

关于内毒素耐性与非特异免疫的一些观察

刘雋湘 許健音

(卫生部生物制品研究所, 北京)

绿脓杆菌、大肠杆菌、变形杆菌等革兰氏阴性杆菌一般是不致病的,但是在抵抗力极度降低的患者中,如严重灼伤、放射病、恶性疾患等,则不但能够形成感染而且常常引起败血症。近年来由于使用抗菌素及化学疗法,一般致病菌多被控制,但革兰氏阴性杆菌感染尚无特效药物,只是采取一般措施治疗。因此,探讨机体的一般防御机制和非特异免疫问题具有特殊的意义。

革兰氏阴性杆菌产生内毒素,而内毒素又有两方面的作用:一方面它能降低机体的抵抗力甚至造成严重的损害,另一方面在一定条件下,又能刺激产生耐性和非特异免疫,从而提高机体的抵抗力^[1,2]。在革兰氏阴性杆菌感染或混合感染中内毒素的作用肯定是存在的。我们在研究严重灼伤败血症时观察到许多病例,其临床症状和病理变化与内毒素血症(Endotoxemia)或内毒素休克(Endotoxic shock)相似^[3],这些病例主要是革兰氏阴性杆菌感染,肯定有内毒素不断自创面吸收,因而可能是处于持续的内毒素作用之下。在这种状态下机体抵抗力受到什么影响,是否可能产生耐性,以及耐性与抵抗力的关系等问题的解决,可能给临床实践提出更有效的治疗原则。

现将我们的试验观察报告于后。

材料与 方法

(一) 内毒素 (1)伤寒杆菌内毒素(TET)系用 Topley 等氏^[4]的胰酶消化酒精沉淀法制备,含还原酐 4.5 毫克/毫升,磷 0.4 毫克/毫升,氮 0.71 毫克/毫升,灰份 2.3 毫克/毫升,小鼠 MLD = 0.8 毫克。(2)大肠杆菌内毒素(CET)系用 Westphal^[5]的酚水提取法制备,含还原酐 2.06 毫克/毫升,磷 0.46 毫克/毫升,氮 0.44 毫克/毫升,灰份 1.5 毫克/毫升,小鼠 MLD = 0.5 毫克。(3)绿脓杆菌内毒素(PsET)系用 Boivin 及 Mesrobian 氏^[6]三氯醋酸法制备,含还原酐 1.98 毫克/毫升,磷 0.5 毫克/毫升,氮 1.39 毫克/毫升,灰份 1.24 毫克/毫升,小鼠 MLD = 0.75 毫克。使用时均按固体总量稀释至所需浓度。

(二) 菌种 绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)系自灼伤败血症病例血培养中分离,试验室编号绿-1,小鼠 MLD = 12×10^4 个菌。大肠杆菌(*E. coli*)系标准菌株 0113,小鼠 MLD = 2×10^9 个菌。感染试验用菌悬液均系 37℃, 18—20 小时普通琼脂培养,悬于生理盐水,用标准比浊管比浊(菌数用活菌计数校正)稀释至所需浓度。攻击用最后的绿脓杆菌悬液中加入有 0.25% 琼脂以提高毒性。

(三) 灼伤及感染试验 采用 14—16 克体重的瑞士小白鼠。灼伤方法是在乙醚麻醉下将小鼠背部向下浸于 70℃ 或 75℃ 水浴中 10 秒钟,灼伤面积为体表的 20%。灼后不做任何抗休克处理,任其自然恢复。70℃ 灼伤者一般能活存 98—100%, 75℃ 灼伤者平均活存 95%, 感染一律用腹腔注射,所需菌量含于 0.5 毫升中。

試 驗 与 結 果

曾有报导,较大剂量的內毒素可使动物对感染的抵抗力降低^[1,7,8];反之,某些细菌感染也会使动物对于內毒素的敏感性提高^[9,10]。

我们观察到加內毒素约 1/10 MLD 于绿脓杆菌悬液可使菌对小鼠的致死力提高 1000 倍;已感染绿脓杆菌的豚鼠注射亚致死量的內毒素可以加剧感染加速死亡。因此我们认为,內毒素与细菌感染的这种相互关系可以解释某些临床败血症的症状与病理变化^[3]。另外,我们还曾观察到,用绿脓杆菌感染动物用抗绿脓免疫血清进行保护试验时,如加入绿脓杆菌內毒素可使血清的保护作用受到抑制,而加入与绿脓杆菌无抗原关系的伤寒杆菌內毒素则无此种现象。说明內毒素对被动免疫亦有影响^[11]。

但是,另方面,內毒素在一定条件下也有增強抵抗力的作用。

曾有不少报导^[1,2],较小剂量的內毒素可以刺激提高对感染的抵抗力,但是所作观察多只是內毒素 1 次注射的作用。在如前所述的临床状态中,內毒素的作用可能是持续的,至少是间歇的。为了观察在这种状态下机体抵抗力所受影响,进行了一些试验。

1. 耐性与非特异抵抗力的产生

先给小鼠每日皮下注射內毒素(TET) 0.1 毫克,连续注射 5 天,头两天注射后可见明显的反应,但以后即逐渐減輕,第 6 天一般状态与健康小鼠无可见的区别。将这些小

表 1 連續注射內毒素后小鼠的耐性及非特异免疫

試 驗	小鼠死亡率	TET 0.8 毫 克		<i>P. S. aeruginosa</i> 12×10 ⁴ 个菌	
		正 常 鼠	耐 性 鼠	正 常 鼠	耐 性 鼠
1		9/10	1/10	9/10	1/10
2		9/10	0/10	10/10	0/10
3		—	—	5/5	0/4
4		5/5	1/4	5/5	0/4
合 并		23/25	2/24	29/30	1/28

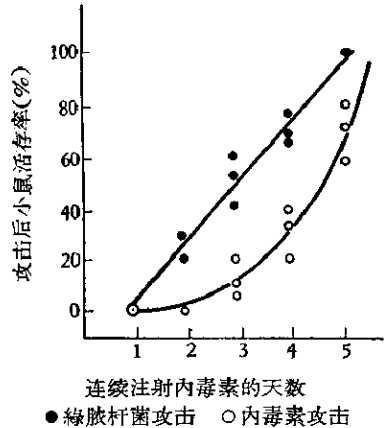


图 1 連續注射內毒素的过程中耐性及非特异免疫增强情况的比較

鼠分別用致死量的內毒素及绿脓杆菌攻击,观察 4 日记录死亡,以未经內毒素注射的健康小鼠同样攻击作为对照。几次试验结果表明,连续注射內毒素可使小鼠获得对內毒素的耐性并产生对细菌的抵抗力。(表 1)

给一羣小鼠每天皮下注射內毒素(TET)0.1 毫克,自第 1 次注射起,每次取出两组,于 24 小时后分別用 1 MLD 內毒素或绿脓菌进行腹腔攻击,几次试验结果一致,均表明在內毒素连续注射的过程中对细菌的非特异抵抗力比对內毒素的耐性出现为早;前者在连续注射內毒素 3 天后已相当明显,连续注射 5 天后非常明显;后者则连注 4 天后才比较明显。(图 1)

2. 耐性、非特异免疫与特异免疫的强度和持续时间

内毒素连续注射可以产生耐性和非特异免疫,同时,作为一种抗原当然也能刺激机体产生特异免疫。如前所述,在连续注射内毒素的过程中,非特异免疫出现比耐性为早,以下试验表明,在连续注射内毒素后非特异免疫的持续时间也比耐性为长。

先给小鼠每日注射大肠杆菌内毒素 0.05 毫克,连续注射 5 天,末次注射后每隔一定时间取出一部分小鼠分为几组,分别用大肠杆菌、大肠杆菌内毒素、绿脓杆菌及绿脓杆菌内毒素攻击,结果如表 2。

表 2 连续注射内毒素后耐性非特异免疫及特异免疫持续时间的比较

攻 击 处 理 后 天 数	CET		<i>E. coli</i>				PsET		<i>Ps. aeruginosa</i>	
	0.5 毫克		2×10 ⁸ 个菌		4×10 ⁸ 个菌		1.0 毫克		12×10 ⁴ 个菌	
	试验	对照	试验	对照	试验	对照	试验	对照	试验	对照
1	1/8	5/8	0/8	4/8	0/8	7/8	0/8	7/8	0/8	7/8
2	1/8	8/8	0/8	6/8	0/8	7/8	2/8	8/8	0/8	7/8
3	5/8	5/8	0/8	8/8	2/8	7/8	3/8	7/8	0/8	8/8
4	8/8	7/8	0/8	8/8	0/8	8/8	3/8	7/8	3/8	6/8
5	5/8	7/8	0/8	7/8	3/8	8/8	5/8	6/8	2/8	8/8
6	5/8	7/8	0/8	7/8	1/8	8/8	7/8	8/8	2/8	8/8
14	7/8	4/8	3/8	8/8	3/8	8/8	5/8	5/8	3/8	8/8
21	6/8	6/8	1/8	5/8	3/8	7/8	6/8	8/8	8/8	8/8
28			0/8	3/8	2/8	7/8	—	—	8/8	8/8
36			0/8	6/8	5/8	8/8				
42			0/8	3/8	5/8	8/8				
49			2/8	8/8	2/8	0/8				

注 双线以上表示试验与对照有非常显著的差别 ($P < 0.01$)

单线以上表示有显著差别 ($P < 0.05$), 单线以下无显著差异。

由表 2 可见: (1) 内毒素耐性持续时间较短, 3 天后已基本消失; 耐性是非特异的, 注射大肠杆菌内毒素而获得的耐性对大肠杆菌内毒素并不比对绿脓杆菌内毒素的作用为强。(2) 连续注射内毒素引起的非特异免疫比耐性为强且持续较久, 14 天后方才消失。(3) 对大肠杆菌的抵抗力在前 6 天非常显著, 这可能是非特异免疫也可能是特异与非特异免疫的双重作用; 14 天后抵抗力出现较大的波动, 但仍然显著, 这个时间非特异免疫可能已经消失, 所表现的抵抗力主要是特异免疫的作用; 至 7 周, 免疫力仍然持续存在。

由于使用动物较少且未作定量的试验, 对于特异与非特异免疫的出现、上升和下降的过程不能作更多的分析, 但总的可以看出, 注射内毒素可以迅速产生非特异免疫, 在特异免疫产生之前发生保护作用。

討論与結論

內毒素能直接引起机体的严重损害,能提高细菌的毒力,能加剧感染,还能抑制免疫血清的保护作用,在革兰氏阴性杆菌感染中,內毒素的作用是不可忽视的。另一方面,內毒素在一定条件下可以引起耐性的产生并有增强抵抗力的作用,进一步了解內毒素的作用将有助于阐明某些感染(如伤寒、痢疾、败血症等)的发病与转归机制。

本文的试验表明,內毒素增强抵抗力的作用至少有以下3种:(1)作为特异抗原,引起抗体产生;(2)持续地或反复地作用,引起对內毒素的耐性;(3)刺激产生对细菌的非特异免疫。这是3种不同的而又互有密切关系的作用,在时间上也是相互交叉的:耐性出现早,但作用不完全,且消失快;非特异免疫出现早,提高快并能持续较长时间;特异免疫出现晚但作用完全,持续最长。在临床实践中是否有可能利用非特异免疫出现早这一特点,在特异免疫发挥作用以前使机体的抵抗力提高,以及在感染过程中耐性与非特异免疫对转归有何影响,都是有兴趣的问题。

Peterdorf 及 Bennett^[12] 报告网状内皮系统 (RES) 被封闭时內毒素耐性即行消失,我们曾观察到严重灼伤对耐性和非特异免疫有显著的破坏作用^[3]。在革兰氏阴性杆菌感染中,特异免疫主要是抗菌免疫,与机体的正常防御机制,特别是 RES 也有密切关系。因此在革兰氏阴性杆菌感染中如何保护与增强机体的一般防御机能,无论对于特异或非特异免疫都是最关键的问题。

参 考 文 献

- [1] 臧人杰、余濱: 免疫学进展(一), 上海科技出版社, 44 页, 1962。
- [2] Braude, A. I. and Siemienski, J.: *Bull. N. Y. Acad. Med.*, **37**:448, 1961.
- [3] 刘雋湘、许健音、陈醒民: 中华外科杂志, 第八届全国外科学术会议增刊, 173 页, 1964。
- [4] Topley, W. W. C., Raistrick, H. et al.: *Lancet*, (232):252, 1937.
- [5] Westphal, C., Luderitz, O. and Bister, F.: *Z. Naturforsch.*, **70**:184, 1952.
- [6] Boivin, A. and Mesrobianu, L.: *Comp. Rend. Soc. Biol.*, **113**:409, 1933.
- [7] Miles, A. A. and Niven, J. S. F.: *Brit. J. Exptl. Path.*, **31**:73, 1950.
- [8] Dubos, R. J. and Schaedler, R. W.: *J. Exp. Med.*, **104**:53, 1956.
- [9] Beeson, P. B.: *J. Exp. Med.*, **86**:39, 1947.
- [10] Suter, E. and Kirsanov, E. M.: *Immunology*, **4**:354, 1961.
- [11] 刘雋湘、许健音、舒 潜: 中华外科杂志, 第八届全国外科学术会议增刊, 178 页, 1964。
- [12] Petersdorf, R. G. and Bennett, I. L.: *A. M. A. Arch. Int. Med.*, **103**:991, 1957.

SOME OBSERVATIONS ON TOLERANCE TO ENDOTOXIN AND RESISTANCE TO INFECTION

LIU CHÜN-HSIANG AND HSÜ CHIEN-YING

(National Vaccine and Serum Institute, Peking)

The experimental results recorded in this paper indicate that at least 3 patterns of resistance are induced by endotoxin: (1) Specific immunity induced by endotoxin as antigen; (2) Tolerance developed after repeated injections of endotoxin; and (3) Non-specific resistance elicited by endotoxin as nonspecific stimulant. The 3 patterns are closely related to and overlapping on each other. Tolerance to endotoxin appeared early but was incomplete and of short duration; nonspecific resistance appeared also early, increased rapidly and lasted more than 14 days after endotoxin treatment; specific resistance appeared later but lasted much longer.

On the other hand, there were evidences to suggest that endotoxin was detrimental to the host, especially after burn trauma, and could aggravate existing bacterial infection. Furthermore, it has been shown that tolerance and nonspecific resistance were partly abolished by burn trauma. All these are illustrative of the dual effects of endotoxin and the close interrelation between burn trauma, bacterial infection and endotoxic effects.