DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.012
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

文章编号:1000-5404(2001)04-0395-03

论著

大肠杆菌DNA对小鼠致死作用的初步研究

潘文东,周 红,郑 江,夏培元,秦孝建,鲁永玲,刘晓禄 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨细菌DNA是否参与细菌感染引起的失控性炎症反应综合征(SIRS)的发生。方法 清洁级昆明种小白鼠100只,随机分为30、20、10、5、1 mg/kg *E. coli* DNA和30 mg/kg ^{60}Co DNA、DNased DNA、CT DNA、DNA抽提流程有机残留物以及空白对照10组,后两组经腹腔注射600 mg/kg D-氨基半乳糖敏化。采用尾静脉给药方式,观察给药后48 h内小鼠的一般情况及其死亡率。结果 ①双链*E. coli* DNA对小鼠的致死作用有明显的量效关系,LD_{50}=11.51 mg/kg;②30 mg/kg *E. coli* DNA、^{60}Co DNA组小鼠死亡率差异无显著性(8/10、10/10,$P>0.05$);③DNased DNA、DNA抽提流程有机残留物和CT DNA组均无小鼠死亡(0/10)。结论 细菌DNA参与了SIRS的发生。

关键词:DNA;失控性炎症反应综合征;感染
中图法分类号:R394.2;R378.21 文献标识码:A

Preliminary study of the lethal effects of *E. coli* DNA on mice

PAN Wen-dong, ZHOU Hong, ZHENG Jiang, XIA Pei-yuan, QIN Xiao-jian, LU Yong-Ling, LIU Xiao-lu (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of bacterial DNA in systemic inflammatory response syndrome (SIRS). **Methods** A total of 100 mice of Kunming species were divided into ten groups: *E. coli* DNA (30, 20, 10, 5 and 1 mg/kg), 30 mg/kg of CT DNA, ^{60}Co DNA, DNased DNA, organic residue of DNA extraction and sterile water control. The last two were pre-treated with D-galactoamine (600 mg/kg intra peritoneally). Animals were administratively injected *via* tail vein. General physical condition and the death rate of mice were observed within 48 h. **Results** ①Obvious lethal effect of double strand *E. coli* DNA on mice were observed with a dose-effect correlation, LD_{50}=11.51 mg/kg. ②NO difference in death rate was found in the group of 30 mg/kg *E. coli* DNA with or without ^{60}Co irradiation (10/10 and 8/10, $P>0.05$). ③No rats died in the group of DNased DNA, organic residue of DNA extraction and calf thymic DNA (0/10). **Conclusion** Bacterial DNA may play an important role in the development of SIRS.

Key words: bacterial DNA; systemic inflammatory response syndrome; infection

近年来,临床革兰氏阴性(G^-)细菌感染患者因失控性炎症反应综合征(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS)所致死亡率呈上升趋势,成为当前研究的热点之一。存在于G^-杆菌外膜中的内毒素(Lipopolysaccharide, LPS)在SIRS中的作用已得到初步肯定[1]。但我们在研究中发现G^-杆菌除LPS,外尚存在其它的具有引起SIRS的物质,证据是进行提前给予内毒素拮抗剂可完全保护单纯由内毒素引起的内毒素血症模型动物[2],但对由细菌感染引起的脓毒血症模型动物则不能完全保护(待发表)。另外此前对细菌DNA的研究显示,单链细菌DNA可以活化B细胞、NK细胞及单核细胞[3];可引起D-氨基半乳糖敏化的小鼠休克甚至死亡[4,5],提示细菌DNA参与了感染导致的炎症反应,并可能是一重要的致病因素。本研究旨在探讨大肠杆菌DNA(*E. coli* DNA)是否参与SIRS的发生。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 大肠杆菌25922株为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 溶菌酶、蛋白酶K、DNase Ⅰ、SDS、Tris、EDTA为Sigma产品,华美生物工程公司分装;D-氨基半乳糖:重庆医科大学化学系合成,批号:990108。

1.1.3 试验所用容器 均经^{60}Co辐照去热源或于清洁干燥后250 ℃ 1.5 h处理。

1.2 方法

1.2.1 *E. coli* DNA的提取、纯化和鉴定 参照文献[6]:大肠杆菌25922于血琼脂基础培养基上培养传代。接种于LB肉汤中37 ℃培养过夜,10 000 r/min×5 min离心收集细菌后碱裂解法裂解细菌、酚氯仿法抽提纯化DNA、干燥处理后的DNA(包括^{60}Co处理的DNA,^{60}Co DNA)用注射用水重溶,0.8%琼脂糖凝胶电泳检查DNA;Beckman分光光度计(DU-7型)测D_{260}值作DNA定量,根据$D_{260/280}$值比值判断DNA纯度。

1.2.2 *E. coli* DNA的^{60}Co辐照、DNA酶消化处理 干燥*E. coli* DNA封装后行^{60}Co辐照(10^4 Gy, 24 h)灭活内毒素(第三军医大学钴源室完成);DNA酶消化处理(DNased DNA):3.2 mg/ml的*E. coli* DNA溶液1 ml,沸水浴15 min后冰浴5 min,按1∶1(*W*/*W*)的比例加入DNase Ⅰ,9∶1(*V*/*V*)加入10× DNase Ⅰ缓冲液溶解,置37 ℃孵育过夜,酚氯法去蛋白、无水乙醇沉淀、干燥,注射用水重溶至消化前体积。0.8%琼脂糖凝胶电泳检查DNA。

1.2.3 实验动物与分组 清洁级昆明种小白鼠100只(本校实验动物中心提供),体重(19.45±0.15) g/只,随机分为30、20、10、5、1 mg/kg *E. coli* DNA和30 mg/kg ^{60}Co DNA、DNased DNA、CT DNA、DNA抽提流程有机残留物以及空白对照10组,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070299)
作者简介:潘文东(1968-),男,云南省嵩明县人,硕士,主治医师,主要从事严重烧创伤与感染方面的研究。现在云南开远59中心医院外四科,开远 661000
收稿日期:2000-08-04;修回日期:2000-12-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

后两组经腹腔注射 600 mg/ kg D-氨基半乳糖(D-Galactoamine, D-GalN)敏化。每组 10 只,雌雄各半。观察 48 h 内小鼠一般情况及死亡率。

1.2.4 给药方式 给药途径为尾静脉注射,注射体积 200 μl/ 20 g。空白对照组给予注射用水;DNA 抽提流程有机残留物组:注射经酚、氯仿抽提、无水乙醇沉淀、干燥、重溶处理的注射用水;*E. coli* DNA 剂量组:注射 *E. coli* DNA;DNA 酶消化组:按消化前浓度计算,注射经 DNase Ⅰ 处理的 *E. coli* DNA;^{60}Co DNA 组:注射经^{60}Co 辐照处理 *E. coli* DNA;CT DNA 组:注射小牛胸腺 DNA。

1.3 统计学处理

所获资料用 EXCEL 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 *E. coli* DNA 琼脂糖凝胶电泳行为

E. coli DNA 与^{60}Co DNA 的电泳条带完全一致,由完整的基因组 DNA 及其碎片组成;而 DNased DNA 则未见明显条带,显示 DNase Ⅰ 对 *E. coli* DNA 的消化完全,且几乎不含有 RNA,见图 1。

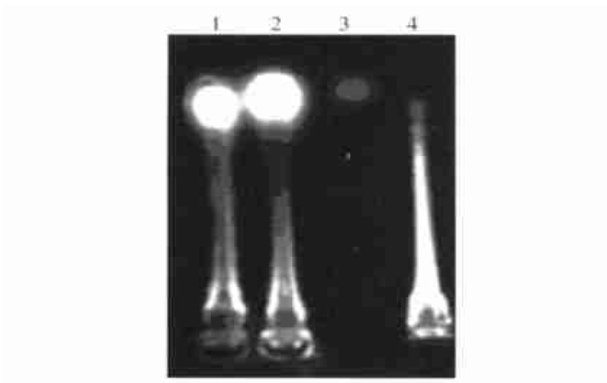


图 1 ***E. coli* DNA** 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1 Results of *E. coli* DNA electrophoresis on 0.8% agarose gel

1: *E. coli* DNA; 2: ^{60}Co DNA; 3: DNased DNA; 4: CT DNA

2.2 动物一般情况

与对照组小鼠比较,*E. coli* DNA 组给药后活动明显减少、进食少、出现寒战、对外界刺激反应差,6~12 h 最为明显,小鼠死亡多发生于该时间段。

2.3 *E. coli* DNA 剂量组给药后不同时间小鼠死亡率

小鼠注射 *E. coli* DNA 后,于 1 h 开始出现死亡,至 7~12 h 达高峰,持续至 24 h,24 h 后未再发生死亡,见图 2。

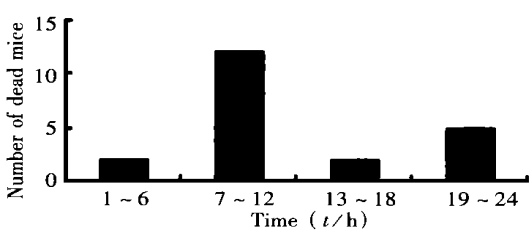


图 2 给予 ***E. coli* DNA** 后不同时间内小鼠的死亡情况

Fig 2 The number of death of mice at different time after given *E. coli* DNA

2.4 *E. coli* DNA 剂量与其小鼠致死作用的关系

E. coli DNA 对小鼠的致死作用具有明显的量效关系,在 *E. coli* DNA 剂量为 1 mg/ kg 即出现死亡,30 mg/ kg 时则动物全部死亡,用概率法求得 LD_{50}= 11.51 mg/ kg,见图 3。

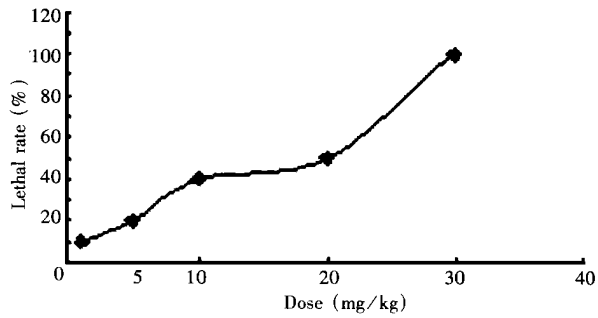


图 3 ***E. coli* DNA** 剂量与其小鼠致死作用的关系

Fig 3 Corelation between doses of *E. coli* DNA and its lethal effects on mice

2.5 *E. coli* DNA 与小鼠死亡的关系的确定

为排除 DNA 抽提流程有机残留物和 LPS 以及其它因素导致的小鼠死亡,我们将 *E. coli* DNA 经 DNase Ⅰ 和^{60}Co 照射处理后,与按实验所用最大剂量 30 mg/ kg,与同等剂量的 *E. coli* DNA 和 CT DNA 分别注射小鼠,同时设立注射用水、DNA 抽提流程有机残留物对照。结果表明,30 mg/ kg *E. coli* DNA、^{60}Co DNA 组小鼠死亡率未见差异(8/ 10、10/ 10, $P > 0.05$);而 DNased DNA、DNA 抽提流程有机残留物和 CT DNA 组均无小鼠死亡(0/ 10),见表 1。说明确实为 *E. coli* DNA 引起的小鼠死亡,而非其它物质。

表 1 ***E. coli* DNA** 与小鼠死亡的关系

Tab 1 Corelation between *E. coli* DNA and death of mice

Group	Dose	*n*	Number of death
Sterile water control※	10 μl/ g	10	0
E. coli DNA	30 mg/ kg	10	10★
DNased DNA	30 mg/ kg	10	0
^{60}Co *E. coli* DNA	30 mg/ kg	10	8※
CT DNA	30 mg/ kg	10	0
Organic residue control※	10 μl/ g	10	0

※: Sensitized with D-GalN 600 mg/ kg *via* peritoneal injection; ★: $P < 0.01$ *vs* control

3 讨论

作为遗传物质的细菌 DNA 曾长期被认为无免疫学活性,虽然真核细胞的 DNA 不能诱导淋巴细胞的活化[3],但近年来有关细菌 DNA 可以诱导活化小鼠 B 细胞、NK 细胞和单核细胞的报道则逐年增加。Sparwasser等[4,5]的研究显示,单链的细菌 DNA 可在体外刺激巨噬细胞,启动核转录因子 NF-κB(Nuclear factor-κB, NF-κB)入核,促进 TNF mRNA 的表达及 TNFα 的产生,并导致经 D-氨基半乳糖敏化的小鼠死亡。Schwartz 等[7]用单链大肠杆菌 DNA 及含 CPG 基元的寡核苷酸灌注小鼠气管,发现灌注处理的小鼠肺泡液中细胞总数及中性粒细胞水平显著升高,表明细菌 DNA 及含 CPG 的寡核苷酸激起了肺泡炎症反应。由于这些实验

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

所用细菌 DNA 均为经解链处理的单链片段，动物模型均经 D-氨基半乳糖敏化，这与自然的细菌感染存在很大差距，且细菌 DNA 与失控性炎症反应综合征的发生是否有关尚无确切的证据。我们认为，在感染过程中细菌 DNA 的释放、降解更可能首先是以双链的形式，但尚无这方面的研究报道。

本实验以双链大肠杆菌 DNA 静脉注射小鼠，观察进入血液的细菌双链 DNA 对小鼠的作用。结果显示双链 *E. coli* DNA 可致小鼠死亡，有明显的量效关系；^{60}Co 辐照处理对双链 *E. coli* DNA 的小鼠致死作用无明显影响，表明小鼠死亡并非由 DNA 中残存的内毒素所致；*E. coli* DNA 经 DNase Ⅰ处理后作用消失，且注射 DNA 抽提流程有机残留物的 D-氨基半乳糖敏化动物模型组未见小鼠死亡，表明小鼠死亡也不是由 DNA 抽提过程中残存的有机物毒性引起，而是仅由双链 *E. coli* DNA 所致，并强烈提示细菌 DNA 参与了失控性炎症反应综合征的发生。小鼠对小牛胸腺 DNA 无反应(0/10)，与以往关于细菌 DNA 与真核细胞 DNA 在免疫活性方面的差别的报道一致[3]，提示真核细胞有可能通过识别细菌 DNA 序列的特点，判断是否存在细菌的侵入并作出反应。

细菌 DNA 参与了诱导炎症反应，为我们对感染病理生理的理解展现了一个新的视野。但在细菌感染的过程中，细菌 DNA 的释放、活化、降解的确切方式如何，在自然感染条件下细菌 DNA 量是否能达到激发炎症反应的水平，细菌 DNA 与其它炎症因素如内毒素的相互作用形式如何等问题仍有待进一步研究。对这些问题的解决将有助于人们对细菌感染的病理机制的全面理解，并为细菌感染的诊断及治疗提供新的策略。

参考文献：

[1] Glauser M P, Zanetti G, Baumgartner J D, *et al*. Sepsis shock: pathogenesis[J]. Lancet, 1991, 338(8 769): 732－736.
[2] 郑 江，袁建成，周 红，等. 杀菌性/通透性增加蛋白(BPI)模拟肽小鼠体内拮抗内毒素的研究[J]. 第三军医大学学报，1998, 20(16): 520－523.
[3] Krieg A M, Yi A K, Maston S, *et al*. CPG motifs in bacterial DNA trigger directly B-cell activation[J]. Nature, 1995, 374(6 522): 546－549.
[4] Sparawasser T, Miethke T, Lipford G B, *et al*. Bacterial DNA causes septic shock[J]. Nature, 1997, 386(6 623): 336－337.
[5] Sparawasser T, Miethke T, Lipford G B, *et al*. Macrophage sense pathogens *via* DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock[J]. Eur J Immunol, 1997, 27(7): 1 671－1 679.
[6] 奥斯特 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等编. 颜子颖，王 海 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京：科技出版社，1998. 29－35.
[7] Schwartz D A, Quinn T J, Thorne P S. CPG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory track[J]. J Clin Invest, 1997, 100(1): 68－73.

(编辑 陈聪连)

文章编号：1000-5404(2001)04-0397-01

经验与短篇

叶酸改善促红细胞生成素对肾性贫血疗效的观察

Observation on the therapeutic effect of erythropoietin with folic acid supplement on nephrotic anemia

阎振成，朱妙珍，张建国，王惠民 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所肾内科，重庆 400042)

贫血是慢性肾衰的主要临床表现之一，现研究认为肾性贫血主要是由促红细胞生成素相对或绝对不足引起的。1986 年 Winearl 等[1]首先使用促红细胞生成素(EPO)治疗肾性贫血取得较好的疗效，现临床上广泛使用。但仍有应用 EPO 疗效不佳者，但原因不明。如何提高 EPO 的疗效，是当务之急解决的问题。我们观察叶酸对 EPO 疗效的改善作用，现报告如下。

1 材料与方法

研究对象：均为我院住院治疗的终末期肾病患者 75 例，应用 EPO 治疗 3～24 月，治疗前血红蛋白均低于 90 g/L，2 周内未接受输血。均除外感染、甲旁亢、骨髓病变、铝中毒、铁缺乏、慢性失血等影响因素。

用药方法：75 例终末期肾病患者，予利血宝 50～150 U/kg 皮下注射，2～3 次/周，治疗期间根据临床及实验室检查结果，补充铁、阿法 D_3，疗效不佳者作为实验组，予叶酸 10 mg/d，有效者作为对照组。如若补充叶酸后仍无效，行骨髓活检。

观察指标：用药后每月查血红蛋白、HCT、MCV、铁蛋白、血清铁，用药前用放射免疫分析法测定叶酸、$VitB_{12}$ 水平。

疗效判定标准：疗效判定标准分为有效和无效，有效：治疗 3 月后，HCT 较治疗前升高＞5%，Hb 升高＞15 g/L 以上者；无效：治疗后上述两项低于标准者。

统计学处理：所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验。

2 结果

EPO 治疗前后 HCT、Hb 的变化：75 例经 EPO 治疗后 54 例有效，作为对照组。21 例患者效果不佳，作为实验组，两组治疗后差异明显($P<0.01$)。

实验组除继续使用 EPO 外，加服叶酸后 Hb、HCT、MCV 的变化：加服叶酸后，15 例患者 HCT 由(0.20±0.042)升至(0.31±0.041)，Hb 由(61±3.3)g/L 升至(89±4.5)g/L($P<0.01$)；MCV 由单纯 EPO 治疗前(86.6±4.5)fl 明显增加至(95.1±2.0)

(下转 400 页)

作者简介：阎振成(1966－)，男，河北省张家口市人，硕士，主治医师，主要从事肾小球疾病的发病机制方面的研究，发表论文 10 余篇。电话：(023)68757446

收稿日期：2000-03-20；修回日期：2000-09-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net