

## 钩端螺旋体内毒素的研究

### II. 钩体脂多糖对家兔白细胞的影响及其 对小鼠的致死毒性作用

聂第楷 时曼华 朱桂凤 刘永明

武素怀 姜淑贤 王焕芹

(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所, 北京)

1. 给家兔静脉内注射钩端螺旋体脂多糖, 与大肠杆菌内毒素一样, 能引起白细胞暂时性减少, 随之以显著增多。

2. 用 BCG 感染 C57BL/6 小鼠后, 增加小鼠对大肠杆菌内毒素致死毒性的敏感性达 96 倍; 同样也增加了钩端螺旋体脂多糖对该小鼠的致死毒性。

3. 用 AM-D 处理 C57BL/6 小鼠后, 测得该小鼠对钩端螺旋体脂多糖的  $LD_{50}$  为 234.9  $\mu$ g。

**关键词** 内毒素; 钩端螺旋体脂多糖; 致死毒性

钩端螺旋体(以下简称钩体)脂多糖的生物学活性很少系统报道, 因而钩体是否有内毒素的问题迄今尚无定论。我们曾就黄疸出血群赖型钩体提取的脂多糖作了生物学活性和化学特性分析<sup>[1]</sup>。

细菌内毒素生物学活性的表现是多方面的, 而主要的共同特性则为毒性和致热性。前文<sup>[1]</sup>曾报道, 我们提取的钩体脂多糖有致热性、Shwartzman 现象、降血压和引起肺出血等作用。此外, 我们所提取的钩体脂多糖有使家兔白细胞减少和增多的作用。所有这些作用, 归根到底, 都是由其毒性所致。而毒性的集中表现则为致死毒性。本文目的在于着重研究钩体脂多糖的这个重要的生物学活性。

### 材料和方法

#### (一) 试验材料

1. 试验动物: C57BL/6 小鼠, 体重 17—23g, 新西兰家兔体重 2.5kg, 均系本所动物室繁殖。

2. 钩体脂多糖 (L-Lps) 和大肠杆菌内毒素

(E-Lps) 的提取均按前文<sup>[1]</sup>所述, 用热酚水法提取。使用时以无热原质生理盐水稀释至所需量。

3. 放线菌素 D (AM-D) 购自 Fuka Ag. Chem. Fabrik., 使用时将所需量溶于 0.5ml 无热原质的灭菌蒸馏水。卡介苗 (BCG) 系冻干制品, 中国药品生物制品检定所提供。使用时, 取 75mg 冻干制品加稀释的苏通氏培养液 (苏通氏液 1 份加灭菌蒸馏水 3 份) 7.5ml, (经复苏, 活菌计数为  $1.34—1.6 \times 10^6$ /mg)。感染小鼠时, 由尾静脉注入 0.3ml。

#### (二) 试验方法

1. 家兔白细胞计数: 每次试验用家兔 6 只, 取耳静脉血按常规法计数其白细胞, 然后随机分为 3 组, 每组 2 只。第 1 组每只由耳静脉注入 E-Lps 500  $\mu$ g/1ml; 第 2 组每只注射 L-Lps 5000  $\mu$ g/1ml, 第 3 组每只注射生理盐水 1ml, 作为对照。间隔不同时间, 分别检测其白细胞数。

2. 用 AM-D 处理 C57BL/6 小鼠加强钩体脂多糖的致死毒性作用: 首先测定 AM-D 对该小鼠的  $LD_{50}$ , 具体作法是将 20 只小鼠随机分为 4

本文于 1986 年 10 月 25 日收到。

组,每组 5 只。最大剂量组每只注射 50 $\mu$ g; 最小剂量组每只注射 6.25 $\mu$ g; 中间的两组分别为 25 $\mu$ g 及 12.5 $\mu$ g。注射后 7 日内记录死亡数。按 Nowotny 修改的 Spearman-karber<sup>[3]</sup> 法计算 LD<sub>50</sub>。然后用小于此 LD<sub>50</sub> 半量的 AM-D 注射另一批 C57BL/6 小鼠腹腔,随即注入 L-Lps,具体作法是将 25 只小鼠随机分为 5 组,每组 5 只。不论组别,每只小鼠各注射同一剂量的 AM-D (小于 LD<sub>50</sub> 半量的 AM-D), 20—30 分钟后,各组分别于小鼠腹腔内注射不同剂量的 L-Lps,观察 7 日,记录死亡数,按上述方法计算 LD<sub>50</sub>。

3. 用 BCG 感染 C57BL/6 小鼠,加强钩体脂多糖的致死毒性作用: 取 C57BL/6 小鼠 65 只,随机分为 13 组,每组 5 只,分缸饲养。其中 9 组均感染 BCG,每只小鼠由尾静脉注射 4—5  $\times$  10<sup>6</sup> BCG 活菌。感染后第 10 天,除 1 组用作 BCG 对照外,其余各组再用不同剂量的 L-Lps 及 E-Lps 分别作腹腔内注射。

未感染 BCG 的 4 组小鼠,用作 E-Lps 的 LD<sub>50</sub> 测定。

所有试验动物均观察 72 小时,记录死亡数,按上述方法计算 LD<sub>50</sub>。

结 果

(一) 钩体脂多糖对家兔白细胞的影 响

两次试验结果(图 1)表明,家兔静脉内注射 L-Lps 或 E-Lps 都有白细胞暂时减少现象,1.5 小时后降至最低,随后逐渐增多。接受 L-Lps 的家兔,在注射后 12 小时,白细胞数增至最高,然后开始下降,

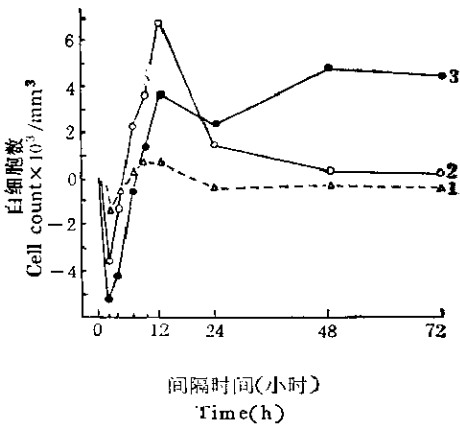


图1 家兔分别注射 L-Lps、E-Lps 和生理盐水后,白细胞数的变化  
图中数据各为 4 只家兔白细胞数的平均值  
Fig. 1 Leukocyte changes in rabbits receiving saline, L-Lps and E-Lps respectively  
All of them injected at zero time. Data expressed as mean changes of 4 rabbits in each group from the base line.  
1.生理盐水 Saline; 2. L-Lps; 3. E-Lps

到 48 小时后,即恢复至正常范围;接受 E-Lps 的家兔,其白细胞数的变化与 L-Lps 相似,唯白细胞增多期历时更长,观察至 72 小时时仍未恢复正常。

(二) AM-D 对 C57BL/6 小鼠 LD<sub>50</sub> 的测定

为了排除 AM-D 本身对该小鼠的致死毒性,首先测定了该药物的 LD<sub>50</sub>,结果见表 1。

(三) 用 AM-D 处理 C57BL/6 小鼠,加强钩体脂多糖的致死毒性作用

根据上述 AM-D 对 C57BL/6 小鼠的

表 1 AM-D 对 C57BL/6 小鼠的 LD<sub>50</sub>  
Table 1 The LD<sub>50</sub> of actinomycin D(AM-D) in C57BL/6 mice

处 理 Treatment AM-D ( $\mu$ g), ip	死亡数/试验数 No. of death/total	LD <sub>50</sub> ( $\mu$ g)
6.25	0/5	28.7
12.50	1/5	
25.00	3/5	
50.00	5/5	

LD<sub>50</sub>(28.7 μg) 测定结果, 我们采用 12.5 μg 给每只小鼠腹腔内注射, 然后再于腹腔内注射不同剂量的 L-Lps, 结果见表 2。

#### (四) 用 BCG 感染 C57BL/6 小鼠, 加强钩体脂多糖的致死毒性

为了验证 BCG 感染该小鼠能否加强

其对细菌内毒素的敏感性, 我们在试验 L-Lps 的同时, 设置了 E-Lps 对照组。试验结果(表 3) 表明, 用 BCG 感染 C57BL/6 小鼠, 使该小鼠对 E-Lps 的敏感性增高 96 倍 (LD<sub>50</sub> 由 268 μg 下降到 2.8 μg)。

同样, 用 BCG 感染 C57BL/6 小鼠也

表 2 钩体脂多糖对 AM-D 处理的 C57BL/6 小鼠 LD<sub>50</sub> 测定结果  
Table 2 L-Lps induced lethality in C57BL/6 mice treated with AM-D

处 理 Treatment		死亡数/试验数 No. of death/total	LD <sub>50</sub> (μg)
AM-D (μg)	L-Lps (μg)		
12.5	8	0/5	234.9
12.5	40	1/5	
12.5	200	2/5	
12.5	1000	4/5	
12.5	5000	3/5	

表 3 大肠杆菌内毒素对 C57BL/6 小鼠的致死毒性  
Table 3 E-Lps induced lethality in C57BL/6 mice

处 理 Treatment	死亡数/试验数 No. of death/total	LD <sub>50</sub> (μg)
E-Lps (μg) alone		268
125	0/5	
250	2/5	
500	5/5	
1000	5/5	
E-Lps(μg) + BCG(4-5 × 10 <sup>6</sup> )		2.8
0.05	0/5	
0.25	0/5	
1.25	2/5	
6.25	3/5	

表 4 钩体脂多糖对 C57BL/6 小鼠的致死毒性作用  
Table 4 L-Lps induced lethality in C57BL/6 mice

处 理 Treatment	死亡数/试验数 No. of death/total	LD <sub>50</sub> (μg)
L-Lps (μg), ip		852
400	0/3	
2000	0/3	
BCG(4-5 × 10 <sup>6</sup> ), iv	0/5	
L-Lps(μg), ip + BCG(4-5 × 10 <sup>6</sup> ) iv		
8	0/5	
40	0/3	
200	0/5	
1000	3/5	

增加了小鼠对 L-Lps 的敏感性。当给未经 BCG 感染的 C57BL/6 小鼠注射 L-Lps 时, 其剂量虽高达  $2,000\mu\text{g}$  也无致死作用(表 4), 但经 BCG 感染后, 即使注射  $1000\mu\text{g}$  的 L-Lps 就有半数以上的小鼠死亡(表 3)。

## 讨 论

早年认为内毒素的毒性物质存在于细菌细胞内, 只有当细胞破裂或被消化才释放出来, 因此内毒素一词是对细菌外毒素而言。现在称细菌脂多糖为内毒素是因为它具有毒性作用<sup>[4]</sup>, 包括致热性、Shwartzman 现象、白细胞减少继而增多、降低血压、引起流产、骨髓和肿瘤坏死等<sup>[5]</sup>。尽管细菌内毒素本身的毒性不像外毒素那样强而有特异性, 但毒性作用毕竟是所有细菌内毒素主要的共同生物学活性, 而毒性作用的集中表现则为致死毒性。

我们曾经从黄疸出血群赖型钩体中提取出脂多糖, 并证明它具有细菌内毒素的生物学活性<sup>[3]</sup>, 现在又显示其对家兔白细胞的作用酷似大肠杆菌内毒素的作用, 并证明了它对 C57BL/6 小鼠的致死毒性作用。因此可以认为钩体是有内毒素的, 至少在黄疸出血群赖型钩体是如此。

钩体脂多糖的毒性物质类脂 A (Lipid A) 含量甚微<sup>[6]</sup>, 在测试其致死毒性时, 必须使用大剂量。实际上, 即使注射  $2000\mu\text{g}$  钩体脂多糖也未能引起 C57BL/6 小鼠死亡(表 4)。使用更大剂量则又因其溶解度差, 仍不能显示其真实毒性。因此, 我们采用 AM-D 处理或 BCG 感染以增强试验动物敏感性的方法, 来测试 L-Lps 的致死毒性。结果表明两法都能增强所试动物的敏感性。但在 AM-D 处理的小鼠中

(表 2), L-Lps  $5000\mu\text{g}$  剂量组的死亡数反而较  $1000\mu\text{g}$  组为少, 这是因为前者的溶解度远不如后者, 而细菌内毒素的物理性状可以影响其生物学活性<sup>[7,8]</sup>。

AM-D 增强机体对内毒素敏感的机制尚不清楚。有的学者<sup>[9]</sup>认为, 细菌内毒素有抑制某些肝酶的产生或降低其活性的作用; 相反, 肾上腺类固醇则可刺激肝酶的产生。AM-D 的作用可能在于阻断肾上腺类固醇对某些肝酶的刺激作用。

BCG 的作用可能是由于细胞内细菌感染, 激活了巨噬细胞, 引起溶酶体水解、酶的集聚, 从而增强机体对内毒素的敏感性<sup>[10]</sup>; 反之, 由细菌内毒素毒性所引起的某些病理生理改变可以用溶酶体膜的稳定剂来防止。

## 参 考 文 献

- [1] 聂第楷等: 中国医学科学院学报, 6(5):321—325, 1984。
- [2] 武素怀等: 流行病学杂志, 1:159—161, 1980。
- [3] Nowotny, A.: Basic Exercises in Immunochimistry, Springer-Verlag, Berlin, p. 303—305, 1979。
- [4] Westphal, O. et al.: Progress Allergy, (ed. Ishizaka, K. et al.), Karger, Basel, 33: 9—39, 1983。
- [5] Kabir, S. et al.: Bacterial Toxines and Cell Membranes (ed. Jeljeszewicz, J. et al.), Academic Press, London, p. 59—87, 1978。
- [6] 武素怀等: 微生物学报, 27(2): 165—168, 1987。
- [7] Galanos, C. et al.: Bacterial Endotoxin Chemical, Biological and Clinical Aspects (ed. Homma, J. Y. et al.), Verlag Chemie, p. 408, 1984。
- [8] Galanos, C. et al.: Handbook of Endotoxin (ed. Rietschel, E. Th.), Elsevier, Amsterdam, p. 46—58, 1984。
- [9] Berry, L. J. et al.: J. Bacteriol., 96(4): 1191—1199, 1968。
- [10] Peavy, D. L. et al.: Bacterial Endotoxins and Host Response (ed. Agarwal, M. K.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, p. 299—309, 1980。

## STUDIES ON ENDOTOXIN OF *LEPTOSPIRA*

### II. THE EFFECTS OF LEPTOSPIRAL LIPOPOLYSACCHARIDES ON RABBIT'S LEUKOCYTES AND LETHALITY TO C57BL/6 MICE

Nie Dikai Shi Manhua Zhu Guifeng Liu Yongming Wu Suhuai  
Jiang Shuxian Wang Huanqin

(*Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing*)

1. Intravenous injection of rabbits with leptospiral LPS as well as *E. coli* endotoxin could induce transient leukopenia followed by marked leukocytosis.

2. Intravenous infection of C57BL/6 mice with  $4-5 \times 10^6$  BCG was capable of enhancing the lethality of *E. coli* endotoxin in the animal over 96-fold. Similarly, it also increased the animal's susceptibility to the lethality of leptospiral lipopolysaccharides.

3. The administration of AM-D simultaneously with leptospiral LPS to C57BL/6 mice could also increase the lethality of the LPS. The  $LD_{50}$  of the LPS was detected to be 234.9  $\mu$ g in the AM-D treated mice.

#### Key words

Endotoxin; Leptospiral lipopolysaccharides; Lethal toxicity