

甘氨酸和多粘菌素 B 拮抗内毒素活性及其机制的研究*

暨南大学医学院病理生理教研室(广州 510632)

戚仁斌 陆大祥[✓] 颜亮 胡巢凤 王彦平 王华东 李楚杰

摘要 目的和方法:通过 LAL 改良基质显色法和紫外光谱法观察甘氨酸/多粘菌素 B(PMB)合剂体外拮抗内毒素的机制。**结果:**测定了各拮抗剂与内毒素中和后剩余内毒素的浓度(活性),结果表明甘氨酸/PMB 合剂组、PMB 组和甘氨酸组均显著低于内毒素组($P < 0.01$),并且甘氨酸/PMB 合剂组显著低于单独使用 PMB 组和甘氨酸组($P < 0.01$)。从紫外光谱图上可看到两种拮抗剂中和内毒素的作用是明显不同的:PMB 可以降低内毒素的吸收峰值(206 nm 和 257 nm 处),而甘氨酸与内毒素的吸收峰值则相加(212 nm 和 257 nm 处)。结论:1)内毒素脂质 A 上磷酸基团及相连的氨基葡萄糖双糖结构在甘氨酸、PMB 作用下发生了变化,从而失去了对鲎试剂中 C 因子的激活作用,并且甘氨酸、PMB 联合应用比单独使用效果要好;2)提示甘氨酸和 PMB 可能是分别作用在内毒素分子的不同结构部位。

主题词 甘氨酸;多粘菌素 B;内毒素类

败血症

败血症期间(特别是 G⁻菌感染),使用抗生素不当,不仅不能杀死细菌,反而会引起内毒素(endotoxin, ET)大量释放入血,即便杀死了细菌,也同样会引起内毒素的释放,进而使机体出现内毒素血症,接着病情迅速恶化,出现休克、DIC、甚至死亡^[1]。所以目前人们对一些严重的内毒素性疾病仍缺乏有效的治疗手段。近 30 年来,学者们一直在寻找较为理想的内毒素拮抗剂,观察了上百种药物对内毒素的拮抗作用,但多因拮抗效果差、本身毒性或副作用等方面的限制而不能广泛应用于临床。因此,结合国内外的研究经验及本室^[2,3]的研究结果,我们认为内毒素拮抗剂的作用机制之一是与内毒素的活性部分类脂 A 相互作用形成复合物,从而使内毒素失活,如果选择分别作用于内毒素分子结构中的不同部位的两种拮抗剂同时应用,或者利用两种拮抗剂同时阻断内毒素作用的多个环节,可能会取得更理想的效果,所以我们在研究中选定了甘氨酸(glycine, Gly)与多粘菌素 B(polymyxin B, PMB)进行了重点观察,研究它们联合或单独拮抗内毒素的机制。

材料和方 法

一、实验材料和仪器:

Gly,分子量 75.07,广东汕头新宁化工厂出品;PMB,美国生命技术公司出品;内毒素国家标准品和无热原水,中国药品生物制品检定所出品;鲎试剂(0.5 mL/支)、厦门鲎试剂厂出品;Tris 由 FARCO

Chemical Supplies 提供;显色基质 S-2423(鲎三肽),由瑞典 Möln dal 公司提供;M-750B 型多功能紫外可见分光光度计,江苏泰州无线电仪器厂制造;UK-260 型紫外光谱仪,日本岛津公司制造。

二、防污染措施:

实验室及工作台,使用前经紫外线照射消毒 1 h,实验中所用耐高温物品均干热 200 °C 6 h,不耐热物品则用 15 磅高压蒸汽灭菌 30 min。

三、实验步骤:

(一) Gly、PMB 对内毒素活性的影响:

1. 溶液的配制:称取 Tris、MgCl₂ 加入无热原水溶解,用盐酸调 pH 至 8.0,配制成 Tris-HCl-MgCl₂ 缓冲液(Tris-HCl 0.4 mol/L, MgCl₂ 0.04 mol/L);称取 S-2423 加无热原水溶解,配成 4 mmol/L 的溶液;LAL 在使用前用 Tris-HCl-MgCl₂ 缓冲液溶解。

2. 定量标准曲线绘制:将 ET 溶解于适量无热原水中,配成 6 种溶液,编号 No1~No6,其中内毒素终浓度为:No1(0 U/mL);No2(25 U/mL);No3(50 U/mL);No4(100 U/mL);No5(150 U/mL);No6(200 U/mL);按文献^[4]报道 LAL 改良基质显色进行操作,将测定结果以内毒素浓度为横坐标,测得的各吸光度 A_{405 nm} 为纵坐标,以空白管为零点作定量标准曲线。

3. 各试验组内毒素浓度(活性)的测定:将 ET 溶解于适量无热原水中,加入 Gly 和/或 PMB 溶液,分为 8 个试验组,编号为 No1~No8,其中试剂或药物的终浓度依次为:No1:ET 0 U/mL;No2:ET 100 U/mL、PMB 30 000 U/mL、Gly 75 mg/mL;No3:ET 100 U/mL、PMB 30 000 U/mL;No4:ET 100 U/mL、Gly 75 mg/mL;No5:

* 广东省“五个一”科教兴医工程”重点科研项目基金资助

PMB 30 000 U/mL, Gly 75 mg/mL; No6: PMB 30 000 U/mL; No7: Gly 75 mg/mL; No8: ET 100 U/mL。其中 ET 与 PMB、Gly 在 37 °C 作用 30 min, 然后按文献^[4]报道方法进行测定, 测定结果按以下公式计算: 吸光度($A_{405\text{ nm}}$) = $\Delta OD_{(\text{测定管})} - \Delta OD_{(\text{对照管})} - \Delta OD_{(\text{试剂空白管})}$, 再根据定量标准曲线, 查出 $A_{405\text{ nm}}$ 相对应内毒素含量, 即可得实际内毒素活性水平; 将上述操作每组每天重复测定 2 次, 5 天内连续重复 5 次。

4. 统计处理: 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经方差齐性检验后, 对各组均数的差异用方差分析进行显著性检验, 进一步用 SNK 检验各组两两比较差异的显著性。

(二) Gly、PMB 对内毒素光谱特性的影响:

1. 实验步骤: 将 ET 溶解于适量无热原水中, 加入 Gly、PMB 溶液, 配得 6 种溶液, 编号为 No1 ~ No6, 其中药物的终浓度依次为: No1: 无热原水; No2: PMB 30 000 U/mL; No3: Gly 75 mg/mL; No4: ET 0.05 $\mu\text{g/mL}$; No5: ET 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、PMB 30 000 U/mL; No6: ET 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、Gly 75 mg/mL。以上溶液于 37 °C 作用 30 min。

2. 用无热原水调零后, 依次将各组溶液进行紫外光谱扫描, 绘制光谱图(比色皿于实验前须用 15% 硝酸浸泡 4 ~ 6 h)。

3. 结果分析: 根据光谱图分析 ET 分子结构在 Gly、PMB 作用下的变化。

结 果

一、Gly、PMB 合剂对内毒素活性的影响:

(一) 定量标准曲线: 将测定结果以 ET 浓度为横坐标, 测得的各吸光度 $A_{405\text{ nm}}$ 为纵坐标, 以空白管为零点作定量标准曲线, 见图 1。

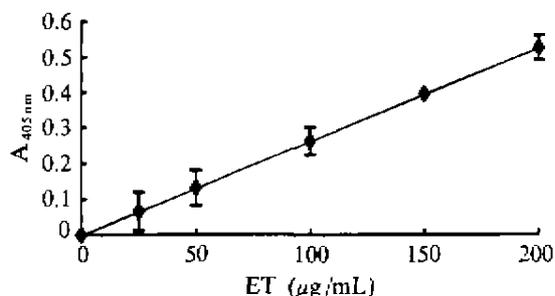


Fig 1 Quantitative standard curve for endotoxin

图 1 ET 定量标准曲线

(二) Gly 和 PMB 对 ET 活性的影响:

由表 1 所示, 对 Gly 和/或 PMB 与 ET 作用后的溶液中剩余 ET 活性结果如下($\bar{x} \pm s$, U/mL): 空白对照(无热原水)组 3.66 ± 1.53 , Gly/PMB 合剂拮抗组 38.63 ± 5.34 , PMB 拮抗组 68.78 ± 4.96 , Gly 拮抗组 73.60 ± 8.02 , Gly/PMB 合剂对照组 5.65 ± 1.15 , PMB 对照组 4.19 ± 0.38 , Gly 对照组 5.57 ± 1.91 , ET 组 109.00 ± 7.97 。用方差分析对各组实验结果进行统计学分析表明: 各拮抗组 ET 活性明显低于 ET 组($P < 0.01$), 并且 Gly/PMB 合剂拮抗组 ET 活性明显低于 Gly 对照组、PMB 对照组($P < 0.01$)。

表 1 Gly、PMB 与 ET 作用后的活性比较

Tab 1 Comparison of activity of residual endotoxin after Gly, PMB neutralizing endotoxin($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

| Group | Concentration of residual endotoxin(U/mL) |
|------------------|---|
| ET | $109.00 \pm 7.97^*$ |
| ET + Gly + PMB | $38.63 \pm 5.34^{\Delta*}$ |
| ET + Gly | $73.60 \pm 8.02^{\Delta*}$ |
| ET + PMB | $68.78 \pm 4.96^{\Delta*}$ |
| Gly + PMB | $5.65 \pm 1.15^{\Delta}$ |
| Gly | $5.57 \pm 1.91^{\Delta}$ |
| PMB | $4.19 \pm 0.38^{\Delta}$ |
| H ₂ O | $3.66 \pm 1.53^{\Delta}$ |

$\Delta P < 0.01$, vs ET group; * $P < 0.01$, vs H₂O group; # $P < 0.01$, vs ET + Gly + PMB group

(三) Gly、PMB 对 ET 光谱特性的影响:

如图 2 所示: 无热原水组基本无吸收峰; 而 PMB 对照组则有 4 个吸收峰: 222.4 nm 吸收值 2.364, 251.4 nm 吸收值 0.337, 257.4 nm 吸收值 0.357, 263.2 nm 吸收值 0.304; Gly 对照组有 1 个吸收峰: 204.2 nm 吸收值 0.737; ET 组有 2 个吸收峰: 206.0 nm 吸收值 1.470, 257.2 nm 吸收值 0.950; PMB 拮抗组有 2 个吸收峰: 223.8 nm 吸收值 2.414, 257.6 nm 吸收值 0.760; Gly 拮抗组有 2 个吸收峰: 212.0 nm 吸收值 2.414, 257.2 nm 吸收值 0.967。由图 2(e) 可见 PMB 与 ET 作用后, PMB 的 4 个吸收峰变为 2 个, 其 222.4 nm 处吸收峰未受影响, ET 的 206 nm 处吸收峰消失, 257.2 nm 处吸收峰值亦由 0.950 降到 0.760, 提示 PMB 作用部位与 ET 分子的紫外吸光基团有关, 而 PMB 自身结构较稳定。而图 2(f) 可见 Gly 与 ET 作用后的吸收峰表现为 Gly、ET 两者吸收峰略有偏移且峰值简单相加, 提示 Gly 与 ET 作用的部位对于 ET 分子的紫外吸光性结构基本上无影响。

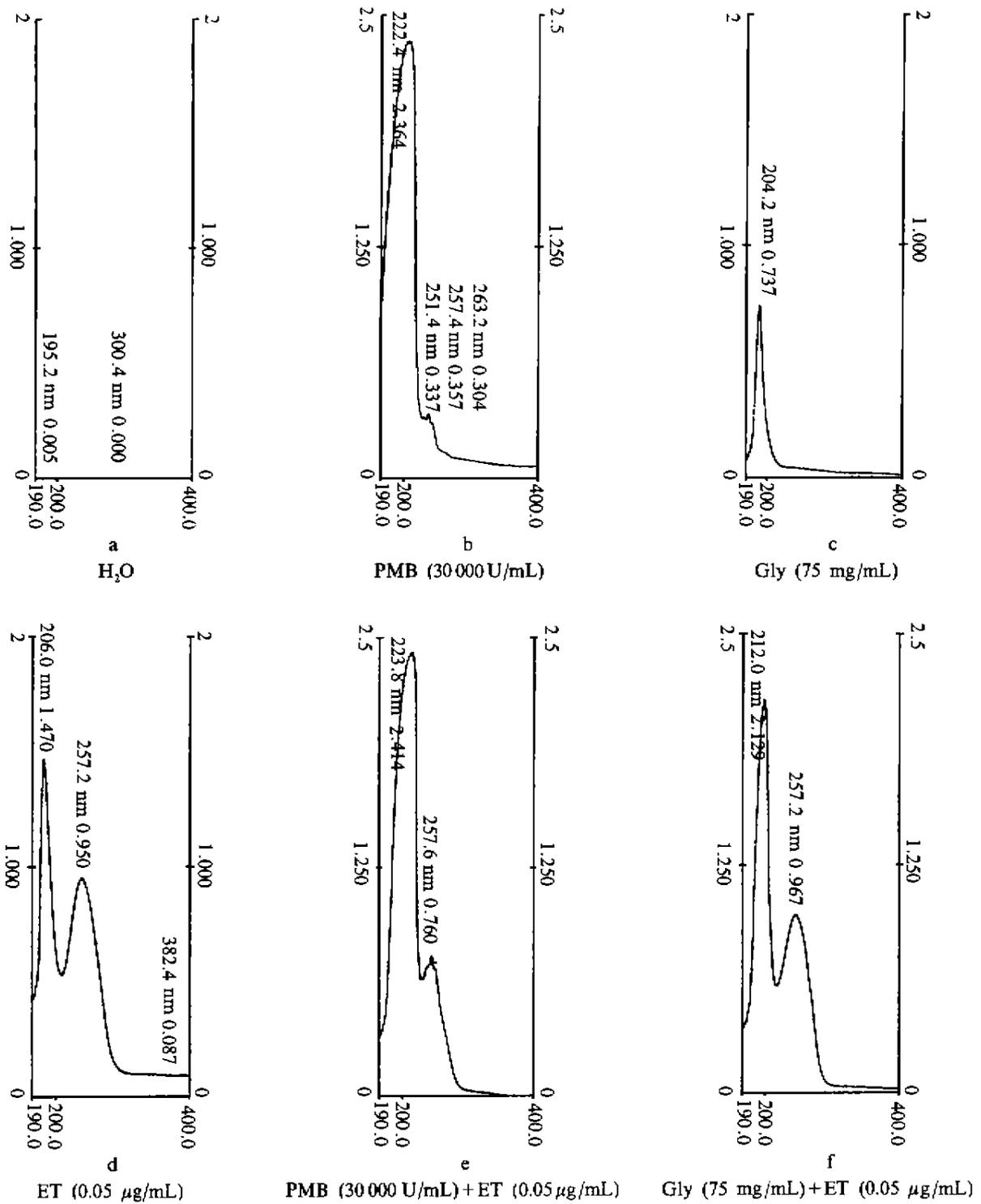


Fig 2 The ultraviolet spectrometer graph of endotoxin neutralized by glycine and polymyxin B

图2 Gly、PMB 与 ET 作用后的紫外光谱图

讨 论

内毒素(脂多糖, LPS)能发挥多种生物学效应,其作用方式首先是与脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide

- binding protein, LBP)结合形成复合物,然后 LBP 将 LPS 传递给可溶性 CD₁₄(soluble CD₁₄, sCD₁₄)或细胞膜结合 CD₁₄(member CD₁₄, mCD₁₄),再通过一些复合物来启动细胞内的激活,这一过程可能通过 G 蛋白的偶

联,刺激细胞产生第二信使——三磷酸肌醇和甘油二酯,并通过它们引起细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化以及激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC),在 PKC 的作用下细胞内功能蛋白依次完成磷酸化,引起 IL-1、TNF- α 等细胞因子和其他介质的释放,最终与靶细胞作用产生生物学效应^[5]。因此,针对 ET 的作用环节及机制,需要从多个方面入手,如加速循环中 LPS 灭活,阻断 LPS 对宿主细胞的激活,阻止细胞因子产生和阻断细胞因子对靶细胞的作用等。

根据这个思路,我们在先前的研究中选定了 Gly 与 PMB 进行了重点观察,实验证实 Gly 与 PMB 联用在体外与 ET 作用后有较为明显的协同拮抗 ET 致热性的作用,那么这种协同作用的机制如何? 本研究第一部分实验利用鲎三肽显色基质法对此进行了初步探讨。因为鲎试剂中的 C 因子可以被 ET 激活,活化的 C 因子又激活 B 因子,接着 B 因子再去激活鲎试剂的凝固酶原,使之转化成活化的凝固酶,该酶水解显色基质鲎三肽中精氨酸肽链,释放出显色物质——对硝基苯胺^[4]。我们知道 ET 脂质 A 上磷酸基团及相连的(31,6)-氨基葡萄糖双糖是鲎试剂中 C 因子的激活所必需的结构^[6],如果这一结构被破坏将失去激活 C 因子的能力,鲎三肽的显色能力将随之降低,这一结果又可通过 ET 的浓度反映出来,因此,通过 ET 浓度的变化可以判断脂质 A 上磷酸基团和氨基葡萄糖是否受到影响。本实验结果证实:PMB、Gly 在体外与 ET 作用后,可以有效降低内毒素浓度。根据上述原理,我们推测 ET 浓度的降低可能是 PMB、Gly 破坏了磷酸基团或与其相连的氨基葡萄糖双糖结构,使 ET 脂质 A 活性(致热性和对鲎试剂中 C 因子的激活作用等)降低或者消失所致。这一推测在第二部分实验中得到进一步证实。此外,本实验结果还提示了 PMB 和 Gly 联合使用比单一使用一种拮抗剂效果要好。

我们知道 ET 是一种具有三维空间结构的大分子物质,电镜下观察其呈较规则的网络状结构,经 PMB 作用后,此结构变成散乱分布的残破网状、点段状结构^[7],Gly 亦有相似的作用^[3]。PMB、Gly 对 ET 结构破坏结果相同,均由规则的网络状结构变成残破点段状结构,那么 PMB、Gly 与 ET 分子相互作用的部位是否也是相似的呢? 第二部分我们通过紫外光谱图对 PMB、Gly 与 ET 分子间的作用机制进行了研究。从

PMB、Gly 与 ET 作用前后的紫外光谱图上,可以看到 PMB 与 ET 作用后,ET 的某些吸光基团^[8,9](可能主要是 LPS 磷酸根和与氨基葡萄糖相连的酰胺基或脂酰基长链脂肪酸)受到明显的影响,这与我们已知的带正电的多肽抗生素 PMB 与 ET 的带负电的磷酸根结合,从而破坏其正常的结构的结果^[10]相吻合。而 Gly 对这些吸光性基团的影响却不明显,仅表现为 LPS 分子中与氨基葡萄糖相连的酰胺基或脂酰基长链脂肪酸吸光基团略有偏移,而对磷酸根的吸光性没有明显改变。提示 PMB、Gly 对 ET 分子结构及活性的影响可能是通过作用于 ET 分子结构的不同部位来实现的。同时进一步证实了磷酸基团、氨基葡萄糖及其相连的长链脂肪酸是 PMB 和 Gly 的主要作用部位。

参 考 文 献

- 1 何炬斌. 抗生素应用和内毒素释放. 国外医药抗生素分册. 1995, 16(5):418.
- 2 陆大祥, 李楚杰, 付咏梅, 等. 甘氨酸对内毒素致热性的拮抗作用研究. 中国病理生理杂志, 1996, 12(3):235.
- 3 孙 葳, 陆大祥, 丁 勇, 等. 甘氨酸对内毒素与单核细胞结合率及内毒素构型的影响. 中国病理生理杂志, 1998, 14(4):359.
- 4 李 平, 朱无难, 周 康, 等. 血浆、尿液、脑脊液、腹水及生物制品中微量内毒素定量检测—鲎变形细胞裂解物改良基质显色法. 上海免疫学杂志, 1985, 5(1):39.
- 5 侯本祥, 史俊南. 内毒素诱导单核—巨噬细胞产生细胞因子的作用机理. 国外医学口腔医学分册, 1997, 24(4):201.
- 6 焦炳华, 崔竹金. 细菌内毒素化学结构. 见:焦炳华主编. 分子内毒素学. 第1版. 上海:上海科学技术文献出版社, 1995. 151~154.
- 7 Lopes J, Inuiss WE. Electron microscopy of effect of polymyxin B on *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Bacteriol*, 1969, 100(11):1128.
- 8 黄 量, 于德泉, 编著. 紫外光谱在有机化学中的应用(上册). 第1版. 北京:科学出版社, 1988. 27~37, 224~239.
- 9 【美】RL Shriner, RC Fuson, 等著. 紫外光谱法. 见:丁新腾, 等译. 有机化合物系统鉴定法. 第1版. 上海:复旦大学出版社, 1987. 315~324.
- 10 Peterson AA, Fesik SW, McGroarty EJ. Decreased binding of antibodies to lipopolysaccharides from polymyxin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987, 31(2): 230.

(1999年5月20日收稿, 1999年7月30日修回)

Anti - endotoxic activity of glycine and polymyxin B and its mechanism

QI Ren - Bing, LU Da - Xiang, YAN Liang, HU Chao - Feng,

WANG Yan - Ping, WANG Hua - Dong, LI Chu - Jie

Department of Pathophysiology, Medical College of Jinan University, GuangZhou (510632)

Abstract **AIM and METHOD:** Modified Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test with chromogenic substrate and ultraviolet spectrometer was used to investigate the mechanism of anti - endotoxin of glycine and polymyxin B *in vitro*. **RESULTS:** Concentration of residual endotoxin (RE) was determined after antagonists neutralized endotoxin; In glycine/polymyxin B mixture group, polymyxin B group, glycine group RE were significantly lower than that of endotoxin group ($P < 0.01$), and in glycine/polymyxin B mixture group RE was significantly lower than that of polymyxin B, glycine group ($P < 0.01$). Observed the graph of various groups with ultraviolet spectrometer, it was obvious that there were difference between action of two antagonists to neutralize endotoxin; polymyxin B decreased absorption peak value of endotoxin (at 206 nm and 257 nm), however, absorption peak values of glycine and endotoxin can be add up (at 212 nm and 257 nm). **CONCLUSIONS:** The result suggested that: 1) phosphoric acid unit and amino - bio - glucose of lipid A was changed after endotoxin was neutralized by glycine, polymyxin B and lost the activating C factor in LAL, moreover, glycine/polymyxin B mixture might be better than any one of single antagonist; 2) glycine and polymyxin B affected different parts of endotoxin molecule.

MeSH Glycine ; Polymyxin B; Endotoxins

本 刊 启 事

经上级主管部门批准,从 1999 年 1 月起,本刊从双月刊改为月刊。更改刊期后,本刊的载文量大大增加,文章发表周期明显缩短,极大地提高了文章的学术价值和社会效益。因此,我们竭诚欢迎广大读者、作者继续踊跃投稿,积极订阅。

编辑部