



LPS 模拟肽 13L 诱导对小鼠内毒素休克的保护反应*

罗海波^{1,2)} 郑健²⁾ 朱平²⁾ 黄来强¹⁾ 富宁^{2)**}

(1)清华大学深圳研究生院生命科学部, 深圳 518055)

(2)南方医科大学免疫学教研室, 广州 510515)

摘要 为研究 LPS 2630 表位模拟肽 13L 是否能诱导抗 LPS 抗体的产生、对细菌攻击及内毒素休克的保护性反应, 合成了模拟 LPS 表位的短肽 13L. 用合成肽 13L-蓝载体(Blue Carrier, BC)交联物免疫 Balb/C 小鼠, 观察小鼠体内抗 LPS 抗体产生的规律; 并观察免疫小鼠细菌感染存活时间; 用颈总动脉插管测定技术观察免疫小鼠内毒素休克的血压变化. 结果显示合成肽 13L-BSA 交联物能与兔抗鼠伤寒和大肠杆菌 LPS 抗血清及抗鼠伤寒 LPS 单抗结合, 证明短肽 13L 可模拟 LPS 的抗原性; 用 13L-BC 交联物免疫可诱发小鼠体内针对大肠杆菌 LPS2630 和鼠伤寒沙门氏菌 LPS7261 的抗体反应, 该反应可被灭活大肠杆菌及两种 LPS 所加强; 其抗体亚类主要为 IgG2a, 其次为 IgG2b 与 IgM, 而 IgG1 与 IgG3 含量极低; 免疫 13L-BC 小鼠显示对细菌攻击的抵抗, 与免疫 BC 对照小鼠比较其存活时间分别为 12 ± 1.3 天和 5.3 ± 0.4 天 ($P<0.01$); 免疫 13L-BC 小鼠对静脉注射 LPS 诱发内毒素休克的保护作用体现在血压下降幅度明显低于对照动物, 在 LPS2630 攻击后 1、2、3 及 4 小时两组动物血压明显差别 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.05$ 及 $P<0.01$); 而 LPS7261 攻击后 1、2、3 及 4 小时两组动物血压差别则略小于 LPS2630 组 ($P>0.05$ 、 $P<0.05$ 、 $P<0.05$ 及 $P<0.01$). 上述结果证明 LPS 表位模拟肽 13L 交联物免疫小鼠可产生针对细菌攻击及内毒素休克的保护性效应, 提示该模拟肽作为 LPS 交叉保护性疫苗候选的可行性.

关键词 脂多糖; 表位模拟肽; 内毒素休克; 保护性免疫

学科分类号 R392.5

已知革兰氏阴性菌 (G⁻) 细胞壁成分脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 亦称为内毒素, 是诱发内毒素性休克的始动因素^[1,2]. 进入体内的 LPS 可来自各种革兰氏阴性菌 (Gram negative, G⁻) 菌感染, 亦可来自机体抵抗力低下时的肠源性 G⁻ 菌, 甚至一些病毒感染急性期也可发生内毒素血症. 鉴于 G⁻ 菌内毒素血症的高发病率和严重危害, 针对 LPS 的治疗与预防的研究始终是人们极为关注的课题. 在治疗方面, 针对革兰氏阴性菌感染的抗生素治疗并不能抑制细菌 LPS 的释放, 也不能中和 LPS^[3,4]. 近年虽然已有针对 LPS 诱发炎症细胞因子的治疗性抗体面世, 但由于价格等原因其应用仍受到一定限制^[5]. 在预防方面, 预存抗 LPS 抗体与败血症的发生、大样本住院肿瘤患者、烧伤、外科手术等因感染死亡例数呈负相关的现象早已被证实, 这意味着研发 LPS 疫苗的必要性^[6,7]. 而人们在 LPS 疫苗研制方面所面临的主要困难包括: ① LPS 为 TI-I (非胸腺依赖抗原-I) 型抗原, 自然诱导产生的抗体亲和力低、调理杀菌力弱, 且无再次抗体应答; ② 源于不同属、不同株乃至不同血清型的 LPS 可具不同的抗原性. 因而至今尚无批准进入临床实验的具广谱保护作用的 LPS 疫苗, 以至于 P. Moingeon 等在 2003 年的一篇述评中写道: 所有的可诱导广谱保护作用 LPS 或类脂 A 疫苗、被动免疫治疗败血症性休克的尝试已均告失败, 也许要转向寻求免疫治疗与小分子药物的结合^[8]. 理想的 LPS 疫苗应能诱导再次免疫应答, 所产生的抗体应是具广谱预防与保护作用^[9]. 在前期工作中, 我们利用噬菌体肽库技术, 以具交叉反应性的抗大肠杆菌 LPS 多克隆抗体作为靶标筛选噬菌体环七肽库, 获得了可模拟 LPS 表位的噬菌体克隆模拟肽序列^[10], 成功的将天然 LPS 的抗原属性由 TI 抗原转变为模拟肽的 TD 抗原. 本研

*国家自然科学基金资助(30471550).

**通讯联系人.

Tel: 020-61648221, E-mail: zfzn@fimmu.com

收稿日期: 2008-3-20, 接受日期: 2008-07-15

究以此 LPS 表位模拟肽为基础重新设计并合成了 LPS 表位模拟肽 13L (SAC-XEDGLLX-C₂GG), 对其结合抗 LPS 抗体、诱导抗体产生及对细菌攻击、LPS 致内毒素休克的保护性效应进行了观察, 并获得了较为肯定的结果. 为制备 LPS 多表位合成肽疫苗奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

LPS2630 模拟位合成肽 13L 系根据用大肠杆菌 LPS 的多克隆抗体为筛选靶分子所获的噬菌体环七肽 C-XEDGLLX-C₂序列设计, 在其两端增加 SAC-X-EDGLL-X₂CGG (共 13 个氨基酸), 由深圳翰宇生物技术有限公司合成; 无关对照 12 肽 HWDPFSL SAYFP(12mer)为 C1q 结合肽^[11], 鼠伤寒沙门氏菌 LPS (L7261)、大肠杆菌 O111:B4 型 LPS (L2630) 及 Freund' 佐剂均购自 Sigma 公司; 蓝载体 (Blue Carrier, BC) 及 EDC 为 Pierce 公司产品; HRP-羊抗鼠 IgG (工作浓度 1:1 000) 及 HRP-羊抗兔 IgG (工作浓度 1:1 000) 均购自北京邦定公司; BALB/C 小鼠购于中山大学医学院实验动物中心; 兔抗鼠伤寒沙门氏菌血清、兔抗大肠杆菌血清及抗鼠伤寒沙门氏菌单抗 1B6 为本实验室制备^[12,13].

1.2 合成肽抗原性鉴定

1.2.1 合成肽 13L-BSA 与抗 LPS 抗体的结合. 将合成肽 13L 与 BSA 进行交联, 取交联物以 2 mg/L 浓度, 50 μ L/孔包被酶标板, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 同时设定无关 12 肽-BSA 交联物为对照; 50 g/L 脱脂奶粉于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h 后, 分别加入系列稀释的兔抗鼠伤寒沙门氏菌血清 (1:100-1 600)、兔抗大肠杆菌血清 (1:100-1 600) 及抗鼠伤寒沙门氏菌单抗 1B6 (10-160 mg/L, 2 倍稀释) 50 μ L/孔, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后洗涤, 分别加入相应的 HRP-羊抗鼠 IgG (1:1 000)、HRP-羊抗兔 IgG (1:1 000), 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, TMB 显色, 2 mol/L 硫酸终止反应, 450 nm 波长下测定吸光度 (A 值)。

1.2.2 合成肽特异性鉴定. 将鼠伤寒沙门氏菌 LPS (LPS 7261) 以包被缓冲液稀释为 10 mg/L 包被酶标板 50 μ L/孔, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 50 g/L 脱脂牛奶于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h 后, 加入梯度稀释的合成肽 13L (50-800 mg/L, 倍比稀释) 25 μ L/孔, 设定无关 12 肽 HWDPFSL SAYFP (12mer) 为阴性对照, 再加入 1:400 稀释的兔抗鼠伤寒沙门氏菌血清 25 μ L/孔, 混匀, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; 洗涤后加入 HRP-羊抗兔 IgG (1:1 000) 50 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 洗涤后 TMB 显色, 2 mol/L 硫酸终止反应, 450 nm 波长下测定吸光度 (A 值), 计算抑制率.

1.3 合成肽免疫原性及诱导保护性鉴定

1.3.1 免疫动物. 制备合成肽 13-BC 交联物为免疫原, 接种 6 周龄 BALB/C 小鼠, 设立 PBS/BC 为对照组免疫原, 每组 6 只. 以载体蛋白量计算, 免疫剂量为 100 μ g/只/次. 首次免疫接种为合成肽交联物加等体积弗氏完全佐剂制备乳化抗原, 足垫及背部多点皮下注射; 3 周后用同样免疫原与弗氏不全佐剂乳化物腹腔内注射, 而后每隔 2 周加强, 共免疫四次; 每次免疫前均自小鼠眶静脉采血检测血清抗体效价, 观察其抗体生成动态.

1.3.2 灭活大肠杆菌加强免疫(Boost). 取培养大肠杆菌离心洗涤, 并于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 1h 灭活, 并以 PBS 稀释为 1.5×10^6 /mL, 给予第四次免疫后小鼠腹腔内注射 0.2 mL/只, 观察攻击后小鼠存活情况, 并于攻击后第 7 天采血检测血清抗体效价.

1.3.3 小鼠血清抗 LPS 抗体效价检测. 分别将大肠杆菌 LPS (LPS 2630) 及鼠伤寒沙门氏菌 LPS (LPS 7261) 以包被缓冲液稀释为 10 mg/L 包被酶标板 50 μ L/孔, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 50 g/L 脱脂奶粉于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h 后, 分别加入梯度稀释的小鼠血清 (1:200-3 200, 倍比稀释) 50 μ L/孔, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后洗涤; 加入 HRP-羊抗鼠 IgG (1:1 000) 50 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 洗涤后 TMB 显色, 2 mol/L 硫酸终止反应, 450 nm 波长下测定吸光度 (A 值), 以高于阴性对照 3 倍以上为阳性结果.

1.4 鼠伤寒沙门氏菌攻击实验

13L-BC 及 PBS/BC 免疫 Balb/C 小鼠各 6 只, 攻击前自小鼠眶静脉采血检测血清抗体效价; 取培养的鼠

伤寒沙门氏菌, 以 PBS 稀释浓度为 $0.5 \times 10^7/\text{mL}$, 给予所有小鼠腹腔内注射 0.2 mL/只, 观察攻击后小鼠存活情况, 计算各组存活天数均值。

1.5 内毒素性休克小鼠模型建立

① 试验动物分组: 13L-BC 免疫 Balb/C 小鼠两组为实验组, BS/BC 免疫小鼠 1 组为对照, 每组 6 只; ② 动物麻醉: 麻醉剂为 13.3%乌拉坦+0.5%氯醛糖, 按照 6.5 mL/kg 给予小鼠腹腔注射麻醉; 行颈总动脉插管, 连接应用压力换能器 (Pclab 数据采集系统) 监测平均动脉压(mean arterial pressure, MAP); ③ 致休克及血压观察: 给两个实验组免疫小鼠分别自尾静脉注射 LPS 2630 200ug/只与 LPS 7261 200ug/只, 注射后, 每 15min 记录血压值; ④ 结果判定: 描绘血压曲线, 取 4 个时间点血压平均值进行统计学处理; 观察小鼠存活情况至 6 h, 6h 仍未死亡即处死。

2 结果与分析

2.1 合成肽 13L 抗原性鉴定

将合成肽 13L 与 BSA 交联后鉴定其与 3 种不同的抗 LPS 抗体的结合作用, 以鉴定合成肽是否模拟 LPS 的抗原表位。实验结果显示, 13L-BSA 交联物可与三种不同的抗 LPS 抗体结合, 其中抗 *S.Typhi* 与抗 *E.Coli* 为多克隆抗体, 而 1B6 系抗鼠伤寒 LPS 单克隆抗体。该结果提示合成肽 13L 可能模拟了不同种属 LPS 之间的交叉表位 (图 1、2)。

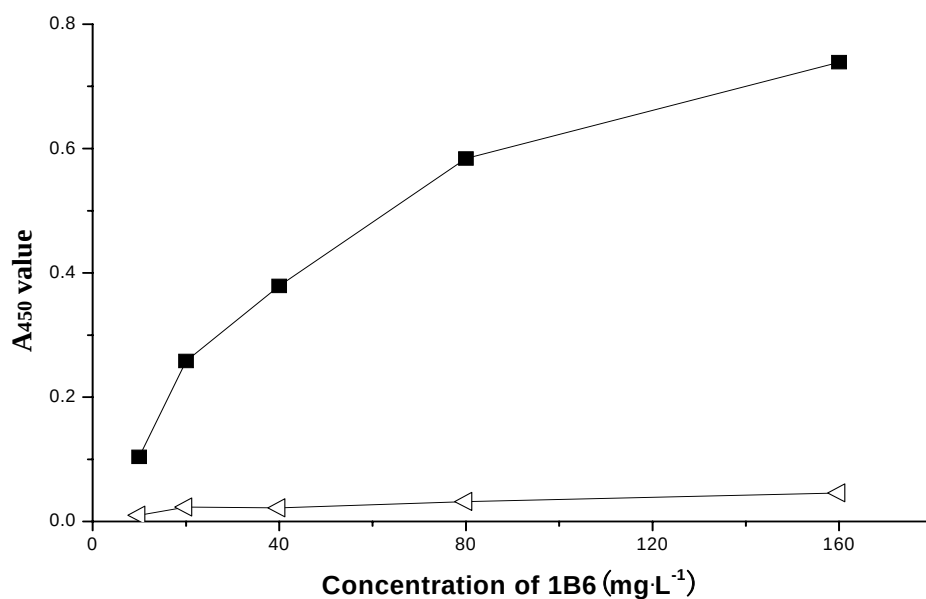


Fig.1 Binding of 13L-BSA with mAb 1B6

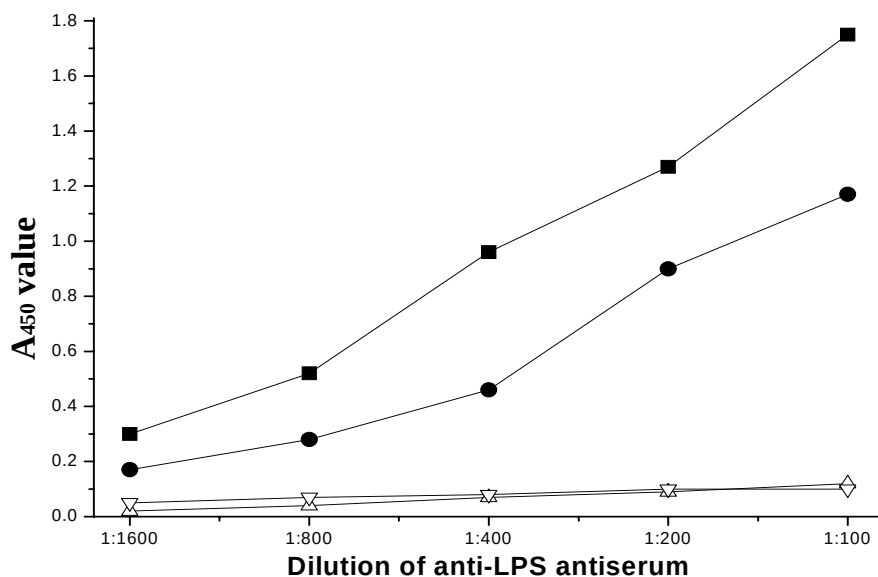


Fig.2 Binding of 13L-BSA with anti-*S.typhi* antiserum and anti-*E.coli* antiserum

■ Binding of 13L-BSA with anti-*S.typhi* antiserum
 ● Binding of 13L-BSA with anti-*E.coli* antiserum
 △ Binding of 12mer-BSA with anti-*S.typhi* antiserum
 ▽ Binding of 12mer-BSA with anti-*E.coli* antiserum

2.2 合成肽 13L 特异性鉴定

为进一步确定合成肽 13L 的模拟 LPS 表位即模拟位性质, 观察了游离合成肽 13L 对兔抗鼠伤寒沙门氏菌多克隆抗体结合 LPS 7261、及兔抗大肠杆菌多克隆抗体结合 LPS 2630 的抑制反应. 试验结果显示, 合成肽 13L 对兔抗鼠伤寒沙门氏菌多克隆抗体结合鼠伤寒沙门氏菌 LPS 7261, 及兔抗大肠杆菌多克隆抗体结合大肠杆菌 LPS 2630 均有明显的抑制作用, 且呈剂量依赖性; 而作为对照的 12-mer 合成肽则无抑制作用. 由此可认为, 合成肽 13L 确实模拟鼠伤寒杆菌与大肠杆菌 LPS 的交叉表位 (图 3).

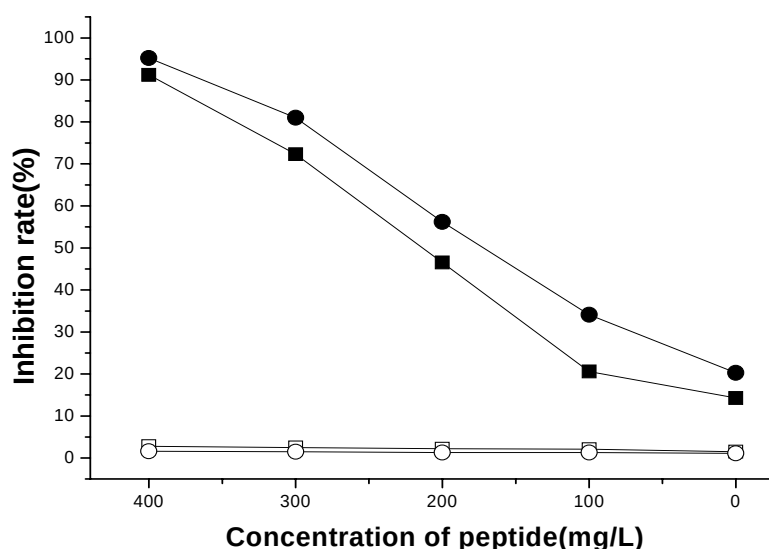


Fig.3 Inhibition of peptide 13L on binding of anti-*S.typhi* and anti-*E.coli* antibodies with LPS 7261 and LPS 2630

■ 13L on binding with LPS 7261 ● 13L on binding with LPS 2630
 □ 12mer on binding with LPS 7261 ○ 12mer on binding with LPS 2630

2.3 合成肽 13L-BC 免疫小鼠的抗体反应

于各次免疫前自小鼠眶静脉采血, 分离血清后, 检测血清内抗体与不同种属 LPS 的结合, 实验结果显示合成肽 13L-BC 交联物免疫小鼠的抗血清能与鼠伤寒沙门氏菌 LPS 7261 和大肠杆菌 LPS 2630 结合, 并以对后者的反应为强; 同时可以观察到血清内抗 LPS 抗体效价随免疫次数的增加而提高, 提示小鼠体内产生了针对 LPS 的再次免疫应答 (图 4)。

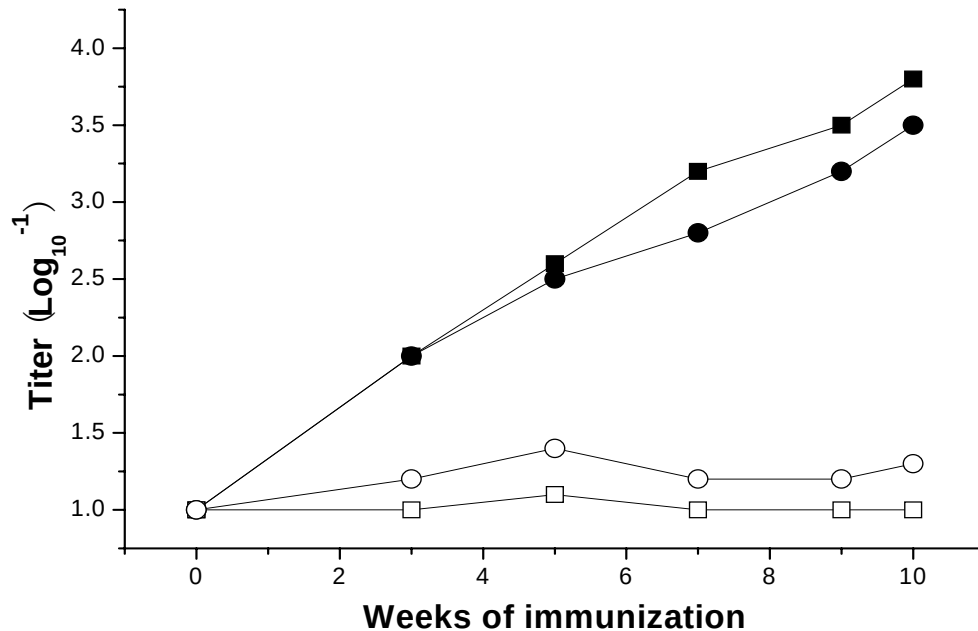


Fig.4 Antisera titer to LPS 2630 and LPS 7261 in mice immunized with peptide 13L and BC as control

■—■Antibody to LPS 2630 in mice immunized with 13L
●—●Antibody to LPS 7261 in mice immunized with 13L
□—□Antibody to LPS 2630 in mice immunized with BC
○—○Antibody to LPS 7261 in mice immunized with BC

2.4 灭活大肠杆菌及不同种属 LPS 可加强合成肽 13L 的免疫效果

第 4 次免疫 2 周后, 给予小鼠灭活大肠杆菌及不同种属 LPS 攻击, 7 天后检测血清抗体效价结果显示小鼠血清内抗体效价均较加强前均有明显提高, 提示灭活菌及 LPS 攻击起到了特异性加强免疫 (Boost) (图 5)。此外, 对合成模拟肽免疫小鼠产生抗 LPS 抗体的维持时间及抗体水平观察结果显示, 末次免疫 3 个月后, 血清内抗体效价能维持在末次免疫后水平。

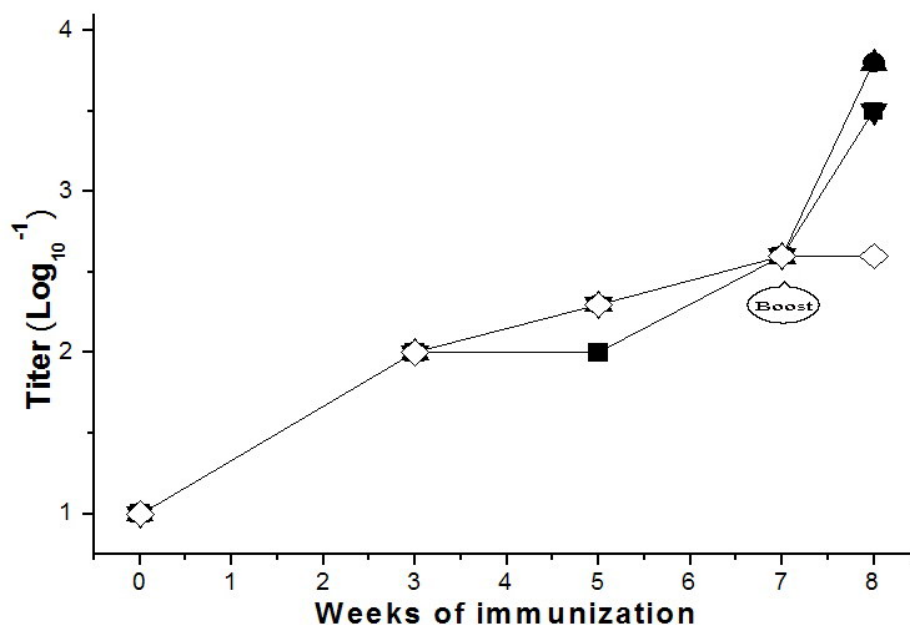


Fig.5 Boost immunization by using multi-LPS and inactivated *E.coli*

- Antibody response to LPS 2630 boosted by LPS 2630
- Antibody response t to LPS 2630 boosted by LPS 7261
- ▲—▲ Antibody response t to LPS 2630 boosted by 13L-BC
- ▼—▼ Antibody response t to LPS 2630 boosted by inactivated *E.coli*
- ◇—◇ Antibody response t to LPS 2630 boosted by BC

2.5 合成肽 13L-BC 免疫小鼠血清抗体类别检测

对合成肽 13L 免疫小鼠血清内抗体的 Ig 类别及抗体产生动态进行检测, 结果显示, 免疫小鼠血清内抗体主要以 IgG2a、IgG2b 及 IgM 为主 (图 6), 尤其以 IgG2a 为著; 而 IgG1 与 IgG3 几乎难以检出. 已知小鼠与人的血清免疫球蛋白中 IgG1 大约占 IgG 总量的一半, 但本研究中血清抗体检测显示几无 IgG1 类别抗体的存在, 提示该合成肽抗原属性有异于普通的蛋白质抗原.

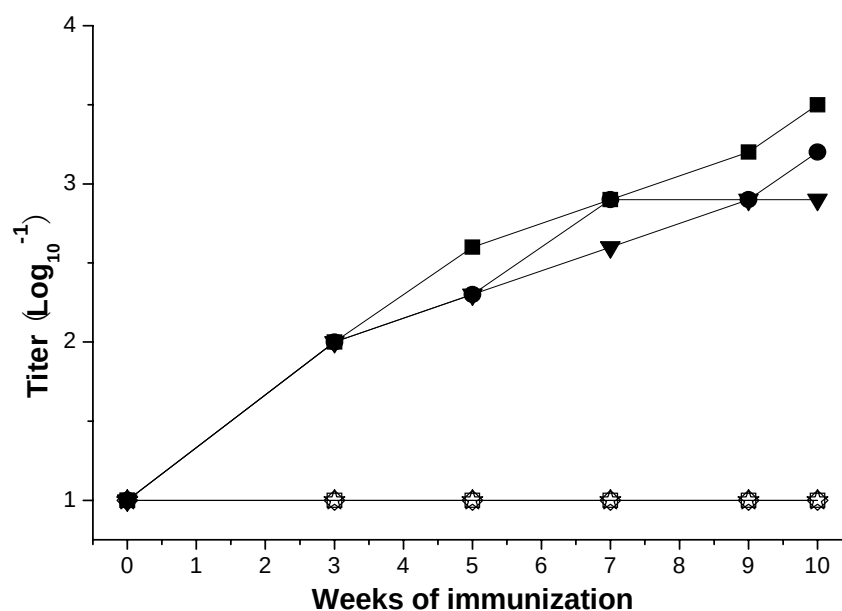


Fig.6 Antisera class of anti- LPS 2630 antibodies in mice immunized with peptide mimics 13L

- IgG2a
- IgG2b
- ▼—▼ IgM
- IgG1
- ☆—☆ IgG3
- ◇—◇ Control serum

2.6 合成肽 13L-BC 诱发对鼠沙门氏菌攻击的保护反应

将培养的鼠伤寒沙门氏菌稀释成不同浓度，注射小鼠腹腔内后观察小鼠死亡时间以建立攻击实验模型，结果显示以 $0.5 \times 10^7/\text{mL}$ 计量注射后，小鼠于 5 天死亡（表 1）。在免疫 4 次及腹腔注射灭活鼠伤寒沙门氏菌后第 8 天，自小鼠眶静脉采血检测血清抗体效价；次日以 LD_{90} 致死量（ $0.5 \times 10^7/\text{mL}$ ）鼠伤寒沙门氏菌 0.2 mL/只腹腔内注射，观察攻击后小鼠存活时间^[14]。结果显示，BC 免疫对照组小鼠均在细菌攻击后 6 天内死亡（ 5.3 ± 0.40 天），而合成肽 13L-BC 交联物免疫组小鼠存活时间较对照组有明显延长（ $P < 0.001$ ），平均存活时间为 12 天，最高存活时间达到 15 天，显示出免疫小鼠可在一定程度上抵御细菌的攻击（表 2）；从攻击前小鼠血清抗体效价检测结果与细菌攻击死亡情况来看，血清内抗体的效价与小鼠存活时间呈正相关，即小鼠血清内抗体效价越高，则细菌攻击后小鼠存活时间越长。

Table.1 The dose of *S.typhi* for challenge and survival time of normal mice

Dose of <i>S.typhi</i>	0.2ml ip $2.5 \times 10^8/\text{mL}$	0.2ml ip $0.3 \times 10^8/\text{mL}$	0.2ml ip $0.8 \times 10^7/\text{mL}$	0.2ml ip $0.5 \times 10^7/\text{mL}$
Survival time	3 h	6.5 h	4 days	5 days

Tab.2 Survival time of mice challenged with *S.typhi*

No.of animal group	Peptide mimics	n	Survival days (mean $\pm$ SD)
1	13L-BC	6	12 ± 1.3
2	PBS/BC	6	5.3 ± 0.40

2.7 合成肽 13L-BC 免疫小鼠诱导对内毒素性休克的保护

为确定模拟肽 13L 免疫是否能够产生针对不同种型 LPS 诱发的内毒素休克具有交叉保护性效应，我们设立了大肠杆菌 LPS 2630 及鼠伤寒沙门氏菌 LPS 7261 攻击组。经预实验确定给予小鼠 LPS 的注射量为 200ug/只，经尾静脉注射，观察小鼠的平均动脉压变化及攻击后小鼠的存活情况：

对照组小鼠注射 LPS 2630 后初始血压为 96.8 ± 7.57 mmHg，30min 时血压下降到 83.8 ± 7.0 mmHg，而后一直呈急速下降，90min 时血压降为 45.7 ± 5.15 mmHg，然后呈缓慢下降趋势；210min 时血压到达最低值 32.7 ± 7.35 mmHg，并维持此水平直至死亡，死亡时间均在 4-5h 内（图 7）；

合成肽 13L 免疫组小鼠初始血压为 104.3 ± 2.79 mmHg，30min 时血压无明显下降，观察血压下降趋势为缓慢下降，150min 时血压达最低值 76.6 ± 2.27 mmHg，而后血压缓慢上升回复正常水平，在 6 小时观察结束时全部小鼠仍存活（图 7），于观察结束后全部处死。实验结果显示，在 LPS 2630 攻击后 1、2、3 及 4 小时两组动物血压明显差别（ $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$ ）。因对照组均在 270 分钟内死亡，而免疫组是在 6 小时时处死，血压观察仅截止 270 分钟。

鼠伤寒沙门氏菌 LPS 7261 攻击组实验结果与上类似（图 8）。在攻击后 1、2、3 及 4 小时时两组动物血压差别则略小于 LPS2630 组（ $P > 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$ ）。

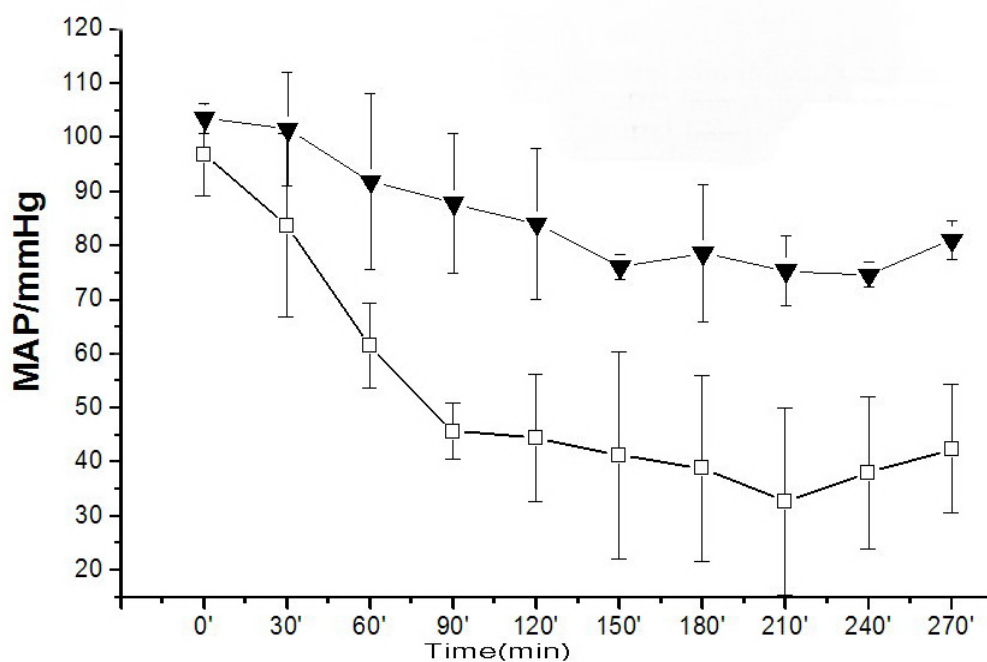


Fig.7 The dynamics of MAP/mmHg in mice injected with LPS 2630 (n=6)

▼—▼ 13L-BC immunized mouse □—□ BC immunized mouse

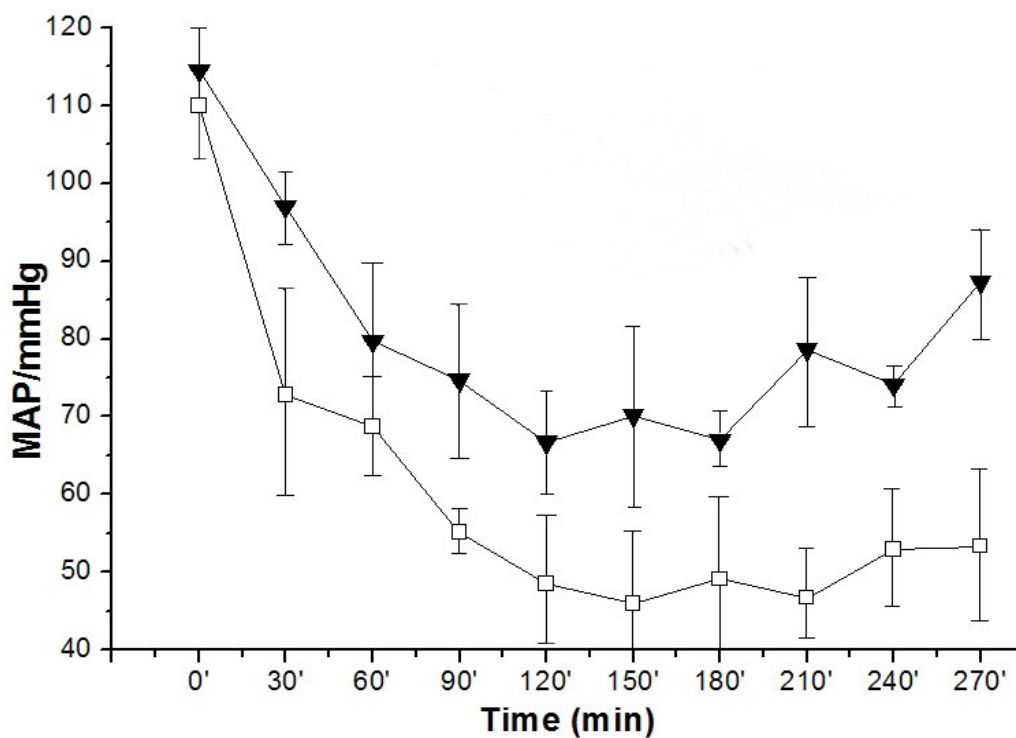


Fig.8 The dynamics of MAP/mmHg in mice injected with LPS 7261 (n=6)

▼—▼ 13L-BC immunized mouse □—□ BC immunized mouse

3 讨 论

迄今为止针对具交叉保护性 LPS 多表位模拟肽疫苗的研究中, 尚未有可成功地诱导动物抵御 LD₉₀ 细菌攻击及内毒素性休克的报道. 本课题组在前期的工作中, 从噬菌体肽库中筛选了数十个模拟位克隆^[10,15], 选

择三个模拟鼠伤寒杆菌 LPS 表位的序列合成短肽 13a (SACPSWASFWCGG)、13b (SACFQFYPAACGG)、12w (GPPQWFFSQPQL), 并证明用这三种模拟短肽免疫动物后, 可诱发机体产生针对鼠伤寒杆菌 LPS 的抗体应答, 但由于所获模拟位合成肽的免疫原性较弱, 所产生的抗体效价较低, 虽然对鼠伤寒杆菌攻击具有一定的保护作用, 但显然还不够理想. 而本次筛选获得了能够与纯化的抗大肠杆菌 L2630 多抗及纯化的抗鼠伤寒沙门氏菌 L7621 多抗结合的交叉反应性噬菌体克隆 ECS-5(c-XEDGLLX-C), 据此对其克隆序列进行重新设计及多肽合成, 获得了 LPS 表位模拟短肽 13L (SACQEDGLLGCGG), 并制备了 13L-BC 交联物为免疫原. 实验结果证明, 合成肽 13L-BC 交联物免疫的小鼠体内有抗 LPS 多克隆抗体的产生, 且抗体效价随着免疫次数的增加而提高, 即小鼠体内产生了针对 LPS 的再次免疫应答. 提示通过筛选表位模拟肽的方法, 已将天然 LPS 的 TI 抗原性质转变为模拟肽的 TD 抗原性质, 证明了表位模拟这一方法运用在制备多糖抗原模拟肽疫苗方面的可行性. 对免疫小鼠所产生的抗 LPS 抗体检测发现, 该抗体不仅能够与鼠伤寒沙门氏菌 LPS (LPS 7261) 结合, 亦能与大肠杆菌 LPS (LPS 2630) 结合, 证明作为免疫原的合成肽 13L 成功的模拟了不同种属 LPS 的保守或交叉性表位, 为后续构建交叉保护性 LPS 多表位模拟肽疫苗的工作奠定了基础. 从抗 LPS 抗体产生情况及规律分析, 提示该合成肽交联物成功诱导了抗两种 LPS 的再次抗体应答, 而且这种应答可被具不同载体的 LPS 表位所加强. 在前期工作中, 我们曾用灭活鼠伤寒沙门氏菌在合成肽四次免疫后进行加强, 而本次在专门为观察加强免疫效果的实验中采用了灭活大肠杆菌与两种 LPS、13L-BC, 结果如图 5 所示, 灭活大肠杆菌与 LPS 均可明显提高抗体水平. 这一结果的意义在于: 合成肽疫苗可作为一种基础免疫, 而天然免疫原, 包括细菌感染及其释放的 LPS 可加强合成肽疫苗的抗体反应, 可望在感染初期即迅速激发抗体的回忆反应; 此外, 正如近年许多用不同形式的抗原加强免疫所获良好免疫效果一样, 本实验结果也证明不同的载体也可诱发抗体再次应答. 本实验中合成肽 13L 诱发抗 LPS 抗体的另一有趣现象是抗体亚类分布. 已知人与小鼠血清免疫球蛋白均以 IgG1 含量最高, 约占总免疫球蛋白的一半以上, 而本实验中小鼠的抗 LPS 抗体则以 IgG2a 为主, 其次为 IgG2b 与 IgM, 而 IgG1 几乎测不出, 我们也曾用该抗原免疫小鼠进行融合获得一株与多种 G-菌结合的单克隆抗体, 也为 IgG2a (未发表资料). 推测 13L-BC 虽为短肽-蛋白交联物, 但由于模拟了 LPS 表位, 诱发了与普通蛋白质抗原不同的抗体反应.

在对细菌攻击的保护性研究中, 前期获得的 3 个短肽交联物免疫动物与未免疫小鼠 5 天生存时间比较, 均为不超过 10 天(分别为 6.7 ± 0.75 , 9.4 ± 1.42 和 9.0 ± 0.86)^[14], 而本次 13L-BC 诱发的保护性免疫则可使小鼠存活达到平均 12 天以上. 并发现血清中抗 LPS 多克隆抗体能够产生保护性作用的有效效价为 $1:800(\text{Log}_{10}^{-1} 2.9)$, 即血清中抗体效价在 1:800 以上的小鼠在细菌攻击后存活时间均较对照组小鼠延长一倍以上, 且小鼠存活时间与体内抗 LPS 多克隆抗体效价呈正相关, 合成肽 13L 免疫小鼠中血清抗体效价达 $1:6400(\text{Log}_{10}^{-1} 3.8)$ 的小鼠存活时间超过 13 天, 在重复试验中还见到 5 只动物中有 2 只小鼠未死亡 (未发表资料), 由此可说明合成肽 13L 序列模拟位点优于以往所获序列.

本实验评价模拟肽疫苗诱导保护性免疫效果的另一个重要指标就是能否防止内毒素性休克的发生, 或减轻其发生的程度. 已知脂多糖 LPS 可引起实验动物休克, 导致低血压、代谢性酸中毒、血液浓缩, 甚至引发实验动物在数十分钟内死亡^[16]. 为进行针对 LPS 诱发内毒素性休克的保护性效应的研究, 我们建立了 LPS 诱导内毒素性休克小鼠模型, 通过对实验条件的摸索, 确定了经尾静脉注射, 给予小鼠 LPS 2630 的注射量为 200ug/只的实验条件, 采用经颈总动脉插管压力以换能器 (Pclab 数据采集系统) 对 LPS 攻击后小鼠的平均动脉压变化及其存活情况进行观察. 实验分组中, 对照组小鼠为 BC 免疫, 其血清内无抗 LPS 抗体的产生, 注射 LPS 导致了小鼠内毒素性休克的发生, 表现为小鼠的平均动脉压急剧下降及小鼠均在 270 分钟内的死亡, 压力换能器对实验动物的血压、心率与呼吸进行了连续监测, 我们每 15 分钟记录其数值, 论文篇幅所限仅给出血压变化, 该方法客观、连续地记录了血压的变化过程, 结果证明我们利用尾静脉注射 LPS 的方法成功的建立了小鼠内毒素性休克模型. 合成肽 13L 免疫组小鼠能够在一定程度上抵御 LPS 攻击所致的血压下降, 在攻击后 1、2、3 及 4 小时四个时间点上, 免疫组小鼠与对照组小鼠血压明显差别, 对 LPS2630 攻击的保

护作用 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$) 优于对 LPS7260 的保护 ($P > 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$)。该结果可证实合成肽 13L 的接种可诱导小鼠对内毒素性的休克。如果从实验组与对照组的死亡时间判断, 对照组均死于 270 分钟内, 而实验组均为 360 分钟时处死, 两组的区别也是十分明显的。在后续实验中, 拟尝试对内毒素休克模型进一步改进, 比如将未死亡的小鼠进行插管动脉结扎, 皮肤缝合后继续观察生存时间。实验结果还显示而且这种保护与血清抗体效价有相关性, 提示是血清内抗体阻断了 LPS 的作用, 有效的抑制了 LPS 诱发内毒素休克的发生发展。同时, 在使用鼠伤寒沙门氏菌 LPS 7261 作为攻击物的研究中, 结果与 LPS 2630 攻击组类似, 提示合成肽 13L 免疫的小鼠体内产生了具有针对不同种型 LPS 的交叉保护性抗体, 并且抗体的产生可有效的抑制不同种型 LPS 所致的内毒素休克。除用上述两种 LPS 致内毒素休克外, 我们还发现免疫小鼠不能抵御或减轻克雷伯菌 LPS 导致的内毒素性休克(未发表资料), 提示合成肽 13L 所诱导免疫的保护性仍有一定的局限性。

在上述工作基础之上, 我们还对免疫小鼠血清抗体持续时间做了观察, 最长观察时间为末次免疫后 3 个月, 仍然能够测出较高水平的抗体, 因考虑是否存在自然感染对免疫小鼠的加强免疫作用, 该部分工作有待重复, 因此未加入文中。但从应用角度出发, 人类不能生活在与 SPF 小鼠一样的环境中, 如果自然感染能够加强并维持血清抗体效价也许是有意义的现象。此外, 在该实验组长期观察结束时, 我们选择 3 只小鼠进行了单克隆抗体制备, 获得 1 株可与 7 种 G-细菌菌体及 4 种 LPS 反应的单克隆抗体(另文发表)。这也间接证明了合成肽 13L 的模拟位特点。

上述结果均提示 LPS 交叉表位模拟肽 13L 作为 LPS 交叉保护性疫苗候选的可行性。在后续的研究中, 我们将对合成肽模拟的表位进行相关的分析, 并考虑是否利用通用性 T 表位短肽共同作用来增强模拟肽的免疫效应。对于免疫后小鼠体内产生的抗 LPS 多克隆抗体能否针对不同种属细菌的攻击均产生有效的保护性作用以及免疫后小鼠 T 细胞的功能变化予以关注, 尤其需观察 LPS 模拟肽能否诱发针对 LPS 的 T 细胞应答。

参 考 文 献

- 1 Alexander, C., Rietschel, E.T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res.* 2001.7, 167–202
- 2 Beutler, B., Rietschel, E.T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* 2003.3, 169–176
- 3 Rodriguez, A., Rello, J., Neira, J., et al. Effects of high-dose of intravenous immunoglobulin and antibiotics on survival for severe sepsis undergoing surgery. *Shock* 2005.23, 298–304
- 4 David, S.A. Towards a rational development of antiendotoxin agents: novel approaches to sequestration of bacterial endotoxins with small molecules. *J. Mol. Recogn.* 2001. 14, 370–387
- 5 Müller-Loennies S, Brade L, Brade H. Neutralizing and cross-reactive antibodies against enterobacterial lipopolysaccharide. *Int J Med Microbiol.* 2007.297(5):321–340
- 6 Hou Y, Gu XX. Development of peptide mimotopes of lipooligosaccharide from nontypeable *Haemophilus influenzae* as vaccine candidates. *J Immunol.* 2003, 170(8):4373–4379
- 7 Shim DH, Chang SY, Park SM, et al. Immunogenicity and protective efficacy offered by a ribosomal-based vaccine from *Shigella flexneri* 2a. *Vaccine.* 2007.25(25):4828–4836
- 8 Moingeon P, Almond J, Wilde M: Therapeutic vaccines against infectious diseases. *Current Opinion in Microbiology* . 2003, 6:462–471
- 9 Dharmasena MN, Jewell DA, Taylor RK. et al. Development of Peptide Mimics of a Protective Epitope of *Vibrio cholerae* Ogawa O-antigen and Investigation of the Structural Basis of Peptide Mimicry. *J Biol Chem.* 2007.282(46):33805–33816

- 10 罗海波, 郑山根, 朱平, 等. 大肠杆菌脂多糖 L2630 模拟位的研究. 细胞与分子免疫学杂志, 2004,20(6): 682-685
- 11 谭艳, 陈政良. C1q 结合十二肽的活性研究. 免疫学杂志, 2004,(06):420-423
- 12 鲍永利, 富宁, 于春雷, 等. 交叉反应性抗类脂 A 单克隆抗体的制备及其性质鉴定. 免疫学杂志, 1998,14 (1):22-24
- 13 郑山根, 刘北一, 朱平, 等. 交叉保护性抗 LPS 多克隆抗体的制备与 LPS 多表位模拟肽的筛选. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003,23(11):903-906
- 14 罗海波, 郑山根, 文维延, 等. LPS 表位模拟肽诱导小鼠保护性免疫的研究. 免疫学杂志. 2007,23(2): 117-120
- 15 文维延, 韩强涛, 富宁. 脂多糖保守表位模拟肽的筛选与鉴定. 生物化学与生物物理进展. 2001,28(2): 222-226
- 16 Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature. 2002.420, 885-891

Protective immunity induced by peptide mimics to LPS in mice with endotoxic shock*

LUO Hai-Bo^{1,2)}, ZHENG Jian²⁾, ZHU Ping²⁾, HUANG Lai-Qiang¹⁾, FU Ning²⁾**

(¹⁾Department of Life Sciences, Graduate School of Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China; ²⁾Department of Immunology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract To characterize a mimotop, peptide mimic to epitope on lipopolysaccharide (LPS) which was named as 13L and was expected to induce humoral immune response to LPS and a protective immunity, peptide 13L was synthesized and conjugated to Blue Carrier (BC) as immunogen. BALB/c mice were immunized with peptide 13L-BC conjugate and BC only as control. Anti-LPS antibodies of mice immunized with peptide 13L-BC were detected by ELISA using peptide 13L-BSA as coating antigen. Survival time of mice challenged with *S.typhi*, and dynamics of MAP/mmHg in mice injected with LPS were observed. The results showed that specific antibodies against *S.typhi*-LPS 7261 and *E.coli*-LPS 2630 were elicited in mice immunized with peptide 13L-BC conjugate, and could be boosted by inactive bacterial and LPS. The main isotype of anti-LPS antibodies were IgG2a, IgG2b and IgM, but less IgG1 and IgG3. The survival time of mice infected with *S.typhi* were 12±1.3 days and 5.3±0.4 days ($P < 0.01$) in group immunized with peptide 13L conjugate and with BC, respectively. And the peptide 13L-BC can also elicit protective immunity against endotoxic shock by LPS. The dynamics of MAP/mmHg observed by carotid Artery catheterization showed a significant difference between mice immunized with peptide 13L-BC and mice immunized with BC only in 1, 2, 3 and 4 hours after injection of LPS 2630 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$ and $P < 0.01$), and injection of LPS 7261 ($P > 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$ and $P < 0.01$). These results suggested that the peptide 13L can mimic the antigenicity of LPS epitopes to induce secondary antibody response like as thymus-dependent antigen, and also can elicit a protective immunity of mice from infection with G- bacteria and endotoxic shock. This peptide mimics could be a new vaccine candidate of LPS.

Key words Lipopolysaccharide(LPS), Peptide mimics, endotoxic shock, Protective immunity

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China(30471550).

**Corresponding author: Tel:86-20-61648221, E-mail:zfzn@fimmu.com

Received: March 20, 2008

Accepted: July 15, 2008

Available online: July 16, 2008