

母牛分枝杆菌制剂对小鼠腹腔巨噬细胞 产生一氧化氮水平的影响

李晓明 庄玉辉 李国利 张小刚

(解放军结核病研究中心, 北京 100091)

王国治 赵桂芳 刘勇 沈小兵

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

母牛分枝杆菌 (*Mycobacterium vaccea*) 是抗酸分枝杆菌属内广泛分布于自然界的一种快生长腐生菌。它对人、动物没有致病性, 长期以来未曾引起人们的重视。本世纪 80 年代后期, Stanford 等^[1]报道用母牛分枝杆菌死菌悬液作结核病免疫治疗剂, 有助于提高免疫细胞活性, 消除巨噬细胞内顽固的结核杆菌。

内源性 NO 的形成在哺乳动物中普遍存在。活化的巨噬细胞由 L-精氨酸末端的胍-氮原子产生 NO, 产生的 NO 通过快速氧化作用而转化成 NO_2^- 和 NO_3^- 。NO 在活化巨噬细胞抗某些肿瘤和微生物上起重要作用^[2]。NO 等物质释放量的多少与巨噬细胞杀伤细菌或肿瘤细胞的能力强弱是一致的。本文利用高压杀灭菌悬液作用于小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 的能力, 作为评价母牛分枝杆菌制剂激活巨噬细胞从而提高其杀菌能力的免疫学指标。现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

菌种来源: 母牛分枝杆菌由中国药品生物制品检定所提供。BALB/c 小鼠, 体重 18~22g, 雌雄各半, 源于澳大利亚, 由中国药品生物

制品检定所提供。

RPMI-1640 细胞培养基 (J. R Scientific 公司产品): 含青霉素 100U/ml, 链霉素 100μg/ml, 2-巯基乙醇 5×10^{-5} mol/L, 谷氨酰胺 2mmol/L, HEPES 10mmol/L, 10% 热灭活小牛血清。

Griess 试剂: 含 1% 磺胺嘧啶, 0.1% 盐酸萘乙二胺 (均为 Sigma 公司产品), 2% H_3PO_4 。751 分光光度计 (岛津公司产品)。

1.2 方法

母牛分枝杆菌制剂的处理方法: 细菌在苏通液体培养基内生长旺盛后收获, 配制成菌悬液。母牛分枝杆菌浓度约为 4.9×10^9 个/ml 活菌, 0.55×10^5 Pa, 112.6℃ 灭活细菌。免疫实验动物: 母牛分枝杆菌制剂分别按湿重 1mg/只、0.5mg/只、0.25mg/只和 0.2ml PBS, 注射小鼠腹腔, 每一剂量组各 11 只小鼠。7 天后按同剂量重复注射一次。取小鼠腹腔巨噬细胞前一天, 向小鼠腹腔注射 0.1% 淀粉 0.3ml, 0.1% 酪氨酸 0.2ml。腹腔巨噬细胞培养: 首次免疫后的第 10d 取小鼠腹腔巨噬细胞。小鼠脱颈

本文为国家卫生部 95 科研基金资助项目 (课题号 94-2-040)

1995-06-05 收稿

处死后,用不完全 RPMI-1640 10ml 分两次反复冲洗小鼠腹腔,1500r/min 离心 15min,再用不完全 RPMI-1640 洗两次,15min/次。各管加入完全 RPMI-1640 1ml,细胞计数,调整细胞数为 1×10^6 /ml,将巨噬细胞按 1ml/孔加入 24 孔细胞培养板中,37℃,5%CO₂ 培养 24h。制备 NO₂⁻ 标准曲线:将 1mmol 的 NaNO₂ 对倍稀释后,加等体积的 Griess 试剂,放室温 10min,测 OD₅₅₀ 值,每一浓度检测 3 次取平均值。腹腔巨噬细胞产生 NO 水平:取培养 24h 后的细胞上清 1ml,与等体积的 Griess 试剂混合,室温放置 10min,测 OD₅₅₀ 值。结果分析采用 minitab 统计软件,进行统计学检验。

2 结果

2.1 NO₂⁻ 浓度标准曲线

按上述方法检测对倍稀释的 NaNO₂, 所得结果进行相关性分析与回归分析,测得结果的 OD 值与 NO₂⁻ 浓度呈正相关,相关系数为 1。所得回归方程为: $C_{NO_2^-} = -0.723 \times OD + 46.8$ OD。NO₂⁻ 标准曲线如图 1 所示:

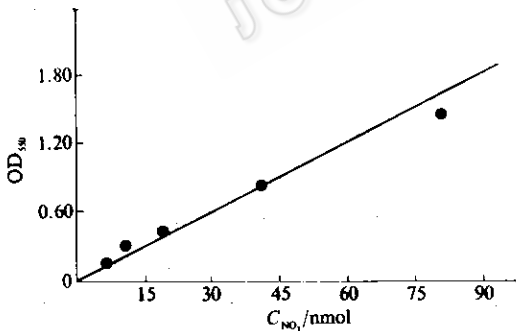


图 1 NO₂⁻ 浓度标准曲线

2.2 母牛分枝杆菌制剂对小鼠腹腔巨噬细胞产生一氧化氮水平的影响

将测得不同标本的 OD 值代入上述回归方程中,即得到相应的 NO₂⁻ 浓度。所得结果如表 1 所示,经统计学处理,各剂量组与对照组差异非常显著 ($P < 0.01 \sim 0.001$),各剂量组之间统计学差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 1 不同剂量的母牛分枝杆菌制剂对小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 的影响

剂量(mg)	检测数量	CNO ₂ ⁻ (nmol)	P
对照	11	1.430 ± 0.396	
1	11	24.945 ± 11.250	<0.001
0.5	11	16.712 ± 12.685	<0.01
0.25	11	27.059 ± 17.767	<0.001

3 讨论

结核病仍是一种在全球范围内严重危害人类健康的传染病,每年有三百万人死于结核病。HIV 在人类中的传播,增加了原发耐药的鸟-胞内分枝杆菌复合体对人类致病的机会。耐药菌株的不断出现,使结核病治疗更加困难。本世纪 80 年代后期,Stanford 等^[1]报道用母牛分枝杆菌死菌悬液作结核病免疫治疗剂,有助于提高免疫细胞活性,消除巨噬细胞内顽固的结核杆菌。Chan 等^[3]报道活化的小鼠巨噬细胞产生的 NO 能有效杀死致病的结核分枝杆菌。Denis 等^[4]报道用 INF- γ 激活小鼠巨噬细胞产生 NO 能有效的抑制其中的结核菌生长。NO 能有效抑制或杀死结核分枝杆菌已得到证实。我们通过用母牛分枝杆菌免疫 BALB/c 小鼠,检测小鼠腹腔巨噬细胞产生高水平的 NO,证明母牛分枝杆菌作为结核病免疫治疗剂的作用机理之一是提高巨噬细胞产生 NO 的水平。这种作用机理与 BCG^[5]及 INF- γ ^[4]使巨噬细胞活化产生 NO,从而达到杀菌的效果一致,但所达到的程度有何差别,尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Stanford JL, Bahr GM, Rook GAW, *et al.* Bull IUATLD, 1988, 63: 10~15.
- [2] Hanano R, Kaufmann SH. Immunol-Lett, 1995, 45: 23~27.
- [3] Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, *et al.* J Exp Med, 1992, 175: 1111~1122.
- [4] Denis M. Cell Immunol, 1991, 132: 150~157.
- [5] Green SJ, Nacy CA, Schreiber RD, *et al.* Infect and Immune, 1993, 61: 689~698.