

济南假单胞菌新种的抗生作用

何祖泽 徐大江 霍美玲 陈金英 吴克霞

(山东省医学科学院药物研究所, 济南)

从济南土壤中分离、筛选到 Ps 161 菌株。该菌株为革兰氏阴性需氧短杆菌, 具有激活非特异性细胞免疫和特异性体液免疫的功能, 能使机体获得免疫应答和免疫反应性。其菌苗对小鼠精原细胞、鼠类移植瘤有显著抑制作用, 并增强吡嗪酮治疗小鼠血吸虫童虫的作用。能提高人体白细胞和体液免疫功能, 对人体癌性胸水和表浅转移癌实体瘤有明显的消除与抑制效果。该菌株的代谢产物对革兰氏阳性细菌有显著抑制作用。经中国科学院微生物研究所鉴定, 该菌株为一新种, 命名为济南假单胞菌(*Pseudomonas jinanensis* sp. nov.)。

关键词 济南假单胞菌; PJV 抗生作用

从山东省济南市无影山土壤中分离到革兰氏阴性需氧短杆菌 Ps161 菌株, 对该菌株的抗生作用进行了研究, 现将结果报道如下。

材料与方 法

(一) 培养基

1. 高氏合成分离培养基(g): KNO_3 0.1, NaCl 0.05, K_2HPO_4 0.05, MgSO_4 0.05, FeSO_4 0.001, 可溶性淀粉 0.2, 琼脂 2, 蒸馏水 100ml, pH 7.0—7.2。

2. Czapek's 合成培养基(g): NaNO_3 0.2, K_2HPO_4 0.1, MgSO_4 0.05, KCl 0.05, FeSO_4 0.001, 蔗糖 3, 琼脂 1.7, 蒸馏水 100ml, pH 6.6。

3. 种子、发酵培养基(g) (中国医学科学院抗菌素研究所配方): 可溶性淀粉 2.5, K_2HPO_4 0.1, ZnSO_4 0.05, CuSO_4 0.01, 葡萄糖 0.5, 黄豆粉 3.5, 蒸馏水 100ml, 自然 pH。

(二) 菌株来源

1. Ps161 菌株的分离: 从山东省济南市无影山表土(海拔 51.6m)取土样, 用无菌水稀释后, 于高氏合成培养基上划线分离, 28℃ 培养(下同) 4—5d, 挑单菌落接种高氏斜面培养基, 形成菌苔后, 接种肉浸液平皿, 进一步划线分离培养(2—3d), 挑取光滑的柠檬色菌落, 接种于肉汁斜

面培养(2—3d)。将菌苔加无菌等渗盐水振荡 10min, 接种发酵培养基(4d), 培养液再接种肉浸液基础培养基平皿, 反复划线分离培养(2—3d), 挑取已纯化的菌落, 接种肉浸液琼脂斜面纯培养后, 用无菌脱脂牛奶洗取菌苔, 搅匀分装于菌种管中, 冷冻真空干燥封存, 低温下保存。

2. 试验菌株: 来自中国医学科学院抗菌素研究所、山东医科大学微生物教研室及附属医院细菌室、山东省结核病防治院等。其中有八叠球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、枯草杆菌、铜绿假单胞菌、结核分枝杆菌、草分枝杆菌和白色念珠状球菌等。

(三) 实验动物

由中国医学科学院动物饲养中心、中国科学院上海动物饲养中心、中国药品生物制品检定所动物饲养场、中国医学科学院抗菌素研究所、北京中医研究院药物研究所肿瘤室、中国医学科学院药物研究所和我院动物房供应的小鼠(615, C_3H , C_{57}BL , LACA, Swiss)、荷瘤小鼠、Wistar 大鼠、豚鼠、家兔、狗等。

(四) 精原细胞法

由中国医学科学院抗菌素研究所和上海第三制药厂中试室提供。

(五) 厌氧培养法

本文于 1987 年 1 月 12 日收到。

用 Wright 氏改良法^[1]厌氧培养, 连续三次均不生长(28℃)。对照接种在同样培养基上, 经需氧培养, 生长良好。

(六) 小鼠脾指数测定方法(略)

(七) 腹腔巨噬细胞吞噬功能试验

方法见参考文献[2]。

结 果

(一) Ps161 菌株的抗生素作用

从济南无影山等地采土分离到 2100 余株菌, 对金黄色葡萄球菌有抑制活性的有 65 株。其中 Ps161 对小鼠精原细胞和

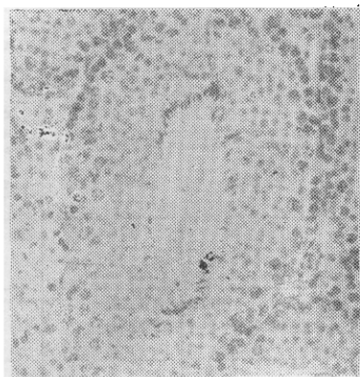


图 1 正常小鼠曲细精管中各精细胞的毗邻关系(400×)

Fig. 1 Neighbouring relationship of seminiferous cells in the seminiferous tubules of the normal mice

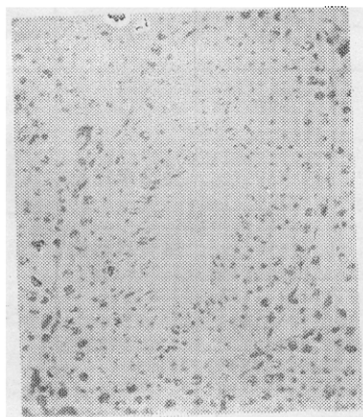


图 2 经 PJV 注射后曲细精管中近基底膜的精原细胞受到明显抑制(400×)

Fig. 2 Spermatogenesis be markedly inhibited by the PJV in the seminiferous tubules near to basement membrane

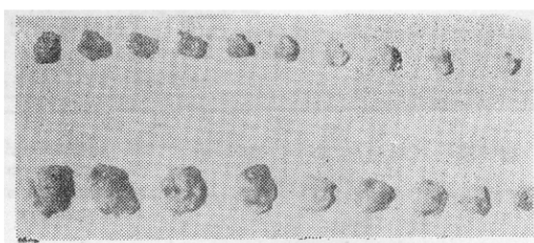


图 3 荷瘤小鼠经 PJV 注射后其宫颈癌 U₁₄ 生长受到明显阻抑

Fig. 3 The carcinoma of cervix U₁₄ of the mice bearing cancer be markedly inhibited by the PJV

抗菌谱中对革兰氏阳性菌有显著的抑制作用, 其菌苗对小鼠宫颈癌 U₁₄、肝癌 H₂₂ 和黑色素瘤 Me 有显著的抑制作用(表 1, 图 1—3)。

Ps161 菌株在肉浸液基础培养基和有机发酵培养基中生长良好, 产生黄绿色可溶性色素和荧光色素。适宜生长温度为 28—32℃; 在发酵后期 pH 偏碱时, 细菌生长茂盛, 其抗金黄色葡萄球菌活性物质多, 抑菌作用明显。试验结果表明, Ps161 菌株与放线菌 161 菌株发酵液抑菌活性比较, 前者其代谢物有抑制金黄色葡萄球菌、八叠球菌和枯草芽孢杆菌等某些革兰氏阳性菌的作用; 对草分枝杆菌抑菌活性不明显; 对绿脓杆菌和结核杆菌无抑菌活性; 对大肠杆菌、白色念珠状球菌抑菌活性可疑; 而后者其代谢物对上述各菌株均无抑制作

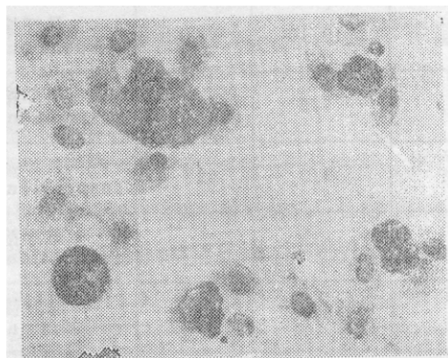


图 4 正常小鼠腹腔液中巨噬细胞经注射鸡红细胞 CRBC 后, 巨噬细胞吞噬血球情况(400×)

Fig. 4 The condition of globuliferous phagocyte from the abdominal cavity of the normal mice

表 1 Ps161 菌苗对鼠类移植瘤的抑制作用
Table 1 Effect of transfer tumor after the administration
of Ps161 various immunization on mice

瘤 株 Tumor	鼠 数 (对照/试验) No. mice (Control/ test)	鼠 种 Mouse	瘤接种方式 Method of transfer of culture	剂 量 Dosage (mg/kg)	免疫途径 Route of immuniza- tion	抑制率 (%) Antitumor effect	P 值 P. value
Me	11/9	Swiss	瘤块包埋 wrap tumorblock up	3mm	ip	8.3	>0.05
Me	10/9	Swiss	瘤块包埋 wrap tumorblock up	3mm	sc	38.1	<0.01
Me	9/10	LACA	悬浮接种 suspension culture	20.0	sc	41.8	<0.01
Me	10/10	Swiss	悬浮接种 suspension culture	20.0	sc	67.6	<0.01
H ₂₂	10/10	Swiss	悬浮接种 suspension culture	20.0	sc	65.3	<0.01
H ₂₂	17/10	Swiss	悬浮接种 suspension culture	20.0	sc	60.5	<0.01
H ₂₂	17/10	Swiss	悬浮接种 suspension culture	20.0	sc	67.1	<0.01
H ₂₂	15/10	Swiss	悬浮接种 suspension culture	20.0	ip	0	
H ₂₂	15/10	Swiss	悬浮接种 suspension culture	20.0	ip	0	
U ₁₄	10/10	Swiss	悬浮接种 suspension culture	20.0	sc	51.4	<0.01
U ₁₄	10/10	Swiss	悬浮接种 suspension culture	20.0	sc	66.4	<0.01
U ₁₄	11/9	Swiss	悬浮接种 suspension culture	20.0	sc	52.9	<0.01
W ₂₅₆	10/10	Wister	悬浮接种 suspension culture	10.0	ip	52.9	<0.01
W ₂₅₆	10/10	Wister	悬浮接种 suspension culture	10.0	ip	51.2	<0.01
L ₆₁₅	9/6	615	悬浮接种 suspension culture	20.0	ip	生命未延长	
L ₆₁₅	9/6	615	悬浮接种 suspension culture	20.0	ip	生命未延长	
S ₁₈₀	10/8	Swiss	悬浮接种 suspension culture	20.0	sc	34.0	<0.05
S ₁₈₀	10/10	Swiss	悬浮接种 suspension culture	20.0	sc	63.0	<0.01

用。

(二) 生物活性

Ps161 菌苗具有激活与增强小鼠非特

异性细胞免疫的功能(表 2、3, 图 4、5)。

用 Ps161 菌苗给家兔免疫注射, 可增强刺激机体形成抗体具有一定的滴度, 因

表2 Ps161 菌苗对小鼠脾指数和体重的影响
Table 2 Effect of Ps161 on spleen index and body weight of C₃H, 615, Swiss of mice

Mice	Group	动物数(只) No. of animals		体 重 (g) Body weight			脾指数 Spleen index
		开 始 Begin	最 后 End	开 始 Begin	注射后一周 After the in j. of a week	注射后二周 After the in j. of two weeks	
C ₃ H	NS	10	9	198	208	186	1.44
	Ps161	10	10	193	189	186	
615	NS	10	10	198	189	197	1.51
	Ps161	10	9	203	179	189.5	
Swiss	NS	10	10	235	284	304	1.04
	Ps161	10	10	235	269	301	

表3 Ps161 菌苗不同注射途径免疫小鼠后腹腔 M ϕ 吞噬率与指数
Table 3 Phagocytosis rate and index of M ϕ , various immunization on mice

注后时间 (h) After the injection time	吞噬率(%) Phagocytic rate				吞噬指数 Phagocytic index			
	NS(C)		Ps161(T)		NS(C)		Ps161(T)	
	ip	ip	t 值 (ip)	Sc	ip	ip	t 值(ip)	Sc
1/3	13.0	59.5	7.8	57.0	1.49	2.33	3.18	3.07
2.5	13.0	74.5	10.8	31.0	2.80	5.48	4.84	5.64
5.0	22.0	50.5	4.4	32.0	2.45	4.34	4.10	5.00

此也参与体液免疫反应(表4)。

Ps161 菌苗对人鼻咽癌 CNE₂ 细胞株和人肺癌的 Lupa 细胞株均有显著抑制效

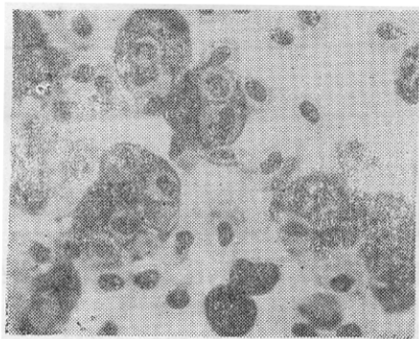


图5 注射 PJV20min 后, 腹腔巨噬细胞明显受到激活, 使其吞噬功能增强(400 \times)

Fig. 5 The M ϕ from the abdominal cavity of normal mice were markedly activated and increased after 20 min by PJV

果(见表5)。

Ps161 菌苗 (PJV) 对肺癌 Lupa 细胞株只需 128 μ g/ml 即有显著抑制效果。

PJV 还可明显增强吡喹酮治疗小鼠血吸虫童虫感染(表6), 并且差异非常显著, $p < 0.01$ (由中国预防医学中心寄生虫病研究所提供)。

PJV 经山东省肿瘤防治院、北京医院、山东医科大学附属医院、上海第一医科大学附属肿瘤医院和上海市纺织管理局第三医院等 13 处临床单位对癌性胸水 149 例, 癌性腹水 11 例; PJV 与化疗、放疗等联用治疗表浅转移癌, 实体瘤 94 例; PJV 与化疗联用治疗肺癌 48 例共计 302 例。其近期有效率分别为 76.5%, 27.3%, 52.1% 和

表4 Ps161 菌苗对家兔免疫后的抗原性测定
Table 4 Determination of homologous titer after the administration of Ps161 by the immunization on rabbits

免疫血清稀释度 Antiserum	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	抗原对照 Antigen control	血清对照 Serum control
抗 原 Ps161 (Antigen) (8mg/ml)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	NS 0.4 Ps161 0.03	NS 0.2 Ps161 0.2
免疫后 14d 凝集价 Titer after immuniza- tion of the fourteenth day	#	#	#	#	#	+++	+++	++	±	-	-
免疫后 21d 凝集价 Titer after immuniza- tion of the twenty- first day	#	#	+++	+++	++	++	+	±	±	-	-
免疫后 14d 凝集价 Titer after immuniza- tion of the fourteenth day	#	#	#	+++	+++	++	+	±	±	-	-
免疫后 21d 凝集价 Titer after immuniza- tion of the twenty- first day	#	#	+++	+++	++	++	+	±	±	-	-

表5 Ps161 菌苗对人鼻咽癌 CNE₂ 细胞株的抑制效果
Table 5 Biotic effect of Ps161 on the cells strain of CNE₂(nasopharynx cancer)

样 品 Sample	浓度 (μg/ml) Concentration	平均细胞数 Mean of cell	抑制率(%) Antitumor rate
细胞质 Cell sap	200	144,200	73.0
细胞质 Cell sap	200	185,800	55.2
细胞壁 Cell walls	200	52,500	100.0
细胞壁 Cell walls	200	149,200	70.0
对 照 Control		315,000	

58.3%，总有效率 64.2% (见图 6、7)。PJV 治疗癌性胸水的近期有效率为 66% 和 83.3%。

讨 论

Ps161 菌株经中国科学院微生物研究所鉴定为一新种，命名为济南假单胞菌

(*Pseudomonas jinanensis* sp. nov.)。其代谢产物对一些革兰氏阳性细菌有抗生作用，对小鼠移植瘤有抑制作用。并能激活小鼠细胞免疫和体液免疫功能，这与国内报道的厌氧棒状杆菌菌苗激活免疫系统与抑瘤效果相似^[3]。并与 Lowell 报道的牛布鲁氏杆菌提取物对小鼠网状内皮系统有激

表 6 增强吡喹酮治疗小鼠血吸虫感染效果
Table 6 Increase the efficacy of praziquantel on schistosomiasis

组 别 Group	鼠 数 No. of mice	剂 量 Dosage	平均虫数 $\bar{x} \pm SD$	减虫率(%) Schistosomacidel rate
PJV + 吡喹酮*	9	0.4mg/鼠 + 300 mg/kg	4±3.3	86.9
PJV	6	0.4mg/鼠	32.7±7.1	—
吡喹酮	9	300mg/kg	18.3±9.6	40.2
对 照 Control	19	—	30.6±7.4	

* 吡喹酮——Praziquantel

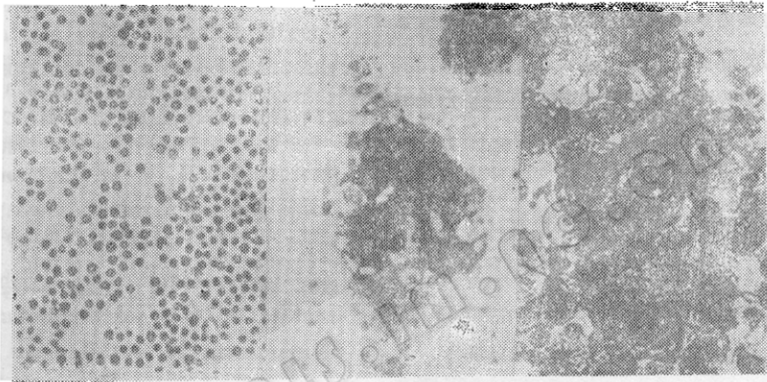


图 6 三位癌症患者胸水中癌细胞呈片块状生长且胸水呈现血性
(左起: 10×;20×;40×)
Fig. 6 The cancer cells show massae growth in the carceremia
pleural effusion of the three people's

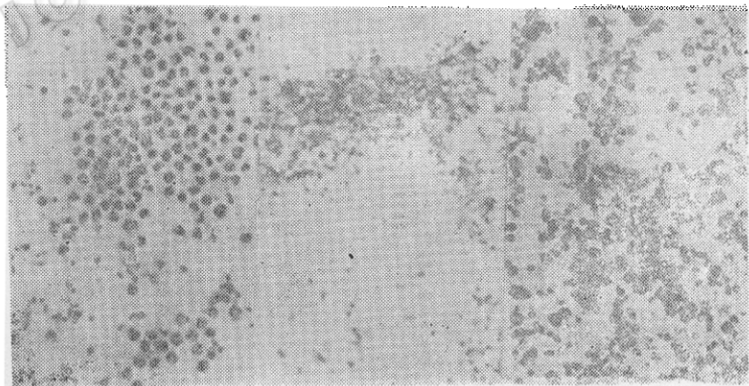


图 7 经 PJV 腔内注射后患者癌细胞明显减少,破碎,并见细胞浸润,血性胸水呈桔黄色
(左起: 10×;10×;40×)
Fig. 7 The cancer cells markedly decreased, broken, inflammatory cells invaded
and carceremia of the pleural effusion show orangeade

活作用,和对小鼠移植的成骨肉瘤的抑制有促进作用相似^[4]。与 Richard 报道的牛布鲁氏菌的乙醚提取物能激活巨噬细胞和抗

瘤活性有相似之处^[5]。中国预防医学中心寄生虫病研究所药理室的实验证实, PJV 还有促进和增强吡喹酮治疗小鼠血吸虫童

虫的作用。PJV 注入人体可提高白细胞总数和中性粒细胞数, 由于该菌株系革兰氏阴性菌, 菌体含脂多糖-蛋白复合物^[6], 起佐剂作用而激活巨噬细胞, 其可能产生“肿瘤坏死因子、过氧化物, 使初生态氧[O]释放”, 故可选择性地使瘤组织出血坏死, 并可使巨噬细胞产生白细胞介素参与对瘤细胞的抗生作用。PJV 还能诱导干扰素, 可调节免疫活性细胞功能, 使 NK、K 细胞活性增强, 而起到间接抗肿瘤作用^[3]。

PJV 作为免疫调节剂仅是一种辅助的激发机体免疫防御功能的药物, 必须要与手术、化疗、放疗结合应用, 抑制、吞噬或消灭肿瘤细胞的效果才能最佳^[7,8]。因为肿瘤本身分泌的抑制因子能抵抗活化巨噬细胞的作用^[9,10]。

在 302 例 PJV 临床疗效观察中, 对癌性胸水近期有效率为 76.5%。与化疗合用治疗肺癌近期有效率为 58.3%, 治疗其他浅表转移癌、实体瘤有效率为 52.1%, 对

癌性腹水有效率较低为 27.3%。其毒性相对较小, 不损害内脏及其功能。因此, PJV 是目前我国治疗恶性肿瘤的一种有效药物。

参 考 文 献

- [1] 蔡宏道等: 实用临床检验学(第三册), 上海卫生出版社, 上海, p. 1058, 1958。
- [2] 中国科学院上海药物研究所等: 科学通报, 16: 765—768, 1979。
- [3] 张玲等: 中国免疫学杂志, 1(3): 25—30, 1985。
- [4] Lowell, A. G. et al.: *Cancer Treatment Reports*, 62: 1931—1935, 1978。
- [5] Richard, M. S. et al.: *ibid.*, 62: 1937—1941, 1978。
- [6] 郑翊珊等: 中国医学百科全书(免疫学分册), 上海科学技术出版社, 上海, p. 37—38, 1983。
- [7] Hortobagyi, G. N. et al.: *Cancer Treatment Reports*, 64: 157—159, 1980。
- [8] Harukazu, M. et al.: *Gann*, 70: 687—692, 1972。
- [9] 余 滨等: 国外医学(免疫学分册), (1): 1—15, 1980。
- [10] 臧人杰等: 同上, (1): 1—9, 1979。

THE ANTIBIOTIC EFFECT OF *PSEUDOMONAS JINANENSIS* SP. NOV.

He Zuze Xu Dajiang Huo Meiling Chen Jinying Wu Kexia

(Institute of Materia Medica, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan)

The *Pseudomonas jinanensis* has been isolated from soil and screened by antibioticogram assay and spermatogonial assay.

It has certain antibiotic properties. The metabolite which has been produced is certainly effective against *Staphylococcus aureus* and some other positive germs.

The preparation of *Pseudomonas jinanensis* vaccine, namely PJV. It's biological activity on the growth of tumor-bearing mice and the murine spermatogenous cell.

It is considered that enhancement of nonspecific immunologic function of the host might increase the efficacy of praziquantel on schistosomiasis in mice.

PJV has certainly produced effectiveness against malignant pleural effusion (effective rate was 76.5%), cancer of lung (effective rate was 58.3%), many solid kinds of cancer (effective rate was 52.1%), and the total effective rate was 64.2%. It could increase the sensitivity of cancer cells to radiation.

PJV could stimulate the animal (rabbit) to develop specific antibody. PJV might belong to the class of immunomodulating agents.

Key words

Pseudomonas jinanensis; PJV antibiotic activity