

综 述

病原弧菌的致病机理

吴后波 潘金培

(中国科学院南海海洋研究所 LED 重点实验室, 广州 510301)

VIRULENCE MECHANISMS OF PATHOGENIC *VIBRIO*

WU Hou-Bo and PAN Jin-Pei

(South China Sea Institute of Oceanology, LED, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301)

关键词: 弧菌病; 弧菌; 致病机理

Key words: Vibriosis; *Vibrio*; Virulence mechanisms

中图分类号: S941.42 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)04-0422-005

由弧菌属细菌 (*Vibrio* spp.) 引起的弧菌病 (Vibriosis) 是在世界各地海水养殖鱼、虾、贝类等动物中普遍流行、危害最大的细菌性疾病。在已知的弧菌中, 有 10 多种是海洋养殖动物的病原菌。长期以来, 人们对病原弧菌的致病性研究一直是利用分离菌株对养殖动物进行各种方式的人工感染, 通过观察实验动物是否发病来判断病原弧菌的致病性, 而对弧菌病的发生、发展等过程缺乏深入的了解。由于对病原弧菌致病机理的研究最终将会为弧菌病的防治提供可靠的科学依据, 近十年来, 对病原弧菌的致病机理研究已成为对弧菌病研究的重点和最活跃的研究领域, 研究工作主要包括对常见的病原弧菌在养殖动物体内外环境中的生存能力、侵袭能力及抗宿主的防御能力等方面的研究。大量的研究表明, 大多数病原弧菌具备较强的侵袭能力、适应宿主体内环境并在宿主体内生长繁殖的能力、抵抗宿主特异性及非特异性免疫清除的能力以及分泌多种毒力因子的能力等。随着医学微生物学及分子生物学技术的不断发展, 当今对病原弧菌致病机理的研究热点已进入了分子生物学和超微结构观察阶段, 如对病原弧菌的毒力因子进行了蛋白质结构及其调控基因的分析, 寻找其毒性结构基因、遗传表达的位点及方式, 通过电镜观察病原弧菌的侵袭途径, 了解病原弧菌的吸附方式及其吸附受体等。

与其他病原菌一样, 弧菌的致病性取决于弧菌与宿主细胞间的相互作用, 致病过程也包括黏附、侵袭、体内增殖及产生毒素等系列过程, 而这些过程又与弧菌产生的各种毒力因子有关。目前已发现的弧菌毒力因子有外毒素 (Exotoxin)、

蛋白酶 (Protease)、荚膜 (Capsule)、载铁体 (Siderophore) 及外膜蛋白 (Outer membrane protein, OMP) 等。

1 黏附作用 (Adhesion)

黏附作用是细菌感染的第一步, 它对细菌侵入宿主细胞并有效发挥毒素等的作用具有重要意义。鳗弧菌 (*V. anguillarum*)、病海鱼弧菌 (*V. ordalii*) 能凝集来自人类 O 型血、豚鼠、虹鳟以及多种家禽类的红细胞^[1], 鳗弧菌的这种凝集作用有的能被甘露糖抑制, 表现为甘露糖敏感型, 即 MSHA (Mannose-sensitive hemagglutination), 有的不能被甘露糖抑制, 表现为甘露糖抑制型, 即 MRHA (Mannose-resistant hemagglutination), 而病海鱼弧菌的这种凝集作用则全部表现为甘露糖抑制型。

弧菌具有多种黏附素, 菌体的胞外产物如蛋白酶类以及菌体本身的组成成分如外膜蛋白等, 均可介导弧菌黏附于宿主细胞。最小弧菌 (*V. mimicus*) 可以产生 3 种类型的黏附素^[2], 第 1 种是分子量为 31kD 的具有凝血作用的金属性胞外蛋白酶 (Vm-HA/protease), 第 2 种是与菌体细胞壁脂多糖 LPS 有关的黏附素 (Vm-LPSHA, *Vibrio mimicus* LPS hemagglutinin), 第 3 种黏附素是分子量为 39kD 的外膜蛋白 (Vm-OM-PHA, *Vibrio mimicus* outer membrane hemagglutinin)。后两种黏附素的主要成分均是菌体细胞的组成成分, 菌体的细胞结构成分参与了这两种黏附素的血凝作用, 因此这种血凝作用又称细胞介导的血凝作用 (Cell-mediated hemagglutination)。

菌毛是病原弧菌的定居因子, 在病原弧菌的黏附过程中

收稿日期: 2002-10-20; 修订日期: 2002-12-30

基金项目: 广东省“科技创新百项工程”资助项目 99B06201G; 中国科学院知识创新工程资助项目 KSCX2-1-04; “十五”国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 2001AA622050

作者简介: 吴后波 (1967—), 男, 湖北洪湖市人; 博士, 副研究员; 研究方向: 海洋生物病害; E-mail: hb.w@netease.com

起作用,虽然有报道菌毛在创伤弧菌(*V. vulnificus*)、最小弧菌的致病过程中介导菌体远距离的黏附^[3],但其机理还不清楚。有关弧菌菌毛的类型、菌毛的组成成分、菌毛是否是弧菌的保护性抗原等问题有待进一步的研究。

弧菌黏附素的受体尚不十分清楚。目前仅知一些糖蛋白能结合到弧菌菌体上,从而抑制血凝及黏附作用,如甘露糖、粘蛋白等,此外细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)也是弧菌黏附的重要底物。尽管 ECM 在正常情况下不外露,但当组织器官被机械、理化及生物因子损坏后,ECM 则裸露出来,弧菌即可黏附其上。ECM 在体内广泛存在,其结构相当保守,不同动物体内胶原蛋白的结构大致相同,这为解释弧菌感染的广谱性及致病的多样性提供了依据。

2 荚膜(Capsule)

荚膜是菌体的表层结构,完整地包裹着细菌的菌体,构成细菌与外界环境之间的第一道屏障,是病原菌的一个很重要的毒力因子。Amako 等人^[4]对病原性创伤弧菌 FCC 和非病原性创伤弧菌 ATCC27562 进行钉红染色并在电镜下观察,发现病原性创伤弧菌 FCC 的细胞表面有一薄层染色很深的结构,而非病原性创伤弧菌 ATCC27562 则没有。采用冰冻蚀刻术对细胞的表面作进一步的观察,在电镜下,病原性创伤弧菌 FCC 可以看到一薄层电子密度低的纤维层,这就是电镜下的荚膜成分,因此可以确定病原性创伤弧菌能产生荚膜。Kreger 等人^[5]以及 Shinoda 等人^[6]通过血清学方法和化学方法,证实了 Amako 等人在电镜下观察的结果,进一步确定病原性创伤弧菌能产生荚膜。

Yoshida 等人^[7]在研究创伤弧菌致病机理的过程中发现,创伤弧菌在固体培养基上的菌落有 2 种类型,一种菌落透明,一种菌落不透明;电镜观察发现,菌落透明的创伤弧菌不产生荚膜,而菌落不透明的创伤弧菌能产生荚膜。菌落不透明、产荚膜的创伤弧菌具有致病性,能抵抗血清的杀菌作用、具吞噬活性、对小鼠有致死性、对豚鼠的上皮组织有很强力的侵袭作用;菌落透明、不产荚膜的创伤弧菌没有致病性。产荚膜的创伤弧菌可以转变为不产荚膜,其频率为 $1/10^4$,完成这种转变后,创伤弧菌失去致病性,至今还没有不产荚膜的创伤弧菌转变为产荚膜的创伤弧菌的报道。以上结果表明,荚膜是创伤弧菌的重要毒力因子,创伤弧菌的致病性与荚膜的有无直接相关,Wright^[8]等人也证明了这种相关性。

3 载铁体(Siderophore)

铁是细胞色素及过氧化氢酶的组成成分,为细菌生长、繁殖所必需。宿主体内的铁主要存在于红细胞及转铁蛋白、乳铁蛋白中,游离铁极少,浓度只能达到 10^{-18} mol/mL,而细菌生长繁殖所需游离铁的浓度至少要达到 10^{-6} mol/mL^[9],因此无法满足细菌生长、繁殖的需要。为了能在宿主体内生长和繁殖,病原弧菌形成了 2 种获铁途径,一种途径是产生外毒素破坏红细胞,释放血红素,如鳃弧菌^[10];另一种途径

就是产生载铁体^[11],如创伤弧菌^[12]能产生一种低分子量的螯合剂—载铁体,它对铁具有高度的亲和性,能从转铁蛋白、乳铁蛋白中摄取铁。

病原弧菌不同,产生载铁体的能力及载铁体的种类也不同。创伤弧菌、河流弧菌能产生酚盐类载铁体(Phenolate-type siderophore),这种类型的载铁体类似于大肠杆菌产生的肠杆菌素(Enterobactin),含有 2,3-二羟基苯甲酸(2,3-DHB)。最小弧菌产生的载铁体与气单胞菌产生的载铁体气单胞菌素(Aerobactin)相似。创伤弧菌还能产生一种独特的羟基肟盐类载铁体(Hydroxamate-type siderophore),这种载铁体的生物活性比酚盐类载铁体更强,它能在 pH 值很低的情况下结合铁离子,有关这种载铁体的分子结构有待进一步的研究,在目前已知的病原弧菌中,只有创伤弧菌可同时产生这两种类型的载铁体。Actis 等人^[13]对鳃弧菌产生的载铁体化学结构进行了深入的研究,发现这种载铁体属于酚盐类载铁体,含有两个苯酚结构,与其他酚盐类载铁体的结构不同,是一种新的载铁体类型,Actis 等人将其命名为鳃弧菌素(Anguibactin)。副溶血弧菌能产生一种结构比较新的载铁体,Yamamoto 等人将这种载铁体命名为弧菌铁素(Vibrioferriin, VF),弧菌铁素只能结合转铁蛋白中的铁离子,不能结合乳铁蛋白中的铁离子。

近十年来,国外对载铁体的遗传调控机制进行了大量的研究。Crosa 等人对太平洋鲑鱼弧菌病的鳃弧菌 775 进行了深入的研究,结果表明,鳃弧菌 775 的载铁体产生是由质粒 pJM1 编码控制的,如果清除该质粒,鳃弧菌 775 就失去致病性^[14]。鳃弧菌 775 的摄铁系统(Iron-sequestering system)由两个重要的部分组成,一个是载铁体(鳃弧菌素),一个是位于鳃弧菌 775 细胞膜上的载铁体受体—分子量为 86kD 的外膜蛋白 OM2(Outermembrane protein)^[15],鳃弧菌 775 在其摄铁的过程中还合成另外一种外膜蛋白 OM3,分子量为 79kD,该蛋白在鳃弧菌 775 摄铁及致病的过程中起什么样的作用还有待进一步研究。鳃弧菌素是由质粒 pJM1 上大小为 20kb 左右的片断来编码,Actis 等人^[16]证实外膜蛋白 OM2 同样也是由质粒 pJM1 上大小为 20kb 左右的片断来编码,但是外膜蛋白 OM3 却不是由质粒 pJM1 编码,而是由鳃弧菌 775 的染色体编码。并不是所有病原鳃弧菌的摄铁系统都是由质粒进行遗传调控的,Toranzo 等人^[17]发现,西班牙西北部大西洋海岸比目鱼弧菌病的病原鳃弧菌没有质粒存在,因此它的摄铁系统不可能由质粒控制,Lemos 等人^[18]进一步的研究证实这种鳃弧菌的摄铁系统是由鳃弧菌染色体编码的。

4 外膜蛋白(Outer membrane protein, OMP)

革兰氏阴性菌特有的外膜蛋白 OMP(Outer membrane protein)的致病作用越来越受到重视。近年来对弧菌的外膜蛋白亦进行了较深入的研究,发现它与细菌的黏附及摄铁过程密切相关,是重要的致病因子。

弧菌具有多种外膜蛋白。最小弧菌的外膜蛋白分子量为 39kD,它介导最小弧菌近距离黏附于红细胞,实际上是最

小弧菌的血凝素,这种血凝作用受粘蛋白、胎球蛋白等糖蛋白的抑制,但不受单糖类、二糖类以及 N-乙酰糖类的抑制。

创伤弧菌具有两种受铁离子调节的外膜蛋白^[19],分子量分别为 72kD 和 77kD,这两种外膜蛋白主要参与创伤弧菌对铁的吸收作用。鳃弧菌 775 外膜蛋白 OM2 的分子量为 86kD,它是鳃弧菌 775 的摄铁系统的一个重要组成部分,在鳃弧菌的致病过程中,作为鳃弧菌素与铁离子复合物的受体而起作用,在鳃弧菌摄铁的过程中还有另一种分子量为 79kD 的外膜蛋白 OM3 的参与。此外,Simon 等人^[20]还认为鳃弧菌膜蛋白的主要骨架成分(Main outer membrane protein, MOMP)可能是鳃弧菌各个不同血清型的共同抗原。

5 胞外产物 ECP(Extracellular product, ECP)

病原弧菌可产生多种胞外产物,菌株不同所产生的胞外产物亦不同。胞外产物 ECP 中与致病有关的毒力因子包括蛋白酶类及外毒素,蛋白酶类包括明胶酶(Gelatinase)、胶原蛋白酶(Collagenase)、弹性蛋白酶(Elastolytic protease)等,外毒素包括溶血素(Hemolysin)、细胞溶素(Cytolysin)以及肠毒素(Enterotoxin)等。

5.1 创伤弧菌产生的蛋白酶类

5.1.1 明胶酶(Gelatinase) Carruthers 等人^[21]首次发现病原性创伤弧菌能产生能分解明胶的蛋白酶,这种蛋白酶没有明显的底物特异性,可直接造成广泛的组织损伤,从而有利于该菌突破宿主的防线并在体内迅速扩散。

5.1.2 胶原蛋白酶(Collagenase) Smith 等人^[22]在培养病原性创伤弧菌的海水普通培养基中添加经水解后的酪蛋白,创伤弧菌生长得很好,能形成很好的透明斑,这表明病原性创伤弧菌能产生分解酪蛋白的胶原蛋白酶。进一步的研究表明,培养基中添加胶原蛋白或胰蛋白胨能提高胶原蛋白酶的产生,而 EDTA 则抑制胶原蛋白酶的产生。病原性创伤弧菌产生胶原蛋白酶有助于提高其在宿主体内的侵袭力。

5.1.3 弹性蛋白酶(Elastolytic protease) Kothary 等人^[23]证明病原性创伤弧菌能产生弹性蛋白酶。创伤弧菌产生这种蛋白酶的最佳时期是对数生长期,培养基中需添加 2% 的胰蛋白胨,含 1.5% 的氯化钠。这种蛋白酶的分子量大约为 50kD,等电点为 5.8,分解弹性蛋白的最适 pH 值为 7-8。重金属离子、高温以及低 pH 值均影响该酶的活性。

创伤弧菌胞外产物中除了蛋白酶外,还有其他的酶类也与致病过程有关,如磷脂酶 A₂(Phospholipase A₂)及磷脂酶 B(Lysophospholipase)。Testa 等人^[24]发现病原性创伤弧菌培养上清液具有磷脂酶 A₂ 及磷脂酶 B 活性,具有细胞毒作用。

5.2 鳃弧菌产生的蛋白酶类

Kanemori 等人^[25]对鳃弧菌的胞外产物进行了研究,发现该胞外产物的毒性在于其中的一种蛋白酶,通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得其分子量大约为 36kD, Norqvist 等人^[26]发现,这种蛋白酶需要 Zn²⁺ 来维持其活性, Ca²⁺ 来维持其稳定性。

5.3 最小弧菌产生的蛋白酶类

Dotevall 等人^[27]首次报道最小弧菌能产生胞外酶,但他

们没有将该酶进一步分离、提纯。Chowdhury 等人^[28]对该酶进行了分离、提纯,测得其分子量大约为 31kD,该酶具有水解蛋白的特性以及血细胞凝集作用(Vm-HA/protease),但这两种活性均受到温度和金属离子抑制剂的影响,因此这种蛋白酶属于热敏感性蛋白酶。Chowdhury 等人还对这种蛋白酶在最小弧菌致病过程中所起的作用进行了深入的研究,结果表明,这种蛋白酶可以提高最小弧菌对宿主血管的穿透性,并引起水肿的形成,但这种穿透性的提高受到大豆胰蛋白酶抑制剂的抑制。

5.4 溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)产生的蛋白酶类

Long 等人^[29]首先报道溶藻弧菌能产生碱性丝氨酸蛋白酶。Hare 等人^[30]对溶藻弧菌能产生多少种碱性丝氨酸蛋白酶以及组氨酸是怎样调节碱性丝氨酸蛋白酶的产生作了深入的研究,他们发现,溶藻弧菌能产生 5 种分子量不同的碱性丝氨酸蛋白酶,这 5 种蛋白酶的分子量分别为 28kD、22.5kD、19.5kD、15.5kD、14.5kD,这 5 种蛋白酶的活性受到丝氨酸蛋白酶抑制剂的抑制,组氨酸对这 5 种酶的活性没有抑制作用。最近, Lee 等人^[31]又报道溶藻弧菌能产生一种分子量为 33kD 的丝氨酸蛋白酶。

5.5 哈氏弧菌(*V. haeveyi*)产生的蛋白酶类

Fukasawa 等人^[32]报道了来自海水中的哈氏弧菌能产生 3 种碱性蛋白酶,这 3 种蛋白酶对金属螯合剂敏感。台湾的刘平春等人^[33]对分离自病虾的哈氏弧菌 820514 所产生的蛋白酶进行了研究,他们发现这种蛋白酶属于碱性半胱氨酸蛋白酶,分子量大约为 38kD,其活性可以完全被 CuCl₂ 和 HgCl₂ 抑制,2-巯基乙醇是该酶最有效的还原剂,发现这种性质的蛋白酶在弧菌属细菌中尚属首次。

5.6 外毒素

5.6.1 细胞溶素 Gray 等人^[34]对创伤弧菌的细胞溶素进行了分离提纯,他们发现该细胞溶素是一种热不稳定性的疏水性蛋白质,分子量大约为 56kD。该细胞溶素具有溶血性,对中国仓鼠卵巢细胞具有细胞毒作用,对小鼠具有致死性,它对小鼠的半致死浓度 LD₅₀ 为 3.0μg/kg。

细胞溶素是美人鱼弧菌(*V. damsela*)的重要毒力因子^[35],美人鱼弧菌产生的细胞溶素分子量为大约 69kD。这种细胞溶素产生的最佳时间是美人鱼弧菌对数生长期的中、后期,而且要求培养基中含有 0.5% 的 Na⁺,当培养基中的 Na⁺ 浓度高于 0.8% 时,细胞溶素的产量就会下降。

5.6.2 溶血素 创伤弧菌产生的溶血素 VVH(*Vibrio vulnificus* hemolysin, VVH)具热不稳定性,它不仅能溶解多种哺乳动物的红细胞,对中国仓鼠卵细胞具有杀灭作用,而且还能提高创伤弧菌对血管的通透性^[36]。Tison 等人^[37]对这种溶血素的产生条件进行了研究,发现产生溶血素的最佳时间为创伤弧菌的对数生长期,最佳培养基为 HIB 培养基(Heart infusion broth)。

溶血素也是鳃弧菌的重要毒力因子^[38]。Munn 对鳃弧菌的溶血素进行了深入的研究,他将这种溶血素提取出来,并测得其分子量大约为 19.1kD,神经节苷脂可以使该溶血

素失活,这表明这种溶血素有神经毒作用。

副溶血弧菌产生溶血素的机制比较复杂,有关它的溶血素研究主要集中在溶血素 TDH(Thermotable direct hemolysin, TDH)和溶血素 TRH(TDH-related hemolysin, TRH)上。溶血素 TDH^[39]是副溶血弧菌产生的一种热稳定性溶血素,产生该溶血素的培养基是一种血琼脂培养基—WA 琼脂培养基(Wagatsuma agar, WA),副溶血弧菌在 WA 琼脂上产生明显的 β 溶血,这种现象称为 Kanagawa 现象(Kanagawa phenomenon, KP),即神奈川现象。大量研究表明,几乎所有病原性副溶血弧菌都是 KP 现象阳性,能产生 TDH 溶血素;非病原性副溶血弧菌大多数是 KP 现象阴性,不产生 TDH 溶血素,但能产生一种与 TDH 溶血素相关的溶血素—TRH 溶血素。TDH 溶血素和 TRH 溶血素有着共同的抗原决定基,编码这两种溶血素的遗传基因具有 70% 相同的核苷酸序列,此外,产生 TRH 溶血素的副溶血弧菌能产生尿素酶,而产生 TDH 溶血素的副溶血弧菌却不能产生尿素酶。

最小弧菌可以产生两种类型的溶血素。一种类型是热稳定性溶血素,Yoshida 等人^[40]将这种热稳定性溶血素与副溶血弧菌产生的 TDH 溶血素进行了比较,发现这两种溶血素极其相似。另一种类型是热不稳定性溶血素,其免疫学特征与霍乱弧菌产生的溶血素相似^[41],这种溶血素的分子量为 63KD,其溶血活性受到 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等二价金属离子的抑制,此外还受到神经节苷脂的抑制,这表明红细胞膜上的神经节苷脂是这种溶血素的受体。

吴后波等人^[42]从养殖真鲷的最小弧菌中分离到一种分子量为 30.456kD 外毒素。该外毒素为单一的多肽,具有较强的溶血性和细胞毒性,对其氨基酸组分进行分析后发现,该外毒素天冬氨酸的含量最多,半胱氨酸的含量最少,更进一步的研究证实,该毒素活性的最适 pH 为 6—8,对胰酶有抗性,不耐热。

5.6.3 肠毒素 最小弧菌可以产生两种类型的肠毒素,一种是热敏感性的与霍乱毒素相关的肠毒素,这种肠毒素在 56℃ 下 30min 失去活性,一种是热稳定性的大肠杆菌肠毒素^[43]。河流弧菌产生的肠毒素不仅可以导致实验小白兔的肠内液体积聚,而且还具细胞毒作用,可使 CHO 的细胞变长,因此,这种肠毒素又称细胞延长因子(Cell elongation factor)^[44]。

病原弧菌产生的溶血素,有的不仅有溶血功能,而且还具有肠毒性,如最小弧菌产生的两种类型的溶血素及副溶血弧菌产生的溶血素 TDH、TRH 均具有肠毒性^[45]。

综上所述,病原弧菌的感染和致病是多种毒力因子相互协同作用的结果,这符合病原细菌致病作用的普遍机制。病原弧菌首先通过菌毛远距离黏附于感染部位的细胞,并在荚膜、外膜蛋白近距离黏附的协同作用下进一步增强其黏附力。病原弧菌在感染部位局部增殖,此时蛋白酶可降解黏附部位的蛋白质及细胞外基质 ECM,这样不仅可以为病原弧菌提供必需的营养,造成感染部位的组织损伤,如皮肤溃疡及肠炎等,而且还有利于病原弧菌突破宿主的防线并在体内广

为扩散。此外,蛋白酶还可以激活机体的血管舒张素—激肽级联机制,以增加感染部位的血管通透性,导致血液的渗出,从而引起感染部位的水肿及出血。毒力很强的病原弧菌,可从感染部位扩散至全身组织器官,并随血流扩散到肝、脾、肾等靶器官后,进行大量的增殖。

增殖速度对病原弧菌致病性极为重要,增殖速度快,就不易被机体的免疫机制清除而能在体内存活。病原弧菌增殖需大量的营养,这时蛋白酶通过降解组织为其提供氨基酸等营养成分,载体铁通过强夺转铁蛋白及乳铁蛋白中的铁为其提供必需的铁离子,大量的外毒素可以破坏机体的红细胞,通过释放血红素为其提供更多的铁离子。随着病原弧菌的大量增殖,蛋白酶和外毒素的大量产生,直接破坏宿主组织的结构和功能,加之红细胞被外毒素大量破坏,机体最终衰竭死亡。

参考文献:

- [1] Larsen J L, Møllergaard S. Agglutination typing of *Vibrio anguillarum* isolates from diseased fish and from the environment [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, **47**: 1261—1265
- [2] Alam M, Miyoshi S I, Tomochika K I, et al. Purification and characterization of a novel hemagglutinin from *Vibrio mimicus*: a 39-kD major outer membrane protein and lipopolysaccharide [J]. *Infect. Immun.*, 1996, **64**: 4035—4041
- [3] Uchimura M, Yamamoto T. Production of hemagglutinins and pili by *Vibrio mimicus* and its adherence to human and small intestines in vitro [J]. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 1992, **91**: 73—78
- [4] Amako K, Okada K, Miake S. Evidence for the presence of a capsule in *Vibrio vulnificus* [J]. *J. Gen. Microbiol.*, 1984, **130**: 2741—2743
- [5] Kreger A S, DeChatelet L, Shirley P. Interaction of *Vibrio vulnificus* with human polymorphonuclear leukocytes: association of virulence with resistance to phagocytosis [J]. *J. Infect. Dis.*, 1981, **144**: 244—248
- [6] Shinoda S, Kobayashi M, Yamada H, et al. Inhibitory effect of capsular antigen of *Vibrio vulnificus* on bactericidal activity of human serum [J]. *Microbiol. Immunol.*, 1987, **31**: 393—401
- [7] Yoshida S, Ogawa M, Mizuguchi Y. Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus* [J]. *Infect. Immun.*, 1985, **47**: 446—451
- [8] Wright A C, Simpson L M, Oliver J D, et al. Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus* [J]. *Infect. Immun.*, 1990, **58**: 1769—1773
- [9] Griffiths E, Rogers H J, Bullen J J. Iron, plasmids, and infection [J]. *Nature (London)*, 1980, **284**: 508—509
- [10] Inglis V, Roberts R J, Bromage N R. Bacterial diseases of fish [M]. London: Blackwell Scientific Publications 1993
- [11] Hider R C. Siderophore mediated absorption of iron [J]. *Struct. Bonding*, 1984, **58**: 25—87
- [12] Litwin C M, Rayback T W, Skinner J. Role of catechol siderophore synthesis in *Vibrio vulnificus* [J]. *Infect. Immun.*, 1996, **64**: 2748—2753
- [13] Actis L A, Fish W, Crosa J H, et al. Characterization of anguibactin,

- a novel siderophore from *Vibrio anguillarum* 775(pJM1)[J]. *J. Bacteriol.*, 1994, **167**, 57—65
- [14] Crosa J H, Hodges L L, Schiewe M H. Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* [J]. *Infect. Immun.*, 1980, **27**, 897—902
- [15] Crosa J H, Hodges L L. Outer membrane proteins induced under conditions of iron limitation in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* 775[J]. *Infect. Immun.*, 1981, **31**, 223—227
- [16] Actis L A, Potter S A, Crosa J H. Iron-regulated outer membrane protein OM2 of *Vibrio anguillarum* is encoded by virulence plasmid pJM1 [J]. *J. Bacteriol.*, 1985, **161**, 736—742
- [17] Toranzo A E, Barja J L, Potter S A, et al. Molecular factors associated with virulence of marine vibrios isolated from striped bass in Chesapeake bay [J]. *Infect. Immun.*, 1983, **39**, 1220—1227
- [18] Lemos M L, Salinas P, Toranzo A E, et al. Chromosome-mediated iron uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*[J]. *J. Bacteriol.*, 1988, **170**, 1920—1925
- [19] Litwin C M, Byrne B L. Cloning and characterization of an outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* required for heme utilization; regulation of expression and determination of the gene sequence [J]. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 3134—3141
- [20] Simon M, Mathes A, Blanch A, et al. Characterization of a porin from the outer membrane of *Vibrio anguillarum* [J]. *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 4182—4188
- [21] Carruthers M M, Kabat W J. *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* B59, 1981, 24
- [22] Smith G C, Merkel J R. Collagenolytic activity of *Vibrio vulnificus*; potential contribution to its invasiveness [J]. *Infect. Immun.*, 1982, **35**, 1155—1156
- [23] Kothary M H, Kreger A S. Production and characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus* [J]. *Journal of General Microbiology*, 1987, **133**, 1783—1791
- [24] Testa J, Daniel L W, Kreger A S. Extracellular phospholipase A₂ and lysophospholipase produced by *Vibrio vulnificus* [J]. *Infect. Immun.*, 1984, **45**, 458—463
- [25] Kanemori Y, Nakai T, Muroga K. The role of extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum* [J]. *Fish Pathol.*, 1987, **22**, 153—158
- [26] Norqvist A, Norman B, Wolf-Watz H. Identification and characterization of a Zinc metalloprotease association with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum* [J]. *Infect. Immun.*, 1990, **58**, 3731—3736
- [27] Dotevall H, Jonson-Stromberg G, Sanyal S, et al. Characterization of enterotoxin and soluble hemagglutinin from *Vibrio mimicus*; identity with *V. cholerae* O1 toxin and hemagglutinin [J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1985, **27**, 17—22
- [28] Chowdhury M A R, Miyoshi S, Shinoda S. Purification and characterization of a protease produced by *Vibrio mimicus* [J]. *Infect. Immun.*, 1990, **58**, 4195—4162
- [29] Long S, Mothibeli M A, Robb F T, et al. Regulation of extracellular alkaline protease activity by histidine in a collagenolytic *Vibrio alginolyticus* strain [J]. *Journal of General Microbiology*, 1981, **127**, 193—199
- [30] Hare P, Scott-Burden T, Woods D R. Characterization of extracellular alkaline protease and collagenase induction in *Vibrio alginolyticus* [J]. *Journal of General Microbiology*, 1983, **129**, 1141—1147
- [31] Lee K K, Chen F R, Yu S R, et al. Effects of extracellular products of *Vibrio alginolyticus* on penaeid prawn plasma components [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1995, **25**, 98—100
- [32] Fukasawa S, Nakanura K, Kamii A, et al. Purification and properties of a proteinase from a marine luminous bacterium, *Vibrio harveyi* strain FLA-11 [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1988, **52**, 435—441
- [33] Liu P C, Lee K K, Tu C C, et al. Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi* [J]. *Curr. Microbiol.*, 1997, **35**, 32—39
- [34] Gray L D, Kreger A S. Mouse skin damage caused by cytotoxin from *Vibrio vulnificus* and by *Vibrio vulnificus* infection [J]. *J. Infect. Dis.*, 1987, **155**, 236—241
- [35] Kothary M H, Kreger A S. Purification and characterization of an extracellular cytotoxin produced by *Vibrio damsela* [J]. *Infect. Immun.*, 1985, **49**, 25—31
- [36] Yamanaka H, Sugiyama K, Furuta H, et al. Cytolytic action of *Vibrio vulnificus* hemolysin on mast cells from rat peritoneal cavity [J]. *J. Med. Microbiol.*, 1990, **32**, 39—43
- [37] Tison D L, Kelly M T. Factors affecting hemolysin production by *Vibrio vulnificus* [J]. *Curr. Microbiol.*, 1984, **10**, 181—184
- [38] Toranzo A E, Barja J L, Potter S A, et al. Hemagglutinating, haemolytic and cytotoxic activities of *Vibrio anguillarum* and related vibrios isolated from striped bass on the Atlantic Coast [J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1983, **18**, 257—262
- [39] Takeda Y. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Pharmacol. Ther.*, 1983, **19**, 123—146
- [40] Yoshida H, Honda T, Miwatani T. Purification and characterization of a hemolysin of *Vibrio mimicus* that relates to thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1991, **84**, 249—254
- [41] Spira W M, Fedorka-Cray P J. Purification of enterotoxins from *Vibrio mimicus* that appear to be identical to cholera toxin [J]. *Infect. Immun.*, 1984, **45**, 679—684
- [42] Wu H B, Pan J P. Purification and characterization of the exotoxin Vm-Pm produced by *Vibrio mimicus*. *Ocean et limn. sin.*, 2002, **33**, 83—89. [吴后波, 潘金培. 海水养殖真鲷弧菌病原菌外毒素的分离、纯化及生物学活性[J]. 海洋与湖沼, 2002, **33**, 83—89]
- [43] Gyobu Y, Kodama H, Uetake H. Production and partial purification of a fluid-accumulating factor of non-O1 *Vibrio cholerae* [J]. *Microbiol. Immunol.*, 1988, **32**, 565—577
- [44] Lockwood D E, Kreger A S, Richardson S H. Detection of toxins produced by *Vibrio fluvialis* [J]. *Infect. Immun.*, 1980, **35**, 702—708
- [45] Nishibuchi M, Fasano A, Russell R G, et al. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin [J]. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 3539—3545