

作为免疫佐剂厌氧棒状菌 77-1 菌株的生物学效应

李守悌 王玉亭 董关木 李修兰

路歧祥 蔡锦霞 朱荫耕 魏 廉

(卫生部药品生物制品检定所,北京)

厌氧棒状菌广泛存在于健康人或动物体中。某些厌氧棒状菌是一种强力的免疫激活剂,它能增强机体对细菌及病毒的抵抗力^[1,2]。尤其 1967 年发现它对动物有明显地广谱抑瘤作用,法国与英国将其制成菌苗作用于辅助化疗及放疗。大量的临床资料提示,此菌苗是较好的免疫佐剂之一。

为了向临床提供国内较好的免疫佐剂,我们从 1976 年开始分离菌种,从健康人骨髓中分离出的 77-1 菌株已定为正式生产用菌株,现将该菌株的分离、鉴定及生物学性状总结如下。

材 料 和 方 法

(一) 厌氧棒状菌苗

国内菌株: 77-1。国内外 I 型代表株: 76-27 (河南医学院分离), 0207, CN6134 (英国菌苗)。国外 II 型代表株: 10390。国外 III 型代表株: 10387。国外 IV 型代表株: 4982, IM1585 (法国菌苗)。除英法两国的菌苗外其余各株菌苗均由本实验室制备。

(二) 瘤株

艾氏腹水癌,由本所提供。

(三) 实验动物

LACA、C₃H 和 L615 纯系小鼠,由本所动物室提供。

(四) 菌株分离

77-1 株分离标本取自一名健康男性的胸骨骨髓,将骨髓接种于胰酶消化碎肉半流体的半中管底部,37℃ 培养。

(五) 血清学试验

将菌苗注射于家兔耳静脉,免疫 4 次,剂量

为 4、8、16 及 16mg,间隔 5 天,分离的血清作两倍递增稀释,用培养菌体上清可溶性抗原作对流电泳。吸收抗原 4—5mg/ml 灭活菌液及免疫血清按 1:1—3 混匀,37℃ 放置 4—12 小时,离心,测上清交叉效价,若免疫血清效价在 1:32 以上,吸收后两侧残留效价在 1:4 以下,定为同型,如一侧残留效价在 1:8 以上定为异型。

(六) 脾脏单核细胞酸性磷酸酶测定

按文献[3]进行。C₃H 小鼠,体重 18—22g,雌雄各半,试验组每只腹腔注射菌苗 0.5mg/0.25 ml,对照组注射同剂量生理盐水,14 天处死小鼠取脾进行试验。

(七) 脾酯酶阳性淋巴细胞测定

按刘连改良的酯酶染色法^[4]。C₃H 小鼠,每组 10 只,雌雄各半。试验组每只腹腔注射菌苗 0.5mg/0.25ml,对照组注射同剂量生理盐水,14 天颈动脉放血处死动物取脾,制成脾细胞悬液,计数酯酶阳性淋巴细胞。

结 果

(一) 菌株生物学性状

77-1 菌株为革兰氏阳性短小棒状杆菌,两端浓染,单个散在或成 V 型排列。菌生长较快,用碎肉半流体培养,第 5 天可见带尾样灯笼形菌落。在厌氧液体培养基中菌体生长呈混浊沉淀。大量培养时,两株菌落各试验 6 次,每次 2 瓶,接种浓度为 3%,结果 77-1 株菌的产量明显高于 76-27 株,详见表 1。

(二) 血清学性状 (见表 2)

77-1 株为血清学 I 型。

(三) 对小鼠脾脏单核细胞酸性磷酸酶的

表 1 不同菌株对培养浓度的影响

菌 株	试验次数	产量(亿/ml 培养基)	X(亿)	$\bar{X} \pm SD$
77-1	1	122.5	122.5	114.63±15.8 亿/ml培养基
		122.5		
	2	129.5	126	
		122.5		
	3	112	117.25	
		122.5		
4	105	105		
	105			
5	87.5	87.5		
	87.5			
6	129.5	129.5		
	129.5			
76-27	1	94.5	94.5	92.1±12.4 亿/ml 培养基
		94.5		
	2	94.5	94.5	
		94.5		
	3	105	105	
		105		
4	87.5	87.5		
	87.5			
5	70	70		
	70			
6	101.5	101.25		
	101			

注：表 1 的试验材料由长春生物制品研究所提供。

激活作用 (表 3)

77-1 和 76-27 株组均有明显的激活巨噬细胞酸性磷酸酶作用, 较对照组分别升高 4.4 和 2.6 倍。

(四) 菌株对脾酯酶阳性淋巴细胞的影响 (表 4)

77-1 株组较对照组酯酶阳性淋巴细胞增加显著($P < 0.01$)而 76-27 株组增加不明显。

(五) 抗艾化腹水癌效应

昆明小鼠体重 18—20g, 雌雄各半, 每只小鼠腹腔注射瘤细胞 100 万个/0.2ml, 试验组注射菌苗 0.5mg/0.25ml, 5 次, 每次间隔 1 天。对照组同时注射同剂量生理盐水, 观察 30 天。以对照组全部癌性胸水死亡为起点计算试验组小鼠活存数。表 5 所示, 各株保护率相近。

(六) 对切除 75% 肝脏的再生作用

LACA 小鼠, 雌, 体重 18—22 g, 每组 10 只。肝脏切除 75%, 5 小时后试验组每只尾静

表 2 77-1 菌株与国外菌株交叉吸收试验

免疫血清	吸收用菌	吸收前交叉效价		吸收后残留效价		结果判断
		本 菌	吸收菌	本 菌	吸收菌	
77-1	0207	1:32	1:16	—	—	同 I 型
I 型 0207	77-1	1:32	1:32	1:4	1:4	
77-1	10390	1:32	1:16	1:16	—	非 II 型
II 型 10390	77-1	1:64	1:4	1:32	—	
77-1	10387	1:32	1:8	1:16	—	非 III 型
III 型 10387	77-1	1:64	—	—	—	
77-1	4982	1:32	—	—	—	非 IV 型
IV 型 4982	77-1	1:64	1:4—8	>1:16	—	

表 3 菌株对脾单核细胞酸性磷酸酶活性的影响

菌 株	全脾含磷量	升高指数	P 值
77-1	99	4.4	<0.001
76-27	60	2.6	<0.01
盐水对照	23		

注：每组小鼠 10 只

脉注射菌苗 0.5mg/0.25ml，对照组每只注射生理盐水 0.25ml，84 小时颈动脉放血处死小鼠取肝称重。表 6 所示，77-1 株较对照组的肝脏增重显著 ($P < 0.01$)，而 76-27 株不明显 ($P > 0.05$)。

(七) 对心脏的影响

表 4 菌株对小鼠脾酶阳性淋巴细胞的影响

菌 株	ANAE 阳性细胞(%)	细胞数(亿)/个脾	ANAE 阳性细胞数(亿)/个脾	增生率(%) / 个脾	P 值
77-1	40.5	5.68	2.31	40	<0.01
76-27	38.5	5.03	1.93	25	>0.05
盐水对照	38	3.65	1.39		

表 5 菌株抗艾氏腹水癌效应

菌 株	活 存 数	保护率(%)
77-1	8	80
76-27	8	80
英国 CN 6134	8	80
法国 LM 1585	7	70
盐水对照	0	0

表 6 各菌株对肝脏切除 75% 后的再生作用

菌 株	肝 重	P 值
77-1	0.82	<0.01
76-27	0.74	>0.05
对 照	0.68	

L615 小鼠 18-22g，试验组每只腹腔注射菌苗 0.5mg/0.25ml，对照组给同剂量生理盐水，14 天颈动脉放血处死动物，观察心脏的组织学变化，不同菌株对心脏的影响不同。英国菌株毒性最强，能使心脏的 36% 有心肌炎病变，其中 21% 心肌灶性坏死，心内膜血柱。76-27 株

能使心脏有心肌炎病变，而 77-1 株未见到对心脏的损伤。

(八) 临床观察

近几年来北京、东北三省及河北省已有 600 余例女阴白色病损病人试用 77-1 株菌苗。用菌苗在患部涂抹，每日，一次或局部注射，用

药 2—4 同复查一次。疗效较好,止痒有效率为 97.4%,促进皮肤复色者占 96%,溃疡治愈率为 80%,对皲裂的治愈率 100%,总有效率为 97%。300 余例血性癌性胸水病人胸腔注射菌苗有显著消退胸水作用,有效率为 95% 以上,随访 2—9 个月未见再渗出。

讨 论

77-1 菌株生长快,产量高,是较理想的生产用菌株。本试验用国外 I、II、III 及 IV 型代表株制备家兔血清,用交叉吸收试验及对流电泳等指标作了菌体抗原的初步分析,参考生化反应,对 77-1 株作了初步分型试验,证明 77-1 株与国外 I 型菌株有共同抗原成份,为同型菌。

厌氧棒状菌的抗癌机制目前尚有争论。但已有试验证明在动物的静脉或腹腔注射厌氧棒状菌后,动物的肝、脾及肺增大,吞噬细胞活力增强,加速了从血液中清除炭颗粒的能力,显示了单核吞噬细胞系统被激活的现象。组织学检查表明这些脏器中含有大量的巨噬细胞,厌氧

棒状菌苗激活的巨噬细胞在试管中抑制肿瘤的生长。本试验表明 77-1 株显著增强了小鼠脾中酸性磷酸酶的活性,有明显的抑瘤效应。

酯酶阳性淋巴细胞的存在可以作为 T 细胞的标记。一般认为厌氧棒状菌对 T 细胞无作用或有抑制作用^[5]。本试验表明 77-1 株菌苗对 T 细胞的作用增强,而 76-27 株作用不明显。

Fisher^[6] 试验证明厌氧棒状菌对切除 70% 大白鼠肝脏有增生作用,本试验表明 77-1 株对切除 75% 肝脏后,小鼠肝脏亦有明显增生作用,而 76-27 株作用不明显。菌株不同其毒性亦不同,英国菌株毒性明显大于 77-1 株。值得注意的是 77-1 株对动物的心脏未见损伤,而英国菌株和 76-27 株使动物心脏病变明显。

参 考 文 献

- [1] Adlam, C. et al.: *Nature* (NB), **235**:219, 1972.
- [2] Trank, M. C. et al.: *Infect. Imm.*, **9**:863, 1974.
- [3] 俞永平: CC-76 菌苗活化鼠脾单核细胞溶酶体酶的研究(内部资料)。
- [4] 刘瑾等: 安徽医学院学报, **16**(1): 41, 1981.
- [5] 林飞卿: 河南医学院学报, **15**(1): 60, 1980.
- [6] © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>