DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.005
第24卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 9
2002年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2002

文章编号:1000-5404(2002)09-1013-04

论著

重组趋化因子vMIPⅡ对小鼠异体移植皮肤存活时间的影响

郑 红[1],苏青和[3],孙志成[2],冯文曦[1],曹 川[2],曹红卫[1],赵静怡[1],钟白玉[5],邓永键[5],罗 平[1],卫 国[1],吴 军[4]
(第三军医大学附属西南医院:[1]综合实验研究中心;[2]整形中心;[4]移植免疫研究所;[5]皮肤科;重庆 400038;[3]南通医学院附属医院烧伤科,无锡 214000)

提 要:目的 观察纯化的重组vMIPⅡ蛋白对小鼠异体皮肤移植免疫排斥反应是否有抑制作用及能否延长移植皮肤的存活时间。方法 pET32a为vMIPⅡ克隆基因的表达载体,在大肠杆菌中诱导表达出硫氧还蛋白-vMIPⅡ的融合蛋白(26×10³)。经金属离子亲和吸附、肠激酶消化以游离vMIPⅡ、阳离子交换层析等步骤纯化目的蛋白。用体外配体结合实验证实重组vMIPⅡ与趋化因子受体CCR5的结合能力。纯化的vMIPⅡ经尾静脉给药异体皮肤移植小鼠(昆明鼠/Balb/c)连续14 d。结果 经纯化可获得高纯度目的蛋白。vMIPⅡ与趋化因子受体CCR5结合的解离常数(Kd)为11.56±1.98 nmol/L。给药vMIPⅡ的异体皮肤移植小鼠组移植皮存活时间较未注射对照组延长至术后7天以上。结论 纯化的重组vMIPⅡ对小鼠异体皮肤移植免疫排斥反应有明显的抑制作用,能显著延长移植皮的存活时间。

关键词:趋化因子;趋化因子受体;vMIPⅡ;皮肤移植
中图法分类号:R392.11;R622.1 文献标识码:A

Effect of recombinant chemokine vMIPⅡ on survival of allo-skin in mice

ZHENG Hong, SU Qing-he, SUN Zhi-cheng, FENG Wen-xi, CAO Chuan, CAO Hong-wei, ZHAO Jing-yi, ZHONG Bai-yu, DENG Yong-jian, LUO-ping, WEI Guo, WU Jun (Center of Medical Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract **Objective** To investigate whether the recombinant chemokine vMIPⅡ possesses the capability of inhibiting allo-skin transplantation rejection and prolonging the survival of the allograft in mice. **Methods** A thioredoxin-vMIPⅡ fusion protein(26×10³) was expressed in *E. coli* under induction of IPTG when pET32a-vMIPⅡ was used as an expression vector. Purified vMIPⅡ was produced through metal-chelated affinity chromatography, enterokinase digestion to free vMIPⅡ from fusion protein and cation exchange chromatography. Its ability of binding with its receptor CCR5 was testified by using ligand-binding assay. Purified vMIPⅡ was injected in tail vein once everyday after skin transplantation (Kunming mice to Balb/c) till the 14th day. **Results** High purified vMIPⅡ was obtained from fermented bacteria. It bound with CCR5 expressed on CHO cells with a dissociate constant (Kd) of (11.56±1.98) nmol/L. The allo-skins of the mice which were injected with vMIPⅡ survived 7 d longer than those with salt saline injection. **Conclusion** Purified recombinant vMIPⅡ is capable of inhibiting the allo-graft rejection in mouse allo-skin transplantation, and markedly prolonging the survival of the allo-skin.

Key words: chemokines; chemokine receptors; vMIPⅡ; skin transplantation

趋化因子是一类控制免疫细胞定向迁移的细胞因子,参与正常和异常免疫应答的所有环节[1,2]。其功能行使由相应的趋化因子受体(CCR或CXCR)介导。病毒巨噬细胞炎性蛋白-Ⅱ(viral Macrophage Inflammatory Protein-Ⅱ,vMIPⅡ)是由柯氏肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV),亦即人疱疹病毒-8(human herpesvirus-8, HHV-8)基因组编码的CC类趋化因子[3],它是多种趋化因子受体如CCR2,CCR5,CXCR4,CX3CR等的天然拮抗剂,能广谱地结合多种趋化因子受体,干扰和阻断趋化因子-趋化因子受体的正常结合及其后续的信号传导,导致趋化因子的功能丧失[4]。已有研究表明,vMIPⅡ能够抑制肾小球肾炎模型大鼠肾小球内淋巴细胞的浸润并减轻尿中蛋白的浓度[5];通过转基因技术将vMIPⅡ基因引入移植供体心脏,行小鼠心脏移植术后,可显著延长供体心脏的存活期[6]。我们在大肠杆菌中表达重组蛋白vMIPⅡ,经纯化获得目的蛋白,并观察到重组vMIPⅡ能够显著延长小鼠异体移植皮肤的存活时间,证实vMIPⅡ对移植免疫排斥反应有抑制作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌表达质粒pET32a(+)-vMIPⅡ,由美国路易维尔大学布朗癌症研究中心Peiper博士提供。大肠杆菌BL21(DE3)plysS,美国Novagen公司产品。表达CCR5的CHO细胞株,自构建。肠激酶(Enterokinase),德国Boehringer mannheim公司产品。TALON™金属离子亲和层析(MAC)凝胶,Clontech产品。阳离子交换柱CM Sepharose (Fast Flow),高压液相色谱仪(HPLC),Pharmacia产品,[125]I-MIP-1β,美国Du Pont-NEN公司产品,γ-计数器:CPBRA Ⅱ Auto-Gamma,美国PACKARD公司产品。

1.2 方法

1.2.1 pET32a(+)-vMIPⅡ在大肠杆菌中的表达 方法同文献[7]。以pET32a(+)-SDF-1β质粒转化感受态大肠杆菌BL21(DE3)plysS。将50 ml过夜培养的菌液转入1 L培养液中37 ℃摇瓶培养。待悬液OD_{600nm}达0.6时,加入IPTG(终浓度为1 mmol/L)。继续培养3 h后,将离心沉淀的菌体悬于1/10倍培养体积的PBS中,-80 ℃保存。

作者简介:郑 红(1961-),女,四川省灌县人,博士,副研究员,主要从事趋化因子及其受体生物学和趋化因子受体拮抗剂方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68754437

收稿日期:2002-06-05;修回日期:2002-08-24

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

1.2.2 纯化 100 ml 菌液裂菌经 32 000 x g, 4 ℃离心 15 min。在裂解液上清中加入 5 ml 柱床体积的 MAC 凝胶, 室温孵育 40 min。凝胶洗涤后, 用 100 mmol/ L EDTA 洗脱液洗脱下融合蛋白。过 SephadexG25 柱除盐。在融合蛋白液中加入肠激酶(1 μg/ml), 37 ℃酶解 3~6 h。酶解液上 HPLC-阳离子交换柱 CM Sepharose(Fast Flow)(5 ml/ min), 经 20 mmol/ L Tris-HCl pH 8.4 洗柱后, 用 50~950 mmol/ L NaCl 连续梯度溶液洗脱(5 ml/ min), 收集 vMIPⅡ组分并冻干。

1.2.3 配体结合试验 按文献[7]方法进行。在配体结合实验中, 配体分别为[^{125}I] MIP-1β、vMIPⅡ, 受体为 CCR5-CHO 表达细胞。

1.2.4 小鼠皮肤移植术 分为自体移植组(Balb/ c), 小鼠 9 只; 异体移植组(对照组), 小鼠 10 只; 异体移植给药组, 小鼠 15 只。在异体移植术中以昆明鼠为供体, Balb/ c 小鼠为受体。选 20~25 g 小鼠, 以 0.5 ml 异戊巴比妥(0.5%)麻醉。自体移植组于 Balb/ c 小鼠背部取 1.5 cm x1.5 cm 全层皮, 彻底剥离后, 缝合于原位, 打包。异体移植组于一只昆明鼠取 1.5 cm× 1.5 cm 全层皮, 缝合于 Balb/ c 小鼠背部已切除 1.5 cm× 1.5 cm 全层皮的创面, 打包。术后分笼饲养。

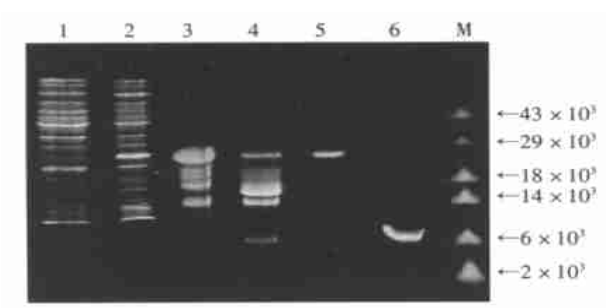
1.2.5 vMIPⅡ对异体移植皮肤存活时间的影响 在异体移植给药组中, 术后立即行尾静脉注射 vMIPⅡ蛋白(4.5 mg/ kg), 每日一次, 连续给药 14 d。在对照组中同时行尾静脉注射同体积生理盐水。术后, 分别在 12 h、术后 1 d、及每隔天取下移植皮, 自体移植组及异体移植对照组取样至术后第 7 d, 异体移植给药组取样至术后第 14 d。取材后固定和液氮保存。

1.2.6 组织切片的制备与染色 移植皮全层取下后, Bouin 氏固定液固定 24 h 以上。经石蜡包埋、切片(5 μm), 常规苏木精-伊红染色后, 脱水、透明, 封固。

2 结果

2.1 表达与纯化

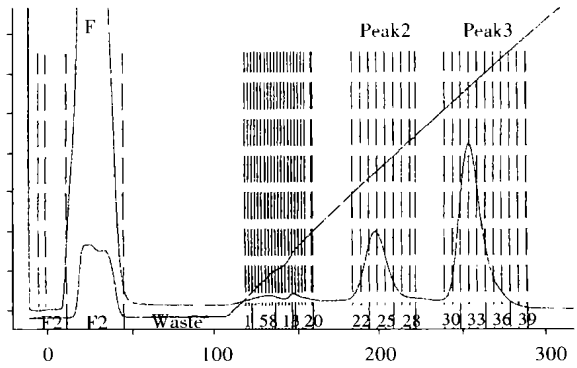
发酵菌在用 IPTG 诱导与未诱导样中表达量差异明显, 所表达的融合蛋白大部分以可溶性蛋白形式存在。经 MAC 吸附后, 融合蛋白占洗脱下蛋白的 50%以上。肠激酶孵育消化后, 经 CEC 柱层析, 各蛋白组分得到很好的分离, 目的蛋白 vMIPⅡ在洗脱条件下被最后洗脱下来, 见图 1, 2。



1: Proteins in supernatant of fertilized bacteria; 2: Proteins in supernatant of induced fertilized bacteria; 3: Eluate components after MAC; 4: Proteins in supernatant after digested with enterokinase; 5: Eluate fraction 2, un-digested fusion protein, after CEC; 6: Eluate fraction 3, purified vMIPⅡ, after CEC; M: Standard protein molecular markers

图 1 SDS-PAGE 电泳

Fig 1 SDS-PAGE of eluated products



F: Flowthrough peak; Peak 2: Peak of un-digested fusion protein, corresponding to that of lane 5 on SDS-PAGE gel in Fig 1; Peak 3: Peak of purified vMIPⅡ, corresponding to that of lane 6 on SDS-PAGE gel in Fig 1

图 2 CEC 洗脱图

Fig 2 Elution fractionation profile with CEC

2.2 配体结合实验

在配体结合试验中, 抑制曲线表明, 纯化的 vMIPⅡ(冷)能够随着其浓度的增加逐步竞争性抑制并替代标记的 MIP-1β(热)与 CCR5 表达细胞的结合。因此, 纯化的重组 vMIPⅡ具有生物学活性。从 Schatchard 直线的斜率可得到 vMIPⅡ与 CCR5 结合的解离常数 Kd, 见图 3。3 次配体结合试验的平均解离常数 Kd= 11.56± 1.98 nmol/ L。

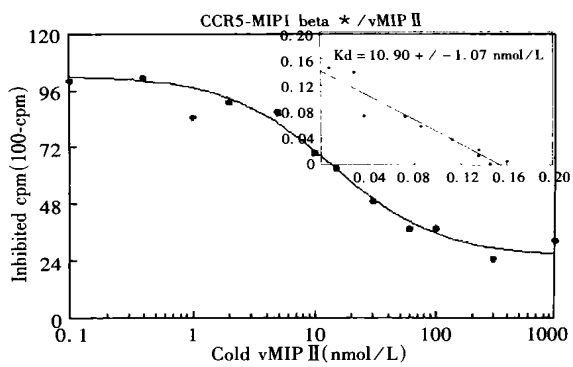


图 3 纯化的 vMIPⅡ与 CCR5 的结合实验

Fig 3 Ligand-binding assay of purified vMIPⅡ and CCR5

2.3 小鼠异体移植皮肤的存活情况及病理变化

各实验组小鼠除因麻醉过深有少数在术后 10 min 内死亡外, 其余小鼠皆存活。自体移植组小鼠术后 20 d 内无意外死亡。各实验组小鼠从术后的第 1 d 到第 3 d, 移植皮由苍白色转变成充血肿胀的红色, 并可见粘连形成, 血运建立, 组织切片中可见相似的炎症发生, 基底部位有中性粒细胞浸润, 表皮皆出现相似的损伤, 如表皮生发层细胞融解、稀疏, 在基底部有新生血管芽长入。从表 1 各实验组小鼠皮肤外观及其组织病理变化比较中可以看出, 在术后第 5 d 开始, 异体移植对照组(A-graft)与自体移植组(S-graft)和异体移植给药组(A-graft-T)出现差异: A-graft 组移植皮由红转苍白, 表明其血运不良, 组织中未见有表皮细胞增生现象, 而 A-graft-T 组同 S-graft 组一样, 移植

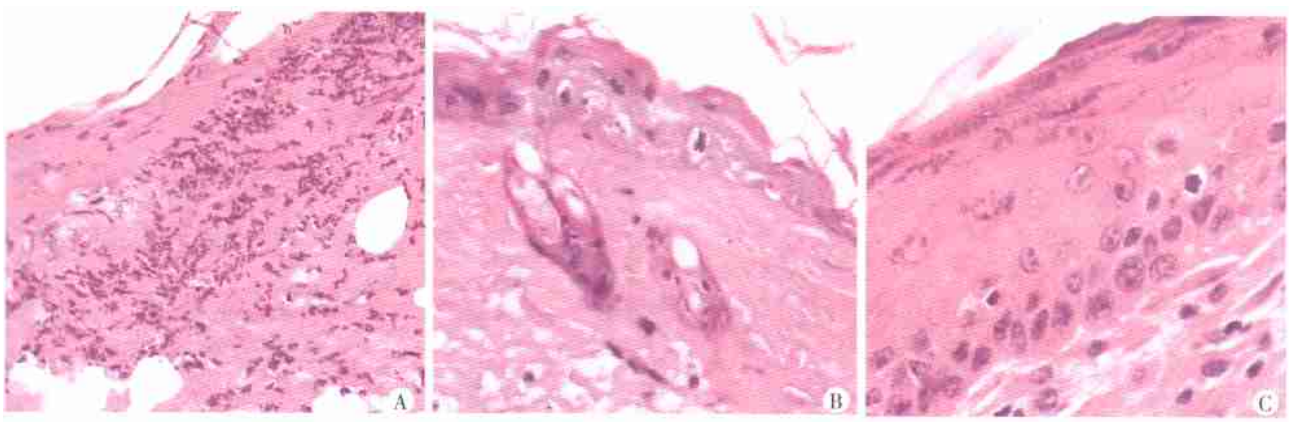
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

皮红润, 组织中可见表皮细胞旺盛增生, 肌细胞增生, 表明移植皮肤在进行修复过程。第 7 d 时 A-graft 组移植皮干痂, 并全层坏死, 而 A-graft-T 组移植皮外观正常, 组织中修复明显; 在术后第 14 d 时移植皮中部仍有部分湿润粉红色正常皮肤, 干痂底部从受体皮创面边缘长出新生皮, 组织中肉芽组织增生, 表皮增生增厚、退化并存, 部分毛囊组织存活, 但肉芽增生组织中未见有脂肪细胞及肌细胞; 在第 19 天时, 移植皮干痂, 受体皮肤创面边缘长出的新生皮已使创面缩小为手术时的 1/4, 皮肤全层坏死。自体移植组小鼠移植皮在两周后供、受体皮肤缝合部位已无瘢痕, 见图 4。

表 1　各实验组小鼠皮肤外观及其组织病理变化比较

Tab 1　Comparison of skin appearance and histology among each group of mice

	Day 5		Day 7		Day 14		Day 19	
	Skin	Histol	Skin	Histol	Skin	Histol	Skin	Histol
S-graft	Hyperemic	Repairing	Rosy	Repairing	Planted skin crusting	Planted skin keratingized, new skin growing	Planted skin without scar	Layers normal
A-graft-T	Hyperemic	Repairing	Rosy	Repairing	Rosy in the middle, crusted on the edge	Hyperplasia of the epithelia, Granulationized	Crusted, cut reduced	Full skin dead
A-graft	Paled	Without repairing	Crusted	Full skin dead	——	——	——	——



A: Epidermis coming off and nuclear dusts in the necrotic dermis in the allo-skin of the receipt mouse treated with PBS (control) 7 d after transplantation; B: Regeneration of the basal cells in the allo-skin of the receipt mouse treated with vMIP Ⅱ 7 d after transplantation; C: Hyperplasia of the basal cells in the allo-skin of the receipt mouse treated with vMIP Ⅱ 14 d after transplantation

图 4　异体移植皮肤的病理组织切片

Fig 4　Pathologic section of the allo-skin tissue

3　讨论

本研究所采用的对重组 vMIP Ⅱ 的纯化方法充分利用了表达蛋白的特点, 分离效果好, 由于融合蛋白的 pI 为 8.1, 硫氧还蛋白的 pI 为 5.8, vMIP Ⅱ 为 10.49, 采用一次阳离子交换层析分离, 即可获得纯度达 99% 的目的蛋白。该纯化蛋白具有其生物学活性, 它与趋化因子受体 CCR5 结合的解离常数为 Kd = 11.56 ± 1.98 nmol/L, 迄今尚未见有其它报道。

目前临床上治疗免疫排斥反应的主要药物是各种抑制淋巴细胞活化的非特异性免疫抑制剂, 虽然能减轻排斥并延长移植物存活, 但长期应用免疫抑制药物不可避免地会造成机体的免疫功能减低, 极易引发感染和肿瘤。因此寻求新的特异性的治疗方法成为移植免疫研究的重要课题。近年来, 趋化因子及其受体研究的飞速进展加深了对移植免疫排斥反应发生机制的认识, 并为寻找非全身免疫抑制条件下治疗移植免疫排斥反应引入了新的途径。已有大量研究证明各种趋化因子对移植物受体的单核细胞及淋巴细胞向移植物内浸润起主导作用, 并参与慢性排斥反应中移植物结构的损伤和纤维化[8]。近年来发现有许多病毒如巨细胞病毒、痘病毒和疱疹病毒在进化中获得了编码宿主细胞因子样和趋化因子样蛋白的能力, 这些感染性病毒通过模仿宿主的活性因子, 干扰和抗衡宿主的防御系统, 争夺其生存和扩散的空间[3], 并能继续生存于宿主体内。我们可以学习病毒的这种免疫逃逸方式并应用于人类疾病的控制。病毒的类趋化因子由于具有广谱的趋化因子受体拮抗剂功能, 是我们寻找针对不同免疫性疾病的趋化因子拮抗剂的良好起源。本研究观察到重组病毒趋化因子 vMIP Ⅱ 能显著延长小鼠异体移植皮肤的存活期, 证明它能够抑制小鼠异体皮肤移植的免疫排斥反应。为进一步探讨 vMIP Ⅱ 成为免疫排斥反应的治疗剂的可能性奠定基础。

参考文献:

[1] Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. Chemokines in immunity[J]. Adv Im-

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

munol, 2001, 78(1): 57—110.
[2] Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic[J]. Nature, 1998, 392(6 676): 565—568.
[3] 郑 红, 朱锡华. 病毒趋化因子与趋化因子受体[J]. 免疫学杂志, 2000, 16(4, Suppl): 24—27.
[4] Kledal T N, Rosenkilde M M, Coulin F, *et al*. A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by KSHV[J]. Science, 1997, 277(5 332): 1 656—1 659.
[5] Chen S, Bacon K B, Li L, *et al*. In vitro inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto(WKY) rats by vMIP II[J]. J Exp Med, 1998, 188(1): 193—198.
[6] DeBruyne L A, Li K, Bishop D K, *et al*. Gene transfer of virally encoded chemokine antagonists vMIP-II and MC148 prolongs cardiac allograft survival and inhibits donor-specific immunity[J]. Gene Ther, 2000, 7(7): 575—582.
[7] 郑 红, Perer S C, 朱锡华. 趋化因子 SDF-1β 在大肠杆菌中的表达及其纯化[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(1): 62—65.
[8] Hancock W W, Gao W, Faia K L, *et al*. Chemokines and their receptors in allograft rejection[J]. Current opinion in immunol, 2000, 12(5): 511—516.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)09-1016-01

从胸水中分离出一株人赭杆菌

Isolation of a strain of *Ochrobactrum anthropi* from pleural effusion

张全华, 雷殿刚, 魏莲花 (解放军 473 医院医务处, 兰州 730070)

人赭杆菌隶属于假单胞菌属第 III群, 为条件致病菌, 在自然界分布广泛, 可从河水、土壤中分离出来, 也可从临床血液、尿液等标本中分离出来[1]。我们从一例胸腔积液患者的胸水标本中分离到一株人赭杆菌(*Ochrobactrum anthropi*), 报告如下。

1 临床资料

患者, 女, 48 岁, 助剂厂工人。因胸腔积液于 1999 年 3 月 20 日入院。入院时查体: 胸廓对称, 左侧略饱满, 呼吸力度及语颤减弱, 左侧胸第 8 后肋以下呈叩浊音, 两肺未闻及干湿罗音。实验室检查: WBC 3.0× 10^9/L N 0.60 L 0.39 M 0.01, ESR 40 mm/h。尿常规提示: RBC3+/HP, ALT 62 U, TB 48 μmol/L, HbsAg 阳性, HbeAg 阳性, HbcAb 阳性, HBsAb 阴性, HBeAb 阴性, AFP 83.09 μg/L, A 30 g/L, G 37 g/L, A/G 0.82。B 超提示为肝硬化。行胸穿, 送检胸腔积液进行常规、生化、细菌学检查。结果提示为漏出液, 培养无细菌生长。患者在 4 月 8 日突然出现发热、食欲不振、疲乏无力、巩膜黄染, 体温 38.9 ℃, 遂行胸穿术并送检胸腔积液、血液进行培养。结果从胸水中分离出一株人赭杆菌, 血培养无细菌生长。给与环丙沙星 Po500 mg Q12 h、哌拉西林 Iv3.0 g/ Q 6 h 治疗后, 感染症状消失。

2 分离鉴定

行胸穿术后送检的胸腔积液标本, 经 3000 转离心 10 min 后弃去上清, 取管底离心物以接种环接种于血琼脂平板, 置 35 ℃ 24 h, 出现边缘整齐、光滑、湿润、灰白色、中等大小的菌落。行革兰染色呈革兰阴性杆菌, 荚膜染色阳性, 鞭毛染色呈极鞭毛, 氧化酶阳性。以该培养物接种至 MicroScan Neg Combo Panel Type20 鉴定板, 置 35 ℃24 h 后读取结果。实验结果见表 1。

表 1 人赭杆菌生化鉴定及药敏结果

生化试验	结果	抗生素	MIC(μg/ml)	结果
尿素分解	−	丁胺卡那	≤16	S
硫化氢	−	氨苄西林/青霉烷砜	≥16/8	R
吲哚	−	氨苄西林	≥16	R
赖氨酸分解	−	头孢唑啉	≥16	R
精氨酸分解	−	cefepime	≤4	S
鸟氨酸分解	−	头孢唑肟	16	I
苯丙氨酸分解	−	头孢替坦	≥32	R
七叶苷水解	−	博拿	≥4	R
丙酮酸分解产物	−	头孢他啶	4	S
枸橼酸盐利用	+	头胞曲松	16	I
麦芽糖分解	−	头孢呋辛	≥16	R
半乳糖苷酶	−	头孢噻吩	≥16	R
酒石酸盐利用	−	环丙沙星	≤0.5	S
乙酰胺利用	−	庆大霉素	≤1	S
溴化十六烷基三甲胺生长	−	亚胺培南	2	S
葡萄糖氧化发酵	+	氧氟沙星	≤1	S
青霉素 G 抑菌	+	哌拉西林	≤16	S
卡那霉素抑菌	+	妥布霉素	≤4	S
多粘菌素抑菌	−	复方新诺明	≥2/38	R
呋喃坦叮抑菌	+	替卡西林	≥64	R
妥布霉素抑菌	−			
硝酸盐还原	+			
氧化酶	+			

3 讨论

据伯杰手册第 8 版记载, 该菌为位置未定属, 最初发现于列宁格勒市郊区, 后来在 1929 年 Naumann 独立地发现于瑞典。1944 年 Beger 独立地发现于柏林附近的井中。该菌广泛分布于含铁的淡水中, 但从胸水中分离出该菌的报道极为罕见。

关键词: 分离鉴定; 人赭杆菌; 胸腔积液
中图法分类号: R379.6 文献标识码: B

参考文献:

[1] 李仲兴, 郑家齐, 李家宏. 诊断细菌学[M]. 香港: 黄河文化出版社, 1992. 397—398.

(编辑 陈聪连)

作者简介: 张全华(1968—), 男, 宁夏回族自治区银川市人, 主治医师, 主要从事临床微生物检验方面的研究。电话: (0931)8976338

收稿日期: 2001-02-16; 修回日期: 2001-07-03

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net