论著

文章编号:1000-5404(2005)24-2406-04

抗氨基端脂多糖结合蛋白单链抗体的生物学活性研究

章 容,王长松,刘友生,李 红 (第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038)

提 要:目的 观察制备的抗NH-LBP单链抗体的体内外生物学活性。**方法** 采用流式细胞术观察抗NH-LBP单链抗体阻断LPS与U937细胞的结合能力;采用ELISA法检测抗体干预后不同时相点的烧伤合并内毒素血症小鼠血浆中炎性细胞因子TNF-α、IL-6含量的变化;同时观察小鼠部分内脏器官的病理形态学改变。**结果** 经抗NH-LBP单链抗体干预后,U937细胞表面的荧光强度明显下降。烧伤合并内毒素血症小鼠经scFv抗体干预后,与模型组相比肝、肺组织的炎性改变明显减轻、浸润的炎细胞减少;肾组织的炎性改变不明显;小鼠血浆中TNF-α浓度在烧伤合并内毒素处理后即显著增高,模型组与对照组相比,差异有显著性($P<0.01$,$P<0.05$),干预组与相应时相点的模型组相比,在最初3 h内差异有显著性($P<0.05$)。IL-6含量在建模3 h以后与对照组相比差异有显著性($P<0.01$,$P<0.05$);干预后IL-6的含量下降比较明显。**结论** 抗人源化氨基端脂多糖结合蛋白的单链抗体对内毒素血症有一定的保护作用;进一步明确了LBP在内毒素生物学效应中的作用。

关键词:NH-LBP;单链抗体;内毒素血症;生物学活性

中图法分类号:R341.6;R392.11;R631.1 **文献标识码**:A

Bioactivity of scFv antibody against human NH-lipopolysaccharide binding protein *in vitro* and *in vivo*

ZHANG Rong, WANG Chang-song, LIU You-sheng, LI Hong (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the bioactivity of recombinant human scFv antibody against NH-lipopolysaccharide binding protein *in vitro* and *in vivo*. Methods KM mice, weighing 20 – 25 g, were burnt on the back to the third degree covering 20% total body surface area. The mice in only burn group were intraperitoneally injected with 1 μg/g LPS and those in scFv-treated group with 1 μg/g LPS and 0.5 μg/g scFv after burn. The mice without any treatment served as controls. All mice were sacrificed in 1, 3, 6, 12, 24 h after all treatment and the whole blood, the tissues of liver, lung and kidney were collected. The serum concentration of TNF-α, IL-6 in burnt mice with endotoxemia was detected by ELISA and the pathological changes of liver, lung and kidney tissues were observed by light microscope. The inhibition of scFv antibody of different concentrations against NH-lipopolysaccharide binding protein on FITC-LPS binding with U937 cells was assayed by FCM. Results The histopathological changes of liver, lung and kidney in mice of scFv-treated group revealed that less inflammatory cell infiltration, less degenerated cells, weaker congestion in tissue as compared with control and only burnt mice. The serum concentration of TNF-α in only burnt mice increased significantly than that of the controls ($P<0.01$ and $P<0.05$), and the serum level of TNF-α in scFv-treated group in 1 h and 3 h was significantly lower than that of only burnt group ($P<0.05$). The content of IL-6 in the only burnt mice was significantly higher than that of controls after 3 h ($P<0.01$ and $P<0.05$). The IL-6 level of scFv-treated group decreased significantly than that of only burnt group ($P<0.01$). The fluorescence intensity on U937 cells was weaken after treated by the scFv antibody. Conclusion The recombinant scFv antibody against NH-LBP plays a potential protective role in the endotoxemia. In addition, result also revealed that LBP plays a key role in the pathogesis of LPS.

Key words: NH-lipopolysaccharide binding protein; scFv; endotoxemia; bioactivity

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271342)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30271342)

作者简介:章 容(1974 –),女,重庆市人,主管技师,主要从事病理学技术方面的研究。电话:(023)68765462

通讯作者:刘友生,电话:(023)68754431

收稿日期:2005-06-10;**修回日期**:2005-10-10

内毒素血症是临床创(烧)伤患者最常见的并发症之一。LPS 是其主要致病因素,G^- 细菌死亡时 LPS 释放入血,由肝细胞产生的 LBP 将其传递给靶细胞膜上的 CD14(mCD14)或血液循环中的可溶性 CD14(sCD14),三者形成 LPS/LBP/CD14 三联复合体[1],再经过 TLR4-MD2-MYD88 跨膜受体识别复合物向靶细胞内传递信号,促使胞浆内的 NF-κB 易位至胞核,导致一系列转录因子的活化[2],进而释放大量炎性介质和细胞因子,诱发全身炎症反应综合征和多器官功能衰竭。在生理状态下循环血液中只有 5 ~ 10 μg/ml 的 LBP,在内毒素血症时 LBP 的浓度可以增高 10 倍左右[3],低浓度的 LBP 可将 LPS 与 CD14 的结合放大3 ~ 4 个数量级。经定点突变以及 LBP 衍生肽的竞争性抑制研究,提示 LBP 结合 LPS 的位点定位于 LBP 氨基末端部分的第 91 ~ 100 位氨基酸残基,这种含有 LBP 与 LPS 结合活性部位的 LBP 称之为(NH-lipopolysaccharide binding protein, NH-LBP)。我们应用基因工程抗体技术制备了抗 NH-LBP 的 scFv 抗体[4],在本研究中我们对该抗体的体内外生物学活性进行了观察。

1　材料与方法

1.1　材料

抗 NH-LBP 的 scFv 抗体由本所制备并经初步鉴定;LPS(*E. coil* 0111:B4)、FITC-LPS 购自 Sigma 公司。小鼠 TNF-α ELISA 试剂盒、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒购自深圳晶美公司。PMA 购自 CalBiochem 公司。8% 硫化钠:8 g 硫化钠充分溶解于 100 ml 蒸馏水中。3% 凝固汽油:将 3 g 凝固汽油用研钵研碎,加入 100 ml 高标号液体汽油,混匀置 4 ℃冰箱,每天振荡数次,3 ~ 4 d 后呈胶冻状时可用。

1.2　方法

1.2.1　实验动物及分组　　SPF 级昆明种小鼠 66 只,雌雄不限,体质量 20 ~ 25 g,由第三军医大学实验动物中心提供。分为正常对照组($n=6$)、模型组($n=30$)、干预组($n=30$)。

1.2.2　烧伤合并内毒素血症小鼠动物模型建立及干预组的处理　　实验小鼠背部以 8% 硫化钠脱毛后,以凝固汽油(按 1 ml/100 g 计算)均匀涂抹于脱毛后的皮肤上,燃烧 15 s 造成 20% Ⅲ度烧伤,立即腹腔注射 1 μg/g 内毒素;干预组:烧伤后立即腹腔内注射 1 μg/g 内毒素,同时再注入 0.5 μg/g 制备好的 scFv(用生理盐水配制)。分别在处理后的 1、3、6、12、24 h 处死动物。摘除眼球取全血于抗凝管内,混匀后 4 ℃,2 000 r/min 离心取上清,-20 ℃保存。同时取肝、肺、肾组织。对照组仅在脱毛后腹腔内注入 1 ml 生理盐水,取抗凝全血和肝、肺、肾组织作对照。

1.2.3　血浆中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-6(IL-6)的含量测定　　采用 ELISA 法测定血浆中 TNF-α 和 IL-6 的含量,具体按说明书进行操作。

1.2.4　光镜观察组织病理形态学变化　　光镜观察:取各时相点动物的肝、肺、肾组织以 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋、切片、HE 染色,光镜下观察组织学改变。

1.2.5　体外实验　　U937 细胞复苏后,在 37 ℃的培养箱培养,待细胞稳定后转入 6 孔培养板内,10^6/孔。用终浓度为 100 ng/ml 的 PMA 分化 U937 细胞 72 h 后,加入终浓度为 1 μg/ml 的 FITC-LPS,同时加/不加 scFv 在 37 ℃孵育 30 min 后,1 200 r/min 离心收集细胞,再用 0.01 mol/L PBS(pH 7.2 ~ 7.4)洗涤细胞 2 次,用流式细胞仪检测细胞表面的荧光强度。实验共设 6 组:A:单纯的 U937 细胞组;B:FITC-LPS(1 μg/ml) + scFv(1 μg/ml) 30 μl;C:FITC-LPS(1 μg/ml) + scFv(1 μg/ml) 60 μl;D:FITC-LPS(1 μg/ml) + scFv(1 μg/ml) 90 μl;E:FITC-LPS(1 μg/ml) + scFv(1 μg/ml) 180 μl;F:FITC-LPS(1 μg/ml)。

1.2.6　统计学处理　　数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Excel 2003 进行方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　小鼠血浆中 TNF-α 含量的变化

各组动物血浆中 TNF-α 的变化见表 1,TNF-α 在烧伤合并内毒素处理后即显著增高,3 h 达到顶峰,随后逐渐降低;各模型组与对照组相比,差异有显著性($P<0.01$,$P<0.05$)。而干预组与相应时相点的模型组相比,在作用的最初 3 h 内 TNF-α 的水平显著下降,差异有显著性($P<0.05$);3 h 以后 TNF-α 的含量也有所下降,但差异不显著($P>0.05$)。

表 1　血浆中 TNF-α 含量的变化(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Changes of serum TNF-α concentration (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Time after treatment				
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
Control	1 880.09 ± 64.15	—	—	—	—
Only burnt	2 528.24 ± 84.86**	2 620.83 ± 111.11**	2 157.87 ± 139.81*	2 176.39 ± 146.99*	2 268.98 ± 178.59*
scFv-treated	2 380.09 ± 32.08△	2 268.98 ± 84.86△	2 120.83 ± 55.56	2 028.24 ± 178.59	1 954.17 ± 200.31

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; △: $P<0.05$, *vs* only burnt mice

2.2　小鼠血浆中 IL-6 含量的变化

模型组小鼠血浆中 IL-6 水平在 1 h 即增高达到顶峰,模型组各组的 IL-6 水平在 3 h 后和对照组相比有显著差异($P<0.01$,$P<0.05$)。而经过 scFv 处理后 IL-6 的下降比较明显,但除干预后 6 h 和同一时相点的模型组相比有显著差异外($P<0.01$),其余各组均无显著性差异($P>0.05$)(表 2)。

表 2　血浆中 IL-6 含量变化(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Changes of serum IL-6 concentration (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Time after treatment				
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
Control	2.450 ± 0.213	—	—	—	—
Only burnt	4.903 ± 2.045	4.546 ± 1.446*	3.555 ± 0.757*	1.551 ± 0.251**	1.696 ± 0.697*
scFv-treated	2.112 ± 0.344	3.1546 ± 2.514	1.691 ± 0.116△△	2.196 ± 0.702	1.318 ± 0.101

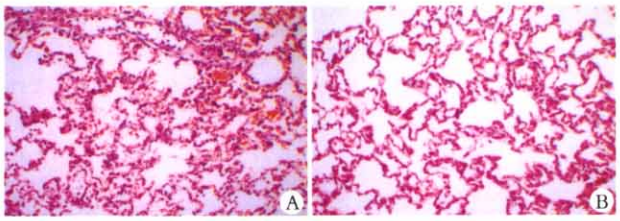
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; △△: $P<0.01$, *vs* only burnt mice

2.3 小鼠部分内脏器官的组织病理学改变

模型组在烧伤合并内毒素腹腔注射后，一般状态差，具体表现为不活泼，不饮水。在 24 h 后开始恢复。

2.3.1 肝脏组织的主要病理学改变 正常对照组肝细胞大小一致，核大而圆，居中。肝窦内无炎性细胞浸润。模型组在镜下可见肝窦扩张、充血，有较多的炎性细胞浸润。汇管区亦有大量的炎性细胞浸润；肝细胞肿胀较广泛，偶见肝细胞点灶状坏死。干预组的上述肝损伤性改变有不同程度的减轻，肝窦内充血明显减轻、炎性细胞浸润不明显，肝细胞肿胀也明显减轻。

2.3.2 肺组织的病理学改变 正常组小鼠肺组织肺泡壁很薄，肺泡腔内无渗出，无红细胞炎性细胞等。模型组在镜下可见肺泡腔内有大量的红细胞、中性粒细胞和巨噬细胞等炎性细胞的浸润，肺间质充血明显，肺泡间隔明显增厚；弥漫性肺毛细血管扩张，可见灶性肺间质和肺泡内出血伴中性粒细胞浸润。干预组各时相点的肺损伤性改变明显减轻炎性渗出和肺泡间质的充血水肿减轻、炎细胞减少（图 1）。

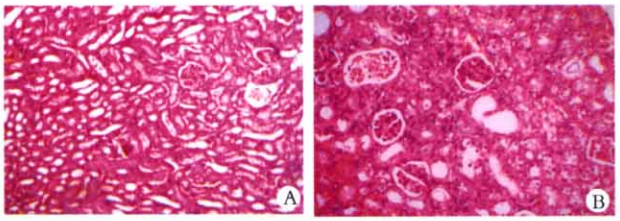


A: Lung tissue of only burnt group showed the alveolar wall thick, much erythrocytes in alveolar cava, inflammatory cells infiltrated and the blood capillary enlarged (HE × 200); B: Lung tissue of scFV-treated group showed a few erythrocytes in alveolar cava and a few inflammatory cells (HE × 200)

图 1 小鼠肺组织病理学改变

Fig 1 Pathological changes of lung tissue from mice

2.3.3 肾组织的病理学改变 正常组小鼠肾组织结构完整，肾小球和肾间质内无炎性细胞浸润，无红细胞渗出等病理学改变。模型组小鼠肾间质内血管扩张充血，部分肾小管扩张，内有渗出。间质内有炎性细胞浸润，毛细血管扩张、充血。干预组各时相点的肾组织病理学改变不是十分明显（图 2）。



A: Kidney tissue of only burnt group showed the blood capillary enlarged and a few erythrocytes in renal glomerulus (HE × 200); B: Kidney tissue of only burnt group showed the normal renal glomerulus (HE × 400)

图 2 小鼠肾组织病理学改变

Fig 2 Pathological changes of kidney tissue from mice

2.4 抗 NH-LBP scFv 干预 FITC-LPS 与 U937 细胞的结合

抗 NH-LBP 的 scFv 处理后，在流式细胞仪上检测 FITC-LPS 结合 U937 细胞的能力，结果可见 180 μl 的 scFv 能够抑制 FITC-LPS（1 μg/ml）与 U937 细胞的结合，细胞表面的荧光强度明显下降，吸收峰处于基线水平。

3 讨论

临床创、烧伤患者出现的内毒素血症由于缺乏有效的治疗策略而难以调节炎症反应的发生发展，因此亟需要新的治疗方法或药物的出现。基因工程抗体由于其生物学效应明显，制备简便而在科研和临床得到了广泛的应用。scFv 片段是抗体的 VH 和 VL 部分通过一个柔性的肽段（Gly_4Ser_1）3 连接而成，Daly 等[5]采用 RT-PCR 的方法从 mAb 中扩增出抗体的 VH 和 VL，然后应用 SOE-PCR 技术将 VH 和 VL 通过一个柔性肽段连接起来成为 scFv 片段，最后成功表达纯化出抗黄曲霉毒素 B1 的 scFv。我们在酵母细胞内表达获得了抗 NH-LBP 的 scFv 抗体[4]，它是一种相对分子质量约为 35.0×10^3 的片段，为进一步明确该抗体是否具有生物学活性，能否阻断内毒素的生物学效应，我们采用体外细胞培养和动物实验对此进行了初步研究。

研究表明 U937 细胞经过 PMA 诱导后可以分化为单核巨噬细胞，具有和 LPS 结合的能力[6]，因此成为常用的研究 LPS 致病机制的体外模型。我们用 PMA 分化 U937 细胞后，加入终浓度为 1 μg/ml 的 FITC-LPS 进行刺激，同时加/不加不同浓度的抗 NH-LBP 的 scFv 抗体进行处理，流式细胞仪检测结果表明：抗 NH-LBP scFv 抗体能够在一定程度上阻断 FITC-LPS 与 U937 细胞的结合。

在内毒素血症中，血循环中会出现较高浓度的 TNF-α、IL-6 等炎性细胞因子，这些过量产生的炎性细胞因子可诱发败血症、低血压、代谢性酸中毒、MOF 等并发症。炎症反应激活后导致 TNF-α 的快速释放，TNF-α 在中性粒细胞和内皮细胞合成黏附分子以及休克和 MOF 的发生发展过程中都发挥着重要的作用[7]。而 IL-6 是一种主要由单核巨噬细胞分泌的炎症介质，在机体许多病理生理过程中发挥重要作用，如创（烧）伤合并内毒素血症的情况下 IL-6 水平升高的更多，且与患者的预后转归有关。在既往成熟的烧伤合并内毒素血症动物模型的基础上，我们观察了抗 NH-LBP scFv 抗体对烧伤合并内毒素血症小鼠的保护作用。结果显示与模型组相比，干预组小鼠的部分内脏如肝、肺、肾在病理形态学方面有明显改善，具体表现在浸润的炎性细胞减少，毛细血管扩张减轻，细胞肿胀不明显。干预组小鼠血浆中 TNF-α 和 IL-6 的含量均有所

降低。研究表明 IL-6 水平变化与动物 MOF 的发生以及预后有密切关系，在实验性 MOF 模型组动物 IL-6 水平明显升高；MOF 动物衰竭器官数目多者 IL-6 水平增高也多；衰竭器官≥3 个的动物，IL-6 水平显著高于两个器官衰竭的动物。这些结果提示 IL-6 在 MOF 的发生和发展过程中起着十分重要的作用。

在内毒素血症中，LBP 将 LPS 递呈至靶细胞表面的糖蛋白 CD14，形成 LPS-LBP-CD14 复合体[8]，LPS-LBP-CD14 复合体和 Toll 样受体 2 和 4(TLR2、TLR4)相互作用，产生跨膜信号诱导靶细胞(如 PMN 和单核细胞)合成一系列的炎症因子。目前国内外应用抗体来治疗内毒素血症的研究不多，应用人源化抗体进行研究的文献还少见有报道。李永旺等[9]制备的兔抗大鼠 LBP 多克隆抗体，能够显著抑制 LPS 诱导的大鼠肺组织 NF-κB 的活化，但其有效作用只限于内毒素血症的早期，LPS 作用 1 h 后阻断效应不明显；作者制备的兔抗人 LBP 多抗效价高达 $1:10^5$，且具有较高的特异性和纯度[10]。有研究表明用多克隆抗体阻断 LBP 的活性可以保护小鼠免于发生致死性的内毒素血症。Le 等[11]在研究兔抗小鼠 LBP 单抗和大鼠抗小鼠 LBP 单抗的作用中也发现，抗 LBP 单抗不但能够阻断 LPS 与 LBP 的结合，也能阻断 LPS/LBP 复合物与 CD14 的结合，因而可以中和 LBP 的活性，抑制体内外 TNF-α 的产生，保护小鼠免于发生致死性的内毒素血症。我们的实验结果也证实在 scFv 抗体作用的早期，对 LPS 的阻断作用较明显。

参考文献：

[1] Dunzendorfer S, Lee H K, Soldau K, *et al*. Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses[J]. FASEB J, 2004, 18(10): 1117 - 1119.

[2] Brightbill H D, Modlin R L. Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response[J]. Immunology, 2000, 101(1): 1 - 10.

[3] Hamann L, Alexander C, Stamme C, *et al*. Acute-phase concentrations of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibit innate immune cell activation by different LPS chemotypes *via* different mechanisms[J]. Infect Immun, 2005, 73(1): 193 - 200.

[4] 王长松，刘友生，李　红，等. 抗氨基末端脂多糖结合蛋白基因工程抗体库的构建及体外表达筛选[J]. 中国生物制品学杂志，2005，18(3)：177 - 181.

[5] Daly S J, Dillon P P, Manning B M, *et al*. Production and characterization of murine single chain Fv antibodies to aflatoxin B1 derived from a pre-immunized antibody phage display library system[J]. Food Agric Immunol, 2002, 14(4): 255 - 274.

[6] 葛晓冬，刘友生，王晓东，等. 兔源内毒素结合蛋白的提取纯化及体外生物学活性研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(6)：514 - 518.

[7] Locksley R M, Killeen N, Lenardo M J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology[J]. Cell, 2001, 104(4): 487 - 501.

[8] Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster[J]. Trends Immunol, 2002, 23(6): 301 - 304.

[9] 李永旺，麻　莉，张德明，等. 抗 LBP 多抗对 LPS 诱导的肺组织 NF-κB 活化的抑制作用[J]. 解放军医学杂志，2003，28(2)：125 - 127.

[10] 李永旺，麻　莉，张德明，等. 重组 LBP 真核表达载体免疫制备兔抗人 LBP 抗体的研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(11)：1307 - 1309.

[11] Le Roy D, Di Padova F, Tees R, *et al*. Monoclonal antibodies to murine lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) protect mice from lethal endotoxemia by blocking either the binding of LPS to LBP or the presentation of LPS/LBP complexes to CD14[J]. J Immunol, 1999, 162(12): 7454 - 7460.

(编辑　汪勤俭)

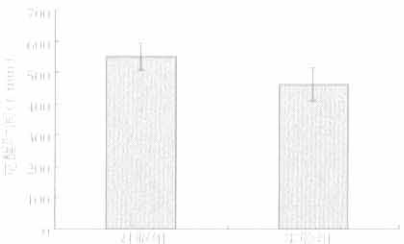
关于本刊论文图表使用注释符号和语言的规定

根据国家标准(GB1.1-2 000)的规定，本刊将停止使用过去常用的"＊、#、○、●、▲ ……"等符号作为图表中的注释符号。从 2006 年起，本刊采用"a、b、c、d、e ……"等英文字母作为图表的注释符号。图表表达只使用中文，如表 1、图 1 所示。敬请本刊作者注意。

表 1　各组 CAlb、SAlb、CTP 的结果及 CAlb/SAlb

组别	例数	CAlb(g/L)	CAlb/SAlb(10^{-3})	CTP(g/L)
对照组	45	0.20 ± 0.06	4.6 ± 1.2	0.32 ± 0.06
病脑组	29	0.53 ± 0.12[a]	12.1 ± 3.1[a]	0.77 ± 0.29[b]
结脑组	30	0.89 ± 0.21[ac]	22.3 ± 5.4[ac]	1.28 ± 0.56[ac]
化脑组	33	1.62 ± 0.40[acd]	37.4 ± 8.7[acd]	2.59 ± 0.27[acd]

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与对照组比较；c：$P<0.05$，与病脑组比较；d：$P<0.05$，与结脑组比较；e：$P<0.01$，与病脑组比较



a：$P<0.05$，与对照组比较

图 1　长时连续作业对大鼠夜间觉醒时间的影响

(本刊编辑部)