

BPI 作为内毒素自然抑制物的作用研究

周红 郑江 袁建成 周立新 秦孝建 肖光夏

【摘要】 目的 确认杀菌性/通透性增加蛋白(bactericidal/permeability increasing protein, BPI)作为机体的自然防御武器在人中性粒细胞中的存在状态。 **方法** 检测猪源 BPI 与内毒素(lipopolysaccharide, LPS)的结合能力及其对 LPS 诱导的肝库普弗细胞分泌 TNF α 的抑制作用,并采用流式细胞仪测定 LPS 刺激后 PMNL 中 BPI 的表达情况。 **结果** 猪源 BPI 与内毒素结合能力随着 BPI 浓度的增加而增加,其抑制 LPS 诱导肝库普弗细胞分泌 TNF α 的作用呈剂量效应依赖关系。在 LPS 刺激 30 min 内, BPI 在 PMNL 表面的表达即明显增加,但并未立即释放入血。 **结论** BPI 具有强大的中和内毒素能力,在 G⁻ 杆菌感染情况下补充外源 BPI 可能是有益的。

【关键词】 杀菌性/通透性增加蛋白; 内毒素; 肿瘤坏死因子 α

A study on bactericidal/permeability increasing protein (BPI) as a natural inhibitor of endotoxin ZHOU Hong, et al. Institute of Burn Research, Southwestern Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the existential status of BPI as a natural defensive factor in human polymorphonuclear leukocytes (PMNL). **Methods** The abilities of porcine BPI to combine endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) and inhibit the release of TNF α from hepatic Kupffer's cells were examined. And the expression of BPI in PMNL after stimulation by LPS was determined by flow cytometry.

Results The ability of porcine BPI to combine LPS was increased along with the increment of BPI concentration. The effects of the BPI on the inhibition of the release of TNF α from hepatic Kupffer's cells were dose-dependant. The expression of BPI in PMNL was enhanced obviously within 30 mins of LPS stimulation. But there was no immediate release of BPI into blood. **Conclusion** BPI possessed potential power of neutralizing LPS. It might be beneficial to supplement exogenous BPI in case of Gram negative bacterial infection.

【Key words】 BPI; LPS; TNF α

革兰阴性(G⁻)杆菌感染能导致机体严重的病理改变,而作为 G⁻ 杆菌外膜中主要成分的内毒素(lipopolysaccharide, LPS),近年来认为是导致 G⁻ 杆菌脓毒症过程中最主要的介质。国外文献报道存在于人中性粒细胞的杀菌性/通透性增加蛋白(bactericidal/permeability increasing protein, BPI)是一种既能杀灭 G⁻ 杆菌、又能中和内毒素的蛋白质。为此,笔者从猪中性粒细胞中提取纯化 BPI,并对 BPI 的体内外作用进行研究,本文仅就 BPI 与 LPS 的体内外作用进行报告。

材 料 与 方 法

1. 实验材料:猪源 BPI 由本研究所制备纯化(专利公开号:1156726A),LPS O111:B4、多粘菌素 B、FMLP、胶原酶 IV 型、培养基 RPMI 1640 均为美国 Sigma 公司产品。Percoll 为 Pharmacia 公司产品。鼠抗人 BPI 单抗 4E3 为荷兰 Dentener 博士惠赠; FITC-羊抗鼠 IgG、人 TNF 酶联检测盒为军事医学

科学院产品;定量测定鲎试剂盒为上海医化所产品;所用玻璃试管经⁶⁰Co 辐射去热原。

2. 猪源 BPI 结合内毒素能力的测定:将 LPS 1 Eu(1 Eu = 100 pg)加入梯度稀释的 BPI 玻璃管中,37℃ 15 min 后,测定内毒素含量。

3. 猪源 BPI 对 LPS 诱导的肝库普弗细胞分泌 TNF α 抑制作用的测定:从正常 Wistar 大鼠中分离纯化肝库普弗细胞,用含体积分数为 10% 自身灭活血清 RPMI 1640 培养基调整细胞终浓度至每孔 1×10^5 ,放入 24 孔细胞培养板中,随即加入 LPS 刺激肝库普弗细胞 30 min,再加入 BPI,置 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h,取细胞上清液测定 TNF α 含量。

4. LPS 刺激后人中性粒细胞表面 BPI 表达及释放 BPI 含量的检测:采用 Percoll 梯度液(下层比重为 1.080,上层为 1.060)分离正常人血中性粒细胞(polymorphonuclear leukocytes, PMNL),吉姆萨染色后镜检确认,PMNL 的比例大于 90%,台盼蓝排斥试验结果 90% 以上为活细胞。

将上述 PMNL 用等渗盐水调整细胞浓度为 10^6 /ml,取 1ml PMNL 混悬液加入已灭菌去热原的

基金项目:全军九五攻关课题资助(96L042)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究

所

试管中,每管分别加入 LPS O111:B4 10 ng/ml、100 ng/ml 和 FMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, FMLP) 10⁻⁷ mol/L 刺激 PMNL, 37℃ 水浴摇床温柔振荡 30 min, 加入鼠抗人 BPI 单克隆抗体 4E3 (1.7 mg/ml) 适量, 冰浴中固定 30 min, 向该细胞混悬液加入 FITC-羊抗鼠 IgG 单克隆抗体, 适量冰浴 30 min, Beckon Dickinson 流式细胞仪测定 FITC 标记的 PMNL 数量, 并采用 ELISA 法检测培养液中 BPI 的含量。

5. 统计方法: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验进行均数比较。

结 果

1. 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, 结果表明猪源 BPI 具有强大的结合 LPS 的能力, 结合力随浓度的增加而增加 (图 1)。

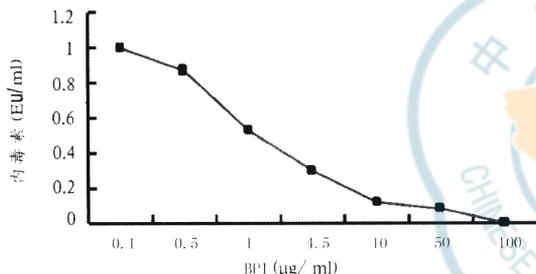


图 1 猪源 BPI 结合 LPS O111:B4 的能力测定
Fig 1 Determining of the ability of porcine BPI combining LPS O111:B4

2. 猪源 BPI 抑制 LPS 诱导的 TNF α 分泌: 猪源 BPI 不仅具有强大的结合内毒素能力, 而且具有中和内毒素的能力。本实验选择 TNF α 作为测定指标, 观察大白鼠肝库普弗细胞对 LPS 的反应情况, 以及 BPI 对这种反应的抑制程度, 结果表明猪源 BPI 能特异阻断 LPS 诱导的 TNF α 分泌, 并呈剂量效应依赖关系 (表 1)。

表 1 猪源 BPI 抑制 LPS 诱导的 TNF α 释放 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 TNF- α releasing induced by LPS was inhibited by porcine BPI ($\bar{x} \pm s$)

LPS (ng/ml)	对照	多粘菌素 B (mg/ml)		猪源 BPI (mg/ml)	
		1	2	0.1	0.4
1000	910 \pm 20	563 \pm 78	502 \pm 60	556 \pm 82	520 \pm 43
100	630 \pm 70	101 \pm 45	89 \pm 38	125 \pm 27	77 \pm 36
10	51 \pm 69	21 \pm 1.5	0	0	0

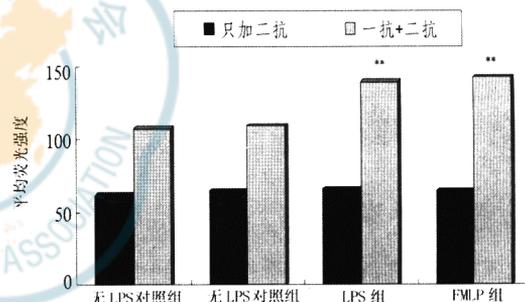
多粘菌素 B 具有部分中和内毒素的作用, BPI 可在比多粘菌素 B 浓度低 5 ~ 10 倍的情况下, 发挥类似多粘菌素 B 的阻断 TNF α 分泌的作用, 提示 BPI 有比多粘菌素 B 更强大的中和内毒素的能力。

3. LPS、FMLP 刺激后人 PMNL 表面 BPI 表达及释放程度的检测: 用 100 ng/ml 的 LPS O111:B4 和 10⁻⁷ mol/L FMLP 刺激后, 人 PMNL 表面 BPI 的表达增加明显 (*P* < 0.01), 而 10 ng/ml 的 LPS O111:B4 诱导的 BPI 表达则无明显增加。对 LPS 刺激后 PMNL 培养液进行的 BPI 测定表明, 尽管 PMNL 表面 BPI 表达增加, 但短时间内并未释放出来, 提示在体情况下 BPI 的作用部位早期可能局限在 PMNL 膜表面 (表 2、图 2)。

表 2 LPS、FMLP 刺激后人 PMNL 表面 BPI 释放程度 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Extracellular release of BPI from human neutrophils after being stimulated by FMLP and LPS ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	BPI 释放量 (ng/ml)
对照组	3	0.51 \pm 0.23
FMLP (10 ⁻⁷ mol/ml) 组	3	0.89 \pm 0.19
LPS (10 ng/ml) 组	3	0.60 \pm 0.18
LPS (100 ng/ml) 组	3	0.85 \pm 0.27



注: 与对照组比较, ***P* < 0.01

图 2 人中性粒细胞表面 BPI 表达情况 (n = 3)

Fig 2 Expression of BPI on the surface of stimulated human PMNL (n = 3)

讨 论

LPS 作为 G⁻ 杆菌外膜上最主要的成分, 由 O 特异链、核心多糖和类脂 A 3 部分组成, 而类脂 A 是其生物活性所在。LPS 能激活单核-吞噬细胞系统释放一系列炎症因子 (TNF α 、IL-1、IL-6 等), 被认为是引起全身炎症反应综合征中最主要的启动子^[1], 因此能够与内毒素结合并消除内毒素和具有生物活性的 BPI, 在临床上有着广泛的应用前景。

据文献报道, BPI 储存在 PMNL 嗜天青颗粒中, 能与多种 G⁻ 杆菌的 LPS 结合, 具有杀灭 G⁻ 杆菌及中和内毒素的作用, 是一种天然的 LPS 抑制物^[2]。笔者的研究结果也证实 BPI 不仅能与内毒素结合, 而且在体外肝库普弗细胞培养中, 能够抑制 LPS 诱导的 TNF α 分泌。

作为游离状态的 BPI 具有强大的杀菌作用及中和内毒素能力, 但在静息 PMNL 中, BPI 却储存在

嗜天青颗粒中。BPI 是一种膜蛋白,其带正电荷的 N - 末端在嗜天青颗粒中部,而疏水性的 C - 末端与膜相联^[3]。在外界刺激因子的作用下,PMNL 中的 BPI 将如何作出反应?·笔者选择 LPS O111: B4 和 FMLP 作为 PMNL 刺激物,观察 BPI 在 PMNL 细胞膜表面的表达及释放情况。结果提示刺激物刺激肝库普弗细胞 30 min 内,PMNL 表面 BPI 表达明显增加,但 BPI 并未立即释放入血,这与 Dentener 等^[4]报道的结果不同,但与 Marra 等^[5]的结果一致,也与 white 等^[6]对正常志愿者和患者血液中 BPI 浓度无差别的检测结果相吻合。说明 BPI 的功能及作用范围早期可能局限在 PMNL 内及其表面,但随着时间的延长 BPI 将释放入血。BPI 在机体内的存在状态及其在 PMNL 表面的功能有待进一步研究,但鉴于游离 BPI 所具有的杀菌及中和内毒素的能力,在 G⁻杆菌感染情况下,有必要考虑补充外源性 BPI。

参 考 文 献

- 1 Martich GD, Boujoukos AJ, Suffredini AF. Response of man to endotoxin. *Immunobiology*, 1993, 187: 403 - 416.
- 2 Mannion BA, Kalatzis ES, Weiss J, et al. Preferential binding of the neutrophil granule derived bactericidal/permeability increasing protein to target bacteria. *J. Immunol*, 1989, 142: 2807 - 2812.
- 3 Egesten A, Breton Gorius J, Guichard J, et al. The heterogeneity of azurophil granules in neutrophil promyelocytes: immunogold localization of myeloperoxidase, cathepsin G, elastase, proteinase 3, and bactericidal/permeability increasing protein. *Blood*, 1994, 83: 2985 - 2994.
- 4 Dentener MA, Francot GJ, Buurman WA, et al. Bactericidal/permeability - increasing protein, a lipopolysaccharide - specific protein on the surface of human peripheral blood monocytes. *J Infect Dis*, 1996, 173: 252 - 255.
- 5 Marra MN, Wilde CG, Collins MS, et al. The role of bactericidal/permeability increasing protein as a natural inhibitor of bacterial endotoxin. *J. Immunol*, 1992, 148: 532 - 537.
- 6 White ML, Ma JK, Birr CA, et al. 1994. Measurement of bactericidal/permeability - increasing protein in human body fluids by sandwich ELISA. *J Immunol Methods*, 1994, 167: 227 - 235.

(收稿日期:2000 - 05 - 10)

(编辑:王 旭)

· 消息 ·

《中华急诊医学杂志》出刊启事

经国家科技部和新闻出版署批准,创刊于 1990 年《急诊医学》杂志已于 2000 年起更名为《中华急诊医学杂志》,由中国科技协会主管、中华医学会主办、浙江大学承办。《中华急诊医学杂志》是高级急诊医学专业刊物,刊登与急诊有关的基础医学科研和临床科研成果、临床诊治经验和 技术方面的文章。设有专论、论著、临床研究、综述、讲座、经验交流、院前急救、急诊护理、病例讨论、学科建设、病例报告、继续教育园地等栏目,及时报道我国急诊医学最新进展及学会相关信息,内容丰富,信息量大,充分体现了现代急诊医学的特点。《中华急诊医学杂志》为双月刊,大 16 开,72 页,逢双月 25 日出刊。定价每期 4.50 元,全年 27.00 元,全国各邮局订购,邮发代号 32 - 41。编辑部常年办理邮购,汇款到即寄杂志。请写清楚订阅者姓名、详细通讯地址、订阅期号及份数。本刊编辑部地址:浙江省杭州市解放路 88 号,《中华急诊医学杂志》编辑部,邮编:310009,电话:0571 - 7783951,传真:0571 - 7228649,电子信箱:jzyx@mail.hz.zj.cn。

招聘启事

北京积水潭医院烧伤科是具有 40 余年历史,在国内外享有声誉的北京市卫生系统重点学科,因工作发展需要,现面向全国招聘从事烧伤及有关学科实验、临床研究,具有博士或博士后学历的专门人才 2 名。应聘者请将简历寄:北京积水潭医院烧伤科沈祖尧主任或北京积水潭医院人事处黄春媚处长。邮编:100035, E - Mail: shenzuyao@sina.com.cn, 传真:(010) 66183542。