DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.008
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)14-1237-03

论著

猪中性粒细胞抑菌蛋白的分离及对细菌影响

罗中华,蔡绍丽,彭代智,刘 敬,周 新,黄文华 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 提取、分离、纯化、高效高活性杀烧伤创面病原菌的猪血中性粒细胞防御素。方法 用5%乙酸提取猪血中性粒细胞溶酶体可溶性成分,经制备性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化猪中性粒细胞防御素,用SDS-PAGE检测防御素的分子质量,以体外杀烧伤创面白色念珠菌试验、体外抑制烧伤创面金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌的生长作用检测其活性。结果 可从提取物中纯化出7种多肽(ND1、ND2、ND3、ND4、ND5、ND6、ND7),它们的分子质量在2 800~6 800之间。体外杀白色念珠菌试验和体外抑制金黄色葡萄球菌及绿脓杆菌的生长作用证实,ND1、ND2有高效杀菌活性,ND3也有较强的杀菌活性。结论 通过猪血中性粒细胞的分离、纯化,可获得高效高活性杀烧伤创面病原菌的防御素。

关键词:烧伤;中性粒细胞;防御素;猪血
中图法分类号:R341.6;R378;R392.12 文献标识码:A

Purification and identification of neutrophil defensins in porcine blood

LUO Zhong-hua, CAI Shao-li, PENG Dai-zhi, LIU Jin, ZHOU Xin, HUANG Wen-hua (Research Institute of Burn, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To extract, isolate and purify highly effective neutrophil defensins (ND) which can kill bacteria in burn wound from porcine blood. Methods The soluble part of the neutrophil lysosome in porcine blood was extracted by using 5% ethanoic acid. Preparative SDS-PAGE was employed to purify neutrophil defensins. The molecular weight (MW) of defensins was detected by SDS-PAGE. The activity of defensins was determined by tests of killing of *candida albicans* from burn wound and inhibition of *staphylococcus aeurus* and *pseudomonas aeruginosa* growth *in vitro*. Results Seven kinds of polypeptides (ND1~ND7 with MW at 2 800~6 800) could be purified from the extracted substance. The above *in vitro* killing and inhibition tests confirmed that ND1, ND2 and ND3 (less strong) exhibited highly effective bactericidal activity. Conclusion Defensins with highly effective bactericidal activity can be obtained by the isolation and purification of neutrophils in porcine blood.

Key words: burn; neutrophil; defensins; porcine blood

防御素(Defensins)是存在于哺乳类动物免疫细胞中的一种小分子多肽,具有广谱抗菌活性,对革兰阳性细菌、阴性细菌、真菌、螺旋体、分枝杆菌以及包膜病毒等病原微生物有较强的杀伤作用。目前许多学者已从人、家兔、豚鼠、及大鼠的中性粒细胞溶酶体中提取可溶性物质,获得了较好的杀菌活性,但提取猪免疫细胞防御素的报道还未查到。本研究采用制备性聚丙烯酰胺凝胶电泳,从猪血中性粒细胞溶酶体中分离纯化出7种肽。在检测了各组分的杀菌活性基础上,又观察了它们在体外对烧伤创面分离病原菌的影响,现将结果报告如下。

基金项目:重庆市科委资助项目(1996-1)
作者简介:罗中华(1958-),男,四川省兴文县人,副主任技师,主要从事烧伤免疫方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68754148-8009
收稿日期:2002-08-01;修回日期:2003-04-10

1 材料与方法

1.1 防御素的提取[1]

取新鲜猪血经Ficoll-Hypaque密度梯度离心法去除单个核细胞,再经低渗处理残存红细胞,获得中性粒细胞。中性粒细胞用0.34 mol/L蔗糖液中匀浆,经差速离心分离得胞浆颗粒,以5%乙酸从胞浆颗粒内提取防御素粗制品。

1.2 防御素的纯化

1.2.1 分离电泳 酸性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳(AU-PAGE)参照文献[2]进行并作部分修改。15%的凝胶(3 mm×125 mm×200 mm)内含6.25 mol/L尿素及0.9 mol/L乙酸,电极液为0.9 mol/L乙酸(pH3.5),于180 V恒压预电泳1 h。将冻干样品溶于含有3 mol/L尿素的1%乙酸,加样后180 V恒压电泳8 h。电泳后,用0.25%伊红Y液浸泡凝胶30 s,把泳动在最前面的7条区带分别切割下来。

1.2.2 洗脱电泳 在长12 cm,内径0.8 cm的玻璃管中段先

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

聚合一个 2 cm 的 7.5%凝胶塞,将切割下来的凝胶块放入管的上段,以透析袋膜封闭管下口,置盘状电泳槽内电泳(每管 3 mA)12~16 h,取管的下段洗脱液以蒸馏水透析,冰冻干燥备用。

1.3 分子质量测定

以SDS-PAGE参照文献[3]进行,分子质量标准多肽为肌红蛋白及其裂解片段(Pharmacia,瑞典)。浓缩胶浓度为3.75%,分离胶浓度梯度为5%~30%,于150 V 恒压电泳 20 h,用考马斯亮蓝 R250 染色。

1.4 蛋白质含量测定

参照文献[4]的方法进行,以牛血清蛋白作标准。

1.5 防御素体外杀烧伤创面病原菌实验(病原菌系从本所不同的烧伤患者创面分离)

1.5.1 杀白色念珠菌实验 取从本所烧伤患者创面分离的单个菌落接种于 5 ml Sabourand 液体培养基内,37 ℃孵育 18 h,从中取 2 ml 菌液转至 10 ml 新鲜液体培养基内,孵育 4 h 后离心收集白色念珠菌,用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)洗涤两次,调整菌量至 2×10^8 个/ml。将防御素溶于 0.01 mol/L PBS。取 0.2 ml 菌液加入 0.2 ml 防御素(对照管则加PBS),于 37 ℃孵育 2 h,以 0.02%美蓝液染色,光镜下死菌呈深蓝色,活菌不着色,计数 1 000 个菌中的死菌及活菌数,计算出白色念珠菌死亡率。

1.5.2 杀金黄色葡萄球菌实验 取从烧伤患者创面分离的单个菌落接种于直径 15cm 的血平板,在种菌血平板培养基上打孔,孔径 6 mm,孔间距离 35 mm。分别于各孔内加入 100、50、25、12.5、6.25 μg/ml 浓度的防御素,加入 250 μl/孔。置 37 ℃细菌培养箱孵育 24 h,取出用解剖显微镜测微仪,测量各孔边缘至无菌生长的抑菌环的大小。对照孔以生理盐水代替防御素进行实验。

1.5.3 杀绿脓杆菌实验 按上述杀金黄色葡萄球菌实验同样方法,以绿脓杆菌代替金黄色葡萄球菌进行实验。

1.6 统计学处理

所有数据均经华西医科大学的医用统计程序进行单因素方差分析比较差异显著性。结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 防御素的提取纯化

经实验每升猪血中可得到 8×10^9 个中性粒细胞,从 1×10^9 个中性粒细胞溶酶体内可提取蛋白质组份约20 mg,经 SDS-PAGE 以及 Beckman CDS-200 积分仪作区带扫描分析,结果表明分子质量在 6 800 以下的组份占了总量的 52%。溶酶体提取物经 AU-PAGE 分离后,经SDS-PAGE 显示有 7 条区带泳动在凝胶中,这 7 条带的组份依次被命名为ND1、ND2、ND3、ND4、ND5、ND6 和ND7,其中 ND1~ND3 蛋白带较宽,着色深,提示该 3 条区带蛋白量高。经洗脱电泳纯化后 7 条带的组份再用 AU-PAGE 和 SDS-PAGE 分析,结果每个组份在两种凝胶上都呈单一区带,表明纯化效果良好。通过用分子质量 Marker 用 AU-PAGE 和 SDS-PAGE 分析可测出7 个组份的分子质量在 2 800~6 800 之间。

2.2 猪防御素体外杀白色念珠菌活性及抑制金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌生长的作用

2.2.1 体外杀白色念珠菌活性 以 ND1、ND2、ND3、ND4、ND5、ND6、和 ND7 分别作体外杀白色念珠菌实验,防御素浓度在 6.25~100 μg/ml 之间,白色念珠菌浓度为 1×10^8 个/ml,结果在 37 ℃下 ND1、ND2 和 ND3 具有较高杀白色念珠菌活性,ND4、ND5、ND6、和 ND7 的杀菌活性显示,虽然对白色念珠菌有一定的杀死作用,但杀菌活性非常低。ND1、ND2 和 ND3 的杀菌活性为高浓度> 低浓度,ND1、ND2 强于 ND3。ND1、ND2、ND3 的杀菌活性与自然死亡率比较 $P<0.05$,见表 1。

表 1 猪血中性粒细胞防御素杀白色念珠菌活性(%, $n=18$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Candidacidal activity of neutrophil defensins in porcine blood blood(%, $n=18$ $\bar{x}\pm s$)

Defensins	Kinds of polypeptides		
Concentration	ND1	ND2	ND3
100 μg/ml	100.00±0.00*	99.00±5.80*	96.00±3.60*
50 μg/ml	100.00±0.00*	98.80±1.06*	85.60±6.85*
25 μg/ml	99.60±0.85*	96.80±0.98*	80.80±3.68*
12.5 μg/ml	97.10±1.96*	93.80±3.86*	70.10±5.36*
6.25 μg/ml	90.80±5.38*	81.20±6.82*	28.00±3.89*
Control	2.00±0.88	2.00±0.88	2.00±0.88

*: $P<0.05$ *vs* control

2.2.2 体外对金黄色葡萄球菌的抑制生长作用 将从烧伤患者创面分离的单个金黄色葡萄球菌菌落接种于直径 12 cm 的血平板后,打孔,分别于各孔内加入 100、50、25、12.5、6.25 μg/ml 浓度的防御素,250 μl/孔。结果显示,ND1、ND2 和 ND3 均有较强的抑制金黄色葡萄球菌生长的活性,其中作用为 ND1> ND2> ND3,高浓度的比低浓度的作用强,ND4、ND5、ND6、和 ND7 则未有抑制细菌生长的活性,与生理盐水对照孔一样细菌生长良好,未见抑菌环,ND1、ND2 和 ND3 的抑菌作用与对照孔比较 $P<0.05$,见表 2。

表 2 猪血中性粒细胞防御素对金黄色葡萄球菌的抑制生长作用(mm, $n=18$ $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Inhibitive effect of neutrophil defensins in porcine blood on the growth of *staphylococcus aerus*(mm, $n=18$, $\bar{x}\pm s$)

Defensins	Inhibiting circle		
Concentration	ND1	ND2	ND3
100 μg/ml	14.0±2.2*	14.0±2.5*	12.5±2.0*
50 μg/ml	13.6±2.5*	13.0±2.6*	10.6±2.6*
25 μg/ml	12.0±2.5*	11.0±1.8*	9.8±1.8*
12.5 μg/ml	10.6±1.6*	10.8±1.2*	8.8±1.0*
6.25 μg/ml	9.8±1.1*	8.8±1.0*	7.0±1.0*
Control	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

*: $P<0.05$ *vs* control

2.2.3 体外对绿脓杆菌的抑制生长作用 以从烧伤患者创面分离的单个绿脓杆菌菌落接种于血平板后,观察猪血中性粒细胞防御素的抑菌活性,结果防御素 ND1、ND2、ND3 对绿脓杆菌均有很强的抑制生长活性。其中大浓度的作用强于低浓度的,ND1 和 ND2 作用比 ND3 好,而 ND4、ND5、ND6、和 ND7 对绿脓杆菌的作用同样很差,未见抑菌环,ND1、ND2 和 ND3 对绿脓杆菌的作用见表 3。

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

表 3　猪血中性粒细胞防御素对绿脓杆菌的抑制生长作用(mm, $n=18$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Inhibitive effect of neutrophil defensins in porcine blood on the growth of *pseudomonas aeruginosa* (mm, $n=18$, $\bar{x}\pm s$)

Defensins	Inhibiting circle		
Concentration	ND1	ND2	ND3
100 μg/ml	14.5±2.6*	14.0±2.3*	12.8±2.0*
50 μg/ml	14.0±2.1*	13.0±2.2*	11.0±1.6*
25 μg/ml	13.5±2.5*	12.5±2.6*	8.8±2.0*
12.5 μg/ml	12.6±2.0*	11.8±1.8*	8.0±1.3*
6.25 μg/ml	11.0±1.5*	10.0±1.6*	8.0±1.0*
Control	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

*: $P<0.05$ *vs* control

3　讨论

猪是人类饲养的主要家畜之一, 尤其在我国养猪者非常广泛, 若能从猪血中提取出高效活性的防御素用于烧伤临床, 治疗烧伤患者病原微生物感染, 将会获得较大的效益。本研究以聚丙烯酰胺凝胶电泳作为分离纯化蛋白质或多肽的方法, 具有分辨力高、样品用量少、操作简便等优点, 若在恰当的电泳条件下对一些分子组成上相差甚微的蛋白质组份, 往往能得到很满意的分离效果。经电泳后, 显示出准确的蛋白质区带, 是从凝胶中得到高纯度蛋白质的关键性步骤。常用的考马斯亮蓝染色使蛋白质变性失活, 故其应用受限。本实验采用伊红 Y 染色以显示蛋白质区带, 实验表明该法不仅快速、简便、灵敏, 而且由于伊红 Y 为带负电的染料, 它和带正电的防御素呈可逆性结合, 在洗脱电泳过程中二者泳动方向相反, 因而可得以完全的分离, 这确保了防御素生物活性的恢复, 并可使其杀菌实验不受染料的干扰。故认为该方法是分离、纯化蛋白质, 尤其是碱性蛋白质的很好方法。

近来研究已明确有关中性粒细胞防御功能肯定在细胞的溶酶体内存在不依赖氧的杀菌作用, 并与依赖氧的杀菌作用相互协同, 形成了一个强有力的杀菌环境[5]。目前研究得知中性粒细胞中的溶菌酶、组织蛋白酶 G、乳铁蛋白、抗菌性渗透性增强因子和防御素, 是不依赖氧的杀菌作用物质, 它们中多数只表现选择性抗菌活性。相比之下, 防御素的作用更引人瞩目, 这一小分子阳性离子肽具有广谱的抗真菌、细菌及病毒活性, 其抗真菌活性尤为显著[5]。本研究以纯化的猪血中性粒细胞防御素 ND1、ND2、ND3、ND4、ND5、ND6 和 ND7 分别作体外杀烧伤创面分离的白色念珠菌实验、对金黄色葡萄球菌的抑制生长作用实验和对绿脓杆菌抑制生长作用实验; 结果显示, ND1、ND2 和 ND3 对白色念珠菌有较强的杀菌活性, 其中高浓度组可杀死 96%以上的白色念珠菌, ND1、ND2 和 ND3 对白色念珠菌活性与自然死亡率比较有显著差异, 而 ND4、ND5、ND6 和 ND7 杀白色念珠菌的活性不明显, 与自然死亡率比较未见显著差异($P>0.05$); 猪中性粒细胞防御素对金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌的抑制生长作用有很强效能, 其中 ND1、ND2 和 ND3 的作用比 ND4、ND5、ND6、ND7 的强, 抑菌环最大的可达(14.0±1.2)和(14.5±1.6)mm, 而 ND4、ND5、ND6、ND7 和加入生理盐水的对照孔周围细菌生长良好, 未见抑菌环, ND1、ND2 和 ND3 对金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌的抑制生长作用与对照组比较有显著差异, 而 ND4、ND5、ND6、ND7 抑制生长作用与对照组比较也未见显著差异($P>0.05$), 提示猪中性粒细胞防御素 ND1、ND2、ND3 对金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌有较强的抑制生长作用。通过上述实验证实了猪中性粒细胞防御素 ND1、ND2、ND3 各个区带都有较强程度的杀菌和抑制细菌生长的活性, ND4、ND5、ND6 和 ND7 虽然是从猪中性粒细胞防御素组份内分离出的 4 条电泳区带, 但对病原菌的杀菌和抑制细菌生长的活性作用不够显著; Selsted 等[6] 的报道也与该结果相符, 他们还作了 ND4、ND5、杀白色念珠菌活性的实验, 发现 ND4、ND5 的杀菌活性较弱。我们也观察到 ND4、ND5、ND6 和 ND7 的抗菌活性较低或几乎没有。鉴于 ND1、ND2 和 ND3 占了中性粒细胞溶酶体防御素的三分之二, 显然它们是防御素中抗菌的最为重要的组份。有实验研究证实病原菌表面有防御素的特异性结合位点, 防御素能粘附于病原菌胞壁上, 可通过使细胞渗透性增加而导致菌体死亡。然而猪防御素对其病原菌的杀菌机制还有待于猪防御素分子结构(包括空间结构)的阐明, 猪防御素的纯化和杀菌、抑制细菌生长的实验为这方面的工作奠定了基础。猪中性粒细胞防御素对烧伤病原菌的杀菌和抑制细菌生长作用, 目前在国内外均未见报道, 并且猪血有来源丰富、价格低廉、容易获得等优点, 如果能大批量生产应用于烧伤临床, 救治患者将具有极大的意义; 本研究也为此提供了理论依据。

参考文献:

[1] 朱庆林, 吴补领, 顾淑萍, 等. 小鼠釉从蛋白在大肠杆菌中的表达、纯化及抗血清的制备[J]. 牙体、牙髓、牙周病杂志, 2002, 12(5): 235-237.

[2] 王永杰, 齐　名. 连续酸-尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳制备人和兔中性粒细胞防御素各组分[J]. 医学研究生学报, 2001, 14(2): 106-109.

[3] 王生余, 胡伟新, 朱茂艳, 等. 改良 SDS-PAGE 法分离尿蛋白组成[J]. 临床检验杂志, 2002, 20(5): 293-294

[4] 克　喜, 唐玉琴, 吴认艰, 等. 纯化 HuIFN-α 蛋白含量测定方法的研究[J]. 微生物学与免疫学进展。2002; 28(2): 46-48.

[5] 刘　献, 夏利文, 冉玉平, 等. 防御素及其生物学活性[J]. 华西医学, 2002, 17(2): 275-276.

[6] Selsted M E, Szklarek D, Ganz T, *et al*. Activity of rabbit leukocyte peptides against *canidia albicans*[J]. Infect Immun, 1985, 49(1): 202.

(编辑　薛国文)

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