DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.09.008

BPI功能区合成肽体外杀菌能力的研究*

秦孝建** 郑江 袁建成 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:研究BPI功能区合成肽体外杀菌能力。方法:大肠杆菌 J5,绿脓杆菌 PA103,稀释成 1×10⁵ cfu/ml,加入不同浓度的BPI合成肽。比较pH、菌量、血清蛋白浓度对其杀菌能力的影响,同时观察细菌形态变化。结果:BPI功能区片段与细菌作用0.5~2 h杀菌力最强。酸性条件下杀菌活性增强,碱性条件下减弱;细菌浓度愈低杀菌力愈强,杀菌活性随血清浓度升高而增强。BPI功能区片段与细菌作用5 min,外膜出现轮廓模糊,30 min见细菌裂解。结论:BPI功能区片段具有杀菌能力,其杀菌活性可能是通过与细菌外膜结合而发挥作用。

关键词 BPI;杀菌
中图法分类号 R34; R826.23

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PMN嗜天青颗粒中的带正电荷的阳性蛋白质,分子量约55×10³u,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,被国外学者誉为"超级抗生素"[1]。国外重组BPI₂₃(rBPI₂₃)及其突变体(rBPI₂₁)的开发研究已进入Ⅱ~Ⅲ期临床试验,初步结果证明,rBPI₂₃和rBPI₂₁对严重G⁻细菌感染有显著疗效[2,3]。本文应用体外合成的BPI功能片段,研究其杀菌活性。

1 材料与方法

1.1 实验菌种与培养基

菌种:标准大肠杆菌 J5,绿脓杆菌 PA103。

M-H培养基:每100 ml含水解酪蛋白1.75 g,牛肉粉0.5 g,可溶性淀粉0.15 g, pH7.2

1.2 实验方法

将大肠杆菌 J5和绿脓杆菌 PA103分别接种于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,用M-H培养基调整细菌浓度至1×10⁶ cfu/ml。

取试管11支并编号,除第一管加入细菌悬液2 ml外,其余每管加入菌液1 ml;在第一管内加入BPI合成肽200 μg,混匀后用菌液等倍稀释至第10管。37℃孵育30 min后各取10 μl(1 000 cfu)均匀涂布于M-H固体培养基上37℃,培养18~24 h后进行菌落计数。

选择恰当的BPI浓度,测定其对J5和PA103的时间-杀菌曲线,菌量为1×10⁶ cfu/ml,反应体积1 ml,当BPI合成肽与细菌混合后,37℃培养,于不同时间取10 μl于37℃平皿培养18~24 h后计数菌落,并绘制时间-杀菌曲线。

1.3 培养条件对BPI合成肽杀菌活性的影响

1.3.1 pH值的影响 将培养基的pH值调整为:5、7、9,菌量为1×10⁶ cfu/ml,测定BPI合成肽对大肠杆菌 J5和绿脓杆菌 PA103的杀菌活性。

1.3.2 细菌接种量的影响 在其它条件不变情况下,改变接种菌量为:1×10³、1×10⁵、1×10⁷ cfu/ml,比较不同菌量对BPI合成肽的最低抑菌浓度(Minimal inhibition concentration MIC)的影响。

1.3.3 血清蛋白结合的影响 采用含25%、50%、75%三种血清浓度与不含血清的M-H培养基观察血清浓度对BPI合成肽杀菌活性的影响。

1.4 BPI合成肽对细菌形态的影响

培养 J5和 PA103,调整细菌浓度为1×10⁸ cfu/ml, BPI合成肽浓度为100 μg/ml,细菌分别于37℃培养5、10、15、30 min后加入等体积6%戊二醛,离心收集菌体、1%锇酸后固定,脱水,包埋,切片,菲利浦透射电镜观察并照相。

2 实验结果

2.1 BPI合成肽杀菌曲线(KCs)

BPI合成肽在与细菌作用0.5~2 h的杀菌活性最强,见图1。

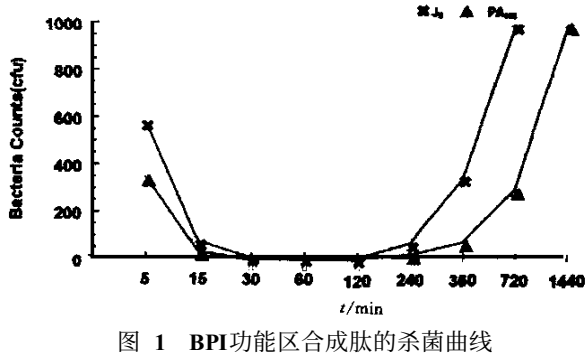


图 1 BPI功能区合成肽的杀菌曲线

Fig 1 The KCs of BPI functional fragment

* 全军"九五"指令性攻关项目, No. 96-L042
** 秦孝建,男,41岁,主管技师

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

2.2 培养条件对 BPI合成肽杀菌活性的影响

2.2.1 pH值的影响　　BPI合成肽在不同 pH值条件下的杀菌活性表现为对 J_5和 PA_{103}在酸性条件下增强,在碱性条件下则杀菌活性减弱,见图 2

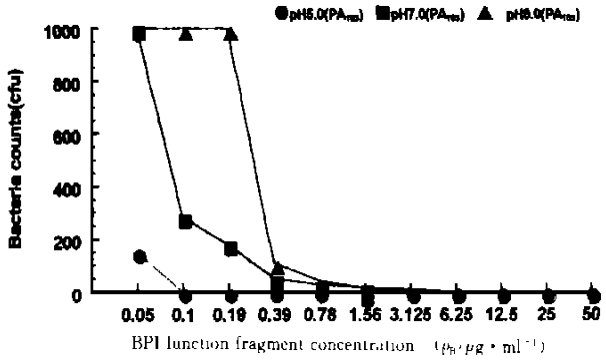


图 2　pH对 BPI功能区合成肽杀灭 PA_{103}能力的影响

Fig 2　The influence of pH on the bactericidal capability of BPI functional fragment to PA_{103}

2.2.2 细菌接种量的影响　　在 pH 7.0条件下,观察了 BPI合成肽对 J_5和 PA_{103}在 $<10^3$、$<10^5$、$<10^7$ cfu/ml三种细菌浓度下的杀菌活性,结果显示 BPI合成肽对 J_5和 PA_{103}在此三种浓度下的 MIC值分别为 0.05、3.125、6.25 μg/ml和 0.1、3.125、6.25 μg/ml,见图 3

2.2.3 血清蛋白浓度的影响　　BPI合成肽对 J_5和 PA_{103}的杀菌活性随血清浓度升高而增强,见图 4

2.3 BPI合成肽对细菌形态的影响

BPI合成肽与细菌作用 5 min,细菌胞膜即开始出现轮廓模糊,胞膜尚完整,但随着 BPI合成肽与细菌作用时间的延长,细菌形态的改变逐渐加重,至 10 min细菌胞膜开始出现不完整,但胞质成分改变不明显,至 15 min细菌的胞膜不清,胞质出现密度不均一,严重者出现空泡,30 min能见到细菌裂解。

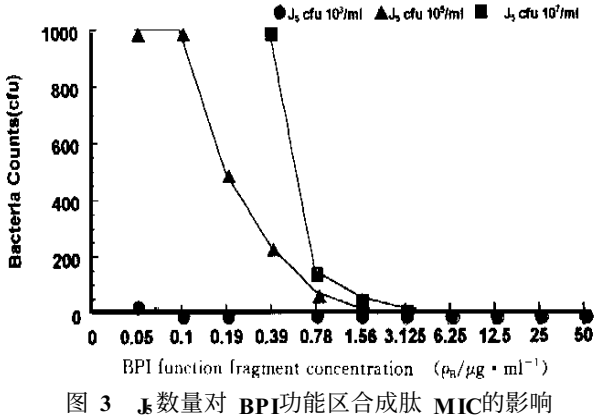


图 3　J_5数量对 BPI功能区合成肽 MIC的影响

Fig 3　The influence of the number of J_5 bacteria on the MIC of BPI functional fragment

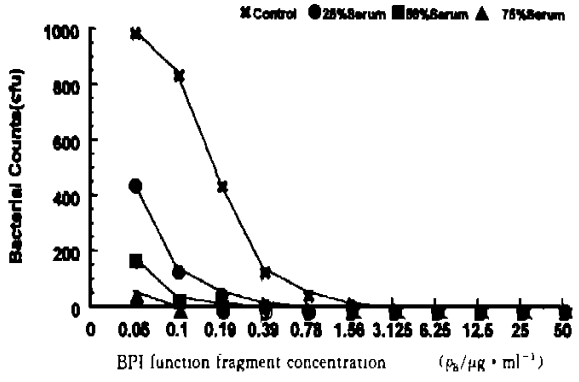


图 4　血清浓度对 BPI功能区合成肽对 J_5 MIC的影响

Fig 4　The influence of serum concentration on the MIC of BPI functional fragment to J_5

3 讨论

60年前,磺胺类和青霉素类抗菌药物的问世,为治疗各种感染性疾病提供了有效武器,使感染问题一度得到缓解。但随着大量抗菌药物的问世及使用,抗菌与细菌耐药性这一矛盾变得日趋突出。近年来,感染性疾病的发生率和死亡率仍然较高,特别是常伴有严重内毒素血症的 G^-细菌的感染。G^-菌菌血症的病死率为 20%~30%,而由菌血症发展而来的脓毒症休克其病死率可高达 50%~80%[4]。

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[5,6]。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[7]。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^-细菌感染的治疗有效[2,3]。但是 $rBPI_{23}$和 $rBPI_{21}$对 G^-细菌感染和 LPS血症的治疗,存在用量较大,成本高、价格昂贵,难以在临床推广应用的问题。各国学者均在致力于开发 BPI功能肽。

本研究结果显示,BPI合成肽对 J_5和 PA_{103}有明显的杀菌作用。本实验中所用 G^-菌均为光滑型,BPI合成肽对光滑型 G^-菌的杀菌活性与 Horwitz等[8]报道的 $rBPI_{23}$对光滑型 G^-的结果一致;而 BPI对光滑型 G^-菌的杀菌活性仅为 $rBPI_{23}$的 1/30,其原因为 $rBPI_{23}$的分子比 BPI的小,仅为 BPI的一半(BPI 56×10^3u;$rBPI_{23}$ 23×10^3u),而 BPI合成肽分子更小(1.7×10^3u),其分子量还不到 $rBPI_{23}$的 1/10,该实验结果支持较小分子的 $rBPI_{23}$比大分子的 BPI更容易克服长链脂多糖的阻挠而能与 Lipid A结合而发挥杀菌活性[9]。

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

BPI合成肽杀菌曲线试验结果发现,BPI合成肽在与细菌作用后 5 min就有杀菌作用,在 0.5~ 2 h区间的杀菌活性最强,2 h后其杀菌活性逐渐减弱。提示 BPI合成肽与细菌的结合是瞬间性的,2 h后其杀菌作用逐渐减弱,可能与 BPI合成肽本质是短肽,易被氧化、水解有关,其机制有待进一步深入探讨和研究。同时观察了 pH 菌量和血清蛋白含量对 BPI合成肽杀菌活性的影响,结果显示 BPI合成肽对 $E_{.}$ 和 PA_{103}的杀菌活性随着 pH降低、细菌接种量的减少、血清蛋白含量的增加而显著增强,反之则减弱但不显著。BPI合成肽在酸性环境条件下杀菌活性增强与 Gray等[10]报道的结果相一致,可能与 BPI和 BPI合成肽本身为带正电荷的阳离子多肽,在酸性条件下比较稳定有关。Horwitz等[8]报道,BPI对 G^- 菌的杀菌活性随着血清蛋白浓度的增加而减弱,而我们的实验结果恰好与此相反,其机制亦不很清楚,可能与 BPI合成肽和血清蛋白结合后更稳定有关。

BPI合成肽与细菌作用之后,5 min就可引起细菌外膜结构的破坏,30 min后可见细菌完全裂解,再一次证明 BPI合成肽的杀菌活性可能是通过与细菌外膜结合而发挥作用的[11]。

参考文献

1 Weiss J, Elsbach P, Olsson I, *et al*. Purification and characterization of a potent bacteria and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. J Bio Chem, 1978, 253(8): 2664

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

3 Lin Y, Leach W J, Ammons W S. Synergistic effect of a recombinant N-terminal fragment of bactericidal/permeability-increasing protein and cefamandole in treatment of rabbit gram-negative sepsis. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(1): 65

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

5 Marra M N, Thornton M B, Snable J L, *et al*. Endotoxin-binding and neutralizing properties of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein and monoclonal antibodies HA-1A and E5. Crit Care Med, 1994, 22(4): 559

6 Rogy M A, Moldawer L L, Oldenburg H S, *et al*. Anti-endotoxin therapy in primate bacteremia with HA-1A and BPI. Ann Surg, 1994, 220(1): 77

7 Weiss J, Muello K, Victor M, *et al*. Role of lipopolysaccharide in the action of the bactericidal/permeability-increasing neutrophil protein on the bacterial envelope. J Immunol, 1984, 132(4): 3109

8 Horwitz A H, Williams R, Nowakowski G, *et al*. Human lipopolysaccharide-binding protein potentiates bactericidal activity of human bactericidal/permeability-increasing protein. Infcet Immun, 1995, 61(2): 522

9 Capodici C, Chen S, Sidorczyk Z, *et al*. Effect of lipopolysaccharide (LPS) chain length on interactions of bactericidal/permeability-increasing protein and its bioactive and 23-kilodalton NH2-terminal fragment with isolated LPS and intact proteus mirabilis and Escherichia coli. Infect Immun, 1994, 60(1): 259

10 Gray B H, Haseman J R. Bactericidal activity of synthetic peptides based on the structure of the 55-kilodalton bactericidal protein from human neutrophils. Infect Immun, 1994, 60(7): 2732

11 Wiese A, Brandenburg K, Carroll S F, *et al*. Mechanisms of action of the bactericidal/permeability-increasing protein BPI on endotoxin and phospholipid monolayers and aggregates. Biochemistry, 1997, 36(33): 10301

(收稿: 1998-10-30;修回: 1999-05-14)

(编辑 汪勤俭)

Study of the bactericidal capability of BPI functional fragment *in vitro* *

Qin Xiaojian, Zheng Jiang, Yuan Jiancheng, Liu Xiaolu, Xiao Guangxia (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To observe the bactericidal activity of BPI functional fragment *in vitro*. Methods: *E coli* J5 and Pseudomonas aeruginosa PA_{103} were diluted to 1× 10^5cfu/ml and different concentrations of BPI fragment were added. The effects of pH, number of bacteria and serum concentration of protein on the bactericidal activity of BPI fragment were studied. Meanwhile, the morphological changes of the bacteria were ob-

* This project was supported by the "Ninth five" obligatory budget of PLA, No. 96-L042

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