DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.10.004
第22卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 10
2000年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2000

文章编号:1000-5404(2000)10-0927-04

论著

乙肝治疗性多肽免疫刺激复合物的制备及鉴定

管孝鞠,吴玉章,贾正才,石统东,唐 艳 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 为有效提高小分子多肽在体诱导CTL应答的能力,制备了乙肝治疗性多肽免疫刺激复合物(ISCOMs),并对其形成进行了鉴定。方法 乙肝治疗性多肽ISCOMs采用透析法制备获得,并经小分子多肽的SDS-PAGE电泳法确定了复合物中小分子多肽的存在,采用Bradfords法测定了复合物中多肽的结合量。结果 在电镜下呈典型的蜂巢状亚微型颗粒结构,所制备的ISCOMs中多肽的结合量约为0.30 mg/ml。结论 ISCOMs的成功制备,为进一步研究小分子多肽免疫刺激复合物的免疫学特性奠定了基础。

关键词:免疫刺激复合物;制备;鉴定
中图法分类号:R373.21;R392.7 文献标识码:A

Preparation and identification of immunostimulating complexes from a hepatitis B therapeutic peptide

GUAN Xiao-ju, WU Yu-zhang, JIA Zheng-cai, SHI Tong-dong, TANG Yan (Institute of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To prepare and characterize immunostimulatory complexes (ISCOMs) from a hepatitis B therapeutic peptide in order to improve the cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses induced by short peptide antigen *in vivo*. **Methods** The ISCOMs were prepared by dialysis approach, and the formation was observed with electron microscopy. The short polypeptide in the ISCOMs was analyzed with SDS-PAGE method and the content of peptide incorporated into the ISCOMs was determined by Bradford's method. **Results** Typical honeycomb-like structure of ISCOMs was observed with electron microscope, and hepatitis B peptide content incorporated into the ISCOMs was approximately 0.30 mg/ml. **Conclusion** The ISCOMs were successfully prepared from the short polypeptide which founded a basis for the further study on immune features of the complexes.

Key words: immunostimulating compexes; preparation; characterization

免疫刺激复合物(Immunostimulating complexes, ISCOMs)最早是由Morein及其同事提出的[1],早期绝大多数研究采用较为粗制的膜成分作为抗原来源,现多由磷脂酰胆碱(或磷脂酰乙醇胺)、胆固醇、糖甙Quil A(也称为Spikoside)及抗原分子形成的直径约为40 nm(与病毒颗粒大小相近)的亚微颗粒型复合物。不含抗原分子时为了区别一般称为ISCOMs基质(ISCOMs matrix)或空ISCOMs。大量工作显示ISCOMs是良好的抗原递呈载体,不仅可使蛋白抗原诱导强效抗体和MHC Ⅱ类限制性T细胞应答,还可携带蛋白抗原进入抗原加工的同源性途径,在体诱导MHC Ⅰ限制性CTL应答[2~4],产生对抗一些实验性感染的保护性免疫,包括流感、弓形体病、麻疹、EBV感染和单纯性疱疹等[5~7],以ISCOMs为基础的马流感疫苗已于1988年在瑞典上市。与常用的脂质体相比,ISCOMs为刚性、显著对称

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39789010)
作者简介:管孝鞠(1970—),女,安徽省马鞍山市人,博士,讲师,主要从事药理毒理学、新药评价及疫苗免疫学特性方面的研究,发表论文约20篇。电话(023)68752236
收稿日期:2000-08-04;修回日期:2000-09-29

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

的三维结构,在许多情况下此复合物极稳定,包括在肠内,可在淋巴组织的细胞内和细胞外长期存在。本研究以合成的乙肝小分子多肽为基础制备乙肝多肽-ISCOMs,并运用电镜观察法、蛋白含量测定法及小分子多肽的SDS 电泳法对其形成进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 主要试剂来源及配制[1,3,6,7]

磷脂酰胆碱、胆固醇、Mega10 均为 Sigma 公司产品,Quil A 由丹麦 Superfos 公司的 Erik Lindblad 博士馈赠。SDS 小分子量 Marker(2 500~17 000),Sigma 公司产品(MWM-100)。乙肝 30 肽、10 糖肽及 30 脂肽由本所合成。

1.1.1 脂类混合物储备液 磷脂酰胆碱(Sigma)和胆固醇(Sigma)加至 20% Mega10(w/v)中,使之溶解完全(终浓度均为 10 mg/ml),分装,低温保存备用。

1.1.2 Bradfords 溶液 将 100 mg 考马斯亮蓝 G 和 30 mg SDS 溶于 50 ml 95% 乙醇,加入 100 ml 85% 磷酸,加水使总体积为 1 L,使用前过滤。

1.1.3 电泳所需溶液 按说明书进行配制。

1.2 实验方法

1.2.1 乙型肝炎治疗性小分子多肽-ISCOMs 的制备 取脂类混合物储备液(0.25 mg/ml)、乙肝多肽(1 mg/ml)、Quil A(1 mg/ml)充分混匀,室温作用 2 h 后,转移至透析袋中,室温透析 24 h,然后 4 ℃透析 48 h,每 8 h 更换透析液 PBS(pH 7.2~7.4)1 次。透析结束后取样品一小份(~80 μl)进行负染,于透射电子显微镜下观察。0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

1.2.2 Bradfords 法测定 ISCOMs 中多肽结合量 用 PBS 缓冲液制备含 1 mg/ml BSA 的储备液,然后稀释为含 0 到 50 μg BSA 等分的 50 μl 缓冲液;向 50 μl ISCOMs 样品和每 50 μl BSA 稀释液中加入 1 ml Bradfords 溶液,室温孵育 5 min;测定每份样品和 BSA 标准品的 A_{595}值;用 BSA 值绘制标准曲线,由此曲线确定 ISCOMs 中小分子多肽的含量(mg/ml)。

1.2.3 小分子肽 SDS-PAGE 电泳确定 ISCOMs 中小分子多肽的嵌入 凝胶灌制按表 1 配胶,分离胶和隔离胶溶液中分别加入0.1 ml 过硫酸铵和 0.01 ml TEMED,轻轻混匀;分离胶加至高度约 10 cm,灌制隔离胶约 2 cm,此操作要在 15 min 内完成,然后在隔离胶上小心用水覆盖;待分离胶和隔离胶聚合后,移去水层,积层胶中加入 0.1 ml 过硫酸铵和 0.01 ml TEMED,轻轻混匀,倒在隔离胶上;插入梳子,保证梳孔基部与隔离胶之间有一段距离;胶形成后于 4 ℃平衡过夜。拔出梳子,用水淋洗,再用阴极缓冲液洗;加样,恒流条件下进行电泳,电泳条件:20 mA,1 h;30 mA,4~6 h(指示染料离阳极端约 1 cm)。固定 30 min,染色 1 h,脱色 2 h,每 30 min 换液 1 次;观察、分析并摄影。

表 1 凝胶配方表

Tab 1 Formulation of the gels

Components	Separating gel(ml)	Spacer gel(ml)	Stacking gel(ml)
Acrylamid solutrorl	5.00	3.05	1.00
Gel buffer	5.00	5.00	3.10
Glycerol	1.60	……	……
Water	3.40	6.95	8.40
Total	15.00	15.00	12.50

2 结果

2.1 乙肝小分子多肽-ISCOMs 具有独特蜂巢状亚微结构的观察

乙肝多肽-ISCOMs 的电镜观察结果见图 1,可见规则蜂巢状、由多个亚单位构成的开放型结构,说明 ISCOMs 特殊形态的形成。

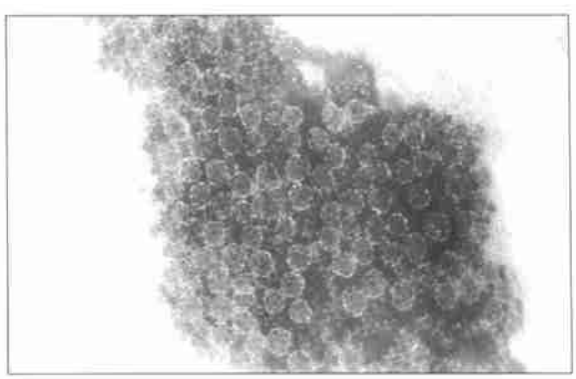


图 1 乙肝多肽-ISCOMs 亚微结构 (TEM×5 000)

Fig 1 Ultrastructure of hepatitis B-ISCOMs (TEM×5 000)

2.2 乙肝小分子多肽-ISCOMs 中多肽的结合量

2.2.1 标准品测定 结果见表 2。

表 2 标准管测定结果

Tab 2 A595 values of standard tubes

BSA(mg/ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
A_{595}	0.000	0.054	0.100	0.148	0.211	0.275

r=0.9968

2.2.2 乙肝多肽-ISCOMs 中多肽的结合量 ISCOMs 的 A_{595} 为 0.0835,根据标准品测定结果绘制的标准曲线,换算浓度约为 0.33 mg/ml。

2.3 乙肝小分子多肽-ISCOMs 的 SDS-PAGE 分析结果

小分子多肽 SDS 电泳结果见图 2,可见在小分子量 Marker 第 6 条区带(3 480)附近显示一清晰的条带,与单纯此多肽(30 肽)相比,显示的位置相同,但稍有拖尾,这可能是 ISCOMs 中其它组分对多肽电泳的影响。

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

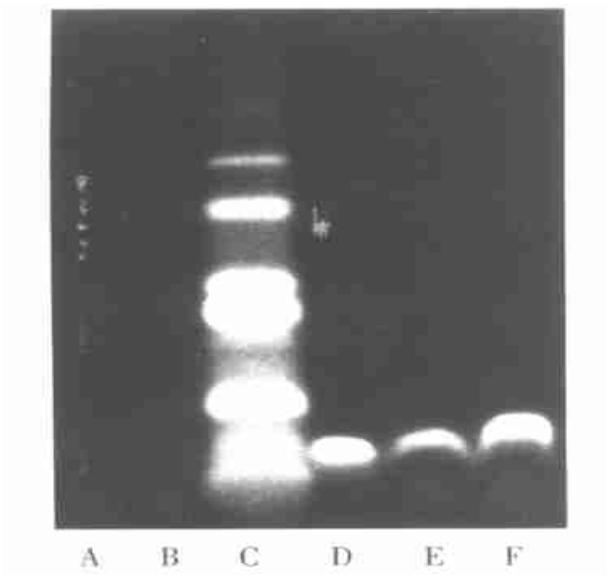


图 2　乙肝多肽-ISCOMs 的 SDS-PAGE 结果

Fig 2　SDS-polyacrylamide gel separation of hepatitis B-ISCOMs

A: Hepatitis B glycopeptide(10)-ISCOMs; B: Hepatitis B lipopeptiole(30)-ISCOMs; C: Molecular wedghte rharker from sigma; D: Hepatitis B peplide(30) (as. conlral); E, F: Hepatitis B peplide(30)-ISCOMs

3　讨论

组织相容性复合体(MHC)I 类限制性细胞毒 T 细胞(CTL)在控制细胞内病原体和肿瘤细胞生长中起极为重要的作用, 迄今为止, 在体诱导 CTL 和细胞免疫问题尚未得到很好解决。近年来对 T 细胞免疫机制的研究表明, 外源性可溶抗原通常不能进入 MHC I 类递呈途径, 故不能激活 MHC I 类限制性 $CD8^+$ CTL, 而 MHC I 类限制性 CTL 应答是体内有效控制细胞内感染及某些肿瘤细胞生长所必需的。显然, 通过感染或(病理)生理基因表达所致的细胞内抗原合成可进入 MHC I 类递呈途径, 导致 MHC I 类限制性 $CD8^+$ CTL 前体的识别, 但是接种感染物或转染细胞可能引起疾病, 因此急需合适的新型疫苗佐剂, 特别是本身无抗原性, 能够携带非复制性可溶抗原进入细胞内途径而诱导 MHC I 类限制性 CTL 应答的佐剂系统。

ISCOMs 正是为了解决以上问题研制的新型疫苗佐剂系统之一, 已有的工作发现, ISCOMs 可引起有效和全面的免疫应答, 抗体应答水平可提高 10 倍以上, 能携带抗原分子进入抗原加工的内源性途径, 诱导 MHC-I 类限制性 CTL, 非胃肠道和口服给予均有效, 而且安全稳定, 制备条件温和。此外, 由于 ISCOMs 为非活性佐剂载体, 本身不具抗原性, 可增强抗原特异性免疫应答, 而不会引起无关的免疫反应, 不同性质抗原分子经适当修饰后, 可与 ISCOMs 的基质形成疫苗-佐剂复合物, 因此适用于多种疫苗设计系统, 因此具有良好的应用前景。

电镜观察确定了 ISCOMs 典型结构的形成, 制备过程中各组份的比例适当、透析完全以及必要时密度梯度离心纯化的运用, 是理想 ISCOMs 获得和应用的前提。虽然电镜下具有独特蜂巢状结构的存在是观察 ISCOMs 形成的最常用和最直观方法, 但由于 ISCOMs 基质也可形成蜂巢状的三维结构, 因此还需要通过其它方法, 以确定 ISCOMs 中抗原分子的成功嵌入。Bradfords 法测定结果表明, 多肽含量约为 0.30 mg/ml (嵌入率 30%)。此外, 实验中还发现, 本来极易降解的小分子多肽(数天内即降解), 可于 4 ℃稳定保存数月而无明显分解, 说明乙肝小分子多肽-ISCOMs 多肽的形成使抗原分子的稳定性显著提高。

SDS-PAGE 电泳结果在接近 3 480 处显示一较清晰的条带, 证实了 ISCOMs 中乙肝多肽的成功嵌入(未嵌入的多肽在透析中除去), 而单纯的该多肽的电泳显示的条带较直和规则, 说明 ISCOMs 中其它成分对多肽 SDS 电泳结果的影响。此外, 初步实验结果(未列出)提示, 该乙肝多肽-ISCOMs 可诱导抗原特异性 CTL, 其作用及激活 MHC I 途径的机制尚待探讨。

(致谢: 感谢丹麦 Soren Kamstrup 博士、瑞典 Anna Lunden 博士及英国 John Simms 博士等对本实验的精心指导与热诚相助。)

参考文献:

[1] Morein B, Sundquist B, Hoglund S, *et al*. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses[J]. Nature, 1984, 308(5 958): 457—460.

[2] Takahashi H, Takeshita T, Morein B, *et al*. Induction of $CD8^+$ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs[J]. Nature, 1990, 344(6 269): 873—875.

[3] Mowat A M, Donachie A M, Reid G, *et al*. Immune-stimulating complexes containing Quil A and protein antigen prime class I MHC—restricted T lymphocytes *in vivo* and are immunogenic by the oral route[J]. Immunology, 1991, 72(3): 317—322.

[4] Heeg K, Kuon W, Wagner H. Vaccination of class I major histocompatibility complex (MHC)-restricted murine $CD8^+$ cytotoxic T lymphocytes towards soluble antigens: immunostimulating-ovalbumin complexes enter the class I MHC-restricted antigen pathway

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

and allow sensitization against the immunodominant peptide[J]. Eur J Immunol, 1991, 21(6): 1 523—1 527.

[5] Sjolander A, Cox J C, Barr I G. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions[J]. J Leukoc Biol, 1998, 64(6): 713—723.

[6] Barr I G, Mitchell G F. ISCOMs (immunostimulating complexes): the first decade[J]. Immunol Cell Biol, 1996, 74(1): 8—25.

[7] Morein B. The ISCOM antigen-presenting system[J]. Nature, 1988, 332(6 161): 287—288.

(编辑 汪勤俭)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)10-0930-01

急性创伤患者的围手术期护理

Preioperative nursing for emergency patients with acute trauma

汪 涛 (第三军医大学附属西南医院急救部, 重庆 400038)

我院急救部自 1999 年开展急救、手术、术后监护一体化以来, 已成功救治数十例急性创伤患者。现就急诊手术患者的围术期护理, 谈谈体会。

1 病例资料

自 1999 年 1 月至 2000 年 3 月, 共救治急性创伤 70 例。其中颅脑外伤 20 例, 肝破裂 1 例, 脾破裂 10 例, 外伤性血气胸 2 例, 骨折(四肢)17 例, 手外伤(血管、神经、肌腱断裂)6 例, 多发伤 13 例(伴动、静脉断裂 9 例), 心脏刀刺伤 1 例。70 例中合并休克 34 例, 占 48.5%, 术后追踪调查死亡 2 例。手术成功率 100%, 治愈率 97.14%。

2 术前护理

重点在于挽救生命, 其特点是急救。

术前建立静脉通道, 依据需要交叉合血, 查血常规、肾功, 做 CT、X 线检查, 备皮等。青霉素、破伤风、普鲁卡因皮试, 留置导尿。注意保暖, 同时向患者或家属交代病情, 做好其心理工作。

心电监护仪监测患者生命体征, 严密观察神志、呼吸、体温。观察并记录尿量, 为抗休克提供可靠依据。准备工作就绪, 与手术室巡回护士做好交接工作, 及时送至手术室(我们急救手术室设在抢救室内, 为及时有效的手术争取了宝贵的时间, 提高了急救质量)。

3 术后护理[1]

术后护理的目标是继续康复过程, 需严密观察病情, 尽可能减轻病人痛苦和不适, 预防并发症, 使病人能顺利康复。

做好病人回病房的准备, 铺好麻醉暂空床。准备好监护仪、呼吸机、吸痰器等, 使其处于备用状态。护送途中密切观察病人神志、呼吸, 防止术后呼吸异常, 与监护室护士做好病人交接工作。

常规心电监护, 必要时呼吸机辅助呼吸, 定时观察记录呼吸、脉搏、血压以评定心血管、呼吸功能。定时监测体温。

术后病人的营养和水份摄入应予重视。正确记录液体出入量, 以防水电解质失衡。

术后并发症的预防和处理: (1)术后疼痛: 去除疼痛对病人身心健康非常重要。正确评价和记录病人的疼痛感觉, 鼓励病人松弛, 提供安静的环境, 帮助病人采取舒适的体位或采用药物止痛。(2)感染: 勤观察伤口的愈合情况, 勤换药。切实做好静脉内插管的护理工作[2], 如 72 h 更换留置针, 在静脉插管部位附近明显处记录插管的日期、时间, 每日观察插管部位有无触痛、肿胀。当敷料潮湿、松脱或有异味时应及时更换等。同时做好留置导尿后的护理, 鼓励患者学习在床上使用尿盆, 一旦临床允许就拔掉尿管。(3)防止褥疮: 术后定期重新估测病人发生褥疮的危险性, 有规律地观察病人受压部位, 制定翻身计划, 定时协助病人翻身更换体位。(4)其他: 如预防便秘, 指导患者功能锻炼, 注意卫生, 保证适当的休息和活动。

4 护理体会

在急救部开展急救、手术、术后监护, 彻底改变了急诊科以往救治分离的局面, 为急重症创伤的早期救治赢得了宝贵的时间, 使病人获得了较为连贯、整体的护理。同时也为急救医学护理的发展提供了良好契机。

关键词: 急性创伤; 围手术期护理
中图法分类号: R473.6 文献标识码: B

参考文献:

[1] 周锡芳, 杨菊芳、古成[illegible]等. 外科围术期护理进展[J]. 国外医学: 护理学分册, 1999, 18(1): 9—11.

[2] 王 岚, 白 岩, 郭 戈. 对创伤患者院前静脉内插管的护理[J]. 国外医学: 护理学分册, 2000, 19(1): 31.

(编辑 汪勤俭)

作者简介: 汪 涛(1974—), 女, 重庆市綦江县人, 护师。电话: (023)68754000-73047

收稿日期: 2000-04-20; 修回日期: 2000-08-28

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