

内毒素结合肽 P1 和 P2 抗内毒素活性的实验研究*

孙亚丽¹, 郭 华¹, 马建洲²

(1. 陕西省人民医院病理科, 西安 710068; 2. 西安解放军第 323 医院眼科, 西安 710054)

摘要:目的 研究基于脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)结合蛋白的新型内毒素结合肽 P1 和 P2 的抗内毒素活性。方法 设计并合成内毒素结合肽 P1 和 P2。体外实验取一名健康志愿者静脉血 100 ml 分离的外周血单个核细胞(PBM), 分为正常对照组、LPS 组、阳性对照组 LPS(1 mg/L)+多黏菌素 B(12.5 mg/L)、P1 组 LPS(1 mg/L)+P1(2 mg/L, 5 mg/L, 12.5 mg/L)、P2 组 LPS(1 mg/L)+P2(2 mg/L, 5 mg/L, 12.5 mg/L)。ELISA 方法检测各组上清液中 TNF- α 和 IL-6 的浓度。体内实验将 40 只昆明小鼠平均分为四组, 每组 10 只, 分别为空白对照组、LPS 模型组、LPS+P1 治疗组和 LPS+P2 治疗组。取各组小鼠肺脏和肝脏组织制作 HE 切片, 观察组织形态学变化。**结果** ①与 1 mg/L LPS 比较, 1 mg/L LPS+12.5 mg/L 的 P1 以及 1 mg/L LPS+3 种浓度 P2 刺激后, PMBC 培养上清液中 IL-6 及 TNF- α 的水平均明显降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$), 12.5 mg/L 的 P2 与阳性对照 PMBC 作用后上清液中 TNF- α 浓度比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。②组织形态学显示, 模型组小鼠肝小叶中央静脉及肝窦扩张充血, 肝细胞浊肿, 偶见肝细胞嗜酸性变及点状坏死。肺间质充血水肿, 灶性出血, 肺泡腔狭小。10 mg/kg P1 处理组肝细胞浊肿较模型组减轻, 肺间质充血水肿减轻。10 mg/kg P2 处理组, 肝小叶中央静脉及肝窦充血程度减轻, 肺间质充血水肿明显减轻。**结论** 体内外实验表明合成内毒素结合肽 P1 和 P2 对 LPS 导致的机体损伤具有拮抗作用。体外实验结果还表明, 12.5 mg/L P2 对 TNF- α 或 IL-6 的释放抑制作用较为肯定。

关键词:脂多糖;内毒素结合肽 P1;内毒素结合肽 P2; 抗内毒素活性

中图分类号:R-332 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2017)06-081-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.06.023

Study on the Anti-Endotoxin Activity of Human Endotoxin Binding Peptide P1 and P2

SUN Ya-li¹, GUO Hua¹, MA Jian-zhou²

(1. Department of Pathology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China;

2. Department of Ophthalmology, the PLA 323th Hospital, Xi'an 710054, China)

Abstract: Objective To study the antiendotoxin activity of P1 and P2 based on the lipopolysaccharide binding protein. **Method**

P1 and P2 were designed and obtained. In vitro test, peripheral blood mononuclear cell(PBMC) were extracted from volunteer 100ml venous blood, the experiment group was arranged as: control group, positive control group, LPS group, LPS+P1 (2 mg/L, 5 mg/L, 12.5 mg/L) group and LPS+P2 (2 mg/L, 5 mg/L, 12.5 mg/L) group, TNF- α and IL-6 of supernatant liquor in every group were detected by ELISA. In vivo, 40 Kunming mice were randomly divided into four groups with ten mice each group: control group, model group, LPS+P1 and LPS+P2 group. Pathologic changes of lung and liver tissues were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. **Results** The serum level of IL-6 and TNF- α in 12.5 mg/L P1 and 2 mg/L, 5 mg/L, 12.5 mg/L P2 treatment group were lower than that in model group, the difference was statistically significant (all $P < 0.01$). Serum level of TNF- α or IL-6 in 12.5 mg/L P2 treatment group were similar to that in PMB treatment group, and there was no statistically significant difference ($P > 0.05$). Histology morphology finding showed that central veins of liver and hepatic sinusoid congestion, hepatic cellular edema existed, occasionally, acidophilic change and spotty necrosis were found, pulmonary interstitial edema, focal hemorrhage, alveolar space stenosis existed. As regards 10 mg/kg P1 treatment group mice, hepatic cellular edema and pulmonary interstitial edema ameliorated. About 10 mg/kg P2 treatment group mice, veins of liver and hepatic sinusoid congestion obviously ameliorated, mild pulmonary interstitial edema existed. **Conclusion** The results indicated P1 and P2 had antiendotoxin effect, in vivo and vitro, for 12.5 mg/L P2, its inhibition effect for TNF- α or IL-6 release was positive.

Keywords: lipopolysaccharide; endotoxin binding peptide P1; endotoxin binding peptide P2; antiendotoxin activity

内毒素即脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)是 LBP 激活一系列信号传导通路, 导致单核/巨噬细胞释放过量炎性介质如 TNF- α , IL-6 和 IL-1 等, 致革兰阴性菌外膜的重要组成成分, 它通过结合

* 基金项目: 陕西省自然科学基金, 资助项目编号 2010JQ4026。

作者简介: 孙亚丽(1975—), 女, 研究生, 主治医师, 研究方向: 肿瘤病理, E-mail: ylisun@163.com。

通讯作者: 马建洲(1973—), 男, 研究生, 主治医师, 研究方向: 眼科肿瘤, E-mail: 153968487@qq.com。

机体产生炎症反应^[1,2]。氨基末端 LBP 含内毒素结合位点,其中碱性氨基酸的突变影响到其结合内毒素功能^[3],研究表明富含碱性氨基酸或正电荷是抗内毒素制剂的共有特性^[4~6],LBP109~138 是 LBP 分子中内毒素类脂 A 的主要结合位点,对应多肽命名为 P1,增加 P1 分子中赖氨酸数量后得到 P2,DNAsis 软件分析 P2 具有更强的阳性电荷数及疏水性,可能会具有较 P1 更高效的抗内毒素活性。进一步通过体内外试验对比研究 P1 与 P2 的抗内毒素功能。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康清洁级雄性昆明小鼠 40 只,平均体重 20 g,由西安交通大学医学院实验动物中心提供。志愿者来自健康体检人群。

1.2 试剂及仪器 RPMI1640(美国 PPA);脂多糖(LPS)(美国 sigma 公司);人 TNF- α ELISA 试剂盒,人 IL-6 ELISA 试剂盒(美国 Genzyme 深圳晶美公司分装);MVLTIKAN MK3 酶标仪(美国 Thermo 公司);人淋巴细胞分离液(天津灏洋);CO₂ 孵箱(美国 Thermoforma);BX51 光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 内毒素结合肽合成:内毒素结合肽 P1 为 LBP109~138,经 DNAsis 软件分析,将其 113 及 126 位谷氨酰胺代替为赖氨酸以后得到 P2,P1,P2 由上海波泰生物科技有限公司合成。

1.3.2 P1 和 P2 作用外周血淋巴细胞的免疫效应实验。

1.3.2.1 人外周血单个核细胞的分离:取一名健康志愿者肝素抗凝静脉血 100 ml 与等量生理盐水充分混匀,用滴管沿管壁缓慢加入淋巴细胞分离液(比重 1.077 \pm 0.001),1 500 r/min 水平离心 20 min;用毛细管插到云雾层,吸取单个核细胞;加入 5 倍以上体积的生理盐水,1 500 r/min 离心 10 min,洗涤细胞两次;离心后弃上清,加入含有 10 ml/dl 小牛血清的 RPMI1640,重悬细胞,0.2 g/dl 台盼兰染液进行细胞活力检测。

1.3.2.2 ELISA 法检测各组 IL-6 及 TNF- α 的浓度:RPMI1640 培养液漂洗 2 次后吹打混匀,调整细胞密度为 5 \times 10⁶ 个/ml,加入 96 孔培养板每孔 200 μ l,内毒素(终浓度 1 mg/L)及各浓度内毒素结合肽 50 μ l 在 37 $^{\circ}$ C 共孵育 30 min,分组如下: LPS 组:LPS(1mg/L) \times 5 孔;阳性对照组 LPS(1 mg/L)+多黏菌素 B(12.5 mg/L) \times 5 孔,P1 组: LPS(1 mg/L)+P1(2 mg/L,5 mg/L,12.5 mg/L) \times 5 孔;P2 组:LPS(1 mg/L)+P2(2 mg/L,5 mg/L,12.5 mg/L) \times 5 孔,正常对照组:不作任何处

理。于 37 $^{\circ}$ C,含 5 ml/dl CO₂ 的孵箱中孵育 5 h。吸取悬液于 1.5 ml EP 管,4 $^{\circ}$ C 1 000 r/min 离心 10 min,取上清 200 μ l,检测培养上清中 IL-6 及 TNF- α 的浓度。

1.3.3 P1 和 P2 作用小鼠的组织病理改变实验:将 40 只昆明小鼠随机分组:正常对照组、模型组、P1 治疗组和 P2 治疗组,每组 10 只。腹腔注射制造内毒素(LPS 5 mg/kg)小鼠模型。P1 或 P2 处理组在注射内毒素后立即腹腔内注射 10 mg/kg P1 或 P2。内毒素及药物均溶于生理盐水,注射总体积 0.2 ml。6 h 后,颈椎脱臼处死并观察各组小鼠肺、肝脏的病理变化。

1.4 统计学分析 SAS8.2 统计软件进行分析,所有数据资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 P1 和 P2 的电荷特性及疏水性 经 DNAsis 软件分析,改建后的 P2 具有更强的疏水性及正电荷数。所带正电荷数由+5 增至+7,平均疏水性由 0.15 增为 0.31。

2.2 外周血单核细胞(PBMC)培养上清液中 IL-6,TNF- α 浓度 1 mg/L LPS 刺激后,PBMC 上清液中 IL-6 或 TNF- α 浓度均有升高,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与 LPS 组相比,12.5 mg/L 的 P1 或 2 mg/L,5 mg/L,12.5 mg/L 的 P2 处理组,上清液中 IL-6 及 TNF- α 的浓度均降低,差异均有统计学意义(IL-6: $F=17.469$, $P<0.01$;TNF- α : $F=19.901$, $P<0.01$);5 mg/L,12.5 mg/L P1 或 P2 处理组 IL-6 浓度均低于 2 mg/L P1 或 P2 处理组($P<0.05$),12.5 mg/L P2 处理组 TNF- α 浓度低于 2 mg/L P2 处理组,差异均有统计学意义($P<0.05$);12.5 mg/L P2 与等浓度 PMB 应用组 TNF- α 或 IL-6 的浓度相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见表 1。

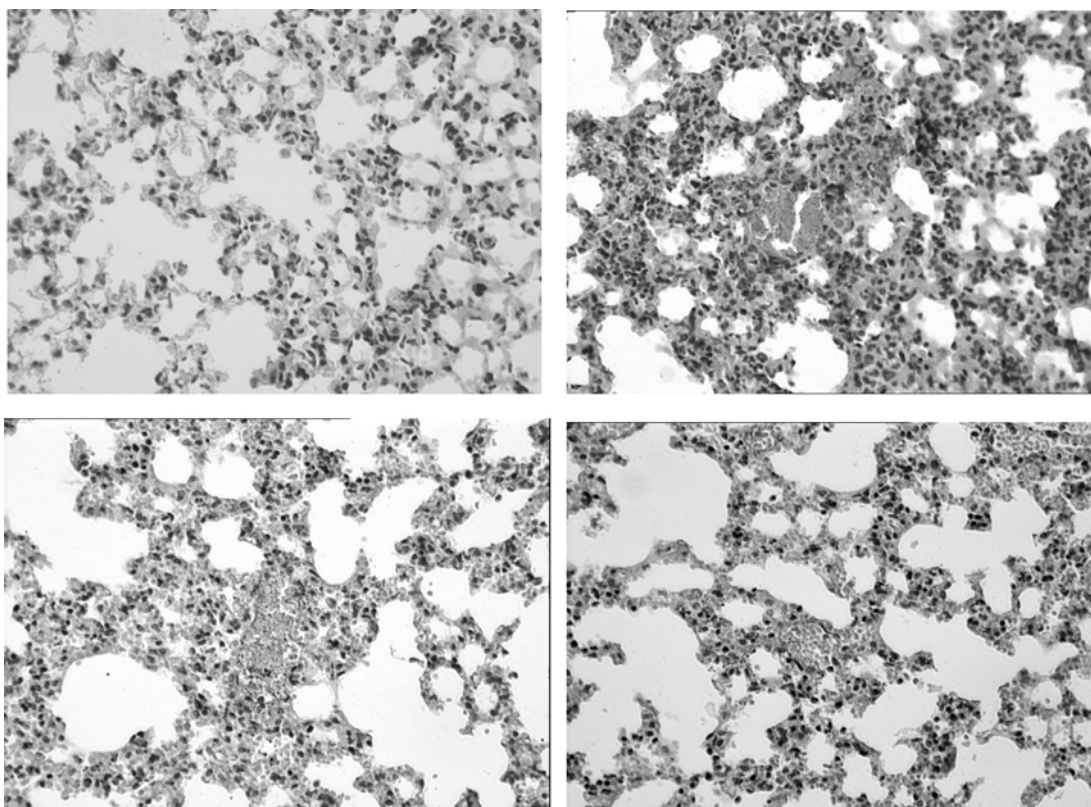
表 1 外周血单核细胞培养液中 IL-6 或 TNF- α 浓度比较(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

分 组	浓度(pg/ml)	
	IL-6	TNF- α
LPS	115.9 \pm 16.8	65.2 \pm 0.4
LPS+2 mg/L P1	95.9 \pm 20.3 [#]	60.9 \pm 1.5 [#]
LPS+5 mg/L P1	60.6 \pm 18.8 ^{*◆}	58.7 \pm 2.2 [#]
LPS+12.5 mg/L P1	61.3 \pm 25.0 ^{*◆}	56.7 \pm 3.7 ^{*#}
LPS+2 mg/L P2	69.2 \pm 10.3 ^{*#}	57.5 \pm 1.6 ^{*#}
LPS+5 mg/L P2	50.7 \pm 15.2 ^{*▲}	56.5 \pm 1.5 ^{*#}
LPS+12.5 mg/L P2	36.3 \pm 6.3 ^{*▲}	52.3 \pm 1.9 ^{*▲}
LPS+12.5 mg/L PMB	41.9 \pm 7.8 [*]	48.9 \pm 6.8 [*]
Normal	24.9 \pm 4.6 [*]	10.9 \pm 5.7 [*]

注: * vs LPS $P<0.01$; vs PMB [#] $P<0.01$; vs 2 mg/L P2 \blacktriangle $P<0.05$; vs 2 mg/L P1 \blacklozenge $P<0.05$ 。

2.3 小鼠主要脏器组织形态学改变

2.3.1 肺脏的组织学变化,见图1。



图A:正常对照组肺泡间隔完整,间质内未见水肿及炎细胞浸润 HE×400;图B:模型组肺间质充血水肿,大部分肺泡间隔充血,灶性肺泡内出血,肺泡腔狭小 HE×400;图C:10 mg/kg P1处理组肺损伤有一定程度减轻,肺泡腔内渗出及肺泡间质充血水肿减轻 HE×400;图D:10 mg/kg P2处理组肺损伤明显减轻,仅见轻度肺间质及肺泡间隔充血水肿 HE×400。

图1 各组小鼠肺组织形态学改变

2.3.2 肝脏组织学变化,见图2。

3 讨论 内毒素所致脓毒症及多器官功能障碍综合征是目前临床面临的难题,抗内毒素研究涉及到内毒素作用的各个环节。随着对内毒素结构和作用的深入研究,以及生物信息研究的飞速发展,以内毒素为药物靶点,借助计算机数值模拟,对天然内毒素结合蛋白进行改性及针对致病靶点进行的药物设计提供了可能。而且小分子肽空间阻隔小,容易与LPS的LipidA结合而起到拮抗内毒素作用。利用生物信息学软件进行药物设计及筛选会加速抗内毒素药物的研究。体内LBP通过氨基端结合LPS,羧基端结合单核/巨噬细胞表面受体CD14,在内毒素结合受体方面起着重要的桥梁作用,发生脓毒血症时,伴随体内细胞因子浓度升高,病人肝脏内LBP mRNA表达大大提高。因此阻断LPS-LBP的结合能有效减弱或抑制LPS诱导的炎症反应。

LBP氨基末端正电荷的富集对内毒素的结合起着不可低估的作用,有利于通过静电作用与LPS分子中负电荷的磷酸基团结合。经适当修饰改造的截断型脂多糖结合蛋白,它能更有效地结合

LPS,但不能转移LPS到靶细胞受体CD14,从而阻断LPS刺激后单核/巨噬细胞释放炎症介质。另外,将LBP第94,95位突变为Glu以后,其结合LPS能力完全消失。本研究中经过改建得到的内毒素结合肽P2富于正电荷数,具有较好疏水性,理论上具有较亲代理想的抗内毒素活性。

内毒素是诱导TNF- α 和IL-6生成释放的主要刺激物,TNF- α 和IL-6浓度变化可以了解内毒素结合肽的抗内毒素功能。体外实验中,与模型组相比,P1或P2治疗组培养液中TNF- α 和IL-6浓度均显著降低,P1或P2的拮抗内毒素作用呈浓度依赖性。另外发现12.5 mg/L的P2作用后上清液中IL-6或TNF- α 的浓度与等浓度的多黏菌素B作用后相比,差异无统计学意义,说明P2有较为肯定的抑制内毒素作用。

体内试验显示模型小鼠肺脏的主要形态学变化为毛细血管扩张及肺间质水肿。肝脏组织有伴随枯否氏细胞激活和肝细胞损害的形态学改变,表现为枯否氏细胞数量增多,肝窦扩张充血,肝细胞肿大,出现肝细胞嗜酸性变及小灶坏死。P1或P2处理组中这些脏器的充血水肿及实质细胞病变减

轻。结合体外实验细胞因子浓度变化情况,考虑是P1或P2中和了内毒素,减轻了内毒素在体内引起

的炎性介质大量释放,从而对重要脏器组织起到保护作用。

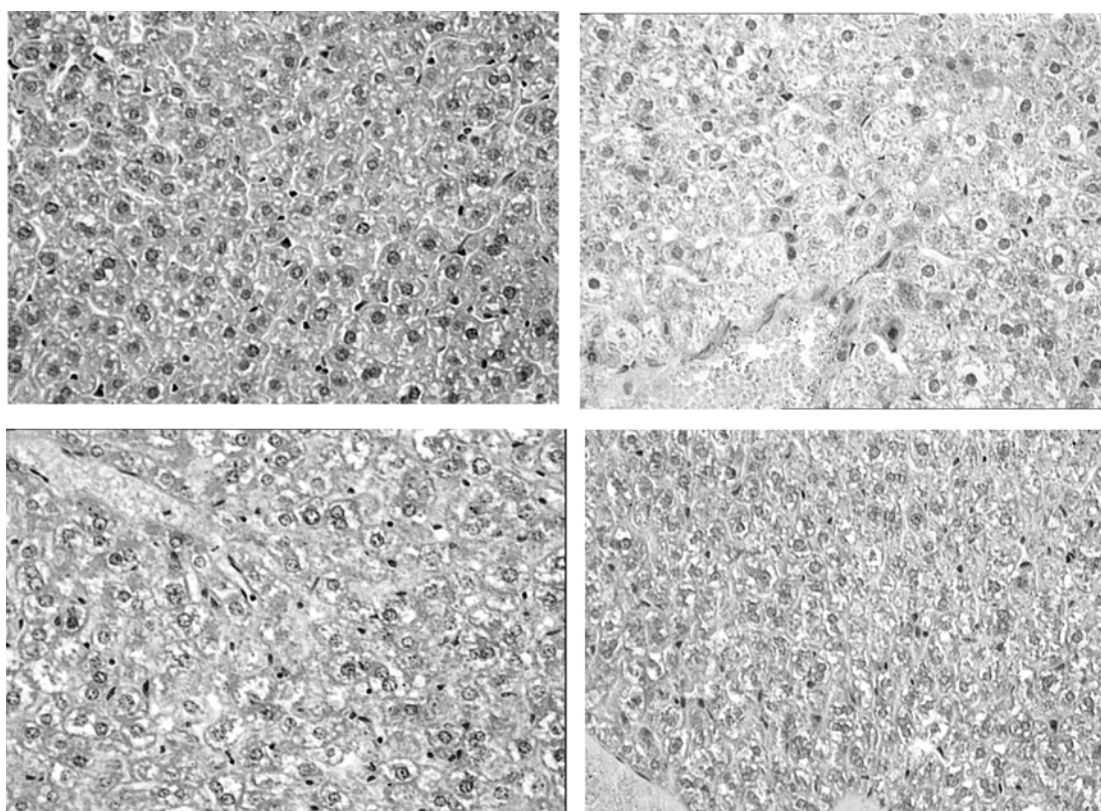


图 A: 正常对照组光镜下肝索排列规则, 肝细胞无水肿或嗜酸性变, 肝血窦未见扩张充血 HE×400; 图 B: 模型组小鼠肝小叶中央静脉及肝窦充血扩张, 肝细胞浊肿, 呈气球样变, 偶见肝细胞嗜酸性变及点状坏死 HE×400; 图 C: 10 mg/kg P1 处理组肝细胞浊肿较模型组减轻, 仍可见到肝小叶中央静脉及肝窦充血扩张 HE×400; 图 D: 10 mg/kg P2 处理组肝小叶中央静脉及肝窦充血程度明显减轻, 肝细胞轻度浊肿 HE×400。

图 2 各组小鼠肝组织形态学改变

通过体内外抗内毒素实验对比, 显示抗内毒素药物 P2 或 P1 呈浓度依赖性拮抗内毒素刺激后细胞因子释放, 并且对炎性介质释放导致的脏器损伤有一定保护作用。其中 P2 对 TNF- α 或 IL-6 的释放抑制作用接近阳性对照 PMB, 而且, P2 对内毒素导致的小鼠脏器损伤有较好的拮抗作用。说明改建后的多肽结合内毒素活性增强, 可以对临床上内毒素导致脏器功能损伤的防治研究提供一点思路。

参考文献:

- [1] Ryu JK, Kim SJ, Rah SH, et al. Reconstruction of LPS transfer cascade reveals structural determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for efficient LPS recognition and transfer[J]. Immunity, 2017, 46(1): 38-50.
- [2] Kim SJ, Kim HM. Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14[J]. BMB Rep, 2017, 50(2): 55-57.
- [3] Lamping N, Hoess A, Yu B, et al. Effect of site-directed mutagenesis of basic residues (Arg94, Lys95,

Lys99) of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein on binding and transfer of LPS and subsequent immune cell activation [J]. Journal of Immunology, 1996, 157(10): 4648-4656.

- [4] Guo S, Li S, Li F, et al. Modification of a synthetic LPS-binding domain of anti-lipopolysaccharide factor from shrimp reveals strong structure activity relationship in their antimicrobial characteristics[J]. Dev Comp Immunol, 2014, 45(2): 227-232.
- [5] Nan YH, Bang JK, Jacob B, et al. Prokaryotic selectivity and LPS-neutralizing activity of short antimicrobial peptides designed from the human antimicrobial peptide LL-37 [J]. Peptides, 2012, 35 (2): 239-247.
- [6] Santos DES, Pol-Fachin L, Lins RD, et al. Polymyxin binding to the bacterial outer membrane reveals cation displacement and increasing membrane curvature in susceptible but not in resistant lipopolysaccharide chemotypes[J]. J Chem Inf Model, 2017, 57 (9): 2181-2193.

收稿日期: 2017-04-26

修回日期: 2017-11-01