论著

文章编号:1000-5404(2008)02-142-04

内毒素结合蛋白样分子 p48 体内外生物学活性的初步研究

葛晓冬[1],杨艳丽[3],段光杰[1],陈锐[1],潘 峰[2],朱 江[1],刘友生[1] (第三军医大学:[1]西南医院病理学研究所,[2]基础医学部中心实验室,重庆 400038;[3]解放军兰州军区总院病理科,兰州 730030)

摘 要:**目的** 以 LBP 为对照,对比研究 p48 的体内、外生物学功能。**方法** 采用生物传感器、流式细胞分析技术研究 p48 与 LPS 及 Lipid A 的结合力。通过体外培养人单核细胞(U937)和小鼠体内 TNF-α 的分泌实验,研究 p48 的生物学功能。采用 ELISA 方法初步探索 p48 与 LBP 是否具有一定相似的空间结构。**结果** p48 能促进 LPS 与 PBMC 结合,其活性为 LBP 的 81%。p48 能与 LPS 及 Lipid A 结合,其亲和常数(KD)分别为 1.59×10^{-6}、1.48×10^{-6} mol/L。体内外实验中 p48 均能促进 TNF-α 的分泌,其生物学活性约为 LBP 的 77%。高浓度抗 NH-LBP Fab 抗体能与 p48 特异性结合,p48 部分空间结构与 LBP 可能有一定的相似性。**结论** p48 具有与 LBP 相近似的生物学功能,在机体炎症反应中也发挥较重要的作用。

关键词:内毒素结合蛋白样分子 p48;生物传感器;流式细胞分析技术;TNF-α 分泌实验

中图法分类号:R341;R392-33;R392.12 **文献标识码**:A

In vitro and *in vivo* biological function of p48—a new type of lipopolysaccharide binding protein

GE Xiao-dong[1], YANG Yan-li[3], DUAN Guang-jie[1], CHEN Rui[1], PAN Feng[2], ZHU Jiang[1], LIU You-sheng[1] ([1]Institute of Pathology, [2]Laboratory Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [3]Department of Pathology, The General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730030, China)

Abstract: **Objective** To study the biological function of p48 by comparing with that of lipopolysaccharide binding protein (LBP). **Methods** The ability of p48 to bind lipopolysaccharide (LPS) or lipid A was determined by the experiment of Biosensor and flow cytometry. The biological function of p48 was identified by measuring the secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) in human monocyte (U937) or mice. Using the monoclonal antibody (mAb) Fab to NH-LBP, the spatial structure of p48 was assessed by ELISA to determine whether its structure is similar to that of LBP. **Results** p48 could accelerate the binding of LPS with peripheral blood mononuclear cells (PBMC), whose ability is about 81% of LBP. p48 could bind LPS or lipid A directly, with the affinity constant of 1.59×10^{-6} mol/L or 1.48×10^{-6} mol/L respectively. The secretion rate of TNF-α was enhanced by p48, whose effect is about 77% of LBP *in vivo* or *in vitro*. That the mAb Fab could bind p48 at high concentration indicated some similar spatial structure between p48 and LBP. **Conclusion** p48, similar to LBP in biological function, plays an important role in innate immunity and inflammatory reaction.

Key words: lipopolysaccharide binding protein p48; biosensor; flow cytometry; secretion of tumor necrosis factor alpha

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是 G^- 杆菌的外膜成分,它作为一种重要的炎症介质,在载体蛋白的介导下可刺激机体产生炎性细胞因子。以往研究表明,肝细胞在多种刺激因素作用下能够合成分泌脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP),LBP 能促进多聚脂多糖单体化,并且通过其氨基末端和羧基末端分别与 LPS 和外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)、肝枯否细胞(Kupffer cell)等细胞膜上的 CD14(mCD14)结合,形成 LPS-LBP-mCD14 复合物,经 TLR4-MD-2-MYD88 识别复合物启动效应细胞信号传导通路,再经核因子 κB(NF-κB)向细胞核内传递信号[1],从而介导炎性细胞因子的分泌,促进炎症反应的发生。近期部分研究表明 LBP 可嵌入单核细胞(MNC)的膜上[2],发挥促进 LPS

基金项目:国家自然科学基金(30400426)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400426)
作者简介:葛晓冬,男,河北省保定市人,博士,主治医师,讲师,主要从事创伤分子病理学、蛋白质工程、基因遗传学方面的研究。电话:(023)68752246,E-mail:xiaodongge650@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-07-17;修回日期:2007-09-16

与 CD14 结合的功能，部分学者还发现高浓度的 LBP 可中和 LPS，对机体发挥保护作用[3]。针对 LBP 抗体等方法只能部分阻断 LPS 所诱导的炎症反应[4]，分析原因：一方面，少许 LPS 不通过 LPS-LBP-mCD14 复合物的形成过程，可与 PBMC 直接结合，导致炎症介质的释放；另一方面，还可能存在其他的炎症介导途径，因此寻找新的炎症介导途径和阻断方法，已成为抑制过度炎症反应发生的重要研究方向。Thomas 等[5]在肝脏枯否细胞的表面发现 p31、p34 两种可疑蛋白，初步发现它们具有与 LBP 部分相近似的生物学功能。2002 年本课题组从烧伤合并内毒素损伤的兔血清中分离出了一种新蛋白 p48[6]，它也能促进 LPS 与 mCD14 结合，促进炎性细胞因子的释放。在本研究中，我们以 LBP 为对照，通过生物传感器、流式细胞分析、ELISA 等方法，较为详细地研究了 p48 的生物学功能，旨在证明 p48 也可能为一种介导 LPS 炎症反应的重要蛋白。

1　材料与方法

1.1　主要材料及试剂来源

兔源内毒素结合蛋白样分子 p48 及抗 NH-LBP Fab 抗体由本课题组制备[6,7]，标准 LBP 购自 RD Systems 公司（CN 870-LP/CF）。LPS（*E. coli*，0111：B4）、FITC-LPS（*E. coli*，055：B5）、佛波脂（phorbol 12-myristate 13-acetate，PMA）购自 Sigma 公司，HRP-羊抗人 IgG Fab 单克隆抗体购自 Pierce 公司，TNF-α 放免检测试剂盒购自北京北方生物技术研究所，疏水生物传感器样品池（CUV 993600）购自 Thermo 公司，等电点聚焦电泳胶条购自 Pharmcia 公司。

1.2　p48 等电点测定

将等电点聚焦电泳胶条置于电泳槽（IP ghhor IEF Uit 为 Pharmcia Biotech 产品），其中阳性端（酸性端）电泳缓冲液为 1 mol/L 磷酸液，阴性端（碱性端）电泳缓冲液为 1 mol/L NaOH 溶液，设定温度为 20 ℃，在胶条中央点上不含盐 p48 蛋白质液约 5 μl（含蛋白约 2 μg）并进行电泳，此后将胶条用考马斯亮蓝 R-250（含 0.25% 考马斯亮蓝 R-250、45% 甲醇、10% 冰醋酸）液进行固定及染色，经脱色后测定聚合条带距酸性端的距离，计算该距离占整个胶条长度的比值，与标准 pH 曲线比较，获得 p48 的等电点。

1.3　抗 NH-LBP Fab 抗体与 p48 结合活性研究

将 p48 以包被液（0.05 mol/L 碳酸缓冲液，pH 9.6）溶解，包 96 孔板（50 μl/孔，含 p48 0.5 μg/孔），并将 LBP、兔血清白蛋白以相同条件包板，分别作为阳性、阴性对照，4 ℃过夜。除去包被液，洗涤后加入 3% BSA/PBS 液封闭 1 h，以不同浓度（10 mg/L 至 1 μg/L）抗 NH-LBP Fab 抗体作为一抗，以 HRP-羊抗人 IgG Fab 单克隆抗体作为二抗，以 TMB（四甲基联苯胺）为显色底物，按常规方法进行 ELISA 检测。鉴定抗 NH-LBP Fab 抗体能否与 p48 结合，推定其空间结构有无相似性。

1.4　p48 体外生物学活性研究

1.4.1　流式细胞分析实验　　将人外周抗凝全血以 Ficoll 液（Tianjin Biological 公司）进行密度梯度离心，取外周血单核细胞层细胞（PBMC），以 0.01 mol/L 的 PBS 洗涤并调细胞数至 4×10^6/ml；FITC-LPS（终浓度 2.5 μg/L）与 p48（2 μg）共孵育 30 min 后，再加入 2×10^5 PBMC，37 ℃孵育 30 min，此后以 0.01 mol/L 的 PBS 洗涤细胞 2 次，最后用流式细胞仪（美国 ESP EPICS ELITE）检测 PBMC 荧光强度，并以 0.1% 兔血清白蛋白作为阴性对照，以相同浓度 LBP 作为阳性对照，鉴定 p48 是否具有促进 FITC-LPS 与 PBMC 结合的能力。

1.4.2　p48 与 LPS/Lipid A 亲和力测定

1.4.2.1　LPS 及 Lipid A 在生物传感器疏水样品池中的包被　　以异丙醇洗涤传感器表面 5 次，用 PBS/AE 液（含 0.025% 叠氮钠、1 mmol/L EDTA，pH 7.4）洗涤 7 次，收集基线数据 10 min，再以异丙醇洗涤 7 次后，分别于池中加入 20 mg/ml 用异丙醇溶解的 LPS 或 Lipid A 各 20 μl，保留 2 min 后，以 PBS/AE 液洗涤 10 次、0.1 mol/L HCl 液洗涤 5 次、10 mmol/L NaOH 液洗涤 5 次，最后以 PBS/AE 液洗涤 7 次，采集数据，其与基线数据的差值即为已包被的 LPS 或 Lipid A 的包被量，并再次使用 BSA（终浓度 1.5 mg/ml）封闭疏水样品池未与 LPS 或 Lipid A 结合的残余表面。

1.4.2.2　p48 与 LPS 及 Lipid A 结合亲和力的测定　　将 p48 以不同浓度（20、10、5、2.5、1.25、0.625 μmol/L）稀释，并以不同浓度的 p48 作为流动相，分别与疏水样品池中 LPS 或 Lipid A 结合，通过 FASTplot 和 FASTfit 软件，进行作图及亲和力计算[7]，并以 LBP 作为阳性对照进行测定。

1.4.3　TNF-α 体外分泌实验　　U937 细胞常规培养，并以 PMA 10 μg/L 诱导分化成熟，以含 15% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养基悬浮并调细胞数为 1×10^6/ml，24 孔板内加入 1×10^6 U937/孔及 LPS（10 μg/L），再加入 p48（3.3 μg/孔），并以 LBP、兔血清白蛋白（3.3 μg/孔）作为阳性及阴性对照，37 ℃、5% CO_2 孵育。每组取 30 min、1、6、12、24 h，共 5 个时相点，分别吸取培养上清，放免法（中国 262 厂，XH6020-4 探头 γ 免疫记数仪）测定 TNF-α 含量。观测 p48 能否促进 LPS 诱导的 TNF-α 分泌。

1.5　p48 体内生物学活性研究

28 只 10 周龄昆明小鼠，体重约 35 g/只，购自第三军医大学实验动物中心，雌雄不限，随机数字表方法分为 4 组（每组 7 只），空白对照组：腹腔注入兔血清白蛋白（20 μg/100 g）；对照组：腹腔注入 LPS（20 μg/100 g）；阳性对照组：腹腔注入 LPS（20 μg/100 g）及 LBP（30 μg/100 g）；实验组：腹腔注入 LPS（20 μg/100 g）及 p48（30 μg/100 g）。注入 48 h 后，断颈、眼球取血，测定血液中 TNF-α 变化。

1.6　统计学方法

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，对抗 NA-LBP Fab 抗体与 p48 结合活性数据，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　p48 等电点测定

等电点聚焦电泳胶条上可见清晰条带（图 1），聚合条带距

酸性端1.42 cm，条带总长约6.6 cm，比值为0.215，与标准pH曲线比较，测得p48的等电点为pI 4.7。



图1 p48等电点聚焦电泳图

2.2 抗NH-LBP Fab抗体与p48结合活性研究

当抗NH-LBP Fab抗体浓度稀释为0.1 mg/L时，仍能与LBP显著结合。当Fab抗体浓度为10 mg/L时，可与p48有效结合，但当浓度稀释到1 mg/L时，结合力明显下降（表1），说明抗NH-LBP Fab抗体可与p48部分结合，但结合力有限。

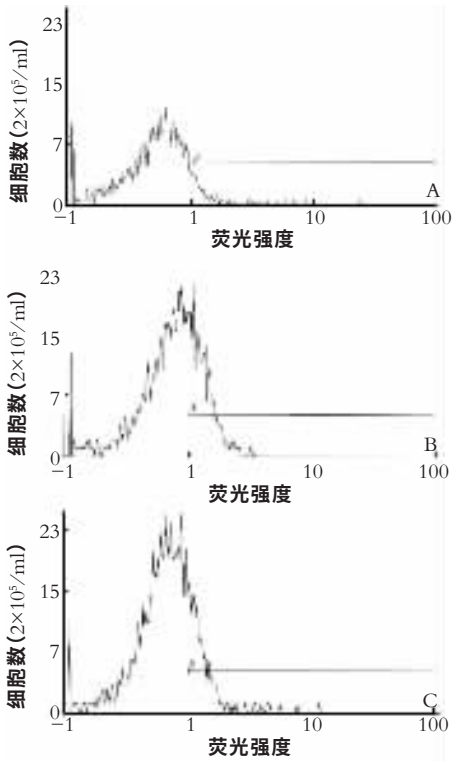
表1 抗NH-LBP Fab抗体与LBP及p48的结合活性（$\bar{x} \pm s$）

抗原	不同浓度Fab抗体(mg/L)				
	10	1	0.1	0.01	0.001
LBP	0.32±0.09[a]	0.19±0.05[a]	0.11±0.04[a]	0.05±0.03	0.04±0.02
p48	0.09±0.04[a]	0.06±0.04	0.04±0.03	0.03±0.02	0.04±0.01
白蛋白	0.03±0.02	0.04±0.02	0.03±0.02	0.04±0.01	0.03±0.01

a：$P<0.05$，与白蛋白比较

2.3 流式细胞仪器分析结果

对人PBMC进行流式细胞仪检测，可见p48和LBP均能促进吸收峰上抬和部分右移（图2），其中阴性对照组（白蛋白）的吸收Pcnt值为6.8，实验组1（LBP阳性对照组）的吸收Pcnt值为42.1，实验组2（p48实验组）的吸收Pcnt值为35.7，p48的生物学活性为LBP的81%［(35.7−6.8)/(42.1−6.8)=0.81］。

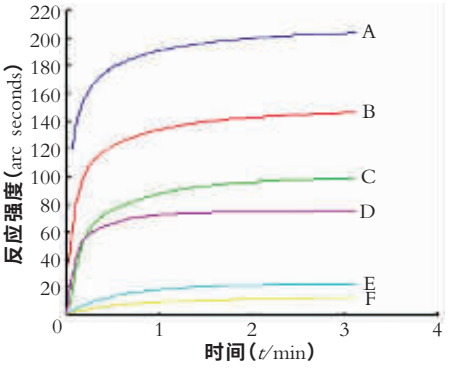


A：阴性对照组（白蛋白）；B：LBP阳性对照组；C：p48实验组

图2 FITC-LPS与人PBMC结合试验结果

2.4 p48与LPS及Lipid A结合亲和力测定

将Lipid A及LPS分别于疏水样品池中包被，其包被量分别约为242和174 arc second，与郑江[9]所报道的251和183 arc second相近，并与厂商所提供的要求比较，证明Lipid A及LPS与疏水样品池的包被量在理想范围内，Lipid A及LPS已在疏水样品池中形成单层脂膜。将不同浓度p48分别与Lipid A及LPS结合（图3），可见随着p48浓度的增加，与Lipid A及LPS结合量也相应增加，经计算获得p48与Lipid A及LPS的亲和常数分别为1.48×10^{-6}、1.59×10^{-6} mol/L。按同样实验方法获得LBP与Lipid A及LPS的亲和常数（KD）分别为1.23×10^{-6}、1.34×10^{-6} mol/L。相同浓度（10 μmol/L）下，p48与LPS的结合量要低于LBP与LPS的结合量（图4），p48与Lipid A及LPS的亲和常数均明显$<10^{-5}$ mol/L数量级，证明p48与Lipid A及LPS结合力明确。



A：20 μmol/L；B：10 μmol/L；C：5 μmol/L；D：2.5 μmol/L；E：1.25 μmol/L；F：0.625 μmol/L

图3 不同浓度的p48与Lipid A的结合曲线

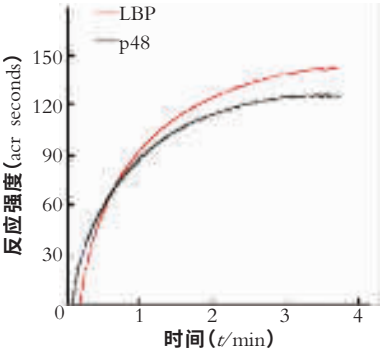


图4 10 μmol/L浓度的p48及LBP与LPS结合曲线

2.5 p48体外诱导TNF-α分泌实验

在TNF-α分泌实验中，当不加入LPS时，培养基中TNF-α维持在较低的浓度（12.8～18.4 fmol/ml）。当只加入LPS（10 μg/L）时，部分LPS可直接与U937细胞结合，促进U937细胞分泌TNF-α，在分泌第24小时TNF-α浓度升至141.1 fmol/ml，p48或LBP组，TNF-α分泌量增加显著（图5），与只加入LPS分泌组比较，差异有显著意义（$P<0.05$），p48与LBP加入组比较，差异不显著（$P>0.05$），但从图形中可看出，LBP活性稍强于p48。

2.6 p48体内生物学活性实验

腹腔注射24 h后，对照组、阳性对照组、实验组小鼠活动减

少，注射 48 h 后，阳性对照组、实验组小鼠活动明显减少、进食减少，但无小鼠死亡。损伤 48 h 后，取全血并测血清中 TNF-α 含量，可见腹腔注入 LPS 组[TNF-α 浓度(33.22 ± 14.02) fmol/ml]与腹腔血清白蛋白注射组[TNF-α 浓度(9.08 ± 3.57) fmol/ml]相差显著($P < 0.05$)，证实低浓度 LPS 在体内即可诱导炎症反应，促进 TNF-α 分泌，但在合并注射了 p48 [TNF-α 浓度(69.95 ± 21.36) fmol/ml]或 LBP[TNF-α 浓度(87.95 ± 28.61) fmol/ml]后，TNF-α 分泌升高更加显著($P < 0.05$)，其中 p48 的生物学活性为 LBP 的 77%[(69.95 − 9.08)/(87.95 − 9.08) = 0.77]。

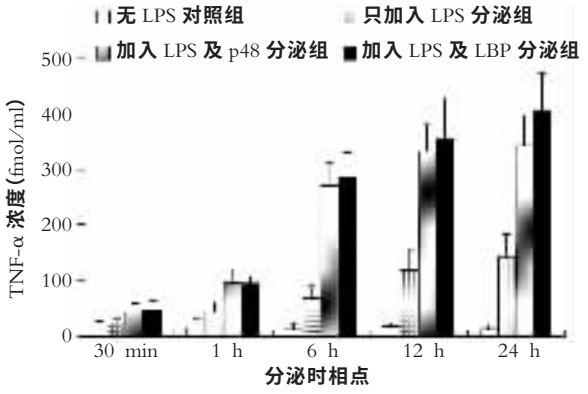


图 5　人 U937 细胞刺激后 TNF-α 分泌实验

3　讨论

本研究在课题组所制备的内毒素结合蛋白样分子 p48 基础上，采用生物传感器、流式细胞分析、体内外 TNF-α 实验等方法，将 p48 的生物学功能与 LBP 进行比较研究，初步研究了 p48 的生物学功能。

以往的研究认为只有 LBP 起介导 LPS 的作用，但通过阻断 LBP，却不能很显著地降低 LPS 的炎症反应，Le-Roy 等[10]发现 CD14、LBP 的单抗可以推迟 TNF-α 的分泌和减少 24 h 内的死亡率，但不能改变 24 h 以后的动物死亡率，抗 TLR4/MD-2 单抗也只能部分阻断 LPS 介导的 IL-6、TNF-α 等细胞因子的释放，这些现象提示在血清中可能还存在其他的内毒素结合蛋白和其他信号传导途径。近期 Thomas 等[5]在肝脏枯否细胞的表面发现 p31、p34 两种可疑蛋白，初步发现它们具有与 LPS 结合的生物学功能，p31、p34 能与双磷酰脂质 A(diphosphoryl lipid A)结合，但不能与单磷酰脂质 A(monophosphoryl lipid A)结合，并且其信号途径可能与 CD14/ NF-κB 途径无关，然而在腹腔单核细胞及 PBMC 中均未发现上述 p31、p34 两种蛋白。

p48 为兔外周血中的一种微量蛋白，流式细胞实验充分证明 p48 能促进 LPS 与 PBMC 结合，其活性为 LBP 的 81%。在生物传感器结合实验中，p48 能与 LPS 及 Lipid A 结合，其亲和常数(KD)均小于 10^{-5} mol/L 数量级，证明 p48 与 LPS 及 Lipid A 结合力较强。p48 与 LPS 及 Lipid A 的亲和常数(KD)较 LBP 与 LPS 及 Lipid A 的亲和常数(KD)稍低，证明 p48 与 LPS 及 Lipid A 的结合力较 LBP 稍弱。本研究结果提示 p48 及 LBP 与 Lipid A 的结合力稍强于与 LPS 的结合力，这也许是因为 Lipid A 为 LPS 的核心部位，Lipid A 体积更小，暴露更充分，易于与 p48 及 LBP 结合。

p48 在体内外 TNF-α 分泌实验中，均能促进 LPS 介导的炎症反应发生、发展，导致 TNF-α 的大量分泌，在体内分泌研究中，p48 的生物学活性约为 LBP 的 77%，证明了 p48 具有与 LBP 相近的生物学功能。

高浓度抗 NH-LBP Fab 抗体能与 p48 特异性结合，但结合力较低，证明 p48 部分空间结构与 NH-LBP 有一定的相似性，但也有明确的差异性，还需进一步研究 p48 的空间结构。

参考文献：

[1] Mansson L E, Kjall P, Pellett S, *et al*. Role of the lipopolysaccharide-CD14 complex for the activity of hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli*[J]. Infect Immun, 2007, 75(2): 997 − 1004.

[2] Mueller M, Lindner B, Dedrick R, *et al*. Endotoxin: physical requirements for cell activation[J]. J Endotoxin Res, 2005, 11(5): 299 − 303.

[3] Thompson P A, Tobias P S, Viriyakosol S, *et al*. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits responses to cell-bound LPS[J]. J Biol Chem, 2003, 278(31): 28367 − 28371.

[4] Gutsmann T, Muller M, Carroll S F, *et al*. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells[J]. Infect Immun, 2001, 69(11): 6942 − 6950.

[5] Thomas P, Lazure D A, Moussa R, *et al*. Identification of two novel LPS-binding proteins in Kupffer cells: implications in TNF-alpha production[J]. J Endotoxin Res, 2006, 12(6): 352 − 357.

[6] 葛晓冬，刘友生，王晓东，等. 一种新型兔源内毒素结合蛋白的分离纯化及体外生物活性的初步研究[J]. 中华烧伤杂志，2003，19(1)：42 − 46.

[7] 葛晓冬，邹　佳，刘友生，等. 人源抗 NH-LBP Fab 抗体的制备和初步鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2007，23(4)：359 − 362.

[8] Bertucci C, Cimitan S, Menotti L. Optical biosensor analysis in studying herpes simplex virus glycoprotein D binding to target nectin1 receptor[J]. J Pharma Biomed Anal, 2003, 32(4-5): 697 − 706.

[9] 郑　江，龚小云，吕根法，等. 杀菌性/通透性增加蛋白模拟肽与 LPS/Lipid A 的亲和力测定[J]. 解放军医学杂志，2003，28(3)：197 − 199.

[10] Le-Roy D, Di-Padova F, Adachi Y, *et al*. Critical role of Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in immune responses against gram-negative bacteria[J]. J Immunol, 2001, 167(5): 2759 − 2765.

（编辑　汪勤俭）