

内毒素基础与临床

朴相浩 杨学海 卢东升 编译 卢东升 审校



黑龙江科学技术出版社

4.1

内毒素基础与临床

朴相浩 杨学海 卢东升 编译

卢东升 审校

黑龙江科学技术出版社

(黑)新登字第2号

责任编辑:王正维

内毒素基础与临床

朴相浩 杨学海 卢东升 编译

卢东升 审校

黑龙江科学技术出版社出版

(哈尔滨市南岗区建设街41号)

黑龙江省教育委员会印刷厂印刷

787×1092毫米 32开本 9.875印张 190千字

1993年8月第1版·1993年8月第1次印刷

印数: 1—1000册 定价: 12.00元

ISBN 7-5388-2315-8/R·307

前 言

近年来，随着分子生物学、免疫学、生物化学和遗传学的飞速发展，内毒素的研究方兴未艾。

内毒素对机体的影响极为复杂，在其他天然或人工产物中，还未见到具有如此复杂的生物学活性物质。内毒素除具有致热性、致死性和出血坏死性等毒性作用外，还具有非特异感染防御、诱导干扰素和抗肿瘤等作用，并能激活补体、脑垂体—肾上腺皮质及免疫系统，释放多种生物学活性物质。内毒素化学结构的研究成果，特别是类脂A的人工合成的成功，为分离内毒素的毒性和生物免疫学活性，提供了科学依据。为内毒素的有益组分的临床应用开辟了广阔的前景。

本书是以本间逊教授主编的《内毒素结构及其生物学活性》一书为基础编写的。我在东京大学留学期间，得到了本间逊教授的指导，并收集到了大量的内毒素研究的最新资料。其内容也一并编入本书里。

因此，本书是有关内毒素研究和学习的最新的、最全面的、最系统的参考书。

国内尚无内毒素专著问世。国内的内毒素研究正向深度和广度发展。此时，编著出版《内毒素基础与临床》一书，无疑对国内内毒素基础与临床应用研究会有很大的促进作用，也将会受到广大医务工作者和医学院校师生的欢迎。

我希望在国内同道者的努力下，在内毒素的基础与临床应用的研究方面，取得可喜可贺的成绩。

在编著过程中，承蒙医学博士孙立英副教授的支持和协助，在此表示谢意。此外，限于水平，错误之处在所难免，诚恳地希望读者多加批评指正。

卢东升

黑龙江省科学院

1992年1月

目 录

第一章 革兰氏阴性菌外膜的结构和意义	(1)
第一节 外膜的形态及其分离与制备.....	(1)
第二节 外膜的化学组成.....	(1)
1. 磷脂.....	(2)
2. 脂多糖.....	(3)
3. 外膜蛋白质.....	(5)
第三节 外膜及其生理功能.....	(10)
1. 屏障作用.....	(10)
2. 亲水性物质通透孔.....	(11)
3. 外膜的载体转运.....	(12)
4. 脂多糖的变异与外膜结构.....	(13)
5. 外膜表层活注.....	(15)
参考文献.....	(17)
第二章 内毒素的分子结构	(20)
第一节 内毒素的提取及精制.....	(20)
1. 主要提取方法及其特点.....	(21)
2. LPS的纯化.....	(23)
3. LPS的纯化及其不均一性.....	(24)
第二节 类脂部分.....	(25)
1. 类脂A的基本结构.....	(25)
2. 类脂A的脂肪酸.....	(30)
3. 类脂A的分子模型.....	(34)
第三节 多糖部分.....	(35)

1. LPS多糖部分的一般分子结构·····	(36)
2. LPS多糖O抗原部分·····	(37)
3. 研究LPS多糖结构的方法·····	(40)
4. O抗原多糖侧链的结构·····	(42)
5. 核心多糖的结构·····	(44)
6. 弧菌属细菌的LPS多糖·····	(48)
7. LPS多糖部分的生物活性·····	(48)
第四节 蛋白质部分·····	(50)
1. 前言·····	(50)
2. 蛋白质部分的分离·····	(52)
3. 蛋白质部分的生物活性·····	(53)
4. 外膜蛋白质与内毒素蛋白质·····	(56)
5. 结束语·····	(57)
第五节 类脂A的化学合成·····	(58)
1. 化学合成类脂A的意义·····	(58)
2. 酰基双糖的合成·····	(59)
3. 磷酸酰基双糖的合成·····	(63)
4. 合成类脂A相关化合物的生物学活性·····	(65)
5. 小结·····	(67)
第六节 脂多糖的生物合成·····	(68)
1. KDO—类脂A部分的生物合成·····	(69)
2. R核的生物合成·····	(73)
3. O抗原多糖的生物合成·····	(73)
4. O抗原的变换·····	(74)
5. 脂多糖向外膜方向移动·····	(75)
第七节 脂多糖的物理特性与生物活性的关系··	(75)
1. LPS是双亲和性的高分子微胶粒·····	(75)

2. LPS的分散状态·····	(77)
3. 用表面活性剂解离LPS·····	(78)
4. 螯合剂作用下的解离·····	(79)
5. LPS亚单位的分子量·····	(81)
6. LPS分散状态与生物活性的关系·····	(82)
7. LPS的稳定性和化学分解·····	(83)
8. LPS的化学修饰·····	(84)
9. LPS的吸附特性·····	(84)
10. 今后的研究方向·····	(85)
参考文献 ·····	(86)
第三章 内毒素的生物活性 ·····	(91)
第一节 内毒素生物活性概论·····	(91)
1. 前言·····	(91)
2. 各种动物对内毒素的敏感性·····	(93)
3. 使动物对内毒素敏感性增强的方法·····	(98)
第二节 非特异抵抗性·····	(102)
第三节 致热性·····	(103)
1. 体温平衡·····	(104)
2. 致热性的测定和各种LPS的活性·····	(106)
3. 致热原的致热机理·····	(107)
4. 致热物质的种属特异性·····	(110)
5. 致热物质的致热机理和解热剂的作用部位 ·····	(111)
第四节 内毒素对血液动力学和血管的影响作 用·····	(112)
1. 内毒素引起的血液动力学紊乱和内毒素休 克·····	(112)

2. 血管活性物质(介质)	(114)
第五节 对补体系统的作用	(123)
1. 补体激活及其意义	(123)
2. 内毒素激活补体的机理	(126)
3. 内毒素的生物活性与补体的作用	(127)
第六节 内毒素与凝血系统	(129)
1. 前言	(129)
2. 内毒素对高等动物凝血—激肽系统的影响	(130)
3. 鲨试验反应机理	(134)
第七节 对各种细胞的作用	(140)
1. 前言	(140)
2. 血小板	(143)
3. 血管内皮细胞	(144)
4. 粒细胞	(145)
5. 网状内皮系统与巨噬细胞	(147)
6. 肝细胞	(149)
7. 造血干细胞和对放射线损伤的防御活性 ...	(150)
8. 骨髓细胞	(154)
9. 纤维母细胞	(155)
10. 淋巴细胞	(155)
11. 肥大细胞和肌细胞	(156)
第八节 施瓦茨曼反应	(156)
1. 前言	(156)
2. 发生机理	(158)
3. 临床	(162)
4. 小结	(165)

第九节 对免疫系统的作用	(165)
1. 前言	(165)
2. LPS的抗原性	(167)
3. 脂多糖载体	(168)
4. B细胞激活和非特异抗体的产生	(170)
5. LPS促进幼稚淋巴细胞成熟	(174)
6. LPS作用下激活巨噬细胞和体液性因子 ...	(175)
7. LPS对抗体产生的调节	(177)
8. 细胞免疫与LPS	(180)
9. LPS的应答和遗传控制	(181)
10. 结束语	(182)
第十节 内毒素与干扰素	(183)
1. 前言	(183)
2. 内毒素型IFN的诱导机理	(186)
3. 结束语	(193)
第十一节 抗肿瘤性	(193)
1. 细菌内毒素抗肿瘤活性的研究历程	(194)
2. 内毒素毒性与抗肿瘤活性的分离	(196)
3. 内毒素抗肿瘤实验实例	(199)
4. 肿瘤坏死因子(TNF)	(202)
5. 内毒素抗肿瘤活性必需的化学结构	(203)
第十二节 内毒素与代谢	(204)
1. 内毒素与糖代谢异常	(204)
2. 内毒素中毒症时的脂代谢异常	(210)
3. 内毒素中毒症时的造血改变及铁代谢异常	(211)
4. 内毒素中毒症与过氧化脂质生成	(213)

参考文献	(214)
第四章 药学问题	(226)
第一节 医药中的内毒素检测	(226)
1. 无菌试验	(226)
2. 致热物质试验	(227)
3. 鲎试验	(227)
4. 小白鼠白细胞减少试验	(228)
第二节 内毒素增强各种药物毒性的作用	(228)
第三节 鲎试验的应用	(230)
第四节 鲎试验与致热性试验的相关性	(231)
1. 关于鲎试验与致热性试验的相关性	(231)
2. 各种注射液对鲎试验和致热性试验反应的 比较	(233)
第五节 去除内毒素的方法	(235)
参考文献	(237)
第五章 临床问题	(239)
第一节 内毒素的病理意义	(239)
1. 内毒素血症	(239)
2. 机体标本的内毒素检测法	(240)
3. 细菌性休克机理	(242)
4. 细菌性休克的治疗方法	(243)
第二节 内科领域—以肝胆疾患为中心	(244)
1. 前言	(244)
2. 肝胆疾患和内毒素	(244)
3. 肾脏和内毒素	(252)
第三节 外科领域	(253)
1. 外科领域的内毒素血症	(253)

2. 内毒素血症的病原菌及临床症状	(254)
3. 急性腹膜炎时内毒素血症的病理变化	(255)
4. 胆道感染时的内毒素血症	(255)
5. 肝疾患并发的内毒素血症	(257)
6. 肠道循环障碍时的内毒素血症	(259)
第四节 口腔疾患与内毒素	(260)
1. 口腔菌丛	(260)
2. 牙周病与革兰氏阴性菌	(261)
3. 牙周病时内毒素的作用	(262)
第五节 兽医领域	(265)
1. 家畜与实验动物的内毒素血症	(265)
2. 牛急剧性乳腺炎时的内毒素血症	(267)
第六节 内毒素生物活性总述	(270)
参考文献	(275)
第六章 关于内毒素的新进展	(280)
第一节 内毒素研究的历史和展望	(280)
第二节 关于标准内毒素问题	(287)
第三节 非革兰氏阴性菌的内毒素样物质	(289)
第四节 内毒素在感染中的意义	(291)
第五节 内毒素疫苗研究的新成就	(293)
1. 主动免疫疗法	(294)
2. 被动免疫疗法	(297)
3. 主动免疫和被动免疫联合应用	(298)
参考文献	(299)

第一章 革兰氏阴性菌外膜 的结构和意义

第一节 外膜的形态及其分离与制备

革兰氏阴性菌的表层结构分为三层：胞浆膜（内膜）、粘肽层和外膜（图1—1）。细胞壁一般是指粘肽层和外膜。本文主要叙述外膜。

外膜结构和机能的研究始于内膜和外膜分离技术的出现，这并非言过其实。其历史经过姑且勿论，目前最常用的内、外膜分离方法有两种，一是把经溶菌酶—EDTA处理后形成的球状体，用渗透压方法溶解，再以蔗糖梯度离心法分离；二是用French打碎机把完整细菌破碎，然后进行蔗糖梯度离心分离。两种方法各有千秋，前者适用于从较小量的标本中制备内、外膜，后者则适用于处理较大量的标本。用上述方法分离的外膜和内膜的密度分别为 $1.22\text{g}/\text{cm}^3$ 和 $1.14\text{g}/\text{cm}^3$ 。内膜的密度与红细胞密度相近，而外膜的密度则较高。

第二节 外膜的化学组成

用上述方法将外膜与内膜分离后，分析化学成分，结果发现用第一种方法制备沙门氏菌外膜的磷脂、Rc脂多糖（LPS）及蛋白质之间的重量比为 $0.3:0.3:1$ 。用French打碎机制备的外膜，其磷脂：RCLPS：蛋白质为 $0.16:0.3:$

1. 已知，LPS 的糖链有所缩短的变异株，其外膜蛋白质含量减少，外膜密度逐渐接近于内膜密度。因此认为外膜的高密度主要决定于外膜蛋白质部分的浓度。

1. 磷脂

用³H—2—甘油标记法检测外膜成分中的磷脂组成，发现乙醇胺磷脂、甘油磷脂、心肌磷脂各占 81%、17% 和 1.6%。可见外膜的主要成分是乙醇胺磷脂。在 Rc 变异株中，这些分布于细胞表层的磷脂为 1.83×10^6 分子/ μm^2 (表 1—1)。据计算，一个菌体约有 1.1×10^7 个分子，这些分子所占面积

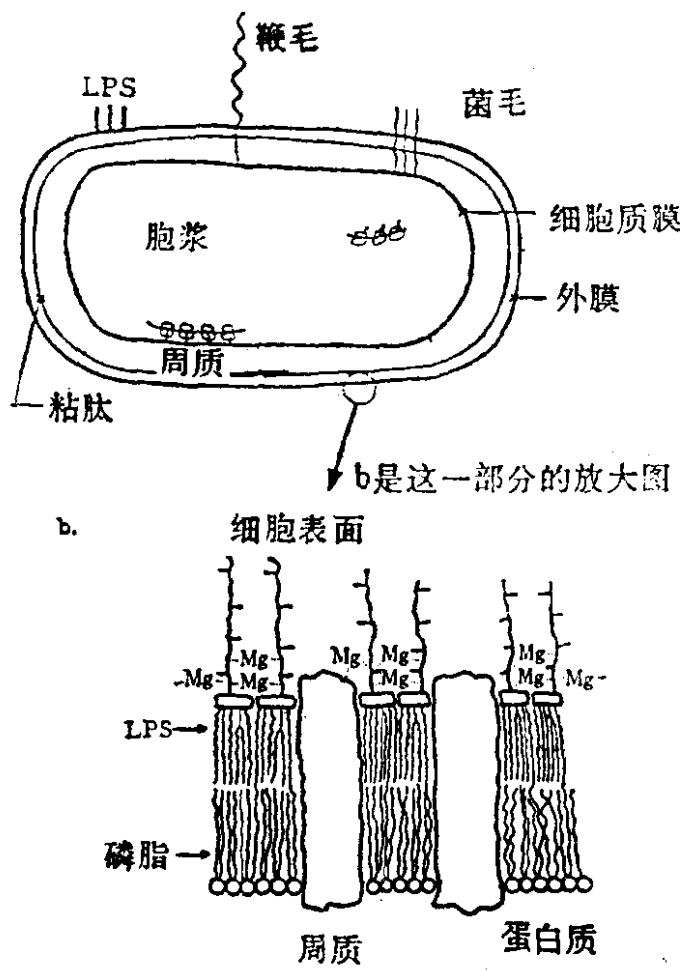


图 1—1 革兰氏阴性菌的表层结构

为 $5.9\mu\text{m}^2$ ，可覆盖菌体表面的98%（把外膜内外两层视为菌体表面积的200%）。用荧光漂白再用分布法观测磷脂在膜上的移动， 24°C 时，约为 $1.5\times 10^9\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ 。LPS及外膜蛋白质的存在，并不影响其移动。用溴化氧活化的葡聚糖（不能透过外膜）与乙醇胺磷脂反应，以观察磷脂在外膜的分布状态，发现野生株和Rc变异株的细胞表层几乎没有磷脂分布。换言之，磷脂几乎全部分布在外膜的内面（图1—1）。随着LPS糖链部分缺陷加重，磷脂逐渐出现在细胞表层。

表1—1 脂多糖的糖链部分缺陷时外膜组成变化（计算以文献2为据）由于LPS变异(Rd₂及Re)，蛋白质量减少而磷脂量增加

LPS结构	LPS	磷脂 分子数/ μm^3	蛋白质(fg)*
S	5.76×10^5	1.45×10^6	12
Rc	5.76×10^5	1.63×10^6	11.3
Rd ₂	5.76×10^5	2.32×10^6	6.6
Re	5.76×10^5	2.48×10^6	6.8

* 此值低估

2. 脂多糖

重量约占外膜成分20%的LPS，结构极为复杂，涉及面较广，其化学结构主要是用沙门氏菌进行实验阐明的。图1—2显示的LPS结构已普遍为人们接受。LPS由疏水性类脂A、亲水性核和O侧链等三部分构成。类脂A由两个氨基葡萄糖在 β 一位连接而成，此壳二糖的OH和NH上共有6个饱和脂肪酸。

一部分脂肪酸有 β —OH—结构，而且是一种有分枝结构的脂肪酸，它们是LPS的许多生物学活性的所在区域。LPS

的这种脂肪酸嵌入外膜，作为疏水性成分参予膜的构成。

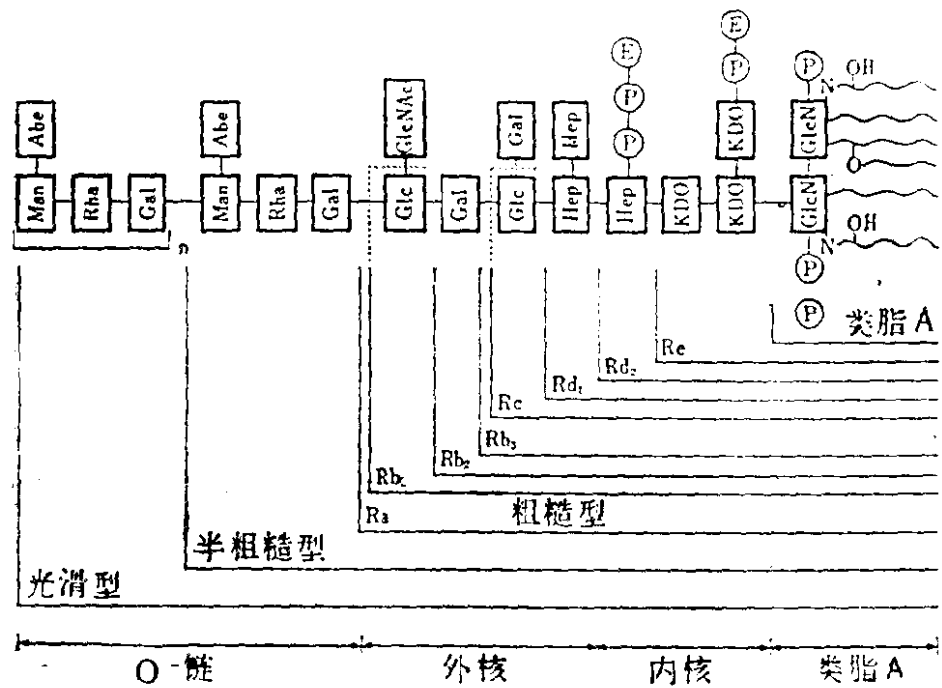


图 1—2 LPS的化学结构

以伤寒杆菌LPS结构为代表，表示各部的名称和变异株的名称。
缩写符号说明如下：表示脂肪酸 GlcN；氨基葡萄糖 P表示磷酸；KDO表示 2—酮基—3—脱氧—甘露辛酮酸；Hep表示庚糖；E 表示乙醇胺Glc表示葡萄糖；Gal表示半乳糖；Glc NAC表示N—乙酰氨基葡萄糖；Rha 表示鼠李糖；Man 表示甘露糖；Abe 表示阿拉伯糖。

曾认为LPS是以 (氨基葡萄糖)₂为一单位，三个单位重叠成 (氨基葡萄糖)₃。而构成一个分子。但最近通过碱水解和³¹P NMR实验得知，LPS 是以 (氨基葡萄糖)₂为基本单位的。类脂A上附有 3 分子的KDO和 2 分子的庚糖，其余结构如图 1—2 所示。然而，最近用质谱仪分析大肠杆菌的结果表明，LPS有 3 个庚糖，其中一个分子为分枝结构。

最近也得出沙门氏菌 LPS 有 3 个庚糖 的结论 (图 1—2)。目前关于核部分结构的研究正在深入进行。

在沙门氏菌体表面上，每1μm²有 6×10⁵ 个具有这种结

构的LPS分子，每个菌有 3.47×10^6 个LPS分子。这样，LPS所占总面积约为 $2.7 \mu\text{m}^2$ ，约占菌表面积的44%。根据前面的计算，磷脂的总面积约占外膜里外面的98%，LPS约占44%，所以剩余的 $200 - 98 - 44 = 58\%$ 一定是蛋白质所占的面积。

Porin三聚体的半径为4.1nm，一个菌相当于有 3.33×10^4 个Porin三聚体。假定Porin占全部外膜蛋白质的40%，则可计算出在外膜内、外表面所占的面积约为 $8.8 \mu\text{m}^2$ ，该值相当于细菌外膜的内、外总面积的72%左右。可见所得计算值与前述值近似。

此外，LPS在菌体表面的移动度可用荧光漂白再分布法重新构成微脂粒（Liposome）而测定出来，Rc型LPS在24℃时为 $1 \times 10^{-9} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ 。当外膜蛋白质Porin占60%时，扩散系数D约下降十分之一。用全菌进行同样实验作为对照，D值变成 $2.0 \times 10^{-10} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ 。这表明LPS可与外膜蛋白质相互作用，LPS的侧面扩散可因外膜蛋白质的作用而被抑制。

用电镜观察，分布于外膜上的LPS的形态，在0℃下，将处于对数生长期的细菌破碎，分离出细胞壁，用溶菌酶和胰蛋白酶处理，分别去掉粘聚糖和添加的溶菌酶。将此标本与预先准备的铁蛋白标记的LPS抗体相互作用，固定洗涤后电镜下观察，所得结论是LPS一般仅分布于外膜的外层。这与前述的磷脂多分布在外膜的内层结合起来考虑，是很合乎逻辑的（图1—1）。

3. 外膜蛋白质

如前述，外膜除含磷脂及LPS外，还存在大量的蛋白质。首先要搞清这些蛋白质与存在于内膜上的蛋白质是否为