

## 钩端螺旋体内毒素的研究

### III. 黄疸出血群赖型钩端螺旋体 70091 株脂多糖含 $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸的证明

武素怀 姜淑贤 王焕芹 柯磊 聂弟楷 朱桂凤 刘永明

(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所, 北京)

采用薄层层析及气相色谱分析黄疸出血群赖型钩端螺旋体 70091 株脂多糖的游离脂肪酸组成, 证明其含有革兰氏阴性细菌内毒素所共有的  $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸, 从而从化学上肯定了上述钩端螺旋体脂多糖为内毒素。

**关键词** 钩端螺旋体; 内毒素;  $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸

重症钩端螺旋体病的临床表现、病理反应和细胞超微结构的变化颇似内毒素所致。但钩端螺旋体(以下简称钩体)有无内毒素, 迄今未能定论。这一关键问题的解决, 有助于钩体病发病机制的阐明以及病理生理和免疫诸方面的深入研究。近年, 我们已经证明了黄疸出血群赖型钩体 70091 株的脂多糖(以下简称 LPS)具有致蜚细胞溶解物凝固<sup>[1]</sup>, 致家兔发热, 血压下降及 Shwartzman 现象等毒性作用<sup>[2]</sup>。这些毒性效应与革兰氏阴性细菌内毒素的表现颇为相似。如若能证明在该脂多糖制品中含有内毒素结构中的特异成分, 则可以从化学上明确肯定这些脂多糖制品确属内毒素。

众所周知, 革兰氏阴性细菌内毒素分子中的类脂 A (Lipid A) 是赋予内毒素大分子毒性的组成部分<sup>[3,4]</sup>。在绝大多数革兰氏阴性细菌中, 以酰胺键与双糖骨架相连的羟基化脂肪酸是类脂 A 中的独特成分<sup>[5]</sup>。因此通过这一组分的鉴定, 可以特异地证实内毒素的存在。为此, 我们将 70091 株的 LPS 水解, 使之释放出游离脂肪酸, 然后采用薄层层析及气相色谱加以鉴别, 以期

确定水解液中是否含  $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸。

## 材料和方法

### (一) 钩端螺旋体

黄疸出血群赖型 70091 株钩体浓缩液(100×)为上海生物制品研究所生产。

### (二) 钩体 LPS 的制备

将钩体细胞反复洗涤后, 在 4500r/min 离心去掉上层洗涤液。按每克湿重加 20ml 无离子水计, 制成钩体细胞悬液。以 Westphal<sup>[6]</sup> 所述酚水法提取脂多糖。为使细胞破碎完全, 提取前可分别用冻融、细胞器压碎或超声波任一种方法进行处

### (三) 水解钩体 LPS 释放游离脂肪酸

称取 2mg 精制钩体 LPS 四份, 各加 0.5ml 1N HCl, 密封于安瓿中。100℃ 恒温, 分别水解 0.5、1、2 和 4 小时。水解液分别以两倍体积的二氯化碳抽提两遍。合并液在 N<sub>2</sub> 气流下浓缩至适当体积后进行薄层层析鉴定。

### (四) 薄层层析

国产硅胶 G 铺成中性板。上行层析。展开剂为正己烷: 乙酸乙酯: 醋酸 (70:30:3V/V)。分别

本文于 1986 年 4 月 5 日收到。

承蒙陈振波同志照相, 药物研究所方洪铨同志协助气相色谱分析, 一并致谢。

本工作得到中国科学院科学基金资助。

用 10% 磷钼酸乙醇溶液、10% 磷钨酸乙醇溶液、1% 2,7-二氯荧光素水溶液进行显色。除最后一显色剂外,均需在 105℃ 烘烤 15 分钟后观察显色效果。

### (五) 气相色谱分析

1. 游离脂肪酸甲酯衍生物的制备: 上述游离脂肪酸的浓缩液加入适量三氟化硼-甲醇溶液。置 60℃—70℃ 水浴中充分振摇 15 分钟。冷却后,加入乙醚进行抽提。以饱和氯化钠使之分层后吸出醚相。洗至中性,脱水后进行气相色谱分析。

2. 气相色谱: 11.5% Silar 10C 填充柱。起始温度为 70℃。程序升温为 6℃/min, 至 130℃; 10℃/min 至 210℃, 以后保持至出峰完毕。载气为高纯氮气 (40ml/min)。氢焰检测器。衰减×范围 16×2。气谱仪型号为 Perkin-Elmer Sigma 2B Gas-Chroma。

## 结 果

### (一) 薄层层析结果

经 1N 盐酸 100℃ 水解可使钩体 70091 株的 LPS 放出游离脂肪酸。结果表明, 钩体 LPS 游离脂肪酸的薄层色谱图与大肠杆菌内毒素相应制品的图谱相似 (图 1)。

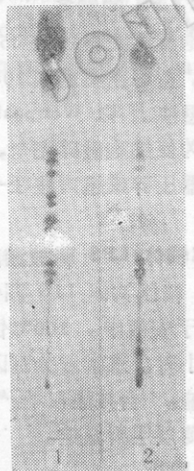


图 1 薄层层析图谱

Fig. 1 Thin-layer chromatogram

1. 大肠杆菌内毒素的游离脂肪酸
2. 钩体 70091 株 LPS 的游离脂肪酸
1. Free fatty acids released from endotoxin of *E. coli*
2. Free fatty acids released from LPS of *Leptospira* strain 70091

试验证明, 选择合适的水解条件是获得  $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸阳性结果的重要条件。盐酸水解时间以 1 小时为佳。随水解时间的延长,  $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸被破坏, 到 4 小时时, 用此法已无法检出。

三种显色剂以 10% 磷钼酸乙醇液最为灵敏。黄色背景下呈现兰色斑点, 其中一组分的  $R_f$  值与标准  $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸的相同。将显色后的薄层板在室温下放置数天后, 兰色斑点一一消失。但标准品  $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸的兰色斑点及钩体 LPS 水解液中相应  $R_f$  值的斑点却仍清晰可见 (图 2)。



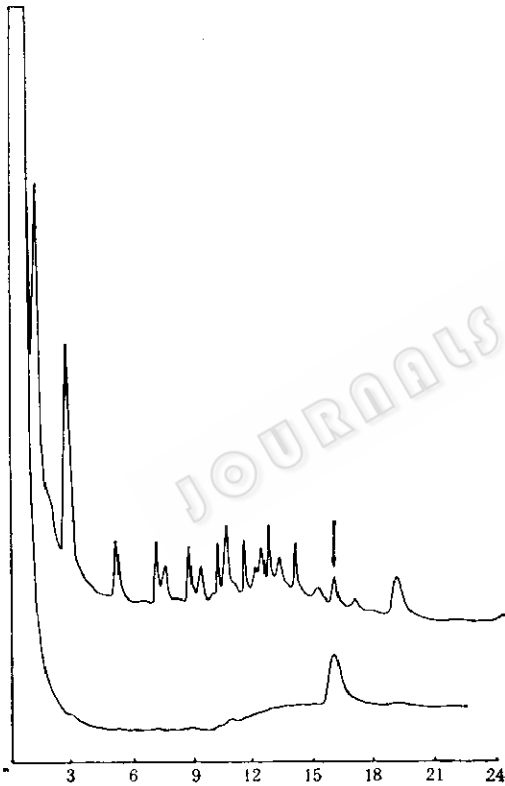
图 2 磷钼酸显色后放置一周的薄层层析图谱  
Fig. 2 Thin-layer chromatogram stayed over a week after stained by phosphomolybdic acid

1. 标准  $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸
2. 钩体 70091 株 LPS 的水解液
1. Standard  $\beta$ -hydroxymyristic acid
2. Hydrolysate of LPS of *Leptospira* strain 70091

当用 10% 磷钨酸显色时, 只有待烘烤的薄层板冷却后, 标准  $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸及钩体 LPS 水解液中相应  $R_f$  值的斑点都呈现出特有的葡萄紫色以资与薄层板上的其它组分相区别。以上薄层显色的两个特点为  $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸所独有, 可作为鉴别的特殊手段。

### (二) 气相色谱分析

钩体LPS经盐酸水解后释放出游离脂肪酸,甲酯化处理后经 Silar 10C 填充柱气相色谱分离可获得一组分。其保留时间与 $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸甲酯的相同,均为 16.73 分(图 3)。不同时间水解均获得一致结果,但盐酸水解 4 小时可将成分破坏,不再有 $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸被检出。上样量过少也不会获得阳性结果。在相同试验条件下,除 $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸以外,还从钩体 LPS 水解液中检出了月桂酸、棕榈酸、硬脂酸和软脂酸。



保留时间 Time (min)

图 3 钩体 70091 株 LPS 游离脂肪酸甲酯的气相色谱图

Fig. 3 Gas-liquid chromatogram of fatty acids released from *Leptospira* strain 70091

1. 标准 $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸甲酯
2. 钩体 70091 株游离脂肪酸甲酯
1. The methyl ester of  $\beta$ -hydroxy-myristic acid
2. The methyl ester of free fatty acids of *Leptospira* strain 70091

## 讨 论

本文旨在于采用适当手段证明钩体 70091 株的脂多糖制品中含有 $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸,从而为确认该脂多糖制品即是内毒素提供有力的证据。

通过薄层层析不仅发现有一组分的  $R_f$  值与标准 $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸相同,而且在薄层展开后的显色行为中发现了两种独特的现象。即磷钼酸使这一组分着兰色后褪色极为迟缓,而磷钨酸却使这一组分染成葡萄紫色以与其它组分相区别。综合  $R_f$  值及染色方面的两个特点均与标准 $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸相同,因此可以初步确定在钩体 70091 株的 LPS 中含有 $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸。

试验不同极性色谱柱的分离效果后,可以确认 Silar 10C 填充柱可以有效地从钩体 LPS 的游离脂肪酸中分离出 $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸。用 1N HCl 水解 4 小时,无论薄层层析还是气相色谱均不能从水解液中检出此成分。说明 $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸的检出不与,与水解条件密切相关;待分析样品中羟基脂肪酸实际含量不同,会影响检出灵敏度。

上述两种手段均证明钩体 70091 株 LPS 的游离脂肪酸中含有革兰氏阴性细菌内毒素中的特异成分—— $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸。因此可以肯定 70091 株的 LPS 确属内毒素。但应指出的是钩体脂多糖含 $\beta$ -羟基-肉豆蔻酸的量仅为大肠杆菌内毒素的 1/20。至于钩体内毒素的详细组成及结构与功能的关系正在研究中。

## 参 考 文 献

- [1] 武素怀等: 流行病学杂志, 1 (3): 159—161, 1980。
- [2] 聂第楷等: 中国医学科学院学报, 6(5): 321—325, 1984。

- [3] Kabir, S. et al.: Bacterial Toxins and Cell Membranes (ed. by Jeljaszewicz, J. et al.), Academic Press, London, p. 229—255, 1978.
- [4] Rietschel, E. Th. et al.: Bacterial Endotoxin. Chemical, Biological and Clinical Aspects (ed. by Homma, J. Y. et al.), Verlag Chemie, Weinheim, p. 11—19, 1984.
- [5] Hammond, S. M. et al.: The Bacterial Cell Surface (ed. by Hammond, S. M. et al.), Croom Helm LTD, London, p. 57—82, 1984.
- [6] Westphal, O. et al.: Z. Naturforsch, 76: 148, 1952.

### STUDIES ON ENDOTOXIN OF *LEPTOSPIRA* III. THE PRESENCE OF $\beta$ -HYDROXY-MYRISTIC ACID IN THE LPS OF *LEPTOSPIRA INTERROGENS* SEROVAR LAI

Wu Suhuai Jiang Shuxian Wang Huanqin Ke Lei

Nie Dikai Zhu Guifeng Liu Yongming

(Institute of Epidemiology and Microbiology, Beijing)

Thin-layer chromatography and gas-liquid chromatography were performed on free fatty acids and their methyl esters which were isolated from acid hydrolyzate of the LPS of *Leptospira interrogans* Serovar Lai showed that the LPS contained  $\beta$ -hydroxy-myristic acid which is common in bacterial

endotoxin. So the LPS should be considered as an endotoxin.

#### Key words

*Leptospira*; Endotoxin;  $\beta$ -hydroxy-myristic acid