

# 牙髓紫卟啉菌内毒素对炎症性细胞因子的介导作用

荫 俊 王忠泽 侯晓军 陈跃峰 张松乐

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

张 郁 孙叶方

(第四军医大学牙髓生物学重点实验室 西安 710032)

**摘要** 牙髓紫卟啉菌 ATCC35406 是近年来新发现的重要致病性专性厌氧菌,采用改良酚-氯仿-石油醚法提取牙髓紫卟啉菌 ATCC35406 内毒素脂多糖,通过 Kramer 测定法、软琼脂细胞培养法以及胸腺细胞增殖法测定脂多糖的细胞生物学活性。结果显示:纯化脂多糖可不同程度地诱导小鼠模型生成肿瘤坏死因子(TNF)、集落刺激因子(CSF)和白介素-1(IL-1),并在一定范围内呈剂量依赖型,提示牙髓紫卟啉菌内毒素在动物模型和细胞模型中具有显著的细胞生物学和免疫学活性。

**关键词** 牙髓紫卟啉菌,内毒素,细胞因子

**分类号** R781.3 **文献标识码** A **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-37-41

## PRODUCTION OF CYTOKINS INDUCED BY ENDOTOXIN PREPARED FROM *PORPHYROMONAS ENDODONTALIS* ATCC 35406

Yin Jun, Wang Zhongze, Hou Xiaojun, Chen Yuefeng, Zhang Songle

(Institute of microbiology and epidemiology, Academy of military medical sciences, Beijing 100071)

Zhang Yu, Sun Yefang

(Laboratory Endodontics, Dental school, FMMU, Xian, 710032)

**Abstract** cyto-immunological activities of endotoxin prepared from *Porphyromonas* ATCC 35406 were examined in production of interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF), colony stimulating factor(CSF) and Shwartzman preparatory Dose<sub>50</sub> (SPD<sub>50</sub>). The results demonstrated that IL-1 can be produced at dose 0.1ng of endotoxin. And level of IL-1 correlated with the dose of endotoxin; The endotoxin can also induce production of sera TNF at dose of 1.0μg in mice, TNF can be found in sera of mice after endotoxin injection one hour later, and disappeared within six hours; the results still revealed this endotoxin have a inducing activity on macrophages of

mouse in production of CSF at the dose 0.1 $\mu$ g and have a character of dose dependence; the  $SPD_{50}$  of *Porphyromonas* endotoxin was 64 $\mu$ g in local Shwartzman reaction. Those results demonstrated the inducing activities of *Porphyromonas* endotoxin on cytokins may be important for its pathogenesis in clinical infection.

**key words** *Porphyromonas endodontis*, Cytokins, Endotoxin

牙髓紫卟啉菌(*Porphyromonas endodontalis*, Pe.) 属革兰氏阴性专性厌氧菌。最初于八十年代中期从感染牙齿根管和牙源性脓肿中分离, 以后的研究发现该菌特异性地存在于感染的牙髓中, 为一种与颌面部牙源性脓肿关系密切的不解糖菌株, 是临床口腔颌面部急性感染的重要致病菌<sup>[1-2]</sup>。但由于专性厌氧培养条件的限制, 目前对其导致颌面部牙源性感染的致病机理仍不清楚。因此, 为了研究牙髓紫卟啉菌的免疫生物学活性, 了解其致病作用的分子基础, 我们采用改良酚-氯仿-石油醚法提取纯化牙髓紫卟啉菌 ATCC35406 的内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 通过动物和细胞模型检测牙髓紫卟啉菌 LPS 对机体内源性细胞因子等免疫介质的诱导作用, 并与大肠杆菌标准内毒素进行对照实验, 以期对专性厌氧菌致病机理研究提供新的实验资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 脂多糖提取纯化

ATCC35406 标准菌株(本室保存)复苏传代培养, 厌氧条件下接种于批量预还原的 GAM 厌氧培养基(北京新技术研究所), 于厌氧培养箱 37 $^{\circ}$ C (80% 氮气、10% 氢气、10% 二氧化碳) 培养 72h, 收集菌落。脂多糖提取采用 Galanos 等的改良酚-氯仿-石油醚法<sup>[3]</sup>。纯化脂多糖分装冷冻干燥, 低温保存备用。

### 1.2 脂多糖纯度鉴定

采用 Folin 酚和紫外吸收法测定蛋白和核酸含量。总磷测定采用钼蓝反应法<sup>[4]</sup>。氨基葡萄糖和 2-酮-3-脱氧-D-甘露辛酮糖酸(KDO) 含量分别采用苯甲醛比色法和锌巴比妥法进行<sup>[5-6]</sup>。鲎试剂凝集实验采用标准试管法进行(鲎试剂购自中国东方鲎试剂公司), 实验参照试剂盒说明书进行。

### 1.3 LPS 对 IL-1 的诱导活性

参照 Mizel 的胸腺细胞增殖测定法进行<sup>[7]</sup>。动物采用 C57BL/6 小鼠, 6~8 周龄用于制备巨噬细胞, 3~4 周龄用于制备胸腺细胞。

**1.3.1 小鼠巨噬细胞培养上清制备:** 取小鼠腹腔巨噬细胞悬浮于 1640 培养液, 分别加入不同剂量的脂多糖, 置 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱培养约 30h, 收集上清。

**1.3.2 胸腺细胞制备:** 小鼠胸腺匀浆制备单细胞悬液, 用含 10% 胎牛血清(GIBCO) 的 1640 培养液调整细胞浓度为  $1 \times 10^7$ /mL。

**1.3.3 IL-1 测定:** 取 96 孔细胞培养板每孔加入 0.1mL 胸腺细胞悬液和 0.1mL 巨噬细胞培养上清(ConA 0.003mg/mL, Sigma), 同时设立阴性、细胞、细胞加丝裂原对照组。37 $^{\circ}$ C 5% 二氧化碳培养 72h, 收集前 6h 每孔加入  $^3$ H-TdR 0.5 $\mu$ ci/20 $\mu$ L (上海原子能所), 进行 $\beta$ 计数, 测定 CPM 值。

### 1.4 脂多糖对小鼠集落刺激因子(CSF)的诱导作用

采用软琼脂单层细胞培养法进行<sup>[8]</sup>。

**1.4.1 小鼠 CSF 血清制备:** 昆明种小鼠分成不同剂量组, 自尾静脉注射不同剂量脂多糖 0.2mL, 注射后 6h 自眼眶静脉取血, 常规分离血清备用。

**1.4.2 小鼠骨髓细胞悬液制备:** 无菌取小鼠单侧股骨, 1640 培养液冲出骨髓细胞调整浓度为  $2 \times 10^5$ /mL 的单细胞悬液。

**1.4.3 CSF 活性测定:** 常规制备软琼脂细胞培养悬液(1640 培养基、20% 马血清、0.3% 琼脂、20% CSF 小鼠稀释血清和 0.1mL 骨髓单细胞悬液), 每 30mm 培养皿加入 1mL。37 $^{\circ}$ C 5% 二氧化碳培养 7d。低倍镜下计算集落形成单位。

### 1.5 脂多糖对肿瘤坏死因子(TNF)的诱导活性

实验依 Kramer 细胞毒检测法进行<sup>[9]</sup>。

**1.5.1 小鼠 TNF 血清制备:**ICR 小鼠随机分组, 经腹腔注射卡介苗 (BCG) 2.5mg, 二周后经腹腔注射不同剂量脂多糖 0.5mL, 1.5h 后自眼眶静脉取血, 常规分离血清备用。

**1.5.2 TNF 活性测定:**制备 L929 细胞单层, 37℃ 5% 二氧化碳培养 8h。小鼠 TNF 血清用含放线菌素 D 的 1640 培养基二倍序列稀释, 每孔 0.1mL, 继续培养 20h, MTT 法测定每孔的光吸收值, 计数得到的一组杀伤率与对应的稀释倍数的对数值作直线回归, 求出 TNF 活性。

**1.6 局部 Shwartzman 反应 (依 Rietschel 法进行<sup>[10]</sup>)**

纯系新西兰家兔, 随机分组, 常规备皮。

背部皮内注射不同浓度 LPS, 以马流产杆菌 LPS 为平行对照。

18h 后静脉注射 50μg 马流产杆菌 LPS, 4h 后记录结果。

2 结果

2.1 LPS 纯度鉴定

采用 Folin-酚、紫外吸收法以及其他生物化学方法对提取的 LPS 进行了初步鉴定, 结果见表 1。

表1 LPS生化鉴定

核酸	蛋白	总磷	KDO	氨基糖	凝胶集活性
<1%	<1%	6%	12.98%	21.23%	10pg

结果显示, 经改良酚水法提取的牙髓紫卟啉菌内毒素脂多糖, 其蛋白和核酸含量均低于 1%, 具有较好的 LPS 纯度。标准试管法试验结果表明, 牙髓紫卟啉菌 LPS 的最低凝集剂量为 10pg, 与大肠杆菌标准内毒素的鲎试剂凝集活性相同。

2.2 IL-1 诱导活性测定

表2 LPS对小鼠IL-1的诱导活性 (cpm ± s)

	1ng	10ng	100ng	1000ng	盐水对照
Pe.	537±102	921±91	1939±365	1758±228	120±46
E.coli	355±74	755±83	1446±122	1442±221	

P<0.01

参照 Mizel 的小鼠胸腺细胞增殖测定法, 对牙髓紫卟啉菌 LPS 的 IL-1 诱导活性进行了测定结果见表 2。

结果显示, 1ng 的牙髓紫卟啉菌 LPS 即可刺激体外培养的小鼠巨噬细胞产生 IL-1, 并随着 LPS 剂量的增加, IL-1 生成量也随之增加, 但当剂量达到 1μg 时, IL-1 水平反呈下降趋势。提示牙髓紫卟啉菌 LPS 对 IL-1 具有较强的诱导活性, 并在一定剂量范围内呈剂量依赖型。其对 IL-1 的诱导活性高于大肠杆菌标准 LPS (图 1)。

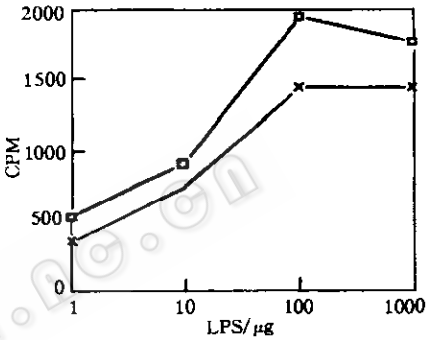


图1 牙髓紫卟啉菌LPS对小鼠IL-1的诱导活性

□PeLPS, ×E.coli LPS

2.3 小鼠血清 CSF 活性测定

经静脉注射不同剂量的 LPS 后, 小鼠血清中 CSF 水平明显增加, 采用软琼脂细胞培养法测定, 结果显示如表 3。

表3 LPS对小鼠CSF的诱导活性 (集落形成单位CFU)

	0.1μg	1.0μg	25μg
Pe.	13.3±4.9	30.0±5.5	43.3±9.5
E.coli	15.1±6.0	26.2±3.4	38.3±8.8
	50μg	75μg	对照
Pe.	65.0±5.6	54.7±5.1	5±2.3
E.coli	55.0±4.2	56.3±7.2	

结果显示, 小鼠血清 CSF 水平随 LPS 剂量增加而上升, 并在一定剂量范围内呈剂量依赖型 (图 2), 小鼠骨髓细胞在 CSF 血清刺激下, 在软琼脂培养基中形成由粒细胞和巨噬细胞组成的集落。其中大部分是粒-巨系, 少数由单纯巨噬细胞组成。高倍镜下可见有成熟的, 具有环状核

的中性粒细胞以及体积较大,形态不规则,核浆比1:1的幼稚巨噬细胞。致密型居多。由此可见LPS诱导的主要为单核-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。紫叶杆菌LPS的CSF诱导活性与大肠杆菌标准LPS无显著差别。

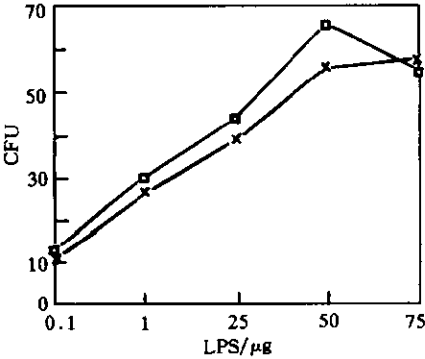


图2 牙髓紫叶杆菌LPS对小鼠CSF的诱导活性  
□Pe. LPS, × *E. coli* LPS

2.4 小鼠血清 TNF 水平测定

经BCG致敏的小鼠,腹腔注射1μg的LPS,血清即可有TNF产生,并随LPS剂量增加而逐渐增高,而当LPS剂量达到50μg时,TNF水平不在明显上升。结果见表4和图3。在LPS诱导小鼠TNF的模型中,TNF产生高峰位于1.5~3h时间内,6h后,血中已测不到TNF活性。结果表明,牙髓紫叶杆菌LPS可迅速刺激

表4 LPS对小鼠TNF的诱导作用 (U/mL)

LPS	0.1μg	1.0μg	10μg	25μg	50μg	对照
Pe.	4	18	1024	4269	5160	0
<i>E. coli</i>	8	14	962	4200	4864	

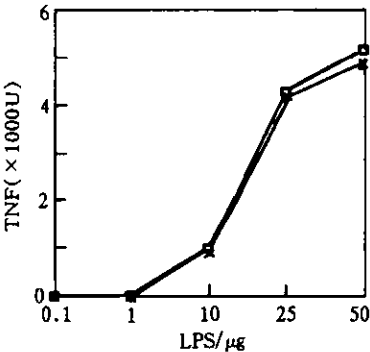


图3 牙髓紫叶杆菌LPS对小鼠TNF的诱导活性  
□Pe. LPS, × *E. coli* LPS

机体产生TNF,注射后1h在血中即可测出TNF活性,并迅速在2h达到峰值。其对TNF的诱导活性与大肠杆菌标准LPS无显著差别。

2.5 局部斯氏反应

局部注射不同剂量的LPS,18h后静脉注射50μg的LPS,牙髓紫叶杆菌LPS诱发的局部斯氏反应的SPD<sub>50</sub>为57μg,大肠杆菌标准LPS为59μg。而平行对照的马流产杆菌LPS为8μg,与前二者之间存在显著差别。

表5 LPS的局部Shwartzman反应(SPD<sub>50</sub>)

LPS	SPD激发剂量 (马流产杆菌LPSμg)	SPD <sub>50</sub> (μg)
牙髓紫叶杆菌	50	57
大肠杆菌	50	59
马流产杆菌	50	8

3 讨论

研究发现,LPS的致死作用是通过内源性细胞因子而实现的。对于LPS敏感的动物,LPS和TNF均可引起一致的毒性反应。而对于LPS抵抗的动物,LPS不引起致死作用,而TNF却具有高度毒性。LPS和TNF介导致死反应的过程基本相似,注射LPS后动物死亡一般在6~9h,而TNF为6~7h。LPS致病作用的强弱,在一定意义上体现在其刺激机体产生内源性细胞因子的能力。因此一种LPS诱导机体产生细胞因子能力大小,成为其致病作用强弱的重要指标。

LPS是最有效的IL-1诱生剂。实验证明牙髓紫叶杆菌LPS在细胞模型中表现出显著的IL-1介导能力,并在一定范围内呈剂量依赖型。这种显著的IL-1介导活性在一定程度上解释了牙髓紫叶杆菌常导致颌面部急性化脓性感染的部分原因。

本实验发现小鼠血清CSF水平随牙髓紫叶杆菌LPS剂量的增加而上升,为一剂量依赖型曲线,0.1μg的LPS即可刺激CSF生成,但当剂量超过50μg时,则CSF水平不再增加,反呈下降趋势。这可能与大剂量LPS产生的抑制作用有关,抑或大剂量LPS同时诱导了CSF抑制物,导致CSF水平降低。

目前对 TNF 的测定多采用参考标准检测法和 Kramer 检测法。本实验采用 BCG 诱导, 两周后给予牙髓紫叶杆菌 LPS, 使小鼠产生了高效价的 TNF, 其结果提示牙髓紫叶杆菌 LPS 具有典型的脂多糖生物学活性, 通过对单核巨噬细胞系统的激活作用而导致高水平的 TNF 产生, 这种显著的炎症介导作用在紫叶杆菌引起的急性化脓性感染中可能具有重要意义。

局部斯氏反应结果显示, 紫叶杆菌 LPS 可导致家兔皮肤局部斯氏反应, 由于牙髓位于牙齿中心密闭的髓腔中, 局部的厌氧环境有利于紫叶杆菌的繁殖生长, 其释放的内毒素所具有的局部斯氏反应能力在导致牙髓坏死方面可能具有一定意义。

总之, 经改良酚水法提取的紫叶杆菌 LPS, 具有典型的内毒素活性, 在动物模型和体外实验中能有效地刺激机体产生 IL-1、TNF 和 CSF, 实验结果提示紫叶杆菌 LPS 高水平 TNF 和 IL-1 的协同诱导作用, 在其导致牙颌脓肿的致病过程中具有重要意义。

## 参 考 文 献

- [1] Drucker D B, Lilley J D, Tucker D *et al.* Microbios, 1992, 71:288~289.
- [2] Kalkren E, Asikainen S, Saarela M *et al.* Oral Microbiol Immunol, 1994, 9:3136~3141.
- [3] Galanos C, Luderitz O, Westphal O. Zent Baktparasit Infekt Hyg. Abt I:A. 1979, 243:226~244.
- [4] Lowry O H, Roberts N R, Farr A *et al.* J Biol Chem, 1954, 207:1~4.
- [5] Strominger J L, Park J T, Thompson R E *et al.* J Biol Chem, 1959, 234:3263~3269.
- [6] Karkhanis D, Zeltner J, Jackson J *et al.* Anal Biochem, 1978, 87:595~601.
- [7] Mizel S B. Manual of Macrophage Methodology, 1981, 407~416.
- [8] Sheng-Yuan Wang, Charn-Yea Su, Ming-ling Hsu *et al.* Experimental Hematology, 1991, 19:122~127.
- [9] Kramer S M, Carver M E. J Immunol Med, 1986, 93:201~206.
- [10] Sveen K. J Periodont Res, 1977, 12:340~350.