DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.032
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
76 2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)01-0076-03

抗人BPI抗体对猪源BPI体外生物活性的增强作用

周 红,郑 江,秦孝建,肖光夏 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 确认抗人杀菌性/通透性增加蛋白(Bactericidal/permeability increasing protein, BPI)多克隆抗体和单克隆抗体对猪源BPI杀菌及结合内毒素活性的增强作用。方法 采用肉汤培养法测定BPI在有或无抗人BPI抗体存在情况下猪源BPI对大肠杆菌J5的杀菌率变化;采用鲎基质显色法测定BPI与抗体孵育30min后其结合内毒素能力的改变。结果 抗人BPI多克隆抗体和单克隆抗体加入后,猪源BPI的杀菌活性不仅不降低,反而增加,而抗体本身并不具有杀菌性,非抗BPI抗体也无此效应;同时抗人BPI多克隆抗体和单克隆抗体可增加猪源BPI的结合内毒素活性。结论 抗人BPI多抗或单抗不仅能增加猪源BPI的杀菌活性,而且能增加其结合内毒素活性。

关键词:猪源BPI;抗人BPI抗体;杀菌率;内毒素
中图法分类号:R345.1;R392.11 文献标识码:A

Enhancement of anti-human bactericidal/permeability increasing protein (BPI) antibodies on bio-activities of porcine BPI *in vitro*

ZHOU Hong, ZHENG Jiang, QIN Xiao-jian, XIAO Guang-xia (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To confirm the increasing abilities of anti-human BPI polyclonal and monoclonal antibodies on bactericidal and endotoxin-binding activities of porcine BPI. Methods Broth culture was used to observe the changes of bactericidal rate of porcine BPI with or without anti-human BPI antibody. LAL test was used to test the ability of BPI binding to endotoxin after porcine BPI cultured with antibodies for 30 min. Results After anti-human BPI polycolonal antibodies or monoclonal antibodies having no bactericidal activities were added, bactericidal rate of porcine BPI increased. But the antibody not against BPI had no such improving bactericidal activity. Meanwhile, anti-human BPI polycolonal antibodies or monoclonal antibodies increased the binding ability of porcine BPI to endotoxin. Conclusion Anti-human BPI polycolonal antibodies or monoclonal antibodies not only increase the bactericidal activity, but also increase the binding activity of porcine BPI to endotoxin.

Key words: porcine BPI, anti-human BPI antibody, bactericidal rate, endotoxin

杀菌性/通透性增加蛋白(Bactericidal/permeability increasing protein, BPI)是一种既能杀菌又能中和内毒素的蛋白质,它存在于人、兔、牛等哺乳动物中性粒细胞的嗜天青颗粒中。本实验室首先建立从猪中性粒细胞中提取、纯化BPI的方法,并对其生物学活性进行研究,结果表明猪源BPI具有与人源BPI相似的杀菌及中和内毒素活性,但与抗人BPI多克隆抗体和抗人BPI单克隆抗体结合后猪源BPI的活性不仅不降低,反而增加,其改变出人意料,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

猪源BPI由我室提取并纯化(专利号:ZL96117850.7);兔抗人BPI多克隆抗体和鼠抗人BPI单克隆抗体4E3、5D7:均为荷兰Dentener[1]博士惠赠;兔抗人癌胚抗原(CEA)抗体为我所吴军教授惠赠。M-H培养基、TEM培养液按文献[2,3]方法配置;LPS O111:B4为Sigma公司产品;定量测定鲎试剂盒Endospecy为日本生化株式会社产品;玻璃试管经^{60}Co照射48 h去热原。

1.2 实验方法

1.2.1 猪源BPI对革兰阴性杆菌(G^-)杀菌活性的测定 将大肠杆菌5株、绿脓杆菌5株、沙雷氏菌6株、痢疾杆菌1株、肺炎杆菌3株、肠杆菌2株、金黄色葡萄球菌3株、表皮葡萄球菌3株、链球菌2株接种于1 ml M-H培养基中,37 ℃培养18 h,再转移至新鲜培养基中培养4 h,将细菌浓度调整为9×10^7 cfu/ml,吸取0.4 ml菌液,加入一定量纯化的猪源BPI,37 ℃培养30 min后,梯度稀释后取10 μl均匀涂布于M-H固体平板上,平皿置37 ℃孵箱培养18~24 h后进行菌落计数。

1.2.2 猪源BPI结合内毒素能力的测定 将LPS 1Eu(1Eu=100pg)与梯度稀释的BPI加于去热原玻璃管中,37 ℃孵育15 min后,测定内毒素含量。

1.2.3 抗人BPI多克隆抗体及单克隆抗体对猪源BPI杀菌活性的增强作用 按前述方法培养大肠杆菌J5菌并调整菌浓为9×10^7 cfu/ml培养液为TEM。将含16 μg BPI的生理盐水20 μl加于无热原玻璃试管中(256 ℃烘烤3 h),再加入抗人BPI的多克隆抗体或其它两种单抗4E3、5D7,37 ℃孵育30 min使抗原与抗体充分结合,同时设置兔抗人CEA多克隆抗体作为标本对照。取0.4ml菌液加入上述试管中,37 ℃孵育30 min,梯度稀释后取10 μl于M-H平板上,37 ℃培养18~24 h后进行菌落计数。

基金项目:全军"九五"攻关课题(96L042)
作者简介:周 红(1964-),女,江苏省南京市人,博士,副研究员,主要从事感染及其防治措施方面的研究,发表论文10篇,现在基础医学部药理学教研室工作。电话:(023)68752266;E-mail:zhouh64@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2001-07-10;修回日期:2001-10-15

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

1.2.4　抗人 BPI 多克隆抗体及单克隆抗体对猪源 BPI 结合内毒素能力的增强作用　　在去热原玻璃管中加入 0.5 μg 的猪源BPI, 然后分别加入抗 BPI 的多克隆抗体和两种单抗 4E3、5D7, 37 ℃ 孵育 30 min 使抗原与抗体充分结合, 同时设置各抗体管作为标本对照, 其后采用鲎基质显色法按照前述方法测定内毒素含量。

1.2.5　统计学分析　　按《中国医学百科全书统计学分册》中的 t 检验方法进行均数比较。

2　结果

2.1　猪源 BPI 对革兰阴性杆菌杀菌活性的测定

猪源 BPI 具有强大的杀灭 G^- 杆菌作用, 对革兰阳性球菌(G^+)无影响, 但各种 G^- 菌之间对 BPI 的敏感性不同, 所需浓度从 1~10 μg 不等, 见表 1。

表 1　细菌对猪源 BPI 的敏感性

Tab 1　Sensitivities of bacteria to porcine BPI

Bacteria (Number of strian)	Sensitivities
Gram negative bacteria	
Escherichia coli (5)	++++−++
Pseudomonas aeruginosa (5)	++++−++
Shigella dysenteriae (1)	+
Serratia marcescens (6)	++++−+++
Klebsiella pneumonia (3)	++++−+++
Enterobacter cloacae (2)	+++−+
Gram positive bacteria	
Staphylococcus aureus (3)	−
Staphylococcus epidermidis (3)	−
Streptococcus (2)	−

+: ≤5 ~10 μg; ++: 2.5 ~ 5 μg; +++: 1~2.5 μg; ++++: ≤1 μg;
−: No detectable effect with pig BPI > 20 μg

2.2　抗人 BPI 多克隆抗体及单克隆抗体对猪源 BPI 杀菌力的增强作用

猪源BPI 对大肠杆菌 J5 菌具有明显的杀菌力, 抗人 BPI 多克隆抗体及单抗本身对该大肠杆菌的生长无影响, 但多抗或单抗与猪源 BPI 同时加入, 则 BPI 的杀菌活性大大增强($P<0.01$), 抗 CEA 多抗及抗 CEA 多抗与猪源 BPI 同时加入也无杀菌活性, 见表 2。

表 2　抗人 BPI 抗体对猪源 BPI 杀菌力的增强作用

Tab 2　Increasing abilities of anti−human BPI antibodies on bactericidal rate of pig BPI

	Bactericidal rate(%, $\bar{x}\pm s$)
pBPI	78.3±2.9
pAb	0
4E3	0
5D7	0
pCEA	0
PBPI + pAb	98.0±2.9
PBPI + 4E3	97.0±1.1
PBPI + 5D7	97.5±1.3
PBPI + pCEA	76.2±2.2

pBPI: porcine BPI; pAb: Rabbit anti-human BPI polyclonal antibody; 4E3 and 5D7: anti-human BPI monoclonal antibody 4E3 and 5D7; pCEA: Rabbit anti-human CEA polyclonal antibody

2.3　猪源 BPI 结合内毒素能力的测定

采用鲎基质显色法测定 BPI 结合内毒素的能力表明猪源 BPI 具有强大的结合 LPS 的能力, 结合力随浓度的增加而增加, 见图 1, 为了测定各种抗体对猪源 BPI 结合内毒素能力的影响, 选择 BPI 的浓度为 0.5 μg/ml。

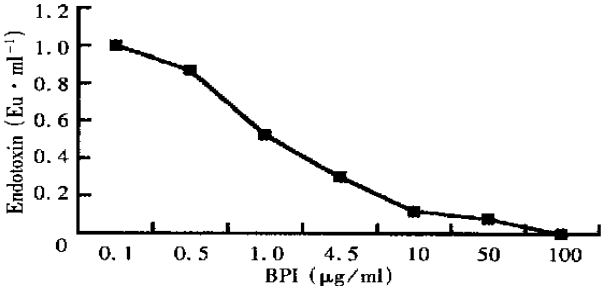


图 1　猪源 BPI 结合 LPS O111: B4 的能力测定

Fig 1　Binding ability of pig BPI to LPS O111: B4 in the capture LAL assay

2.4　抗人 BPI 多克隆抗体及单克隆抗体对猪源 BPI 结合内毒素能力的增强作用

抗人 BPI 多克隆抗体及单克隆抗体并无结合内毒素能力, 但与猪源 BPI 共同孵育 30 min 后, BPI 结合内毒素的能力明显增加($P<0.01$), 见图 2。

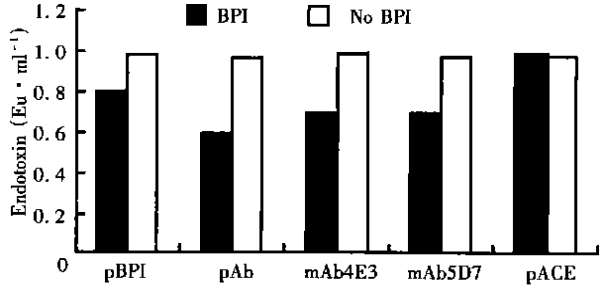


图 2　抗人 BPI 抗体对猪源 BPI 结合 LPS O111:B4 的增强作用

Fig 2　Increasing abilities of anti-human BPI antibodies on binding activities of porcine BPI to LPS O111:B4

3　讨论

BPI 是一具有特异杀灭 G^- 杆菌和中和内毒素的蛋白质。猪源 BPI 与人源、兔源 BPI 一样对许多 G^- 杆菌具有增加其外膜通透性并将之杀灭的作用, 其中包括大肠杆菌、绿脓杆菌、沙雷氏菌、痢疾杆菌、肺炎杆菌等, 而对 G^+ 菌无此作用[4~6]。

在测定猪源BPI 杀灭 G^- 杆菌作用的实验中, 我们发现一个非常有意思的现象: 当我们在猪源 BPI 纯化液中分别加入一定量的兔抗人 BPI 多抗及两种鼠抗人 BPI 单抗 4E3、5D7, 37 ℃ 15 min 后, 再加入一定量的菌液, 试图观察到猪源 BPI 杀菌活性的降低, 甚至消失, 但有趣的现象出现了: 猪源 BPI 的杀菌活性不仅不降

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

低,反而增加,而抗体本身并不具有杀菌性,非抗BPI抗体也无此效应。经过多次重复实验,我们认为:不论是抗人BPI多抗或单抗均能增加猪源BPI的杀菌性。同时我们进一步观察兔抗人BPI多抗及两种鼠抗人BPI单抗对猪源BPI结合内毒素的影响,结果表明抗体可增强猪源BPI结合内毒素的能力,与抗体增加BP的杀菌性的结果相一致。

通常抗体的效应功能理解为抗体与抗原结合后降低抗原的生物学活性。但我们的实验结果并非如此。尽管有关抗BPI抗体增加BPI杀菌活性的报告尚未见到,但抗BPI抗体对BPI杀菌性无影响的现象,1987年Spitzagel[7]曾经报告过:人CAP 57(分子量为57×10^3的阳性蛋白,现在已证实CAP57即为BPI)的单抗PIG8、P2A5在拮抗CAP57杀菌活性方面相差甚远,PIG8具有拮抗CAP57的杀菌活性而P2A5则对CAP57杀菌性无影响,作者推测PIG8可能结合在CAP57上与杀菌活性有关的抗原决定簇上,从而封闭CAP57与细菌的结合位点,使CAP57的杀菌活性消失,而P2A5与CAP57的结合位点离此抗原决定簇甚远,因而不影响CAP57的杀菌活性。

1994年Little[8]在对人BPI 23×10^3 N-末端片段进行功能区分析时表明合成的N-末端第85~99个氨基酸多肽片段具有杀菌活性,而含有此氨基酸序列的第71~100、第57~104个氨基酸多肽片段却无杀菌活性,推测其差异在于二级结构的不同所致。因此我们推测抗人BPI抗体引起猪源BPI生物活性增强的原因可能为:①猪源BPI与人BPI空间结构有所不同,抗人BPI抗体结合在猪源BPI的某一抗原决定簇上,该抗原决定簇与杀菌活性无关,但抗体与该抗原决定簇结合后改变了猪源BPI的空间构象,使与杀菌及结合内毒素活性有关的结构充分暴露出来,增加猪源BPI的生物活性;② 抗体与猪源BPI结合后,使BPI的空间构象发生改变,使潜在的杀菌位点或结合内毒素位点暴露出来,增加猪源BPI的生物活性活性。对于抗人BPI抗体增加猪源BPI杀菌及结合内毒素活性的原因尚不清楚,但这确实是一个有意思的现象,有待进一步探讨研究。

参考文献:

[1] Dentener M A, mit F T, Francot G J. *et al*. Characterization of two monoclonal antibodies directed against bactericidal/permeability-increasing protein[J]. J Infect Dis, 1994, 170(6): 1 483—1 489.

[2] Sandven P, Lassen J, Solberg O. *et al*. Comparative in vitro activity of tobramycin and gentamicin on three different media[J]. Chemotherapy, 1980, 26(5): 354—360.

[3] Weiss J, Hutzler M, Kao L. Environmental modulation of lipopolysaccharide chain length alters the sensitivity of Escherichia coli to the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein[J]. Infect Immun, 1986, 51(2): 594—599.

[4] Mannion B A, Weiss J, Elsbach P. Separation of sublethal and lethal effects of polymorphonuclear leukocytes on Escherichia coli[J]. J Clin Invest 1990, 86(2): 631—641.

[5] Weiss J. Purification and characterization of a potent bacteria and membrance active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes[J]. J Bio Chem, 1978, 253: 2 664—2 672.

[6] Elsbach P, Weiss J, Franson R C. *et al*. Separation and purification of a potent bactericidal/permeability-increasing protein and a closely associated phospholipase A2 from rabbit polymorphonuclear leukocytes. Observations on their relationship[J]. J Biol Chem, 1979, 254(21): 11 000—11 009.

[7] Spitznagel J K, Pereira H A, Martin L E, *et al*. A monoclonal antibody that inhibits the antimicrobial action of a 57 KD cationic protein of human polymorphonuclear leukocytes[J]. J Immunol, 1987 Aug 15, 139(4): 1 291—1 296.

[8] Little R G. Functional domains of recombinant bactericidal/permeability increasing protein (rBPI23)[J]. J Biol Chem, 1994, 269(3): 1 865—1 872.

(编辑 王 红)

消息

第八届全国骨质疏松年会暨第五届全国钙剂年会与“第一届全国骨矿研讨会”征文通知

经上级批准,由中国老年学学会骨质疏松委员会、中国骨质疏松杂志社主办的“第八届全国骨质疏松年会暨第五届全国钙剂年会和第三届中国老年学学会骨质疏松委员会换届选举会议”(简称“春季会议”)定于2002年4月22~27日,在江西省庐山脚下的九江市举行;由中国骨质疏松基金会、中国骨质疏松杂志社和北京东方亚太骨矿研究中心主办的“第一届全国骨矿研讨会”(简称“秋季会议”)定于2002年10月12~17日在桂林市举行。现征集稿件。

“春季会议”征文内容包括骨质疏松基础、诊断、治疗与预防、经验与教育等;“秋季会议”征文内容包括骨矿诊断和临床、代谢性骨病、风湿性骨病、骨性关节炎、骨质疏松的诊、治、防等。两会均设有“中青年优秀论文奖”和继续教育学分,欢迎您向会议秘书处索取详细通知,或浏览我们的网页(网址 http://www.china-osteofound.org)。

“春季会议”截稿日期为2002年2月10日,稿件及软盘请寄:100101,北京市朝阳区小营路9号亚运豪庭A座05F室,韩丽收。电话:(010)64985881,传真:(010)64936211,E-mail:cgsoc@sina.com。

“秋季会议”截稿日期为2002年7月31日,稿件及软盘请寄:100102,北京市9910信箱,朴俊红收。电话:(010)64742043 传真:(010)64741972,E-mail:info@china-osteofound.org。

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