

## 猪胎盘脂多糖的分离纯化及其对 脾淋巴细胞的诱导作用

吴梧桐 高向东

(中国药科大学生物化学教研室, 南京)

**摘要** 健康猪胎盘经酶解, 提取, 氯仿-正丁醇除杂蛋白与5'-磷酸二酯酶除核酸, 再经透析, 乙醇沉淀, DEAE-Dextran-Gel A-25层析制得纯品猪胎盘脂多糖(简称P-脂多糖)。分析结果表明, P-脂多糖是一种类酸性粘多糖与脂质的共价结合物, 分子量约为75kD, 分子中含11种单糖组成, 其中半乳糖含量最高, 其次为岩藻糖, 氨基已糖和已糖醛酸。体外实验发现P-脂多糖能明显诱导小鼠淋巴细胞的增殖, 强烈地促进淋巴细胞的DNA合成, 刺激指数约为9.3, 最适刺激浓度50~60 $\mu$ g/mL, 最适刺激时间48小时, 同时能明显促进淋巴细胞的蛋白质合成。实验还证实, P-脂多糖对脾淋巴细胞的增殖诱导作用并不是通过依赖于白间素-2(IL-2)途径, 而是通过增强淋巴细胞IgM的表达, 表明P-脂多糖是一种促B-淋巴细胞分裂剂。

**关键词:** 猪胎盘脂多糖, 淋巴细胞增殖, 细胞分裂素

菌类脂多糖是一种B-淋巴细胞分裂剂<sup>[1]</sup>, 它能增加细胞内的钠离子浓度, 促进B-淋巴细胞表面的IgM表达<sup>[2]</sup>, 但因有明显毒副作用, 迄今尚未正式供作药用。我们以健康猪胎盘为原料经酶解, 提取, 纯化, 制得了纯品P-脂多糖, 经药理实验证实, 本品能改善和增强机体的免疫功能, 在临床上对慢性支气管炎, 支气管哮喘的治疗和感冒的预防等均有较好疗效<sup>[3]</sup>, 且无热原与过敏反应<sup>[3]</sup>。本文进一步研究了P-脂多糖的分离纯化, 组成分析以及P-脂多糖对小鼠脾淋巴细胞的增殖诱导作用, 还观察了P-脂多糖对B-淋巴细胞分裂与IgM表达的促进作用, 证实本品是一种B-淋巴细胞促分裂剂。

### 材 料 与 方 法

1. 猪胎盘: 健康新鲜猪胎盘, 剪去脐带等, 用水洗净于70°C烘干, 密封保存, 用前粉碎。
2. 实验动物: 小鼠C<sub>57</sub>BL<sub>10</sub>, 鼠龄40~60天。
3. 5'-磷酸二酯酶: 比活20~30u/mg, 由中国科学院上海生化所酶室提供。
4. 糖醛酸的定量: 采用硫酸-咪唑比色法<sup>[4]</sup>。

5. 氨基已糖的测定: 采用 Ludo Wley 法<sup>[5]</sup>。
6. 多糖组成分析及纯度检查: 均按作者发表的方法进行<sup>[6]</sup>。
7. 脾淋巴细胞的分离与培养: 按作者发表的方法进行<sup>[7]</sup>。
8. 淋巴细胞 DNA 合成与蛋白质合成分析: 均采用先前作者发表的方法进行<sup>[8]</sup>。
9. B-淋巴细胞 IgM 阳性率分析: 采用 Philip 介绍的荧光抗体结合法<sup>[2]</sup>。

## 结 果

### 一、P-脂多糖的提取与纯化

1. 提取: 猪胎盘粉10g, 加水100mL, 搅拌均匀后, 加入5g 新鲜胰浆及适量苯酚, 用2mol/L NaOH 调节 pH 为8.0~8.5, 于37°C 连续水解12小时。水解液加入1%十二烷基硫酸钠, 在60°C 保温1小时, 以解离核蛋白。冷却后, 加入1/8体积的氯仿-正乙醇(3:1) 振荡, 分取上层液。用50mg 5'-磷酸二酯酶处理, 在pH5.3, 75°C作用1~1.5小时, 再用1/8体积的三氯醋酸-正丁醇(含15%三氯醋酸) 除尽杂蛋白, 然后对蒸馏水透析至无 $SO_4^{2-}$ , 透析液离心后, 分取清液加入三倍量95%乙醇, 离心收集沉淀, 用丙酮, 乙醚脱水, 真空干燥, 得P-脂多糖粗品。

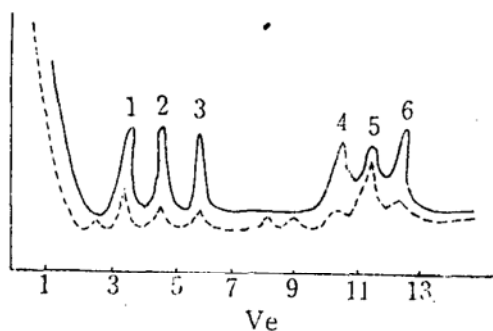


Fig.1 The  $V_e$  of acetylating derivatives of P-lipopolysaccharide hydrolyzates with the  $V_e$  of standardized product

1. L-fucose 2. L-arabinose 3. D-xylose
  4. D-mannose 5. D-galactose 6. D-glucose
- Group of sample  
 —— Group of standard

2. 纯化: 粗品P-脂多糖500mg溶于5mL 0.1mol/L NaCl, 离心去不溶物, 上样于DEAE-dextran-Gel A-25(氯型)层析柱(2.5×17.6cm), 用0.1mol/L NaCl洗至无中性多糖流出(用蒽酮试剂检查), 然后改用500mL 3.9mol/L NaCl对500mL 0.1mol/L NaCl进行直线梯度洗脱, 分部收集, 经鉴定合并主峰成分用三倍乙醇沉淀, 干燥制得P-脂多糖纯品。经Sephadex G-200层析<sup>[6]</sup>, 用标准分子量Dextran对照测得分子量约为75kD。

### 二、P-脂多糖的纯度检查与组成分析

1. 电泳分析: 本品经聚丙烯酰胺凝胶电泳阿利新兰染色呈现一条均匀区带<sup>[3]</sup>。

2. 紫外光谱: 本品200mg/mL的水溶液在260nm与280nm处均无特征吸收, 说明本品不含蛋白质与核酸类物质。

3. 红外光谱: 本品1%浓度KBr压片, 其红外特征吸收峰为 $3300cm^{-1}$ ,  $2900cm^{-1}$ ,  $1650cm^{-1}$ ,  $1600cm^{-1}$ ,  $1550cm^{-1}$ ,  $1400cm^{-1}$ ,  $1220cm^{-1}$ ,  $1030cm^{-1}$ , 是一典型多糖类物质的红外特征光谱。

4. 气相色谱分析: P-脂多糖酸水解物的还原乙酰化衍生物用气相色谱分析, 结果见Fig.1。通过气相色谱分析及硫酸呋唑比色测定与氨基已糖分析, 表明P-脂多糖分子中含有11种单糖组分, 已鉴定的有8种: 岩藻糖, 阿拉伯糖, 木糖, 甘露糖, 半乳糖, 葡萄糖, 已糖醛酸与氨基已糖。其中以半乳糖含量最高, 其次是岩藻糖, 氨基已糖和已糖醛酸。

### 5. 脂质的鉴定

脂质的分离：*P*-脂多糖5g溶于100mL水中，用等量乙醚抽提三次，蒸去乙醚，用纸片法检查，未见有脂质残留物。故基本上可以排除样品含有游离脂质的可能性。水层调至pH2.0，置沸水浴中水解4小时，水解液调至pH6.0，过滤，滤液再用等量乙醚提取三次，合并醚层，蒸去乙醚，得淡棕黄色油状物（25mg）。

脂质红外光谱：将上述分离获得的棕黄色油状物以液膜法进行红外光谱分析，结果呈现脂肪酸类的特征红外光谱：3600~2500 $\text{cm}^{-1}$ 宽带（脂肪酸羧酸的—C=O吸收带），1400 $\text{cm}^{-1}$ （脂肪酸羟基对称伸缩振动）以及1210 $\text{cm}^{-1}$ （C—O伸缩振动）。

脂肪酸鉴别反应：取上述分离获得的棕黄色油状物用氧肟酸盐法和酯化反应法鉴别<sup>[9-10]</sup>，结果均呈阳性反应。

### 三、*P*-脂多糖对脾淋巴细胞的增殖诱导作用

#### 1. *P*-脂多糖对脾淋巴细胞分裂增殖作用的影响

小鼠脾淋巴细胞 $5 \times 10^6$  细胞/mL 与*P*-脂多糖（50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）一起培养，每隔一定时间，取出适量细胞悬液，染色测定细胞数。结果见Fig 2。由图（Fig. 2）可见*P*-脂多糖能明显促进脾淋巴细胞的分裂增殖，最佳刺激时间为48小时。

#### 2. *P*-脂多糖对脾淋巴细胞DNA合成的影响

以不同浓度的*P*-脂多糖刺激培养的小鼠脾淋巴细胞（ $2.5 \times 10^6$  细胞/mL），于不同时间，取出0.2mL培养物置于多孔培养板，加入1 $\mu\text{Ci}^3\text{H-TdR}$ （30 $\text{Ci}/\text{mmol}/\text{L}$ ）继续培养6小时，收集细胞，按先前报道的方法测定淋巴细胞的DNA合成<sup>[8]</sup>。结果见图Fig3与图Fig4，结果表明：*P*-脂多糖诱导淋巴细胞DNA合成的合适浓度是50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，最佳刺激时间是48小时。此结果与*P*-脂多糖对淋巴细胞增殖诱导作用的动态过程基本同步。经多次测定，在最佳反应条件下（*P*-脂多糖50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，培养48小时），

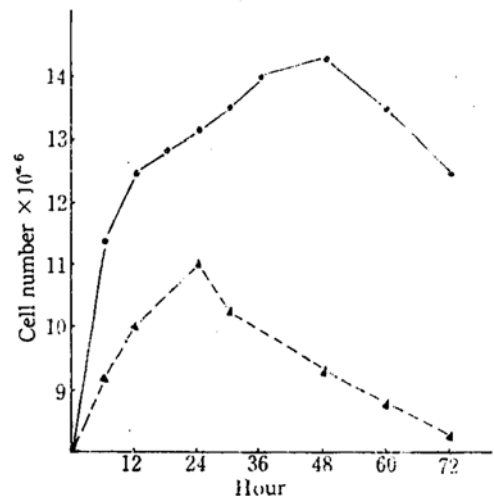


Fig.2 Effect of *P*-lipopolysaccharide mitosis and on proliferation in mice spleen lymphocytes  
..... Group of control  
—•— Group of *P*-lipopolysaccharide

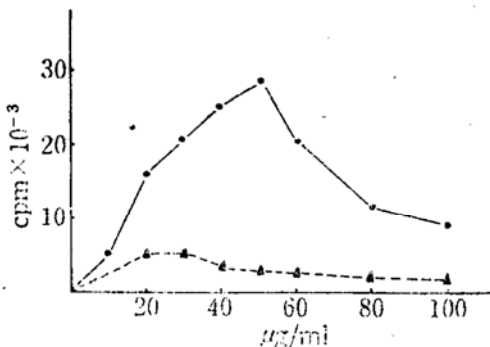


Fig.3 Effect of *P*-lipopolysaccharide concentration on DNA synthesis in Lymphocytes  
△...△ Group of control  
•—• Group of *P*-lipopolysaccharide

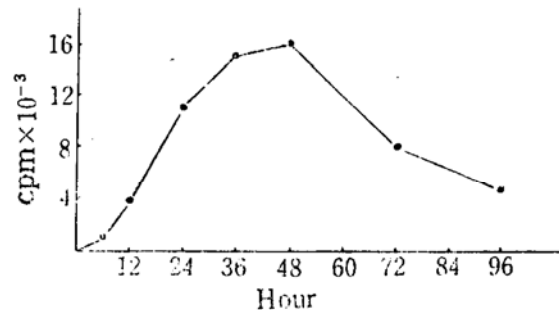


Fig.4 Time course of DNA synthesis in lymphocytes stimulated with *P*-lipopolysaccharide

*P*-脂多糖促进淋巴细胞合成DNA的刺激指数达到9.3以上。(刺激指数 = 实验值 cpm/对照值cpm)

### 3. *P*-脂多糖对脾淋巴细胞蛋白质生物合成的影响

小鼠脾淋巴细胞  $2 \times 10^7$  细胞/mL, 在 *P*-脂多糖 ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激下培养, 同时加入  $30 \mu\text{Ci}^3\text{H-Val}$  (最后 $^3\text{H-Val}$ 比活为  $25 \text{Ci}/\text{mmol}/\text{L}$ ), 于不同时间收集1mL培养物, 按先前报道的方法分析淋巴细胞的蛋白质合成动态<sup>[8]</sup>。结果见 Fig. 5, 由 Fig. 5 可见 *P*-脂多糖能明显促进淋巴细胞的蛋白质合成, 其作用动态过程与细胞的分裂增殖时的基本相似。

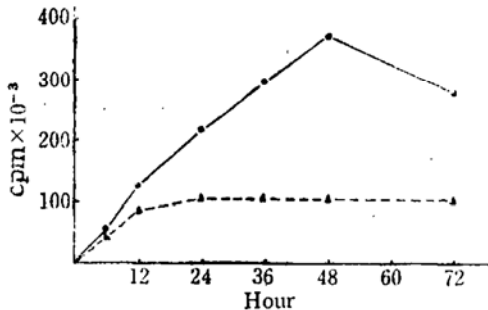


Fig. 5 Effect of *P*-lipopolysaccharide on protein biosynthesis in spleen lymphocytes

△...△ Group of control  
●-● Group of *P*-lipopolysaccharide

### 四、*P*-脂多糖对淋巴细胞增殖作用的诱导途径

#### 1. 抗 IL-2 单克隆抗体与阿斯匹林对 *P*-脂多糖诱导淋巴细胞增殖作用的影响

在用 *P*-脂多糖刺激淋巴细胞的同时加入适量抗 IL-2 单克隆抗体或阿斯匹林 ( $300 \mu\text{mol}/\text{L}$ ), 同时加入  $[^3\text{H}]\text{TdR}$  观察其参入的 cpm 值。结果表明抗 IL-2 单克隆抗体不抑制 *P*-脂多糖对淋巴细胞的增殖诱导作用, 阿斯匹林也不增加 *P*-脂多糖对淋巴细胞的增殖诱导作用 (Table 1)。由于 IL-2 是 *T*-淋巴细胞群体间的重要介导物质, 对活化的 *T*-淋巴细胞的增殖作用是必需的, 而阿斯匹林已证明能增强 IL-2 的产生<sup>[11]</sup>, 上述实验结果表明, *P*-脂多糖对淋巴细胞增殖的诱导作用与 IL-2 的产生并无直接关系, 说明淋巴细胞对 *P*-脂多糖的应答反应可能不是通过依赖于 IL-2 的 *T*-淋巴细胞系统。

Table 1. Effect of anti-IL-2 monoclonal antibody and aspirin on lymphocyte proliferation stimulated with *P*-lipopolysaccharide (CPM ± SD) n = 5

Treatment	control	ConA ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ )	<i>P</i> -lipopolysaccharide ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ )
Experiment No. 1			
No anti-IL-2 monoclonal antibody	1571 ± 125	10949 ± 878	13166 ± 681
Add anti-IL-2 monoclonal antibody	1493 ± 402	26481 ± 2117	13633 ± 314
Experiment No. 2			
No aspirin	258 ± 30	14462 ± 530	9135 ± 310
Add aspirin	298 ± 20	32045 ± 217	8972 ± 210

#### 2. *P*-脂多糖对淋巴细胞表达 IgM 的诱导作用

小鼠脾淋巴细胞 ( $5 \times 10^6$  细胞/mL) 在 *P*-脂多糖 ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激下培养, 于不同时间取 0.1 mL 细胞悬液, 用新鲜培养介质洗涤三次, 加入与荧光素结合的兔抗鼠 IgM 抗体, 依照 Philip 介绍的荧光抗体结合法<sup>[2]</sup> 进行染色反应, 然后用荧光显微镜计数免疫球蛋白呈阳性反应的细胞数, 结果如 Fig. 6。由 Fig. 6 可见, 在 *P*-脂多糖的刺激下, 表达 IgM 的细胞数量明显增加, 在诱导 24 小时后, 表达 IgM 的细胞数达到高峰。这说明 *P*-脂多糖对脾淋巴细胞的增殖诱导作用是通过 *B*-淋巴细胞系统, 以增强体液免疫功能, 所以 *P*-脂多糖是一种促 *B*-淋巴细胞分裂剂。

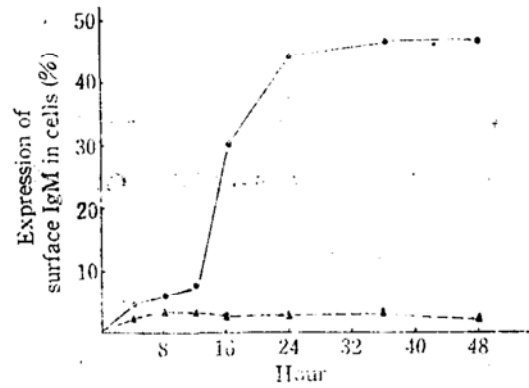


Fig. 6 Effect of *P*-lipopolysaccharide on the expression of immunoglobulin in lymphocytes  
 ..... Group of control  
 — Group of *P*-lipopolysaccharid

## 讨 论

大量的研究证明, 纯化的菌体脂多糖是一种多克隆 *B*-淋巴细胞促分裂剂, 对 *B*-淋巴细胞具有强烈的促进增殖作用。但由于菌体的毒副作用, 尤其会引起严重的热原质反应而不能用于临床。由猪胎盘分离的 *P*-脂多糖同样具有明显的免疫促进剂作用, 且经适当处理后已制成安全、有效的注射剂, 广泛用于治疗慢性气管炎、支气管哮喘和用作感冒预防药。化学组成分析结果表明, *P*-脂多糖是一种类酸性粘多糖与脂质的共价结合物, 其组成与一般酸性粘多糖有较大差异。应用紫外分光光度法, 双缩脲法, Folin 酚试剂法, 硫酸汞法以及氨基酸自动分析法反复分析证明, 本品不含有蛋白质成分, 故可排除本品含有脂蛋白组成的可能性。

*P*-脂多糖既不增加淋巴细胞产生 IL-2, 也不受到抗 IL-2 单克隆抗体的拮抗作用, 对阿司匹林增强 IL-2 的产生也无协同作用, 却能明显增加表达 IgM 的淋巴细胞数, 说明 *P*-脂多糖是一种典型的 *B*-淋巴细胞促分裂剂。已有研究证明, 菌体脂多糖诱导细胞表面 IgM 表达的基本作用是活化了  $[\text{Na}^+]$  摄取系统<sup>[2]</sup>, *P*-脂多糖是否具有类似作用机制尚需进一步阐明。

## 参 考 文 献

- [1] Christopher J P et al. *J Immunol*, 1978, 121 (2): 641.
- [2] Philip M R, Lewis C C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80: 7547.
- [3] 吴梧桐等. 脏器生化制药, 1983, 1, 46.
- [4] Dishe Z. *J Biol Chem*, 1947, 167: 189.
- [5] Ludo W J et al. *Anal Biochem*, 1967, 19: 80.
- [6] 吴梧桐等. 生物化学与生物物理学报, 1984, 16: 394.
- [7] Wutong W et al. *Journal of Leukocyte Biology*, 1985, 38: 531.
- [8] Wutong W et al. *Cellular Immunol*, 1986, 100: 224.
- [9] 曾昭琼. 有机化学实验, 北京, 人民教育出版社, 1981, 220
- [10] 陈耀组. 有机分析, 北京, 高等教育出版社, 1981, 359.
- [11] Marion M Z et al. *Immunopharmacology*, 1985, 9: 189.

# Isolation and Purification of Lipopolysaccharide From Pig Placenta and its Abilities to Induce Lymphocytes Proliferation

Wu, Wu-tong      Gao, Xiang-dong

*(Department of Biochemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing)*

**Abstract** Placenta powder from health pig placenta was suspended in water and treated with enzyme. Protein in extract was removed by chloroform-n-butanol partition. The supernatant was treated with phosphodiesterase, then dialysed and precipitated by alcohol.

The crude lipopolysaccharide was further purified by DEAE-dextran-gel A-25. The pure lipopolysaccharide obtained was identified. The results showed that it is composed of acid mucoitin and lipid and contains 11 kinds of sugars, mainly galactose, fucose, hexosamine and glucuronic acid. The molecular weight was 75000 by chromatography.

The lipopolysaccharide dramatically stimulated proliferation, DNA and protein synthesis of lymphocytes. The stimulatory index of DNA synthesis was about 9.3. A maximum proliferation was induced by treatment of 50-60 $\mu$ g/mL of lipopolysaccharide for 48 hours. It was also demonstrated that the lipopolysaccharide induced lymphocytes proliferation by an interleukin-2-independent pathway and by increasing expression of IgM in lymphocytes. Therefore the lipopolysaccharide from pig placenta is a polyclonal B-cell mitogen.

**Key words:** Lipopolysaccharide from pig placenta,      Lymphocytes proliferation,  
Mitogen