

# 伤寒杆菌内毒素与蛋白质结合的减毒作用

謝 彦 博

(卫生部生物制品研究所生物化学室, 北京)

降低内毒素的毒性而保留免疫原性的工作具有重要的实用意义, 但至今仍无理想的方法。本文报告一种结合减毒方法。按 Westphal 的水-酚法制备的伤寒菌内毒素, 经稀碱激活后与 10 倍量的酪蛋白或人血清白蛋白结合, 其毒性(用卡介苗致敏小鼠测定)可降低 3—4.5 倍; 免疫原性(家兔凝集素产生能力)在稀碱激活后稍有降低, 与蛋白质结合后仍可恢复到原来水平。以精制破伤风类毒素代替白蛋白与经激活之内毒素保温亦可稍降低其毒性。已激活之内毒素与白蛋白结合后再加入福马林至 0.4%, 在 37℃ 保温 16 日, 毒性又可大为降低。

在上述结果的基础上, 通过进一步的工作, 或可提供一种制造毒性较低的伤寒菌苗的方法。此外, 通过上述实验, 对蛋白质与内毒素之生物活性的关系, 也有进一步的了解。

内毒素是一类具有多种强烈生物活性的高分子类脂多醣蛋白质复合物, 其生物功能与化学成分及结构之关系尚远未被阐明。Westphal 等<sup>[1]</sup>认为其中结合牢固, 不易用一般脂溶剂抽提的类脂成分(他们称之为类脂 A)是毒性的载体; 但 Ribí 等<sup>[2]</sup>对此表示怀疑。Landy 等<sup>[3]</sup>认为内毒素的主要活性成分是脂多醣, 其中的蛋白质成分与各种活性无关; 此种看法亦未能被普遍接受。至于现在所谓内毒素究竟是一种具有多种生物功能的分子, 或是由多种具有单一生物功能的分子或次单位组成, 更无定论。因此, 研究内毒素生物功能与化学成分的关系, 以及研究各种生物功能是否可以分开或选择性降低的问题, 有着重要的意义。

对免疫学工作者来说, 最关心的是降低或排除内毒素的毒性而保留免疫原性的问题。以往从事这方面工作的很多<sup>[4]</sup>, 结果多不能令人满意。因内毒素经各种处理后, 往往毒性及免疫原性同时降低或消

失。

Westphal 等<sup>[5]</sup>曾报告内毒素经稀碱激活后, 获得与蛋白质、胆固醇等结合成复合物之能力, 并初步指出如与 25 倍量的胆固醇结合后, 热原性可降低 8 倍, 但未作毒性及免疫原性试验。鉴于内毒素之毒性与热原性有相似之处。我们进行了伤寒杆菌内毒素与蛋白质结合的减毒试验。结果说明, 此内毒素经稀碱激活再与 10 至 50 倍量之蛋白质结合后, 毒性共可降低 4 倍。免疫原性(家兔凝集素产生试验)在激活后稍有降低, 但与蛋白质结合后又恢复至原来水平。因此, 本文提供了一种新的内毒素减毒方法——结合减毒方法。此外, 对蛋白质在内毒素生物活性中的作用, 也提供了一些线索。

## 材料和方法

伤寒杆菌内毒素之制备 伤寒杆菌 0-901

本文 1964 年 5 月 30 日收到。

株用蛋白陈琼脂培养基培养, 菌体经福与林处理后<sup>1)</sup>, 按 Westphal 等<sup>[6]</sup>的热酚或冷酚法提取。制品之小鼠毒性(健康小鼠): LD<sub>50</sub> 约在 0.3 毫克左右。小鼠自动保护力: 当攻击一个致死量的 0-901 菌时, ED<sub>50</sub> 在 0.005 毫克左右。

**卡介苗致敏小鼠毒性之测定** 基本上按 Suter 等<sup>[7]</sup>的方法进行。14—16 克小白鼠, 每只尾静脉注射新制备的卡介苗<sup>1)</sup> 2 毫克/0.2 毫升。10 至 14 日后腹腔注射 0.5 毫升或静脉注射 0.2 毫升内毒素样品。样品浓度按 2 倍稀释, 共 4 个稀释度。每稀释度注射 9—10 只。观察死亡情况 3 天。按 Reed 及 Muench 法计算 LD<sub>50</sub> 或按机率单位直线迴归法计算 LD<sub>50</sub> 及作显著性测验。

**家兔凝集素产生试验** 用体重约 2,000 克家兔, 先测定自然抗体凝集价, 然后静脉注射样品 5 次, 每次间隔 3 或 4 天。免疫剂量(按其中所含内毒素计)依次为 1、2.5、5、7.5、10 微克。免疫后 7 天采血。用 0-901 菌测定 O 凝集价。

## 实 验 结 果

### (一) 伤寒内毒素之激活及激活内毒素之一般性质

内毒素之激活按 Westphal 等<sup>[5]</sup>的方法进行, 但对激活条件进行了筛选。选出有对其生物性质破坏不大而具有相当结合能力条件的如下: 取内毒素 3—4 毫克, 置 1 毫升 0.25N NaOH 中, 37℃ 保温 18 分钟后, 用 1N HCl 中和之, 再加 6 倍体积 95% 乙醇, 4—6℃ 放置后 4—6℃ 离心。所得沉淀真空干燥, 是为激活之内毒素。

按 Westphal 等<sup>[5]</sup>的方法测定其与酪蛋白结合的能力为 1:5 至 1:10, 即能与 5 至 10 倍量结合; 与胆固醇结合能力为 1:20 至 1:40。与未激活毒素相比, 激活内毒素之毒性稍有降低见表 1, 但免疫原性亦稍有降低(见表 6)。

### (二) 内毒素与蛋白质之结合

内毒素溶液 2 毫升(含内毒素 500 微克), 加蛋白质溶液 0.5 毫升(5 毫克酪蛋白在 0.1N NaOH 中或 5 毫克人血清白蛋白在 0.1N NaOH 或生理盐水中)。此时内毒素与蛋白质之比值为 1:10。在 37℃ 水浴保温 30 分钟, 其间摇匀 1—2 次。保温后用生理盐水稀释成所需内毒素浓度(用 0.1N NaOH 者, 尚用 HCl 中和)。另取上述的内毒素溶液 2 毫升, 加 0.5 毫升 0.1N NaOH 或生理盐水, 同法保温及中和, 作为对照组。用同一天同一批卡介苗致敏的小鼠作毒性测定。

### (三) 激活内毒素与酪蛋白结合后之小鼠毒性

用上述条件激活 4 批冷酚或热酚法内毒素共 6 批次。用此 6 次所得激活内毒素按上述方法与 10 倍量之酪蛋白作结合实验共 26 批次。实验结果综合如表 2。为了显示激活内毒素与其蛋白质复合物之毒性差别, 将其各别结果用机率单位直线迴归法计算 LD<sub>50</sub> 及作显著性测验, 并以机率

表 1 稀碱激活及未激活内毒素之小鼠毒性\*比较

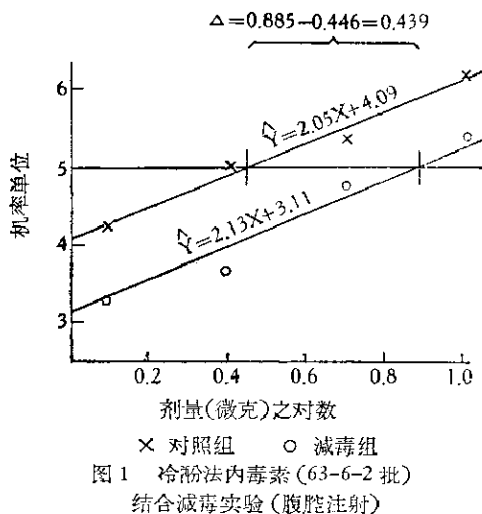
样 品	内毒素腹腔注射剂量组				LD <sub>50</sub> 微克	减毒倍数**
	10微克	5微克	2.5微克	1.25微克		
未激活内毒素(批号冷酚 63-6)	18/18***	18/18	14/18	3/18	1.8	
激活内毒素(批号冷酚 63-6-2)	18/18	15/18	8/18	3/18	2.7	1.5

\* 卡介苗致敏, 后同。

\*\* 减毒倍数 = 减毒组 LD<sub>50</sub>/对照组 LD<sub>50</sub>。

\*\*\* 死亡数/总数。

1) 分别由本所菌苗室伤寒组及卡介苗组供给。



单位对剂量之对数作图，绘出迴归线如图1。

从表2及图1可见激活内毒素与10倍量的酪蛋白结合后毒性一般降低2—3倍。经统计学处理的两批结果，*P*值均小于0.001。各批号之间、冷酚法或热酚法内毒素之间差别不大。此种毒性降低现象在腹腔或静脉注射内毒素时均能表现出来，可见此乃内毒素本身的改变，并非由于外

加的蛋白质对于腹腔或腹膜的局部作用。  
在毒性方面，内毒素经激活后稍有降低（约1.5倍），与酪蛋白结合后则继续降低（约2—3倍）。总的算起来，内毒素经过如此的激活和结合过程，毒性共降低3—4.5倍。

（四）不同的激活内毒素蛋白质比值对减毒效果的影响

在反应体系中固定酪蛋白的浓度为2毫克/毫升，但改变激活内毒素的浓度，使后者与前者的比值各为1:2、1:5、1:10、1:20、1:50。其他条件及操作则同前不变。如此所得减毒实验结果见表3。

由表3可见，当比值为1:2或1:5时效果不明显，至1:10时即达最高，继续增大至1:20及1:50仍不能增加减毒效果。此结果可用激活内毒素与酪蛋白的结合能力解释之。前已提及，按本文条件激活之内毒素与酪蛋白之结合能力为1:5至1:10，即每单位重量之内毒素最多只能与10倍的酪蛋白结合，超过此量则不能结合，故减毒效果不再增加。但在比例为1:50时，减毒

表2 激活内毒素与10倍量酪蛋白结合后的减毒

内毒素批号	激活批号	注射途径	共作实验次数	组别	各剂量组（微克）死亡情况				LD <sub>50</sub> （微克）	减毒倍数	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
					10（1.0）*	5.0（0.5）	2.5（0.25）	1.25（0.125）				
冷酚63-6	1	腹腔	5	对照	22/29	21/32	18/32	9/32	2.64**	2.78**	3.65	<0.001
				减毒	19/31	12/33	7/33	4/33	7.33**			
	2	腹腔	12	对照	92/104	68/106	54/106	24/105	2.79**	2.75**	9.41	<<0.001
				减毒	71/105	45/105	9/105	4/105	7.67**			
		静脉	***2	对照	14/16	12/17	8/17	2/17	0.31	2.55		
				减毒	8/17	6/18	0/18	1/18	0.79			
热酚63-1	1	静脉	2	对照	16/19	11/18	8/18	3/18	3.4	2.1		
				减毒	9/18	7/18	2/18	0/18	7.2			

\* 括号内为静脉注射剂量。  
\*\* 用机率单位直线回归法算出，其余按 Reed 及 Muench 法。  
\*\*\* 与 50 倍量的酪蛋白保温。

表 3 激活伤寒内毒素(批号冷酚 63-6-2)与不同量的酪蛋白保温后的小鼠毒性(腹腔注射)

激活内毒素与酪蛋白的比例	共作次数	各剂量组(微克)死亡情况				LD <sub>50</sub> (微克)	减毒倍数
		10	5.0	2.5	1.25		
1:0	4	36/37	25/37	17/37	5/37	3.00	
1:2	2	18/18	10/19	7/19	3/19	3.50	1.17
1:5	2	16/18	11/18	5/18	4/17	3.55	1.18
1:10	3	14/26	13/26	2/26	0/26	6.50	2.17
1:20	3	22/26	10/26	0/26	0/26	6.15	2.05
1:50	3	19/26	15/26	0/26	2/26	5.10	1.70

表 4 未激活伤寒内毒素(冷酚 63-6 批)与酪蛋白保温后之小鼠毒性(腹腔注射)

酪蛋白量	共作次数	组别	各剂量组(微克)死亡情况				LD <sub>50</sub> 微克	减毒倍数	t 值	P 值
			10	5.0	2.5	1.25				
10倍	2	对照	14/18	9/18	9/18	6/18	3.01*	0.83*	0.42	>0.5
		实验	15/18	11/18	8/18	7/18	2.51*			
50倍	3	对照	24/28	19/28	13/28	5/28	3.08*	1.45*	1.72	<0.1
		实验	19/27	16/27	10/27	3/27	4.46*			

\* 用机率单位直线回归法算出。

表 5 激活内毒素与 10 倍量的人血清白蛋白结合减毒

激活内毒素批号	保温条件	注射途径	实验次数	组别	各剂量组(微克)死亡情况				LD <sub>50</sub> (微克)	减毒倍数
					10(1.0)*	5.0(0.5)	2.5(0.25)	1.25(0.125)		
冷酚63-6-2	0.02N NaOH 37° 30分	腹腔	2	对照	19/19	15/19	14/19	6/19	1.9	2.1
				减毒	17/19	12/19	5/19	0/19	4.0	
冷酚63-6-3	同 上	静脉	1	对照	10/10	10/10	8/9	2/9	0.17	3.2
				减毒	6/10	5/10	3/10	0/10	0.54	
	生理盐水 37° 30分	静脉	2	对照	17/19	12/20	10/20	3/10	0.31	3.1
				减毒	8/20	5/20	1/20	0/10	0.96	

\* 括号内为静脉注射剂量。

表 6 激活内毒素与精制破伤风类毒素的减毒(静脉注射, 冷酚 63-6-3)

组别	次数	保温方法	各剂量(微克)组死亡情况				LD <sub>50</sub> 微克	减毒倍数
			2.0	1.0	0.5	0.25		
对照	3	生理盐水 37°C 30分	27/30	21/30	19/30	7/30	0.47	
减毒	3	100 微克激活内毒素在 2 毫升生理盐水中加精制破伤风类毒素 0.5 毫升 37°C 保温 30 分	24/30	18/30	11/30	5/30	0.73	1.55

效果反而降低。为何降低尚待深入研究。

### (五) 未激活内毒素与蛋白质作用能否减毒

为了进一步证实上述减毒作用的确是 由于激活内毒素与蛋白质之复合, 而非由于外加蛋白质对机体的内毒素敏感性直接发生影响, 我们曾采用未激活的内毒素与酪蛋白在相同条件下保温后, 观察毒性能否降低。结果见表 4。

从表 4 可见, 未激活内毒素与 10 倍量酪蛋白保温后毒性不但不降低, 反有轻微增加, 但  $t = 0.42$ ,  $P > 0.5$ , 故此种差别无显著性。酪蛋白量加大至 50 倍时, 减毒倍数亦只 1.45,  $t = 1.72$ ,  $P > 0.05$ , 此种差别亦不显著。由于未激活内毒素与蛋白质结合能力很低, 加入的酪蛋白绝大部分是在未结合状态。可见内毒素一定要与蛋白质结合后毒性方能降低。此外, 也可说明未结合的蛋白质本身对机体的内毒素敏感性无直接影响。

### (六) 激活内毒素与人血清白蛋白结合解毒

用人血清白蛋白(低温乙醇法制)代替酪蛋白, 在 0.02N 的 NaOH 或生理盐水条件下保温均可降低毒性。增加蛋白质或延长保温时间至 2 小时, 均不能加强效果(见表 5)。

### (七) 激活内毒素与精制破伤风类毒素结合减毒

用精制破伤风类毒素与激活内毒素在 37℃ 保温 30 分钟, 亦可降低毒性(见表 6)。

### (八) 未激活内毒素、激活内毒素及结合内毒素之免疫原性

此三种内毒素之家兔凝集素产生比较见表 7。

从表 7 可见未激活内毒素经稀碱激活后免疫原性稍有降低( $P < 0.05$ ), 经与酪蛋白结合后又恢复至原内毒素水平( $P < 0.05$ )。

## 讨 论

从本文结果看来, 蛋白质与内毒素的毒性及免疫原性均有一定关系。用稀碱激活内毒素时, 蛋白质成分受到破坏, 毒性稍降, 同时免疫原性亦稍有降低; 与蛋白质结合后, 毒性继续降低, 免疫原性则恢复到原来水平。这和 Freeman<sup>[8]</sup>、Morgan 等<sup>[9]</sup>的观察是一致的。可见内毒素中的蛋白质成分对于其免疫原性是必需的。因此在制备高免疫原性的内毒素制品时, 必需注意所采用的方法是否能够制出蛋白质含量较高的制品。在毒性方面, 稀碱激活后稍有降低, 与蛋白质结合后, 不但不恢复, 反而继续降低, 可见毒性与免疫原性在与蛋白质的关系上是不同的。

根据上述结果, 伤寒内毒素经过如此激活及结合后, 毒性总计可降低 3—4.5 倍, 免疫原性则维持在原来水平, 如果与提纯

表 7 未激活内毒素、激活内毒素及结合内毒素的家兔 O 凝集素产生比较

样 品	O 凝 集 滴 度						P 值
	160	320	640	1280	2560	几何平均	
未激活内毒素(冷酚 63-6)			5/6*		1/6	806.5	<0.05
激活内毒素(冷酚 63-6-2)	2/6	1/6	3/6			358.0	
激活内毒素(冷酚 63-6-2)加 10 倍量酪蛋白			5/6		1/6	806.5	<0.05

\* 分母为家兔总数, 分子为有该滴度凝集素之家兔。

的伤寒 Vi 抗原合并, 组成完整的 Vi 抗原 O 抗原复合物<sup>[10]</sup>, 或可提供一种制造较低毒性高免疫原性的伤寒菌苗的方法。

此外, 本文报告的减毒方法——结合减毒方法是比较新颖的, 它不同于一般的水解减毒或吸附减毒。虽然减毒效果尚不算理想, 操作还比较复杂, 但可根据这种结果出发, 作进一步的实验。在这方面也做了一些初步实验。例如按上述方法制备激活内毒素与白蛋白的复合物后, 加入福马林至 0.4%, 再在 37℃ 保温 16 天后, 对照组 (亦加 0.4% 福马林) 毒性仍不下降, 而蛋白质减毒组之毒性可大为降低, 减毒倍数 (静脉注射) 大于 6.5 倍。其原因可能为激活内毒素与大量蛋白质结合后, 获得了与一般外毒素蛋白质相似的性质, 即可被甲醛类毒素化。

近年来许多作者观察到, 血清蛋白质成分对内毒素 (未经激活) 的生物学活性有改变作用。如 Landy 等报告新鲜血清或血浆与内毒素保温, 可降低其对小鼠移植肿瘤之坏死作用<sup>[11]</sup>, 但对家兔之抗原性却同时降低<sup>[12]</sup>。根据对作用条件的分析, 他们认为血清中的活性物质是一种酶<sup>[13]</sup>。Ho 及 Kass<sup>[14]</sup> 研究血清及其成分对内毒素毒性之减毒作用, 认为其有效成分存在于  $\alpha$  及  $\beta$  球蛋白中, 其本质可能是酶。Yoshioka 及 Johnson<sup>[15]</sup> 亦认为活性成分在 Cohn 氏法 VI<sub>1</sub> 部分中。本文报告的血清白

蛋白对激活内毒素的减毒作用似不属于上述的酶解反应。因本实验所用的蛋白质、内毒素 (激活的) 及 pH (在 0.02N NaOH 中亦可进行减毒) 等条件均与前人不同。

## 参 考 文 献

- [1] Westphal, O. and Lüderitz, O.: *Angew. Chem.*, **66**:407—417, 1954.
- [2] Ribí, E., Haskins, W. T., Landy, M., and Milner, K. C.: *Bact. Rev.*, **25**:427—436, 1961.
- [3] Webster, M. E., Sagin, J. F., Landy, M. and Johnson, A. G.: *J. Immunol.*, **74**:455—465, 1955.
- [4] 谢彦博: 免疫学问题, 30—31, 1963.
- [5] Lüderitz, O., Westphal, O., Eichenberger, E. U., Neter, E.: *Bioch. Zeit.*, **330**:21—33, 1958.
- [6] Westphal, O., Lüderitz, O. U. Bister, F.: *Z. Naturforsch.*, **7b**:148—155, 1952.
- [7] Suter, E. and Kirsanow, E. M.: *Immunol.*, **4**: 354—365, 1961.
- [8] Freeman, G. G.: *Biochem. J.*, **37**:601—614, 1943.
- [9] Morgan, W. T. J. and Partridge, S. M.: *Biochem. J.*, **35**:1140—1163, 1941.
- [10] 谢彦博: 微生物学报, **10**:274—283, 1964.
- [11] Skarnes, R. C., Rosen, F. S., Shear, M. J. and Landy, M.: *J. Exp. Med.*, **108**:685—699, 1958.
- [12] Landy, M., Trapani, R.-J. and Shear, M. J.: *J. Exp. Med.*, **110**:731—750, 1959.
- [13] Keene, W. R., Landy, M., Shear, M. J. and Strelecky, K. A.: *J. Clin. Invest.*, **40**:302—310, 1961.
- [14] Ho, M. and Kass, E. H.: *J. Lab. and Clin. Med.*, **51**:297—311, 1958.
- [15] Yoshioka, M., and Johnson, A. G.: *J. Immunol.*, **89**:326—335, 1962.

## DETOXIFICATION OF *SALMONELLA TYPHOSA* ENDOTOXIN BY COMPLEXING WITH PROTEINS

HSIEH YEN-PO

(Laboratory of Biochemistry, National Vaccine and Serum Institute, Peking)

*Salmonella typhosa* (strain 0-901) endotoxins, prepared by Westphal's cold or hot phenol-water methods, were "activated" by 0.25 N NaOH treatment in 37°C for 18 minutes, and the "activated" endotoxins were complexed with casein or human serum albumin following the method described by Westphal *et al.* The toxicity of the original endotoxins, the "activated" endotoxins and of the endotoxin-protein complexes was determined by Suter's method in BCG sensitized mice. It was found that the toxicity decreased to 70% of the original strength after the alkaline "activation" and to 20–30% after the complexing. The immunogenicity of the endotoxin, as determined by rabbit O agglutinin formation, decreased to about half of the

original strength after alkaline "activation" but regained its full immunogenicity after complexing with serum albumin.

In another experiment, it has been found that the toxicity of the endotoxin-protein complex could be reduced greatly by further incubating with 0.4% formalin. Incubating the "activated" endotoxin with purified tetanus toxoid also reduced the toxicity but to a lesser degree.

The relationship between the protein moiety and the biological activities of endotoxin and the possibility of preparing a typhoid vaccine with lowered toxicity and full immunogenicity employing this complexing procedure are briefly discussed.