DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.07.020
第26卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 7
608 2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)07-0608-03

抗内毒素IgY体外拮抗内毒素效应的实验研究

李 强,张雅萍 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 观察抗内毒素鸡卵黄抗体(IgY)在体外拮抗内毒素(LPS)的作用。方法 ①用不同浓度IgY与LPS直接体外中和作用,检测剩余LPS的量,观察二者的量效关系;②以培养的原代人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为模型,加入一定浓度的FITC-LPS及IgY,观察各时相点细胞的荧光强弱变化;③加入一定浓度的LPS及IgY,观察各时相点培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的活性变化。结果 ①当二者浓度比为16∶1时,有较好的量效关系;②在4、8、12 h 3个时相点,单纯FITC-LPS结合组细胞均显示较亮的荧光,且强弱没有明显的区别,在IgY拮抗组的3个时相点,荧光均有减弱,以8、12 h较明显;③LDH的活性在LPS攻击8 h后明显升高($P<0.01$),IgY拮抗组LDH的活性在8h后明显降低($P<0.01$)。结论 在体外,特异性IgY有较强的拮抗LPS的作用。

关键词:鸡卵黄抗体;内毒素;人脐静脉内皮细胞;乳酸脱氢酶;异硫氰荧光素-内毒素
中图法分类号:R392.11;R966 文献标识码:A

Effects of anti-lipopolysaccharide egg yolk immunoglobulin on LPS *in vitro*

LI Qiang, ZHANG Ya-ping (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 observe the effects of anti-lipopolysaccharide (LPS) immunoglobulin Y (IgY) on LPS *in vitro*. Methods The direct *in vitro* neutralization of different concentrations of IgY and LPS was conducted for the detection of the remained amount of LPS to observe the dose-effect relationship. The primary cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured for 48—72 h after addition of certain concentrations of fluorescein isothiocyanate-LPS (FITC-LPS) and IgY. Changes of the fluorescent intensity in HUVECs were observed at different time points. After addition of certain concentrations of LPS and IgY for incubation with HUVECs for 4, 8, and 12 h, the changes of lactate dehydrogenase (LDH) activity were measured. Results The dose-effect relationship was satisfactory when the ratio was 16∶1. At 4, 8, and 12 h, fluorescent intensity was somewhat strong in FITC-LPS group, but weak in IgY group, especially at 8 and 12 h. The LDH activity in medium increased obviously after incubation for 8 h in LPS group ($P<0.01$), but decreased in IgY group ($P<0.01$). Conclusion Anti-LPS IgY can antagonize LPS efficiently *in vitro*.

Key words: immunoglobulin Y; lipopolysaccharide; human umbilical vein endothelial cell; lactic dehydrogenase; fluorescein isothiocyanate-lipopolysaccharide

在严重烧伤后,由于肠粘膜屏障功能的破坏,肠道来源的革兰阴性菌和内毒素大量入血,导致菌血症及内毒素血症,是伤后多种并发症的重要致病原因[1]。目前,尚无有效拮抗LPS的药物应用于临床,本研究拟通过体外实验观察特异IgY对LPS的拮抗作用,采用实验方法简便,实验结果稳定可靠效果满意。

1 材料与方法

1.1 IgY与LPS体外中和实验

固定LPS浓度为2 μg/ml,IgY浓度为2、4、8、16、32 μg/ml,两者等体积混匀后,37 ℃孵育4 h,用鲎试剂(上海伊华医学科技公司)检测剩余LPS量,以确定两者较好的量效关系,并作为后面实验的用药量依据。

1.2 HUVEC的分离培养[2]

无菌条件下取新生儿脐带20~30 cm,用无菌生理盐水冲洗静脉血管腔,直至冲洗液清亮无血,用血管钳夹闭血管一端,从另一端注入0.25%胰酶,37 ℃消化15 min,抽出消化液,再用无菌生理盐水冲洗1次,加入小牛血清终止胰酶的消化作用。1 000 r/min离心10 min,弃上清液,再用生理盐水漂洗2次,加

作者简介:李 强(1969—),男,新疆米泉市人,硕士,主治医师,主要从事烧伤肠源性感染方面的研究。现在新疆阿勒泰市解放军第16医院外科,电话:(0906)2311890-8022

收稿日期:2003-03-12;修回日期:2003-12-15

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

入M199 完全培养液(含 10%小牛血清), 血细胞计数板上计数, 调整细胞浓度为 1.0× 10^5/ml, 接种于盖玻片上, 置于 6 孔板内, 37 ℃, 5% CO_2 条件下培养, 至细胞融合成片备用。

1.3　IgY 拮抗 FITC-LPS 与 HUVEC 结合实验

分组: FITC-LPS(Sigma 公司)结合组(n= 3), 取上述细胞培养板, 漂洗后加入 M199(含 10%小牛血清, 下同)配制的 FITC-LPS 溶液, 37 ℃, 5% CO_2 孵育; IgY 拮抗组(n= 3), 同时加入 M199 配制的FITC-LPS 和 IgY 溶液, 37 ℃, 5% CO_2 孵育。孵育后 4、8、12 h 取出细胞玻片, 荧光显微镜下观察并照相。

1.4　IgY 拮抗 LPS 对 HUVEC 的损伤实验

分组: 正常对照组(n= 30), 加入 M199 完全培养液, 37 ℃, 5%CO_2 培养; LPS(Sigma 公司)攻击组(n= 30), 加入 M199 配制的 LPS 溶液, 37 ℃, 5%CO_2 培养; IgY 保护组(n= 30), 加入 LPS 和 IgY 溶液, 37 ℃, 5%CO_2 培养。培养后 4、8、12 h 检测培养上清液中 LDH 含量, 每组每个时相点 10 个标本。

1.5　统计学处理

结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS11.0 for windows 统计软件作显著性 t 检验。

2　结果

2.1　IgY 与 LPS 体外中和实验结果见表 1

随着 IgY 浓度的增大, 其中和 LPS 的能力亦增加。本次实验尚未发现两者存在饱和现象, 在两个相邻浓度间似有一平台, 在两者浓度比为 1∶16 (2∶32 μg/ml)左右时, 可中和大部分的 LPS, 这一浓度比将作为以后实验的用药依据。

表 1　IgY 中和后剩余 LPS 含量(Eu/ml)

Tab 1　Remained amount of LPS after neutralization with IgY (Eu/ml)

	Concentration of IgY (μg/ml)				
	2	4	8	16	32
Remained amount of LPS (Eu/ml)	0.97±0.21	0.95±0.20	0.79±0.07	0.77±0.13	0.53±0.17

2.2　各时相点的细胞荧光强度变化

从图 1~6 可以看出, 在 FITC-LPS 结合组中, 3 个时相点的荧光强度没有明显的差别, IgY 拮抗组则在相对应的时相点均有减弱, 尤以 8 及 12 h 组明显。

2.3　培养上清液中 LDH 的含量变化

在 3 个时相点中, 攻击组的 LDH 含量均明显升高, 以 8、12 h 二组差异显著, 与对照组相比, P< 0.01; 保护组也有升高, 但较攻击组明显降低, P< 0.01, 见表 2。

表 2　不同时相点各组 LDH 的含量变化($\bar{x} \pm s$, IU/L)

Tab 2　Changes of content of LDH in the culture medium in each group at different time points ($\bar{x} \pm s$, IU/L)

Group	4 h	8 h	12 h
Normal	18.7±4.16	24.3±5.31	26.3±6.91
LPS	35.5±5.56 *	87.4±5.78 *	108.1±7.43 *
IgY	28.1±4.33 *#	47.1±5.40 *#	66.2±7.36 *#

*: P< 0.01, *vs* normal; #: P< 0.01, *vs* LPS

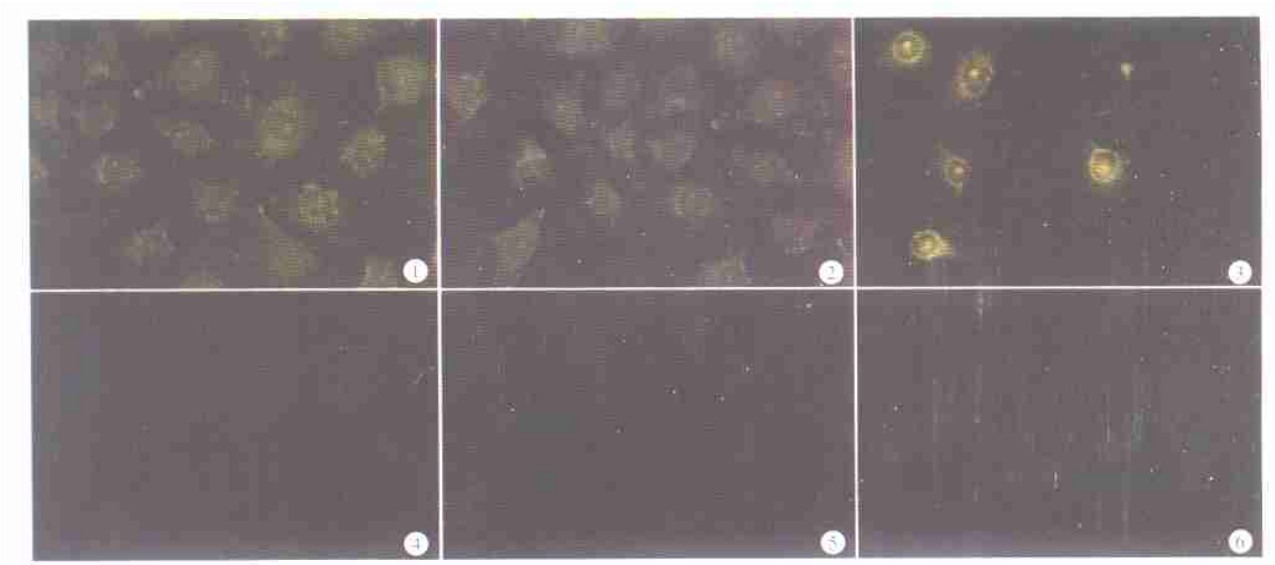


图 1　FITC-LPS 结合 4 h 细胞荧光　(× 200)

Fig 1　Fluorescence in HUVECs at 4 h after binding to FITC-LPS　(× 200)

图 2　FITC-LPS 结合 8 h 细胞荧光　(× 200)

Fig 2　Fluorescence in HUVECs at 8 h after binding to FITC-LPS　(× 200)

图 3　FITC-LPS 结合 12 h 细胞荧光　(× 200)

Fig 3　Fluorescence in HUVECs at 12 h after binding to FITC-LPS　(× 200)

图 4　IgY 拮抗 4 h 细胞荧光　(× 200)

Fig 4　Fluorescence in HUVECs at 4 h after IgY antagonism　(× 200)

图 5　IgY 拮抗 8 h 细胞荧光　(× 200)

Fig 5　Fluorescence in HUVECs at 8 h after IgY antagonism　(× 200)

图 6　IgY 拮抗 12 h 细胞荧光　(× 200)

Fig 6　Fluorescence in HUVECs at 12 h after IgY antagonism　(× 200)

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

3 讨论

LPS 对血管内皮细胞损伤作用的机制还不是非常清楚，目前认为包括直接与间接作用，大多数学者承认间接作用，因为迄今为止的研究均表明内皮细胞不表达内毒素的受体 CD14；LPS 通过内毒素受体作用于免疫细胞，刺激其产生许多炎性介质、细胞因子（TNF、IL-1 等），引起内皮细胞的粘附分子（E-selectin、ICAM-1、VCAM-1、P-selectin）、NO、SOD、热休克蛋白等多方面变化[3]；或者 LPS 与血浆可溶性 CD14（sCD14）先形成复合物，然后与 CD14 阴性细胞上一种膜结构结合才能使细胞活化，这种膜结构可能是一种跨膜信号受体，也可能是与信号转导亚单位相连的结构，目前这一模式已为大多数人公认[4]。除了 CD14 是大家公认的 LPS 细胞表面受体外，尚有其他受体的存在，也可与 Lipid A 结合或介导 LPS-sCD14 复合物对细胞的作用[5]，说明了 LPS 对 CD14-细胞的直接作用。IgY 作为抗 LPS 的特异性多克隆抗体，可与 LPS 的特异性多糖、核心多糖及 Lipid A 上的抗原决定簇特异性结合，可能改变 LPS 的分子构象或封闭其抗原结合位点，抑制它再与 sCD14 或其他膜受体的结合，或者与这些结构竞争性的与 LPS 结合，从而达到拮抗 LPS 生物学效应的作用，这些机制尚需进一步的研究证实。

实验中 FITC-LPS 浓度参考本研究所的科研成果：2 μg/ml 的 FITC-LPS 可与 HUVEC 很好的结合，过量的 LPS 可竞争性抑制这种作用。从本次实验来看，IgY 可以明显抑制 FITC-LPS 与 HUVEC 的结合，表现为细胞荧光强度的减弱，细胞轮廓模糊不清，且随着时间的延长，这种作用更加明显。LPS 对 HUVEC 的损伤作用可用培养上清液中 LDH 的含量变化来说明，LDH 是一种糖酵解酶，广泛存在于组织细胞浆中，只有在细胞膜受到损伤，胞浆中的 LDH 才大量释放到细胞外。本实验结果表明，在 LPS 的攻击组中，随着时间的延长，培养上清液中的 LDH 迅速升高，可达正常对照组的 4～5 倍（$P<0.01$），IgY 保护组虽然也有升高，但较攻击组明显降低（$P<0.01$）。IgY 在体外良好的拮抗 LPS 的作用，为其进一步的开发研究打下了基础。

参考文献：

[1] Shinozawa Y, Takuma K, Aikawa N. Sepsis in extensive burned patients [J]. Nippon Geka Gakkai Zasshi, 1998, 99(1): 31－39.

[2] 安 静，黎 鳌，杨宗城，等. 胎儿脐静脉内皮细胞的培养[J]. 第三军医大学学报，1990，12(3)：102－106.

[3] 罗向东，杨宗城，黎 鳌. 内毒素对培养人脐静脉内皮细胞的损伤作用[J]. 中华创伤杂志，1998，14(3)：154－156.

[4] Vita N, Lefort S, Sozzani P, *et al*. Detection and biochemical characteristics of the receptor for complexes of soluble CD14 and bacterial lipopolysaccharide[J]. J Immunol, 1997, 158(7): 3457－3462.

[5] Schletter J, Brade H, Brade L, *et al*. Binding of lipopolysaccharide LPS to an 80-kilodalton membrane protein of human cells is mediated by soluble CD14 and LPS-binding protein[J]. Infect Immun, 1995, 63(7): 2576－2580.

（编辑 陈聪连）

（上接 607 页）

2.2 副反应

治疗组病人均未出现发热、疲劳、头昏及其他不适，亦无任何局部粘膜刺激反应。

3 讨论

通过对 CA 免疫学发病机制的研究显示，CA 患者存在细胞免疫受抑制现象，外周血 T 细胞亚群失衡，白介素-2 生产能力和 NK 细胞活性显著低于正常，Th1 型细胞因子水平降低，Th2 型细胞因子水平相对增高[2]。故有人提出宿主的细胞免疫缺陷可能是 CA 复发的重要原因之一[3]。

目前治疗 CA 的方法很多，但复发问题一直未能很好解决，尤其是女性阴道内 CA，由于其特殊的解剖位置，治疗难度大，复发率高。如果在治疗 CA 时，首先彻底去除疣体，然后对病灶部位进行免疫调节治疗，尤其是提高 NK 细胞活性，有望降低复发率。干扰素是一种生物活性蛋白，具有抗病毒、抗增生和免疫调节等作用，可用于 CA 的辅助治疗，但女性阴道内 CA 由于其特殊的解剖位置，局部注射干扰素会引起患者较大痛苦，价格较昂贵，也不方便。奥平栓的主要成份为重组人干扰素 α-2a，外用方便，无痛苦，其治疗 CA 的机制可能是 α-2a 干扰素直接作用于靶细胞，尤其在 CO_2 激光治疗后，形成的创面更易于干扰素渗透到被病毒感染的靶细胞，刺激靶细胞合成多种酶，如 2′～5′寡腺苷酸合成酶，以干扰乳头瘤病毒复制[4]，特别适合于治疗女性阴道 CA。表 1 显示 CO_2 激光结合奥平栓治疗女性阴道内 CA 的治愈率显著高于单独 CO_2 激光组，而复发率则显著低于单独 CO_2 激光组，经统计学处理有非常显著性差异（$P<0.001$）。我们应用奥平栓治疗女性阴道 CA，未发现类似注射干扰素所致的副作用，无局部刺激，费用较低，使用方便，病人易于接受，具有较高的临床价值。

关键词：尖锐湿疣；复发

中图法分类号：R752.530.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] 叶干运. 性病防治手册[M]. 第2版，南京：江苏科学技术出版社，1994. 57.

[2] 郭红卫. 尖锐湿疣的免疫学发病机制[M]. 国外医学皮肤性病学分册，2001，27：296.

[3] 尹光文，于建斌，李冬芹，等. 香茹多糖治疗尖锐湿疣及其免疫调节作用[J]. 中华皮肤科杂志，1999，19(2)：176－177.

[4] 乔树芳，李维云，李振化，等. 疣脱欣加复方干扰素霜 α-2a 外用治疗尖锐湿疣38例临床分析[J]. 临床皮肤科杂志，2001，30：315.

（编辑 张大春）

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