

# 产黑色素类杆菌 ATCC 25845 内毒素对小鼠集落刺激因子的诱生活性

芮俊\* 张郁 余伟明\*\* 史俊南

(第四军医大学口腔医学院牙体病科, 陕西西安 710032)

**摘要** 产黑色素类杆菌(*Bacteroides melaninogenicus*)是口腔感染的主要致病菌,由该菌产生的内毒素在致病中具有重要作用。本文采用半固体琼脂培养基培养小鼠骨髓细胞,以形成的集落数作为集落刺激因子(CSF)的水平指标,研究了产黑色素类杆菌内毒素的CSF诱生活性。实验发现,在一定范围内,CSF水平随内毒素剂量增加而上升,但当内毒素剂量大于 $50\mu\text{g}$ 时,CSF水平不再继续上升。产黑色素类杆菌内毒素的集落形成单位数(CFU-C)为 $66.6\pm 8.5$ 。

**关键词** 产黑色素类杆菌;内毒素;集落刺激因子

集落刺激因子(Colony Stimulating Factor, CSF)是近年来发现的一种具有广泛生物学活性的内源性细胞因子,在参与机体抗感染和免疫反应中具有重要意义。细菌内毒素是高效的CSF诱生剂<sup>[1,2]</sup>,在内毒素刺激下CSF的生成可能是机体防御性反应的组成环节,有助于增强杀菌和免疫反应<sup>[3]</sup>,同时由于单核巨噬细胞的大量分化和增殖,加剧炎症反应,又可促进免疫病理损伤过程。因此,细菌内毒素对CSF的诱生能力,可作为内毒素生物学活性的参考指标。产黑色素类杆菌是口腔感染性疾病的重要致病菌,对其内毒素的生物学活性,目前研究较少。本实验采用半固体琼脂培养基,体外培养小鼠骨髓细胞,以形成的集落数作为CSF的水平指标,研究了产黑色素类杆菌内毒素的CSF诱生能力,以期对该菌内毒素的生物学活性有

更深入的了解。

## 材料和方法

### (一) 材料

1. 实验动物:采用纯系昆明种小鼠(第二军医大学实验动物中心),体重18—22g,雌雄各半。

2. 菌种及内毒素:产黑色素类杆菌(*Bacteroides melaninogenicus*) ATCC 25845菌株经厌氧培养和大量增菌后,其内毒素提取采用热酚水法粗提,并经苯酚-氯仿-石油醚法及超速离心纯化。作为对照的马流产杆菌内毒素

\* 本研究为国家自然科学基金资助项目  
现在中科院微生物研究所三室  
\*\* 第二军医大学微生物教研室

为联邦德国参考标准品。

3. 培养基: RPMI1640 培养基及纯化琼脂均购自 GIBCO。马血清购自上海生物制品研究所。

### (二) 方法

1. CSF 血清制备: 昆明种小鼠 55 只, 随机分组, 每组 5 只。分别自尾静脉注射不同剂量的产黑色素类杆菌和马流产杆菌内毒素 0.2ml。注射后 6h, 自眼眶静脉丛取血, 37℃ 水浴 30min, 4℃ 冰箱过夜后分离血清, 0.22µm 微孔滤膜过滤除菌, -20℃ 保存备用。

2. 小鼠骨髓细胞悬液制备: 实验小鼠摘除眼球放血、颈椎脱臼处死, 75% 酒精浸泡 5min, 无菌条件下取单侧股骨, 剔除肌肉后, 用 3ml RPMI1640 培养液冲洗出全部骨髓细胞, 轻轻吹打后制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为  $2 \times 10^5$  有核细胞/ml。

3. CSF 活性测定: 用 RPMI1640 培养基, 加入 20% 马血清、0.3% 琼脂, 20% CSF 小鼠血清(经 1:4 稀释)、0.1ml 骨髓细胞悬液, 用注射器抽取混匀后注入 24 孔细胞培养板, 每孔 1ml。在二氧化碳培养箱 37℃ 培养 7 天, 于低倍镜下计算集落形成单位(Colony-forming Unit in Culture, CFU-C)的数量(以每个细胞团所含细胞数  $\geq 50$  为一个单位)。琼脂取出后整片压片, 固定后作原位 H-E 染色。

## 结 果

### (一) 集落的形态特征

小鼠骨髓细胞在 CSF 血清的刺激下, 在半固体琼脂培养基中大部分为粒细胞、巨噬细胞组成的集落, 少数是仅由巨噬细胞组成的集落。高倍镜下可见组成集落的细胞有成熟的具有环状核的中性粒细胞, 及体积较大、形态不规则、核呈椭圆形、核浆比约为 1:1 的幼稚巨噬细胞。集落形态以致密型居多。

### (二) 内毒素剂量与 CSF 诱生强度间的关系

每组小鼠分别自尾静脉注射 0.1、1、25、50、75µg 的内毒素。注射后 6h 采血, 测定不同

剂量内毒素的 CSF 诱导活性(表 1)。

表 1 细菌内毒素对 CSF 的诱导活性

内毒素剂量 (µg)	集落形成单位数量(CFU-C)		
	产黑色素类杆菌内毒素	马流产杆菌内毒素	盐水对照
0.1	11.3±5.8	19.0±5.2	5±2.3*
1.0	28.3±8.0	41.6±7.5*	
25	39.6±6.8	54.3±11.9*	
50	66.6±8.5	79.0±11.1*	
75	65.0±15.4	56.3±7.37	

\* P<0.01

结果发现, 经小鼠尾静脉注射 0.1µg 的内毒素即可诱导 CSF 产生, 并随内毒素剂量增加, CSF 水平呈剂量依赖曲线, 并在 50µg 内毒素剂量时, CSF 水平达到峰值。而内毒素剂量继续增加时, CSF 水平反呈下降趋势。与盐水对照组相比, 二种内毒素均具有显著的 CSF 诱导活性, 其中马流产杆菌内毒素的 CSF 诱导活性大于产黑色素类杆菌内毒素。

## 讨 论

1966 年, Bradley 和 Ichikawa<sup>[1,2]</sup> 分别用半固体软琼脂培养基培养造血细胞, 由此得到了繁殖分化的粒细胞和单核-巨噬细胞集落, 他们发现这种集落的形成必须在培养基中添加一种特殊因子, 这种因子即我们现在所称的集落刺激因子。在已知的 CSF 中, 多数是诱导粒细胞和单核巨噬细胞分化的因子。CSF 的活性表现在(1)刺激造血细胞分裂。(2)维持应答细胞在体外的生存并刺激其分裂。(3)使应答细胞发生不可逆的定向分化。(4)刺激已成熟的粒细胞和单核巨噬细胞增强吞噬功能, 提高杀伤能力, 促进免疫活性产物生成。迄今为止, 内毒素被认为是最有效的 CSF 诱生剂。机体在受到内毒素刺激后, 细胞合成 CSF 的速度明显加快, 释放至体液中的 CSF 水平迅速升高。因此在这种情况下生成的 CSF 成为炎症反应中的重要介质。

本实验发现, 产黑色素类杆菌内毒素可显著地诱导小鼠 CSF 的产生, 仅 0.1µg 的内毒素

即可诱生 CSF,并在一定剂量范围内呈剂量依赖曲线。但当内毒素剂量超过 50 $\mu\text{g}$ 后,CSF 水平不再继续上升,反而呈下降趋势,这可能与较大剂量内毒素产生的细胞毒性作用有关,抑或大剂量内毒素同时诱导了 CSF 抑制物的产生<sup>[5]</sup>,从而使 CSF 活性下降。

实验结果显示,产黑色素类杆菌内毒素对 CSF 的诱导活性较与流产杆菌内毒素弱,这可能与不同内毒素间的化学成分、结构和生物学活性的差异有关。马流产杆菌内毒素为光滑型,而产黑色素类杆菌内毒素为半粗糙型,相比之下,其分子量较小,结构也较简单,其生物学活性相应亦较低,这些因素可能导致了二种内毒素间 CSF 诱生活性的差异。

一般认为,细菌内毒素主要通过免疫活性细胞,引起机体免疫系统的连锁反应,尤其是内

毒素对单核巨噬细胞系统的活化并由此所引起的细胞因子合成和释放,被认为是感染免疫的中心环节。因此,研究产黑色素类杆菌内毒素对 CSF 的诱导活性,对深入了解该菌在感染中的作用机制,具有实际意义。

### 参 考 文 献

1. Quesenberry P J et al. : *N Engl J Med*, **286**:227,1972.
2. Apte R N et al. : *Exp Hematol*, **4**:10,1976.
3. Nicola N A and M Vadas: *Immunol Today*, **5**(3):76,1984.
4. Bradley T R and D Metcalf: *Aust J Exp Biol Sci*, **44**:287, 1966.
5. Ichikawa Y et al. : *Proc Natl Acad Sci USA*, **56**:488,1968.
6. Stanley E R et al. : *Aust J Exp Biol Med Sci*, **46**:715, 1968.

(1991-9-30 收稿)

## RELEASE OF COLONY-STIMULATING FACTOR INDUCED BY ENDOTOXIN FROM *BACTEROIDES MELANINOGENICUS* ATCC 25845

Yin Jun Zhang Yu Yu Weiming Shi Junnan

(Department of Endodontics, Qindu Dental School, Xian 710032)

Present study investigated the effect of endotoxin from *Bacteroides melaninogenicus* ATCC 25845 on release of colony-stimulating factor (CSF) in mice. The bone marrow cells were cultured in semisolid agar medium, the number of colonies was as a level index of CSF. The results showed that as much as 0.1 $\mu\text{g}$  endotoxin could induce the release of CSF, moreover, The level of CSF increased with dose of endotoxin until 50  $\mu\text{g}$ . The colony-stimulating factor level of *B. melaninogenicus* endotoxin was  $66.6 \pm 8.5$  (CFU-C). This endotoxin showed significant effect on bone marrow cells of mice.

**Key words** *Bacteroides melaninogenicus*; Endotoxin; Colony-stimulating factor