

家兔血浆内毒素的鲎试验定量测定法及其应用

陈有为 王宝恩 赵淑颖

(北京友谊医院)

摘要 本文介绍采用过氯酸法处理血浆，应用国产鲎试剂和基质定量检测动物血中微量内毒素的鲎试验合成基质偶氮显色法。该法变异系数为3.8—4.6%，回收率为84—112%，对革兰氏阴性细菌具有特异性。应用该法对实验性大肠杆菌败血症家兔及实验性肺炎球菌感染家兔的血浆内毒素定量测定结果表明，均有不同程度的内毒素血症出现。

鲎在动物分类学上属于节肢动物门 (Anthropoda)、有螯肢亚门 (Chelicerata)、肢口纲 (Merostomata)、剑尾目 (Xiphosura)、鲎科 (Tatyleidae), 全世界现有三属五种。1964年, Levin 等发现革兰氏阴性细菌内毒素可以使美洲鲎 (*Limulus polyphemus*) 的血球抽出液发生凝固, 进而首创了一种简便的鲎血细胞裂解物试验 (Limulus lysate test, 简称鲎试验) 方法, 用以测定血液中的内毒素。此后鲎试验作为一种内毒素的检测方法, 逐步得到推广和应用。1978年 Woods Hole 海洋生物研究所举办的鲎在生物医学上的应用讨论会上, 对鲎试验的价值给予了充分肯定。

用鲎试验检测内毒素的方法甚多, 但均为定性(或半定量)试验。随着对内毒素血症研究的逐步深入, 需要一种能够定量检测动物血中微量内毒素的方法。本研究采用日本 Obayashi 等发明的过氯酸法^[4]处理血浆, 应用国产鲎血变形细胞裂解物 (Tachypleus Amebocyte Lysate, 简称鲎试剂) 和基质, 建立了鲎试验合成基质偶氮显色法用以定量测定家兔 (*Oryctolagus cuniculus domesticus*) 的血浆内毒素浓度; 并应用该法对实验性大肠杆菌败血症家兔及实验性肺炎球菌感染家兔的内毒素血症进行了初步的研究。

测定原理

鲎变形细胞裂解物中含有能被微量内毒素激活的凝固系统, 主要有C因子、B因子、凝固酶原 (proclotting enzyme) 和凝固蛋白原。C因子被内毒素激活后即可激活B因子, 活化B因子又激活凝固酶原变成凝固酶 (clotting enzyme), 后者具有酰胺酶专一活性, 可特异性水解人工合成的三肽显色基质 (N-叔丁氧羰酰-L-亮氨酸-甘氨酸-L-精氨酸-对硝基苯胺) 中所含的精氨酸肽链, 使对硝基苯胺释放而显示黄色。游离的对硝基苯胺经偶氮化作用, 最终形成偶氮蓝复合物(呈玫瑰红色)。通过对标本偶氮显色的光电比色即可间接定量测定标本的内毒素浓度。

材料和方法

(一) 血浆内毒素的定量测定法

1. 试剂 (1) 0.32mol/L 过氯酸与0.18 mol/L 氢氧化钠溶液, 用灭菌注射用水配制并经121℃ 高压消毒90分钟。(2) 鲎试剂 批号851012, 使用前每安瓿加0.4 mol/L Tris-HCl·Mg²⁺ (pH 8.0) 缓冲液0.95毫升溶解。(3) 合成基质 (Boc-Leu-Gly-Arg-PNA)。试剂(2)、(3)由上海市医学检验中心提供。(4) 精制大肠杆菌内毒素 (*Escherichia coli* O₁₅₇B₄) 国家工作标准品, 卫生部药品生物制品检定所产品。

2. 器材 所有玻璃器皿和金属制品均经250℃ 以上干烤3小时以去热原。

3. 方法 操作在冰水浴中进行。取无菌采血的肝素抗凝血浆(空白对照管取灭菌注射用水) 100微升加0.32 mol/L 过氯酸200微升, 混匀置37℃ 水浴20分钟。在冰水浴中冷却数秒后, 3,000转/分离心15分钟, 取上清液75微升加等量的0.18 mol/L 氢氧化钠溶液混匀。取浓度为0.5单位/毫升的内毒素稀释液150微升加入另外管中作为标准液管。于上述各管中再加入75微升鲎试剂, 置37℃ 20分钟, 在冰水浴中加入合成基质50微升进行显色反应(37℃, 8分钟), 随即加入0.032% 亚硝酸钠/0.48 mol/L HCl 溶液500微升, 用力搅拌并从冰水浴中移出, 再顺序加入0.5% 氨基磺酸铵及0.05% N-甲基萘基盐酸二氨基乙 烯各500微升进行偶氮反应。混合物室温放置15分钟, 以721分光光度计波长545毫微米 (nm) 测其光密度值。标准曲线的制订采用不同稀释度的大肠杆菌内毒素标准数次测定而成(见图1)。血浆标本内毒素浓度 (C; 单位/毫升) 按下式计算:

$$C = \text{内毒素标准液浓度} \times \frac{\Delta E (\text{标本})}{\Delta E (\text{标准液})} \times 6$$

ΔE (标本): OD₅₄₅ (标本) - OD₅₄₅ (空白)

ΔE (标准液): OD₅₄₅ (标准液) - OD₅₄₅ (空白)

(二) 动物实验方法

1. 动物的选择与饲养 选用纯种健康新西

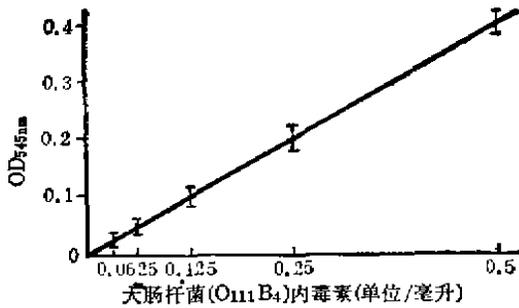


图1 鲎试验合成基质偶氮显色法标准曲线
OD 545 nm: 721 分光光度计波长 545 毫微米

兰白兔 (*New Zealand White*) 23 只, 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所提供。体重 1.95—2.6 千克, ♀♂ 不限。实验前连续测量肛温两次, 取正常者用于实验。实验期间, 动物分笼饲养在室温为 16—21℃ 环境下, 自然光线, 颗粒饲料, 随意摄食、饮水。

2. 取血及血浆制备 未麻醉的清醒家兔仰卧位, 皮肤常规消毒后, 用无热原针管、针头心脏穿刺取血数毫升加到肝素抗凝管 (20 单位/毫升血)。管口过火焰后即加盖混匀置冰水浴中。4℃ 500 转/分离心 10 分钟吸出血浆, 保存于 -25℃ 待测。

结果与讨论

(一) 关于血浆内毒素的检测 内毒素是革兰氏阴性细菌胞壁中的类脂多糖体成分, 位于胞壁外膜的最外层, 结构复杂, 有多种生物学活性, 能引起严重、广泛而复杂的病理变化。以往多用家兔热原试验和凝胶法鲎试验来检测内毒素, 但均为定性的方法, 且易受主观判断等因素的影响。直至 1978 年日本学者 Iwanaga 等基于鲎试验凝胶的机理, 首先采用合成显色基质来定量测定内毒素获得成功。这种定量法比传统的凝胶法更为敏感, 在特异性、灵敏度及精确度等方面均被认为是最为优异的方法。

血浆中存在多种干扰因子, 抗凝血酶、 α_1 -抗胰蛋白酶、 α_2 -巨球蛋白等丝氨酸酯酶抑制剂均可抑制凝固酶的活性, 易产生假阴性结果; 纤维蛋白溶酶、凝血酶、尿激酶等内源性酰胺酶可

裂解含精氨酸-对硝基苯胺基团的物质而产生假阳性结果。因此, 将基质显色法应用于定量检测血浆内毒素时, 需进行必要的血浆预处理, 以预先除去非特异的酰胺酶活性以及多种鲎试验反应的抑制因子。但若采用稀释加热法处理血浆, 回收率较低, 国外报道只有 40% 左右, 国内也不过 50—60%。为此, 我们采用了 Obayashi 等报道的一种新的血浆处理方法——过氯酸法, 应用该法可以完全除去血浆中的多种反应干扰因子, 使回收率明显提高, 可达 100% 左右。同时对应用国产试剂的原法做了多项改进, 使灵敏度比改进前提高 4 倍。本组内及组间变异系数分别为 3.8% 和 4.6%。

目前, 采用过氯酸处理血浆的基质显色法除了用于检测人血标本内毒素之外, 还用于牛、马、猪、鸡等家畜家禽^[3], 以及犬、大鼠等实验动物^[2]的血浆内毒素定量测定。对于家兔血标本, 五十岚英夫等认为, 由于用与处理人血浆同样的过氯酸法对日本白兔血浆进行预处理后回收不佳, 变异较大, 因而提出兔血浆过氯酸预处理的条件有别于人及其他动物^[1]。而我们应用鲎试验定量法对纯种新西兰白兔血浆标本所做的内毒素回收试验, 回收率为 84—112%, 与人血浆内毒素回收相差不多 (见图 2)。可认为, 处理人血浆标本的过氯酸法也可应用于家兔及其他一些动物。

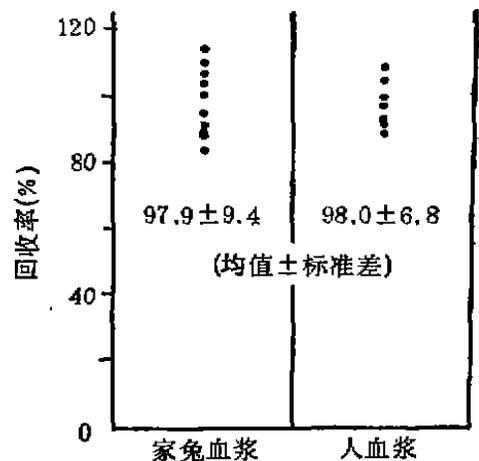


图2 内毒素回收试验

(二) 实验性细菌感染家兔的内毒素血症

23 只健康家兔实验前心血标本血浆内毒素均 <0.075 单位/毫升。以血浆内毒素 >0.075 单位/毫升为内毒素血症阳性。

1. 实验性大肠杆菌败血症家兔的内毒素血症 将大肠杆菌 ($O_{111}B_4$) 纯培养液按 10 亿个/千克体重剂量于 4 只家兔耳缘静脉注射造成败血症, 血培养大肠杆菌均为阳性。实验兔注菌后在较短的时间内即有内毒素血症的出现, 且在血中呈现有规律的波峰样变化 (见图 3)。注射菌后 4 小时血浆内毒素浓度达高峰, 与实验前比较有显著差异 ($P < 0.05$), 至 8 小时仍未恢复到实验前的正常水平。结果表明, 革兰氏阴性杆菌感染多伴有内毒素血症的出现。一般认为, 内毒素血症的形成早于菌血症和败血症, 也可独立存在, 因而鲎试验已广泛用于革兰氏阴性细菌感染的快速诊断。

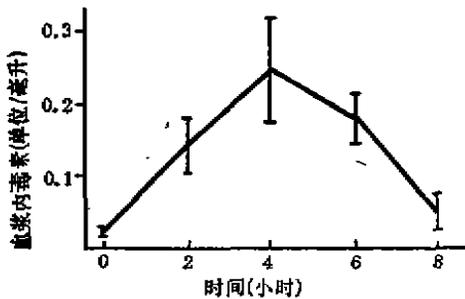


图 3 实验性大肠杆菌败血症家兔血浆内毒素的变化

2. 实验性肺炎球菌感染家兔的内毒素血症用革兰氏染色阳性的肺炎球菌 (*Pneumococci*) 1 型纯培养菌液 0.2 毫升 (含菌 3000 万个) 注射于 15 只实验兔背部引起感染。注菌后 6—8 小时家兔体温开始升高, 24 小时达高峰, 肛温可达 $40.5-41.7^{\circ}\text{C}$ 一般可持续 2 天以上。注射局部皮肤微红, 病中少食或拒食, 蹒跚少动, 血培养肺炎球菌阳性者占 $2/3$, 多在一周内死亡。15 只实验兔于感染后 48 小时内每 12 小时取血一次连续四次, 血浆内毒素浓度均 <0.075 单位/毫升者有 6 只, 血浆内毒素 >0.075 单位/毫升者有 9 只 (见图 4)。其内毒素血症阳性率为

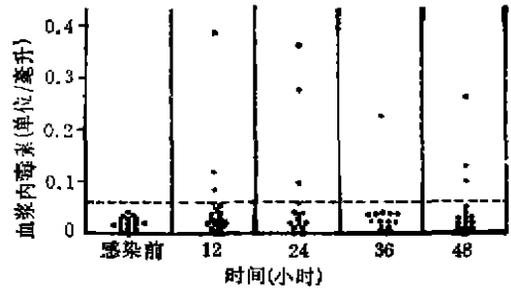


图 4 实验性肺炎球菌感染家兔的内毒素血症

60%, 提示革兰氏阳性球菌感染也可以出现内毒素血症。

机体的内毒素血症可分为两大类。革兰氏阴性细菌感染, 热原注射等可导致外源性内毒素血症, 而内源性内毒素血症则来源于机体自身的肠道菌群代谢。正常情况下, 胃肠道细菌代谢释放的内毒素可以被肠壁吸收进入门静脉。在某种病理情况下, 内毒素可以从胃肠道释放进入门脉及血循环中形成内毒素血症, 甚至在无菌血症时, 亦能引起病理改变。我们用鲎试验定量法对大肠杆菌和肺炎球菌纯培养菌液的测定结果显示, 大肠杆菌使该法产生显色反应所需的细菌浓度仅为肺炎球菌的 $1/150$ 万左右, 说明鲎试验定量法对革兰氏阴性杆菌具有良好的特异性。因此, 可以认为实验性肺炎球菌感染家兔的内毒素血症属于内源性的内毒素血症, 是由肺炎球菌感染所引起的肠道内毒素进入血液循环所造成的。

参 考 文 献

- [1] 五十嵐英夫他 1984 合成発色基質を用いたリムルステストによる黄色ブドウ球菌 Toxic-shock toxin 投与ウサギの血中エンドトキソンの挙動について 日本細菌学雑誌 39(3): 313.
- [2] 中尾昭公他 1984 過塩素酸処理と合成基質法による実験動物の血中エンドトキソンの定量 日本消化器病学会雑誌 81: 2503.
- [3] Hakogi E. et al. 1984 Perchloric acid treatment and use of chromogenic substrate in the limulus test: application to veterinary diagnosis. *Ver. Microbiol.* 10: 33-42.
- [4] Ohayashi T. et al. 1982 New limulus amoebocyte lysate test for endotoxaemia. *Lancet* 1(8266): 289.