

# 布鲁氏菌104M的化学抗原免疫 机制的研究

中国医学科学院流行病学微生物学研究所

吕秀芝 王惠萍

我们曾报道,从牛种104-M活菌苗中提取的A及E二种抗原成分,可使实验动物出现一定程度的免疫反应,其保护力与活菌苗相似<sup>[1,4]</sup>;且不导致明显的皮肤变态反应及特异性血清抗体的形成。在此基础上,我们进一步开展了对该化学组分免疫机制的研究,并与104-M活菌苗作了对比分析。

## 材料及方法

1. 动物: 300~350克豚鼠, 18~20克小白鼠。

2. 免疫方法及剂量: 免疫途径为皮下; 免疫剂量: 化学组分为5毫克/每只豚鼠, 1~2毫克/每只小鼠; 对照组104-M活菌苗为 $1 \times 10^7$ 个菌细胞/每只小鼠或豚鼠。

3. 体外单核细胞的吞噬、制菌试验: 试验过程为无菌操作。首先,从豚鼠颈动脉放血、处死。再用含肝素的Hanks液洗出腹腔内细胞,细胞经3次洗涤后计数备用;细菌为104-M活菌苗菌株(即将24小时培养物制成菌液,以Hanks液洗涤3次)。细胞与细菌按1:20~1:25的比例混合,取1毫升分装小玻璃瓶内,斜置架上,于37℃温箱1~2小时,使细胞吞噬细菌。取出后用含40%灭活小牛血清的1640营养液(含青、链霉素各100单位/毫升)置换,并置37℃温箱内培育24、48小时,弃去液体,用2毫升盐水洗涤瓶内细胞2次。最后加入1毫升蒸馏水,将壁上细胞顺序刮下,至刮净止。细胞液依次10倍稀释至适宜浓度,每组为3小瓶,继而分别取0.1毫升倾注平皿,检查活菌数。

4. 体内吞噬试验: 以104-M $5 \times 10^5$ 菌浓度,对正常或免疫小白鼠行腹腔内注射,于不同时间将动物处死,用1毫升含肝素的生理盐

水洗出腹腔细胞,稀释到适当浓度倾注平皿,测定活菌数;经800转/分离心5分钟,使细胞沉淀,取上清液倾注平皿,其活菌数,代表细胞外菌量。每次试验,各实验组标本均同时离心,使条件一致;在检查腹腔内细菌数的同时,还检测了血液及脾脏中菌量,以对比全身感染的状况。

5. 被动保护力试验: 小白鼠血清的转移量为0.2~0.3毫升,转移途径为腹腔。转移后的被动保护作用,以腹腔内细胞吞噬作用能力及活性布鲁氏菌(5~10个致死剂量)攻击后的保护能力为指标。

6. 体外血清制菌试验: 豚鼠从心脏取血,小白鼠从股动脉放血,俟血液凝固后,即刻分离血清,进行试验,如需低温(-25~-30℃)保存,时间不得超过24小时。血清用肉汤稀释,总量为1毫升,并加入104-M活菌 $5 \times 10^5$ 个,混合,置37℃温箱培养不同时间后,倾注培养皿,测定存活菌数。

## 结 果

1. 不同化学组分的体外制菌作用: 体外细胞吞噬试验证明,以A或E二种化学组分免疫豚鼠,均能激活单核巨噬细胞,与104-M活菌苗一样,可增强制菌功能。免疫机体细胞体外吞噬布鲁氏菌后,经24、48小时,活菌数较正常动物细胞内的菌数值明显为低。E化学组分免疫后26天,体外培育48小时,细胞内菌数下降到350个,而对照组高达 $133 \times 10^3$ 个,差别极为显著;以下降指数为指标,E化学组分为846,对照组为4,前者较后者高200倍以上。但化学组分激活的细胞,其制菌作用持续时间短。到60天时,唯24小时培养物有制菌作用,

而48小时细菌又有回升; 90天正常。而104-M 活菌苗至180天仍有一定程度制菌活性(表1)。

表1 体外单核巨噬细胞的制菌功能

免疫天数	细胞与细菌培育时间(小时)	免疫组						对照组	
		104-M活菌		A组		E组分		活菌数	下降指数*
		活菌数	下降指数*	活菌数	下降指数*	活菌数	下降指数*		
26	1.5	$618 \times 10^3$	1	$426 \times 10^3$	1	$296 \times 10^3$	1	$516 \times 10^3$	1
	24	$450 \times 10^3$	1.4	$7 \times 10^3$	60	$39 \times 10^3$	8	$150 \times 10^3$	3.4
	48	$0.35 \times 10^3$	1766	$2 \times 10^3$	213	$0.35 \times 10^3$	846	$133 \times 10^3$	4
60	2	$282 \times 10^4$	1	$223 \times 10^4$	1	$221 \times 10^4$	1	$289 \times 10^4$	1
	24	$7.7 \times 10^4$	37	$7.5 \times 10^4$	30	$1 \times 10^4$	221	$37 \times 10^4$	8
	48	$1 \times 10^4$	282	$29.6 \times 10^4$	8	$5.8 \times 10^4$	38	$4.4 \times 10^4$	66
90	2	$144 \times 10^3$	1	$136 \times 10^3$	1	$17 \times 10^3$	1	$7 \times 10^3$	1
	24	$62 \times 10^3$	2.3	$83 \times 10^3$	1.6	$59 \times 10^3$	3.4*	$14 \times 10^3$	2*
	48	$10 \times 10^3$	14	$81 \times 10^3$	1.5	$104 \times 10^3$	6.1*	$105 \times 10^3$	15*
180	4	$1150 \times 10^4$	1	$199 \times 10^4$	1	$264 \times 10^4$	1	$185 \times 10^4$	1
	24	$84 \times 10^4$	14	$90 \times 10^4$	2	$74 \times 10^4$	4	$110 \times 10^4$	2
	48	$9 \times 10^4$	128	$56 \times 10^4$	4	$28 \times 10^4$	9	$60 \times 10^4$	3

\* 单核巨噬细胞内布鲁氏菌下降的指数 =  $\frac{\text{经1.5、2、4小时巨噬细胞内菌数}}{\text{巨噬细胞与细菌培育24或48小时胞内存活菌数}}$  (以吞噬过程结束后的下降指数为1) \*为单核巨噬细胞内布鲁氏菌上升指数。

2. 化学组分E在动物体内引致的细胞吞噬作用: 给小白鼠腹腔内注射104-M布鲁氏菌后, 正常动物经6~8小时开始清除注入菌, 而E化学组分免疫的动物经3~4小时后, 腹腔内细菌数即明显减少, 清除时间较前者提前3小时, 表明免疫后机体内吞噬细胞的功能有所增强; 从腹腔内散在分布的及吞噬细胞内的细菌数亦可看出, 免疫动物腹腔内吞噬细胞的吞噬活性明显高于对照组。细菌进入腹腔后6和8小时, 细胞外散在细菌由3小时的 $14 \times 10^3$ 个下降到 $1.02 \times 10^2$ 个, 而细胞内菌数则明显升高, 即由12个上升为167个(表2), 可见绝大多数细菌已被吞入细胞内; 血液及脾中的活菌计数亦证明, 进入免疫动物体内的细菌, 大多数可在腹腔中被消灭, 仅极少细菌能通过血流进入脾脏; 注入正常动物体内的细菌, 短时间内(30分钟)便可通过血流进入脾脏。正常小鼠以104-M菌感染24小时, 脾内菌数达 $129 \times 10^3$ , 第5天上升到 $990 \times 10^4$ ; 而E化学组分免疫的小白鼠以同样方法感染时, 24小时脾中菌数仅为 $5 \times 10^1$ ,

第5天为 $1.2 \times 10^4$ , 至60天腹腔内细胞仍有较强的吞噬及制菌能力(表2)。

3. 血清在试管内的制菌作用: 用化学组分E免疫的小白鼠及豚鼠血清, 有明显的制菌活性, 持续到60天仍相当明显; 而以104-M活菌免疫的动物, 其血清在80天时, 已丧失制菌作用(表3)。

4. 免疫血清及细胞在受体内的被动保护功能: 以化学组分E免疫的动物, 其血清及细胞均有较好的被动保护作用, 当用致死剂量的活菌攻击时在第5天到第30天, 其通过血清制菌及免疫细胞的被动保护力高达78%~100%。但60天时, 如将豚鼠免疫细胞转移给正常小鼠, 其保护力下降到25%; 而免疫血清下降不明显, 保护力仍达88.9%; 而104-M活菌苗免疫小白鼠30天的血清被动保护力(60%)已低于细胞, 但腹腔细胞反而优于前者, 分别为100%及78%(表4)。以腹腔内细菌被清除的速度及脾内菌数为指标, 用转输试验比较腹腔细胞及脾细胞的被动保护力, 前者优于后者(表5)。

表 2

小白鼠腹腔内单核巨噬细胞的吞噬功能\*

接种后天数	细菌注入腹腔时间(小时)	免 疫 组						对 照 组		
		104-M活菌苗			E化学组分			腹腔内菌数	未吞入菌数	胞内*菌数
		腹腔内总菌数	未吞入菌数	胞内*菌数	腹腔内总菌数	未吞入菌数	胞内*菌数			
30	0.5以内	858 × 10 <sup>3</sup>			883 × 10 <sup>3</sup>			735 × 10 <sup>3</sup>		
	3~4	58 × 10 <sup>3</sup>	20 × 10 <sup>3</sup>	2	185 × 10 <sup>3</sup>	14 × 10 <sup>3</sup>	12	660 × 10 <sup>3</sup>	107 × 10 <sup>3</sup>	5
	6~8	9.85 × 10 <sup>3</sup>	3.3 × 10 <sup>1</sup>	297	17 × 10 <sup>3</sup>	1 × 10 <sup>2</sup>	167	119 × 10 <sup>3</sup>	68 × 10 <sup>3</sup>	1
	24	6.5 × 10 <sup>2</sup>	1.6 × 10 <sup>1</sup>	40	6 × 10 <sup>3</sup>	1.4 × 10 <sup>2</sup>	42	26 × 10 <sup>3</sup>	2 × 10 <sup>3</sup>	13
	72~120	5.1 × 10 <sup>2</sup>	3 × 10 <sup>1</sup>	16	1.5 × 10 <sup>3</sup>	1.7 × 10 <sup>2</sup>	8	6 × 10 <sup>3</sup>	7 × 10 <sup>2</sup>	8
60	0.5以内	780 × 10 <sup>3</sup>			1310 × 10 <sup>3</sup>			650 × 10 <sup>3</sup>		
	6~8	52 × 10 <sup>3</sup>	3.9 × 10 <sup>2</sup>	107	18 × 10 <sup>3</sup>	1.5 × 10 <sup>2</sup>	119	110 × 10 <sup>3</sup>	13 × 10 <sup>3</sup>	7
	24	56 × 10 <sup>2</sup>	1.5 × 10 <sup>2</sup>	30	19 × 10 <sup>2</sup>	3.5 × 10 <sup>1</sup>	53	50 × 10 <sup>3</sup>	2 × 10 <sup>3</sup>	24

\*为感染一定时间的细胞内菌数(以分散在细胞外的菌数为1); \*表内空项示未做。

表 3 免疫血清的制菌功能

动物血清	免疫原	布鲁氏菌增长指数*	
		5小时以内	24小时
小鼠免疫后25天	E化学组分	1.2	23.5
	104-M活菌苗	1.3	8.3
正常小鼠肉汤对照	血清对照	0.9	151.5
	无血清	1.0	134.5
豚鼠免疫后60天	E化学组分	0.9	19.9
	104-M活菌苗	1.0	242.0
正常豚鼠	正常血清	1.2	228.1

\* 增长指数 =  $\frac{\text{细菌与血清混合后培养一定时间的活菌数}}{\text{细菌与血清混合后的活菌数}}$

表 4 免疫血清及细胞转输后的被动保护功能

动物供体	E化学组分免疫时间	转输材料					
		腹腔细胞			血 清		
		小鼠总数	死亡数	保护率(%)	小鼠总数	死亡数	保护率(%)
免疫小鼠	3天	10	8	20	10	9	10
	5天	10	1	90	10	0	100
	30天	9	2	78	10	1	90
	30天*	10	0	100	10	4	60
对照小鼠	/	10	10	0	10	10	0
免疫豚鼠	16~18小时	8	6	25	9	5	44.5
	60天	8	6	25	9	1	88.9
对照豚鼠	/	8	7	12.5	8	6	25

\*为104-M活菌苗免疫时间; /为未处理

### 讨 论

从104-M活菌苗中提取的E、A化学组分,虽无特异性免疫反应及对布鲁氏菌素的皮肤变态反应,但可激活免疫系统,增强巨噬细胞的吞噬及杀菌作用,提高机体的抗感染能力。当机体注入E化学组分后,至第5天其血清及腹腔细胞即具有满意的被动保护作用,但巨噬细胞免疫功能持续时间短,而血清的保护作用则持续时间较长。104-M活菌苗引起的巨噬细胞活性持续时间长(可达180天),但血清中的制菌活性物质消失快。根据我们以前的报道[2,3]及本次实验结果可以推论: E化学组分在免疫接种后的早期,巨噬细胞及血清在抗感染的机制中占有同等重要的地位,随着时间延长,尤其是免疫后期,逐渐过渡到以体液免疫为主。

吞噬试验(表1、2)表明,经6~8小时,免疫动物的单核细胞便可吞噬注入体内大部分细菌使胞外细菌数大量下降;免疫60天时,化学组分E组的体内细菌减少程度,大于体外进行的吞噬作用,说明免疫动物体内单核细胞的吞噬活性高于体外。我们认为,这是动物体内的各种辅助因子(包括腹腔液中的各种因素)所起的作用。实验还表明,免疫动物的血清对布鲁氏菌在体外有一定的杀、抑作用,在实验动

表 5

输入不同细胞的被动保护力比较

观察指标	转输的细胞	转输细胞来源				对照组
		104-M活菌	A化学组分	E化学组分	正常小白鼠	
腹腔内细菌总数	腹腔细胞	$39 \times 10^2$	$50 \times 10^2$	$14 \times 10^2$	$131 \times 10^2$	$59 \times 10^2$
	脾脏细胞	$189 \times 10^2$	$127 \times 10^2$	$350 \times 10^2$	$263 \times 10^2$	
脾脏内活菌数	腹腔细胞	$2 \times 10^2$	$20 \times 10^2$	$3 \times 10^2$	$2100 \times 10^2$	$4000 \times 10^2$
	脾脏细胞	$10 \times 10^2$	$13 \times 10^2$	$57 \times 10^2$	$2300 \times 10^2$	

注：细胞被动转输后16小时，受体腹腔内注入104-M活菌，24小时后处死动物，检查腹腔及脾内菌数。

物中亦有被动保护功能，故体液因素在抗感染机制中的重要意义不容忽视。当然，由于免疫阶段不同，细胞及血清介导的防御作用及其程度大小亦异。

小白鼠是研究慢性布鲁氏菌病的较好模型<sup>[5]</sup>，我们的吞噬试验也证明，它对布鲁氏菌敏感，反应比较规律。便于饲养管理。在进行免疫研究时，可能较豚鼠为优。

当E化学组分免疫豚鼠后，如从腹腔第二次注入抗原，个别动物于24小时内死亡；如皮内注射同种抗原，可产生轻度皮肤变态反应。在吞噬实验中，当免疫动物再次接触E化学组分时，发生了细胞功能短时间内受损的迹象。上述情况提示我们，如给人接种化学组分，应注意排除可能引起的变态反应。

### 摘 要

已报道由104-M活菌苗中提取的化学组分A及E在实验动物中引起的保护作用与活菌苗相似，但不形成明显的血清特异性抗体及皮肤变态反应。为此，本实验采用豚鼠腹腔细胞在体外作吞噬试验；利用小鼠腹腔细胞在体内进行吞噬以及血清杀菌力、转输血清及细胞后进行被动保护力等试验，探讨了化学组分的免疫机制，并同104M活菌苗进行了对比。结果表明E化学组分免疫后迅速激活机体的免疫系统，使细胞及血清制菌活性升高，并具有被动保护功能，腹腔细胞优于脾细胞。与活苗组动物比较，接种E组分后导致的细胞免疫持续时间短，血清的保护作用持续时间长。

### ABSTRACT

Certain chemical fractions, i.e. A & E extracted from *Brucella abortus* 104-M cells, could cause protective immunity in experimental animals similar to that induced by 104-M live *Brucella* cells. Following inoculation with A or E fraction, it revealed that neither production of serum specific antibodies nor marked delayed skin hypersensitivity. By means of tests for phagocytosis both in vivo & in vitro, assay of bactericidal activities of serum passive acquired immunity in recipients after transferring cells or serum of vaccinated animals. We studied in white mice & guinea pigs the immune mechanism by inoculation of chemical fraction A or E, as compared with that induced by 104-M live vaccine. By inoculation A or E fraction, the immune system of experimental animal was activated promptly. After priming with E fraction, the bactericidal activities of phagocytes both in vivo & in vitro and immune sera in vitro were found elevated. The cells and sera of the immunized animals were able to confer a marked degree of passive immunity to the recipients. The peritoneal exudate cells were superior to spleen cells. After priming with E fraction, it conferred a cellular immunity with shorter duration than that following 104-M live vaccine, whereas the humoral responses following priming with E fraction lasted longer.

### 参 考 文 献

1. 尚德秋等：流行病学杂志，1(3)：137，1980。
2. 吕秀芝等：科学通报，17(5)227：，1966。
3. 肖东楼：布鲁氏菌不同抗原制剂对实验动物免疫反应的观察，内部资料，1981。
4. 尚德秋等：中国地方病学杂志，1(2)：104，1982。
5. Cheers C et al: Inf Immun, 23(2)：197, 1979.