

DOI: 10.13376/j.cbls/2016001

文章编号: 1004-0374(2016)01-0001-11

· 专题: 生物毒素 ·



王景林, 研究员, 博士生导师, 现任军事医学科学院微生物流行病学研究所毒理学实验室主任, 学科带头人。主要从事生物毒素检测、疫苗和相关基础研究, 先后承担国家自然科学基金、“863”计划、传染病防治重大专项、科技支撑计划等多项科研课题, 发表中英文同行评议论文 50 余篇, 参编专著 7 部, 获得 6 项国家发明专利授权, 已培养硕士研究生 24 人, 博士研究生 6 人。

梭菌神经毒素的研究进展

辛文文, 王景林*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘要: 梭状芽孢杆菌属包括许多可以形成芽孢的革兰阳性棒状杆菌, 它们广泛分布于自然界中, 包括土壤、海洋和淡水沉积物中。在家畜、鸡, 以及人等哺乳动物的肠道中也经常能发现肉毒梭菌。许多梭状芽孢杆菌可以产生神经毒素, 如肉毒毒素、破伤风毒素和产气荚膜梭菌 ϵ 毒素, 分别由肉毒梭菌、破伤风梭菌和产气荚膜梭菌产生。这些梭菌神经毒素毒性非常强, 可以引起人类或动物发病, 如肉毒中毒、破伤风、羊肠毒血症等, 给人类的健康和养殖业带来许多危害, 一直是重要的研究对象。近年来, 梭菌神经毒素在结构与受体以及检测、防控方面取得了较大的进展, 现从以上方面综述这 3 种毒素的研究进展。

关键词: 梭菌神经毒素; 结构与受体; 检测; 防控

中图分类号: Q786; Q936; R378.8 文献标志码: A

Research progress of Clostridial neurotoxins

XIN Wen-Wen, WANG Jing-Lin*

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

Abstract: The genus *Clostridium* comprises a number of spore forming Gram positive, rod shaped bacilli. They are widely distributed on the earth including the soil, marine and freshwater sediments. They are also found in the intestines of domestic animals, chickens, and mammalian species such as humans. Many Clostridial species produce medically important neurotoxins. For example, botulinum neurotoxin, tetanus neurotoxin, and epsilon toxin were produced by *Clostridium botulinum*, *C. tetani*, and *C. perfringens* respectively. These neurotoxins are extremely potent, and are responsible for many diseases of human or animals, such as botulism, tetanus, and enterotoxemia. So, there have been many studies on these neurotoxins and new achievements have been made in fields of structures, receptors, detection, and prevention in recent years. The purpose of this paper is to review the advances on Clostridial neurotoxins in respect of structures, receptors, monitoring, and prevention.

Key words: Clostridial neurotoxins; structures and receptors; detection; prevention

收稿日期: 2014-12-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31500108)

*通信作者: E-mail: wjl0801@vip.163.com

梭状芽孢杆菌属包括许多可以形成芽孢的革兰阳性棒状杆菌,它们广泛分布于自然界的土壤、海洋和淡水沉积物中。它们也是许多动物,如家畜、鸡,以及人类的肠道中的正常菌群^[1]。许多梭状芽孢杆菌可以产生神经毒素,如肉毒毒素(botulinum neurotoxin, BoNT)、破伤风毒素(tetanus neurotoxin, TeNT)和产气荚膜梭菌 ϵ 毒素(*Clostridium perfringens* epsilon toxin, ETX),分别由肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、破伤风梭菌(*C. tetani*)和产气荚膜梭菌(*C. perfringens*)产生。在以往文献中,梭菌神经毒性通常只指 BoNT 和 TeNT,因为 ETX 也被证明有神经毒性^[2],故本文把这3种毒素统称为梭菌神经毒素。这3种毒素是自然界中生物毒素毒性排名前三的毒素。BoNT 是目前发现的生物毒素和化学毒剂中的毒性最强的物质,对小鼠的半数致死剂量(lethal dose 50, LD₅₀)约为 1 ng/kg^[3]。TeNT 毒性和 BoNT 的相似,对小鼠的 LD₅₀ 约为 1 ng/kg^[4]。ETX 对小鼠的 LD₅₀ 约为 70 ng/kg^[5]。

梭菌神经毒素不但毒性非常高,而且通常会引起人类和动物非常严重的疾病,跟人们的生活息息相关,因此,一直是非常重要的研究对象。我国每年都会发生食源性肉毒中毒事件,严重威胁着人们的健康和安全^[6]。另外,BoNT 由于其极高的毒性,被列入国际生物武器核查清单,是重要的生物战剂^[7]。TeNT 是引起人破伤风的致病因子,常通过伤口感染破伤风梭菌所致,一旦出现症状死亡率很高,在发展中国家每年都有很多新生儿因患破伤风死亡^[8]。ETX 主要是由 B 和 D 型产气荚膜梭菌产生的一种主要致病因子,可导致山羊、绵羊和牛等动物的肠毒血症或坏死性肠炎,以及新生羔羊和犊牛腹泻等肠道致死性疾病^[9-10]。该病发病急、病程短、死亡快,新生羔羊死亡率高达 95%~100%,山羊和绵羊死亡率接近 30%,给我国乃至世界各国的畜牧业生产造成严重损失^[11-12]。

近年来,这3种毒素的研究取得了较大的进展,主要集中在结构与受体、检测和防控等方面。本文从这几个方面详细综述了这3种梭菌神经毒素的研究进展。

1 肉毒神经毒素

肉毒神经毒素(BoNT)是由肉毒梭菌产生的一种外毒素,可以分为7个血清型,分别为 BoNT/A~G^[13],除 BoNT/G 外,其余血清型都存在亚型,如 BoNT/A 存在 5 个亚型(A1~A5)。这7种血清型

的毒素分子具有相似的结构和功能。2014 年,有多篇文章同时报道发现了新的血清型 BoNT/H,该血清型的毒素不能被目前所有 7 种抗毒素的任何一种中和^[14-16],序列比对和聚类分析也表明该血清型不属于现有 7 种血清型的任何一个血清型或亚型。该新血清型目前还没有被完全得到认可^[17-18]。

BoNT 以无活性的前体毒素的形式存在,在内源或外源蛋白酶的作用下,在 N 端三分之一位置处断裂成两条链,形成有活性的毒素分子。有活性的毒素分子由一条重链(相对分子质量为 10⁵)和一条轻链(相对分子质量为 5 × 10⁴)组成,两条链由一个二硫键链接^[13,19]。重链可以和神经细胞表面的受体结合,通过受体介导的内吞作用介导毒素分子进入细胞内部^[13]。毒素分子进入细胞后轻链和重链分离,重链在内体膜上形成跨膜孔洞介导轻链进入胞质内^[13,20-21],进入细胞内的轻链分子具有蛋白酶活性,可以切割与胞吐作用相关的蛋白。BoNT/A 和 BoNT/E 可以切割突触小体相关蛋白-25(synaptosomal-associated protein of 25 kDa, SNAP-25),BoNT/B、BoNT/D、BoNT/F 和 BoNT/G 可以切割囊泡相关膜蛋白(vesicle-associated membrane protein, VAMP),而 BoNT/C 同时可以切割 SNAP-25 和突触融合蛋白(syntaxin)^[22-27]。SNAP-25、VAMP 和突触融合蛋白组装在一起可以介导突触小泡和质膜的融合^[28]。轻链分子通过切割这些蛋白从而抑制突触小泡内神经递质的释放,造成肌肉麻痹,进而使患者呼吸麻痹而死亡。

1.1 结构与受体

BoNT 的受体以及其进入神经细胞的机制一直是研究的热点。目前,BoNT 的双受体模型已经逐渐得到证实,BoNT 进入神经细胞存在两种受体——蛋白受体和神经节苷脂受体。通常情况下,毒素分子和单一受体的亲和力较低,而和两种受体同时结合时可以获得更高的亲合力。表 1 列出了各型毒素分子的蛋白受体和神经节苷脂受体。A 型、D 型和 E 型毒素的蛋白受体是突触小泡蛋白 2(synaptic vesicle protein 2, SV2)分子。SV2 分子有 3 个亚型(SV2A、SV2B 和 SV2C),不同型的毒素分子和 3 种 SV2 分子的亲和力也有差异。B 型和 F 型毒素分子的蛋白受体是突触结合蛋白 I(synaptotagmin I, Syt I)或突触结合蛋白 II(synaptotagmin II, Syt II)^[29-30]。C 型毒素分子的蛋白受体目前还不清楚。复杂型神经节苷脂分子类型较多,各型毒素分子的神经节苷脂受体通常不止一种,较为复杂,在亲和力方面偏

好不同, 并不统一, 不过 GT1b 是各型毒素分子共有的受体 (表 1), 因此, 各型毒素分子在神经节苷脂的结合区域相对较为保守。随着研究的深入, BoNT 的受体及进入细胞机制虽不断得以阐明, 但尚有很多地方没有研究清楚。C 型毒素分子的蛋白受体一直没有被证实, 尚不能确定 C 型毒素分子是否存在蛋白受体。研究表明, 缺乏神经节苷脂的神经细胞几乎丧失对 C 型毒素的敏感性, 这也表明神经节苷脂受体对 C 型毒素的结合具有决定性的作用, 这与其他型别的毒素分子有所不同, 对于其他毒素分子, 蛋白受体通常对结合具有决定性作用^[31]。

另有研究表明, C 型毒素分子存在两个受体, 但这两个受体都是神经节苷脂类受体^[32]。

另外, 毒素分子表面的不同受体结合区与受体结合时可能会存在竞争^[33]。由于一个毒素分子表面可能存在较多的受体结合结构域, 这些结构域之间的空间距离可能会比较近, 因此, 其中一个结构域与受体结合后可能会影响另一个结构域与受体的结合。B 型毒素的蛋白受体 Syt II 和神经节苷脂受体可以独立地和毒素分子结合, 而且两者的结合还存在相互抑制的作用, 过量的神经节苷脂 GD1a 或 GT1b 可以抑制毒素分子与 Syt II 的结合^[33]。

表1 肉毒神经毒素及破伤风神经毒素的受体与底物

毒素	蛋白受体	脂类受体	作用底物
BoNT/A	SV2C ^[34-35]	GT1b	SNAP-25 ^[36]
BoNT/B	SytI、SytII ^[30]	GT1b、GD1a ^[37]	VAMP
BoNT/C	未知	GT1b、GD1b ^[31] 、唾液酸 ^[32]	SNAP-25 ^[36] 、突触融合蛋白
BoNT/D	SV2 ^[38]	磷脂酰乙醇胺 ^[31,39] 、GT1b、GD1b、GD2 ^[40]	VAMP
BoNT/E	SV2A、SV2B ^[41]	GT1b、GD1a、GQ1b、游离脂肪酸 ^[42]	SNAP-25 ^[36]
BoNT/F	SV2 ^[29]	GT1b、GD1a ^[29]	VAMP
BoNT/G	SytI、SytII ^[43-44]	GT1b ^[45]	VAMP
TeNT	SV2A、SV2B ^[46]	GT1b	VAMP-2

1.2 检测与防控

对 BoNT 的监测与预警对生物战剂检测、食品安全都具有重要的意义。近几年, BoNT 的检测技术取得了快速的发展。目前, 小鼠致死试验 (mouse lethality assay, MLA) 是检测 BoNT 活性的金标准, 可以检测所有型别的 BoNT^[47-48]。BoNT 有效的检测方法包括 MLA 以及基于其他动物的方法, 如数字诱导评分、运动活跃度、复合肌肉动作电位和神经肌肉活动检测。然而, 动物试验耗时长, 自然界的复杂变化会导致试验不可避免的一些缺陷, 包括样本量的限制、无法实现自动化、动物设施的要求以及较高水平的技术人员。与 MLA 相比, 理想的检测方法应该具备简单、快速、易于自动化、准确性好以及灵敏度高等优势。因此, 开发一种灵敏度高且可以用于检测有活性 / 无活性的 BoNT 的体外试验, 如酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和肽链内切酶活性检测, 则显得尤为重要。基于 DNA 检测的体外试验只能用于检测基因编码区的神经毒素或神经毒素相关蛋白, 而不是真正的毒素。BoNTs 现有的检测方法详见表 2。

目前, ELISA 技术已经广泛应用于食品和临床样本中毒素的检测。但 ELISA 需要复杂的数据处理, 可被流式细胞术所替代。免疫层析操作简单、快速、易于操作, 但灵敏度远低于 MLA 试验。PCR 和 ELISA 结合后可以显著提高检测的灵敏度, 脂质体 ELISA 是目前报道的 BoNT 检测灵敏度最高的方法, 但其操作较为复杂, 且容易被污染而产生假阳性结果。基于生物传感器技术的检测方法便于自动化, 但其灵敏度远低于 MLA 试验。

内肽酶活性试验具有较为广阔的应用前景和发展潜力。内肽酶活性试验检测 BoNT 基于多项技术建立了多种方法, 如基于质谱技术、荧光共振能量转移技术、表面等离子体共振等。这些方法通常可以获得和 MLA 试验一致, 甚至更高的灵敏度, 而检测时间却大大缩短到几个小时甚至几分钟。基于内肽酶活性的检测方法的灵敏度通常和时间相关, 时间延长可以获得更高的灵敏度, 故可以根据实际情况灵活控制时间和灵敏度。

目前, 很多方法已经将 BoNT 的检测灵敏度提高到了 fg/mL 的级别。然而, 仍没有一种方法可以全面解决 BoNT 检测所面临的问题。大部分最新建

表2 肉毒神经毒素现有的检测方法的比较

方法	检测下限(mL ⁻¹)	检测耗时	自动化	样品基质干扰
动物试验				
小鼠致死试验 ^[49]	20 pg	4~6 d	否	受限
运动能力试验 ^[50]	2 pg	1~2 d	否	受限
神经肌肉试验 ^[51]	<20 pg	4~5 h	否	受限
基于抗体的试验				
ELISA ^[52]	5 pg~2 ng	5~6 h	受限	可控的
免疫层析 ^[53]	1~50 ng	30 min	未知	高
流式细胞术 ^[54]	50 pg~20 ng	4 h	是	可控的
免疫PCR ^[55]	1~5 pg	<9 h	否	可控的
脂质体-ELISA ^[56]	0.02 fg	<9 h	否	未知
生物传感器技术				
双衍射光栅试验(bidiffractive grating assay) ^[57]	100 ng	<30 min	是	低
生物传感阵列试验(array biosensor assay) ^[58]	40~200 ng	<30 min	是	低
光和流体试验(optic and fluidic assay) ^[59]	20~500 ng	<30 min	是	低
芯片ELISA(ELISA on a chip) ^[60]	2 ng	<30 min	是	低
适配子电化学传感器 ^[61]	40 pg	<30 min	是	低
内肽酶活性试验				
蛋白芯片捕获试验 ^[62]	20 pg	3~5 h	是	高
实验室试验(ILab-on-chip) ^[63]	1 pg	<20 min	是	高
肽阵列试验(Peptide array assay) ^[64]	3 pg	<3 h	是	高
荧光共振能量转移 ^[65-66]	0.5 fg	2.5 h	否	低
	150 ng	2 min	否	低
细胞试验 ^[67]	1~10 ng	2~3 d	否	低
质谱检测 ^[68]	0.4~6 pg	3~4 h	是	高
表面等离子体共振 ^[69]	8 pg	5 min	否	低
	66 fg	5 h	否	低

备注：该表格首次由Singh绘制^[70]，本文做了补充。

立的方法都存在一定的问题，需要进一步的改进和优化。然而，这些方法的广阔应用前景和发展潜力是不可否认的，希望在未来可以通过技术的改进以解决 BoNT 检测所面临的问题，同时也期待更具创新性的 BoNT 检测方法。

肉毒中毒的防治主要采用类毒素疫苗预防和使用中和性抗体进行被动免疫治疗。类毒素疫苗是预防肉毒中毒的有效方法。目前国外使用较多的类毒素疫苗是福尔马林灭活的五价疫苗，该疫苗只含有 A~E 这 5 个血清型，不能抵抗 F 型和 G 型毒素的攻击^[71]。BoNT 的 Hc 片段包含保护性抗原基本决定簇，作为免疫原能引发显著保护性免疫应答，是目前 BoNT 亚单位疫苗的研究方向^[72-74]。由于临床诊断往往不能有效区分中毒的毒素类型，使用保护性抗体治疗时多使用多价的马血清抗毒素^[75]，卵黄抗体通过口服也能产生保护效果^[76]。美军装备有七价的抗毒素血清，以防利用 BoNT 的恐怖袭击^[1]。

另外，小分子化合物和肽类物质对 BoNT 的毒性可以起到一定的抑制作用，毒素拮抗剂成为肉毒中毒防治的新途径^[77-78]。

2 破伤风毒素

破伤风毒素 (TeNT) 是由破伤风梭菌产生的一种神经毒素，和 BoNT 的结构相似，由一条重链 (相对分子质量为 10^5) 和一条轻链 (相对分子质量为 5×10^4) 构成，两条链之间由二硫键链接。轻链同样具有 Zn 离子依赖的内肽酶活性，可以切割 VAMP-2 蛋白。重链由 3 个结构域构成，分别是 HN、HC-N 和 HC-C 结构域。HN 结构域相对分子质量约为 5×10^4 ，由 2 个 11 nm 长的 α 螺旋构成；HC-N 结构域由 6 个 β 折叠和 4 个 α 螺旋组成一个卷筒样结构域；HC-C 结构域具有 2 个多聚唾液酸神经节苷脂的结合位点，介导毒素分子和外周运动神经细胞突触前膜的结合。

2.1 受体及致病机制研究

TeNT 的神经节苷脂受体已经得到确认, 但该毒素是否存在蛋白受体尚不能确定。2009 年, Chen 等^[79]证实 TeNT 分子 HC-C 结构域上存在 2 个槽样的结构域(W 槽和 R 槽), 这两个结构域都能和神经节苷脂结合, 而且毒素分子和神经细胞高亲和力结合只依赖于神经节苷脂。2011 年, Yeh 等^[46]报道, SV2 是 TeNT 的蛋白受体, 介导毒素分子进入中枢神经元细胞。然而, 2012 年, Blum 等^[80]认为毒素进入细胞存在两种不同的机制, 一种是不依赖于突触小泡循环的方式, 另外一种是和突触小泡有关的方式, 但这两种方式都不依赖于 SV2 分子。体外实验也发现 SV2 和毒素分子不能发生结合。到目前为止, TeNT 分子是否存在蛋白受体尚没有定论。

TeNT 分子通过受体和外周运动神经细胞结合, 然后通过受体介导的细胞内吞作用进入细胞内囊泡。载有毒素分子的囊泡可以沿运动神经细胞逆行, 直至到达脊髓释放到运动神经细胞和抑制性神经细胞的交界处, 然后毒素分子通过受体进入到抑制性神经细胞内的囊泡中。随着囊泡的酸化, 轻链分子和重链分子解离并进入胞质中。进入胞质的轻链分子可以切割 VAMP-2 蛋白, 从而抑制突触小泡内神经递质的释放。由于作用细胞是抑制性神经细胞, 会造成对运动神经元正常的抑制作用消失, 从而造成运动神经元持续性兴奋, 导致肌肉强直性收缩^[4]。

TeNT 和 BoNT 在一级结构上具有同源性, 两者在结构和作用方式上均较为类似, 在其 H 链和 L 链的氨基酸组成上有相当高的同源性, 血清学上有明显的抗体交叉反应, 这些表明两者在进化上具有亲缘关系。

2.2 检测与防控

由于破伤风基本都由伤口感染破伤风梭菌引起, 如果伤口处理得当, 可以大大减少感染的几率。另外, 虽然 TeNT 和 BoNT 毒性相似, 但其用作生物战剂的局限性较大, 因此, TeNT 的检测技术一直没有得到人们的重视。目前关于其检测方法的文献较少。

目前, 破伤风的防控手段主要是接种疫苗, 分为主动免疫和被动疫苗两大类^[1]。被动疫苗是指抗 TeNT 免疫球蛋白, 因为目前使用的抗 TeNT 免疫球蛋白基本来自于动物血清, 所以通常会有 20% 的人出现过敏反应, 1% 的人出现严重的过敏反应^[1]。主动免疫疫苗是指 TeNT 类毒素疫苗, 是防控破伤风的有效办法, 可以激发机体产生有效且持久的免

疫反应。另外该疫苗较为安全, 每 50 000 人约有 1 人出现轻微的反应, 严重的反应十分罕见^[1]。

孕产妇和新生儿破伤风每年夺去成千上万名新生儿的生命, 主要发生在发展中国家。在世界卫生组织的倡导之下, 全球范围内展开了破伤风免疫计划, 目的是消灭孕产妇和新生儿破伤风。该计划取得了很好的成果, 目前为止, 全球大部分国家都已经消灭了孕产妇和新生儿破伤风。我国新生儿的计划免疫中就有百白破疫苗接种, 该疫苗能同时预防百日咳、白喉和破伤风。2012 年, 我国也成功消灭了孕产妇和新生儿破伤风^[81]。

3 产气荚膜梭菌ε毒素

产气荚膜梭菌 ε 毒素 (ETX) 是由 B 型和 D 型产气荚膜梭菌产生的一种外毒素, 具有多种生物学活性, 如具有细胞毒性、神经毒性、水肿活性、致死性和肠坏死性等。目前已经清楚, *etx* 基因由带有插入序列 IS1151 的大质粒编码, 其结构基因大小为 987 bp, 编码 329 个氨基酸, 含有 32 个氨基酸的信号肽, 成熟肽为 297 个氨基酸, 相对分子质量为 3.2×10^4 ^[82]。ETX 首先在产气荚膜梭菌的指数生长期以无活性的前体毒素形式被合成分泌, 经产气荚膜梭菌产生的 λ 蛋白酶 (λ-protease) 和消化性蛋白酶, 如胰蛋白酶 (trypsin)、胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin) 的切割成为有活性的成熟肽, 即 254~261 个氨基酸组成的单链多肽, 相对分子质量为 $2.83 \times 10^4 \sim 2.91 \times 10^4$ ^[83]。ETX 一级结构及不同蛋白酶切割位置, 如图 1 所示。其中, λ-蛋白酶可以切除前体毒素 N 端 11 个、C 端 29 个氨基酸, 胰蛋白酶可以切除前体毒素 N 端 13 个、C 端 22 个氨基酸, 而胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶共同作用可以去除 N 端 13 个、C 端 29 个氨基酸^[2]。不同切割方式所活化的毒素的毒力是不同的, 经胰酶活化的毒素对小鼠的 LD₅₀ 约为 320 ng/mL, 经 λ-蛋白酶蛋白酶活化的毒素对小鼠的 LD₅₀ 约为 110 ng/mL, 而经胰酶和胰凝乳蛋白酶共同作用活化的毒素分子的毒性最强, 对小鼠的 LD₅₀ 约为 65 ng/mL^[84]。然而, 有研究利用羊小肠内容物消化 ETX, 发现其活化还有羧肽酶的参与, 最终毒素分子被去除了 N 端 13 个、C 端 32~34 个氨基酸, 形成由 3 种相对分子质量约为 2.7×10^4 的毒素分子组成的混合物, 该混合物的毒性甚至更强^[85]。

3.1 结构与受体

目前对 ETX 细胞毒性机制, 包括一些关键氨

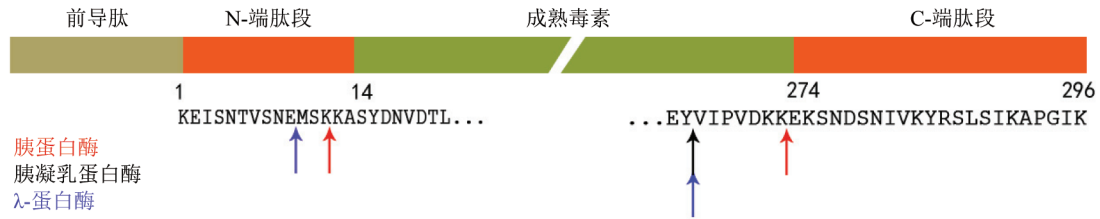


图1 产气荚膜梭菌ETX分子的一级结构示意图^[2]

氨基酸位点与 ETX 生物活性的关系已有一些了解,但现有的实验数据还不能完成阐明 ETX 的作用机制^[2,83,86]。如大量数据已经证明,ETX 是一种成孔毒素,对犬肾上皮 (Madin-Darby canine kidney, MDCK) 细胞具有致死作用,可在其细胞膜上与脂筏相关蛋白结合形成一种七聚体复合物,并在细胞膜表面形成一个大的孔隙,导致细胞膜通透性改变,使胞内 K 离子外流^[87-89]。ETX 晶体结构具有成孔毒素家族的主要结构特点^[2]。前体毒素的晶体结构已经被解析出来,其呈现一种狭长的形态,由 3 个结构域组成,且有两个长条索状结构横贯 ETX 分子的 3 个结构域 (图 2)。其中,结构域 I 中有一组芳香族氨基酸簇,被推测可能是与受体结合的关键区域^[90]。结构域 II 中可能存在与毒素成孔活性相关的结构区域,在 S124-Y146 片段区域中含有交替的亲水性-疏水性残基,形成 β 发卡结构,推测是形成七聚体的跨膜结构域,但目前还未获得可靠的实验结果^[91]。结构域 III 中可能包含一个毒素活化的裂解位点,且极有可能与毒素单体的寡聚反应有关^[83]。虽然 ETX 的晶体结构已被解析,但是 3 个结构域中的重要氨基酸残基在 ETX 细胞毒性中的具体作用尚不十分清楚。如果可以解析出其形成的七聚体的晶体结构,将可以全面阐释 ETX 的结构与功能。

ETX 的受体尚未被确认,但越来越多的证据表明 ETX 和细胞表面特定的受体结合。在小鼠中毒素和大脑的结合可以被前体毒素所抑制^[92-93]。相似地,前体毒素也可以抑制活化毒素与细胞膜的结合^[94]。细胞膜碎片经链霉菌蛋白酶和神经氨酸酶处理后可以降低毒素的结合,表明受体分子可能是唾液酸糖蛋白^[94]。最近有证据表明,甲型肝炎病毒细胞受体 1 (hepatitis A virus cellular receptor 1, HAVCR1) 可能是 ETX 毒素结合 MDCK 细胞的受体,但尚未得到确认^[95]。另外有研究表明,细胞表面的 MAL 蛋白 (myelin and lymphocyte protein) 对 ETX 与细胞

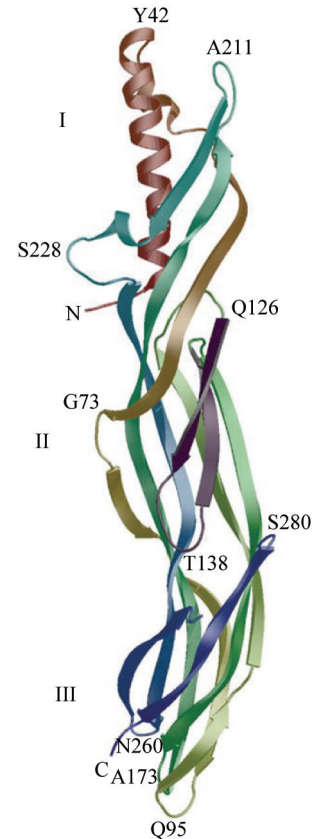


图2 产气荚膜梭菌ETX前体毒素的晶体结构图^[91]

的结合及毒性的发挥必不可少。原本对 ETX 不敏感的中国仓鼠卵巢细胞 (CHO 细胞) 在其表面重组表达了大鼠来源的 MAL 蛋白后便获得了对 ETX 的敏感性。然而,研究并没有发现 MAL 蛋白和 ETX 毒素蛋白之间的相互作用,因此,最终也没有确定 MAL 是 ETX 的受体^[96]。

目前,ETX 致死细胞的机制尚未完全阐明,可能存在多种机制。ETX 的敏感细胞系主要有 MDCK 细胞、人肾平滑肌瘤 (Caucasian renal leiomyoblastoma, G-402) 细胞、人肾颗粒细胞癌 (ACHN) 细胞和鼠肾皮质集合管 (murine renal cortical collecting duct, mpkCCD_{c14}) 细胞。其中,MDCK 细

胞是研究 ETX 致死毒性最敏感的体外细胞系模型^[97-98]。此外, 与敏感细胞相一致的是, 动物肾脏是 ETX 作用的首要靶器官, 而大脑则是仅次于肾脏的第 2 个靶器官, 当 ETX 发挥作用时可在肾脏和脑两个重要靶器官中大量蓄积, 使其发生充血和水肿^[83,99]。ETX 对 MDCK 细胞的致死作用主要通过细胞膜表面形成跨膜通道, 导致离子失衡而使细胞死亡^[98]。然而, ETX 可以导致 mpkCCD_{c14} 细胞流失 ATP 而引发细胞凋亡, 这种作用不依赖于七聚体的形成^[99]。因此, 很可能存在其他的细胞致死途径。

ETX 具有神经毒性, 无论是在自然条件下还是在实验室中, 中毒的动物体内都能发现脑部组织水肿^[100]。许多证据表明, 这些水肿是由于 ETX 导致的脑部血管渗透率增加而引起的血管源性水肿^[9,101]。同样也有很多证据表明, ETX 毒素直接作用于神经组织。Nagahama 和 Sakurai^[94] 利用放射性标记技术证实, ETX 和脑组织匀浆及突触膜碎片高亲和地结合。有研究表明 ETX 毒素通过刺激神经细胞释放神经递质来损伤神经细胞^[102]。另外, 有学者对 ETX 和神经细胞的直接作用产生质疑, Lonchamp 等^[103] 研究发现 ETX 对谷氨酸能的神经末梢没有直接的作用。同样的, Dorca-Arevalo 等^[104] 研究发现, ETX 处理突触膜碎片并不能引发谷氨酸盐的释放。因此, ETX 的神经毒性的具体机制还有待进一步的研究。

3.2 检测与防控

目前检测动物肠内容物或其他体液中是否含有 ETX 是确诊羊等动物是否患有毒素引起的肠毒血症的最常用方法。检测方法多是免疫学方法, 如小鼠中和试验、ELISA、对流免疫电泳。其中基于多克隆抗体捕获的 ELISA 方法灵敏度最高, 可以检测 0.075 倍小鼠 LD₅₀ 的毒素, 但特异性相对较低。小鼠中和试验特异性最好, 但灵敏度相对较低, 约为 50~200 倍 LD₅₀。不同方法之间存在较大的不一致性, 因此, ETX 的检测最好采用两种方法进行确认^[105]。

目前, 类毒素疫苗通常采用 D 型产气荚膜梭菌培养物经过滤后使用甲醛脱毒而制成, 已经在畜牧业上应用很多年。但该疫苗并不能提供持久的保护性, 绵羊需要每年进行一次加强免疫, 而山羊每 3~4 个月就要进行一次加强免疫。然而, 疫苗接种带来的炎症反应经常会导致动物食量减少、体重减轻等症状^[106]。另外, 使用粗培养物制备的疫苗不同生产批次很难保持均一。基因工程表达技术出现

后, 出现了重组表达类毒素疫苗, 即 ϵ 毒素经大肠杆菌重组表达后经甲醛脱毒制备而成。该疫苗在两次接种后可以产生有效的保护性, 在山羊、绵羊、兔子和牛的身上均能产生较好的效果。这种重组类毒素疫苗在巴西已经实现了商业化^[107]。

另外一种替代甲醛脱毒的技术就是基因工程突变体疫苗。该疫苗通过基因工程技术对毒素分子特定位点进行突变, 筛选出保留免疫原性且无毒或减毒的突变体分子。这种突变体分子可以直接作为疫苗, 无需甲醛处理。Oyston 等^[108] 制备的 H106P 突变体疫苗可以保护小鼠抵抗 1 000 倍 LD₅₀ 天然毒素的攻击。本实验室构建的 H199E 突变体在小鼠试验中也能达到同样的保护效果^[109]。对结构和功能的研究会促进疫苗的研究。

ETX 的多克隆抗体或单克隆抗体可用于毒素中毒的被动治疗。对新生羔羊注射抗血清或者饲喂含保护性抗体的初乳可以实现被动保护^[110-111]。另外有研究表明, 单克隆抗体可以有效保护培养的细胞和小鼠不受毒素的侵害^[112-113]。有研究利用戊糖乳杆菌及干酪乳杆菌重组表达 ETX 突变体制备口服疫苗, 在小鼠体内可以刺激产生较高水平的特异性 IgG 抗体, 并且在消化道和阴道黏膜上可以产生特异性 sIgA 抗体。

显性失活抑制因子 (dominant-negative inhibitors of toxicity) 是另外一种可以抑制毒素活性的突变体。这种抑制因子是 ETX 的突变体, 当和天然毒素混合时, 可以和天然毒素分子形成无活性的七聚体, 从而抑制天然毒素的活性。Pelish 和 McClain^[114] 曾筛选到一个突变体, 当和天然毒素至少以 1:8 混合时可以有效保护 MDCK 细胞, 但是这种抑制因子需要和毒素分子同时进入体内才能发挥作用, 因此限制了其在医疗上的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Goonetilleke A, Harris JB. Clostridial neurotoxins. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2004, 75: 35-9
- [2] Bokori-Brown M, Savva CG, Fernandes da Costa SP, et al. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* ϵ toxin. *FEBS J*, 2011, 278: 4589-601
- [3] Rossetto O, Megighian A, Scorzeto M, et al. Botulinum neurotoxins. *Toxicon*, 2013, 67: 31-6
- [4] Rossetto O, Scorzeto M, Megighian A, et al. Tetanus neurotoxin. *Toxicon*, 2013, 66: 59-63
- [5] Stiles BG, Barth G, Barth H, et al. *Clostridium perfringens* ϵ toxin: a malevolent molecule for animals and man? *Toxins: Basel*, 2013, 5: 2138-60
- [6] Zhang S, Wang Y, Qiu S, et al. Multilocus outbreak of

- foodborne botulism linked to contaminated sausage in Hebei province, China. *Clin Infect Dis*, 2010, 51: 322-5
- [7] 王景林. 生物毒素战剂: 检测识别分子与防治药物. *军事医学*, 2011, 35: 561-5
- [8] Khan AA, Zahidie A, Rabbani F. Interventions to reduce neonatal mortality from neonatal tetanus in low and middle income countries--a systematic review. *BMC Public Health*, 2013, 13: 322
- [9] Finnie JW. Neurological disorders produced by *Clostridium perfringens* type D ϵ toxin. *Anaerobe*, 2004, 10: 145-50
- [10] Tamai E, Ishida T, Miyata S, et al. Accumulation of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin in the mouse kidney and its possible biological significance. *Infect Immun*, 2003, 71: 5371-5
- [11] Chandran D, Naidu SS, Sugumar P, et al. Development of a recombinant ϵ toxoid vaccine against enterotoxemia and its use as a combination vaccine with live attenuated sheep pox virus against enterotoxemia and sheep pox. *Clin Vaccine Immunol*, 2010, 17: 1013-6
- [12] 张红英, 卢中华, 杨霞, 等. 我国魏氏梭菌病的流行特点. *中国畜牧兽医*, 2004, 31: 39-41
- [13] Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev*, 2000, 80: 717-66
- [14] Barash JR, Arnon SS. A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *J Infect Dis*, 2014, 209: 183-91
- [15] Dover N, Barash JR, Hill KK, et al. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. *J Infect Dis*, 2014, 209: 192-202
- [16] Hooper DC, Hirsch MS. Novel *Clostridium botulinum* toxin and dual use research-of concern issues. *J Infect Dis*, 2014, 209: 167
- [17] Johnson EA. Validity of botulinum neurotoxin serotype H. *J Infect Dis*, 2014, 210: 992-3; discussion 993
- [18] Relman DA. "Inconvenient truths" in the pursuit of scientific knowledge and public health. *J Infect Dis*, 2014, 209: 170-2
- [19] Simpson LL. Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004, 44: 167-93
- [20] Koriazova LK, Montal M. Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nat Struct Biol*, 2003, 10: 13-8
- [21] Fischer A, Montal M. Crucial role of the disulfide bridge between botulinum neurotoxin light and heavy chains in protease translocation across membranes. *J Biol Chem*, 2007, 282: 29604-11
- [22] Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, et al. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*, 1992, 359: 832-5
- [23] Schiavo G, Rossetto O, Catsicas S, et al. Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. *J Biol Chem*, 1993, 268: 23784-7
- [24] Schiavo G, Shone CC, Rossetto O, et al. Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/synaptobrevin. *J Biol Chem*, 1993, 268: 11516-9
- [25] Schiavo G, Malizio C, Trimble WS, et al. Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond. *J Biol Chem*, 1994, 269: 20213-6
- [26] Blasi J, Chapman ER, Link E, et al. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature*, 1993, 365: 160-3
- [27] Blasi J, Chapman ER, Yamasaki S, et al. Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J*, 1993, 12: 4821-8
- [28] Jahn R, Scheller RH. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 631-43
- [29] Fu Z, Chen C, Barbieri JT, et al. Glycosylated SV2 and gangliosides as dual receptors for botulinum neurotoxin serotype F. *Biochemistry: Mosc*, 2009, 48: 5631-41
- [30] Dong M, Richards DA, Goodnough MC, et al. Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J Cell Biol*, 2003, 162: 1293-303
- [31] Tsukamoto K, Kozai Y, Ihara H, et al. Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin types C and D. *Microb Pathog*, 2008, 44: 484-93
- [32] Karalewitz AP, Fu Z, Baldwin MR, et al. Botulinum neurotoxin serotype C associates with dual ganglioside receptors to facilitate cell entry. *J Biol Chem*, 2012, 287: 40806-16
- [33] Atassi MZ, Taruishi M, Naqvi M, et al. Synaptotagmin II and gangliosides bind independently with botulinum neurotoxin B but each restrains the other. *Protein J*, 2014, 33: 278-88
- [34] Dong M, Yeh F, Tepp WH, et al. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science*, 2006, 312: 592-6
- [35] Mahrhold S, Rummel A, Bigalke H, et al. The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett*, 2006, 580: 2011-4
- [36] Vaidyanathan VV, Yoshino K, Jahnz M, et al. Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C, and E: domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage. *J Neurochem*, 1999, 72: 327-37
- [37] Kozaki S, Kamata Y, Watarai S, et al. Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Microb Pathog*, 1998, 25: 91-9
- [38] Peng L, Tepp WH, Johnson EA, et al. Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors. *PLoS Pathog*, 2011, 7: e1002008
- [39] Zhang Y, Buchko GW, Qin L, et al. Structural analysis of the receptor binding domain of botulinum neurotoxin serotype D. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 401: 498-503
- [40] Kroken AR, Karalewitz AP, Fu Z, et al. Novel ganglioside-mediated entry of botulinum neurotoxin serotype D into neurons. *J Biol Chem*, 2011, 286: 26828-37

- [41] Dong M, Liu H, Tepp WH, et al. Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin E into neurons. *Mol Biol Cell*, 2008, 19: 5226-37
- [42] Kamata Y, Kozaki S, Sakaguchi G, et al. Evidence for direct binding of *Clostridium botulinum* type E derivative toxin and its fragments to gangliosides and free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, 140: 1015-9
- [43] Rummel A, Karnath T, Henke T, et al. Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J Biol Chem*, 2004, 279: 30865-70
- [44] Willjes G, Mahrhold S, Strotmeier J, et al. Botulinum neurotoxin G binds synaptotagmin-II in a mode similar to that of serotype B: tyrosine 1186 and lysine 1191 cause its lower affinity. *Biochemistry: Mosc*, 2013, 52: 3930-8
- [45] Schmitt J, Karalewitz A, Benefield DA, et al. Structural analysis of botulinum neurotoxin type G receptor binding. *Biochemistry: Mosc*, 2010, 49: 5200-5
- [46] Yeh FL, Dong M, Yao J, et al. SV2 mediates entry of tetanus neurotoxin into central neurons. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1001207
- [47] Pearce LB, Borodic GE, First ER, et al. Measurement of botulinum toxin activity: evaluation of the lethality assay. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1994, 128: 69-77
- [48] Dressler D, Dirnberger G, Bhatia KP, et al. Botulinum toxin antibody testing: comparison between the mouse protection assay and the mouse lethality assay. *Mov Disord*, 2000, 15: 973-6
- [49] Ferreira JL. Comparison of amplified ELISA and mouse bioassay procedures for determination of botulinum toxins A, B, E, and F. *J AOAC Int*, 2001, 84: 85-8
- [50] Keller JE. Recovery from botulinum neurotoxin poisoning *in vivo*. *Neuroscience*, 2006, 139: 629-37
- [51] Rasetti-Escargueil C, Liu Y, Rigsby P, et al. Phrenic nerve-hemidiaphragm as a highly sensitive replacement assay for determination of functional botulinum toxin antibodies. *Toxicon*, 2011, 57: 1008-16
- [52] Scotcher MC, Cheng LW, Stanker LH. Detection of botulinum neurotoxin serotype B at sub mouse LD₅₀ levels by a sandwich immunoassay and its application to toxin detection in milk. *PLoS One*, 2010, 5: e11047
- [53] Ching KH, Lin A, McGarvey JA, et al. Rapid and selective detection of botulinum neurotoxin serotype-A and -B with a single immunochromatographic test strip. *J Immunol Methods*, 2012, 380: 23-9
- [54] Ozanich RM Jr, Bruckner-Lea CJ, Warner MG, et al. Rapid multiplexed flow cytometric assay for botulinum neurotoxin detection using an automated fluidic microbead-trapping flow cell for enhanced sensitivity. *Anal Chem*, 2009, 81: 5783-93
- [55] Chao HY, Wang YC, Tang SS, et al. A highly sensitive immuno-polymerase chain reaction assay for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. *Toxicon*, 2004, 43: 27-34
- [56] Mason JT, Xu L, Sheng ZM, et al. A liposome-PCR assay for the ultrasensitive detection of biological toxins. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 555-7
- [57] O'Brien T, Johnson Iii LH, Aldrich JL, et al. The development of immunoassays to four biological threat agents in a bidiffractive grating biosensor. *Biosens Bioelectron*, 2000, 14: 815-28
- [58] Sapsford KE, Taitt CR, Loo N, et al. Biosensor detection of botulinum toxoid A and staphylococcal enterotoxin B in food. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 5590-2
- [59] Warner MG, Grate JW, Tyler A, et al. Quantum dot immunoassays in renewable surface column and 96-well plate formats for the fluorescence detection of botulinum neurotoxin using high-affinity antibodies. *Biosens Bioelectron*, 2009, 25: 179-84
- [60] Han SM, Cho JH, Cho IH, et al. Plastic enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)-on-a-chip biosensor for botulinum neurotoxin A. *Anal Chim Acta*, 2007, 587: 1-8
- [61] Wei F, Ho CM. Aptamer-based electrochemical biosensor for botulinum neurotoxin. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393: 1943-8
- [62] Marconi S, Ferracci G, Berthomieu M, et al. A protein chip membrane-capture assay for botulinum neurotoxin activity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 233: 439-46
- [63] Lillehoj PB, Wei F, Ho CM. A self-pumping lab-on-a-chip for rapid detection of botulinum toxin. *Lab Chip*, 2010, 10: 2265-70
- [64] Frisk ML, Tepp WH, Johnson EA, et al. Self-assembled peptide monolayers as a toxin sensing mechanism within arrayed microchannels. *Anal Chem*, 2009, 81: 2760-7
- [65] Schmidt JJ, Stafford RG. Fluorogenic substrates for the protease activities of botulinum neurotoxins, serotypes A, B, and F. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 297-303
- [66] Bagramyan K, Barash JR, Arnon SS, et al. Attomolar detection of botulinum toxin type A in complex biological matrices. *PLoS One*, 2008, 3: e2041
- [67] Hakami RM, Ruthel G, Stahl AM, et al. Gaining ground: assays for therapeutics against botulinum neurotoxin. *Trends Microbiol*, 2010, 18: 164-72
- [68] Kalb SR, Garcia-Rodriguez C, Lou J, et al. Extraction of BoNT/A, /B, /E, and /F with a single, high affinity monoclonal antibody for detection of botulinum neurotoxin by Endopep-MS. *PLoS One*, 2010, 5: e12237
- [69] Leveque C, Ferracci G, Maulet Y, et al. A substrate sensor chip to assay the enzymatic activity of botulinum neurotoxin A. *Biosens Bioelectron*, 2013, 49: 276-81
- [70] Singh AK, Stanker LH, Sharma SK. Botulinum neurotoxin: where are we with detection technologies. *Crit Rev Microbiol*, 2013, 39: 43-56
- [71] Brown DR, Lloyd JP, Schmidt JJ. Identification and characterization of a neutralizing monoclonal antibody against botulinum neurotoxin serotype F, following vaccination with active toxin. *Hybridoma*, 1997, 16: 447-56
- [72] Holley JL, Elmore M, Mauchline M, et al. Cloning, expression and evaluation of a recombinant sub-unit vaccine against *Clostridium botulinum* type F toxin. *Vaccine*, 2000, 19: 288-97
- [73] Villaflores OB, Hsei CM, Teng CY, et al. Easy expression of the C-terminal heavy chain domain of botulinum neurotoxin serotype A as a vaccine candidate using a bicistronic baculovirus system. *J Virol Methods*, 2013, 189:

- 58-64
- [74] Henkel JS, Tepp WH, Przedpelski A, et al. Subunit vaccine efficacy against botulinum neurotoxin subtypes. *Vaccine*, 2011, 29: 7688-95
- [75] Smith LA. Development of recombinant vaccines for botulinum neurotoxin. *Toxicon*, 1998, 36: 1539-48
- [76] You Z, Yang H, Xin W, et al. Preparation of egg yolk antibodies against BoNT/B and their passive protection in mouse models. *Hum Vaccin Immunother*, 2014, 10: 2321-7
- [77] Sheridan RE, Deshpande SS, Nicholson JD, et al. Structural features of aminoquinolines necessary for antagonist activity against botulinum neurotoxin. *Toxicon*, 1997, 35: 1439-51
- [78] Eubanks LM, Silhar P, Salzameda NT, et al. Identification of a natural product antagonist against the botulinum neurotoxin light chain protease. *ACS Med Chem Lett*, 2010, 1: 268-72
- [79] Chen C, Fu Z, Kim JJ, et al. Gangliosides as high affinity receptors for tetanus neurotoxin. *J Biol Chem*, 2009, 284: 26569-77
- [80] Blum FC, Chen C, Kroken AR, et al. Tetanus toxin and botulinum toxin utilize unique mechanisms to enter neurons of the central nervous system. *Infect Immun*, 2012, 80: 1662-9
- [81] Fan Z, Guan H, Luo S, et al. Validation on the elimination of neonatal tetanus programs through Lot Quality Assurance-Cluster Sample Survey in China. *Chn J Epidemiol*, 2014, 35: 163-6
- [82] Hunter SE, Clarke IN, Kelly DC, et al. Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* ϵ -toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 1992, 60: 102-10
- [83] Popoff MR. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *FEBS J*, 2011, 278: 4602-15
- [84] Minami J, Katayama S, Matsushita O, et al. Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of ϵ -toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. *Microbiol Immunol*, 1997, 41: 527-35
- [85] Freedman JC, Li J, Uzal FA, et al. Proteolytic processing and activation of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by caprine small intestinal contents. *MBio*, 2014, 5
- [86] Dorca-Arevalo J, Martin-Satue M, Blasi J. Characterization of the high affinity binding of ϵ toxin from *Clostridium perfringens* to the renal system. *Vet Microbiol*, 2012, 157: 179-89
- [87] Nagahama M, Ochi S, Sakurai J. Assembly of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin on MDCK cell membrane. *J Nat Toxins*, 1998, 7: 291-302
- [88] Petit L, Gibert M, Gourch A, et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin rapidly decreases membrane barrier permeability of polarized MDCK cells. *Cell Microbiol*, 2003, 5: 155-64
- [89] Wioland L, Dupont JL, Bossu JL, et al. Attack of the nervous system by *Clostridium perfringens* ϵ toxin: from disease to mode of action on neural cells. *Toxicon*, 2013, 75: 122-35
- [90] Ivie SE, McClain MS. Identification of amino acids important for binding of *Clostridium perfringens* ϵ toxin to host cells and to HAVCR1. *Biochemistry: Mosc*, 2012, 51: 7588-95
- [91] Cole AR, Gibert M, Popoff M, et al. *Clostridium perfringens* ϵ -toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11: 797-8
- [92] Nagahama M, Sakurai J. Distribution of labeled *Clostridium perfringens* ϵ toxin in mice. *Toxicon*, 1991, 29: 211-7
- [93] Buxton D. Use of horseradish peroxidase to study the antagonism of *Clostridium welchii* (Cl. perfringens) type D epsilon toxin in mice by the formalinized ϵ prototoxin. *J Comp Pathol*, 1976, 86: 67-72
- [94] Nagahama M, Sakurai J. High-affinity binding of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin to rat brain. *Infect Immun*, 1992, 60: 1237-40
- [95] Ivie SE, Fennessey CM, Sheng J, et al. Gene-trap mutagenesis identifies mammalian genes contributing to intoxication by *Clostridium perfringens* ϵ -toxin. *PLoS One*, 2011, 6: e17787
- [96] Rumah KR, Ma Y, Linden JR, et al. The myelin and lymphocyte protein MAL Is required for binding and activity of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin. *PLoS Pathog*, 2015, 11: e1004896
- [97] Shortt SJ, Titball RW, Lindsay CD. An assessment of the *in vitro* toxicology of *Clostridium perfringens* type D ϵ -toxin in human and animal cells. *Hum Exp Toxicol*, 2000, 19: 108-16
- [98] Borrmann E, Gunther H, Kohler H. Effect of *Clostridium perfringens* ϵ toxin on MDCK cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2001, 31: 85-92
- [99] Chassin C, Bens M, de Barry J, et al. Pore-forming ϵ toxin causes membrane permeabilization and rapid ATP depletion-mediated cell death in renal collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293: F927-37
- [100] Finnie JW. Histopathological changes in the brain of mice given *Clostridium perfringens* type D ϵ toxin. *J Comp Pathol*, 1984, 94: 363-70
- [101] Miyamoto O, Minami J, Toyoshima T, et al. Neurotoxicity of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin for the rat hippocampus via the glutamatergic system. *Infect Immun*, 1998, 66: 2501-8
- [102] Miyamoto O, Sumitani K, Nakamura T, et al. *Clostridium perfringens* ϵ toxin causes excessive release of glutamate in the mouse hippocampus. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 189: 109-13
- [103] Lonchamp E, Dupont JL, Wioland L, et al. *Clostridium perfringens* ϵ toxin targets granule cells in the mouse cerebellum and stimulates glutamate release. *PLoS One* 2010, 5
- [104] Dorca-Arevalo J, Soler-Jover A, Gibert M, et al. Binding of ϵ -toxin from *Clostridium perfringens* in the nervous system. *Vet Microbiol*, 2008, 131: 14-25
- [105] Uzal FA, Kelly WR, Thomas R, et al. Comparison of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D ϵ toxin in intestinal contents and other body fluids

- of sheep and goats. *J Vet Diagn Invest*, 2003, 15: 94-9
- [106] Uzal FA, Wong JP, Kelly WR, et al. Antibody response in goats vaccinated with liposome-adjuvanted *Clostridium perfringens* type D ϵ toxoid. *Vet Res Commun*, 1999, 23: 143-50
- [107] Lobato FC, Lima CG, Assis RA, et al. Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D ϵ toxoid in ruminants. *Vaccine*, 2010, 28: 6125-7
- [108] Oyston PC, Payne DW, Havard HL, et al. Production of a non-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin which induces protective immunity in mice. *Microbiology*, 1998, 144: 333-41
- [109] Li Q, Xin W, Gao S, et al. A low-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin as a potential candidate vaccine against enterotoxemia. *Hum Vaccin Immunother*, 2013, 9: 2386-92
- [110] Odendaal MW, Visser JJ, Bergh N, et al. The effect of passive immunization on active immunity against *Clostridium perfringens* type D in lambs. *Onderstepoort J Vet Res*, 1989, 56: 251-5
- [111] Clarkson MJ, Faull WB, Kerry JB. Vaccination of cows with clostridial antigens and passive transfer of clostridial antibodies from bovine colostrum to lambs. *Vet Rec*, 1985, 116: 467-9
- [112] El-Enbaawy MI, Abdalla YA, Hussein AZ, et al. Production and evaluation of a monoclonal antibody to *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *Egypt J Immunol*, 2003, 10: 77-81
- [113] Percival DA, Shuttleworth AD, Williamson ED, et al. Anti-idiotypic antibody-induced protection against *Clostridium perfringens* type D. *Infect Immun*, 1990, 58: 2487-92
- [114] Pelish TM, McClain MS. Dominant-negative inhibitors of the *Clostridium perfringens* ϵ -toxin. *J Biol Chem*, 2009, 284: 29446-53