



卡介苗接种中几个基础理论 问题研究进展

北京结核病研究所 都本业

机体经BCG免疫接种以后,在产生抗结核的获得性免疫的同时,还产生对结核菌素的迟发型变态反应,两种现象同时产生,伴随存在,在结核免疫中具有重要意义。

本文仅就BCG免疫接种中的几个基础理论问题的研究进展,综述讨论如下。

结核变态反应的物质基础

结核变态反应的产生包括二种抗原,即反应原和致敏原。

一、反应原:是使已致敏机体呈现结核变态反应的物质。例如,结核菌素。关于结核菌素的活性物质,早经Seibert(1941~1954)氏研究阐明为结核菌蛋白。结核菌蛋白成分非常复杂,在免疫反应上可出现30多条沉淀线。Chase等人(1975)指出:在结核菌素中至少可能存在5个不同结核菌蛋白活性成分,究竟哪一成分更具特异性,在皮试反应中意义更大,尚属未知。自1959年以来,先后有日本学者森泽等人企图纯化结核菌蛋白,提纯结核菌素活性肽物质,分子量为7,180;其后,Sinks(1963)追试了该项工作,认为其活性较PPD-S为弱。但Gupta氏等(1978)以胰酶水解PPD,再经离子交换层析技术,分离获得二个活性肽成分,分子量分别为3200和12000,其活性较PPD-S强4-7倍,而且交叉反应性较小。关于结核菌多肽的活性部位,亦引起学者们的重视,Kuwarabara(1975)实验指出:仅仅天门酰胺-甘氨酸-丝氨酸-谷氨酰胺-甲硫氨酸-精氨酸(Asn-Gly-Ser-Gln-Met-Arg)等组成的肽链部分才表现出结素反应的活性。这是结素免疫化学研究的进展。基于上述研究,相信:随着免疫化学技术的发展,在将来有可能提纯或人工合成更具特异性的结核菌素活性肽物质,从而提高皮试反应的敏感性和特异性,更好地为结核病的防治工作服务。

二、致敏原:Raffel(1955)证明:结核菌蛋白加上Wax-D可使机体对结核菌素反应致敏,故认为Wax-D是结核变态反应的致敏原。关于Wax-D的

化学结构,据山口(1970)、Tanak(1971)的报告,主要由三部分组成,即分枝菌酸、多糖体和粘液肽(mucopeptide)。近年来的研究证明:致敏原的最小活性单位的化学组成是N-乙酰-胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(N-Acetyl-Muramyl-L-Alanyl-D-Isoglutamine)即壁酸二肽(MDP),并已人工合成,具有免疫佐剂活性。Wahl(1979)等人实验证明:1微克/毫升的MDP,在体外与巨噬细胞作用24小时,即能激活巨噬细胞,表现为胶原蛋白酶(Collagenase)活性、前列腺素E₂和C-AMP水平等均有明显的增强和升高。MDP的副作用甚小,显然,MDP的提取和合成对免疫佐剂的发展和肿瘤免疫治疗的实践均有较重要的理论意义和实际意义。

结核免疫的物质基础

尽管免疫化学技术的进步,许多学者的不懈努力,但对结核免疫的物质基础仍未定论。离结核病防治工作的实际需要尚有很大差距。

早年,Nègre及其同工(1925~1956)提取的甲醇抗原,曾认为具有抗结核的免疫活性,并用于临床治疗;但后来,经Dubos(1964)、Williams(1969)等人实验指出:可能是一脂多糖类物质,其作用可能是非特异性免疫作用,故在结核病的防治工作中未能得到成功的应用。近年来,有人应用甲醇提取物残渣(MER)进行肿瘤的免疫治疗,据Wainberg(1976)报告,应用BCG的MER对豚鼠的实验性肿瘤有一定的预防和治疗作用。

Crowle氏(1972)的结核菌胰酶提取物(trypsin extract)工作,虽然报告能使动物产生抗结核的保护作用,而不使机体对结核菌素致敏,在佐剂的基础上,2.5微克即得到较好免疫效果,但其免疫对照是含佐剂的丙酮杀死的人型结核菌菌苗,而不是目前公认的活卡介苗,因此,目前对这项工作的全面评价,实际意义等尚有待追试。

A.S.Youmans和G.P.Youmans二氏(1964~1974)对结核分枝杆菌细胞内核糖体的免疫作用进行

了研究,当提取物以胰酶消化处理时,其免疫活性不受影响,若以核糖核酸酶处理时,则免疫活性消失近半。同时,当培养物中含丰富的RNA时,则有较好的免疫作用;故认为结核菌细胞内的RNA是产生免疫的有效成分,其作用可能是由于核酸的免疫作用,刺激机体的免疫活性细胞,生成一个结核菌生长抑制因子(Myco IF),从而获得抗结核的免疫力,但不使机体对结核菌蛋白致敏,故结素试验仍为阴性。Youmans还指出:分枝杆菌RNA的免疫作用具有特异性。以分枝杆菌RNA免疫小鼠仅有抗结核菌的免疫作用;相反,以鼠伤寒杆菌的RNA免疫小鼠仅有抗鼠伤寒菌的免疫作用,而无抗结核菌感染作用。

Youmans氏还指出:分枝杆菌RNA具有佐剂作用。当与牛血清丙种球蛋白(BGG)合并注射时,能明显地增强BGG的抗原性,提高抗体效价。当与PPD一起注射时,能使机体对PPD致敏,产生结核变态反应。这就提出了问题的复杂性,人们自然要问:分枝杆菌RNA究竟是佐剂的非特异性免疫作用,还是抗结核的特异性免疫的物质基础?因此,关于核酸的免疫作用问题,目前尚不能肯定结论,还有待更多的实验追试和实践检验证实,方能说明RNA是结核免疫的物质基础。

结核变态反应与免疫的关系

结核变态反应与免疫的关系较为复杂,现根据近年文献资料(Mackness, 1964, 1967; Dennenberg, 1968, 1969; Youmans, 1975; Lefford, 1975; Freedman, 1975; Ten Dam, 1975; 都本业, 1974),对结核变态反应与免疫的关系综合分析讨论如下。

一、结核变态反应在一定条件下同免疫是平行的、一致的;就主要方面来说,对免疫是有利的。

经结核菌感染或卡介苗免疫的机体,在结核菌初次进入后,首先,由巨噬细胞吞噬,处理加工抗原,然后,将其抗原信息传递给T淋巴细胞,使T细胞致敏,于是,诱发结核变态反应和结核免疫的产生,这两个反应同是T细胞所介导,而且,均能用免疫淋巴细胞被动转移,使机体对结素致敏,并产生结核免疫。

致敏的个体,当再次有结核菌或其抗原性物质进入时,首先同致敏的T细胞相互作用,并释放出一系列淋巴因子,正是由于这些淋巴因子的综合协同作用,结果形成大量的淋巴细胞和单核细胞在结核菌或

其抗原所在部位的周围积聚,此即结核病形态学上所见到单核细胞和淋巴细胞浸润,这些反应无疑地对于将结核菌围歼在局部,使其局限不易扩散是有益的。此外,由于活化因子和MIF对巨噬细胞的激活作用,使巨噬细胞活化,活化巨噬细胞的主要特征是吞噬功能增加,我们以放射性同位素胶体磷酸铬的廓清试验证明:BCG免疫小鼠的吞噬功能有明显增加;其次是溶酶体含量丰富,酸性水解酶活性增高;还有胞质流动活跃,溶酶体同吞噬小体的融合率增加,以及糖酵解增加,乳酸生成增多,细胞内呈酸性环境,使酸性水解酶活化,增强对被吞噬的结核菌的水解、消化、杀伤能力;此外,还能以己糖磷酸旁路进行糖酵解,产生过氧化氢类等过氧化物,生成 O_2^- 等元素物质,对结核菌有较强的杀菌作用。相反,在没有T细胞参加、没有淋巴因子存在的情况下,免疫巨噬细胞同正常巨噬细胞一样,杀菌力不强;其次,活化巨噬细胞可能还产生胞膜分子的改造,生成某些杀菌物质,直接杀伤结核菌。详见图1所解。

从图1可以看出:迟发型结核变态反应的产生和存在,同结核免疫的关系十分密切。正是由于这些淋巴因子的综合利用,形成巨噬细胞和淋巴细胞的浸润,将结核菌围歼在局部;正是由于淋巴因子对巨噬细胞的激活作用,提高其对结核菌的吞噬和杀伤能力,从而才产生抗结核的免疫力增强。

从图1所示,可以看出:结核变态反应在一定条件下同结核免疫是平行的、一致的,就对巨噬细胞的浸润和激活这个主要方面来说,是完全有利的。

二、变态反应的两重作用——对机体的损伤作用。

1. 淋巴因子:上述一系列淋巴因子的综合作用对结核免疫起有利作用,但不是所有如此。例如,淋巴毒素又称细胞毒素,它在肿瘤免疫中具有重要作用,可把肿瘤细胞作为靶细胞直接杀伤。但在结核免疫中,尚未证明它能直接杀伤结核菌;相反地,它能把吞噬结核菌的巨噬细胞作为靶细胞而杀伤。在我们的实验中,以 ^{51}Cr 标记的鸡红血球,以PPD致敏作为一个结核的靶细胞,同BCG免疫小鼠的脾细胞共同培养,证明有结核细胞毒的存在。因此,从这一点上来看,当结核变态反应过强时,显然对结核免疫是不利的。

2. 当变态反应过强时,结素对致敏细胞的作用,主要表现是高度过敏反应,其结果是导致过敏性坏死,细胞内外大量细菌繁殖,病变恶化,播散进展。

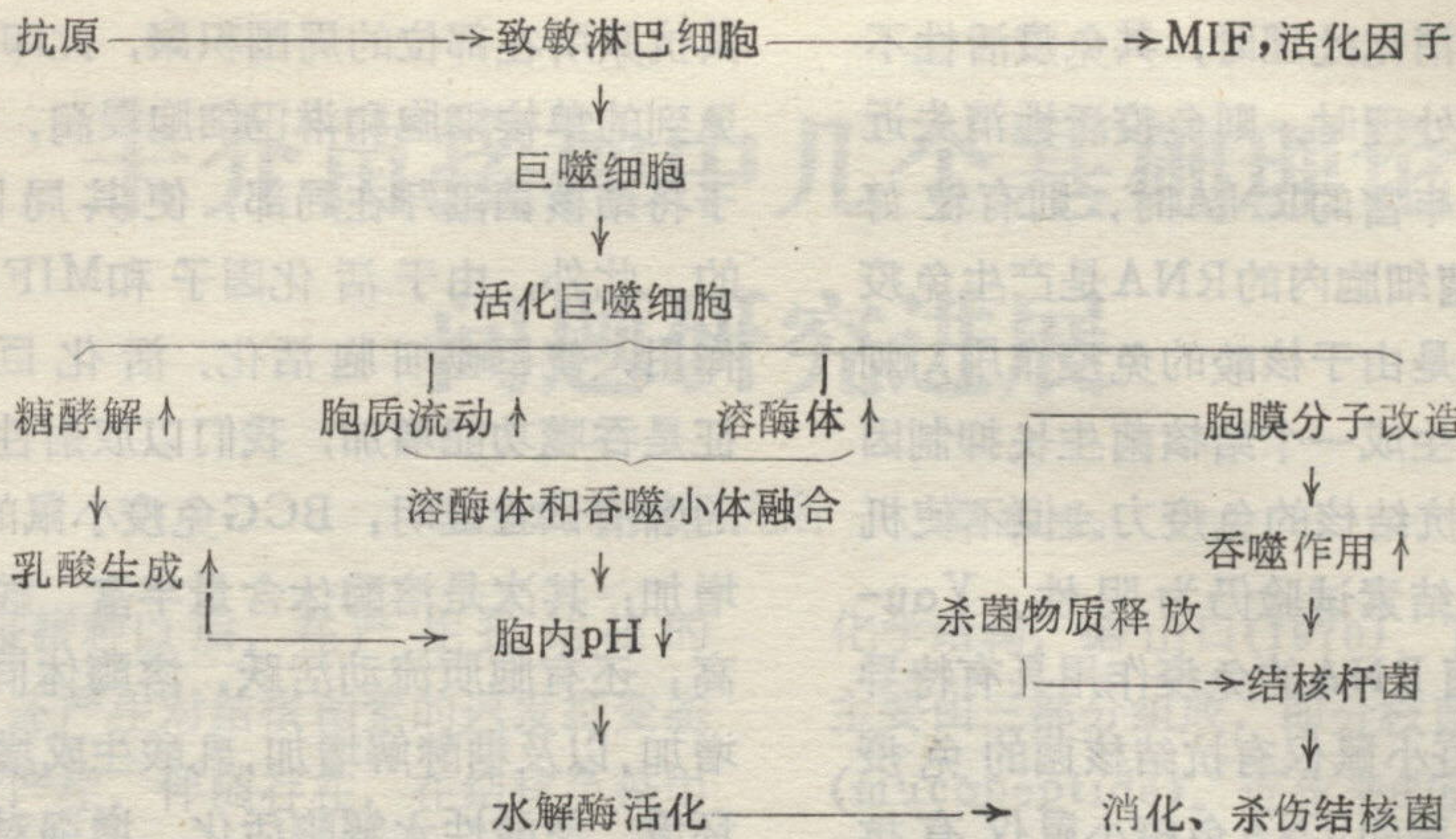


图1 结核获得性免疫机制(引自Kanai, 1971)

3. 当变态反应过强时, 由于变态反应本身的一些因素, 例如, 大量细胞渗出, 小血管栓塞, 局部循环不畅, 组织细胞缺氧, 以及变态反应所释放的某些毒性物质等, 均不利于细胞和组织的活存, 而致坏死。

因此, 当变态反应过强时, 对免疫并无有利作用, 而是有害的。所以说, 结核变态反应对免疫的影响有两重作用。

三、结核变态反应和免疫是两种不同的细胞介导免疫反应表现。

Youmans发现, 经RNA免疫的小鼠淋巴细胞对PPD刺激不产生MIF等淋巴因子, 仅H₃₇Ra免疫小鼠的淋巴细胞对PPD刺激, 产生MIF等淋巴因子; 进而发现对两种(H₃₇Ra、RNA)免疫小鼠的淋巴细胞分别以PPD和RNA刺激时, 在其上清中均存在一个分枝杆菌生长抑制因子(Myco IF), 经分离、纯化、鉴定, 认为MIF和Myco IF是两种不同的物质, Myco IF没有移动抑制因子作用。从而认为: 结核超敏感性反应和结核免疫是由两种不同的生物活性因子所分别介导的; 结核超敏感性反应对巨噬细胞的激活, 在抗结核免疫中即使有一定的作用, 亦不是主要的; 主要的作用可能是由于RNA免疫, 使T细胞致敏, 由RNA的特异性刺激, 而使T细胞释放一个分枝杆菌生长抑制因子(Myco IF)所致。如果这种推论能够得到确证, 它将说明结核变态反应和结核免疫是孤立不同的两回事。

此外, Freedman(1975)从免疫遗传基因上, 对结核超敏感性反应和免疫产生的相互关系做了新的解释。他认为, 控制免疫反应的基因决定着机体对某些疾病的易感性。例如, 对结核菌某一抗原成分的反应基因存在与否, 决定着该机体对结核菌感染的免疫反应的性质。详见图2所解。

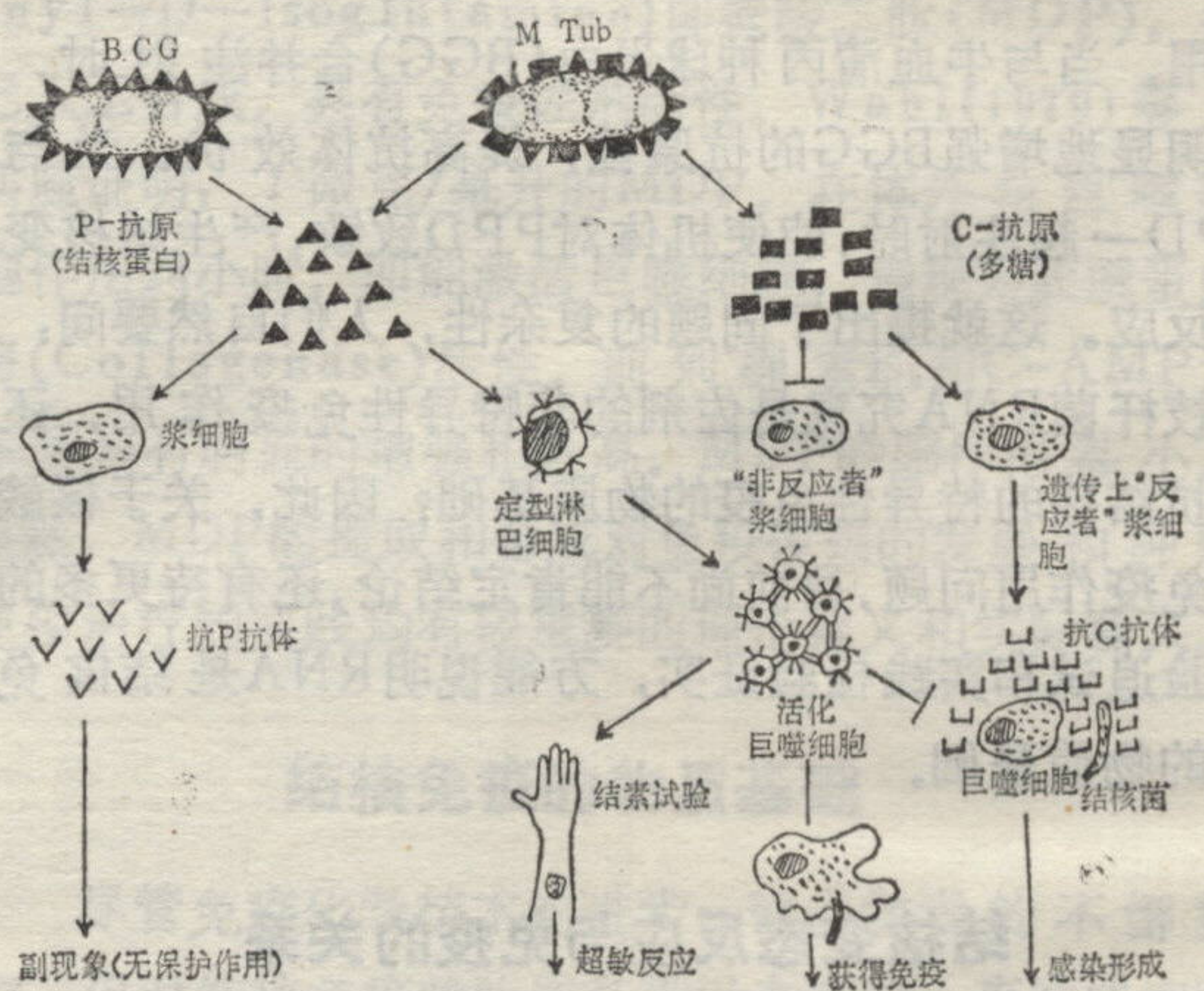


图2 结核超敏感性反应和免疫产生的相互关系

如图2所示, 假定结核菌有P和C二个抗原决定基, P抗原为结核菌蛋白, C抗原为结核菌多糖。P抗原刺激浆细胞, 生成抗体, 以及可能活化致敏T细胞; 然而, 循环的抗P抗体在抗结核的免疫中不起作用, 但由于P抗原能活化致敏T细胞, 使其转化繁殖, 生成淋巴因子, 于是, 产生两种不同的免疫现象——迟发超敏反应和由于淋巴因子的激活作用, 使巨噬细胞活化、吞噬功能增加、溶酶体酶的活性增强, 因而, 使机体抗结核的免疫力增强。

对C抗原的免疫反应可能受遗传上特异性免疫基因的控制。在遗传上属“反应者”的机体, 就易对C抗原致敏, 产生抗C抗体, 后者能阻碍致敏T细胞对巨噬细胞的活化, 它还能以包裹结核菌的形式而阻碍调理素作用, 致使结核菌不易被吞噬。于是, 这种遗传上“反应者”的个体对结核菌的易感性增加; 但是, 抗C抗体不能干扰T细胞介导的迟发超敏反应, 所以, 结素反应仍为阳性。这就为结核超敏感性和结核免疫的产生和表现从某些方面可以分隔开

来, 在理论上给予一些新的解释。至于 BCG 免疫的保护作用, 如图 2 所示, 可能由于它仅有 P 抗原, 于是, 即使在遗传上属“反应者”的个体, 亦不产生干扰免疫而有利于感染的抗 C 抗体, 所以, 其表现是结核超敏感性反应和结核免疫之间的平行性和一致性。

参 考 文 献

1. 都本业: 结核的变态反应和免疫的物质基础, 内部资料, 1974。
2. Barksdale L et al: *Mycobacterium Bacterial Rev*, 41: 219, 1977.
3. Berthrong B: *Adv Tuberc Res*, 17: 1, 1970.
4. Collins FM: *Adv Tuberc Res*, 18: 1, 1972.
5. Freedman SO et al: *Chest*, 68: 470, 1975.
6. Kuwabara S: *J Biol Chem*, 250: 2563, 1975.
7. Lefford MJ: *Am Rev Respir Dis*, 111: 243, 1975.
8. Tendam HG et al: *Bull WHO*, 5: 255, 1976.
9. Youmans GP: *Am Rev Respir Dis*, 111: 109, 1975.
10. Youmans GP: *Tuberculosis*, Saunders Philadelphia, 1979.
11. Wahl SM et al: *J Immunol*, 122: 2226, 1979.
12. Dannenberg Am: *Bacteriol Rev*, 32: 85, 1968.
13. Koomi Kanai: *Tuberculation*, 46: 271, 1971.
14. Crowle AJ: *Adv Tub Res*, 18: 32, 1972.
15. Mackaness GB: *Am Rev Respir Dis*, 97: 337, 1968.
16. Gupta KC: *J Microbiol*, 24: 1242, 1978.
17. Bloom BR: *Tuberculation*, 55: 389, 1980.
18. 齐藤和久: *Tuberculation*, 55: 493, 1980.
19. 都本业等: 未发表资料。
20. Wainberg MA et al: *BCG in Cancer Immunotherapy*, P 39, Grune & Stratton, New York, 1976.
21. 东市郎: *Tuberculation*, 55: 455, 1980.
22. Youmans AS et al: *Infect Immun*, 19: 212, 1978.

钩端螺旋体犬型弱毒株的筛选与两价活菌苗的研究

福建省流行病研究所

于恩庶 翁士珍

目前国内外许多学者均在努力寻找可供钩体活菌苗制造的弱毒株, 但收获不大, 迄今取得比较成功的有流感伤寒型和波蒙那型弱毒株, 其他型弱毒株未见文献报道。本实验室最近筛选犬型弱毒株成功, 现将该弱毒株的抗原性和免疫性报告如下:

一、犬型弱毒株来源: 是1975年从钩体病患者赖灿然血液分离的, 当时鉴定为犬型, 以80%兔血清柯氏基培养传代, 每1~2个月传代一次, 至1980年检查时, 发现菌体柔软纤细而长, 两端无钩, 运动迟缓而不旋转, 经过反复传代保持不变, 定名为“赖株”。

二、菌型鉴定: 取犬型的强毒犬3株和赖株与上海生物制品研究所生产的13群15型标准血清作1:1000初筛, 结果这两株均与犬群和致热群血清发生凝集, 其他型均阴性。初步确定赖株为犬群。进一步用成都生物制品研究所生产的钩体因子血清定型, 发现赖株仅与犬群因子血清3发生凝集, 犬3株与犬群因子血清3和6起反应, 但前者效价高出后者8倍, 据此结果, 判定赖株为犬型。

三、对敏感动物的致病力: 取150克豚鼠3只, 皮下注射赖株柯氏培养基培养液1毫升, 未引起任何症状, 肾培养亦无钩体生长。取赖株于地鼠传代, 接种后一天, 取眼底血培养, 连续盲传6代, 未见地鼠发病, 也未从肾分离出钩体, 为一典型稳定的弱毒株。

四、免疫力试验: 取赖株培养物0.5毫升和波蒙那弱毒N株皮下注射地鼠, 3周后用强毒的犬型犬3株和波蒙那型强毒人11株攻击, 并以健康地鼠作对照。结果同型间动物不死亡, 肾不带菌; 异型间动物死亡(100%), 肾有带菌(100%)。再按同样方法, 在豚鼠作免疫力试验, 两个强毒株对豚鼠不能致死; 同型间肾不带菌, 异型间肾带菌(100%)。

五、两型混合活菌苗的免疫效果: 以上两型弱毒株制成两价混合活菌苗, 取其1毫升, 皮下注射豚鼠, 3周后分为两组: 一组用犬型强毒株攻击, 另一组用波蒙那型强毒株攻击, 观察20天全部存活, 解剖无病变, 肾培养阴性。