG, SIRAGUSA GR. An outbreak of gangrenous dermatitis in commercial broiler chickens[J]. *Avian Pathology*, 2010, 39(4): 247-253.
- [5] MWANGI S, TIMMONS J, FITZ-COY S, PARVEEN S. Characterization of *Clostridium perfringens* recovered from broiler chicken affected by necrotic enteritis[J]. *Poultry Science*, 2019, 98(1): 128-135.
- [6] KOMATSU H, INUI A, SOGO T, FUJISAWA T. *Clostridium perfringens*[J]. *Nihon Rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine*, 2012, 70(8): 1357-1361.
- [7] LINDSTRÖM M, HEIKINHEIMO A, LAHTI P, KORKEALA H. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning[J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(2): 192-198.
- [8] LAW ST, LEE MK. A middle-aged lady with a pyogenic liver abscess caused by *Clostridium perfringens*[J]. *World Journal of Hepatology*, 2012, 4(8): 252-255.
- [9] ALVES GG, MACHADO de ÁVILA RA, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI CD, LOBATO FCF. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: the third most potent bacterial toxin known[J]. *Anaerobe*, 2014, 30: 102-107.
- [10] RUMAH KR, MA YH, LINDEN JR, OO ML, ANRATHER J, SCHAEREN-WIEMERS N, ALONSO MA, FISCHETTI VA, McCLAIN MS, VARTANIAN T. The myelin and lymphocyte protein MAL is required for binding and activity of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(5): e1004896.
- [11] BLANCH M, DORCA-ARÉVALO J, NOT A, CASES M, GÓMEZ de ARANDA I, MARTÍNEZ-YÉLAMOS A, MARTÍNEZ-YÉLAMOS S, SOLSONA C, BLASI J. The cytotoxicity of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* on lymphocytes is mediated by MAL protein expression[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2018, 38(19): e00086-18.
- [12] MIYATA S, MATSUSHITA O, MINAMI J, KATAYAMA S, SHIMAMOTO S, OKABE A. Cleavage of a C-terminal peptide is essential for heptamerization of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the synaptosomal membrane[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(17): 13778-13783.
- [13] GREENFIELD RA, BROWN BR, HUTCHINS JB, IANDOLO JJ, JACKSON R, SLATER LN, BRONZE MS. Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism[J]. *The American Journal of the Medical Sciences*, 2002, 323(6): 326-340.
- [14] 王武斌, 崔洁文, 曹小安, 高鹏程, 马清龙, 李学瑞, 储岳峰. 产气荚膜梭菌 ϵ 毒素蛋白的原核表达及其抗体间接 ELISA 方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2023, 53(4): 426-433.
- WANG WB, CUI JW, CAO XA, GAO PC, MA QL, LI XR, CHU YF. Prokaryotic expression of ϵ toxin protein of *Clostridium perfringens* and establishment of an indirect ELISA method for detection of ϵ toxin antibody[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2023, 53(4): 426-433 (in Chinese).
- [15] 郭子槲, 吕若梅, 黄静, 柳婷婷, 陈铭, 康琳, 王景林, 辛文文. 带荧光标签的产气荚膜梭菌 ϵ 毒素融合蛋白纯化及特性鉴定[J]. *军事医学*, 2022, 46(10): 744-748.
- GUO ZS, LÜ RM, HUANG J, LIU TT, CHEN M, KANG L, WANG JL, XIN WW. Purification and characterization of fluorescently labelled *Clostridium perfringens* ϵ toxin fusion protein[J]. *Military Medical Sciences*, 2022, 46(10): 744-748 (in Chinese).
- [16] 朱真, 杜吉革, 薛麒, 李启红, 印春生, 张莹辉, 李倩琳, 姚文生, 陈小云. 产气荚膜梭菌 ϵ 毒素重组突变体大肠杆菌表达条件的优化[J]. *中国兽药杂志*, 2021, 55(6): 8-14.
- ZHU Z, DU JG, XUE Q, LI QH, YIN CS, ZHANG YH, LI QL, YAO WS, CHEN XY. Optimization of expression conditions for recombinant mutants of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin in *E. coli*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2021, 55(6): 8-14 (in Chinese).
- [17] McDONEL JL. *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E)[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 1980, 10(3): 617-655.
- [18] MINAMI J, KATAYAMA S, MATSUSHITA O, MATSUSHITA C, OKABE A. Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides[J]. *Microbiology and Immunology*, 1997, 41(7): 527-535.
- [19] FENNESSEY CM, SHENG JS, RUBIN DH, McCLAIN

- MS. Oligomerization of *Clostridium perfringens* epsilon toxin is dependent upon caveolins 1 and 2[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46866.
- [20] JIANG ZG, CHANG JT, WANG F, QI YL, LI YX, YU DB, YU L. Etx-Y71A as a non-toxic mutant of *Clostridium perfringens* epsilon toxin induces protective immunity in mice and sheep[J]. Vaccine, 2020, 38(42): 6553-6561.
- [21] 姜志刚. 产气荚膜梭菌 ϵ 毒素 Domain III 功能性氨基酸的鉴定及减毒突变体免疫保护性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- JIANG ZG. Identification of functional amino acids of *Clostridium Perfringens* epsilon toxin Domain III and immunoprotection of non-toxic mutants[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020 (in Chinese).
- [22] PETIT L, MAIER E, GIBERT M, POPOFF MR, BENZ R. *Clostridium perfringens* epsilon toxin induces a rapid change of cell membrane permeability to ions and forms channels in artificial lipid bilayers[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(19): 15736-15740.
- [23] NAGAHAMA M, OCHI S, SAKURAI J. Assembly of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin on MDCK cell membrane[J]. Journal of Natural Toxins, 1998, 7(3): 291-302.
- [24] PETIT L, GIBERT M, GILLET D, LAURENT-WINTER C, BOQUET P, POPOFF MR. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(20): 6480-6487.
- [25] KNAPP O, MAIER E, PISELLI C, BENZ R, HOXHA C, POPOFF MR. Central residues of the amphipathic β -hairpin loop control the properties of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin channel[J]. Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes, 2020, 1862(9): 183364.
- [26] NESTOROVICH EM, KARGINOV VA, BEZRUKOV SM. Polymer partitioning and ion selectivity suggest asymmetrical shape for the membrane pore formed by epsilon toxin[J]. Biophysical Journal, 2010, 99(3): 782-789.
- [27] BOKORI-BROWN M, KOKKINIDOU MC, SAVVA CG, da FERNANDES COSTA S, NAYLOR CE, COLE AR, MOSS DS, BASAK AK, TITBALL RW. *Clostridium perfringens* epsilon toxin H149A mutant as a platform for receptor binding studies[J]. Protein Science: a Publication of the Protein Society, 2013, 22(5): 650-659.
- [28] MARSHALL S, MCGILL B, MORCLETTE H, WINLOVE CP, CHIMEREL C, PETROV PG, BOKORI-BROWN M. Interaction of *Clostridium perfringens* epsilon toxin with the plasma membrane: the role of amino acids Y42, Y43 and H162[J]. Toxins, 2022, 14(11): 757.
- [29] MORCLETTE H, BOKORI-BROWN M, ONG S, BENNETT L, WREN BW, LEWIS N, TITBALL RW. *Clostridium perfringens* epsilon toxin vaccine candidate lacking toxicity to cells expressing myelin and lymphocyte protein[J]. NPJ Vaccines, 2019, 4: 32.
- [30] ALONSO MA, WEISSMAN SM. cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84(7): 1997-2001.
- [31] JI B, HUANG JX, ZOU KX, LIU MJ, PEI YF, HUANG J, WANG Y, WANG JL, ZHOU RH, XIN WW, SONG J. Direct visualization of the dynamic process of epsilon toxin on hemolysis[J]. Small Methods, 2023, 7(7): e2300028.
- [32] LI Q, XIN WW, GAO S, KANG L, WANG JL. A low-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin as a potential candidate vaccine against enterotoxemia[J]. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2013, 9(11): 2386-2392.
- [33] UZAL FA, KELLY WR, MORRIS WE, BERMUDEZ J, BAISÓN M. The pathology of peracute experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in sheep[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 2004, 16(5): 403-411.
- [34] LOSADA-EATON DM, UZAL FA, FERNÁNDEZ MIYAKAWA ME. *Clostridium perfringens* epsilon toxin is absorbed from different intestinal segments of mice[J]. Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology, 2008, 51(7): 1207-1213.
- [35] CHASSIN C, BENS M, de BARRY J, COURJARET R, BOSSU JL, CLUZEAUD F, BEN MKADDEM S, GIBERT M, POULAIN B, POPOFF MR, VANDEWALLE A. Pore-forming epsilon toxin causes membrane permeabilization and rapid ATP depletion-mediated cell death in renal collecting duct cells[J]. American Journal of Physiology Renal Physiology, 2007, 293(3): F927-F937.
- [36] MANTIS NJ. Vaccines against the category B toxins: staphylococcal enterotoxin B, epsilon toxin and ricin[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005, 57(9): 1424-1439.
- [37] DORCA-ARÉVALO J, MARTÍN-SATUÉ M, BLASI J.

- Characterization of the high affinity binding of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* to the renal system[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 157(1/2): 179-189.
- [38] GARCIA JP, ADAMS V, BEINGESSER J, HUGHES ML, POON R, LYRAS D, HILL A, McCLANE BA, ROOD JI, UZAL FA. Epsilon toxin is essential for the virulence of *Clostridium perfringens* type D infection in sheep, goats, and mice[J]. Infection and Immunity, 2013, 81(7): 2405-2414.
- [39] GIANNITTI F, GARCÍA JP, ADAMS V, ARMENDANO JI, BEINGESSER J, ROOD JI, UZAL FA. Experimental acute *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in sheep is not characterized by specific renal lesions[J]. Veterinary Pathology, 2023, 60(4): 412-419.
- [40] FERNANDEZ MIYAKAWA ME, ZABAL O, SILBERSTEIN C. *Clostridium perfringens* epsilon toxin is cytotoxic for human renal tubular epithelial cells[J]. Human & Experimental Toxicology, 2011, 30(4): 275-282.
- [41] DORCA-ARÉVALO J, DORCA E, TORREJÓN-ESCRIBANO B, BLANCH M, MARTÍN-SATUÉ M, BLASI J. Lung endothelial cells are sensitive to epsilon toxin from *Clostridium perfringens*[J]. Veterinary Research, 2020, 51(1): 27.
- [42] FINNIE JW, MANAVIS J, CASSON RJ, CHIDLOW G. Retinal microvascular damage and vasogenic edema produced by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in rats[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 2014, 26(3): 470-472.
- [43] GAO J, XIN WW, HUANG J, JI B, GAO S, CHEN L, KANG L, YANG H, SHEN X, ZHAO BH, WANG JL. Research article hemolysis in human erythrocytes by *Clostridium perfringens* epsilon toxin requires activation of P2 receptors[J]. Virulence, 2018, 9(1): 1601-1614.
- [44] GENG ZJ, HUANG J, KANG L, GAO S, YUAN Y, LI YW, WANG J, XIN WW, WANG JL. *Clostridium perfringens* epsilon toxin binds to erythrocyte MAL receptors and triggers phosphatidylserine exposure[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020, 24(13): 7341-7352.
- [45] SHOKRZADEH M, ZEYAR A, GOLMOHAMMADI R, MOUSAVI SH, MIRHOSSEINI SA. Investigation of genetic toxicity and oxidative stress of *Clostridium perfringens* epsilon toxin type D on human peripheral blood lymphocytes[J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 156: 104820.
- [46] GARCIA JP, GIANNITTI F, FINNIE JW, MANAVIS J, BEINGESSER J, ADAMS V, ROOD JI, UZAL FA. Comparative neuropathology of ovine enterotoxemia produced by *Clostridium perfringens* type D wild-type strain CN1020 and its genetically modified derivatives[J]. Veterinary Pathology, 2015, 52(3): 465-475.
- [47] FINNIE JW, UZAL FA. Pathology and pathogenesis of brain lesions produced by *Clostridium perfringens* type D Epsilon toxin[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(16): 9050.
- [48] BERKES J, VISWANATHAN VK, SAVKOVIC SD, HECHT G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation[J]. Gut, 2003, 52(3): 439-451.
- [49] DORCA-ARÉVALO J, SOLER-JOVER A, GIBERT M, POPOFF MR, MARTÍN-SATUÉ M, BLASI J. Binding of epsilon-toxin from *Clostridium perfringens* in the nervous system[J]. Veterinary Microbiology, 2008, 131(1/2): 14-25.
- [50] CASES M, LLOBET A, TERNI B, GÓMEZ de ARANDA I, BLANCH M, DOOHAN B, REVILL A, BROWN AM, BLASI J, SOLSONA C. Acute effect of pore-forming *Clostridium perfringens* ϵ -toxin on compound action potentials of optic nerve of mouse[J]. eNeuro, 2017, 4(4): ENEURO.0051-ENEURO.0017.2017.
- [51] MORRIS WE, GOLDSTEIN J, REDONDO LM, CANGELOSI A, GEOGHEGAN P, BROCCO M, LOIDL FC, FERNANDEZ-MIYAKAWA ME. *Clostridium perfringens* epsilon toxin induces permanent neuronal degeneration and behavioral changes[J]. Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology, 2017, 130: 19-28.
- [52] LINDEN JR, MA YH, ZHAO BH, HARRIS JM, RUMAH KR, SCHAEEREN-WIEMERS N, VARTANIAN T. *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes selective death of mature oligodendrocytes and central nervous system demyelination[J]. mBio, 2015, 6(3): e02513.
- [53] WIOLAND L, DUPONT JL, DOUSSAU F, GAILLARD S, HEID F, ISOPE P, PAUILLAC S, POPOFF MR, BOSSU JL, POULAIN B. Epsilon toxin from *Clostridium perfringens* acts on oligodendrocytes without forming pores, and causes demyelination[J]. Cellular Microbiology, 2015, 17(3): 369-388.
- [54] LONCHAMP E, DUPONT JL, WIOLAND L, COURJARET R, MBEBI-LIEGEOIS C, JOVER E, DOUSSAU F, POPOFF MR, BOSSU JL, de BARRY J, POULAIN B. *Clostridium perfringens* epsilon toxin

- targets granule cells in the mouse cerebellum and stimulates glutamate release[J]. PLoS One, 2010, 5(9): e13046.
- [55] LINDEN JR, FLORES C, SCHMIDT EF, UZAL FA, MICHEL AO, VALENZUELA M, DOBROW S, VARTANIAN T. *Clostridium perfringens* epsilon toxin induces blood brain barrier permeability via caveolae-dependent transcytosis and requires expression of MAL[J]. PLoS Pathogens, 2019, 15(11): e1008014.
- [56] 耿志军, 辛文文, 黄静, 康琳, 袁媛, 王景林. 产气荚膜梭菌 ϵ 毒素受体研究进展[J]. 动物医学进展, 2020, 41(5): 100-104.
- GENG ZJ, XIN WW, HUANG J, KANG L, YUAN Y, WANG JL. Progress on *Clostridium perfringens* ϵ toxin receptors[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2020, 41(5): 100-104 (in Chinese).
- [57] ZACCHETTI D, PERÄNEN J, MURATA M, FIEDLER K, SIMONS K. VIP17/MAL, a proteolipid in apical transport vesicles[J]. FEBS Letters, 1995, 377(3): 465-469.
- [58] KIM T, FIEDLER K, MADISON DL, KRUEGER WH, PFEIFFER SE. Cloning and characterization of MVP17: a developmentally regulated myelin protein in oligodendrocytes[J]. Journal of Neuroscience Research, 1995, 42(3): 413-422.
- [59] MILLAN J, PUERTOLLANO R, FAN L, RANCANO C, ALONSO MA. The MAL proteolipid is a component of the detergent-insoluble membrane subdomains of human T-lymphocytes[J]. Biochem J. 1997, 321 (Pt 1):247-52.
- [60] TITBALL RW, LEWIS N, NICHOLAS R. Is *Clostridium perfringens* epsilon toxin associated with multiple sclerosis?[J]. Multiple Sclerosis, 2023, 29(9): 1057-1063.
- [61] SHETTY SV, MAZZUCCO MR, WINOKUR P, HAIGH SV, RUMAH KR, FISCHETTI VA, VARTANIAN T, LINDEN JR. *Clostridium perfringens* epsilon toxin binds to and kills primary human lymphocytes[J]. Toxins, 2023, 15(7): 423.
- [62] DORCA-ARÉVALO J, BLANCH M, PRADAS M, BLASI J. Epsilon toxin from *Clostridium perfringens* induces cytotoxicity in FRT thyroid epithelial cells[J]. Anaerobe, 2018, 53: 43-49.
- [63] ADLER D, LINDEN JR, SHETTY SV, MA YH, BOKORI-BROWN M, TITBALL RW, VARTANIAN T. *Clostridium perfringens* epsilon toxin compromises the blood-brain barrier in a humanized zebrafish model[J]. iScience, 2019, 15: 39-54.
- [64] de OLIVEIRA JÚNIOR CA, DUARTE MC, de ASSIS RA, ALVES GG, SILVA ROS, LOBATO FCF. Humoral responses in cattle to commercial vaccines containing *Clostridium perfringens* epsilon toxoid and *C. botulinum* types C and D toxoids last less than a-year[J]. Anaerobe, 2019, 59: 72-75.
- [65] VESCHI JLA, BRUZZONE OA, LOSADA-EATON DM, DUTRA IS, FERNANDEZ-MIYAKAWA ME. Naturally acquired antibodies against *Clostridium perfringens* epsilon toxin in goats[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2008, 125(1/2): 198-202.
- [66] SONGER JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1996, 9(2): 216-234.
- [67] UZAL FA, WONG JP, KELLY WR, PRIEST J. Antibody response in goats vaccinated with liposome-adjuvanted *Clostridium perfringens* type D Epsilon toxoid[J]. Veterinary Research Communications, 1999, 23(3): 143-150.
- [68] SANTOS FDS, FERREIRA MRA, MAUBRIGADES LR, GONÇALVES VS, de LARA APS, MOREIRA C, SALVARANI FM, CONCEIÇÃO FR, LEIVAS LEITE FP. *Bacillus toyonensis* BCT-7112^T transient supplementation improves vaccine efficacy in ewes vaccinated against *Clostridium perfringens* epsilon toxin[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 130(3): 699-706.
- [69] OYSTON PCF, PAYNE DW, HAVARD HL, WILLIAMSON ED, TITBALL RW. Production of a non-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin which induces protective immunity in mice[J]. Microbiology, 1998, 144 (Pt 2): 333-341.
- [70] 杜吉革, 彭小兵, 张秀坤, 朱真, 薛麒, 王磊, 李启红, 印春生, 姚文生, 康凯, 蒋玉文, 陈小云. 产气荚膜梭菌 ϵ 毒素突变体的表达及免疫保护力评价[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(6): 13-20.
- DU JG, PENG XB, ZHANG XK, ZHU Z, XUE Q, WANG L, LI QH, YIN CS, YAO WS, KANG K, JIANG YW, CHEN XY. Expression and evaluation of protective efficacy of *Clostridium perfringens* ϵ toxin mutant[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(6): 13-20 (in Chinese).
- [71] BOKORI-BROWN M, HALL CA, VANCE C, da FERNANDES COSTA SP, SAVVA CG, NAYLOR CE, COLE AR, BASAK AK, MOSS DS, TITBALL RW. *Clostridium perfringens* epsilon toxin mutant Y30A-Y196A as a recombinant vaccine candidate against enterotoxemia[J]. Vaccine, 2014, 32(23): 2682-2687.

- [72] 杜吉革, 张秀坤, 朱真, 薛麒, 李启红, 印春生, 彭小兵, 王磊, 姚文生, 康凯, 陈小云. 重组产气荚膜梭菌 ϵ 毒素三点突变体的融合表达及其免疫活性分析[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(7): 28-34.
- DU JG, ZHANG XK, ZHU Z, XUE Q, LI QH, YIN CS, PENG XB, WANG L, YAO WS, KANG K, CHEN XY. Expression and immunocompetence of *Clostridium perfringens* ϵ toxin derivative with three mutations[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(7): 28-34 (in Chinese).
- [73] 杜吉革, 朱真, 薛麒, 李启红, 印春生, 彭小兵, 姚文生, 康凯, 陈小云. 产气荚膜梭菌重组 ϵ 毒素突变体的免疫保护力评价[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(4): 777-785.
- DU JG, ZHU Z, XUE Q, LI QH, YIN CS, PENG XB, YAO WS, KANG K, CHEN XY. Evaluation of protective efficacy of recombinant mutant of *Clostridium perfringens* ϵ toxin[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2018, 49(4): 777-785 (in Chinese).
- [74] SINGH AP, PRABHU SN, NAGALEEKAR VK, DANGI SK, PRAKASH C, SINGH VP. Immunogenicity assessment of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin epitope-based chimeric construct in mice and rabbit[J]. 3 Biotech, 2020, 10(9): 406.
- [75] PILEHCHIAN LANGROUDI R, SHAMSARA M, AGHAIYPOUR K. Expression of *Clostridium perfringens* epsilon-beta fusion toxin gene in *E. coli* and its immunologic studies in mouse[J]. Vaccine, 2013, 31(32): 3295-3299.
- [76] KANG JJ, GAO J, YAO WW, KANG L, GAO S, YANG H, JI B, LI P, LIU J, YAO JH, XIN WW, ZHAO BH, WANG JL. F199E substitution reduced toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by depriving the receptor binding capability[J]. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2017, 13(7): 1598-1608.
- [77] ALIMOLAEI M, GOLCHIN M, BALUCH-AKBARI A. Immunogenicity of a recombinant *Lactobacillus casei*, surface-expressed H₁₅₁P mutant of *Clostridium perfringens* epsilon toxin and its protective responses in BALB/c mice[J]. Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology, 2021, 200: 173-179.
- [78] DU JG, LIU B, WANG TJ, ZHU Z, YIN CS, LUO YF, LIU Y, CHEN XY. A non-toxic recombinant bivalent chimeric protein rETX_{m3}CSA_{m4}/TMD as a potential vaccine candidate against enterotoxemia and braxy[J]. Vaccine, 2023, 41(6): 1232-1238.
- [79] 彭小兵, 杜吉革, 彭国瑞, 李旭妮, 董令赢, 冯丽芳, 蒋玉文. 含腐败梭菌 α 毒素和产气荚膜梭菌 ϵ 毒素基因的重组大肠杆菌的高密度发酵和免疫效果[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(17): 186-189.
- PENG XB, DU JG, PENG GR, LI XN, DONG LY, FENG LF, JIANG YW. High-density fermentation and immune effect of recombinant *Escherichia coli* containing *Clostridium putrificum* α toxin and *Clostridium perfringens* ϵ toxin genes[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(17): 186-189 (in Chinese).
- [80] 彭国瑞, 彭小兵, 李旭妮, 董令赢, 蒋玉文. 腐败梭菌 α 毒素和产气荚膜梭菌 ϵ 毒素的共表达及其免疫效力评价[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(2): 26-32.
- PENG GR, PENG XB, LI XN, DONG LY, JIANG YW. Evaluation immune efficacy of co-expression of *Clostridium septium* α -toxin and *Clostridium perfringens* ϵ -toxin[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(2): 26-32 (in Chinese).
- [81] GARCIA JP, BEINGESSER J, BOHOROV O, BOHOROVA N, GOODMAN C, KIM D, PAULY M, VELASCO J, WHALEY K, ZEITLIN L, ROY CJ, UZAL FA. Prevention and treatment of *Clostridium perfringens* epsilon toxin intoxication in mice with a neutralizing monoclonal antibody (c4D7) produced in *Nicotiana benthamiana*[J]. Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology, 2014, 88: 93-98.
- [82] SHIVAPPAGOWDAR A, PATI S, NARAYANA C, AYANA R, KAUSHIK H, SAH R, GARG S, KHANNA A, KUMARI J, GARG L, SAGAR R, SINGH S. A small bioactive glycoside inhibits epsilon toxin and prevents cell death[J]. Disease Models & Mechanisms, 2019, 12(10): dmm040410.
- [83] NAGAHAMA M, SAKURAI J. High-affinity binding of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin to rat brain[J]. Infection and Immunity, 1992, 60(3): 1237-1240.
- [84] LEWIS M, WEAVER CD, McCLAIN MS. Identification of small molecule inhibitors of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin cytotoxicity using a cell-based high-throughput screen[J]. Toxins, 2010, 2(7): 1825-1847.
- [85] HUANG J, ZHAO BH, LIU TT, KANG L, LI JX, GUO ZS, CHEN M, GAO S, WANG J, LI YW, WANG JL, XIN WW. Statins as potential preventative treatment of ETX and multiple pore-forming toxin-induced diseases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(6): 5414.