

广东省预防医学会微生物学、免疫学会

第四届学术会议论文汇编

1993.11 广州

中國國際科學交流年會暨中國科學院學部

國際科學年會歡迎文士題

目 录

综 述

干扰素(IFNs)与免疫调变	梁希若 (1)
碱性成纤维细胞生长因子	林 剑等(6)
肠道致病菌分子生物学研究进展	莫美仪 (10)
厌氧菌检查及其临床应用	陈菊香 (14)

微生物学

1991—1992 年广州市 54 个医疗单位消毒监测	李锦光等(17)
庄臣敌灭菌灯对微生物杀灭效果的观察	寒 松 (19)
金星消毒液的消毒灭菌试验报告	王鉴雄 (21)
灭菌灵对几种微生物的杀灭效果观察	林立辉 (23)
广州地区急性弛缓麻痹患者肠道病毒感染的研究	李昌遵等(26)
登革病毒 1 型和 2 型国内分离株 NS1 基因的克隆和鉴定	方美玉等(28)
登革Ⅲ型病毒抗原分析研究	陈煥辉等(30)
丙型肝炎病毒基因高变区(E ₁ 、E ₂ /NS ₁)的分子克隆及基因型鉴定	李 刚等(34)
抗鹭山病毒单克隆抗体的研制及应用	田小东等(38)
广州口岸艾滋病监测报告	沈镜生等(40)
乳糖发酵奈氏菌、脑膜炎奈氏菌人群带菌调查以及乳糖发酵奈氏菌筛选的研究	张巧云等(44)
七年性病高危人群中淋病奈瑟氏菌实验室结果分析	单桂林等(46)
紫色色杆菌引起脓毒败血症感染性休克菌株鉴定	刘 妮等(48)
118 例不动杆菌结果分析	李红玉等(49)
中国大陆首次发现克雷菲尔德沙门氏菌	潘爱琼等(52)
1986—1991 年广州地区食品从业人员沙门氏菌带菌情况调查	黄美婵等(53)
白矾对副溶血性弧菌的杀灭效果	易春旭等(57)
东莞市细菌性食物中毒情况分析(1990~1991 年)	袁达康等(59)
厌氧菌菌种保存方法的探讨	林君仪等(61)
38 例慢性化脓性中耳炎厌氧菌分析	朱 道等(63)
真菌性腹泻三例报告	周梓文等(65)
广东省饮料真菌污染及菌相分析	黄吉城等(66)
广东省部分地区化妆品卫生质量调查	方丹云等(68)

免疫学

大鼠海马 ACTH 受体分布特性及海马 ACTH 损毁对胸腺细胞 ACTH 受体的影响	李康生等(72)
热敏免疫脂质体的合成及其在体外对人乳癌细胞攻击的实验研究	林 剑等(76)
人血清中 HLA-A、B 抗原的分型	蔡征涛等(83)
广东汉族人群 HLA-DQA ₁ 基因的多态性	陈盛强等(84)
促甲状腺激素释放激素对小鼠红细胞免疫功能的影响	汤 斌等(86)
大肠杆菌谷氨酰胺合成酶基因上游增强子样序列对不同类型启动子作用的研究	关国晟等(89)

PCR 扩增 CD23 全基因	黄树其等 (91)
几种丝裂原对白细胞介素-2、干扰素- γ 和肿瘤坏死因子的诱生作用...	李叔田等 (93)
白细胞介素 2(IL-2) 依赖细胞系 CTLL 的冷冻保存	杨 英等 (97)
白细胞介素-2 检测方法的研究	杨 英等 (101)
天然人白细胞介素-2 的诱生与纯化	马桂璋等 (106)
重组人 α_2a 干扰素对肿瘤病人的 NK 细胞的增强作用	李 剑等 (112)
绞股蓝总皂甙对小鼠产生白细胞介素 2(IL-2) 的增强效应	刘倩娴等 (115)
EBV 特异转移因子对鼻咽癌患者外周血 T 细胞亚群的影响	陈德元等 (119)
654-2 抗过敏性休克作用的研究	向军俭等 (122)
双轻链病一例报告	寒 松等 (123)
检测技术	
采用 PCR-RFLP 技术进行 HLA-DQA1 基因分型	陈盛强等 (125)
应用套式聚合酶链反应检测单项抗-HBc 阳性血清中 HBVDNA	唐漾波等 (127)
套式聚合酶链反应检测乙肝疫苗接种后无表面抗体反应者血清的 HBV DNA	魏绍静等 (129)
100 例 HBV-DNA PCR 检测报告	寒 松等 (131)
对比 ELISA 法检测 HBsAg 和 HBeAg 的“一步法”和“二步法”	郑有为等 (132)
AFP 四种方法检测结果的比较	张静然等 (134)
10 例高滴度乙肝病毒核心抗体不同稀释度的检测结果	张静然等 (135)
3188 例献血员与血制品抗-HCV 调查报告	寒 松等 (136)
输血后丙型肝炎 112 例分析	寒 松等 (140)
血清中 HBcAg 与乙肝各项指标的探讨	黄福浩等 (143)
328 例丙型肝炎抗体阳性初步分析	郭秀筠等 (145)
甲、乙、丙、丁、戊病毒肝炎血清标志物检测与原发性肝癌相关性的研究...	柳恩侯等 (148)
HIV 感染者的血清学检测分析	梁丽芬等 (151)
在麻疹血凝抑制试验和被动血凝试验中几种血清处理方法的比较	杨卫路 (153)
为凝固酶试验推荐一种廉价方便实用的血浆	曾洁涛 (156)
大肠菌群纸片法在食具卫生监测中的应用效果观察	袁达康 (157)
国家标准方法与美国 FDA 方法检验大肠菌群的比较	曾洁涛 (159)
酶联免疫吸附法(ELISA)测定大肠杆菌 STa 毒素	陈云战 (161)
一起伤寒暴发流行的血清肥达氏反应结果分析	莫美仪等 (165)
从婚宴发生食物中毒的检材中检出一株鼠伤寒沙门氏菌的报告	戴昌芳等 (168)
霍乱单克隆抗体重氨基乳胶快速诊断霍乱弧菌实验研究及现场应用	周进平等 (170)
介绍用嵌合法抗体血凝技术检查 HBsAg	杜 江等 (174)
反向乳胶凝集试验(RPLA)检测 HBsAg	张新群等 (177)
三种检测人血清中 C_3 方法的比较研究	向军俭等 (178)
药瘾者血清六项检验结果分析	郭秀筠等 (182)
添加剂富马酸单甲酯单钠毒性研究	梁雪梅 (184)
饮用天然矿泉水中出现沉淀物的起因分析	黄吉城 (187)

干扰素 (IFNs) 与免疫调变

梁希若

广州医学院 广州·510182

IFNs 是一类细胞基因自稳反应的产物,除抗病毒、抗肿瘤的活性外,最令人感兴趣的是:IFNs 的免疫调变功能。事实上 IFNs 的抗病毒、抗肿瘤活性也与其能提高免疫功能有一定关系。过去人们比较强调 IFN γ 的免疫调变作用,这是因为 IFN γ 是免疫应答过程中活化 T 细胞产生的细胞因子,是免疫系统中显而易见的免疫分子,IFN α/β 则似乎没有这些关系。然而,众所周知 IFN α/β 是在急性传染早期产生的细胞因子,可能参与调节该传染所引起的机体免疫应答,最近 Virelizler 提出,疏忽 IFN α/β 诱生非特异免疫调节功能,是一种危险的倾向。已证明 IFN α/β 能增强 MHC 抗原(主要是 I 类)表达;激活 M Φ 的细胞毒性和产生多种细胞因子;促进或抑制抗体形成;特别是在增强 NK 活性功能上可能比 IFN γ 更强。因此忽略 IFN α/β 如此重要的效能是不聪明的。

一、IFNs 与主要组织相容复合体 (MHC) 抗原的表达

MHC 是指某一物种某一号染色体上的一群紧密相连的基因群,它们编码的抗原决定着组织相容性,故称 MHC 抗原,它们还控制着免疫细胞间相互作用,调节免疫应答。

不同动物的 MHC 有不同的名称,人的 MHC 为 HLA,小鼠的 MHC 为 H-2。人的 HLA 与小鼠 H-2 相似,所以小鼠已为研究 MHC 的重要模型。小鼠的 H-2 位于第 17 对染色体上,人的 HLA 则在第六对染色体上。

MHC 抗原与免疫功能关系较密切的有 I、II 两类,即:

I 类抗原(在小鼠为 H-2K、H-2D 区,人 HLA-A、B、C 区编码的产物):是一种膜糖蛋白,主要分布在各种组织及有核细胞膜上,以淋巴细胞膜上密度最大,也存在于血清、初乳及尿液等体液中, I 类抗原在移植排斥反应中起重要作用,在免疫应答中制约细胞毒 T 细胞 (T_c 或称 TCL) 即致敏 TCL 必须同时识别自身的 I 类抗原及病毒抗原才能发挥杀伤效应。

II 类抗原(是小鼠 H-2 I 区,人类 HLA-DR、DQ、DP 编码的产物):已证实小鼠的免疫应答基因 (I_r 基因) 就存在于 H-2 内,其产物称为免疫相关抗原 (I_a 抗原)。在人类称 SD 抗原 (DR、DQ 区产物) 及 LD 抗原 (DP 区产物)。近年来的研究亦表明,人类亦存在 I_r 基因,此基因与 HLA 连锁,主要在 D/DR 区。II 类抗原亦是膜糖蛋白,主要分布于 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞和其他抗原递呈细胞(如郎罕氏细胞、树突状细胞),T 细胞的某些亚群及活化 T 细胞上。II 类抗原亦可在一些未知免疫功能的细胞如上皮细胞,内皮细胞及精子细胞上查见,此外在恶性黑色素瘤细胞上亦有发现。II 类抗原与免疫应答及免疫调节有密切的关系,在细胞与细胞间识别及相互作用中至关重要。在 M Φ 向 T 细胞递呈抗原时,必需同时递呈自身 II 类抗原才能为 T 细胞识别,从而活化 T_H,所以它是 T 细胞活化的必需信号。在 T_H 细胞与 T 或 B 细胞相互作用过程中,同样也需要有 II 类抗原存在才能发挥其辅助作用。这就是 I_r 基因介导的遗传制约性。

在免疫应答中, I 类抗原量的变化与免疫调节及应答程度起着关键的作用。

已证实, 自然或重组的 IFN γ 能增强表达和合成人单核细胞 MHC I 类抗原 (HLA-DR)。IFN γ 还能诱导正常的纤维母细胞、心肌细胞、一些来自人癌的组织细胞系及各种起源的肿瘤细胞如神经胶质瘤细胞、黑色素瘤细胞等表达 I 类抗原。在研究 IFN γ 对肿瘤细胞 I 类抗原的影响上, 黑色素瘤研究得较深入。实验表明, IFN γ 似乎只诱导一般性质的人黑色素瘤细胞系及正常不表达 I 类抗原的非恶性黑色素瘤细胞表达 I 类抗原。IFN γ 除诱导表达及脱落 (Shedding) I 类抗原外, 还能明显增加脱落黑色素瘤抗原, 此现象是否就是一种免疫刺激作用? 仍有较大的争论。然而重组人 IFN γ 也可能因诱导表达和脱落 I 类抗原而抵消了 IFN γ 的抗增殖效应。看来, IFN γ 的抗原调节效应和抗增殖效应产生的机制并不相同, 但同时亦有资料表明, 这种在试管中抵消 IFNs 的抗增殖作用, 在体内则受到抑制。

总之, 到目前为止, 由 IFNs 的增强 MHC I 类抗原表达, 刺激免疫反应从而排出肿瘤的证据是不够充分的。但是, 在 ADV-12 转化细胞系统中, 鼠 IFN α/β 通过增强 MHC I 类抗原表达, 明显降低了有免疫能力的宿主发生肿瘤的机会。鼠的重组 IFN γ 可选择性地增强多数组织的 MHC I 类及 I 类抗原, 例如对淋巴造血系统、骨髓的 I、I 类抗原都有极明显的增高, 对非淋巴器官、多数组织内皮细胞 I 类抗原表达增加, 而多数树突状细胞则为 I 类抗原增加。在停用 IFN γ 后, 抗原的表达即回复至基础水平。这表明, IFN γ 可迅速地调节抗原表达上升和下降。有人认为, I 类抗原的可变性是局部免疫的一种调节机制, 这在中枢神经系统中尤为重要。在正常情况下, 中枢神经系统不表达 I 类抗原, 但用人 IFN γ 可诱导人神经胶质细胞表达 I 类抗原, 也可诱导星形细胞表达 I 类抗原, 刺激 T 细胞活化。因此, IFN γ 能介导星形细胞与 T 细胞间免疫特异的相互作用, 从而在脑内引起免疫应答。此过程并不总是有益的, 有时可引起脑内疾病。IFN γ 还可诱导人成神经瘤细胞株表达 HLA-DR、DP 抗原, 但不能诱导出 HLA-DQ 抗原, 在抗原表达的同时可观察到神经纤维样突起的形态学变化, 但继续培养也不能诱导产生神经微丝。另外还发现, IFN γ 的浓度为 50 u/ml 时诱导能力最大 (DR 抗原 84%, DP 抗原 88%); >50 u/ml 时则表现为诱导高度抑制; 1,000 u/ml 时则细胞活性下降, 以上研究说明了两个问题: ① HLA I 类抗原的亚类不同, 表达机制也不一样。最近 Tarammelli 等也发现 IFN γ 诱导黑色素瘤 I 类抗原时 HLA-DQ 比 DR2 较难诱导; ② IFN γ 可通过量的变化来调节 I 类抗原表达, 此认识有利于今后对 IFN γ 临床应用的研究。必须注意到, 不是所有的细胞都能被 IFN γ 诱导出 I 类抗原, 如鼠成神经瘤细胞只被诱导表达 I 类抗原, 又如人 IFN γ 对人羊膜细胞只诱导 I 类抗原和 β 2-微球蛋白。因此, 可以认为 IFN γ 能自主地调节 I 类或 I 类抗原。看来, 靶细胞的不同状态与此效应有密切关系。

已证明, IFN γ 能在培养的胸腺上皮细胞上调变 HLA I 类抗原, 此发现提供了 IFN γ 在体内确实能恒定地参与胸腺上皮细胞上 I 类抗原表达的机制的可能性, 并可能就是以这种潜在的重要功能来教导自我识别。那么引起免疫系统中细胞的相互作用是否亦是 IFN γ 刺激 I 类抗原的主要功能之一? 无疑, 刺激 I 类抗原是 IFN γ 的特异性功能。在多数情况下 IFN α 或 β 只能刺激 I 类抗原, 而不诱导 I 类抗原。事实上, 亦有相反效应的例子, 如鼠 IFN β 可刺激鼠 M Φ 表达 I 类抗原, 又如人 IFN α 在人, 鼠 IFN α/β 在鼠都刺激 I 类抗原产生。另外, 人 IFN α/β 和人 IFN γ 在某些 B 淋巴样细胞及黑色素瘤细胞系中能提高 HLA I 类 mRNAs 的水平, 但 mRNAs 水平的升高并不一定引起相应的 I 类抗原增加, 这表明在翻译

水平上可能有其他调节机制。另外, $\text{IFN}\alpha$ 与 $\text{IFN}\beta$ 协同使用时则既可诱生 MHC I 类抗原也可诱生 II 类抗原。

$\text{IFN}\gamma$ 是 I 类抗原的重要诱导剂, 而 $\text{IFN}\alpha$ 和 β 仅是次要的。另一方面, 三种 IFNs 均可诱导 I 类抗原表达, 不同细胞的敏感性不同, 例如从人胸腺白血病细胞系 Molt 4 分离到高和低二株细胞; 又如鼠 YAC-1 淋巴瘤细胞系有二株 H-2 阴性变种, 不论用鼠 $\text{IFN}\beta$ 或 γ 处理都仍然是 H-2 阴性。有趣的是这些变种对 IFNs 的其他作用如抗病毒和细胞上抑制作用则与野细胞株一样敏感。

此外, 值得一提的是: IFNs 还可影响免疫细胞表面某些受体的表达, 如 $\text{IFN}\gamma$ 可使细胞上的肿瘤坏死因子(TNF)受体数目明显上升, 还可增加外周血单个核细胞上的 IL_2 受体; 鼠的 $\text{IFN}\gamma$ 及 $\text{IFN}\alpha/\beta$ 可增强鼠腹腔 $\text{M}\Phi$ 上的 Fc 受体表达等, 而这些受体都与免疫应答有密切关系。

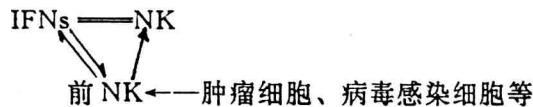
二、 IFNs 与 NK 细胞

NK 细胞是一类具天然杀伤能力的淋巴细胞, 作用不受 MHC 限制。一般认为是免疫监视作用的重要细胞, 能快速溶解某些病毒感染的细胞和原发性的自身肿瘤细胞, 也能清除转移的肿瘤细胞以防止肿瘤扩散。前 NK 细胞在与靶细胞或 IFNs 接触时可被活化, 被活化的 NK 细胞能产生多种细胞因子, 如 IL_1 、 IL_3 、 IFNs 、CSF 等, 还能从正负两方面对 T、B 细胞的功能进行双向调节。

三种 IFNs 均既可激活 NK 细胞, 又可提高 NK 细胞的活性, IFNs 的水平和 NK 活性呈平行关系, 当用抗 IFNs 抗体处理时, 可封闭 IFNs 对 NK 的增强作用。Maeyer 等认为 $\text{IFN}\alpha/\beta$ 的作用可能比 $\text{IFN}\gamma$ 更强。有实验证明: 天然的或重组的 $\text{IFN}\alpha$ 及 $\text{IFN}\gamma$ 均能增强 NK 活性, 且作用差别不大。

IFNs 对 NK 细胞的调节还表现在改变靶细胞对 NK 细胞的反应性上。 IFNs 对正常细胞表现为保护作用, 而对肿瘤细胞或病毒感染细胞则相反, 表现为杀伤作用。所以正常细胞与 NK 接触不诱生 IFNs , 故不活化 NK 细胞, 这可能就是 IFNs 支配 NK 细胞活化的一个重要机制。

NK 可提高 NK 活性, 而活化的 NK 又可产生 $\text{IFN}\gamma$ 。因此, IFNs 与 NK 细胞的调节上可能形成一个正反馈的“放大回路”。



Saksela 等认为 IFNs -NK 系统在功能上是半自动控制的, 对个体生存有重要的意义。NK 细胞的活性随年龄增加而有所变化。有报告, 30 岁以后的人, 其 NK 细胞活性开始缓慢下降。但亦有相反的资料证明, 老年人外周血的 NK 细胞呈现较高的活性, 只是对 PWM 的增殖反应降低。无论如何, 用 IFNs 来增强 NK 细胞功能将是有益的。

三、 IFNs 巨噬细胞 ($\text{M}\Phi$)

$\text{M}\Phi$ 在免疫调节中起着极其重要的作用。 $\text{M}\Phi$ 的主要功能表现为: ? 递呈抗原, $\text{M}\Phi$ 以其自身的表面 MHC I 类抗原与已加工处理的外来抗原结合在细胞膜递呈给 TH; ! 破坏肿瘤细胞及处理衰老损伤细胞, 并吞噬病原体, $\text{M}\Phi$ 吞噬作用后, 可以产生 70 多种介质, 主要杀菌或溶瘤的介质有: 溶细胞蛋白酶 (CP)、 H_2O_2 和反应性氧中间产物 (ROI) 和肿瘤坏

死因子 (TNF) 等; 分泌多种细胞及炎症调节因子, 如 IL_1 、 IL_3 、 IL_5 、 IL_6 、TNF、 $IFN\alpha/\gamma$ 、PGE 等。其自身功能又受到多种细胞因子网络的影响, 对免疫功能的调节作用, 亦呈双向性

IFNs, 特别是 $IFN\gamma$ 能更有效地激活、增强 $M\Phi$ 的功能。其激活机制可能是 $IFN\gamma$ 首先与 $M\Phi$ 上的 $IFN\gamma$ 受体结合; 其次是诱导胞内 Ca^{++} 水平升高; 然后增强胞内蛋白激酶 C (PKC) 的活性而使 $M\Phi$ 活化。可以认为 $IFN\gamma$ 是 $M\Phi$ 的启动信号, 重组 $IFN\gamma$ 可刺激人 $M\Phi$ 释放高约 20 倍的 H_2O_2 , 加强了对病原体 (弓形体) 的杀灭。 $IFN\gamma$ 亦能提高肿瘤病人的单核细胞分泌较多的 H_2O_2 。在实验性李司特菌感染鼠的单核细胞内, 内源性产生 $IFN\gamma$ 能活化该动物的 $M\Phi$, 从而增强清除细菌的能力。已证明: 产生 $IFN\gamma$ 、 $M\Phi$ 在体内被激活以及从腹腔清除李司特菌三者之间密切相关, 如中和了 $IFN\gamma$ 则 $M\Phi$ 不能活化, 细菌也就无法清除。这充分说明: $IFN\gamma$ 是体内激活 $M\Phi$ 必不可少的因子。 $IFN\gamma$ 活化的 $M\Phi$ 亦能摧毁 HSV 感染的细胞, 而不损害未感染的细胞, 但此活性可被去甲肾上腺素和肾上腺素所抑制, 这表明通过激素应激反应的机制能降低某些病毒感染细胞的抵抗力。比较重组鼠 $IFN\gamma$ 和鼠自然 $IFN\alpha/\beta$ 表明, $IFN\gamma$ 是强有力的杀肿瘤 $M\Phi$ 的激活剂, 其效能比 $IFN\alpha/\beta$ 高 100~1,000 倍 (通过抗病毒单位测定)。比较重组 $IFN\alpha/\beta$ 和 $IFN\gamma$ 在试管中免疫调变活性表明, 对某些活性 (例如抑制 T 细胞对 PHA 的增殖反应), $IFN\alpha$ 和 β 比较有效, 而另一些 (如刺激 Ig 合成) 则 $IFN\gamma$ 是更有效的调节剂。

四、IFNs 与 T、B 淋巴细胞

T 和 B 细胞是机体主要的免疫活性细胞。T 细胞介导细胞免疫, B 细胞介导体液免疫, 这两种免疫应答都需要单核巨噬细胞系协同完成。T、B 细胞都是不均一的群体, T 细胞的亚群比较复杂, 根据细胞表面的聚类分化抗原 (CD) 结合功能可分为 TH/TD ($CD4+$) 和 Ts/Tc ($CD8+$), 此外还有记忆 T 细胞 (TM)。 $IFN\gamma$ 能使活化的 TH 细胞增殖并增强其活性, 活化的 TH 在 IL_2 、 IL_4 、 IL_5 、(IL_7 ?) 等的作用下分化成效应 T 细胞。IFNs 还可增强特异性 Tc 的细胞毒性, 亦能促进 Tc 的产生。实验证明 $IFN\gamma$ 与淋巴毒素 (LT) 具有明显协同增强溶靶细胞的效应, 而且它们都是由 TH 细胞产生。亦有报告认为, $IFN\alpha$ 可抑制 T 细胞增殖。

IFNs 对 B 细胞抗体形成的影响是最先注意到的免疫调节活性之一。各种天然或重组的 IFNs 在试管中均可刺激 B 细胞合成 IgG 和 IgM, 此作用多数需要有 TH 的存在。三类 IFNs 均能刺激 B 细胞增殖, $IFN\alpha$ 及 γ 还可促进 B 细胞分化。 $IFN\gamma$ 可选择性地促进 LPS 刺激的 B 细胞产生 IgG2a, 而 $IFN\gamma$ 与 IL_2 联用还能诱导 SPA 刺激 B 细胞产生 IgM 和 IgG。另一方面, 少量的 $IFN\gamma$ 即可完全阻断 IL_4 增强 IgE 合成的作用。此外 $IFN\gamma$ 还能抑制活化的 B 细胞及 IgG1 的合成。

IFNs 对 B 细胞形成抗体的影响, 经常出现抑制或增强两种相反的结果。看来, 这主要由实验的条件所决定。

五、IFNs 与 IL_2

IL_2 由 TH 产生, 而 IL_2 又反过来对 TH 反应。 IL_2 是公认的极其重要的免疫增强因子。其活性主要有: (1) 使静止的 T 细胞活化、增殖, 在体内外对 T 细胞均有扩增作用, 可促进 TH、Tc、Ts、TD 的增殖与活性以及再激活已失去活性的 TM; (2) 刺激、促进 B 细胞的增殖、分化; (3) 激活 NK 活性, 诱导 LAK 和 TIL 细胞的扩增能力; (4) 激活 $M\Phi$;

(5) 抗肿瘤作用；(6) 佐剂样作用等。

动物实验表明，IFN γ 在明显增强 TH 细胞活性的同时促进 IL $_2$ 的产生。反过来，用 ConA 处理 IL $_2$ 诱导的胸腺细胞或 SEA 诱导的鼠脾细胞亦可增强 IFN γ -ConA 的合成。在此研究中，IL $_2$ 本身不能诱导 IFN γ ，但在人周围血单个核细胞的实验中，IL $_2$ 自己就能使 IFN γ 的合成显著升高。但后者显然是由于使用了高剂量的 IL $_2$ ，当用较小量的 IL $_2$ 时，培养物中需要有丝裂原 (PHA) 的存在。无论如何，IFN γ 的产生需要有 IL $_2$ 存在，而且呈剂量依赖关系。

IFN α 亦可增强或抑制 IL $_2$ 的活性。三类 IFNs 均可协同 IL $_2$ 增强 NK 活性，IFN α/β 则可抑制 IL $_2$ 对 LAK 细胞的诱导作用，而 IFN γ 则起增强作用。最近有报告 IL $_2$ 可降低 LPS 诱生鼠脾细胞产生 IFN α/β ，而刺激合成 IFN γ 。因此，认为 IL $_2$ 可能是细胞合成 IFN α/β 转到合成 IFN γ 的开关。

以上简单综述了近年来 IFNs 免疫调变作用的研究概况。有关这方面的研究仍在不断地扩大。深入了解 IFNs 的免疫调变性质，将有助于我们在适当的时机应用 IFNs 来提高人体的免疫功能，造福人类。

碱性成纤维细胞生长因子

林剑 许雁 刘春宇

暨南大学生物系遗传工程研究所 广州 510632

成纤维细胞生长因子和其他细胞因子一样,是哺乳动物和人体中一种正常的非常微量的物质。然而其生理功能却非常广泛,在临床上具有重要价值。

早在1940年,Trowell和Hoffman等就在组织提取液中发现一种能促进成纤维细胞生长的物质。直到1974年Gospodarowicz从牛的垂体中纯化出这种物质并命名为成纤维细胞生长因子(Fibroblast Growth Factors, FGF),至此引起人们注意,进行深入研究。FGF依其氨基酸组成,等电点行为分成酸性FGF(aFGF)和碱性FGF(bFGF),1980年Thomas测定了bFGF分子量、等电点,发现其对酸、温度敏感;1987年Gospodarowicz用肝素亲和层析法分离纯化了bFGF;1987年Simposon测定了bFGF氨基酸序列,确定为单肽链,含146个氨基酸;1986年Abraham进行了bFGF的cDNA克隆及表达;1987年Moscatelli对bFGF受体(高亲和性、低亲和性)进行分离、鉴定,并确定了肝素结合位点;1987年Schweigerer发现bFGF无典型氨基端信号肽;1988年Feige报道bFGF受体结合区磷酸化可增强其与受体结合的能力。1985年Esch发现bFGF能诱导毛细血管新生,1988年Cuevas发现其能加速创伤组织修复,并对外周神经的再生有促进作用。1990年Fukushima对bFGF染色体定位为4q25;1991年Ago报道bFGF二级结构为 β 折叠片,无 α -螺旋;1991年Presta发现其活性部位结构为“Asp-Gly-Arg”。美国加州生物技术公司提供的FGF用于第二期临床治疗慢性软组织溃疡。Syner-gen生产的人bFGF治疗静脉曲张,糖尿病的腿和足溃疡已进入第三期临床试用,可见,对FGF的研究的既具有理论价值更具有主要的实际应用意义。

一、一般理化性质

碱性纤维细胞生长因子(bFGF)等电点 $PI=9.6$,肽链长度为155个氨基酸(其中精氨酸11个,赖氨酸14个等),分子量约17—23KD。bFGF对热和酸敏感,56℃,5分钟或酸条件($PH=2.0$)作用2小时可使其失活。整条肽链形成约12个 β -片层结构,但无 α -螺旋结构。肽链中有4个半胱氨酸残基,可形成分子内二硫键,但非活性所必需。肽链功能区可分为受体结合或活性中心,肝素结合位点及铜离子结合点等,这些功能区对bFGF的稳定或活性表现具有影响,但其结构与生物学功能间的联系尚不十分清楚。

不同的脊椎动物(哺乳类、鸟类、两栖类、鱼类)的FGFS具有高的种间同源性和进化上的保守性。人与牛的bFGF只有2个氨基酸差别。

二、分布与生物合成与生物合成

FGFS不存在或以极低浓度存在于血清和体液中。脑和神经组织尤其是脑下垂体中含量最高。另外,肾脏、卵巢、胎盘、肝脏、骨骼肌、睾丸、胸腺、心肌、骨细胞、血管内皮细胞、角膜内皮细胞、晶状体上皮细胞、成纤维细胞、肾上腺皮质、粒细胞和巨噬细胞等正常组织细胞以及一些肿瘤组织中都可以分离到FGFS。

很多种类的细胞可以合成自身的FGFS,用于刺激自身细胞的增殖。这些细胞包括:成

纤维细胞、血管和毛细血管内皮细胞、平滑肌细胞、颗粒细胞、肾上腺皮质细胞、星形细胞等。

三、作用机制

很多类型的细胞可以对FGFs产生应答反应,这种应答为非特异性的。bFGF的应答能力比aFGF强10—100倍。应答反应包括以下几种:细胞骨架的重排使细胞形态发生可逆改变;刺激细胞内的运输系统,使多核糖体形成;RNA分化;蛋白质合成;抑制蛋白质的降解。bFGF也可以诱导细胞分裂所需的蛋白质在细胞间通过。

能对FGFs发生应答反应的细胞,其表面存在着FGF受体,受体是一单链多肽,分子量依细胞的种类不同在110KDa—150KDa之间,受体数目为2000—8000个/细胞。bFGF与受体的亲和力大于aFGF。细胞受体结合FGF后,将产生的信号通过不同的途径传递到细胞核中,诱导基因发生作用。

四、生物效应

1、创伤愈合、软硬组织的修复

当组织受创伤后,周围的巨噬细胞和受损伤细胞释放bFGF,bFGF可刺激细胞释放胶原酶、血纤维蛋白溶酶激活因子等进入创伤部位,合成新的细胞间质蛋白,它能促进所有与创伤有关的细胞迅速增殖,所以能促进肉芽组织形成,还能促进黑色素细胞和高蛋白细胞的增殖,并对褥疮、烧伤、烧伤后血管阻塞以及放疗、化疗后形成的软组织溃疡均有较好的疗效,据报导,它对骨折的修复有较好的疗效,因为它能促进骨细胞的生长,亦有报导,大鼠脑损伤后一小时内,伤口腔内FGF比周围脑组织高13倍。FGF还能促进胶质细胞增生,防止神经元继发性死亡,促进轴突和血管新生,我们多例的褥疮治疗也说明bFGF对软组织的修复有显著的作用。

2、促进血管新生

血管新生是一复杂的过程,包括毛细胞血管基底膜降解,内皮细胞迁移增生、胶原蛋白的合成以及小血管腔的形成等,现已证明,bFGF对以上过程都有促进作用,此外,bFGF对许多正常组织如鸡胚绒毛尿囊、视网膜、黄体、肾上腺以及脏的血管新生都有很强的促进作用,局部缺血损伤,都可将局部的FGFs激活,诱发新的血管形成。

3、促进组织、肢体的再生

家兔角膜上皮剥离,造成角膜损伤,用bFGF治疗,15—20天可以完全再生,实验又证明,晶体再生必须依赖视网膜或垂体的存在,说明bFGF是晶体上皮细胞和虹膜细胞强力分裂源。

bFGF能刺激哺乳动物外周神经的再生,实验显示,将bFGF注入一段有8mm断裂距离的小鼠坐骨神经残体内,4周后,可见到坐骨神经的再生,断裂处形成轴突桥,将残体相接,并具髓鞘,辣根过氧化物酶可经轴突桥输送到脊髓处,说明再生组织至少已恢复了部分功能。

4、神经营养作用

bFGF象神经生长因子(NGF)一样对新生大鼠许多脑区的神经元有维持生存和促进生长的作用,这些脑区包括:海马、嗅脑、额顶、枕叶的皮层;纹状体、隔区和丘脑,实验发现,bFGF不仅对肝素的较强的亲和力,而且对肝素硫酸盐糖蛋白(HSP)亦有较强的亲和力,而神经组织具有丰富的HSP,提示bFGF对神经系统有特殊影响。

bFGF 是胶质细胞如轴突神经胶质细胞、星形胶质细胞和施旺细胞的分裂原,它还能刺激星形胶质细胞的迁移以及星形神经胶质细胞释放血纤维蛋白溶酶原激活因子,也能调节中间丝状蛋白 GFAP (胶质纤维酸性蛋白),谷氨酰胺合成酶及 S100 蛋白表达,这些物质在特殊的星形细胞分化过程中都能观察到。bFGF 能刺激成神经细胞的增殖,延长培养的各种中枢及外周神经存活,刺激乙酰胆碱转移酶的合成以及形成轴突。

最近研究认为体内 bFGF 具有神经营养作用,切断活鼠的视神经,当 bFGF 存在时,体内视网膜神经节细胞存活,否则细胞会加速死亡。Anderson 等人的工作进一步证实了这个结论。他们发现当把 bFGF 注入受损的大脑内,海马区的神经能生存下来,若不添加 bFGF,变性坏死。在外周神经系统方面,bFGF 用在坐骨神经近端可增强神经外鞘重新髓鞘化,防止脊神经节神经的坏死。

5、胚胎的发育与分化

bFGF 具有促进组织再生和创伤修复的能力,在组织发育与分化方面,FGFs 起着重要的作用。短暂地调节鸡胚脑和鼠胚肾间质细胞里的 bFGF 的表达,可重现发育组织受刺激形成血管雏形,它们能促进发育组织进一步生长。FGFs 能促进胚胎器官形成过程中特别组织细胞的增殖。bFGF 的 mRNA 能在鼠胚许多组织中表达。

最近的研究指出,内源 bFGF 可指导胚胎形成初期细胞的分化。Slack 等发现 bFGF 可以产生与腹侧植物区信号相似的作用,而这些信号是形成腹侧中胚层的指令,bFGF 的诱导作用是高度特异性的,因为这种诱导向中胚层方向分化的作用不能被其他生长因子所替代。因此,bFGF 在早期胚胎发育中起着原始分化因子的作用。有人用哺乳动物做实验,证明当注入抗 bFGF 血清后,移植的同源胚胎组织不能组织生长和化分。所以说,bFGF 在合格内具多效应性,既是形态形成亦是促细胞分裂和诱导细胞分化的因子,在胚胎发育和组织分化中起作用。

6、对免疫系统的作用

FGF 在免疫调节的作用,目前还不甚清楚,但巨噬细胞在 Th 细胞作用下,分泌多种细胞因子包括 FGF,其生物系意义还不清楚。

我们研究了 bFGF 对巨噬细胞、B 细胞和 T 细胞的作用,发现它能明显地促进巨噬细胞的吞噬作用。吞噬百分数为 0.55%,吞噬指数为 1.74,对照组为 0.46%和 1.30,变性的 bFGF 只有轻微的刺激作用,B 细胞的空斑形成率为 18.72/10⁴ 脾细胞。对照组为 14.11/10⁴ 脾细胞,T 细胞的增殖率为 1.42,对照组为 1.0 (注:T 细胞的增殖率计算是以 ConA 刺激 T 细胞的 cpm 值为 1.0,实验组增殖为 1.0 的倍数)。以上结果显示,bFGF 对免疫系统有促进作用,自然状态下 bFGF 对免疫系统的意义还不清楚。

7、对遗传物质的影响

我们采用 Ames 法检测回复突变率为阴性,小鼠嗜多染红细胞的微核率仅为 3.05%,阴性对照为 2.4%,阳性对照为 45.3%,染色体的畸变率为 12.3%,阴性对照 9.8%,阳性对照为 32.5%,以上结果显示 bFGF 对遗传物质不造成损伤,为非特变剂,细胞转化试验进一步证明 bFGF 为非诱癌物质。其他安全试验如急性毒性,长期慢性试验皆为阴性,安全范围很大。

据文献报导,在多种肿瘤组织中发现有 FGF 样物质,但未发现 bFGF 有诱导肿瘤发生的报导,相反 Schwcigerer 等人 1987 年报导 bFGF 具有抑制癌细胞生长的作用。

碱性成纤维细胞生长因子近十年多年来，在许多方面作了比较充分的研究，特别是对其基因结构，理化性质，生物效应中关于诱导血管分化，对神经组织的营养与修复，对创伤的修复等方面发表了大量文章。

但在某些方面如 FGF 对免疫应答和调节作用，与其它细胞因子的关系；对神经系统的作用的机理，特别是与其它神经生长因子如 NGF，MNGF 等的关系还需要更深入的研究，在疾病治疗方面，还不止作为一种分裂原作用，还有许多潜在的功效未被揭示。

肠道致病菌分子生物学研究进展

莫美仪

广东省流行病防治研究所

自从分子生物学问世以来,医学微生物在许多方面的研究已迈进到分子生物学水平。现就肠道致病菌有关细菌分类,发病机理,实验室诊断和工程菌苗的构建等方面的分子生物学研究进展情况作一概述。

一、细菌分类:通常根据形态,生化特性,血清学,免疫化学,抗菌谱及种、属特异性噬菌体裂解情况等来作为肠道细菌分类的指标。近十年来,电子计算机应用以后增加了数值分类法,另外在分类学上亦广泛应用了分子生物学的成就。如:

1、DNA G+C 克分子百分含量测定:去氧核糖核酸(DNA)分子是由两个多核苷酸长链所组成的双重螺旋,其核苷酸由一个分子的磷酸脱氧核糖和一个分子的嘌呤碱或嘧啶碱所组成。两个螺旋单链上的相对硷基的种类有一定的关系,即鸟嘌呤(Guanine,简称G)与胞嘧啶(Cytosine,简称C)相对,腺嘌呤(Adenine)与胸腺嘧啶(Thymine)相对。每种细菌DNA的硷基排列顺序是固定的,也就是说每类细菌DNA中硷基组成(G+C克分子%)都有恒定的数值。根据该数值可了解各种细菌DNA分子同源性的程度,亦即反映出各种细菌之间的亲缘关系。亲缘关系近的细菌,它们的G+C克分子百分含量相同或相似,亲缘关系远的细菌,它们的G+C克分子百分含量不同。

耶尔森氏菌属原归巴斯德菌属,而其DNA G+C克分子百分含量是45.8~46.8moles%与后者为36.5~43moles%显然不同,故对耶尔森氏菌的分类重新深入研究,并改列为一个独立的菌属。摩根氏菌属原归变形杆菌属,但其DNA G+C克分子含量是50~52 moles%与变形杆菌属(38~40moles%)的同源性较低,最近报道摩根氏菌属已从变形杆菌属中独立出来。弧菌科里的气单胞菌属虽具有与弧菌属相近似的生物学特性,但G+C含量前者为57~63moles%,后者为40~50moles%,因此亦归不同属。

2、DNA 相关度测定:(又称DNA-DNA分子杂交试验)由于细菌DNA G+C克分子含量的百分数并不反映核苷酸对的排列顺序,因而G+C百分含量相同或近似的细菌,其亲缘关系不一定相近。若测定两种细菌的DNA相关度就可以比较两种细菌的核苷酸对的排列顺序是否相同从而精确地反映两种细菌DNA的同源性程度。

该试验就是利用了细菌DNA有变性和复性的特征,把提出的细菌DNA在106℃高温下,分子的双链自动解离成为单链状态,解离后的DNA单链在冷却至60~75℃时又会相互结合重新形成双链DNA。两种细菌的DNA单链在一定条件下能相互结合。用放射性标记的方法以本菌的DNA结合率即相关度为DNA测定两种细菌DNA的相关度。亲缘关系近的细菌,它们的DNA相关度就高,反之则低。

耶尔森氏菌与巴斯德菌属的相关度仅为6~13%,结合其DNA G+C克分子百分含量已把它独立为一菌属归入肠杆菌科。该菌属中三个种之间的DNA相关度是不一致的,鼠疫耶尔森氏菌和假结核耶尔森氏菌在同一个同源群内,结肠炎耶尔森氏菌则可以分为四个同源群。非O1群霍乱弧菌原称为不凝集弧菌,它与霍乱弧菌古典及E1-Tor生物型的DNA相关度极高(82~100%),故归入霍乱弧菌种中,其他病原性弧菌虽然DNA G+C克分子

含量为 41~48 moles%，归属弧菌属，但与霍乱弧菌古典及 E1-Tor 生物型的 DNA 相关度极低，仅 0~26%，故把病原性弧菌分别列为独立的种。通过同源性测定，弧菌属内增加了不少种，其中拟态弧菌，霍利斯弧菌，河弧菌，弗尼斯弧菌，创伤弧菌，海鱼弧菌等都是根据 DNA 同源性的研究确定为独立的菌种在 1979 年以后才命名的。

3、rRNA 相关度测定：又称 rRNA-DNA 分子杂交试验，核糖体核糖核酸 (rRNA) 的同源性也是细菌分类学的指标，rRNA 比较稳定，在 DNA 相关度低的菌株之间，rRNA 相关度的测定能够显示出它们的亲缘关系。例如用该试验可以把假单胞菌属分为五个同源群，这些同源群在检测 DNA 相关度时，并不能发现。

4、质粒相关度测定：细菌的质粒是独立于染色体外的共价闭环双链 DNA，它具有自我复制的能力，在细菌分裂时可随染色体分配到子细胞，能稳定遗传。质粒的存在对细菌的生存并没有决定性作用，但能赋予细菌具有抗药性，致病性等生物学特性。质粒分类的基础是质粒不相容性，也就是在没有选择压力条件下，两个密切相关的质粒不能稳定共存于同一细菌内，故质粒的不相容性可以作为质粒相关度的指标。

通过接合转移试验等方法检测细菌质粒的不相容性而对细菌作质粒分群。目前大肠杆菌可分为 25 个质粒不相容群，假单胞菌分 11 个以上的质粒不相容群。已经发现越来越多的细菌都携带质粒，肠道致病菌更为突出，因此，质粒分类必将成为其分类的新指标。

总的说来，由于分子生物学技术的应用，使肠道细菌分类迅速发展，既发现了新属或新种，又增加了细菌鉴定上的精确性，使分类更趋合理。

二、致病机理：分子生物学的迅速发展，明显地推动了对肠道致病菌致病机理的研究。现就肠道致病菌四个毒力因素的研究而论。

1、粘附力：指特定的细菌定居在特定的靶器官或靶细胞表面的能力。肠道致病菌一般定居在大肠或小肠上皮细胞上，这是引起机体感染的重要始动因素。细菌粘附力的大小和有无决定于细菌能否产生粘附素，而粘附素的产生又受特定的基因控制。通过分子生物学技术以发现这些控制基因有些在染色体上，有些在质粒上，有些同时在染色体和质粒上而受二者共同控制。目前尚认为细菌表面的特异识别分子—配体和宿主上皮细胞表面对应的识别分子—受体是细菌实现粘附的物质基础，并认为大多数肠道致病菌的配体是菌毛。已发现产肠毒素性大肠杆菌 (ETEC) 有六种新的菌毛抗原，且都受质粒基因编码。从分子水平研究细菌粘附机理还是近几年的事，大多数肠道致病菌有关粘附分子生物学仍有待进一步研究。

2、破坏力：指细菌对宿主细胞产生损坏的能力。肠道致病菌通常产生肠毒素从而对宿主肠上皮细胞产生损伤作用。控制毒素的基因有些在染色体上，有些在质粒上，还有些是前噬菌体控制的。现已明确霍乱肠毒素 CT 受染色体基因控制。ETEC 的肠毒素分热不稳定肠毒素 (LT) 和热稳定肠毒素 (ST) 两种，控制它们的是 Ent 质粒，根据基因序列等不同，最近发现 ST 又可分为 STa1, STa2 和 STb。此外还发现 LT 样毒素 (LT-Like) 称为 LT-I，该毒素的结构基因不在质粒上，亦有待进一步研究。

3、侵袭力：指致病菌侵入机体敏感组织深度的能力。一般来说，不穿透肠上皮细胞的细菌属于非侵袭性如霍乱弧菌，ETEC 等，穿透肠上皮细胞的属于侵袭性如志贺氏菌，侵袭性大肠杆菌 (EIEC)，空肠弯曲菌，耶尔森氏菌和某些沙门氏菌等，居两者之间有致病性大肠杆菌 (EPEC)。侵袭力绝大多数是质粒控制的，而且这些质粒的分子量一般比较大，

侵袭性细菌一旦失去相应的大质粒毒力会显著下降,如志贺氏菌属没有 140 或 120Md 大质粒的菌株则豚鼠角膜试验变为阴性,当导入大质粒后,就能恢复致病性。近来发现某些细菌的侵袭力除受质粒控制外,还同时受染色体 DNA 影响,如福氏志贺氏染色体上有 3 个区域与毒力有关。因而其毒力的表达还需染色体基因的配合。

4、抵抗力:指细菌进入宿主机体后,抵抗机体各种免疫系统攻击的能力,这是决定细菌能否致病的重要因素。细菌的这种作用大多数是由质粒控制的,例如耶尔森氏菌属的大质粒除控制侵袭力外,还能控制 V、W 抗原的生成,使该菌有抗吞噬作用。

总之,自从分子生物学的角度去研究细菌的致病作用机理后,对肠道致病菌的致病机理已有了不少新的认识,并发现一些细菌尽管种类不同且引起不同的疾病,但其外毒素的作用机理明显类似。

三、实验室诊断:目前已成功地应用了各种分子生物学技术对肠道致病菌进行鉴定,并对它们所引起的疾病进行监测及流行病学分析。常用的分子生物学技术有:

1、质粒图谱分析(有称质粒指纹分析):该法把提到的细菌质粒 DNA 分子,经琼脂糖凝胶电泳后形成条带从而进行分析比较。由于细菌质粒 DNA 提取方法不断改进,目前已可从 0.5 毫升的细菌肉汤培养物中 4 小时内分离到细菌质粒 DNA 从而为细菌质粒的研究提供了可能性。

质粒 DNA 在肠道致病菌的鉴定和鉴别中是很重要的,质粒图是同源感染暴发的敏感指标。已有报道在空肠弯曲菌,沙门氏菌,出血性大肠杆菌等感染暴发流行中,用质粒图谱分析成功地对它们的传染源及传播途径作出追踪调查。此外,某些肠道致病菌的质粒与耐药性有关,因此该法又可作为肠道致病菌耐药性监测的手段。例如应用该法已证明痢疾志贺氏菌系耐药性质粒所介导的,提示应重视其耐药性质粒的监测。

2、限制性内切酶图谱分析:限制性内切酶是细菌的酶类(常用 E. CorI, Hind III 等),它仅在一个特殊的碱基序列位点上降解 DNA,并将 DNA 链切断,每个基因组被切断的切点是一定的,相同的菌株被切断出的片段一致,而片段的大小也一致,这些片段经琼脂糖凝胶电泳形成特异的内切酶图谱又称指纹图谱。无论是质粒或染色体 DNA 都可通过酶切,电泳获得图谱。

该法是质粒图谱分析的补充和深化。对质粒谱一致的细菌,可以进一步发现其菌株之间的微小差别,如出血性大肠杆菌(EHEC)所引起的出血性肠炎的流行,用质粒图谱分析 E. Coli O157 : H7 时都带有 72Md 和一个少于 1Md 的质粒,但若通过酶切图谱则会发现这些质粒 DNA 可能在结构上仍具有微小差异从而追踪到传播源。对缺乏质粒 DNA 的菌株,可通过其染色体酶切图谱进行分析。目前把酶切图谱分析与杂交技术联合应用已成功地用于某些流行病调查如对霍乱流行的分析。

3、基因探针(分子杂交)技术:每一种细菌的遗传物质都具有相对独特性,即可以具备该细菌的种,属甚至株的特异性 DNA 如基因编码毒素,酶,耐药决定簇,外膜蛋白等。若将从细菌中抽提出的 DNA 切割成为单链 DNA,并以同位素或生物素标记后连接转化到受体菌所得到的克隆 DNA 即可作为探针。这种探针能特异性地检测具有互补 DNA 细菌中的特异性基因片段。待测细菌的单链核酸与探针根据同源 DNA 在一定条件下碱基能互相配对(即互相杂交)的原理相互结合,然后通过检测系统如放射性自显影或酶催化的颜色反应去了解待测标本中有无特异的核酸片段从而作出诊断。

有报道用鼠伤寒沙门氏菌的 5 个染色体片段的混合物作为一种探针去鉴定接种于各种食品中的沙门氏菌,至少能检出 1300 多株沙门氏菌株和亚种。目前已用毒素基因探针成功地应用于 ETEC 和霍乱的流行病学研究,用毒力特异性探针用于痢疾志贺氏菌, EIEC 耶尔森氏菌和弯曲菌的调查。

4、单克隆抗体 (McAb) 技术:将免疫淋巴细胞与骨髓瘤细胞相融合,所形成的杂交瘤在体外能产生高度纯一的特异性抗体即 McAb。该技术使抗体从体内产生转向体外培养,使多克隆细胞的血清型抗体变为单克隆的专一均质型抗体,并扩大了抗体的来源,提高了抗体的特异性。

目前已成功地制备沙门氏菌属,霍乱弧菌、弯曲菌等 McAb。用实验动物感染和体外毒素抑制试验都说明了霍乱的 McAb 对霍乱弧菌感染有保护作用。有报道用 McAb 研究福氏志贺氏菌的型和群抗原时发现型抗原Ⅲ和群抗原 6 相同,又在福氏和志贺氏 I 型中发现一个新的血清型暂定为 4X。此外尚用 McAb 研究肠道细菌的生化功能如大肠杆菌细胞壁蛋白,沙门氏菌脂多糖等等。虽然目前 McAb 技术在肠道致病菌方面的应用仍很有限,但相信随着该技术的成熟和发展,它必将为肠道致病菌的研究提供简便、特异的方法。

四、工程菌苗的构建:随着分子生物学技术的迅速发展,应用 DNA 体外重组技术定向改变细菌毒力基因的结构,使之失活但仍保持免疫原基因,可克隆免疫原基因并提高它的表达水平用以 3 构建高效,稳定而又安全的口服细菌苗。

1、预防霍乱活菌苗株的构建:过去预防霍乱病使用霍乱死菌苗 (A+B+株),经 100 年的实践后已证实其效果不佳而需口服活无毒菌株 (A-B+株)来预防。八十年代初期开始用亚硝基胍诱变霍乱 A-B+ 减毒株,但由于其毒力突变可在体内回复,故效果亦不理想。近年,不少学者在许多研究的基础上,结合 DNA 体外重组技术成功地构建了 A-B- 或 A-B+ 突变株,从而为构建 A-B+ 无毒株口服活疫苗提供了可能性。这种工程菌苗既缺失了编码毒素 A 亚单位,保证了无毒的稳定性,又保留了 B 亚单位基苗,保证了引起抗毒素的免疫反应,此外还能保持在人肠定居,在肠腔内增殖和引起肠道分泌 IgA 抗体等的功能,因此霍乱工程菌苗必将成为理想的菌苗。进一步的工作是构建出更令人满意的无毒霍乱工程菌苗株并反复进行动物免疫及志愿者免疫试验。

2、痢疾、伤寒双价菌苗的构建:利用 DNA 体内和体外重组技术,目前已成功地将宋内志贺氏菌 I 相抗原的大质粒转移到伤寒沙门氏菌无毒株 Ty21a 内获得了衍生株。用血清学试验表明该衍生株不仅能表达伤寒沙门氏菌的菌体抗原,还能表达宋内志贺氏菌 I 相抗原。用动物试验亦证明该衍生物对宋内志贺氏菌和伤寒沙门氏菌的攻击都有保护作用。Ty21a 是有效的伤寒口服活菌苗株,亦可将它作为其他抗原决定子的载体构建预防肠道感热的双价或多价活疫苗。

此外,亦已成功地将宋内志贺氏菌 I 抗原的大质粒转移到福氏 2a 志贺氏菌无毒株 T32 中,构建了宋内氏和福氏 2a 二价株菌苗。该工程菌苗既保持了 T32 株原来安全有效的特性,又表达了宋内志贺氏菌 I 相抗原,从而又获得了对宋内氏菌感染的特异性保护作用。相信随着分子生物学技术的不断发展,会出现更多、更理想的肠道菌工程菌苗。

上面仅概述了肠道致病菌分子生物学研究的几个方面,但已明显看出分子生物学推动了肠道致病菌研究的进展,并将为肠道致病菌提供更简便、灵敏、特异的检测手段,使肠道致病菌的研究更加广泛深入。