DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.07.006
第26卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 7
2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

文章编号:1000-5404(2004)07-0573-03

论著

噬菌体展示短肽模拟脂多糖结合蛋白抗炎功能位点的研究

徐德斌,钱桂生,侯一峰,赵晓利,陈维中,李淑萍 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 应用噬菌体随机12肽库筛选脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)具有抗炎作用的肽序列。方法 以LPS为目标分子,对噬菌体十二肽库进行亲合筛选,4轮筛选后,检测随机挑取的噬菌体克隆的结合活性和抑制活性,对可与LBP竞争性结合LPS的噬菌体克隆行细胞因子生成抑制实验和LPS内化抑制实验,对获得的阳性克隆进行DNA序列测定,推导外源肽氨基酸序列,并与LBP序列比较,确定LBP的抗炎功能位点。结果 随机挑取的100个噬菌体克隆中16个可与LBP竞争性结合LPS,其中7个噬菌体克隆对LBP的增敏LPS刺激PBMC分泌TNF-α功能无作用,对这7个克隆进行LPS内化抑制实验,其中3个克隆可以抑制LBP增强LPS内化作用。测序发现这3个阳性克隆融合多肽的序列均为FHTRWNYWPYLH,与LBP一级结构氨基酸序列同源性低。结论 该12肽序列可以模拟LBP的抗炎功能位点。

关键词:噬菌体随机肽库;脂多糖结合蛋白;功能位点
中图法分类号:Q516; R373.9; R394.2 文献标识码:A

Screening of peptide mimicking antiinflammatory functional site of lipopolysaccharide binding protein by phage peptide library

XU De-bin, QIAN Gui-sheng, HOU Yi-feng, ZHAO Xiao-li, CHEN Wei-zhong, LI Shu-ping (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To screen mimic peptide of antiinflammatory functional site of lipopolysaccharide binding protein (LBP) from phage random 12-mer peptide library. Methods Using LPS as the target molecule, 4 rounds of bio-panning to a phage random 12-mer peptide library were carried out. A total of 100 clones were selected and used in binding test, competitive inhibition test, and function test. Positive clones were sequenced and compared with LBP sequence. Results Sixteen phage clones out of the 100 clones could inhibit the binding of LBP to LPS, and 7 out of 16 clones had no effects on the function of LBP which enhanced the LPS-dependent activation of PBMC. Three out of the 7 clones could inhibit the function of LBP to enhance LPS internalization, and had a consensus peptide sequence FHTRWNYWPYLH. Conclusion These results suggest that 12-mer peptide could mimic the antiinflammatory functional site of LBP.

Key words: phage random peptide library; lipopolysaccharide binding protein; functional site

脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)是存在于正常人和动物血清中的一种糖蛋白,属于I型急性期反应蛋白。LBP具有致炎和抗炎的双重作用[1]。LBP既可使LPS多聚体形成单体,加速LPS与其受体CD14结合,增强靶细胞对LPS的敏感性[2];也可加速LPS与靶细胞膜上的清除受体结合,使LPS被靶细胞清除;还可催化LPS与脂蛋白结合,后者可中和LPS的生物学活性,加速体内LPS的清除[3]。LBP的不同作用可能是由不同功能位点决定的,当LBP的某一功能位点与LPS结合时,表现为对LPS的增敏作用,而当另一功能位点与LPS结合时,则可增强LPS的内化,表现为对LPS的抑制性调理作用。本研究应用噬菌体肽库技术研究LBP的抗炎功能位点,对于更深入了解LBP作用和进一步阐明内毒素血症的发病机制具有一定意义。

1 材料和方法

1.1 主要材料

噬菌体随机12肽库及大肠杆菌购自美国New England Biolabs公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗M13单克隆抗体购自瑞典Pharmacia公司,TNF-α检测试剂盒和rhLBP由晶美生物工程有

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170366)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (20170366)
作者简介:徐德斌(1968-),男,山东省滕州市人,博士研究生,主治医师,主要从事ARDS方面的研究,发表论文15篇。电话(023)68755320
收稿日期:2003-09-08;修回日期:2004-02-15

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

限公司提供，LPS 和 FITC-LPS(0111：B4)为 Sigma 公司产品。

1.2 噬菌体肽库的亲和筛选

LPS 用包被液(0.1 mol/L $NaHCO_3$，pH 8.6)稀释至浓度为 10 μg/ml，取 1.5 ml 包被塑料培养皿(Nunc，d=60 mm)，4 ℃过夜。次日弃去包被液，加入封闭液(0.1 mol/L $NaHCO_3$，5 mg/ml BSA，0.02% NaN_3)4 ℃至少 1 h。弃去封闭液，TBST 洗涤平皿 6 次。取 10 μl 原始库溶液(含 4×10^{10} 噬菌体)用 1 ml TBST 稀释，加入平皿中，室温轻轻摇动 1 h。移去肽库溶液，TBST 洗涤平皿 10 次。加入 1 ml 酸洗脱液(1 mg/ml BSA，0.2 mol/L Gly-HCl，pH 2.2)，室温平缓摇动 8 min，把洗脱液移至 1.5 ml Ep 管，立即加入 150 μl 中和液(1 mol/L Tris-HCl，pH 9.1)至中性。取 1 μl 测滴度，其余加入 20 ml 对数早期的大肠杆菌 ER2738 菌液中，37 ℃，225 r/min 孵育 4.5 h，特异性结合的噬菌体克隆得到扩增。应用 PEG/NaCl 沉淀噬菌体，在 LB/IPTG/Xgal 平板上测定扩增的噬菌体滴度，并进行下一轮的筛选。共进行 4 轮亲和筛选，逐轮减少 LPS 浓度，缩短噬菌体克隆与 LPS 的结合时间，增加 Tween-20 浓度。前 2 轮采用酸洗脱，第 3、4 轮采用 LBP 竞争性洗脱。

1.3 滴度测定

按试剂盒操作说明。

1.4 结合活性的测定

从第 4 轮筛选出的噬菌体库中随机挑取 100 个克隆，扩增后测定与 LPS 的结合活性。1 μg/ml LPS 包被 96 孔板，每孔 100 μl，4 ℃过夜。弃去包被液，每孔加 100 μl 封闭液，4 ℃封闭 2 h。弃去封闭液，TBST 洗板 6 次，每孔加入 100 μl 噬菌体克隆，室温结合 2 h，洗板 6 次后加入 200 μl 酶标抗 M13 单抗(1∶5 000)，室温结合 1 h，洗板 6 次。每孔加入 200 μl ABTS 显色液，室温 30 min，测 A_{405} 值。以噬菌体原库为阴性对照。

1.5 竞争抑制实验

可与 LPS 结合的噬菌体克隆进一步做竞争抑制实验。LPS 包被、封闭同上，10 μg/ml LBP 50 μl 与 50 μl 噬菌体克隆加入酶标板，室温结合 2 h，洗板后加入 200 μl 酶标抗 M13 单抗，室温结合 1 h，洗板加入 ABTS 显色液，室温 30 min，测 A_{405} 值。以噬菌体克隆 50 μl 加 TBS 50 μl 为对照。抑制率% = (1－A 实验孔/A 对照孔)%

1.6 细胞因子生成抑制实验

肝素抗凝静脉血，淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell，PBMC)，Hanks 液洗涤 3 遍后用含 10%小牛血清的 1640 培养液调整细胞浓度为 1×10^6/ml。设 3 个对照组：Ⅰ组(PBMC)、Ⅱ组(PBMC＋LPS)、Ⅲ组(PBMC＋LPS＋LBP)，实验组为 PBMC＋LPS＋LBP＋噬菌体克隆下又分为 16 个克隆组(C1-C16)。各组 LPS 和 LBP 的终浓度均为 10 ng/ml。孵育 24 h 后收集上清液，－20 ℃冰箱保存待测。按 ELISA 试剂盒说明测定 TNF-α。

1.7 LPS 内化抑制实验

参照文献[4]的方法。分离 PBMC 并调整细胞浓度同上。分组：Ⅰ组 PBMC＋FITC-LPS 组，Ⅱ组 PBMC＋FITC-LPS＋LBP 组，噬菌体克隆组为 PBMC＋FITC-LPS＋LBP＋噬菌体克隆。取 1 ml PBMC 置入 Ep 管中，分别加入的 FITC-LPS 和 LBP 终浓度分别为 1 μg/ml 和 10 μg/ml，37 ℃孵育 2 h，PBS 漂洗 2 次，流式细胞仪检测每份标本 10 000 个 PBMC 的平均荧光强度。

1.8 阳性噬菌体克隆融合肽 DNA 序列测定和同源性分析

将筛选得到的阳性噬菌体克隆制备单链 DNA，试剂盒提供-96gⅢ测序引物 5′-^{HO}CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3′，应用 Sanger 双脱氧终止法测定阳性噬菌体克隆的 DNA 序列，根据外源 DNA 序列推导融合表达的 12 肽序列，并与 LBP 的一级结构进行同源性分析。

1.9 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 统计软件进行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 亲和性噬菌体的筛选

以 LPS 为目标分子在 12 肽库中进行亲和筛选，前 2 轮酸洗脱，得到与 LPS 高亲和力的噬菌体克隆，后 2 轮采用 LBP 竞争性洗脱，得到与 LBP 竞争性结合 LPS 的噬菌体克隆。经 4 轮筛选，回收率从 3.5×10^{-6} 增加到 5.2×10^{-2}，噬菌体得到了有效的富集，结果见表 1。

表 1 4 轮亲和筛选对对噬菌体的富集

Tab 1 Selective enrichment of phage after 4 rounds of panning

Round of panning	Input phage (TU)	Output phage (TU)	Yield
1	4.0×10^{10}	1.4×10^{5}	3.5×10^{-6}
2	2.2×10^{12}	3.8×10^{7}	1.7×10^{-5}
3	6.8×10^{12}	5.3×10^{8}	7.8×10^{-3}
4	8.5×10^{12}	4.4×10^{9}	5.2×10^{-2}

TU：Transduction unit

2.2 结合活性实验

经过 4 轮亲和筛选，随机挑取的 100 个克隆中有 72 个克隆 A_{405} 值＞0.2，高于对照组 10 倍以上，与 LPS 有较高的结合活性。

2.3 竞争抑制实验

将结合活性实验得到的阳性噬菌体克隆行竞争抑制实验，其中 16 个克隆抑制活性超过 40%，能较大程度抑制 LBP 与 LPS 的结合，进一步检测其生物学活性。

2.4 细胞因子生成抑制实验

结果显示Ⅱ组 TNF-α 含量显著高于Ⅰ组($P<0.01$)，Ⅲ组 TNF-α 含量显著高于Ⅱ组($P<0.01$)。噬菌体克隆 C2、C3、C4、C9、C11、C14 和 C16 组的 TNF-α 含量与Ⅲ组无显著差别($P>0.05$)，见表 2。对这 7 个克隆进一步行 LPS 内化抑制实验。

2.5 LPS 内化抑制实验

结果见表 3。Ⅱ组荧光强度显著高于Ⅰ组，LBP 可显著增强 LPS 的内化作用。7 个噬菌体克隆组中 C2、C4、C11 组荧光强度显著小于Ⅱ组($P<0.01$)，表明这 3 个克隆具有抑制 LBP 的增强 LPS 内化的活性。这 3 个噬菌体克隆所展示的融合肽可以模拟 LBP 的抗炎功能位点。

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

表 2　噬菌体展示肽对 LBP 增敏 LPS 诱导 PBMC 分泌 TNF-α 的抑制活性($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of phage clones on the function of LBP to enhance the LPS-induced TNF-α secreted by PBMC ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	TNF-α (A450)	Group	TNF-α (A450)
Ⅰ	0.066±0.011	C8	0.327±0.059△★
Ⅱ	0.121±0.017△★	C9	0.529±0.040△
Ⅲ	0.532±0.053△	C10	0.256±0.057△★
C1	0.271±0.072△★	C11	0.543±0.044△
C2	0.515±0.043△	C12	0.233±0.062△★
C3	0.506±0.044△	C13	0.401±0.050△★
C4	0.535±0.034△	C14	0.521±0.046△
C5	0.297±0.032△★	C15	0.228±0.039△★
C6	0.196±0.043△★	C16	0.541±0.051△
C7	0.324±0.052△★		

△: $P<0.01$, *vs* group Ⅰ; ★: $P<0.01$, *vs* group Ⅲ

表 3　噬菌体展示肽对 LBP 增强 LPS 内化的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effects of phage clones on the function of LBP to enhance LPS internalization ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Fluorescence intensity
Ⅰ	39.33±9.37
Ⅱ	152.17±13.51△
C2	120.52±16.27△★
C3	142.83±9.54△
C4	108.16±9.73△★
C9	148.67±11.16△
C11	115.33±12.26△★
C14	155.56±14.22△
C16	150.67±10.75△

△: $P<0.01$, *vs* group Ⅰ; ★: $P<0.01$, *vs* group Ⅱ

2.6　阳性噬菌体克隆融合肽 DNA 序列测定和同源性分析

3 个阳性噬菌体克隆融合肽 DNA 序列一致, 推导融合表达的 12 肽序列为 FHTRWNYWPYLH, 该序列与 LBP 一级结构的同源性低, 提示是 LBP 与 LPS 结合的一个模拟位点, 而不是线性位点。

3　讨论

噬菌体展示肽库技术是利用生物分子间的相互作用来筛选功能分子, 由于噬菌体表面呈现的多肽能够与靶分子结合, 因而通过亲和筛选可以从噬菌体随机肽库中筛选与靶分子结合的多肽, 即让多肽模拟天然配体的结合部位与靶分子结合, 直接测知配体与受体的结合位点, 多肽序列可以通过测定噬菌体所插入的外源 DNA 序列而得知[5]。蛋白质分子之间的相互作用并不需要整体构象的识别和锲和, 而是由分子上数个关键氨基酸所决定的, 含有这些氨基酸的短肽可以模拟蛋白分子上的结合位点对受体进行结合。采用噬菌体肽库筛选蛋白的功能位点, 可能得到线性位点, 也可能得到空间位点或构象位点。

本研究应用亲和富集法对噬菌体 12 肽库进行 4 轮亲和筛选, LPS 用量逐轮减少, 目的在于筛选得到高亲和力的噬菌体克隆。前 2 轮采用酸洗脱, 后 2 轮采用 LBP 竞争性洗脱, 这样得到的噬菌体克隆可与 LBP 竞争性结合 LPS。我们随机挑取 100 个克隆, 经与 LPS 的结合实验和与 LBP 竞争抑制实验, 确证其中 16 个克隆可与 LBP 竞争结合 LPS。通过细胞因子生成抑制实验, 其中 7 个噬菌体克隆不能抑制 LBP 增敏 LPS 的致炎作用; 通过 LPS 内化抑制实验, 发现 3 个克隆可以抑制 LBP 增强 LPS 内化作用, 这 3 个噬菌体克隆所展示的融合肽可以模拟 LBP 的抗炎功能位点。

LBP 与 BPI 同属于 LPS 结合和脂质转运蛋白家族, 氨基酸序列有 44%的同源性, 分子结构相似, 均呈扁平回飞棒状, 分为大小相似的 N 末端区域和 C 末端区域, 中间由 21 个富含脯氨酸残基的肽链连接[6]。即往的研究表明 LBP 的 N 末端区域主要与 LPS 结合, C 末端区域主要决定 LBP/LPS 复合物结合的靶目标[7,8]。我们获得噬菌体克隆所展示的融合多肽序列与 LBP 的一级结构比较同源性低, 提示可能为模拟位点。LBP 具有抗炎和致炎双重作用, 在 G^- 杆菌引起的内毒素血症中是一把双刃剑, 深入探讨 LBP 的功能位点, 进一步研究利用其抗炎作用, 阻断其致炎位点, 对于阐明内毒素血症的发病机制和提高防治水平具有重要意义。

参考文献:

[1] 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.

[2] Fenton M J, Golenbock D T. LPS-binding proteins and receptors[J]. J Leukoc Biol, 1998, 64(1): 25－32.

[3] Vreugdenhil A C, Rousseau C H, Hartung T, *et al*. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons[J]. J Immunol, 2003, 170(3): 1399－1405.

[4] Lazaron V, Leslie D B, Wasiluk K R, *et al*. Accelerated internalization and detoxification of endotoxin by anti-lipopolysaccharide antibody is an Fc receptor-mediated process[J]. Surgery, 2001, 130(2): 192－197.

[5] Daniels D A, Lane D P. Phage peptide libraries[J]. Methods, 1996, 9(3): 494－507.

[6] Beamer L J, Carroll S F, Eisenberg D. Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution[J]. Science, 1997, 276(5320): 1861－1864.

[7] Thenofan G, Horwitz A H, Williams R E, *et al*. An amino-terminal fragment of human lipopolysaccharide-binding protein retains lipid A binding but not CD14-stimulatory activity[J]. J Immunol, 1994, 152(7): 3623－3629.

[8] Iovine N, Eastvold J, Elsbach P, *et al*. The carboxyl-terminal domain of closely related endotoxin-binding proteins determines the target of protein-lipopolysaccharide complexes[J]. J Biol Chem, 2002, 277(10): 7970－7978.

(编辑　陈聪连)

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