

## • 论著 •

## 抗内毒素核心糖脂抗体大肠杆菌 J5 株免疫血清的制备

徐新女 李志军 李银平

**【摘要】 目的** 探讨制备高效价抗内毒素核心糖脂(E. Coli J5)抗体,为免疫治疗革兰阴性菌(GNB)菌血症和感染性休克奠定基础。**方法** 应用大肠杆菌 O111:B4 变异株(J5)制备无毒菌苗( $50 \times 10^{12}$ /L)。12 只家兔经耳缘静脉注射 J5 菌苗(另 12 只用生理盐水作对照),每 3 d 注射 1 次,共 5 次,每次剂量依次为 0.1、0.2、0.4、0.6 和 0.8 ml。第 5 次注射后 1 周由心脏取血 40~50 ml,分离血清,采用间接血凝法测定抗体效价及交叉反应试验。**结果** 12 只免疫家兔中,6 只抗体效价在 1:1 024 以上,并与多种 GNB 内毒素产生交叉反应。**结论** 自制的 E. Coli J5 抗体效价高,可与多种 GNB 内毒素相结合。

**【关键词】** 大肠杆菌 O111:B4 变异株(J5); 抗内毒素核心糖脂抗体; 菌苗; 内毒素

**中图分类号:** R63; R457.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-0603(2004)06-0358-03

**Anti-endotoxin core glycolipid antibody: the preparation of immune serum of E. Coli J5** XU Xin-nu\*, LI Zhi-jun, LI Yin-ping. \* Key Lab for Critical Care Medicine of The Ministry of Health, First Central Hospital, Tianjin 300192, China

**【Abstract】 Objective** To prepare high titer anti-endotoxin core glycolipid (J5) antibody (CGL) for the treatment of Gram-negative bacteremia and septic shock. **Methods** Nontoxic bacterial vaccine ( $50 \times 10^{12}$ U/L) against E. Coli O111:B4 mutant strain J5 was prepared. J5 bacterial vaccine was injected into rabbits through ear marginal vein (saline as control preparation), one time pre three days, totally five times. Injected doses were as following: 0.1 ml, 0.2 ml, 0.4 ml, 0.6 ml, and 0.8 ml. One week after fifth injection, blood samples from heart were collected and immune serum was isolated. Indirect clotting test was used to determine the titer of antibody and cross reaction. **Results** Among 12 immunized rabbits, titers of antibody against E. Coli J5 were exceeding 1:1 024 in 6 rabbits, and they had cross reaction with various kinds of Gram-negative bacterial endotoxins. **Conclusion** The titer of anti-endotoxin core glycolipid (E. Coli J5) antibody prepared by us appears to be high, and it can combine with various kinds of Gram-negative bacterial endotoxins.

**【Key words】** Escherichia Coli O111:B4 (J5); anti-endotoxin core glycolipid antibody; vaccine; endotoxin

**CLC number:** R63; R457.14 **Document code:** A **Article ID:** 1003-0603(2004)06-0358-03

虽然人们对内毒素的结构、生物学活性及其致病机制,以及内毒素血症的病理生理过程等有关认识取得了显著的进展,但是针对内毒素血症的抗内毒素治疗却一直困扰着医学界<sup>[1,2]</sup>。革兰阴性菌(GNB)主要致病因子为内毒素,其化学成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)通常由暴露于菌体表面的 O 特异性多糖和与之相连的核心寡糖及类脂 A 三部分组成,类脂 A 是其毒力部分,并与核心寡糖一同构成了 LPS 的核心不变区,称为核心糖脂(CGL)。动物实验表明,GNB 共有的 CGL 免疫产生的抗体能与绝大多数 GNB 产生交叉结合反应,并具有保护宿主免受毒害的作用<sup>[3]</sup>。Ziegler 等<sup>[4]</sup>应用暴露 CGL 的大肠杆菌 O111:B4 变异株 Rc(J5)制

备抗血清临床治疗 GNB 菌血症和感染性休克获得初步疗效。目前国内相关的研究报道较少<sup>[5]</sup>,因为建立这一免疫疗法的基础是制备出高效价的 J5 免疫血清。为此,我们对 J5 免疫血清制备及抗体效价测定方法进行了研究,报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料:** E. Coli O111:B4 变异株 J5(E. Coli J5)菌种:由英国皇家进修医学院 Hammersmith 医院 Dr. Cohen 博士赠送,经国家卫生部药品生物制品鉴定所菌种室鉴定并收藏。健康大耳白家兔(2.0 kg 左右),由本院动物室提供。体积分数为 2% 的新鲜绵羊红细胞在每次实验前采集,用玻璃珠脱纤维法去纤维,磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至终浓度。E. Coli J5-LPS 和 E. Coli O111:B4-LPS 购自国家卫生部药品生物制品鉴定所和 Sigma 公司。

## 1.2 实验方法:

**1.2.1 E. Coli J5 菌苗的制备:** 复苏后的 E. Coli J5

基金项目:天津市卫生局科研基金资助项目

作者单位:300192 天津市第一中心医院重点实验室(徐新女,李志军);300050 天津市天和医院(李银平)

作者简介:徐新女(1965-),女(汉族),天津市人,副主任技师。

菌种接种于胰酶大豆肉汤培养基培育 18 h 后,离心 (3 500 r/min) 30 min, 弃上清, 沉淀的菌体用无菌生理盐水洗 3 次, 放置水浴锅中煮沸 (100 °C) 2.5 h。参比细菌浓度比浊管配制成菌浓度为  $50 \times 10^{12}/L$  的菌悬液, 加苯酚使其体积分数为 0.5%, 分装, 4 °C 冷藏, 经菌苗安全性、无菌性实验检测合格后备用。

**1.2.2 家兔 E. Coli J5 免疫血清的制备:** 随机取大耳白家兔 24 只, 随机分为实验组和对照组, 每组 12 只。实验组 12 只家兔分别经耳缘静脉注射 J5 菌苗, 每 3 d 注射 1 次, 共 5 次, 每次剂量依次为 0.1、0.2、0.4、0.6 和 0.8 ml。第 5 次注射后 1 周从心脏取血 40~50 ml, 至无菌塑料袋内, 静置后分离血清, 检测抗体效价, 将效价 1:1 024 的兔血清混合, 4 °C 冷藏备用。对照组 12 只家兔仅注射生理盐水, 其他操作同实验组。

**1.2.3 E. Coli J5 免疫血清抗体效价的检测:** 采用间接血凝法。取新鲜绵羊动脉血, 玻璃珠脱纤维后配成体积分数为 2% 的红细胞浓度, 用等体积 E. Coli J5-LPS (400 mg/L) 致敏 (37 °C 水浴 1 h) 后, 用生理盐水洗 3 次, 再用含体积分数为 0.5% 小牛血清的 PBS 配成 0.5% 的致敏红细胞备用, 所有待测血清经 56 °C, 30 min 灭活备用。每份待测血清经 PBS 倍比稀释 (1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 和 1:1 024) 分别加到 96 孔微量血凝板中, 每孔再加入等量致敏红细胞, 微量振荡 2 min, 置湿盒 (37 °C) 1 h, 观察红细胞凝集结果。

**1.2.4 交叉反应试验:** 采用间接血凝法, 步骤与上相似, 不同之处为: 红细胞致敏分别用 E. Coli J5 400 mg/L, E. Coli O111:B4-LPS 400 mg/L, E. Coli J5 菌苗 ( $50 \times 10^{12}/L$ ) 及生理盐水。J5 免疫血清和非免疫血清分别倍比稀释 1:4~1:1 024。

## 2 结果

血清效价测定及交叉反应试验结果见表 1 和表 2。由表 1 可见, 实验组 12 只 E. Coli J5 免疫血清效价在 1:500 以上 8 只, 其中 1:1 024 有 6 只; 对照组 12 只血清效价均很低。交叉反应结果显示, 由 E. Coli J5 免疫产生的抗血清可与 GNB 内毒素相结合, 且效价较高。

表 1 E. Coli J5 免疫血清效价的动物结果

Table 1 Titer of rabbit immune serum to E. Coli J5 只

| 组别  | 动物数<br>(只) | J5 血清效价 |     |      |      |      |       |       |       |         |   |
|-----|------------|---------|-----|------|------|------|-------|-------|-------|---------|---|
|     |            | 1:4     | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 | 1:512 | 1:1 024 |   |
| 对照组 | 12         | 12      | 0   | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0       | 0 |
| 实验组 | 12         | 0       | 1   | 1    | 0    | 0    | 0     | 2     | 2     | 6       |   |

表 2 E. Coli J5 免疫血清交叉反应结果

Table 2 Immune serum cross reaction of E. Coli J5

| 组别         | E. Coli J5-LPS | E. Coli O111:B4-LPS | E. Coli J5 菌苗 | 生理盐水 |
|------------|----------------|---------------------|---------------|------|
| 实验组抗 J5 血清 | 1:1 024        | 1:1 024             | 1:1 024       | 1:4  |
| 对照组非免疫血清   | 1:4            | 1:4                 | 1:4           | 1:4  |

## 3 讨论

抗生素的使用使细菌、病毒在被杀死的同时在体内释放出大量的内毒素, 只有采取有效措施抑制内毒素的产生, 控制其向血中释放的速度, 才能有效地治愈各种内毒素引起的败血症或毒血症<sup>[6]</sup>。LPS 由 O 特异侧链、核心寡糖及类脂 A 三部分构成。普通的 GNB 及其所包含的内毒素由于有血清型特异性抗原 O 侧链, 免疫所产生的抗体具有血清型特异性, 缺乏广泛的交叉反应和保护作用。

已有研究结果发现, 某些 GNB 的粗糙变异株 (roughmutant) 缺少尿苷二磷酸半乳糖表位酶 (UDP-Gal4-epimerase), 在细菌构筑 LPS 的过程中不能将外源性半乳糖掺入 LPS, 从而不能合成完整的 LPS, 使 LPS 的多糖链全部或部分缺失, 使得 LPS 的稳定区 CGL 暴露。采用粗糙变异株免疫产生的抗体能与绝大多数 GNB 及其内毒素产生交叉结合反应, 并具有保护宿主免受毒害的作用<sup>[5,7]</sup>。J5 株是 E. Coli O111:B4 的粗糙变异株, 属 Rc 化学型。本研究结果证实, 由 E. Coli O111:B4 的粗糙变异株 J5 免疫产生的抗血清具有与多种 GNB 内毒素相结合的反应, 且效价较高。Ziegler<sup>[4]</sup>应用大肠杆菌 O111:B4 的变异菌株 Rc(J5) 制备了抗血清, 在临床 136 例脓毒症患者中进行了随机、双盲、安慰剂对照实验研究, 结果发现, 在严重脓毒症和 GNB 菌血症患者中, 安慰剂对照组病死率为 39%, J5 抗血清组为 22%,  $P=0.011$ ; 在脓毒症休克而需要应用血管加压药 6 h 以上的患者中, 对照组病死率为 77%, 抗血清组为 44%,  $P=0.003$ 。全竹富等<sup>[5]</sup>研究显示, 抗内毒素核心糖脂抗体 (抗 J5 血清) 能够明显改善腹腔感染伴多器官功能障碍综合征 (MODS) 的代谢紊乱, 对高分解代谢具有显著的调理作用。

总之, 大肠杆菌 J5 株制备的抗内毒素核心糖脂抗体能有效结合内毒素, 是治疗内毒素血症一条很有希望的途径。通过本研究证实, 自制的 E. Coli J5 菌苗免疫家兔能产生高效价抗体, 并为免疫治疗 GNB 菌血症及其内毒素血症提供可能。

## 参考文献:

- 李春盛. 关于脓毒症的几个问题[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(6): 323-328.
- 陆付耳, 李鸣真, 叶望云. 论内毒素血症的治疗对策[J]. 中国危重

病急救医学, 2000, 12(10): 579-580.

- 3 Dunn D L, Ferguson R M. Immunotherapy of Gram - negative bacterial sepsis; enhanced survival in guinea pig model by use of rabbit antiserum to Escherichia Coli J5 [J]. Surgery, 1982, 92: 212-219.
- 4 Ziegler E J. Treatment of Gram - negative bacteremia and shock with human antiserum to a mutant Escherichia Coli [J]. N Engl J Med, 1982, 307: 1225-1230.
- 5 全竹富, 臧静, 刘放南, 等. 抗 J5 血清对腹腔感染伴多器官功能障

碍的代谢调理 [J]. 肠外与肠内营养, 1998, 10(1): 153-158.

- 6 王今达, 雪琳. 细菌、内毒素、炎性介质并治——治疗重症脓毒症的新对策 [J]. 中国危重病急救医学, 1998, 10(6): 323-325.
- 7 Bhattacharjee A K, Cross A S. Vaccines and antibodies in the prevention and treatment of sepsis [J]. Infect Dis Clin North Am, 1999, 13(2): 355-369.

(收稿日期: 2004-04-08 修回日期: 2004-05-19)

(本文编辑: 李银平)

## • 研究报告 •

# 降钙素原对老年患者脓毒症的诊断价值

张莉 王彦欧 王东浩

**【关键词】** 全身炎症反应综合征; 脓毒症; 降钙素原; 白细胞计数; 中性粒细胞分类

**中图分类号:** R631 **文献标识码:** B **文章编号:** 1003-0603(2004)06-0360-01

区分感染与非感染因素引起的全身炎症反应综合征(SIRS)、脓毒症及脓毒性休克对早期诊断、判断患者预后及提高患者生存率非常重要。脓毒症与非感染性 SIRS 的临床表现相似, 但治疗与预后不同。目前常用的脓毒症临床和实验室诊断指标特异性有限, 降钙素原(PCT)作为一种全身细菌感染的新指标, 与其他临床传统炎症指标相比, 显示出较高的特异性与敏感性。本实验的目的是了解 PCT 对脓毒症的早期诊断价值。

### 1 资料与方法

**1.1 临床资料:** 2001 年 1 月—2003 年 3 月在本院住院发生 SIRS 的老年患者 42 例, SIRS 及脓毒症诊断参考 1991 年美国胸科医师学会和美国危重病学会(ACCP/SCCM)提出的标准。脓毒症患者 23 例, 其中男 15 例, 女 8 例; 平均年龄(61±15)岁。肺感染 10 例, 其中 1 例为真菌感染; 感染性休克 7 例; 重症胰腺炎合并感染 1 例; 泌尿系感染 2 例; 消化道感染 3 例。非感染性 SIRS 患者 19 例, 男 13 例, 女 6 例, 平均年龄(63±13)岁。其中脑梗死 4 例, 脑出血 4 例, 肺梗塞 2 例, 心源性休克 7 例, 糖尿病酮症酸中毒 2 例。全部患者于入院后即行常规血、尿、粪检查及胸部 X 线检查, 对疑有感染者进一步行血培养或分泌物培养或涂片, 同时进一步检查, 明确诊断。

作者单位: 300192 天津市第一中心医院干部病房

作者简介: 张莉(1967-), 女(汉族), 天津市人, 主治医师。

**表 1 两组患者体温、PCT 评分及细胞学分析比较( $\bar{x} \pm s$ )**

| 组别          | 例数(例) | PCT 评分(分)  | 白细胞( $\times 10^9/L$ ) | 中性粒细胞分类   | 体温( $^{\circ}C$ ) |
|-------------|-------|------------|------------------------|-----------|-------------------|
| 脓毒症组        | 23    | 2.81±1.21* | 12.12±5.16             | 0.76±0.11 | 37.76±1.51        |
| 非感染性 SIRS 组 | 19    | 1.52±0.81  | 12.10±4.96             | 0.81±0.09 | 37.82±1.42        |

注: 与非感染性 SIRS 组比较: \* $P < 0.05$

**1.2 方法:** PCT 用 Brahms 快速半定量法(PCT-Q)测定, 其血清浓度由高到低分别评为 1、2、3 和 4 分。白细胞计数及中性粒细胞分类由自动分析仪检测。

**1.3 统计学方法:** 检测结果用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**1.4 结果:** 脓毒症组 PCT 评分与非感染性 SIRS 组 PCT 评分存在显著差异; 白细胞计数、中性粒细胞分类两组间无显著性差异。见表 1。

### 2 讨论

PCT 在血清中的半衰期较长, 在全身细菌感染后 4 h 即可检测到, 6 h 急剧上升, 并在 6~24 h 内维持该水平。血浆中 PCT 浓度升高不仅可以判断是否存在全身细菌感染, 而且可以反映感染的严重程度<sup>(1)</sup>。Wanner 等<sup>(2)</sup>对创伤患者血 PCT 水平与多器官衰竭(MOF)的关系进行研究, 发生 MOF 的患者较未发生者血 PCT 水平明显增高, 连续监测可作为判断预后的指标。对于发热患者能否尽快合理使用抗生素治疗在于明确发热的病原学诊断, 血 PCT 水平测定可提示细菌感染。同时, 本结果表明, PCT 与传统的炎症指标如白细胞计数、中性粒细胞分类、体温等相比, 对脓毒症的诊断价值更高<sup>(1,3,4)</sup>; 且 PCT-Q 法简单易

行, 敏感性与特异性均高。

### 参考文献:

- 1 Claeys R, Vinken S, Spapen H. Plasma procalcitonin and C-reactive protein in acute septic shock; clinical and biological correlate [J]. Crit Care Med, 2002, 30(4): 757-762.
- 2 Wanner G A, Keel M, Steckholzer U, et al. Relationship between procalcitonin plasma levels and severity of injury, sepsis, organ failure, and mortality in injured patients [J]. Crit Care Med, 2000, 28(4): 950-957.
- 3 Deleaux I, Andre M, Colobier M, et al. Can procalcitonin measurement help in differentiating between bacterial infection and other kinds of inflammatory processes [J]. Ann Rheum Dis, 2003, 62(4): 337-340.
- 4 Oliver S, Hartmut H, Michael M, et al. Discrimination of sepsis and systemic-inflammatory response Syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6 [J]. Crit Care Med, 2000, 28(8): 2793-2798.

(收稿日期: 2004-04-09)

修回日期: 2004-04-21)

(本文编辑: 李银平)