

# 钩端螺旋体脂多糖非特异性抗感染的研究

## II. 非特异性保护作用的机制

周文静 聂第楷 武素怀

(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所, 北京)

对钩端螺旋体脂多糖提高机体非特异性抗感染力的作用机制进行了研究。试验结果表明, L-LPS 和 E-LPS 均能增强豚鼠腹腔巨噬细胞的非特异性吞噬功能。两者激活小鼠腹腔巨噬细胞, 使胞体增大, 并提高细胞内酸性磷酸酶的含量与活性。L-LPS 可能对酶的合成具有较强的作用, 而 E-LPS 相对增强酶的活性。两者具有免疫调节作用。小鼠在免疫 3d 后接受 L-LPS, 产生免疫佐剂作用, 而在免疫前 24h 给予 L-LPS, 却导致免疫抑制。

**关键词** 钩端螺旋体脂多糖; 非特异性抗感染

细菌脂多糖 (LPS) 主要通过激活网状内皮系统 (RES) 和免疫系统来提高机体的抗感染力。小鼠接受细菌 LPS 后, 血液和 RES 清除异物的作用加强, 巨噬细胞吞饮、吞噬功能增强<sup>[1-3]</sup>, 胞内代谢、蛋白合成加速, 溶酶体变大, 酶含量和活性增高<sup>[4-6]</sup>, 溶酶体膜脆性增加, 酸性水解酶等易释放到胞浆及周围组织中<sup>[7,8]</sup>。细菌 LPS 还有免疫佐剂作用, 能增加机体对蛋白抗原的抗体产生量<sup>[9-11]</sup>, 提高抗原性, 缩短抗体从产生到高峰的时间<sup>[12]</sup>, 使机体对微弱或无抗原性的复合物产生抗体反应<sup>[13]</sup>。抗原和 LPS 的注射途径和剂量可影响免疫佐剂作用, 但更重要的是 LPS 的注射时间<sup>[14]</sup>。细菌 LPS 激活机体免疫系统的集中表现为增强特异性免疫和非特异性抗感染力。

钩端螺旋体脂多糖 (L-LPS) 能提高机体非特异性抗感染力, 是否通过激活 RES、免疫系统来起作用? 作者就其作用机制进行了研究。

## 材料与 方法

### (一) 巨噬细胞的吞噬试验

1. 动物: 健康豚鼠 27 只, 体重 200—250 g, 雌性。随机分成 3 组, 每组 9 只。
2. 鸡红细胞悬液: 100ml 阿氏液加 10ml 鸡心血, 用灭菌生理盐水洗三次 (1000 r/min, 10 min), 按压积红细胞配成 1% 鸡红细胞悬液。
3. RPMI-1640 培养液(自配)。
4. 实验步骤: 对三组动物分别进行内注射 1ml PBS/只、E-LPS 10 μg/只、L-LPS 100 μg/只, 24h 后腹腔注入 1% 鸡红细胞悬液 8ml/只, 30min 后击脑处死豚鼠。用 HBSS 洗腹腔。用台盼蓝溶液检查洗出液中细胞存活率 >99%。腹腔液离心 10min (1000 r/min), 弃上清液, 加 2ml RPMI-1640 使细胞混匀滴在载玻片上, 37℃ 2h, 流水轻洗去未贴壁细胞, 滤纸吸干, 姬姆萨-瑞氏染色 8min, 油镜下观察记录吞噬鸡红细胞数, 计算吞噬率。

本文于 1987 年 6 月 19 日收到。

承中国科学院生物物理研究所胡匡祐同志和本所陈振波同志协助, 特此致谢。

## (二) 酸性磷酸酶 (ACP) 的测定

1. 动物: C57BL/6 小鼠, 18—20g/只, 雌性。  
 2. 实验步骤: 取小鼠 9 只, 随机分为 3 组, 每组 3 只, 分别于腹腔注射生理盐水 0.5 ml/只、E-LPS 3  $\mu$ g/只、L-LPS 50  $\mu$ g/只。24 h 后处死小鼠(避免腹腔出血), 取腹腔巨噬细胞。混合同组小鼠腹腔液, 离心 500 r/min, 2—5 min, 弃上清液, 用 Hank's 液 2.5 ml 混匀细胞滴于载玻片上, 37°C 1—2 h, 流水洗掉未贴壁细胞。显微镜下观察巨噬细胞占总数 98% 以上。用 2% 戊二醛/0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液固定细胞, 硫化铅法对酸性磷酸酶进行特异性染色<sup>[15]</sup>, 油镜下观察细胞形态、ACP 酶颗粒及分布情况。并用 MPV3-TAS PLUS 显微图像分析仪对胞内 ACP 进行微量测定和分析。先测出 ACP 最大透射波长, 用以测定各组细胞: (1) 单细胞面积 (C); (2) 单细胞内酶颗粒总面积与细胞面积之比 (G/C); (3) 单细胞内酶相对含量 (M)。M = GE (G: 单细胞内酶颗粒总面积; E: 消光值)。

## (三) 抗体产生细胞 (PEC) 的测定

1. 动物: C 57 BL/6 小鼠, 同性别, 体重 18—20 g。  
 2. 二倍 DMEM 培养液(自配)。  
 3. 小牛血清 (FCS) 用 SRBC 吸收 2 次。吸收过程: 10 ml ECS 中加 1 ml 压积 SRBC, 置冰浴 30 min, 2000 r/min 离心 10 min。  
 4. SRBC 悬液: 100 ml 阿氏液中加入 50 ml 绵羊血, 混匀, 4°C 保存。Hank's 液洗 2 次(1000 r/min, 5—10 min), 按红细胞压积配成 2% 及 7% 的 SRBC 悬液。  
 5. 补体: 取新鲜豚鼠血清, 用 SRBC 吸收一

次, Hank's 液 10 倍稀释后使用。

6. 实验步骤: 取小鼠 9 只, 随机分成 3 组, 每组 3 只。用鸡红细胞进行腹腔免疫 (2% SRBC 1 ml/只)。第 3d 按组分别腹腔注射 0.5 ml N.S./只、E-LPS 1  $\mu$ g/只、L-LPS 20  $\mu$ g/只。另取 27 只小鼠随机分成 3 组, 每组 9 只, 分别腹腔注射 0.5 ml N.S./只、E-LPS 3  $\mu$ g/只、L-LPS 50  $\mu$ g/只。24 h 后用 SRBC 腹腔免疫全部小鼠, 方法同上。免疫后第 4d, 无菌取小鼠脾脏, 制备脾细胞悬液。用 0.5% 台盼蓝计数脾细胞 (细胞活率 > 98%), Hank's 液配成  $5 \times 10^6$  个细胞/ml 悬液。按 Yamada<sup>[16]</sup> 空斑滴定法测定 PEC 数量。

## 结 果

### (一) 巨噬细胞吞噬试验

吞有鸡红细胞的巨噬细胞明显增大,



图 1 吞有鸡红细胞的豚鼠腹腔巨噬细胞  
(胞体明显增大, 胞浆呈网状, 可见鸡红细胞核,  $\times 1000$ )

Fig. 1 Peritoneal macrophages of guinea pig in which chick RBC were ingested

表 1 LPS 对豚鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

Table 1 The effect of LPS on the phagocytic activity of guinea pig's peritoneal macrophages

组 别 Group	剂 量 Dose ( $\mu$ g/pg)	动物数 Animals tested	巨噬细胞 观察总数 Total no. M $\phi$ s observed	吞噬鸡 RBC 的 巨噬细胞数 No. M $\phi$ s with CRBC ingested	吞噬率 (%) Ingestion	U 检验 U test
大肠杆菌内毒素 E-LPS	10	3 $\times$ 3	2922	2027	70.4	p < 0.001
钩体脂多糖 L-LPS	100	3 $\times$ 3	2122	1626	76.6	p < 0.001
对 照 Control	PBS/ml	3 $\times$ 3	3062	1754	57.3	

并伸出不规则的伪足,胞浆疏松网状,其内可见鸡红细胞核,巨噬细胞核挤到细胞一边(图 1)。试验结果见表 1。

(二) 酸性磷酸酶的测定

显微镜下,对照组巨噬细胞体小,胞内 ACP 酶颗粒细而小,着色浅。E-LPS 及 L-LPS 组细胞增大,胞内酶颗粒粗而多,可呈团块状。L-LPS 组胞体增大及颗粒

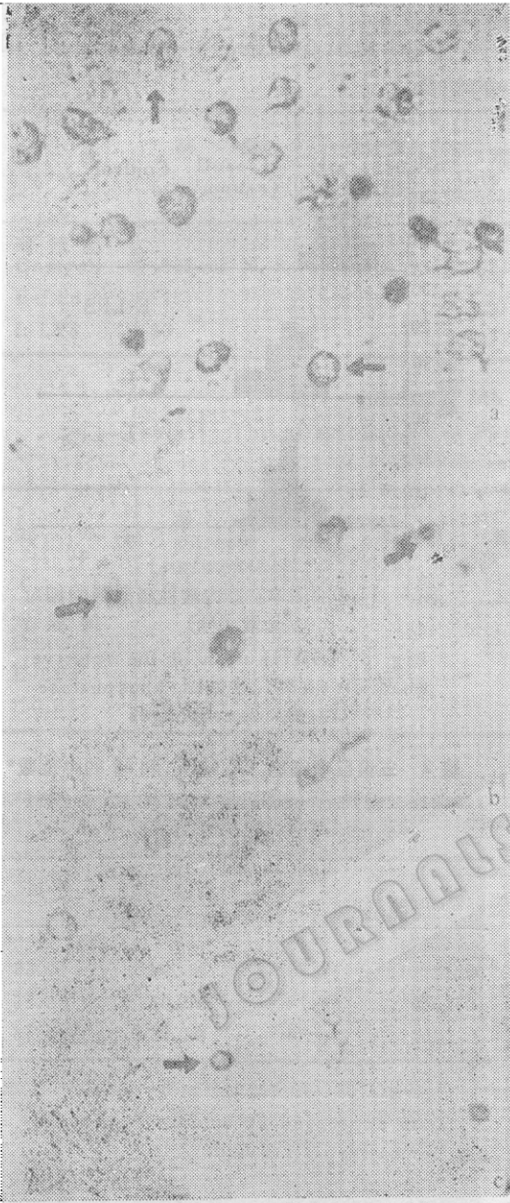


图 2 小鼠腹腔巨噬细胞内酸性磷酸酶的测定结果  
Fig. 2 The results of measurement of intracellular acid phosphatase in the peritoneal macrophages of mice

a. 对照组巨噬细胞 (×400); b. E-LPS 组巨噬细胞: 细胞增大,胞内酶颗粒多,呈团块状,染色深(箭头所示), (×400); c. L-LPS 组巨噬细胞: 细胞显著增大,胞内酶颗粒增多,染色较深(箭头所示), (×400)。

a. Peritoneal macrophages from the control mice; b. The macrophages from the E-LPS treated mice: the cells enlarged with enzyme granules increased and deeply stained as indicated by the arrows; c. The macrophages from the L-LPS treated mice: the cells markedly enlarged with enzyme granules increased as indicated by the arrows.

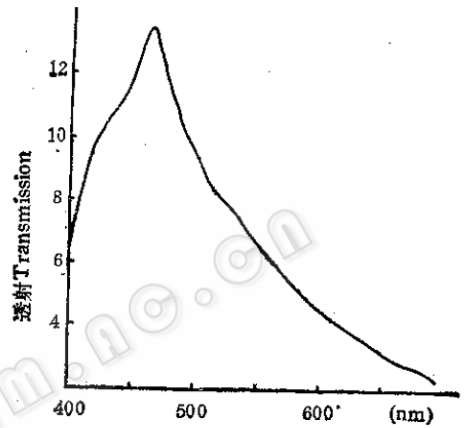


图 3 酸性磷酸酶透射光谱

Fig. 3 Transmissive spectrum of the acid phosphatase

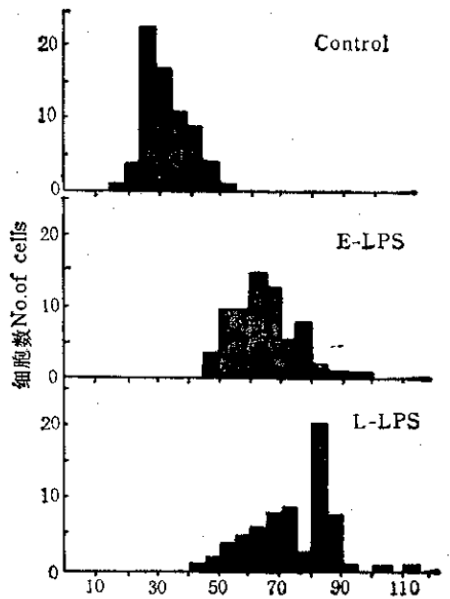


图 4 巨噬细胞单细胞面积 (C) 的分布

Fig. 4 Distribution of the cell area (C) of the macrophages

增多较 E-LPS 组明显, 但酶颗粒着色较浅(图 2)。

图 3 示 ACP 颗粒对不同波长单色光的透射情况。最大透射波长为 465nm, 所以用该波长的单色光测定、分析细胞。

图 4—6 为三组细胞 C、G/C、M 的分布。并将其中位数列入表 2。统计分析结果见表 3。

(三) PFC 的测定

在每滴琼脂糖上, 可见数量不等的圆形透明、形态规则的溶血空斑(图 7)。表 4 示免疫小鼠 3d 后给予 LPS 的实验结果。

表 5 为在免疫小鼠前 24h 腹腔注射 LPS 的结果。

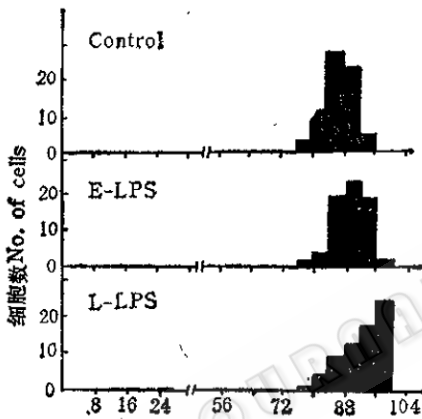


图 5 巨噬细胞单细胞内酶颗粒总面积与细胞面积之比 (G/C)

Fig. 5 Distribution of the ratios of total area of the enzyme granules in the macrophage to the cell area (G/C)

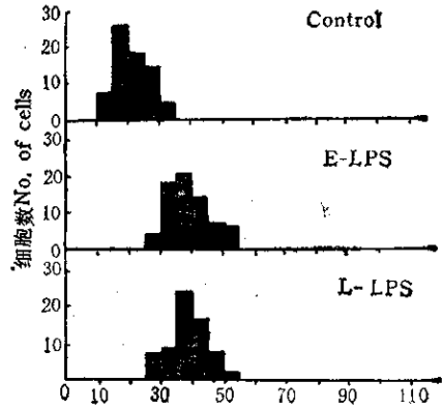


图 6 巨噬细胞单细胞内酸性磷酸酶的相对含量 (M)

Fig. 6 Distribution of the relative quantities (M) of acid phosphatase in the macrophages

表 2 三组巨噬细胞 C、G/C 和 M 的中位数\*

Table 2 The medians of C,G/C and M of the macrophages in the 3 groups

组别 Group	C(u <sup>2</sup> )	G/C	M
对照 Control	31.79	86.84	20.65
E-LPS	63.78	90.04	38.28
L-LPS	75.44	94.56	39.15

\* 各组数值不完全呈正态分布, 故采用中位数。

Data expressed as median since they are not normally distributed.

表 3 三组巨噬细胞 C、G/C 和 M 值统计分析

Table 3 Statistical analysis of the C, G/C and M values of macrophages in the 3 groups

组别 Group	细胞数 No. Mgs	C (mean±SE)	G/C (mean±SE)	M (mean±SE)
Control (0.5 ml/mouse)	70	33.14±6.98	86.77±3.38	21.69±5.48
E-LPS (3μg/mouse)	70	64.59±10.78*	89.38±4.10*	38.84±6.25*
L-LPS (50 μg/mouse)	70	73.68±13.08*Δ	92.68±5.39*Δ	38.90±6.25*†

\* 与对照组相应值有显著性差异 (p<0.01); Δ 与 E-LPS 组有显著性差异 (p<0.01);

+ 与 E-LPS 组无显著性差异 (p>0.05)。

\* Significant difference compared to the control (p<0.01);

Δ Significant difference compared to the E-LPS (p<0.01);

† No significant difference compared to the E-LPS (p>0.05)。

表 4 小鼠免疫 3d 后给予 LPS 对 PFC 的影响

Table 4 The effect of LPS to PFC in mice administered 3 days after the immunization with SRBC

组别 Group	剂量 Dose ( $\mu\text{g}/\text{mouse}$ )	动物数 No. animals tested	观察滴数 Gtts observed	总空斑数 Total no. plaques	均数(个/滴) $\bar{X}$ (plaques/gtt)	T 检验 T test
对照组 Control	0.5 ml N. S.	3	13	558	42.9 $\pm$ 10	
E-LPS	1	3	13	1268	89.85 $\pm$ 28	p<0.005
L-LPS	20	3	13	2018	155.2 $\pm$ 37	p<0.01

表 5 小鼠免疫前 24h 给予 LPS 对 PFC 的影响

Table 5 The effect of LPS to PFC in mice administered 24h before the immunization with SRBC

组别 Group	剂量 Dose ( $\mu\text{g}/\text{mouse}$ )	动物数 No. animals tested	观察滴数 Gtts observed	总空斑数 Total no. plaques	均数(个/滴) $\bar{X}$ (plaques/gtt)	T 检验 T test
对照组 Control	0.5 ml N. S.	3 $\times$ 3	82	3053	37.2 $\pm$ 19.3	
E-LPS	3	3 $\times$ 3	77	311	4.0 $\pm$ 2.7	p<0.001
L-LPS	50	3 $\times$ 3	68	530	7.0 $\pm$ 7.8	p<0.001

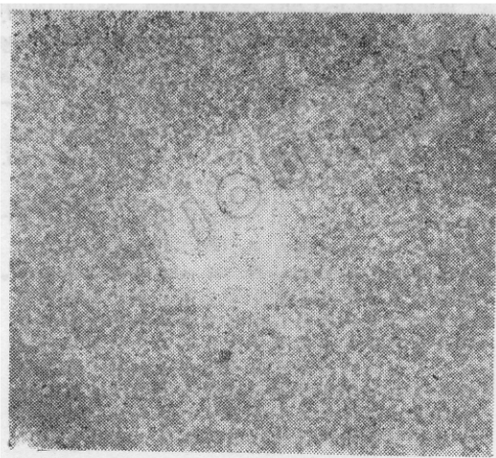
图 7 四周为 SRBC, 中心有一圆形透明溶血空斑 ( $\times 40$ )

Fig. 7 A round transparent hemolytic plaque in the center with SRBC around

## 讨 论

试验结果表明, L-LPS、E-LPS 均能提高腹腔巨噬细胞的吞噬功能, 可能与该细胞  $C_3$ 、Fc 受体活性增强有关。同时, 血

中数种调理因子的含量也升高, 如特异及非特异性抗体、备解素等, 补体系统也通过旁路被激活。

巨噬细胞吞饮和吞噬 LPS 后, 胞内产生一系列变化。蛋白质(包括各种水解酶)合成加速, 糖代谢旺盛, 胞内 pH 降低。此外,  $H_2O_2$ 、超氧离子等杀菌物质增加, 这些都有利于巨噬细胞吞噬功能的提高, 为更有效地消灭微生物提供了物质条件。本文仅以酸性磷酸酶为溶酶体酶的代表。

L-LPS、E-LPS 对腹腔巨噬细胞均有刺激作用。二组细胞面积和酶颗粒面积均增大, 但后者增加程度大于前者(两组 G/C 值均大于对照组)。注射 LPS 两组的 M 值与对照组有显著差异, 表明胞内 ACP 酶合成和活性增加。值得注意的是: L-LPS 组 C 值、G/C 值均大于 E-LPS 组的相应数值, 并有显著性差异(表 3), 但两组 M 值相差甚微。表明 L-LPS 增大细胞面积、酶颗粒面积的作用较显著(即增加胞内

ACP 酶合成和含量),而 E-LPS 偏重提高 ACP 酶活性(即单位面积酶颗粒的酶相对含量增加)。

我们通过观察在不同时间注射 L-LPS 对小鼠脾脏产生抗 SRBC 的 PFC 数量的影响,来了解 L-LPS 对免疫系统的调节作用。在小鼠免疫 3d 后腹腔注射 LPS,结果 L-LPS 组 PFC 数量增加 2 倍多, E-LPS 组增加 1 倍多,显示出明显的免疫佐剂作用。在小鼠免疫前 24h 给予 LPS 两组 PFC 数量明显减少,呈现免疫抑制作用。由此可见 LPS 注射时间的重要性。

Masayasu<sup>[17,18]</sup> 认为, LPS 起免疫佐剂作用的成分是脂质 A (Lipid A), 但也有人提出是多糖部分与脂质 A 通过不同途径相互协同起作用的<sup>[19]</sup>。LPS 的免疫佐剂作用是在 B、T 淋巴细胞和巨噬细胞共同调控下完成的。

以上主要是 LPS 对 RES、免疫系统的作用。实际上, LPS 提高机体非特异性抗感染力的作用还涉及到许多其他体液因子,如 C 反应蛋白、补体系统、前列腺素、备解素、组织因子等。进一步研究 L-LPS 的免疫机制,将使我们有可能避免内毒素的有害作用,利用其有益效应,更好地为防治疾病服务。

## 参 考 文 献

- [1] Bennett, W. E. et al.: *J. Exp. Med.*, 123: 145—159, 1966.
- [2] Land, M. B. et al.: *Exp. Cell Res.*, 108: 279—288, 1977.
- [3] Edelson, P. J. et al.: *J. Exp. Med.*, 142: 1150—1164, 1975.
- [4] Weissmann, G. et al.: *ibid.*, 116: 433, 1962.
- [5] McGivney, A. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)*, 155: 390, 1977.
- [6] Bradley, S. G.: *Prog. Clin. Biol. Res.*, 62: 3—14, 1981.
- [7] Bradley, S. G. et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 31: 208, 1975.
- [8] Janoff, A. et al.: *J. Exp. Med.*, 116: 451, 1962.
- [9] Johnson, A. G. et al.: *ibid.*, 103: 225, 1956.
- [10] Hofman, J. et al.: *Bacterial Endotoxins and Host Responses*, Agarwal, M. K. (Ed.), pp. 117—142, 1980.
- [11] Merritt, K. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 115: 1132, 1964.
- [12] Katharine, M. et al.: *J. Immunol.*, 91: 266, 1963.
- [13] David, L.: *J. Infect. Dis.*, 136(Suppl.): 239—245, 1977.
- [14] Phyllis, K. et al.: *J. Immunol.*, 82: 415, 1959.
- [15] 陈啸梅等: *组织化学手册*, 人民卫生出版社, 北京, 1982.
- [16] Yamada, H. et al.: *J. Immunol.*, 103: 357—363, 1969.
- [17] Erzsébet, E. et al.: *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 25(1): 17—21, 1978.
- [18] Masayasu, N. et al.: *Beneficial Effects of Endotoxins*, Nowotny, A. (Ed.), pp. 255, 1983.
- [19] Haeflner-Cavaillon, N. et al.: *Cell. Immunol.*, 74: 1—13, 1982.

# STUDIES ON ENHANCEMENT OF NONSPECIFIC RESISTANCE TO INFECTION BY LEPTOSPIRAL LIPOPOLYSACCHARIDE

## II. THE MECHANISMS OF THE NONSPECIFIC PROTECTIVE ACTIVITY OF THE LPS

Zhou Wenjing Nie Dikai Wu Suhuai

*(Institute of Epidemiology and Microbiology, Beijing)*

Leptospiral lipopolysaccharide can enhance the nonspecific resistance of host to infection. By researching its mechanism, we found: (1) The phagocytic function of peritoneal macrophages of guinea pigs was strengthened by E-LPS and L-LPS; (2) L-LPS and E-LPS activated peritoneal macrophages of mice then enlarging the cell size, and increase the quantity and activity of intracellular acid phosphatase. Relatively, the L-LPS might have a greater action in synthesis of the enzyme, while the E-LPS mainly enhanced the activity

of the enzyme; (3) L-LPS and E-LPS appeared to be immunomodulant. When they were injected 3d after immunizing the mice with SRBC, immune adjuvant effect developed; however, if the injection of LPS was made 24h prior to the immunization, it would result in immunosuppression.

### Key words

Leptospiral lipopolysaccharide; Nonspecific resistance to infection