文章编号:1000-5404(2005)13-1323-03

论著

鲎抗内毒素因子模拟肽中和内毒素的体外研究

顾劲松[1],肖光夏[2],夏培元[1] (第三军医大学西南医院:[1]药学部,[2]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 体外研究以评价鲎抗内毒素因子模拟肽(modeling peptides from the limulus anti-lipopolysaccharide factor, MPLALFs, Ms)中和内毒素(lipopolysaccharide/endotoxin)的活性。**方法** Ms结合内毒素的活性采用生物传感器技术测定,结合力以反应速率值(Kon)和Kd值表示;中和内毒素活性以鲎试验动态浊度法进行分析。**结果** 生物传感器技术测定结果表明,M_1、M_2、M_3、M_4、M_6、M_8、M_{10}、M_0与LPS 055:B5的亲和力反应速率分别为(840±5.716)、(549±6.532)、(842±6.530)、(627±2.450)、(996±5.716)、(814±8.982)、(556±1.633)和(635±2.449)arc second(弧度/秒),以M_4活性最强,M_1活性最弱。M_4与LPS的反应Kd值为72.377 μmol/L。鲎试验结果与生物传感器测定结果基本一致。**结论** M_4具有较强的体外中和内毒素活性。

关键词: 鲎抗内毒素因子;模拟肽;内毒素;生物传感技术;鲎试验
中图法分类号: R341.6; R392.11; R996 **文献标识码:** A

In vitro study on the neutralizing LPS activity of modeling peptides from the limulus antilipopolysaccharide factor

GU Jin-song[1], XIAO Guang-xia[2], XIA Pei-yuan[1] ([1]Department of Pharmacy, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the endotoxin-neutralizing activity of modeling peptides from the limulus antilipopolysaccharide factor (MPLALFs, Ms) *in vitro*. **Methods** The endotoxin-binding activity of Ms was examined by biosensor technique and shown in values of Kon and Kd. The endotoxin-neutralizing effect was analyzed by limulus amebocyte lysate test. **Results** The biosensor technique results showed that the Kon values of M_0, M_1, M_2, M_3, M_4, M_6, M_8 and M_{10} binding to LPS 055:B5 were (840±5.716), (549±6.532), (842±6.530), (627±2.450), (996±5.716), (814±8.982), (556±1.633) and (635±2.449) arc second, of which M_4 and M_1 had the highest and lowest endotoxin-binding activity, respectively. The M_4 reacted to LPS with a Kd of 72.377 μmol/L. The results obtained by the limulus amebocyte lysate test were the same with those from the biosensor technique. **Conclusion** M_4 has a potential good endotoxin-neutralizing effect *in vitro*.

Key words: limulus antilipopolysaccharide factor; modeling peptide; LPS; biosensor technique; limulus amebocyte lysate-test

严重创伤/烧伤患者中脓毒症的发病率和死亡率极高[1],至今尚乏有效防治药物。近年来针对其发生机制中主要的始动因素——革兰阴性细菌内毒素(lipopolysaccharide, endotoxin, LPS)[2],开展的能中和LPS活性物质的研究一直是医药研究中的热点。目前已发现存在于动植物中的一些中和内毒素活性成分具有潜在的药用开发价值,如鲎抗内毒素因子(limulus antilipopolysaccharide factor, LALF)即是从鲎蓝色血液中分离鉴定的一种具有抗菌/中和LPS作用的蛋白,因其天然来源局限,对其结构进行改造并建立易于大量获取的方法具有重要意义。我们在前期工作中以LALF为模板通过计算机模拟设计,经固相化学合成得到了8条模拟肽。本研究采用生物传感器技术与鲎试验两种方法对这些模拟肽进行中和内毒素活性的体外研究,以期获得

基金项目: 重庆市科委攻关课题资助项目(2000)
Supported by the Sci & Tech Research Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2000)
作者简介: 顾劲松(1960-),男,贵州省毕节市人,博士,副主任医师,主要从事烧伤感染方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)65398647
通讯作者: 夏培元,电话:(023)68754463,E-mail: py-xia@yahoo.com.cn
收稿日期: 2005-01-24;**修回日期:** 2005-04-16

中和内毒素作用较强的小分子多肽。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

LPS 055:B5(美国 Sigma 公司);鲎试剂(灵敏度:0.03 EU/ml)、鲎试验内毒素标准品 *E. coli* 011:B4、内毒素检测专用水均由湛江安度斯生物工程公司生产,批号分别为:0310310、991223、0210290;生物传感器及其疏水样品池(美国 Thermo 公司);EDS-99 细菌内毒素测定系统(湛江正杰科学仪器有限公司生产);BP211D 型微量天平(法国 Sartorious 公司生产,测量范围 0.1 ~ 210 000 mg,精度为 0.01 mg);鲎抗内毒素因子模拟肽(modeling peptides from the limulus anti-lipopolysaccharide factor, MPLALFs, Ms) M_1、M_2、M_3、M_4、M_6、M_8、M_{10}、M_0 共 8 条(深圳翰宇生物工程有限公司合成,HPLC 纯化,纯度为 74.6% ~ 95.5%)。所有试验用塑料容器均经 ^{60}Co 辐照去热原;玻璃容器清洁干燥后经 250 ℃烘烤 3 h 待用。

1.2 方法

1.2.1 生物传感技术测定 该技术利用光学共振镜原理[3],当包被于其疏水样品池的固定受体与相应配体结合时,以共振角度进入光线衰减区的激光就会发生共振角度的改变,从而可以对生物分子受-配体间的相互作用力及作用强度进行定量,结果以 Kon 值(反应速率)表示。根据文献确定反应速率值(Kon)在 100 ~ 300 arc second(弧度/秒)范围[4]。生物传感器搅拌速率设定为 98 次/s,数据采集设定为 3 次/s,温度设定为 25 ℃;加入 50 μl 的 pH 6.0、0.02 mol/L PBS,冲洗 5 次至基线平衡。疏水样品池上 LPS 的包被按厂商提供的包被说明书进行。8 条 Ms 均在实验前以 PBS (pH 7.2)配制为 100 μmol/L 浓度,试验中各取 5 μl 上样,测定它们与 LPS 的亲和力,实验数据以 FASTplot 和 FASTfit 软件作图。将初筛活性最佳模拟肽再设 5、10、20、40、80 μmol/L 浓度以同样方法进行检测。每实验重复 3 次。

1.2.2 鲎试验动态浊度法测定 实验组分别取浓度 80 μmol/L 的模拟肽液 100 μl 与浓度为 4 EU/ml(1 EU 约为 0.1 ng)的内毒素标准品 100 μl,混合后 37 ℃水育 15 min,使模拟肽和内毒素的反应终浓度分别为 40 μmol/L 和 2 EU/ml;取混合液 100 μl 与 100 μl 鲎试剂反应。对照组分别取 40 μmol/L 浓度的模拟肽 100 μl 与 100 μl 鲎试剂反应。以 2 EU/ml 内毒素标准品(线性测定范围)作为内毒素标准对照,采用动态浊度法测定。模拟肽的 LPS 中和率计算公式为:LPS 中和率 = (标准对照 LPS 实测值 - 实验组 LPS 实测值)/标准对照 LPS 实测值 × 100%。实验重复 3 次。

2 结果

2.1 生物传感技术测定

2.1.1 疏水样品池的包被 包被后的共振图像为对称的单峰图形(图 1),证明所包被的 LPS 在疏水样品池中形成均匀的单层脂膜。A、B 两点间差的绝对值即为 LPS 055:B5 在疏水样品池中的包被量,为 183.2 arc second,符合实验要求。

2.1.2 模拟肽与 LPS 亲和力测定结果 模拟肽和 LPS 的亲和力与反应速率的高低成正比,见图 2。M_1、M_2、M_3、M_4、M_6、M_8、M_{10}、M_0 与 LPS 055:B5 亲和力反应速率分别为(840 ± 5.716)、(549 ± 6.532)、(842 ± 6.530)、(627 ± 2.450)、(996 ± 5.716)、(814 ± 8.982)、(556 ± 1.633)、(635 ± 2.449)arc second,显示与 LPS 亲和力最佳者为 M_4,最差者为 M_1(图 2)。

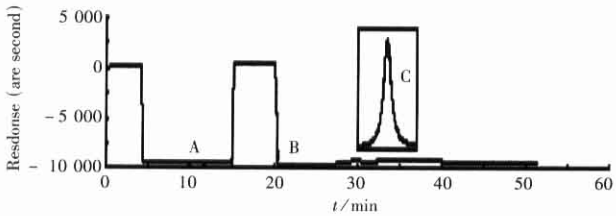


图 1 LPS 055:B5 在疏水样品池中的包被曲线

Fig 1 LPS 055:B5 immobilization curve in the hydrophobic curvette

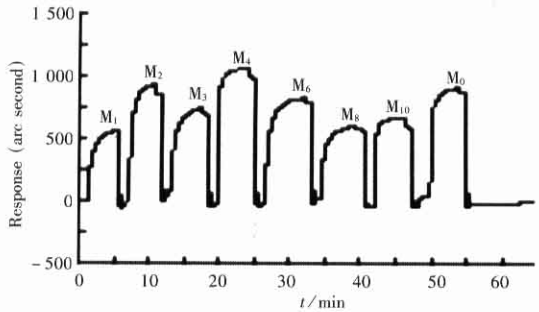


图 2 模拟肽与 LPS 055:B5 亲和力反应曲线

Fig 2 The affinity reaction curve of Ms to LPS 055:B5

2.1.3 M_4 不同浓度与 LPS 的亲和力测定 M_4 以 5、10、20、40、80 μmol/L 浓度与 LPS 的结合随着浓度增加,反应速率也随着上升,分别为(149 ± 1.633)、(248 ± 4.083)、(325 ± 3.266)、(586 ± 4.899)、(813 ± 9.798) arc second,呈现明显的浓度梯度效应(图 3)。平衡解离常数(Kd)测定获得截距(intercept)为 0.079 085 5,斜率(gradient)为 1 092.685,Kd = intercept/gradient = 72.377 μmol/L,说明该肽与 LPS 的亲和力较高(图 3)。

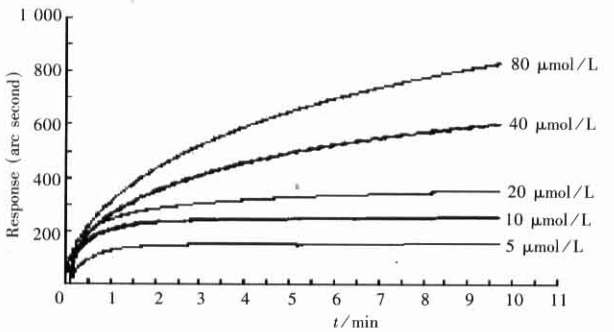


图 3 不同浓度 M_4 与 LPS 055:B5 的亲和力反应曲线

Fig 3 The affinity reaction curve of different concentrations of M_4 to LPS 055:B5

2.2　鲎试验测定

LPS 中和率显示，M_1 中和 LPS 的作用最弱，中和率为 19%；M_4 中和 LPS 的作用最强，中和率为为 82%。为防止假阳性结果的出现，实验设置单用 Ms 进行鲎试验的对照，结果显示 Ms 本身可与鲎试剂发生不同程度反应，导致 LPS 测定出现偏差，但似乎对加入 LPS 孵育后的中和实验结果影响较小（表 1）。

表 1　模拟肽中和 LPS 的鲎试验结果[$(\bar{x} \pm s)$%]

Tab 1　The results of Ms neutralizing endotoxin by limulus amebocyte lysate test [$(\bar{x} \pm s)$%]

Group	Reclaiming (%)	LPS value(EU/ml)	LPS neutralizing (%)
Blank		< 0.007 6	—
Standard control	97.4 – 105	1.984 ± 0.003	—
M_1		2.256 ± 0.081 7	—
M_1 + LPS		1.584 ± 0.001 6	19
M_2		0.062 ± 0.003 3	
M_2 + LPS		0.563 ± 0.002 5	71
M_3		< 0.007 6	
M_3 + LPS		1.452 ± 0.042 5	27
M_4		0.1323 ± 0.001 9	
M_4 + LPS		0.356 ± 0.045 7	82
M_6		1.692 ± 0.075 1	
M_6 + LPS		0.856 ± 0.024 5	56
M_8		0.021 ± 0.000 8	
M_8 + LPS		1.498 ± 0.081 7	23
M_{10}		0.030 ± 0.001 6	
M_{10} + LPS		1.452 ± 0.265	27
M_0		0.058 ± 0.0327	
M_0 + LPS		0.952 ± 0.0408	51

3　讨论

LALF 能高亲和性地以剂量依赖方式结合 LPS，具有较强的中和 LPS 作用[2]。根据其功能区的结构特点，我们应用计算机分子模拟技术模拟设计并合成了一系列 Ms。因为模拟肽合成价格昂贵，每次合成量非常有限，不可能采用整体动物试验对其生物活性进行筛选。有学者报道，应用生物传感技术可快捷、准确地定量分析多粘菌素 B 及内毒素结合肽与 LPS/lipid A 的结合活性[5]，本研究将生物传感技术与鲎试验结合，对 8 条 Ms 进行了生物活性的体外研究，获得了较为满意的结果。生物传感技术测定结果表明，8 条 M_s 均有不同程度的 LPS 结合活性，结合力依次为 $M_4 > M_0 > M_2 > M_6 > M_{10} > M_3 > M_8 > M_1$，$M_4$ 的反映速率最高，其平衡解离常数 Kd 为 72.377 μmol/L，说明该肽具有良好的中和 LPS 活性，且呈现明显的浓度梯度效应。鲎试验动态浊度法对 LPS 中和活性的分析发现，Ms 中和 LPS 的作用依次为 $M_4 > M_2 > M_6 > M_0 > M_{10}$ 和 $M_3 > M_8 > M_1$。其中 M_1 和 M_6 在未加入 LPS 时出现了分别高于和接近于 LPS 标准对照实测值的结果，表明该两肽可与鲎试剂发生反应，可能是肽纯度过低，内含杂质所致。M_4 也可对鲎试剂发生较轻的类似反应，但似乎对加入 LPS 孵育后的中和实验结果影响较小。

中和内毒素活性物质的体外研究中，生物传感技术检测每 1 份样品仅需样品 5 μl，耗时不超过 10 min，用于确定可与 LPS 结合的活性物质具有样品用量少、操作简便、直观迅速、特异性强的优点，但缺点是不能肯定是否具有中和 LPS 的活性。将生物传感技术结合鲎试验分析正好克服此不足，并可避免单用鲎试验容易受到多种非特异性因素的影响，出现假阳性或假阴性结果。因此先采用生物传感技术进行亲和力初筛后，有针对性地结合鲎试验分析，在面对大量待测物质时可节省时间、人力、物力和经费。

参考文献：

[1] Bone R C. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine[J]. Clin Microbiol Rev, 1993, 6(1): 57 – 68.

[2] Hoess A, Watson S, Siber G R, *et al*. Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, Limulus anti-LPS factor, at 1.5? resolution[J]. EMBO J, 1993, 12(9): 3351 – 3356.

[3] Keusgen M. Biosensors: new approaches in drug discovery[J]. Naturwissenschaften, 2002, 89(10): 433 – 444.

[4] de Haas C J, Haas P J, van Kessel K P, *et al*. Affinities of different proteins and peptides for lipopolysaccharide as determined by biosensor technology[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 252(2): 492 – 496.

[5] 吕根法，龚小云，卫国，等. 应用生物传感技术测定多粘菌素 B 中和内毒素活性物质能力的实验研究[J]. 中华烧伤杂志，2004，20(1)：23 – 25.

（编辑　龙　亮）

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神，血压计量单位恢复使用毫米汞柱（mmHg），但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡]（kPa）的换算系数（1 mmHg = 0.133 kPa）。

本刊编辑部