DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.14.011

论著

文章编号:1000-5404(2004)14-1252-03

多粘菌素B拮抗内毒素的体外作用研究

吕根法[1],卫 国[1],郭毅斌[1],肖光夏[2],郑 江[1],罗高兴[2] (第三军医大学西南医院:[1]实验研究中心,[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 探讨多粘菌素B(PMB)对内毒素(LPS)的亲合、中和能力,以及体外抑制LPS作用的时效和量效关系。方法 应用鲎试剂动态浊度法测定PMB对LPS的中和能力;应用生物传感器技术测定PMB与Lipid A的亲和力;并测定PMB对LPS刺激的人PBMC释放TNF-α、IL-6的抑制作用。结果 PMB具有较强的LPS中和能力,其IC_{50}约为4.35±0.91 μmol/L;与Lipid A具有很高的亲和力,其解离平衡数(kinetic dissociation constant, KD)=1.11×10^{-8} mol/L;10 μg/ml的PMB能够明显抑制100 ng/ml LPS刺激的人PBMC释放TNF-α、IL-6的释放($P<0.05$),并具有明显的量效关系;在LPS刺激PBMC前应用PMB,细胞因子释放的抑制率达95%以上,但在LPS刺激后10 min,PMB即失去了对细胞因子的抑制作用($P>0.05$)。结论 PMB具有较强的内毒素结合及中和能力,并呈剂量和时间依赖性地抑制内毒素刺激的人PBMC释放炎性介质。

关键词:多粘菌素B;内毒素;肿瘤坏死因子-α;白细胞介素-6
中图法分类号:R-322;R392.11;R996 文献标识码:A

Study of anti-endotoxin effect of polymyxin B *in vitro*

Lü Gen-fa[1], WEI Guo[2], GUO Yi-bin[2], XIAO Guang-xia[1], ZHENG Jiang[2] ([1]Central Laboratory, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of polymyxin B (PMB) on the affinity and neutralization with lipid A and the anti-LPS effect of PMB. Methods The ability of PMB on endotoxin-neutralization was detected by quantitative limulus amoebocyte lysate assay. The affinity for lipid A was detected by biosensor technology. The inhibitory effect of PMB on the inhibition of TNF-α and IL-6 released from LPS-stimulated human PBMC was detected by ELISA. Results PMB had high anti-LPS ability. Inhibition concentration at 50% endotoxin was (4.35±0.91) μmol/L. PMB also had high affinity for lipid A. The KD value for lipid A was 1.11×10^{-8} mol/L. PMB at the dose of 10 μg/ml had significantly inhibitory effect on TNF-α and IL-6 release induced by 100 ng/ml LPS ($P<0.05$) in a dose-effect manner. PMB at the dose of 80 μg/ml administrated 10 min before LPS could result in 95% of the inhibition rate. But at 10 min after LPS stimulation, the effect was not significant. Conclusion PMB has high binding and neutralizing abilities of LPS and can inhibit the release of TNF-α and IL-6 in time- and dose-dependent manners.

Key words: polymyxin B; LPS; TNF-α; IL-6

内毒素即脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)是革兰阴性菌外膜的重要组成成分,是介导全身性炎症反应综合征或脓毒症的主要启动子。在严重的烧伤、创伤和感染等病理情况下,肠道内的细菌和LPS可进入血液而介导或加重脓毒症。LPS通过激活巨噬细胞、中性粒细胞等引起炎性介质的释放,导致机体的损伤甚至死亡。仅在美国,每年有超过50万人患有由内毒素引起的脓毒症,死亡率超过40%[1]。但是,目前对LPS引起相关疾病的治疗仍然以对症、支持治疗为主,缺乏特异性的拮抗LPS药物供临床使用。多粘菌素B(polymyxin B, PMB)对脓毒症动物显示一定的保护作用,因此探讨多粘菌素B拮抗LPS的作用具有一定的应用价值。本研究从PMB对LPS的中和作用、PMB与Lipid A的亲和力测定以及PMB抑制LPS活化细胞的量效和时效关系等方面,探讨PMB体外对内毒素的拮抗作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

LPS O111:B4,PMB,Samonella Lipid A Re595,Sigma产品;淋巴

作者简介:吕根法(1970-),男,河南省灵宝市人,博士研究生,主治医师,主要从事内毒素拮抗方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68765466
通信作者:郑 江,罗高兴,电话:(023)68754435,68752688
收稿日期:2003-08-28;修回日期:2004-03-12
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞分离液, 上海试剂二厂; 人 TNF-α、IL-6 ELISA 试剂盒, 深圳晶美公司。生物传感器、原始板样品池, Thermo 公司产品, EDS-99 细菌内毒素测定系统, 广州湛江科学仪器厂; 试验所用塑料容器均经 ^{60}Co 辐照去热源; 玻璃容器清洁干燥后 250 ℃处理 1.5 h。

1.2　方法

1.2.1　内毒素中和试验　　终浓度 1 mg/ml 的 PMB 进行倍比稀释, 与 2 ng/ml 的 LPS O111∶B4 等体积混合, 37 ℃水浴 30 min, 平行三管, 鲎试剂动态浊度法测定中和后的内毒素值, 并计算出抑制 50% 内毒素的 PMB 浓度(IC_{50})。

1.2.2　PMB 与 Lipid A 的亲和力测定　　将 Lipid A 包被于原始板样品池表面, 应用生物传感器技术, 以 PMB 为流动相, 测定 PMB 与 Lipid A 的亲和力。

1.2.3　PMB 对 LPS 刺激的人外周血 PBMC 释放 TNF-α、IL-6 的抑制效应　　常规分离健康人外周血 PBMC, 调整细胞数 8×10^5/ml, 37 ℃、5% CO_2 培养 3 h, 加入 100 ng/ml LPS O111∶B4, 并加入不同剂量或于不同的时间加入 PMB, 4 h 后取细胞上清液测定 TNF-α、IL-6。

1.2.4　TNF-α、IL-6 的测定　　按照 ELISA 试剂盒操作说明进行操作。

1.3　统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 统计软件中的方差分析。

2　结果

2.1　内毒素中和结果

从图 1 的半对数图可以看出, PMB 具有较强的中和内毒素能力, 呈剂量依赖性抑制 LPS 催化的鲎试剂反应, $IC_{50}\approx(4.35\pm0.91)$ μmol/L。

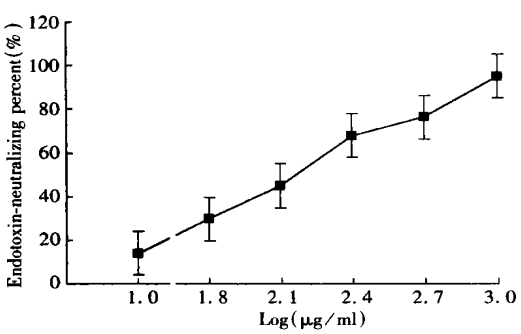


图 1　PMB 的内毒素中和抑制曲线

Fig 1　Dose-dependent curves for endotoxin neutralization

2.2　PMB 与 Lipid A 的亲和力测定结果

PMB 与 LPS 的活性中心 Lipid A 结合, 是其发挥生物学功能的关键, 图 2 结果显示, PMB 与 Lipid A 具有很高的亲和力。其解离平衡数(kinetic dissociation constant, KD)= 1.11×10^{-8} mol/L。

2.3　PMB 对人外周血 PBMC 释放 TNF-α、IL-6 的抑制效应

2.3.1　量效关系　　PMB 10、20、40、80 μg/ml 与 LPS 100 ng/ml 同时加入人 PBMC 细胞培养液中, 4 h 后取上清液, 测定 TNF-α、IL-6, 结果见表 1。PMB 对 LPS 刺激人 PBMC 的 TNF-α、IL-6 的释放具有显著的抑制作用, 并呈明显的量效关系。

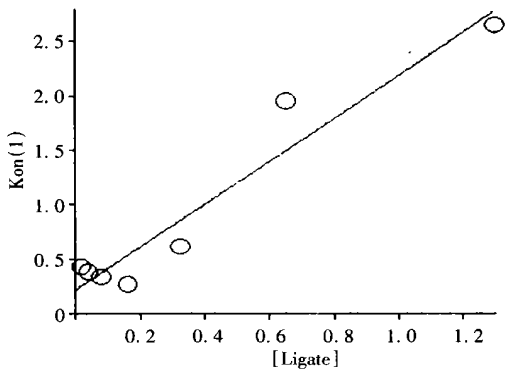


图 2　多粘菌素 B 与 Lipid A Re595 的亲和力测定

Fig 2　The affinity of PMB for Lipid A Re595

表 1　PMB 抑制 LPS 刺激 PBMC 释放 TNF-α、IL-6 量效关系($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Dose-effect inhibition of TNF-α and IL-6 released from LPS-stimulated human PBMC ($\bar{x}\pm s$)

PMB (μg/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)
Control	2 046.37±105.69	3 736.83±904.91
10	812.65±86.32 *	761.83±386.95 *
20	512.39±95.36 **	544.33±264.20 **
40	358.36±64.29 **	428.08±166.19 **
80	287.81±59.36 **	292.67±85.45 **
F	327.24	13.418
P	1.84×10^{-14}	7.6×10^{-5}

Control: IL-6 and TNF-α release from human PBMC stimulated by only LPS　*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$, *vs* control

2.3.2　时效关系　　PMB 80 μg/ml、LPS 100 ng/ml 分别于 −20、−10、0、+10、+20 min("−"表示 PMB 与 LPS 先孵育; "+"表示先加入 LPS)加入 PMBC, 4 h 后取上清测定 IL-6、TNF-α, 结果见表 2。PMB 与 LPS 孵育 10 min 作用于 PBMC, 能够明显抑制 IL-6、TNF-α 的释放, 同时加入细胞培养液, 仅能部分抑制 IL-6、TNF-α 释放, 但当 LPS 刺激细胞 10 min 后, PMB 几乎不能抑制 IL-6、TNF-α 的释放。

表 2　PMB 对 LPS 刺激的人 PBMC 释放 IL-6、TNF-α 的时效关系($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Time-dependent inhibition of TNF-α and IL-6 released from LPS-stimulated human PBMC ($\bar{x}\pm s$)

Time (min)	IL-6 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)
Control	1 951.85±90.54	3 767.67±356.82
−20	120.31±7.92 **	226.83±27.70 **
−10	124.92±8.66 **	216.00±51.26 **
0	309.92±99.84 *	311.83±38.29 *
10	1 726.46±358.50	2 791.00±187.86
20	1 816.08±247.96	3 240.17±292.53
F	165.75	1 042.47
P	2.15×10^{-14}	1.65×10^{-21}

Control: IL-6 and TNF-α release from human PBMC stimulated by only LPS　*: $P<0.05$　**: $P<0.01$, *vs* control

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

机体受到严重的创伤或应激状态下，由于细菌内毒素的移位，或机体在感染、抗生素的作用下，均可引起内毒素血症，内毒素通过巨噬细胞、中性粒细胞等引起炎性介质的释放，造成机体的损伤。因此，及时应用中和内毒素的药物，抑制内毒素的活化，无疑是治疗成功的关键。

PMB是一种环形阳离子多肽，被认为是惟一具有抗内毒素作用的抗生素，通过破坏细菌外膜磷脂、与Lipid A的SO_4^-结合，发挥杀菌和中和内毒素双重作用。由于PMB的中枢神经和肾毒性，限制了其临床应用，但有报道在烧伤病人应用亚抑菌量PMB后，能降低病人的血浆内毒素水平，而无肝肾毒性[2]。近年报道采用药物铰链技术将PMB与高分子有机物Dextran 70或聚苯乙烯纤维连接在一起[3]，通过血液透析，以减轻PMB的毒性而保留其内毒素中和能力，将这种与其它抗生素合用于治疗革兰阴性杆菌感染性休克，通过杀菌与中和内毒素并举，可明显提高休克动物的生存率[4]，在日本，多粘菌素B复合物是临床上治疗内毒素休克最有效的方法之一，能够降低循环内毒素水平和改善血液动力学参数。

在LPS引起的炎性瀑布反应中，TNF-α、IL-6具有重要的作用，是造成机体病理损害的主要炎性介质，Tsuzukit等[5]报道，PMB的治疗作用可能与降低TNF-α、IL-6有关，TNF-α、IL-6的降低一方面是由于PMB对内毒素的中和作用，另一方面也可能与其对内毒素活化后的细胞内信号转导NF-kB通路的下调有关。本研究的结果显示，PMB具有直接灭活内毒素作用，$IC_{50}\approx$（4.35±0.91）μmol/L，显示了较强的中和内毒素能力，与LPS的活性中心Lipid A具有很高的亲和力，说明与LPS活性中心Lipid A的结合，是PMB直接抑制LPS生物学活性的基础。PMB能够显著抑制LPS对人PBMC的TNF-α、IL-6的释放，具有明显的量效和时效关系，而且应用愈早，抑制作用愈明显，10 min后应用即无明显效果，进一步说明PMB直接中和内毒素，可能是其发挥抗炎作用的主要途径，一旦LPS与细胞表面的受体结合，介导细胞活化后，PMB将失去其抗内毒素作用。因此本研究的结果支持PMB对内毒素的直接中和作用是其拮抗内毒素的主要方式。

参考文献：

[1] O'Reilly M, Newcomb D E, Remck D. Endotoxin sepsis, and the primrose path[J]. Shock, 1999, 12(6): 411—420

[2] Andrew M, Calvin B. Reversal of postburn immunosuppression with low dose polymyxin B[J]. J Trauma, 1986, 26(11): 995—998

[3] Bucklin S E, Lake P, Logdberg L, *et al*. Therapeutic efficacy of a polymyxin B-dextran 70 conjugate in experimental model of endotoxemia[J]. Antimicro Agents Chemother, 1995, 39(7): 1462—1466

[4] Aoki H, Kodama M, Tani T, *et al*. Treatment of sepsis by extracorporeal elimination of endotoxin using polymyxin B immobilized fiber[J]. Am J Surg, 1994, 167(4): 412—417.

[5] Tsuzuki H, Tani T, Ueyama H, *et al*. Lipopolysaccharide: Neutralization by polymyxin B shuts down the signaling pathway of nuclear factor kappB in peripheral blood mononuclear cells, even during activation[J]. J Surg Res, 2001, 100(1): 127—134

（编辑 陈聪连）

（上接1251页）

少。本结果显示慢性肾衰患者红细胞膜带3蛋白相对含量较正常人高，提示慢性肾衰患者红细胞膜蛋白构成异常。带3蛋白介导的HCO^2/Cl^-交换对组织CO_2运输和肺CO_2排出起重要作用[3]，它可明显加强血液有效携带CO_2的能力。部分代偿代谢性酸中毒引起的pH下降。慢性肾衰患者带3蛋白相对含量增高可能是肾性贫血发生的机制之一；但有关慢性肾衰患者带3蛋白构象和拓形改变有待进一步研究。rHuEPO治疗后带3蛋白相对含量回落，提示rHuEPO治疗肾性贫血的机制，一方面是促进骨髓造血，另一方面可能与影响衰老红细胞的识别和清除有关[4]。

关键词：促红细胞生成素；带3蛋白；慢性肾功能衰竭
中图法分类号：R692.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] 李津婴，周 虹，夏 放，等. 辐射远后效应对红细胞膜阴离子转运蛋白基因表达的影响[J]. 中华放射医学与防护杂志，2002，22(4)：275—276.

[2] 张龙翔. 生化实验方法帮技术[M]. 北京：人民教育出版社，1981. 21.

[3] 刘利梅，傅国辉，王天英，等. 人类红细胞膜带3蛋白C端域Lys892-Phe895在Cl^-转运过程中作用的研究[J]. 生物化学与生物物理进展[J]，2003，30(2)：245—250.

[4] Delaunay J. Molecular basis of red cell membrane disorders. Acta Haematol[J]. 2002, 108(4): 210—8.

（编辑 郭建秀）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net