

# 巨噬细胞和补体在保护小鼠抵抗钩端螺旋体感染中作用的研究

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 张哲夫

巨噬细胞和补体在保护动物抵抗钩端螺旋体(以下简称钩体)感染中究竟起什么作用? Faine 1964年曾证明具有毒力的钩体能被网状内皮吞噬细胞快速的吞噬<sup>[1]</sup>, 随后同一作者在试管内试验时, 发现不同动物的巨噬细胞或多核白细胞吞噬有毒或无毒的钩体。Adler和Faine(1977)应用对钩体不敏感的小鼠来研究钩端螺旋体病(以下简称钩体病)的免疫机制时, 强调早期特异性抗体的重要性<sup>[3]</sup>。1982年Ven Tu研究巨噬细胞在对抗钩体感染的作用时, 再次强调特异性抗体的重要性<sup>[4]</sup>。补体亦是机体重要的防御因子, Johson<sup>[5]</sup>证明补体在体外有杀非致病性钩体的作用, 但对致病性钩体没有作用。1982年Banfi<sup>[6]</sup>证明补体仅仅可以使非致病钩体对吞噬细胞敏感, 而不能使致病性钩体敏感。上述虽然说明巨噬细胞和补体对钩体有吞噬和杀灭作用, 但在决定免疫力上, 巨噬细胞和补体的作用究竟如何则尚未阐明。

本研究的目的是企图搞清巨噬细胞和补体在抵抗钩体感染上的作用。

## 材料和方法

**菌种:** 黄疸出血群哥本哈根型Shiboura株, 由日本梁川良赠送。黄疸出血群赖型70091株, 由上海生物制品所赠送。菌种的保存、培养、计数和显微镜凝集试验(MAT)如Adler和Faine所述<sup>[7]</sup>。

**动物:** Balb/c小鼠, 体重18~20克, 雌雄皆可。动物由澳大利亚蒙纳西大学动物房和流研所动物房供给。裸鼠, 体重18~20克, 由澳

大利亚Water Eliza Hall研究所供给。跳鼠由澳大利亚阿的来德大学供给。

**硅粉(Silica)处理小鼠:** 硅粉平均大小为5微米。硅粉的处理依照O'Brien等人的方法<sup>[8]</sup>。把处理过的硅粉悬浮于Hanks溶液, 每毫升含50毫克, 经过超声波处理(3~5秒), 和121℃高压后即可使用。每只小鼠腹腔注射1毫升硅粉悬液, 两小时后再用钩体攻击<sup>[9]</sup>。

**眼镜蛇毒素处理小鼠:** 眼镜蛇毒素溶于灭菌生理盐水中, 使其0.1毫升含25微克。三小时后再用钩体攻击<sup>[10]</sup>。

**环磷酰胺处理小鼠:** 环磷酰胺溶于蒸馏水, 使每毫升含10毫克。按每公斤体重300毫克的剂量给小鼠腹腔注射, 48小时后用钩体攻击。

**50%补体溶血值的测定:** 绵羊红血球和溶血素买自澳大利亚国家血清研究所。小鼠血清采来后立即测定其补体活性, 基本依照余赟所述的方法<sup>[11]</sup>。致敏的血球和不同稀释度的小鼠血清放在37℃, 30分钟, 然后离心, 取上清在分光光度计541nm波长处检测。能引起50%致敏红血球溶解的小鼠血清量, 即表示50%补体溶血值。

**巨噬细胞功能测定:** 巨噬细胞取自Balb/c小鼠腹腔, 先在小鼠腹腔注射1毫升淀粉溶液, 三天后再从小鼠腹腔取巨噬细胞。在收集巨噬细胞24小时前, 在小鼠尾静脉注射3毫克硅粉悬液, 即可得到受硅粉处理的巨噬细胞。然后, 用相差显微镜检查巨噬细胞吞噬胶乳的能力。用含有10%牛血清199培养液洗小鼠腹腔, 收集巨噬细胞, 放巨噬细胞于Leighton



培养管内，管内预先放  $8 \times 22$  毫米盖玻片，把培养管放在  $37^{\circ}\text{C}$ ， $5\% \text{CO}_2$  温箱内 1 小时。然后加入 1 毫升胶乳<sup>[4]</sup>，放温箱培育，在间隔 30 分，60 分，90 分的不同时间，取出盖玻片放在相差显微镜下观察巨噬细胞吞噬胶乳的情况。每个标本观察 100 个巨噬细胞，计算出 100 个细胞中有多少个细胞吞噬有胶乳。

用化学光反应测定巨噬细胞吞噬钩体的能力。取 1 毫升巨噬细胞 ( $6 \times 10^5$ ) 放入小玻璃瓶中，把此小玻璃瓶放在  $37^{\circ}\text{C}$ ， $5\% \text{CO}_2$  温箱 2 小时，然后用含有 Luminol 的 Hanks 溶液 (无酚红) 换出原培养液，Luminol 在 Hanks 溶液中浓度为 40 微克/毫升。把上述含有巨噬细胞的小玻璃瓶放入 LKB1250 化学光反应计内。整个反应在  $37^{\circ}\text{C}$  温室中进行。以 1 个细胞需 100 条钩体的比例加入玻璃瓶中，正常小鼠血清 (补体) 和小鼠抗血清都以 1 : 100 比例加入玻璃瓶中，记录其反应。

### 结 果

一、硅粉对巨噬细胞吞噬能力的影响：正常小鼠的巨噬细胞对胶乳颗粒有良好的吞噬能力。在 30 分钟时，大部分细胞内都可见到大量胶乳颗粒。每个细胞含有 50 或更多的颗粒。在 90 分钟时，平均 94% 巨噬细胞都吞噬有胶乳颗粒。注射过硅粉的小鼠巨噬细胞的吞噬能力有非常明显的降低，30 分钟时仅 10% 的细胞内有胶乳颗粒。而且每个细胞内的胶乳颗粒也低于 10 或更少。90 分钟也只有 24% 巨噬细胞吞噬有胶乳颗粒 (图 1)。

化学光反应：在同样的条件下，正常小鼠巨噬细胞加入钩体后，反应线没有明显变化，但在加入正常鼠血清和抗血清后，反应线在几分钟内迅速上升，15 分钟后上升到 2 个毫伏，说明巨噬细胞在抗血清的作用下能迅速的大量吞噬钩体。注射过硅粉的小鼠巨噬细胞加入钩体、补体和抗血清后，曲线在上升到 1 个毫伏后就停留在一个水平，15 分钟后开始下降。说明受过硅粉处理的巨噬细胞吞噬能力至少比正

常降低一倍 (图 2)。

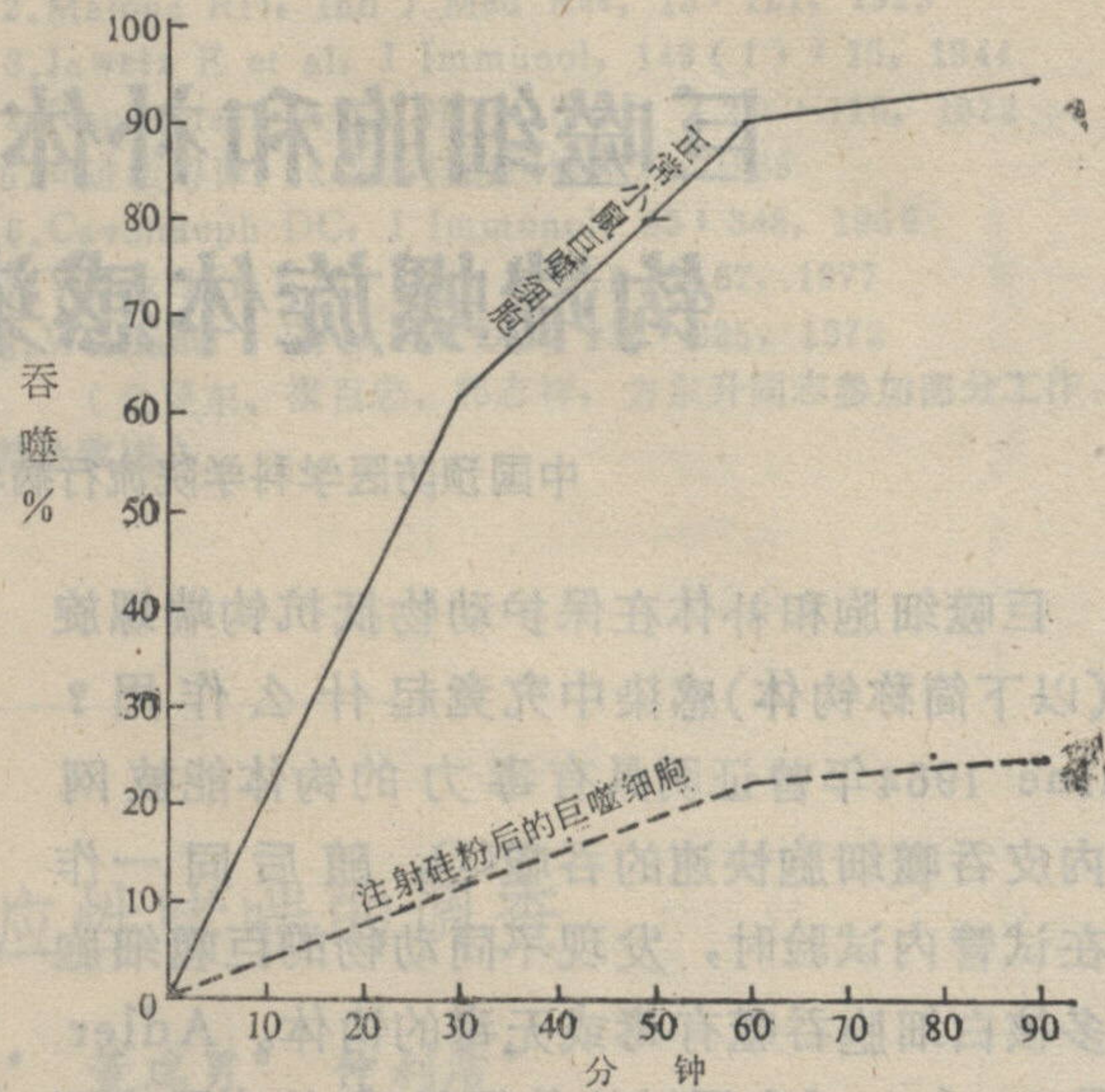


图1 正常巨噬细胞和硅粉处理的巨噬细胞吞噬活性的比较

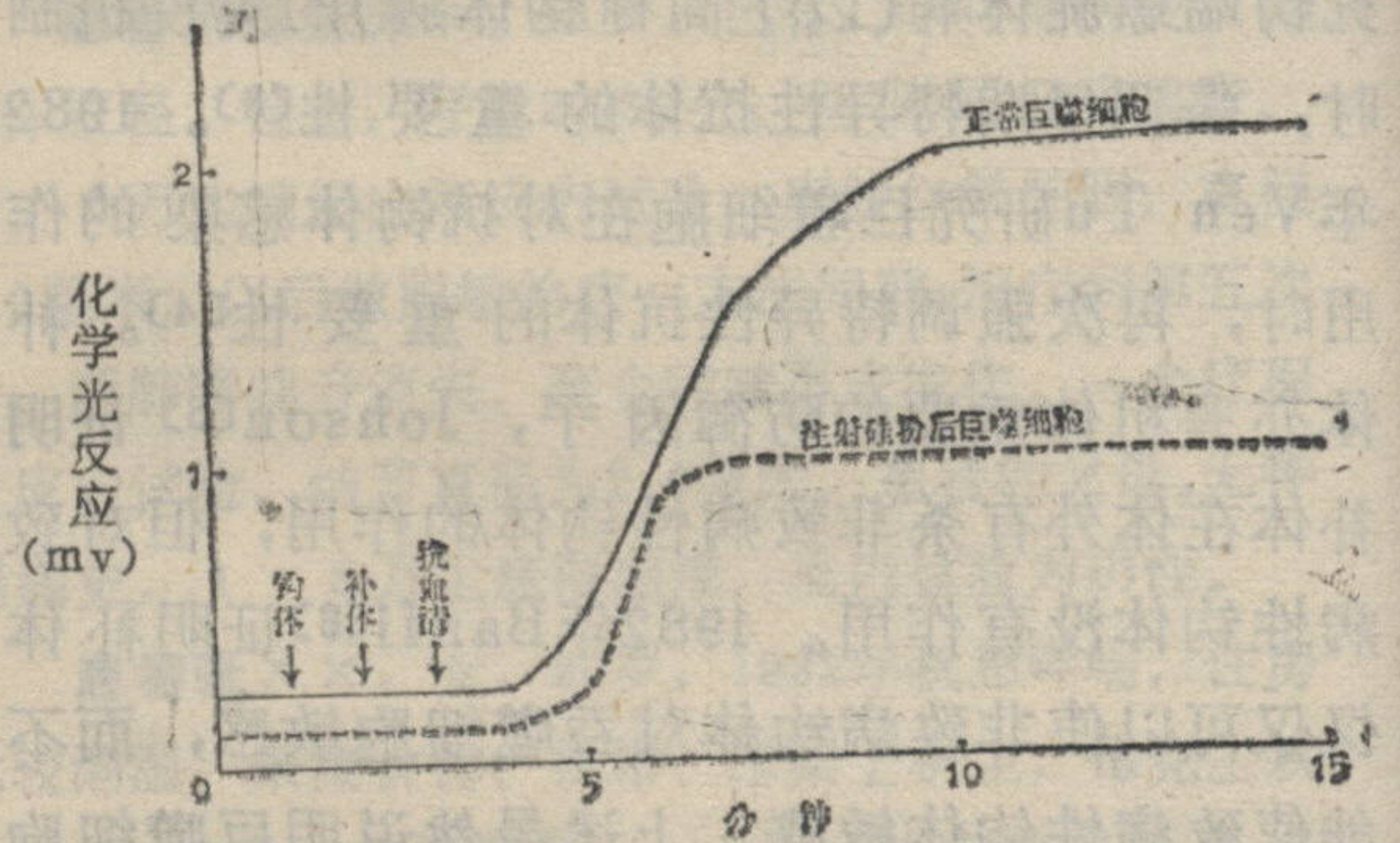


图2 正常巨噬细胞和硅粉处理的巨噬细胞吞噬钩体在化学光反应上的比较

图注：钩体  $1 \times 10^8$  / 毫升；补体 1 : 100；抗血清 1 : 100，两种巨噬细胞分别为  $6 \times 10^5$  / 1 毫升。

二、硅粉在小鼠对致病性钩体敏感性上的作用：用黄疸出血群哥本哈根型 Shiboura 株  $4 \times 10^8$  条的剂量给小鼠腹腔注射不能引起小鼠发病或死亡，但是这种剂量用在硅粉处理过的小鼠上就会导致小鼠发病和死亡。在用不同的注射剂量  $3.5 \times 10^8$  或  $4 \times 10^8$  条钩体后其死亡率变化在 50~100% 之间 (附表)。解剖发现有出血和黄疸，肝脾肿大，典型钩体病肺出血斑，血中有大量钩体。并能从肝组织中分离培养出钩体。硅粉处理的小鼠对致病性钩体的敏感性 (死亡 9/10) 大于环磷酰胺处理的小鼠 (死亡 2/10) 和对钩体敏感的跳鼠 (死亡 2/5)。用黄



疸出血群赖型70091株感染硅粉处理的小鼠，同样可使动物呈现典型的钩体病，解剖后肺部有典型钩体病出血点，严重的出血和黄疸，肝脏中有大量钩体。其死亡率随感染的剂量的不同而变化。钩体剂量在 $1.5 \times 10^7$ 时可使小鼠死亡。硅粉处理的小鼠经钩体感染后其幸存者的抗体水平类似正常小鼠，其显微镜凝集滴度在第4，7，10和14天分别为4，32，64，128。

附表 硅粉在小鼠对黄疸出血群哥本哈根型钩体敏感性上的作用

| 组别 | 感染剂量              | 死亡数/试验数 |      |      |
|----|-------------------|---------|------|------|
|    |                   | 硅粉+钩体   | 硅粉   | 钩体   |
| 1  | $4 \times 10^8$   | 9/10    | 0/5  | 0/5  |
| 2  | $3.5 \times 10^8$ | 5/10    | 0/5  | 0/5  |
| 3  | $4 \times 10^8$   | 10/10   | 0/10 | 0/10 |
| 总计 |                   | 24/30   | 0/20 | 0/20 |

三、眼镜蛇毒素对溶血性补体单位的作用：给小鼠注射眼镜蛇毒素后3小时，其血清溶血性补体单位迅速下降到20，维持这样的水平达三天，第五天和第六天补体单位才接近正常水平(图3)。

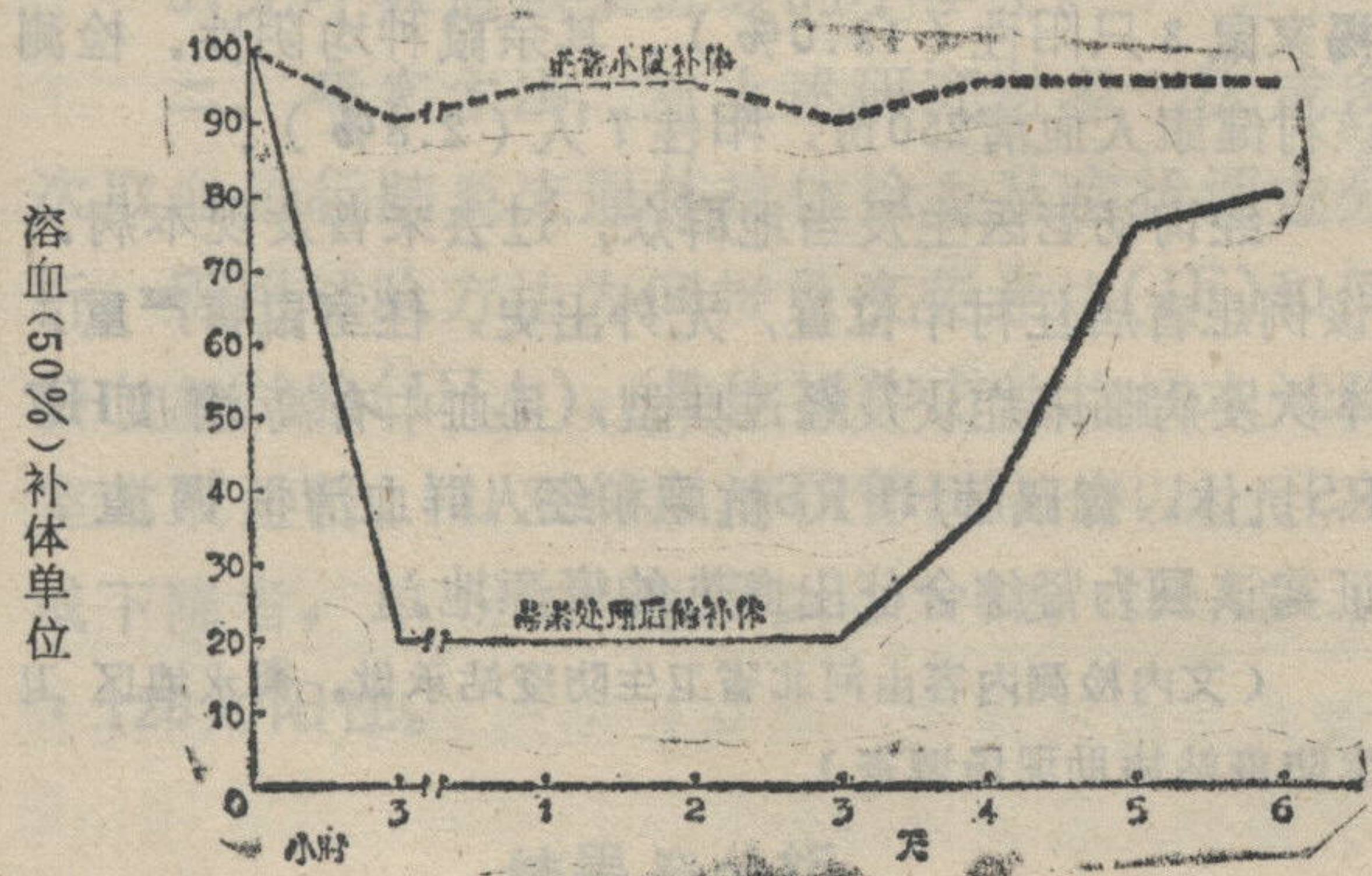


图3 眼镜蛇毒素对小鼠50%溶血补体单位(值)的作用

四、眼镜蛇毒素在小鼠对致病性钩体敏感性的作用：用眼镜蛇毒素处理小鼠和裸鼠，三小时后用 $4 \times 10^8$ 剂量黄疸出血群哥本哈根型Shiboura株攻击，小鼠和裸鼠没有发病和死亡，但是其MAT抗体反应较正常小鼠MAT抗体反应快而且其抗体水平也高。

## 讨 论

巨噬细胞是机体清除侵入病原微生物的重要防御屏障<sup>[12]</sup>。巨噬细胞在不同的病原微生物感染中其作用也是不同的。最近，Tatsukawa指出，机体对抗绿脓杆菌的感染主要依赖多形核白细胞，而对抗李司特菌主要依赖巨噬细胞<sup>[13]</sup>。机体在抵抗钩体感染中巨噬细胞的作用尚不完全清楚。硅粉曾被认为具有选择性可以使巨噬细胞失去活性的作用<sup>[14]</sup>。用硅粉处理的小鼠经黄疸出血群钩体感染后可产生典型的钩体病。这可能是巨噬细胞失去或减弱了吞噬作用使钩体大量增加的结果。Adler和Faine指出小鼠能克服钩体感染是由于早期体液抗体对钩体的清除作用。我们的研究表明，在感染早期，巨噬细胞在清除钩体、克服感染方面也起了重要作用，也可能是抗体和吞噬细胞的联合作用。

有补体缺陷的病人临床上常发生反复感染<sup>[15]</sup>，因此Roitt强调补体在防御感染方面的重要性<sup>[16]</sup>，补体缺陷的小鼠可增加对肺炎球菌<sup>[17]</sup>，葡萄球菌<sup>[18]</sup>和流感嗜血杆菌<sup>[19]</sup>的敏感性。眼镜蛇毒素可暂时性使补体水平下降<sup>[16]</sup>。在本试验中，用眼镜蛇毒素处理的小鼠，其补体水平大幅度下降，并持续数日。但是这并没有使这些动物产生钩体病的临床表现和死亡。然而其MAT抗体滴度比正常小鼠感染后的抗体滴度高四倍。这种强烈的抗体反应，可能是由于大量抗原刺激机体的结果。这也间接说明补体参加了清除钩体的过程。

## 摘 要

用硅粉抑制巨噬细胞和用眼镜蛇毒素降低补体水平的方法来分析和评价巨噬细胞和补体在小鼠对钩体的免疫上的作用。在硅粉处理小鼠二小时后，用具有毒力的钩体攻击，可引起急性致死性钩体感染。眼镜蛇毒素处理的小鼠对同样的钩体则不能引起发病，这些实验提供了直接证据，证明巨噬细胞对钩体感染在天然免疫上起着重要作用。



### ABSTRACT

The role of macrophages and complement in the immunity of Balb/c mice to *Leptospira* was assessed with silica, which depressed phagocytosis by macrophages, and Cobra Venom Factor which depleted hemolytic complement. Silica given to mice 2h before challenge with a suspension of virulent *Leptospira* caused an acute lethal leptospiral infection. Cobra Venom Factor did not render mice susceptible to the same *Leptospira*. These experiments indicate that macrophages play an important role in natural immunity to leptospiral infection in mice.

### 参 考 文 献

1. Faine S: Am J Vet Res, 25: 830, 1964
2. Faine S: Aust J Exp Biol Med Sci, 42: 579, 1964
3. Adler B et al: Infect Immun, 17: 67, 1977
4. Vinh Tu et al: Pathology, 14: 463, 1982
5. Johnson R C et al: J of Bact, 91: 1403, 1966
6. Banfi E et al: J of General Microbiology, 128: 813,

- 1982
7. Adler B et al: Infect Immun, 14: 703, 1976
8. O'Brien A D et al: Infect Immun, 25: 513, 1979
9. Schlabach A J et al: Infect Immun, 26: 615, 1979
10. Crosson F J JR et al: Infect Immun, 14: 882, 1976
11. 余 颢等: 临床免疫技术, 上海科技出版社, 118~123页, 第一版, 1982年
12. Densen P et al: Rev Infect Dis, 2: 817, 1980
13. Tatsakawa K et al: J Gen Microbiol, 115: 161, 1979
14. Kessel R W et al: J Exp Pathol, 44: 351, 1963
15. Rabson A R et al: The Lancet, 2: 1179, 1972
16. Roitt I: Essential Immunology, Fourth Edition, P167, 1980
17. Winkelstein J A et al: Pro Soc Exp Biol Med, 149: 397, 1975
18. Easmon C S F et al: Infect Immun, 13: 399, 1976
19. Zwahlen A et al: Infect Immun, 42: 708, 1983

(本试验工作大部分是在澳大利亚蒙纳西大学微生物学系费恩教授指导下进行的。一部分是回国完成的。对在工作中给予大力支持的爱弟拉致谢)

## 首次证实河北省安平县存在肾综合征出血热疫源地

河北省安平县卫生防疫站 孙永桥

河北省安平县城关乡兴贤村高××, 男 26 岁, 1984 年 2 月 16 日发病, 住该县医院治疗。患者三大病征(发热、出血、肾功能损害)突出, 五期(发热期、低血压期、少尿期、多尿期、恢复期)经过明显。临床症状符合西安《1981 年全国 EHF 防治科研工作座谈会》诊断标准中的中型。4 月 9 日采患者血用 IFAT 检测 HFRS 抗体, 滴度 1:1280。

对该村作鼠类户内调查, 扑鼠 72 只。其中褐家鼠 23 只 (31.9%)、小家鼠 38 只 (52.8%), 其余为大仓鼠和小仓鼠。以 IFAT 检测鼠肺 HFRS 抗原, 23 只

褐家鼠 3 只阳性 (13.0%), 其余鼠种均阴性。检测该村健康人血清 250 份, 阳性 7 人 (2.8%)。

经询问老医生及当地群众, 过去未曾发现本病。该例患者居住村中位置, 无外出史, 住室鼠害严重。本次发病临床症状及经过典型, 且血中有高滴度 HFRS 抗体。查鼠肺 HFRS 抗原和经人群血清学调查, 证实该县为肾综合征出血热的疫源地。

(文内检测内容由河北省卫生防疫站承做, 衡水地区卫生防疫站协助现场调查)

### 新 书 预 告

《流行病学进展》第四卷即将出版。该卷组编了流行病学方法有关的内容, 其中有: 流行病学方法进展、程序计算器在流行病学上的应用、病例对照研究方法、筛选、偏倚及通径分析等。此外还编入近年有新进展的一些疾病, 如感染性腹泻、弯曲菌感染、轮状病毒感染及食管癌和国境卫生检疫的进展等。由于印数不多, 请注意新书预告, 及时向新华书店预订。

《流行病学进展》编写组 1986.4