

重组人 N 末端脂多糖结合蛋白对脂多糖致伤小鼠保护作用的初步研究

王晓东 刘友生 葛晓冬 李艳秋 陈杰

【摘要】 目的 初步观察重组人 N 末端脂多糖结合蛋白(tLBP)对细菌脂多糖(LPS)致伤小鼠的保护效应。方法 选用雄性昆明小鼠 70 只,随机分为致伤组 1(21 只):腹腔内注射 LPS 100 ng;保护组 1(21 只):腹腔内注射 100 ng LPS + 40 mg tLBP;对照组(8 只):腹腔内注射等渗盐水。于注射后 15、30 min 及 1、3、6、12、24 h 测定 3 组动物血清丙氨酸转氨酶(ALT)及肿瘤坏死因子 α(TNF-α)的含量,并观察其肝、肺组织的病理学改变。另设致伤组 2 及保护组 2 各 10 只,分别腹腔内注射 LPS 400 ng 及 400 ng LPS + 40 mg tLBP,观察伤后 24 h 内动物的死亡数。结果 保护组 1 与致伤组 1 血清 ALT 含量分别于伤后 12、6 h 到达峰值,各为(41.00 ± 4.58)、(99.50 ± 62.63) U/L,前者的升高幅度显著低于后者(P < 0.01);两组血清 TNF-α 含量均于伤后 3 h 到达峰值,各为(35.96 ± 7.33)、(42.49 ± 4.79) fmol/ml,保护组 1 的升高幅度低于致伤组 1。与致伤组 1 比较,保护组 1 肝细胞变性程度明显减轻,未见肝细胞散在坏死病变;肺组织充血有不同程度减轻,肺泡腔内、支气管内炎性渗出明显减弱。致伤组 2 伤后 24 h 死亡 9 只,保护组 2 死亡 3 只。结论 初步认为重组人 tLBP 具有一定的生物学活性,对 LPS 致伤小鼠具有一定保护作用。

【关键词】 载体蛋白质类; 脂多糖类; 肿瘤坏死因子

Study on the protective effect of recombinant human N-terminal lipopolysaccharide binding protein in mice challenged with LPS WANG Xiao-dong, LIU You-sheng, GE Xiao-dong, LI Yan-qiu, CHEN Jie. Institute of Pathology, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of recombinant human N-terminal lipopolysaccharide binding protein in mice challenged with LPS. Methods Seventy male Kunming mice were randomly divided into 3 groups, i. e. LPS challenge (Injection of LPS into abdominal cavity, n = 21); tLBP protection (Injection of LPS and tLBP into abdominal cavity, n = 21) and control (Injection of normal saline into abdominal cavity, n = 8) groups. The blood samples and tissue samples of the liver and lungs were harvested on 15 and 30 minutes and 1, 3, 6, 12 and 24 hours after the injection. The serum contents of ALT and TNF-α were determined by biochemical velocity analysis and RIA method, respectively. The pathomorphological changes in the liver and pulmonary tissue were examined under light microscope(LM). The mortality rate of ten mice each was observed within 24 hours after the injection of tLBP + 400ng LPS or 400ng LPS. Results The ALT content of tLBP group reached the peak level at 12 post-injection hour (PIH) (41.00 ± 4.58), but it was significantly lower than that in LPS group in which it peaked at 6PIH(99.50 ± 62.63) (P < 0.01). The TNF-α content in tLBP and LPS group was lower than that in LPS group, and both reached the peak level at 3 PIH(35.96 ± 7.33). Compared with those in LPS, injury to hepatocytes in tLBP group was obviously milder without scattered necrosis. The pulmonary congestion in tLBP group was abated, and the inflammatory exudation in the alveoli was evidently less than that in LPS group. There were 9 out of 10 mice died in the LPS challenge group, while only 3 out of 10 mice died during 24 hours after LPS injection in tLBP protection group. Conclusion Preliminary results indicated that recombinant human tLBP might possess biological activity with a potential protection effect in LPS challenged mice.

【Key words】 Carrier proteins; Lipopolysaccharides; Tumor necrotic factor

细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)在体内的信号识别和激活反应有赖于脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)、单核-巨噬细

胞系模式识别受体 CD14、跨膜信号受体——Toll 样受体(TLR)和辅助蛋白 MD2 的参与,而 LPS 刺激反应导致细胞因子过量产生被认为是 G⁻ 杆菌脓毒症的发病机制^[1,2]。LBP 为分子质量(58 ~ 60) × 10³ 的血清糖蛋白,主要由肝脏产生,可参与介导对 LPS 的激活反应,并对 LPS 启动效应细胞分泌炎性介质和细胞因子起催化、放大作用^[3,4]。在 LBP 的一级

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000171、39970757)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院病理学研究所(王晓东、刘友生、葛晓冬),核医学科(陈杰);沈阳军区总医院检验科(李艳秋)

结构中,目前认为存在 2 个独立的结构域,即 N 末端结合 LPS 和 C 末端结合 CD14,并已将结合 LPS 的结构域定位在 109 ~ 125 残基之间^[5]。因此,克隆表达截段型 LBP(truncated lipopolysaccharide binding protein, tLBP)基因并深入研究其结构与功能的关系具有重要意义。本实验中,笔者在获得重组人 tLBP 蛋白和体外初步鉴定的基础上,应用 LPS 致伤小鼠模型检测 tLBP 蛋白在小鼠体内的生物学活性和潜在的保护作用,为 tLBP 的进一步应用奠定基础。

材 料 与 方 法

1. 主要试剂:LPS(*E. coli* 0111:B4)购自美国 Sigma 公司;半乳糖胺购自美国 Fluka 公司;血清丙氨酸转氨酶(ALT)速率法测定试剂盒购自科华公司;肿瘤坏死因子 α (TNF- α)放射免疫测定试剂盒购自北京北方生物技术研究所;重组人 tLBP 由本研究所表达纯化并经初步鉴定^[6]。

2. 实验分组及致伤条件^[7]:选用健康雄性昆明小鼠 70 只(第三军医大学实验动物中心),10 ~ 12 周龄,体重(46.2 \pm 7.5)g。(1)其中 50 只随机分为致伤组 1(21 只)、保护组 1(21 只)及对照组(8 只)。3 组均用 25 mg 半乳糖胺致敏,致伤组 1 单纯腹腔内注射 LPS 100 ng,保护组 1 腹腔内注射 LPS 100 ng + 重组人 tLBP 40 mg,对照组腹腔内注射等体积的等渗盐水。分别在注射后 15、30 min 及 1、3、6、12、24 h 处死致伤组 1、保护组 1 小鼠,每时相点 3 只,同时处死 1 ~ 2 只对照组小鼠,取血和肝、肺组织待检。(2)余下 20 只小鼠用 50 mg 半乳糖胺致敏,其中 10 只为致伤组 2,腹内注射 LPS 400 ng;另 10 只为保护组 2,腹内注射 400 ng LPS + 40 mg tLBP,待检。

3. 检测指标:(1)ALT 和 TNF- α 的测定:取小鼠血清标本,按试剂盒说明书操作。分别采用 715 型全自动生化分析仪(日本日立公司)和免疫计数器(中国二六二厂)进行检测,对 TNF- α 的测定结果用四参数曲线进行拟合。(2)将小鼠肝、肺组织标本用体积分数 10% 甲醛固定,石蜡包埋,切片,行 HE 染色,观察组织病理学改变。(3)观察致伤组 2、保

护组 2 在注射后 24 h 内的死亡数。

4. 统计学分析:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Excel 2000 统计软件对各组数据进行单因素方差分析。

结 果

1. 血清 ALT 含量的变化:与对照组比较,致伤组 1 伤后 15 min ALT 含量开始升高,6 h 达到峰值;保护组 1 伤后 30 min ALT 含量开始升高,12 h 到达峰值。伤后 1 ~ 12 h 保护组 1 ALT 含量明显低于致伤组 1($P < 0.05 \sim 0.01$)。见表 1。

2. 血清 TNF- α 含量的变化:与对照组比较,致伤组 1、保护组 1 伤后 15 min TNF- α 含量即升高,至 3 h 时达到峰值,分别为(42.29 \pm 4.79)、(35.96 \pm 7.33) fmol/ml。保护组 1 的升高幅度低于致伤组 1,但两组各时相点比较,差异无显著性意义($P > 0.05$),见图 1。

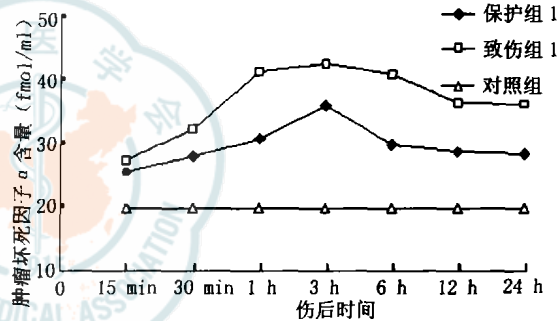


图 1 各组小鼠血清肿瘤坏死因子 α 含量变化
Fig 1 Changes in the mice serum content of TNF- α in each group

3. 致伤组 2、保护组 2 小鼠伤后 24 h 内的死亡情况:致伤组 2 伤后 24 h 内死亡 9 只,保护组 2 死亡 3 只。

4. 组织病理学观察结果:(1)肝:致伤组 1 伤后肝细胞广泛变性,呈肿胀、空泡化改变,中央静脉及叶间静脉出现不同程度的充血,门静脉区肝细胞呈现灶性细胞坏死(图 2a)。保护组 1 伤后亦可见肝组织中央静脉及叶间静脉充血,细胞变性程度较致伤组 1 明显减轻,未见肝细胞有散在坏死病变,部分肝窦腔内非实质细胞有反应性增生性改变(图 2b)。(2)肺:致伤组 1 伤后肺组织血管充血,肺泡间质炎细胞浸润,肺泡腔内、支气管内渗出物较多(图 3a)。

表 1 各组小鼠血清丙氨酸转氨酶含量的变化(U/L, $\bar{x} \pm s$)
Tab 1 Changes in the mice serum content of ALT in each group(U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	伤后时间						
		15 min	30 min	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
保护组 1	21	22.67 \pm 3.87	24.33 \pm 4.73	23.33 \pm 4.16*	32.33 \pm 14.29**	35.67 \pm 15.31**	41.00 \pm 4.58*	35.00 \pm 1.00
致伤组 1	21	31.67 \pm 9.71	44.33 \pm 12.01	54.67 \pm 15.14	69.33 \pm 16.17	99.50 \pm 62.63	59.33 \pm 25.32	59.33 \pm 25.32

注:对照组鼠数 8 只,丙氨酸转氨酶含量为(23.20 \pm 12.92)U/L;与致伤组 1 比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

保护组 1 肺组织充血程度较致伤组 1 减轻,肺泡间质炎细胞浸润较少,肺泡腔内、支气管内炎性渗出明显减弱(图 3b)。

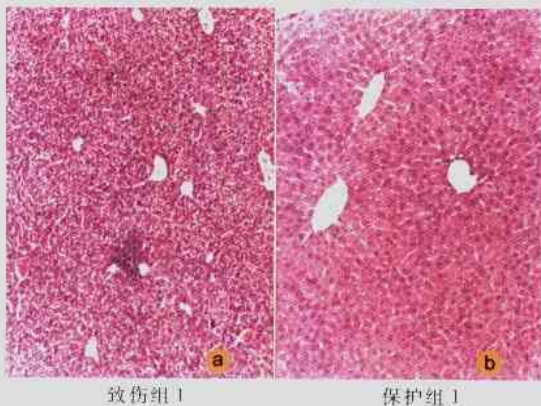


图 2 两组小鼠伤后 24 h 肝脏的组织病理学变化 HE × 100

Fig 2 Pathomorphological changes in hepatic tissue of mice at 24 h post injury HE × 100

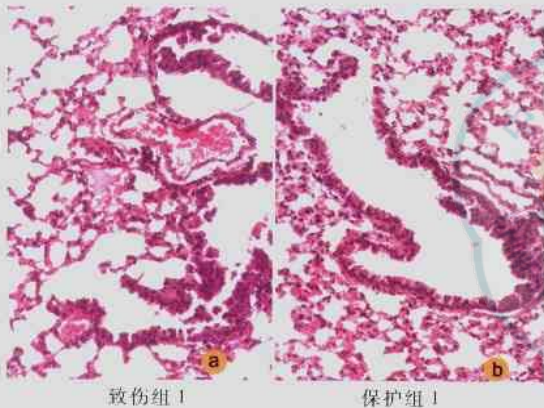


图 3 两组小鼠伤后 24 h 肺脏的组织病理学变化 HE × 100

Fig 3 Pathomorphological changes in pulmonary tissue of mice 2 at 4 h post injury HE × 100

讨 论

本实验结果显示,致伤组 2 小鼠伤后 24 h 内死亡 9 只,保护组 2 死亡 3 只;在组织病理学变化方面,保护组 1 的肝、肺组织损伤情况较致伤组 1 轻。此结果提示重组人 tLBP 对 LPS 致伤小鼠具有一定的保护作用。此外,保护组 1 伤后 1 ~ 12 h 血清 ALT 含量明显低于致伤组 1 ($P < 0.05 \sim 0.01$),提示保护组 1 小鼠的肝脏功能较致伤组 1 有所好转。致伤组 1、保护组 1 伤后血清 TNF- α 含量均较对照组升高,后者升高幅度较小,初步提示重组 tLBP 可能结合或中和了部分 LPS,从而减弱了 TNF- α 等相关炎性细胞因子和介质的释放;两组各时相点 TNF- α 含量比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$),一方面可能与纯化的重组人 tLBP 含量有限而导致动物数量较

少有关,另一方面,在给药时间和途径的选择上也有待进一步摸索。综上所述,笔者初步认为重组人 tLBP 为具有一定生物活性、类似原型分子的重组蛋白,有一定的结合或中和 LPS 的作用。

有研究表明,LPS 的结合域位于氨基端 LBP,即 tLBP,它含有 17 个氨基酸,目前推测其能够通过脂质 A 结合 LPS,但不能介导 LPS 与可溶性受体 CD14 或膜受体 CD14 结合^[8,9]。本研究结果提示,通过昆虫细胞杆状病毒获得的重组人 tLBP 具有一定的体外生物活性和保护作用,从而进一步证实了重组人 tLBP 可抑制由 LPS/LBP 介导的单核-巨噬细胞激活反应。因此,重组人 tLBP 既能与 LPS 以高亲和力结合,又可阻止 LPS 与 mCD14 或 sCD14 作用。tLBP 与 LPS 结合的结构域特点如下:(1)形成具有螺旋或折叠的双环结构;(2)存在大量疏水的具有阳性电荷的碱性氨基酸,如精氨酸、赖氨酸;(3)在 tLBP 氨基酸残基中包含有 3 ~ 4 个半胱氨酸和一定数量的二硫键^[10]。提示 LBP 不同部位的生物活性是由该分子不同的结构成分决定的,探讨 tLBP 的生物活性特点,将有助于阐明 LBP 介导 LPS 刺激单核-巨噬细胞产生细胞因子这一反应的机制,进而为防治 LPS 所介导的疾病提供理论依据。

目前临床上由 G⁻ 细菌感染所致的发病率和死亡率仍然很高,特别是应用于临床的抗 LPS 有效防治措施鲜见报道。因此,研发 LPS 抑制剂是今后临床抗脓毒症应用研究的方向和趋势,其首要目标是降低脓毒症的发病率。关于 LPS 抑制剂在结合或中和 LPS 效应中的作用机制,仍需进一步的探讨。

参 考 文 献

- Schumann RR, Latz E. Lipopolysaccharide-binding protein. *Chem Immunol*, 2000, 74:42 - 60.
- Fenton MJ, Golenbock DJ. LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol*, 1998, 64:25 - 32.
- Heumann D, Roger T. Initial response to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta*, 2002, 323:59 - 72.
- 方文慧,姚咏明,施志国,等. 烫伤大鼠肝脏脂多糖结合蛋白和脂多糖受体 CD14 mRNA 表达的意义. *中华烧伤杂志*, 2000, 16: 157 - 160.
- Hubacek JA, Buchler C, Aslanidis C, et al. The genomic organization of the genes for human lipopolysaccharide binding protein (LBP) and bactericidal permeability increasing protein (BPI) is highly conserved. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 236:427 - 430.
- 王晓东,刘友生,葛晓冬,等. 人 N 端脂多糖结合蛋白基因在 sf 21 昆虫细胞中的表达. *免疫学杂志*, 2001, 17:417 - 420.
- Jack RS, Fan X, Bernheiden M, et al. Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine Gram-negative bacterial infection. *Nature*, 1997, 389:742 - 744.
- Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharide and innate

immunity. J Endotoxin Research, 2001, 7:167-202.
9 Uknis ME, Wasiluk KR, Acton RD, et al. Design of a potent novel endotoxin antagonist. Surg, 1997, 122:380-385.

10 Dunn DL. Prevention and treatment of multiple organ dysfunction syndrome; lessons learned and future prospects. Surg Infections, 2000, 1:227-237.

(收稿日期:2002-12-23)

(本文编辑:罗勤 莫愚)

· 经验交流 ·

32 例小儿严重烧伤并发症分析

黎洪棉 梁自乾 刘达恩 林源 徐海

小儿烧伤较常见,其发病率约占同期烧伤住院患者的 50%^[1],致伤原因以热液烫伤为主^[2]。笔者单位 1990 年 1 月~2002 年 1 月共收治≤7 岁的烧伤患儿 816 例,其中死亡 32 例占 3.92%,现将其并发症作如下分析。

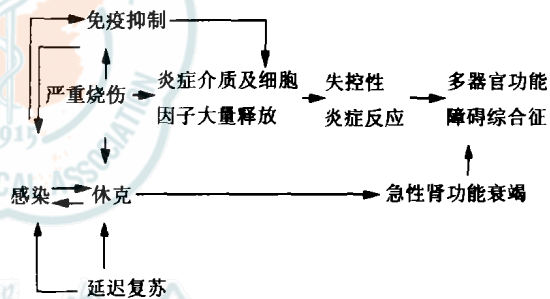
临床资料:32 例死亡患儿中男 22 例、女 10 例,年龄 9 个月~7 岁。伤后入院时间:48 h 内入院 12 例、3~10 d 13 例、11~30 d 7 例。致伤原因:热液烫伤 21 例占 65.63%、火焰烧伤 6 例占 18.75%、石灰烧伤 4 例占 12.50%、电烧伤 1 例占 3.13%。平均烧伤总面积 56.38%,平均Ⅲ度烧伤面积 30.29% TBSA。其中 1 例为左手拇、食、中指电烧伤+大脑电损伤,伤后 27 d 入院,入院时已合并有多器官功能障碍综合征(MODS);其余 31 例按 1970 年全国烧伤会议制定的小儿烧伤严重程度诊断标准^[3]分为重度烧伤 8 例、特重度烧伤 23 例。本组患儿的并发症情况见表 1。

表 1 32 例小儿烧伤后并发症发生情况

并发症种类	例数	伤后 2 d 内发病(例)	伤后 3~35 d 发病(例)	发病率 (%)
休克	3	3	0	9.38
急性肾功能衰竭	4	4	0	12.50
脑水肿	1	1	0	3.13
消化道出血	3	0	3	9.38
药物中毒性肝	1	0	1	3.12
全身性感染	20	0	20	62.50

讨论 由于儿童各系统、器官发育不完善,代偿能力低,烧伤后容易出现各种并发症,尤其是休克和全身性感染;加上家属对患儿病情的严重性认识不足,不易接受手术,给治疗带来极大的困难。南宁是典型的亚热带地区,空气湿度大,该地区以热液烫伤为主的患儿伤后极易并发感染^[4]。本组患儿中有 20 例并发全身性感染,占 62.5%,表明全身性感染在小儿烧伤并发症中占首要地位。延迟复苏是影响严重烧伤治愈率的主要因素之一,其主要危害在于增加了患者对脓毒症及 MODS 的易感性,增加了病死率。本组并发休克者虽仅有 3 例占 9.38%,但入院时出现休克征象者即有 10 例占 31.25%。虽然这些患儿入院后休克大都得到控制和纠正,但随后均并发不同程度的感染;有 8 例在感染的基础上并发了 3 种以上的脏器损害,最终发展为 MODS。这表

明感染更易导致 MODS,而延迟复苏、休克可导致急性肾功能衰竭(ARF)及 MODS。显然,延迟复苏、休克、全身性感染、MODS 有着密切的病理连续性,表现为互为因果的恶性循环,最终均向 MODS 转归。休克是全身性感染、ARF 及 MODS 的病理基础(图 1)。机体烧伤后,由于出现应激、休克或感染,引起炎症介质及细胞因子大量释放,促炎因子与抗炎因子失衡,进而导致失控性炎症反应(SIRS),此为 MODS 的根本原因。某些因子如前列腺素 2(PGE2)的失衡还可诱发脓毒症^[5]。因此,早期及时有效抗休克、迅速恢复重要内脏器官的血供,防治炎症介质的损伤是挽救严重烧伤患者生命的最基本措施,直接影响患者的预后。



本组患儿休克期(伤后发病时间≤2 d)主要并发症为 ARF(4/8),与延迟复苏、休克未能及时纠正有关;而休克期后(伤后发病时间为 3~35 d)主要并发症为全身性感染(20/24),与此时正值感染高峰期有密切关系。因此,伤后早期主要任务是积极防治休克。休克期平稳度过后,即应把防治感染作为主要任务,这样才能有效地提高烧伤患儿的治愈率。

参 考 文 献

- 1 刑继平,武秀平,主编.小儿烧伤与整形临床问答.北京:人民军医出版社,2000.1146.
- 2 方勇,龚永生,陈玉林.664 例小儿烧伤流行病学统计分析.中华整形烧伤外科杂志,1999,11:387.
- 3 黎鳌,主编.烧伤治疗学.第 2 版.北京:人民卫生出版社,1995.14.
- 4 黎洪棉,林源.学龄前小儿烧伤特点分析及预防对策(附 677 例报告).广西医科大学学报,2001,18:511-512.
- 5 陈洪福,仇刚,许伟石.烧伤患者血浆前列腺素 E2 和肿瘤坏死因子水平的变化.中华烧伤杂志,2001,17:304-306.

(收稿日期:2002-04-02)

(本文编辑:莫愚 罗勤)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学附属第一医院烧伤整形科(黎洪棉、刘达恩、梁自乾、林源);来宾县人民医院外科(徐海)