

肺炎克雷伯菌表面成分对小鼠细菌感染的保护作用*

葛新¹ 陈锦英¹ 吴庆刚¹ 方文² 张瑛²

(天津医科大学微生物教研室 天津 300070)¹

(天津大学化工学院 天津 300072)²

摘要: 观察肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, Kp) 表面成分在小鼠体内对细菌感染的保护作用。经肺炎克雷伯菌培养液经溶菌酶、NP40 溶菌后, 再经去脂、去蛋白和有机溶剂沉淀, 干燥获取 Kp 表面成分干粉。用不同剂量的 Kp 表面成分免疫小鼠, 分别用大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌攻击小鼠, 记录小鼠死亡情况, 并测定循环抗体效价。结果: Kp 表面成分低剂量组 (30 μ g/g 体重) 和高剂量组 (40 μ g/g 体重) 对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌感染有显著保护作用, 能降低感染小鼠的死亡率。免疫后小鼠的抗体效价明显高于对照组小鼠 ($P < 0.01$)。应用 Kp 表面成分的小鼠对细菌感染有一定的保护作用。

关键词: 肺炎克雷伯菌, 表面成分, 免疫活性

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2002) 06-0051-04

POTECTIVE EFFECTS OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* SURFACE PREPARATIONS ON EXPERIMENTAL INFECTIONS IN MICE

GE Xin¹ CHEN Jin-Ying¹ WU Qing-Gang¹ FANG Wen² ZHANG Ying²

(Department of Microbiology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070)¹

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072)²

Abstract: Objective: To observe the protection of *Klebsiella pneumoniae* (Kp) surface preparations on bacterial infections in mice. Methods: Kp strain was isolated from clinical sample. Its surface preparations were extracted from fluid culture by bacteriolysis, delipidation, deproteination and precipitation by organic solvents. Mice were immunized with various doses of the surface preparations before challenged with the strains of *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus*. The survival rate was analyzed within 5 days and the serum titer of murine antibody to the surface preparations was assayed by ELISA method. Results: The mice injected with Kp surface preparations at 30 μ g/g⁻¹·bw and 40 μ g/g⁻¹·bw were protected obviously against infection with the strains of *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus*. The average antibody titer in experiment group was significantly higher than that in control group ($P < 0.01$). Conclusion: The *Klebsiella pneumoniae* surface preparations have protective effects on bacterial infections in mice.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, Surface preparations, Immunity

感染性疾病是人类的大敌。随着抗生素的应用, 感染性疾病已经得到了有效的控制。但日益严重的细菌耐药性对抗感染治疗提出了新的挑战, 众多的病毒性感染尚缺乏有效的治疗药物。许多学者开始注重改善机体免疫状态和增强机体的免疫功能在治疗感染性疾病中所起到的积极作用。本文提取了肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, Kp) 表面成分, 用不同剂量的该成分免疫小鼠, 观察它对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌感染的保护作用, 为其作为免疫调节剂用于感染性疾病的防治奠定基础。

* 天津市自然科学基金资助项目 (No. 993604411)

收稿日期: 2001-11-21, 修回日期: 2002-02-15

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基:提取表面成分的肺炎克雷伯菌 Kp9 为临床分离菌株,经 VITEK 细菌自动分析仪鉴定。感染动物的大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌临床分离菌株,经常规鉴定。细菌培养采用 LB 液体及固体培养基。

1.1.2 试剂:溶菌酶 (Sigma 分装), NP40 (Fluck), 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG (卫生部北京生物制品研究所)。

1.1.3 动物:昆明种小鼠, 78 只, 6~8 周龄, 体重 $20 \pm 2\text{g}$, 购自天津医科大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 肺炎克雷伯菌 (Kp) 表面成分的提取^[1]:肺炎克雷伯菌 Kp9 株接种液体培养基过夜培养, 经 1:10 转种 37℃ 培养 8h 后用 NP40 溶菌裂解, 离心取上清浓缩, 分别经去脂、去除杂蛋白和有机溶剂甲醇-甲缩醛沉淀后, 37℃ 干燥成粉末状。

1.2.2 Kp 表面成分分析:蛋白含量的测定采用 Lowery 法^[2], 总糖的测定采用酚-硫酸法^[3], 葡萄糖醛酸的测定采用呋唑法^[4]。

1.2.3 半数致死量 (LD_{50}) 测定:小鼠随机分为 5 组, 每组 6 只。大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌分别接种平板后转种 LB 液体培养基, 37℃ 培养 6~8h, 菌液以比浊法测定菌量, 10 倍稀释成 4 个浓度 (5×10^7 、 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^4 CFU/mL)。每只小鼠腹腔注射 0.2mL 菌液, 并设对照组, 观察 7d, 按 Reed-Muench 公式计算 LD_{50} ^[5]。

1.2.4 细菌感染保护试验:小鼠分为 3 组, 设正常对照组、Kp 表面成分低剂量组 ($30\mu\text{g/g}$ 体重) 和高剂量组 ($40\mu\text{g/g}$ 体重), 每组 8 只。用 0.9% NaCl 溶解 Kp 表面成分提取物, 微孔滤膜过滤除菌。按小鼠体重计算所需 Kp 表面成分提取物剂量, 分 2 次 (间隔 3d) 腹腔注射给小鼠, 每只 0.2mL, 对照组注射同体积生理盐水。末次免疫后第 2d 将 $100LD_{50}$ 的大肠埃希菌或金黄色葡萄球菌的菌液腹腔注射至小鼠, 每只 0.2mL。连续 5d 记录小鼠死亡情况。

1.2.5 小鼠循环抗体效价的测定:采用 ELISA 方法。细菌感染保护试验观察 5d 后, 从低、高剂量组存活小鼠中各取 5 只, 从对照组存活小鼠中取 3 只, 内眦取血, 分离血清。Kp 表面成分提取物用包被液 (pH9.6) 配制蛋白含量 $20\mu\text{g/mL}$ 包被酶标板。依次加入 0.5% 明胶, 不同稀释倍数小鼠血清, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 和邻苯二胺-过氧化氢显色系统。以未免疫的小鼠血清为阴性对照, 以未加血清孔为空白对照, 测定 $OD_{494\text{nm}}$ 值。以 $P/N \geq 2.1$ 为阳性, 测定受试动物的抗体效价。

1.2.6 统计方法:采用精确概率法和方差分析比较实验组与对照组的差异, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 Kp 表面成分的分析结果

肺炎克雷伯菌 Kp9 菌株 500mL 培养液可获得表面成分提取物 5.7g, 其中蛋白质含量 30.1%, 总糖含量 11.6%, 葡萄糖醛酸含量 1.79%。

2.2 Kp 表面成分对细菌感染的保护作用

观察 Kp 表面成分免疫小鼠后对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌感染的保护作用 (表 1)。对照组小鼠感染细菌后第 1d 陆续开始死亡, 存活的小鼠动作迟缓, 伏卧不动。至第 5d 小鼠大部分死亡, 其中大肠埃希菌组存活 1 只, 金黄色葡萄球菌组存活 2 只。实验组小鼠出现死亡的时间晚于对照组, 大肠埃希菌组 and 金黄色葡萄球菌组分别于第 2d 和第 3d 出现死亡, 高剂量组死亡数均小于低剂量组, 存活的小鼠食量正常, 较活跃。至观察结束时实验组小鼠大部分仍存活。统计分析表明, 大肠埃希菌组低剂量 Kp 表面成分的保护作用与对照组比较无明显差别 ($P > 0.05$), 高剂量 Kp 表面成分免疫能显著提高小鼠的生存率 ($P < 0.05$)。金黄色葡萄球菌组低剂量和高剂量 Kp 表面成分均表现出显著的保护作用 (前者 $P < 0.05$, 后者 $P < 0.01$)。

表 1 Kp 表面成分免疫小鼠对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌感染的保护作用

分组	大肠埃希菌组				金黄色葡萄球菌组			
	死亡数	存活数	存活率 (%)	P	死亡数	存活数	存活率 (%)	P
对照组	7	1	12.5		6	2	25	
低剂量组	3	5	62.5	0.119 ^Δ	1	7	87.5	0.041 ^Δ
高剂量组	1	7	87.5	0.01 ^Δ	0	8	100	0.0035 ^Δ

^Δ 与对照组比较。

2.3 小鼠循环抗体效价测定

观察不同剂量的 Kp 表面成分对小鼠抗体水平的影响 (表 2)。结果显示, 经过两次免疫后, 低剂量和高剂量 Kp 表面成分均可刺激小鼠产生相应抗体, 与对照组比较有明显差别 ($P < 0.01$), 并且呈剂量依赖关系。

表 2 小鼠循环抗体效价测定结果

分组	平均抗体效价	
	大肠埃希菌组	金黄色葡萄球菌组
低剂量组	1: 443	1: 408
高剂量组	1: 508	1: 497
对照组 [*]	1: 127	
F	31.8 [*]	22.5 [*]

^{*} 对照组小鼠共存活 3 只, 其数据与大肠埃希菌组和金黄色葡萄球菌组比较

^{*} $P < 0.01$

3 讨论

当今, 感染性疾病仍然严重威胁人类的

健康。由于细菌耐药性的产生和机体免疫功能低下等原因, 抗生素治疗在许多情况下并不能获得理想的效果。人们认识到有效的抗生素治疗必须与机体的免疫功能相结合才能最终彻底地消除病原微生物。因此近年来免疫调节剂的研究成为热点课题, 增强机体免疫功能成为改善感染性疾病治疗现状不可忽视的一个方面。

已有的研究表明细菌表面成分在调节机体免疫功能方面具有重要作用。Fournier 等用肺炎克雷伯菌的荚膜多糖、细菌表面成分和核蛋白体 3 种成分分别接种于小鼠, 结果细菌表面成分免疫原性最强^[1]。细菌表面成分所以增强机体非特异性免疫, 可能是因为细菌的表面有多种抗原决定簇, 荚膜多糖与外膜蛋白、脂多糖结合在一起后, 使多糖由非胸腺依赖性抗原转变为胸腺依赖性抗原, 免疫原性大大增加, 能有效地刺激机体免疫系统。

肺炎克雷伯菌为肠道的过路菌, 是常见的机会致病菌。Kp 以其丰厚的荚膜在革兰阴性杆菌中著称, 该菌的荚膜糖蛋白是一种理想的免疫调节剂, 具有刺激性强、副作用小的特点。法国罗素公司开发的新型免疫调节药一必思添就是由肺炎克雷伯菌荚膜糖蛋白组成, 已用于临床防治上呼吸道感染。体内外实验研究表明它对感染有很好的

保护作用。预先接受腹腔注射或口服必思添的小鼠对多种病原微生物感染表现出抵抗力, 包括金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、产单核细胞李斯特菌以及白假丝酵母菌和流感病毒等^[6,7]。Rudent 等甚至发现必思添对环磷酰胺所致免疫抑制的小鼠也有相当的免疫增强作用, 能显著降低李斯特菌感染的死亡率^[6]。我们制备的 Kp 表面成分体外实验可有效地刺激细胞免疫和体液免疫功能^[8], 并能诱发 TNF- α 、IL-2 和 IL-6 的产生 (未发表资料)。本文结果进一步表明实验动物应用 Kp 表面成分后对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌感染取得了良好的保护作用, 与必思添的报道相一致。该成分的作用可能在于其中的糖蛋白激活了免疫系统, 增强吞噬细胞的代谢、趋化性和吞噬功能并促进细胞因子释放, 从而激活 T 细胞和 NK 细胞。

血清抗体效价的测定进一步验证了保护试验的结论。由于肺炎克雷伯菌是肠道过路菌, 与其它肠道杆菌存在共同抗原成分, 自然状态的动物体内有可能存在一定程度的抗体, 但本文实验组和对照组的血清抗体效价还是表现出明显差异 ($P < 0.01$)。相信 Kp 表面成分进一步纯化后, 其免疫调节作用会相应增强。

参 考 文 献

- [1] Fournier J M, Colette J R, Riottot M, *et al.* Infect Immun, 1981, 32: 420 ~ 426.
- [2] 李健武, 肖能康, 余瑞元, 等. 生物化学试验原理与方法. 北京: 北京大学出版社, 1994. 168 ~ 170.
- [3] 严 杰, 罗海波, 陆德源. 现代医学微生物学实验技术及其应用. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 38 ~ 39.
- [4] 陈锦英, 陈秉阳. 天津医药, 1990, 18 (9): 545 ~ 546.
- [5] 杜 平. 医用实验病毒学. 北京: 人民军医出版社, 1985. 81 ~ 82.
- [6] Rudent A, Zaliz R, Salles M F, *et al.* Int J Immunopharmac, 1982, 4: 256.
- [7] Karine N, Francois W, Pierre Y A, *et al.* Int. J. Immunopharmac, 1999, 21: 561 ~ 574.
- [8] 李晓霞, 冯津津, 李方涛, 等. 天津医药, 2001, 29 (4): 220 ~ 222.