DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.06.021

杀菌性 通透性增加蛋白模拟肽小鼠体内拮抗内毒素作用的研究*

郑 江** 袁建成 周 红 周立新 刘晓禄 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:观察杀菌性 通透性增加蛋白(BPI)模拟肽对内毒素(LPS)攻击所致小鼠死亡的保护作用。方法:以一个 LD_{50}的 LPS(20 mg·kg^{-1})静脉注射攻击小鼠,分别于 LPS攻击后 20 s内静脉注射不同剂量的 BPI模拟肽;于 LPS攻击前及攻击后不同时间内分别静脉注射 5 mg·kg^{-1}和 10 mg·kg^{-1}的 BPI模拟肽,以观察 BPI模拟肽对 LPS攻击所致小鼠死亡的保护作用、BPI模拟肽对 LPS攻击小鼠死亡保护作用的时效关系及 BPI模拟肽对 LPS攻击小鼠死亡的预防作用。结果:BPI模拟肽对 LPS所致小鼠死亡有明显的保护作用及预防作用,并有一定的量效关系及时效关系。结论:BPI模拟肽,不仅保留了 BPI特异性中和 LPS的特性,而且对 LPS攻击小鼠具有更强的保护作用。

关键词 杀菌性 通透性增加蛋白;内毒素;多肽
中图法分类号 Q514.3; R392.11

杀菌性 通透性增加蛋白(Bactericidal/permeability increasing protein, BPI)是一种存在于人及哺乳动物中性粒细胞(PMN)嗜天青颗粒中的蛋白质,由 456个氨基酸组成,具有强大的杀灭 G$^-$细菌和中和 LPS的能力。我们根据 BPI分子的晶体结构模拟设计了 BPI的模拟肽,在鉴定其体外生物活性的基础上,观察了 BPI模拟肽对 LPS攻击小鼠所致死亡的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

LPS O111:B4 Sigma产品(小鼠 LD_{50}= 20.85 mg/kg);放线菌素 D注射液:上海新亚药业公司产品,批号 9501104;地塞米松注射液:湖北省襄樊市生物化学制药厂产品,批号 970407;昆明种小白鼠:体重 18~22 g,雄雌各半,由四川抗菌素工业研究所实验动物室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 BPI模拟肽对 LPS攻击所致正常小鼠死亡的保护作用 小鼠随机分为 10组,每组动物 20只,各组均静脉注射 1个 LD_{50}(20 mg/kg)剂量的 LPS后于 20 s内同时分别静脉注射 BPI模拟肽及地塞米松,观察 7 d内小鼠死亡情况。

1.2.2 BPI模拟肽对 LPS攻击小鼠死亡保护作用的时效关系 将小鼠随机分为 6组,每组动物 20只,静脉注射 LPS 20 mg/kg,分别于 LPS注射后 10 s、30、60、120 min及 240 min静脉注射 BPI模拟肽 10 mg/kg,观察 7 d内小鼠死亡情况。

1.2.3 BPI模拟肽对 LPS攻击小鼠的预防作用 小鼠随机分为 8组,每组动物 20只,于静脉注射 BPI模拟肽 5 mg/kg后不同时间静脉注射 LPS 20 mg/kg进行攻击,观察 7 d内小鼠死亡情况。

1.2.4 BPI模拟肽对 LPS攻击的放线菌素 D致敏小鼠的保护作用 小鼠随机分为 12组,致敏攻击的对照组动物 20只、其它每组动物 10只,用放线菌素 D(Acti-D) 0.5 μg/kg腹腔注射致敏小鼠,观察 BPI模拟肽对 LPS(0.3 mg/kg)攻击的放线菌素 D致敏小鼠的保护作用。

2 结果

2.1 BPI模拟肽对 LPS(20 mg/kg)攻击小鼠所致死亡的保护作用,见表 1

表 1 BPI模拟肽对 LPS(20 mg/kg)所致小鼠死亡的保护作用

Tab 1 The protective effects of BPI modeling peptides on LPS challenged mice

Group	Dose (mg/kg)	Treated animals	Died animals	P
Control	-	20	14	
Treated 1	0.1	20	8	> 0.05
Treated 2	0.25	20	9	> 0.05
Treated 3	0.5	20	6	< 0.05
Treated 4	1	20	4	< 0.01
Treated 5	2.5	20	4	< 0.01
Treated 6	5	20	2	< 0.01
Treated 7	10	20	1	< 0.01
Treated 8	10×2	20	0	< 0.01
Dexamethasone	5	20	7	< 0.05

由见表 1可见,BPI模拟肽对 LPS所致小鼠死亡有明显的保护作用,并有一定剂量效应关系,5~10 mg/kg有稳定的保护效果。

* 重庆市科委院士基金、军队卫生医药基金面上项目资助
** 郑 江,男,37岁,副研究员,博士

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

2.2　BPI模拟肽对 LPS攻击小鼠所致死亡保护作用的时效关系,见表 2

表 2　BPI模拟肽对 LPS攻击小鼠所致死亡保护作用的时效关系

Tab 2　The time-effect relationship of protective effects of BPI modeling peptides on LPS challenged mice

Groups	Post LPS challenging	Treated animals	Died animals	*P*
Control	–	20	9	
Treated 7-1	10s	20	0	< 0.01
Treated 7-2	30 min	20	5	> 0.05
Treated 7-3	60 min	20	6	> 0.05
Treated 7-4	120 min	20	6	> 0.05
Treated 7-5	240 min	20	8	> 0.05

表 2可见,于 LPS攻击后 10 s内给药,BPI模拟肽有显著的保护效果,LPS攻击后较长时间给药,BPI模拟肽保护作用差.

2.3　BPI模拟肽对 LPS攻击小鼠所致死亡的预防作用,见表 3

由表 3可见,BPI模拟肽预先静脉注射,对继后的 LPS攻击所致小鼠死亡也有明显的保护作用,但这一作用以 BPI模拟肽静脉注射后立刻攻击效果为佳.

表 3　BPI模拟肽(5mg/kg, iv)对 LPS攻击小鼠的预防作用

Tab 3　The preventive effects of BPI modeling peptides (5 mg/kg, iv) on LPS challenged mice

Groups	Pro LPS challenging	Treated animals	Died animals	*P*
Control	–	20	12	
Treated 1	10s	20	0	< 0.01
Treated 2	1 min	20	1	< 0.01
Treated 3	2 min	20	1	< 0.01
Treated 4	5 min	20	3	< 0.01
Treated 5	10 min	20	4	< 0.01
Treated 6	30 min	20	4	< 0.01
Treated 7	60 min	20	4	< 0.01

2.4　BPI模拟肽对 LPS攻击的放线菌素 D致敏小鼠的保护作用,见表 4

表 4可见,BPI模拟肽对 LPS攻击的放线菌素 D致敏小鼠有明显保护作用,但较对单纯 LPS攻击组为弱,仅 5 mg/kg于 LPS攻击后 10 s内给予才有明显的保护效果.

表 4　BPI模拟肽对 LPS攻击的放线菌素 D致敏小鼠的保护作用

Tab 4　The protective effects of BPI modeling peptides to Acti-D and LPS treated mice

Groups	Dose (mg/kg, iv)	Post LPS challenging	Acti-D (μg/kg, ip)	LPS (mg/kg, iv)	Treated animals	Died animals
Control a	–		0.5	–	10	0
Control b	–		–	0.3	10	0
Control c	–		0.5	0.3	20	14
Treated a	1	10s	0.5	0.3	10	10
Treated b	2.5	10s	0.5	0.3	10	6
Treated c	5.0	10s	0.5	0.3	10	3*
Treated d	5.0	5 min	0.5	0.3	10	8
Treated e	5.0	15 min	0.5	0.3	10	6
Treated f	5.0	30 min	0.5	0.3	10	6
Treated g	5.0	60 min	0.5	0.3	10	5
Treated h	5.0	120 min	0.5	0.3	10	6
Treated i	5.0	240 min	0.5	0.3	10	6

* : $P < 0.05$ *vs* control a

3　讨论

自抗生素问世以来,临床与感染的斗争一直被细菌耐药性不断产生及新型抗生素难以跟上所困扰. 感染性疾病的死亡率仍居高不下,特别是 G⁻细菌感染所伴随的严重的内毒素血症导致的严重全身性炎症反应综合征(SIRS)、多脏器功能不全综合征(MODS)甚至多脏器功能衰竭(MOF),其病死率达 50%~ 80%以上[1]. 针对 G⁻细菌感染所伴随的内毒素血症的防治研究已进行了十几年,从抗 J5血清、抗 Lipid A抗 TNF抗体、抗 IL-1、IL-6抗体、抗 PAF抗体及其受体拮抗剂到 NO拮抗剂,虽在动物实验研究中对脓毒症所致的脏器损伤有一定的保护作用,但在扩大的Ⅲ期临床试验中,仅抗 J5血清和抗 Lipid A的鼠源单抗 E5及人源单抗 HA-1A对脓毒症的某些亚群病人有一定效果,而其它的制剂均未被证实对脓毒症有治疗作用. 抗 J5血清在临床应用中因存在安全性问题被美国 FDA终止,而 E5和 HA-1A因疗效不确切亦未获得 FDA批准[1]. 目前尚无一种安全有效的特异性中和 LPS的制剂. BPI是一种具有强大的杀灭 G⁻细菌和中和 LPS活性的蛋白质,在动物实验研究中已证实其对脓毒症的疗效明显优于 E5和 HA-1A,被国外学者誉为"超级抗生素"[2,3]. 已证实其 N-末端 1~ 199个氨基酸片段(BPI$_{23}$),具有完整 BPI的全部生物活性. 国外 rBPI$_{23}$及 rBPI$_{21}$的开发研究已进入Ⅱ~ Ⅲ期临床试验,初步结果证明,rBPI$_{23}$和 rBPI$_{21}$对严重 G⁻细菌感染的治疗

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

有效[4]。我们对模拟设计的 BPI模拟肽,在鉴定其体外生物活性的基础上,观察了其对 LPS攻击小鼠所致死亡的保护作用,初步结果证明:

BPI模拟肽对 LPS(20 mg/kg)攻击小鼠死亡的保护作用,从量效关系看,0.5 mg/kg有一定的保护作用($P < 0.05$),当模拟肽 1~ 10 mg/kg时有非常显著的保护作用($P < 0.01$),若 10 mg/kg后间隔 30 min重复 1次,则对小鼠的保护作用为 100%。当模拟肽 < 0.5 mg/kg时,对小鼠的保护作用不显著,提示模拟肽在中和 LPS的过程中存在一个量的平衡关系。如果外源性 BPI模拟肽不足以中和入血的 LPS,则未被中和的 LPS达到一定的域值仍有可能通过介导细胞因子、炎性介质等因素诱导 SIRS甚至 MODS,导致动物死亡。该实验结果与 Fisher等[5]报道的 BPI对 LPS攻击小鼠的保护作用相一致。

从给药程序及时效关系看,于 LPS攻击同时或短时间内给药效果最好,再一次表明 BPI模拟肽对 LPS的中和是一个快速结合过程;而 30 min后给药则中和 LPS的作用明显减弱,与 Fisher等[5]的报道基本一致,可能在 LPS攻击后 30 min内 LPS已启动了炎症瀑布反应有关。本实验所用 LPS剂量为 LD_{50},而且是一次性静脉注射给药,与临床上自然性内毒素血症有着本质上的不同。对自然性内毒素血症,如果即时清除了血内的 LPS,已启动的炎性反应就会自限,因此,在动物实验中 30 min后给药效果不好并不能完全否定其临床应用价值。

在 LPS攻击小鼠前 10 s至 1 h,预防性给予 BPI模拟肽对小鼠都有非常显著的保护作用($P < 0.01$),以 LPS攻击前即刻给药为最佳,与 Fisher等[5]报道的结果相一致。与 BPI相比较,BPI模拟肽在 LPS攻击前 30 min、60 min给药仍有显著的保护作用。Ammons等[6]报道,$rBPI_{23}$的半衰期仅为 0.4 min,静脉给药后 BPI及 $rBPI_{23}$均很快被肝脏清除,因此预防性给药超过 30 min即无效。而 BPI模拟肽在 LPS攻击前 60 min给药对小鼠仍有显著的保护作用,该实验结果显示 BPI模拟肽在体内的半衰期明显长于 BPI。

BPI模拟肽在 LPS攻击的放线菌素 D致敏的小鼠动物模型中,我们观察到在 LPS攻击后 10 s以内,5 mg/kg BPI模拟肽对小鼠有显著的保护作用,但较单纯 LPS攻击组为弱,随着给药时间的延迟其保护作用明显减弱甚至无保护作用,与 Kohn等[7]报道的结果相一致。

通过体内系列实验研究,发现 BPI模拟肽,不仅保留了 BPI特异中和 LPS的特性,而且对 LPS攻击小鼠具有更强的保护作用。因此,对 BPI模拟肽进行深入研究和开发,具有很大的临床应用价值和前景。

参考文献

1 Verhoef J, Hustinx W M, Frasa H, *et al*. Issues in the adjunct therapy of severe sepsis. J Antimicrob Chemother, 1996, 38(2): 167

2 Weiss J, Elsbach P, Olsson I, *et al*. Purification and characterization of a potent bacteria and membrance active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. J Bio Chem, 1978, 253(6): 2664

3 Elsbach P, Weiss J, Frason R C, *et al*. Separation and purification of a potent bactericidal/permeability increasing protein and a closely associated phospholipase A_2 from rabbit polymorphonuclear leukocytes. J Bio Chem, 1979, 254(22): 11000

4 Giroir B P, Quint P A, Barton P, *et al*. Preliminary evaluation of recombinant amino-terminal fragment of human bactericidal/permeability-increasing protein in children with severe meningococcal sepsis. Lancet, 1997, 350(9089): 1439

5 Fisher C J, Jr F C C M, Marra M N, *et al*. Human neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein reduces mortality rate from endotoxin challenge: A placebo-controlled study. Crit Care Med, 1994, 22(4): 553

6 Ammons W S, Kohn F R, Kung A H. Protective effects of an N-terminal fragment of bactericidal/permeability-increasing protein in rodent models of gram-negative sepsis: role of bactericidal properties. J Infect Dis, 1994, 170(6): 1473

7 Kohn F R, Ammons S, Horwitz A, *et al*. Protective effect of a recombinant amino-terminal fragment of bactericidal/permeability-increasing protein in experimental endotoxemia. J Infect Dis, 1993, 168(5): 1307

(收稿: 1998-06-08,修回: 1998-10-15)

(编辑 王 红)

Studies on the anti-endotoxin activity of modeling peptides of bactericidal/permeability increasing protein *in vivo*

Zheng Jiang, Yuan Jiancheng, Zhou Hong, Zhou Lixin, Liu Xiaolu, Xiao Guangxia (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To observe the protective effects of BPI modeling peptides on LPS challenged

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

mice. **Methods**: One LD_{50} dose of LPS was injected to challenge mice, and different dose of BPI modeling peptides was injected within 20 s after the challenging and then 5 mg·kg^{-1}/10 mg·kg^{-1} dose of BPI modeling peptides was injected pre/post the challenging respectively, to observe the protective or preventive effects of BPI modeling peptides on the LPS challenged mice. **Results**: It was found that BPI modeling peptides had a significant protective effect on endotoxin (20 mg/kg) challenged mice and when the peptides administered with LPS at the same time or after that of LPS within 10 s, it had a significant protective effects, and when administered 30 min after that of LPS, it had no significant protective effect; when administered 60 min to 10 s before LPS challenging, it still had a significant protective effect. **Conclusion**: BPI modeling peptides seems had a much longer half-life time and the protective effect on LPS challenged mice could be better than that of BPI.

Key words BPI; modeling; peptide

鼠用连续输液装置的设计和应用

Development and appliance of continous rat infusion device

屠伟峰* 伍晓汀** 袁建成 肖光夏 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆, 400038

体液支持、静脉营养支持、静脉内持续给药在临床上心肺复苏、严重创伤、多脏器功能障碍等病人救治中是非常重要和有效的措施[1,2],但尚难以在大鼠等小动物顺利开展有关此领域的系列研究,原因是缺乏能确保鼠在自由活动情况下能给鼠持续输液或给药的途径和输液设备,国外虽有类似的设备,但价格太昂贵。为此设计出一套鼠用连续输液装置,现介绍如下。

输液装置的设计: (1)设计思路: 实验结束后,随着麻醉药作用的消失,鼠开始苏醒、增加活动,就难以给鼠进行持续输液和给药,如何解决鼠既能自由活动,又不影响持续输液,就必须解决两个问题:① 近鼠端输液单元与远离鼠输液单元既相互独立又相互联系,既要确保近鼠端输液单元与远离鼠输液单元的活动是独立的、毫不联系的,但它们相互之间又是连续的、不能中断输液的;② 近鼠端输液单元必须随着鼠的活动而随意活动、又不被鼠咬断、扭转、折断,而远离鼠输液单元又必须保持相对固定、不能随意转动。换句话说,两个输液单元之间的连接必须既是连续的又是可随意转动的。(2)设计原理: 我们选用了尖利的输液针和软性、耐刺的高质量橡胶材料,利用输液针在刺透较薄的橡胶层后可任意转动、阻力小的特性和原理,以达到两个输液单元之间既是连续的又是可随意转动的目的。(3)材料和组成: 分为近鼠端输液单元和远鼠端输液单元,见图 1。(4)主要特性:① 设计合理;② 简便实用、易学;③ 价格低廉;④ 既可自行设计,也可成套购置;⑤ 在实验观察期间,既能保证鼠能自由活动、自由进水、自由进食,又可减少因限制笼限制实验动物活动而引起的直接或间接影响实验动物观察结果的各种应激反应。

应用情况: 该输液装置已被部分科研单位和多个研究所所采用,已完成 ω-3脂肪酸、1,6-二磷酸果糖和谷胺酰胺对移植小肠的营养作用等多项研究课题。

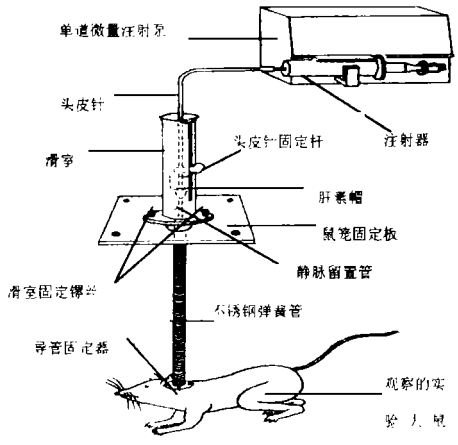


图 1 鼠用连续输液装置结构示意图

关键词 鼠;输液装置
中图法分类号 R197.39

参考文献

1 Denno R, Rounds J D, Faris R, *et al*. Glutamine-enriched total parenteral nutrition enhances plasma glutathione in the resting state. J Surg Res, 1996, 61(1): 35

2 Haglind E. Effects of continuous naloxone infusion in intestinal ischemia shock in the rat. Circ Shock, 1992, 38(3): 195

(收稿: 1998-05-10;修回: 1998-07-15)
(编辑 刘 鹏)

* 屠伟峰 男,37岁,主治医师,博士后 ** 南京军区南京总医院全军普通外科研究所 南京,210002

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