

内毒素诱导多形核白细胞产生的化学发光现象

何炬斌 焦炳华

(第二军医大学微生物学教研室, 上海 200433)

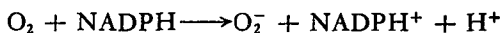
提 要

细菌内毒素 (LPS) 能够诱导多形核白细胞 (PMN) 产生化学发光现象, 其发生机理可能和 PMN 的呼吸爆发有关。不同类型的 LPS 对 PMN 的诱导能力不尽相同, 粗糙型 (R) 比光滑型 (S) 要强得多。LPS 诱导产生化学发光的过程受到许多因素的影响。

关键词 细菌内毒素, 脂多糖, 化学发光, 多形核白细胞

一、多形核白细胞的化学发光现象

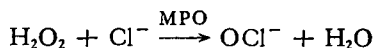
1972 年, 美国科学家 Allen 首次发现人体的嗜中性粒细胞在吞噬细菌过程中可出现化学发光现象^[1], 从此以后, 经过多年的研究, 人们对其发生机制已经有所了解, 认为这与细胞内的呼吸爆发 (respiratoy burst) 有关。所谓呼吸爆发就是当多形核白细胞 (polymorphonuclear, PMN) 激活时, 细胞对氧的消耗大量增加, 并产生一系列的超氧化物阴离子等氧自由基, 该反应消耗 NADPH, 因此细胞内磷酸已糖旁路活性升高, 以补充 NADPH。该反应如下式所示: ^[2]



该反应所产生的大部分 O_2^- 又可以通过以下反应式生成 H_2O_2 ,

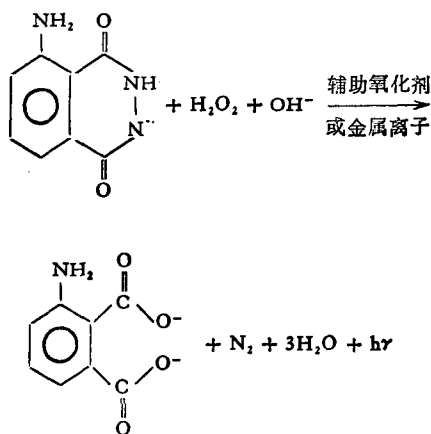


H_2O_2 在髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 存在下可以产生 OCl^- 自由基。



反应产生的 OCl^- 被认为是一种重要的偶联发光物质^[3], 而且依赖鲁米诺 (luminol) 的化学发光直接和 PMN 中的 MPO 有关系^[4], 因此

H_2O_2 -MPO 系统被认为是产生化学发光的重要物质。当上述反应中产生的自由基特别是 H_2O_2 , 渗透到细胞外, 在有冷光剂鲁米诺 (氨基苯二酰肼)、lucigenin (联 N-甲基吡啶硝酸盐)、TCPO (双 2, 4, 6-三氨苯基草酸盐) 的存在时, 可以和冷光剂偶联发光。实验中最常用的是鲁米诺, 其发光反应式如下, 该反应的散射光谱峰 (λ_{max}) 为 425nm^[5]。



已经证实, 促癌剂佛波醇类 (PMA 等)、刀豆素 A (ConA)、甲酰寡肽 (f-MLP)、 C_5a 、白细胞三烯 B_4 (LTB_4) 以及细胞的吞噬活动都可以诱导 PMN 产生呼吸爆发^[6]。

二、内毒素诱导 PMN 产生化学发光

细菌内毒素,又称脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),是革兰氏阴性细菌和其他微生物如衣原体、立克次氏体等胞壁中的结构成分。在结构上由三部分组成,即O-多糖、核心多糖及类脂体A(lipid A)。类脂体A是LPS的毒性及活性中心^[7]。人们已经知道LPS能激活机体的非特异免疫系统,为了丰富这一内容和进一步探讨其作用机理,人们对LPS诱导PMN产生的化学发光进行了研究。

1. 内毒素直接诱导 PMN 产生化学发光

Henricks 等人^[8]将不同浓度的光滑型(Smooth, S)或粗糙型(Rough, R) LPS 以及类脂体A加入PMN中,以观察LPS对PMN产生化学发光的直接作用。S-LPS和R-LPS的结构上的差异是S-LPS具备有完整的核心多糖以及O-多糖,而R-LPS的O-多糖则丢失了。实验使用的S-LPS为大肠杆菌O111:B₄的LPS, R-LPS为大肠杆菌J₅(大肠杆菌O111:B₄的半乳糖差向异构酶缺陷变异株)的R-LPS,结果发现,各型LPS都能诱导PMN产生化学发光,其中R-LPS的作用比S-LPS强。这表明在LPS的三个部分中,诱导PMN产生化学发光的活性部位主要位于核心多糖和类脂体A中,而O-多糖诱导化学发光的能力相比之下则极弱。

最近,联邦德国弗兰堡大学的Kapp 等人^[9]则采用 lucigenin 为冷光剂测定浓度为0.01~100 μg/ml 的各型LPS对人PMN化学发光的诱导能力,结果发现,S-LPS只在实验的最大浓度(100 μg/ml)时才能诱导化学发光,而且强度不大,而R-LPS和类脂体A则在0.1 μg/ml 浓度时就能明显诱导化学发光。如果去除S-LPS中的R-LPS,则余下的S部分实际上已经没有能力诱导化学发光。作者认为其原因有二,一是LPS中亲脂性的R-LPS成分具有很强的诱导能力,二是S-LPS中的O-多糖部分对PMN的化学发光有一种抑制作用。

2. 反应动力学

PMN 的化学发光反应动力学因各种刺激物的不同而不同,如用血小板激活因子刺激后,其散射光峰值出现在1 min以内,而酵母聚糖则出现在10—20 min 之间^[10]。据Kapp 等人报道,各型LPS和类脂体A诱导PMN产生的化学发光,其动力学和PMA相似,即5 min左右开始反应,峰值位于20 min,整个反应结束需60 min。

3. 实验影响因素

在实验中,为观察理想的实验结果变化,常常需要确定实验的最适条件,即能诱发产生一定强度的化学发光。在LPS诱导PMN产生化学发光中,其发光强度常常受到以下因素影响。(1)补体和免疫复合物:反应系统本身有没有补体和免疫复合物的存在对于化学发光影响极大^[11],因为补体和免疫复合物本身就可以诱导PMN产生化学发光,因此在反应系统中应去除这二类物质。(2)细胞来源:各种动物和人的PMN对刺激物的反应性是不一样的^[12],因此要注意考虑细胞来源问题,国内外大部分实验都常规选用人的PMN。(3)细菌来源:如前所述,不同类型的细菌的LPS诱导PMN产生化学发光的能力是不一样的,R型LPS要比S型强得多。(4)冷光剂浓度和反应温度^[13]:研究表明,鲁米诺的浓度在 4.5×10^{-7} 至 9×10^{-6} mol/L时,其浓度和发光强度成正比,超出了这个范围,则发光强度下降。而且当浓度大于 10^{-5} mol/L时,鲁米诺本身就能激活细胞,因此,冷光剂的浓度一定要适宜。发光本身是一个需能过程,因此具有温度依赖性,只有在33℃至41℃时,反应系统才能产生明显的发光现象,通常反应温度固定在37℃。(5)红细胞和血红蛋白:少量红细胞污染就可以使发光值明显降低^[14],因为红细胞和血红蛋白对发光有淬灭作用。随着红细胞浓度上升,发光值下降,但并不影响发光过程的动态曲线的形状。至于血红蛋白,少量红细胞溶解所产生的血红蛋白就能影响发光值的测定^[15]。

尽管以上因素会产生一些影响,但是,由于80年代末期新一代高灵敏度的发光仪的问世,

使得人们在一些无法避免上述因素的实验中通过调整实验条件以达到理想的发光值。另外,值得提出的是,近年来实验方法学得到了改进,广泛采用鲁米诺作为冷光剂。鲁米诺的应用大大提高了测定化学发光的敏感度,它仅需以往实验所需细胞数的 1/100 即可测定,而且实验中也降低了红细胞的影响作用,因此有人提出,对于测定 LPS 诱导产生的化学发光鲁米诺是必须的^[11]。

三、结 语

化学发光作为一种生物物理化学的现象现在逐渐被应用到微生物学、免疫学的研究中,并已经引起人们的广泛兴趣。LPS 诱导的化学发光,为研究 LPS 的结构和功能的关系以及 LPS 激活 PMN 分子机制方面,提供了令人满意的模型。由于该实验敏感度高,微量测定,反应迅速,已逐步为 LPS 研究者所采用。但是,在这个研究领域还存在不少问题有待解决,对一些

现象也没有令人满意的解释,加上实验中影响因素十分复杂,实验的标准化问题等等,因此,这个领域的工作还有待于进一步深入开展。

参 考 文 献

- 1 Allen RC *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1972;47:679
- 2 Babior BM. *J Clin Invest*, 1984;73:599
- 3 Dechatelet LR *et al.* *J Immunol*, 1982;129:1589
- 4 Dahlgren C *et al.* *Infect Immun*, 1983;39:736
- 5 康建等. 生物化学与生物物理进展,1984;5: 52
- 6 Cockcroft S. *Phosphoinositides and receptor mechanisms*, Alan R Liss Inc 1986:287—310
- 7 焦炳华等. 国外医学. 分子生物学分册,1987;4: 168
- 8 Henricks PAJ *et al.* *Infect Immun*, 1983;41:294
- 9 Kapp A *et al.* *Infect Immun*, 1987;55:758
- 10 Parnham MJ *et al.* *Int J Immunopharmacol*, 1986;8:951
- 11 Goetz MB *et al.* *Cellular Chemiluminescence*, CRC Press, 1987; 11:101
- 12 Larry A *et al.* *J Cell Biol*, 1985;101:1161
- 13 胡天喜. 发光分析与医学,上海生物物理学会,华东师范大学生物系编,1987
- 14 李明等. 上海免疫学杂志,1986;6: 304
- 15 Easman CSF *et al.* *Immunol*, 1980;41:67

[本文于 1989 年 10 月 12 日收到]

(上接第 424 页)

配产生。它不是父本的后代,很可能是异父同母。进一步地研究发现邻近巢里一只雄鸟很可能是它的“亲生父亲”。

五、展 望

卫星 DNA 探针如 33.6 和 33.15 通常是定出多个位点,但它们仍能用于寻找只杂交单一基因的探针。White 小组正在人体进行这种研究。用于哺乳类和鸟类的特定基因的探针可能很快发展起来。如果成功,将对确定基因连锁十分有用,特别是对那些控制重要性状如生长率、牛奶产量等的基因。在饲养方面也很有用,还可能有助于某些基因定位,并可能阐明其作用机制。总之, DNA 指纹技术诞生以来,已显示出非凡的生命力。它在法医学和遗传学上的重要作用,受到人们的高度重视^[12],并在各相关领域广泛应用。为此, Jeffreys 教授获 1988 年

西德生化分析大奖。可以预计: DNA 探针的应用将越来越广泛。DNA 指纹技术将会进一步完善和发展,其应用前景将十分诱人。

参 考 文 献

- 1 Botstein D *et al.* *Am J Hum Genet*, 1980;32:314
- 2 Drayna D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; 81:2836
- 3 Jeffreys A J *et al.* *Nature*, 1985;314:67
- 4 Jeffreys A J *et al.* *Nature*, 1985;316: 76
- 5 李伯龄等. 遗传,1988;10(3): 10
- 6 徐绍颖,许幼禹. 生物工程进展, 1989;9(3): 38
- 7 Hill W G. *Nature*, 1987; 327:98
- 8 Jeffreys A J *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1987; 15: 2823
- 9 Jeffreys A J, Morton DB. *Anim Genet*, 1987;18:1
- 10 Wetten J H *et al.* *Nature*, 1987; 327:147
- 11 Burke T, Bruford M W. *Nature*, 1987; 327:149
- 12 徐俊杰. 生命的化学, 1989; 9(2): 13

[本文于 1989 年 10 月 4 日收到]