

· 论著 ·

# 阳离子多肽 MP-1 拮抗内毒素/脂多糖活性的实验研究

郭毅斌 郑江 吕根法 卫国 王良喜 肖光夏

**【摘要】** 目的 探讨阳离子多肽 MP-1 对内毒素/脂多糖(LPS)攻击小鼠的作用及机制。方法 将 30 只昆明小鼠随机分为 MP-1 组(尾静脉注射 3 mg/kg MP-1)、致伤组(尾静脉注射 20 mg/kg LPS)、保护组(先注射 20 mg/kg LPS, 20 s 内再注射 3 mg/kg MP-1), 每组 10 只。观察 3 组小鼠注射后 3 d 内的存活情况。应用生物传感器及 FASTfit 作图, 比较 MP-1、多黏菌素(PMB)与 LPS 的亲合力, 以 Kd 值表示。通过动态比浊法和鲎试验定量, 比较 5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  MP-1、PMB 对 2  $\mu\text{g/L}$  LPS 的中和作用, 以 LPS 中和 0  $\mu\text{mol/L}$  MP-1、PMB 为对照。采用逆转录聚合酶链反应法, 观察 MP-1 对 LPS 刺激的 10 只昆明小鼠腹腔巨噬细胞(PM $\phi$ ) Toll 样受体 4(TLR4) mRNA、肿瘤坏死因子(TNF) $\alpha$  mRNA、白细胞介素(IL)6 mRNA 表达的影响。结果 致伤组小鼠注射 LPS 后 48 h 全部死亡。保护组小鼠精神状态一度萎靡但恢复较快, 食欲、活动度在短时间内改善, 存活率为 90%。MP-1 组小鼠存活率为 100%。MP-1 对 LPS 具有高亲合力(Kd 值为 484.0 nmol/L)但弱于对 LPS 有极高亲和力的 PMB (Kd 值为 18.9 nmol/L)。MP-1 具有中和 LPS 的能力但弱于 PMB; 20、40  $\mu\text{mol/L}$  MP-1 中和 LPS 的能力明显高于 0  $\mu\text{mol/L}$  MP-1 ( $P < 0.01$ )。MP-1 对 LPS 刺激的小鼠 PM $\phi$  TLR4 mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA 和 IL-6 mRNA 的表达均有显著的抑制作用。结论 MP-1 对 LPS 攻击的小鼠有显著的保护作用, 其机制可能与 MP-1 对 LPS 具有亲合力及中和作用, 阻断了 LPS 与其受体的结合, 从而抑制了 LPS 介导的 PM $\phi$  活化有关。

**【关键词】** 内毒素类; 脓毒症; 巨噬细胞; 阳离子多肽

**Experimental study on the antagonistic activity of cationic multi-peptide mastoparan-1 against lipopolysaccharide** GUO Yi-bin\*, ZHENG Jiang, LV Gen-fa, WEI Guo, WANG Liang-xi, XIAO Guang-xia. \*General Experimental Research Center, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

Corresponding author: ZHENG Jiang, Email: Zhengj@mail.tmmu.com.cn, Tel: 023-68754435

**【Abstract】** Objective To explore the mechanism of cationic multi-peptide mastoparan-1 (MP-1) on the protection of mice from lipopolysaccharide (LPS) challenge. Methods Thirty Kunming mice were divided randomly into MP-1, injury, protection groups with 10 mice in each group. The mice in MP-1 group were injected with 3 mg/kg MP-1 by tail vein, while those in injury group were injected with 20 mg/kg LPS by tail vein, and those in protection group 3 mg/kg MP-1 within 20 seconds after 20 mg/kg LPS injection were injected. The effects of MP-1 on the protection of mice from LPS challenge were observed. In vitro, the affinity of MP-1 and PMB to LPS was compared by biosensor and FAST fit construct and expressed as Kd. And the neutralizing activity of MP-1 and PMB in dose of 5, 10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$  on LPS (2  $\mu\text{g/L}$ ) was detected by dynamic turbidimetric limulus test with LPS neutralizing 0  $\mu\text{mol/L}$  MP-1 and PMB as control. The mRNA expression levels of TLR4, TNF- $\alpha$  and IL-6 in murine peritoneal macrophages (PM $\phi$ ) after exposure to LPS (100 ng/ml) were assayed by RT-PCR. Results MP-1 could significantly protect mice from LPS challenging with protection rate of 90%. In vitro, MP-1 had a high affinity (Kd value: 484.0 nmol/L) and neutralizing ability with LPS, but it was lower than that of PMB (Kd value: 18.9 nmol/L). The neutralizing effect of 20 and 40  $\mu\text{mol/L}$  MP-1 was obviously stronger than that in 0  $\mu\text{mol/L}$  ( $P < 0.01$ ). MP could obviously inhibit the expression of TLR4, TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA in LPS-stimulated murine PM $\phi$ . Conclusion MP-1 can evidently protect mice from lethal LPS challenge, and the mechanism might be related to the activity of MP-1 which binding and neutralizing LPS, blocking the combination LPS with its receptors. So the murine macrophage activation induced by LPS was inhibited.

**【Key words】** Endotoxins; Sepsis; Macrophages; Cationic peptide

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(G1999054203)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院综合实验研究中心(郭毅斌、郑江、吕根法、卫国),全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(肖光夏);第三军医大学药理学教研室(王良喜)

通信(讯)作者:郑江, Email: Zhengj@mail.tmmu.com.cn, 电话: 023-68754435

脓毒症是现代医学面临的棘手问题,易发展为脓毒性休克和多器官功能障碍综合征(MODS)。内毒素/脂多糖(LPS)是革兰阴性( $G^-$ )菌外膜的主要成分,已证实它是介导脓毒症最主要的病原分子之一<sup>[1]</sup>。MP多肽来源于昆虫,由十余个氨基酸组成的一类阳离子多肽,具有广泛的生物学活性。国外研究证实,MP多肽可激活Go/G蛋白、抑制 $Na^+/K^+$ -腺苷三磷酸(ATP)酶和 $Ca^{2+}$ -ATP酶活性,对细菌的外膜具有穿膜作用<sup>[2]</sup>。有关MP多肽在全身炎症反应综合征(SIRS)和脓毒症中的作用,国内外鲜见报道。笔者单位通过固相化学合成法合成了7种天然的MP多肽,通过初步的拮抗脓毒症动物实验,筛选出阳离子多肽MP-1。本实验测定MP-1与LPS结合的亲和力及中和作用,以及它对LPS刺激的小鼠腹腔巨噬细胞(PM $\phi$ )Toll样受体4(TLR4)mRNA、肿瘤坏死因子(TNF) $\alpha$  mRNA和白细胞介素(IL)6 mRNA表达的影响,探讨MP-1对LPS攻击小鼠的作用及机制。

## 材 料 与 方 法

### 一、主要试剂和仪器

MP-1(纯度98.5%)由深圳翰宇生物工程有限公司合成;LPS O55: B5(酸抽提法,批号31K4120)、多黏菌素B(PMB,批号41k15415)购自美国Sigma公司;鲎试剂购自湛江安度斯生物工程公司;PCR引物购自上海博亚生物技术有限公司。生物传感器及其疏水样品池购自美国Thermo公司;凝胶成像仪购自美国Bio-Rad公司;EDS-99细菌LPS测定系统购自湛江正杰科学仪器有限公司。

### 二、检测方法

1. MP-1对LPS攻击小鼠的保护实验:30只昆明小鼠,体重18~25g,雌雄不拘,由重庆医科大学实验动物中心提供。将小鼠随机分为MP-1组、致伤组和保护组,每组10只。MP-1组和致伤组小鼠分别经尾静脉注射3mg/kg MP-1、20mg/kg LPS;保护组小鼠在注射20mg/kg LPS后20s内注射3mg/kg MP-1。以上注射总量为200 $\mu$ l/20g。观察3组小鼠注射后3d内的存活情况。

2. MP-1与LPS的亲和力测定:采用疏水样品池的包被流程,参照郑江等<sup>[3]</sup>的方法将LPS包被于疏水样品池中。利用生物传感器以750.00、375.00、187.50、93.75、46.90nmol/L的MP-1及65.00、32.50、16.25、8.13、4.06nmol/L的PMB为流动相,与疏水样品池中的LPS结合,并通过FASTfit作图,

测定MP-1、PMB与LPS的亲和力,以Kd值表示结果。

3. MP-1体外中和LPS能力测定:将相同终浓度的MP-1和PMB(5、10、20、40 $\mu$ mol/L)分别与2 $\mu$ g/L LPS置37 $^{\circ}$ C孵育30min后,采用动态浊度法鲎试剂检测孵育后的LPS值;以等量无热原水孵育(MP-1、PMB为0 $\mu$ mol/L)为对照。将各浓度MP-1、PMB条件下所测得的LPS值与0 $\mu$ mol/L MP-1、PMB条件下的测定值相比,得出该浓度的LPS检出率,每个浓度重复检测4次。具体操作按EDS-99细菌LPS测定系统说明书进行。

4. 小鼠PM $\phi$  TLR4 mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA和IL-6 mRNA表达的检测:另取10只昆明小鼠(体重、来源等情况同前),参照Parsonnet等<sup>[4]</sup>的方法分离纯化其PM $\phi$ ,置于6孔细胞培养板中,每孔 $3 \times 10^6$ 个细胞。将PM $\phi$ 与0、10、20、40 $\mu$ mol/L MP-1预先孵育2h后,加入终浓度100 $\mu$ g/L LPS继续孵育4h,提取PM $\phi$ 总RNA。每个样本各取2 $\mu$ g总RNA进行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。内参照 $\beta$ 肌动蛋白:上游引物5'-CCCTGTATGCCTCTGGTC-3',下游引物5'-GTCTTTACGGATGTCAACG-3',长度为455bp;TLR4:上游引物5'-TTTATTCAGAGCCGTTGG-3',下游引物5'-AGTTGCCGTTTCTTGTTTC-3',长度为285bp;TNF- $\alpha$ :上游引物5'-TTCTGTCCCTTTCCTACTGACTGG-3',下游引物5'-TTGGTGTTTGCTACGACGTGG-3',长度为349bp;IL-6:上游引物5'-GAGGAGACTTCACAGAGGATAC-3',下游引物5'-GACTCTGGCTTTGTCTTTCTTG-3',长度为329bp。扩增反应总体积25 $\mu$ l,条件:94 $^{\circ}$ C变性30s,51 $^{\circ}$ C(检测TNF- $\alpha$  mRNA、IL-6 mRNA时为55 $^{\circ}$ C)复性30s,72 $^{\circ}$ C延伸40s。取7 $\mu$ l PCR反应产物经15g/L琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,用凝胶成像仪于紫外线下观察结果并照相。

### 三、统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件进行t检验和 $\chi^2$ 检验。

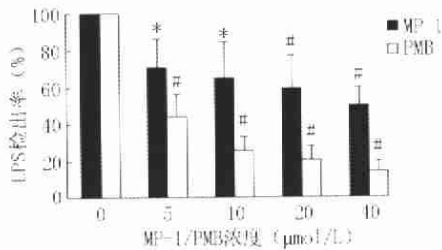
## 结 果

1. 致伤组小鼠在注射后48h内全部死亡,保护组小鼠存活率达90%,MP-1组存活率为100%。保护组小鼠精神状态一度萎靡但恢复较快,食欲、活动度及对外界刺激的反应性在较短时间内改善明显。

2. MP-1与LPS结合的Kd值为484.0nmol/L,而PMB与LPS结合的Kd值为18.9nmol/L。随着PMB、MP-1的浓度升高,其与LPS的结合能力逐渐增强。

3. MP-1具有中和LPS的能力,但中和作用弱于

PMB, 在 40  $\mu\text{mol/L}$  时约为 PMB 的一半。5  $\mu\text{mol/L}$  MP-1 对 LPS 的中和作用明显高于 0  $\mu\text{mol/L}$  MP-1 ( $P < 0.05$ ), 在 20, 40  $\mu\text{mol/L}$  时其中和作用非常显著 ( $P < 0.01$ )。见图 1。

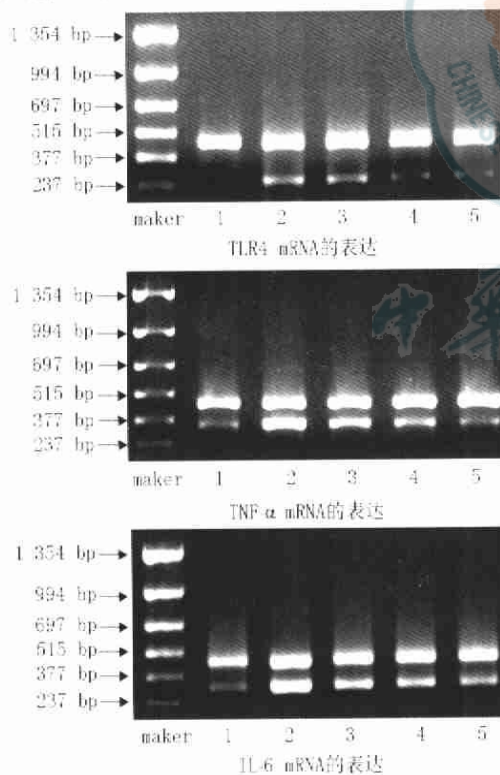


注:与 0  $\mu\text{mol/L}$  MP-1、PMB 比较, \*  $P < 0.05$ , #  $P < 0.01$

图 1 MP-1 与 PMB 中和 LPS 的能力

Fig 1 The comparison of activity of MP-1 and PMB neutralizing LPS

4. MP-1 对 LPS 刺激小鼠 PM $\phi$  的 TLR4 mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA、IL-6 mRNA 的表达有明显的抑制作用, 尤其对 TNF- $\alpha$  mRNA 表达呈显著的剂量-效应关系。见图 2。



注:1. 0  $\mu\text{g/L}$  LPS 刺激 0  $\mu\text{mol/L}$  MP-1; 2. 100  $\mu\text{g/L}$  LPS 刺激 0  $\mu\text{mol/L}$  MP-1; 3. 100  $\mu\text{g/L}$  LPS 刺激 10  $\mu\text{mol/L}$  MP-1; 4. 100  $\mu\text{g/L}$  LPS 刺激 20  $\mu\text{mol/L}$  MP-1; 5. 100  $\mu\text{g/L}$  LPS 刺激 40  $\mu\text{mol/L}$  MP-1

图 2 MP-1 对 LPS 刺激小鼠 PM $\phi$  TLR4 mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA 和 IL-6 mRNA 表达的影响

Fig 2 The influence of MP-1 on mRNA expression of TLR4, TNF- $\alpha$  and IL-6 in LPS-stimulated PM $\phi$

### 讨 论

脓毒症是严重烧伤(创)伤、休克及感染性疾病的

常见并发症, 是临床危重患者死亡的重要原因。国外的一项流行病学调查表明, 脓毒症的死亡率约为 30% ~ 40%, 病情严重时可高达 50% 以上<sup>[5]</sup>。LPS 通过与单核巨噬细胞膜上的受体 CD14 结合, 进而与受体 TLR4 结合将信号转入胞内, 导致细胞活化、释放各种炎症介质(如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 和 IL-6 等), 产生致死性的生物学效应, 是 LPS 介导脓毒症的主要机制<sup>[1]</sup>。

MP 多肽来源于昆虫, 由于昆虫种属的差异, MP 多肽的结构各不相同。目前国内对 MP 多肽的研究多集中在其作用于 G 蛋白和改变细胞内外  $\text{Ca}^{2+}$  的分布, 具有扩张血管、促进胰岛素分泌和促肾上腺皮质激素的释放等功能方面<sup>[6,7]</sup>。

本研究表明, MP-1 对脓毒症小鼠有明显的保护作用。由于 MP-1 分子结构中大约 60% 的氨基酸为疏水性氨基酸, 且富含赖氨酸使其带正电荷。LPS 分子是由类脂 A、核心多糖和 O 特异多糖链 3 部分共价连接而成, 其中类脂 A 是 LPS 的活性中心, 在分子结构中极为保守, 因含有多个磷酸基团而带负电荷, 磷酸基团是 LPS 与受体结合的关键。由此推测, MP-1 可能通过正、负电荷的相互吸引与 LPS 分子发生作用。

本研究应用生物传感器检测到 MP-1 与 LPS 结合的 Kd 值为 484.0 nmol/L, 与对 LPS 具有极高亲和力的 PMB(18.9 nmol/L) 比较, 同样具有高亲和力, 分析原因可能与二者之间的静电作用有关。动态浊度法实验表明 MP-1 与 LPS 的结合作用是一种中和作用。由于 LPS 分子中负电荷的数量、位置与其分子的空间构象和活性密切相关, MP-1 可能通过静电作用与类脂 A 所带负电基团结合, 改变了 LPS 分子的阴离子特性, 从而影响了 LPS 的构象, 使之丧失了与受体结合的能力。

笔者又通过 RT-PCR 观察到, MP-1 对 LPS 攻击小鼠 PM $\phi$  TLR4 mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA 和 IL-6 mRNA 的表达均有显著的抑制作用, 其中对 TNF- $\alpha$  mRNA 的抑制呈现出剂量-效应关系。进一步证实 MP-1 与 LPS 的结合, 可能阻断了 LPS 与受体的结合, 抑制了 LPS 对巨噬细胞的活化作用。这可能是 MP-1 对脓毒症小鼠具有保护作用的机制之一。此外, Solomon 等<sup>[8]</sup>认为 G 蛋白与膜受体 CD14 之间可能存在某种功能上的关联, 从而影响 LPS 介导的细胞活化。而天然 MP 多肽可激活 G 蛋白, 因此, 不排除 MP-1 可能还存在着其他抑制 LPS 介导的细胞活化的机制。

参 考 文 献

1 Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 2002, 420: 885-891.

2 Suh BC, Song SK, Kim YK, et al. Induction of cytosolic  $Ca^{2+}$  elevation mediated by Mas-7 occurs through membrane pore formation. *J Biol Chem*, 1996, 271: 32753-32759.

3 郑江, 龚小云, 吕根法, 等. 杀菌性/通透性增加蛋白模拟肽与 LPS/LipidA 的亲合力测定. *解放军医学杂志*, 2003, 3: 197-199.

4 Parsomnet J, Gillis ZA. Production of tumor necrosis factor by human monocytes in response to toxic-shock-syndrome toxin-1. *J Infect Dis*, 1988, 158: 1026-1033.

5 Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States; analysis of incidence, outcome, and

associated costs of care. *Crit Care Med*, 2001, 29: 1303-1310.

6 Daniel S, Nola M, Cerione R, et al. A link between Cdc42 and syntaxin is involved in mastoparan-stimulated insulin release. *Biochemistry*, 2002, 41: 9663-9671.

7 Wilson ML, Guild SB. A direct inhibitory action of prostaglandins upon ACTH secretion at the late stages of the secretory pathway of AtT-20 cells. *Br J Pharmacol*, 2002, 135: 1851-1858.

8 Solomon KR, Kurt-Jones EA, Saladino RA, et al. Heterotrimeric G proteins physically associated with the lipopolysaccharide receptor CD14 modulate both in vivo and in vitro responses to lipopolysaccharide. *J Clin Invest*, 1998, 102: 2019-2027.

(收稿日期: 2003-10-10)

(本文编辑: 莫 愚)

· 经验交流 ·

### 小腿和足背岛状皮瓣接力修复足远端高压电烧伤创面 13 例

薛晓东 邓津菊 刘建云 孙亚东 司小强 杨国虎

1999 年 8 月—2003 年 12 月, 笔者单位对收治的 13 例患者足远端高压电深度烧伤创面, 用转移带蒂逆行足背动脉岛状皮瓣进行修复, 其供瓣区创面再转移小腿隐神经营养血管岛状皮瓣接力修复, 术后患者足部功能及外形恢复均满意。

**临床资料:** 本组患者男 12 例, 女 1 例, 年龄 17~44 岁, 平均 27 岁。电烧伤创面均位于单足远端, 以第 1~3 趾为主。创面大小 (3 cm × 4 cm) ~ (11 cm × 12 cm), 累及肌腱、骨和关节, 部分患者足趾坏死。

**手术方法:** (1) 切除坏死组织, 包括坏死肌腱和骨。距趾关节坏死者行关节融合, 足趾坏死者行截趾或关节离断。(2) 设计和切取皮瓣: 逆行足背动脉岛状皮瓣以第 1 跖骨间隙近段足底深支从足背动脉的发出处为旋转轴点, 以足背动脉体表投影线为轴线。根据创面大小及形状设计皮瓣, 应略大于创面, 沿足跖骨浅面和肌腱表面切取后旋转修复足远端创面。按 Cavadas<sup>[1]</sup> 报道的方法, 以小腿内侧内踝后上缘 5~7 cm 处为旋转轴点, 太隐静脉走向为轴线, 设计和切取略大于足背继发创面的隐神经皮瓣, 皮瓣蒂宽约 3~4 cm。通过明道旋转覆盖足背继发创面, 小腿供瓣区创面移植皮片进行封闭或直接拉拢缝合。

**结果:** 13 例患者足远端创面覆盖的逆行足背动脉岛状皮瓣均成活, 其足背供瓣区覆盖的隐神经营养血管岛状皮瓣成活 11 例 (图 1~5), 距 2 例皮瓣远端或边缘约 0.5~1.5 cm 范围

发生感染或因静脉回流障碍坏死, 经换药愈合。本组中 8 例患者经 1 年以上随访, 外形和功能恢复均满意。

**讨论:** 足远端高压电烧伤创面常为电流出口, 多伴有肌腱、骨和关节的暴露或部分坏死, 只有通过皮瓣转移才能有效地修复, 但目前修复方法较少<sup>[2]</sup> 或有一定不足<sup>[3,4]</sup>。自从 Cavadas<sup>[1]</sup> 报道了隐神经营养血管岛状皮瓣的临床应用后, 笔者即设想用该皮瓣转移修复切取逆行足背动脉岛状皮瓣后的供瓣区继发创面。逆行足背动脉岛状皮瓣的供血动脉为足底深支, 皮瓣血供丰富, 抗感染能力强, 是修复足远端深度创面的良好选择。由于切取后供瓣区遗留肌腱和骨暴露, 无法单独应用, 而用隐神经营养血管岛状皮瓣转移覆盖其切取后的足背部创面, 外形及功能恢复较好, 使逆行足背动脉岛状皮瓣修复足远端深度缺损成为现实。该修复方法操作简单, 效果好, 易于推广。

参 考 文 献

1 Cavadas PC. Reversed saphenous neurocutaneous island flap: clinical experience. *Plast Reconstr Surg*, 1997, 99: 1940-1946.

2 刘帅明, 李津军, 丁宝财, 等. 肩胛游离皮瓣修复足部电烧伤创面五例. *中华烧伤杂志*, 2003, 19: 380.

3 陈国华, 忻向荣, 李梅. 足内侧血管神经蒂岛状皮瓣修复足部电损伤缺损九例. *中华烧伤杂志*, 2003, 19: 41.

4 周嘉顺, 陈长方, 袁良忠, 等. 隐神经营养血管逆行岛状皮瓣修复踝、足部软组织缺损 12 例. *中华创伤杂志*, 2001, 17: 52.



图 1 患者高压电烧伤“出口”创面第 2 趾坏死, 拇趾跖趾关节外露



图 2 截趾清创后设计逆行足背动脉岛状皮瓣



图 3 足背皮瓣覆盖创面后, 设计小腿内侧隐神经营养血管岛状皮瓣拟覆盖继发创面



图 4 小腿内侧皮瓣覆盖继发创面后供皮区移植中厚皮片



图 5 术后 2 周, 皮瓣全部成活

(收稿日期: 2004-01-30)

(本文编辑: 赵 敏)

作者单位: 730000 兰州, 甘肃省人民医院烧伤整形科