DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.017
第25卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 17
1536 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)17-1536-04

内毒素对巨噬细胞膜CD14表达的影响及与膜脂微环境关系

万志红,陆松敏,陈惠孙 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第二研究室,重庆 400042)

提 要:目的 研究内毒素脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)刺激下巨噬细胞膜脂改变对CD14表达的影响。方法 LPS体外刺激巨噬细胞,用Western blot及RT-PCR检测随时间变化细胞膜CD14 mRNA及蛋白表达的变化;同时观察膜脂微环境变化对CD14表达的影响。结果 LPS刺激巨噬细胞1 h CD14表达增加,5 h达高峰,8 h降至正常水平;而CD14 mRNA水平3 h达高峰,5 h降低。LPS刺激巨噬细胞5 h后细胞膜脂成分降解,膜脂流动性降低,CD14表达增加;用脂质体预处理后膜脂含量增加,膜脂流动性增加,CD14表达降低。结论 LPS体外刺激能上调巨噬细胞膜CD14表达,且此调节作用可能至少发生在转录水平;LPS刺激巨噬细胞使主要膜脂成分降解,膜流动性降低,这可能是LPS上调CD14的重要原因。

关键词:脂多糖;CD14;膜脂
中图法分类号:R329.2+7;R392.11;R996 文献标识码:A

Relationship between membrane phospholipids and CD14 expression of macrophage stimulated by LPS

WAN Zhi-hong, LU Song-min, CHEN Hui-sun (Department 2, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of cellular membrane phospholipids on CD14 protein expression of macrophage stimulated by LPS. Methods Changes of CD14 protein expression and CD14 mRNA of macrophages stimulated by LPS *in vitro* were determined by Western blotting and RT-PCR. Effects of membrane phospholipids on CD14 protein expression were also detected. Results After stimulation by LPS, CD14 expression increased at 1 h, reached the peak value at 5 h and decreased to the normal level at 8 h but CD14 mRNA reached the peak value at 3 h and decreased at 5 h. The levels of phospholipids and membrane fluidity decreased at 5 h but CD14 protein expression increased after LPS stimulation. After pretreatment with liposomes, membrane phospholipid microenvironment improved and CD14 protein expression decreased. Conclusion LPS can up-regulate CD14 protein expression, which might be regulated at least at the transcriptional level of the CD14 gene. Changes of membrane phospholipid microenvironment may be an important reason for the up-regulation of CD14 induced by LPS.

Key words: LPS; CD14; phospholipid

膜D14(mCD14)是一种糖磷脂肌醇(Glycosylphosphatidyl-inositol inkage, GPI)锚定的蛋白质,主要分布在单核/巨噬细胞膜表面脂质丰富的区域,是内毒素脂多糖的主要膜结合受体,在内毒素脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导的炎症反应中起重要作用。而膜脂不仅是构成细胞膜的主要成分,更是膜上活性蛋白(如酶、受体、泵)赖以生存的环境和功能单位,膜脂微环境状态同样可能会影响膜蛋白CD14的功能。但内毒素血症中巨噬细胞膜脂如何变化及是否影响CD14表达及功能尚疗提供新无确切报道。因此本实验旨在研究内毒素脂多糖(Lipoplysaccharide, LPS)作用下,膜脂与CD14蛋白表达的关系,为研究LPS诱导炎症反应的机制及内毒素血症的临床治的理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Phosphatidylcholine(PC), phosphatidylethanolamine(PE), phosphatidylserine(PS); LPS(O111: B4); DPH, 12-AS: Sigma产品;大鼠抗小鼠CD14抗体: Pharamigene产品;CD14及β-actin引物由上海生工合成。

1.2 实验分组

健康昆明种小鼠6只。体质量(20±2) g,由第三军医大学实验动物中心提供,腹腔内注射3%硫代乙醇酸钠0.6 ml/只诱生

作者简介:万志红(1970—),女,安徽省长丰市人,博士,主治医师,讲师,主要从事内毒素脂多糖致炎机制及感染病方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754289

收稿日期:2002-09-15;修回日期:2002-12-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

腹腔巨噬细胞，4 d 后分离正常小鼠腹腔巨噬细胞，调细胞浓度 1×10^6/ml，分组：正常对照组（Control）；内毒素组（LPS）；（O111：B4）100 ng/ml 刺激细胞混合脂质体组（Liposome pretreated）1、3、5、8 h 四个时相点；混合脂质体（PC∶PE∶PS＝100∶50∶25）与细胞共同孵育 5 h，再加 LPS（O111：B4）100 ng/ml 刺激细胞 5 h。

1.3　磷脂脂质体制备[1]

不同成分磷脂（PC∶PE∶PS＝100∶50∶25）溶于氯仿/甲醇（4∶1）5 ml，旋转蒸发仪上抽干，加 5 ml PBS 缓冲液，超声振荡器振荡 4 次，15 s/次，再用探头超声冰浴 200 W 5 次，45 s/次，直至溶液透亮，最后 4 ℃ 10 000× g 离心 30 min，去除不溶物和钛粉，0.22 μm 滤过除菌，4 ℃保存。

1.4　巨噬细胞膜磷脂测定[2]

用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液悬浮巨噬细胞，向其中加入 2 倍体积的氯仿/甲醇（2∶1）混合液，剧烈振荡 1 min 后 3 500 r/min 离心 15 min，小心吸去上层液，加入 1/4 下层液体积的甲醇∶水（1∶1），振荡后 3 500 r/min 离心 10 min，吸取全部下层液，氮气吹干。用毛细管电泳法测定细胞膜磷脂成分。

1.5　小鼠腹腔巨噬细胞膜流动性的变化[3]

DPH 检测细胞膜脂平均流动性 EX 360 EM 430 Slit 10；12-AS 检测细胞膜膜脂深层次流动性 EX 365 EM 420 Slit 10。12-AS 用甲醇配成 1 mg/ml 储存液，用前用 PBS 配成 0.012 5 mg/ml 应用液；DPH 用四氢呋喃配成 2×10^{-3} mol/L 储存液，用前用 PBS 配成 2×10^{-6} mol/L 应用液。

调细胞浓度为 1×10^6/ml。取 3 ml 细胞悬液加 12-AS 应用液 30 μl；取 2 ml 细胞悬液加 2 ml DPH 应用液，分别在 25 ℃孵育 30 min，用荧光分光光度计检测荧光强度并计算荧光偏振值（ρ），膜脂区微粘度（η）、分子排列有序系数（γ）。

1.6　Western blot 检测细胞膜 CD14 蛋白表达[4]

按常规步骤进行，包括膜蛋白提取、聚丙烯酰胺凝胶电泳、电转印、杂交显色。用 Bio-Rad 图像分析仪对 X 线片上目的条带进行分析，结果以面积× 灰度表示。分析结果时以每张膜各时相点与正常对照的相对值（%）进行统计分析。

1.7　RT-PCR 检测 CD14 mRNA 水平[4]

CD14 引物为：上游 5′TTG TTG CTG TTG CTT CTG GTG C 3′；下游 5′ CTC CGA ATA GAA TCC GAC TAG G 3′逆转录：总体积 20 μl。包括 RNA 4 μg，M-MULV 200 U，oligo（dT）15 0.5 μg，10 mmol/L dNTP 2 μl，Rasin 0.5 μl，5× buffer 4 μl，37 ℃ 60 min，95 ℃ 5 min，冰浴。

PCR：总体积 50 μl。包括 cDNA 5 μl，10 mmol/L dNTP 1 μl，10 ×buffer 5 μl，CD14 引物各 1 μl，β-actin 引物各 1 μl，95 ℃预变性 2 min，加 Taq 酶 0.5 μl，进入 30 个 PCR 循环，95 ℃ 45 s，58 ℃ 60 s，70 ℃ 90 s，循环结束后 72 ℃延伸 5 min。PCR 产物保存于 4 ℃。用 2%凝胶电泳，紫外灯下观察并照相。用 Bio-Rad 图像分析仪进行分析，CD14 及β-actin 条带分别以面积× 灰度表示，分析结果时以各组 CD14/β-actin（%）进行统计分析。

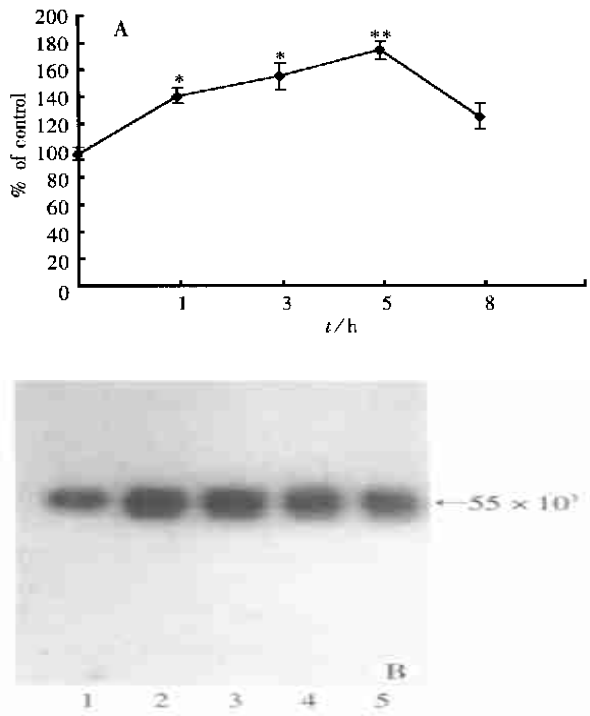
1.8　统计学方法

实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验。

2　结果

2.1　LPS 对巨噬细胞膜 CD14 表达的影响

巨噬细胞膜 CD14 为单一条带，分子质量为 55×10^3。LPS 体外刺激巨噬细胞 1 h 后，mCD14 蛋白表达明显增加，5 h 达最高，为对照组的 1.77 倍，8 h mCD14 蛋白表达明显下降，与对照组无显著性差异，见图 1，图 2。



*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control；A：Changes of mCD14 expression；B：mCD14 expression using western blot

图 1　LPS 刺激巨噬细胞不同时间后 mCD14 的表达

Fig 1　mCD14 expression of macrophage membrane stimulated by LPS at different time points

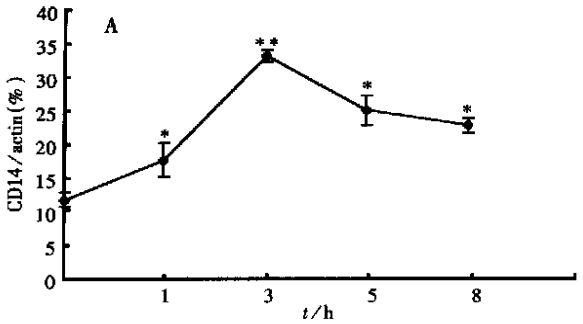
2.2　LPS 对巨噬细胞膜 CD14 mRNA 水平的影响，见图 2

巨噬细胞膜 CD14 mRNA 为 295 bp 条带，内参照β-actin mRNA 为 587 bp 条带。为消除各组间由于取用 RNA 量不同所产生的差异，故用 CD14/actin（%）来表示 CD14 mRNA 水平。LPS 体外刺激巨噬细胞 1 h 后，mCD14 mRNA 水平明显增加；3 h mCD14 mRNA 水平达高峰；5 h 后 mCD14 mRNA 水平降低，但仍高于对照组，8 h 后 mCD14 mRNA 水平与 5 h 比较无明显差异。

2.3　LPS 及混合脂质体对体外培养巨噬细胞膜磷脂成分的影响，见表 1

100 ng/ml 的 LPS 刺激巨噬细胞 5 h 后，细胞膜 4 种主要磷脂含量显著降低。加入混合脂质体预处理 5 h 后再加 LPS 刺激 5 h，细胞膜各磷脂成分含量显著增加。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; A: Changes of mCD14 mRNA; B: mCD14 mRNA expression using RT-PCR

图 2 LPS 刺激巨噬细胞不同时间后 mCD14 mRNA 的变化

Fig 2 Changes of CD14 mRNA of macrophage membrane stimulated by LPS at different time points

表 1 LPS 和脂质体对巨噬细胞膜脂的影响($\mu g/10^6$ cells, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of LPS and liposomes on membrane phospholipids of cultured macrophages($\mu g/10^6$ cells, $\bar{x}\pm s$)

	n	PI	PS	PE	PC
Control	6	7.60±0.39	3.16±0.51	10.28±1.49	16.34±1.31
LPS 5 h	6	3.21±0.37**	2.26±0.91*	5.96±0.59**	3.28±0.99**
Liposome pretreated	6	5.44±0.46#	3.25±0.32#	8.33±1.42#	10.02±1.29#

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$ *vs* LPS 5 h

2.4 LPS 及混合脂质体对巨噬细胞膜荧光偏振度(ρ)、微粘度(η)、分子排列有序系数(γ)的影响

100 ng/ml LPS 刺激巨噬细胞 5 h 后巨噬细胞膜荧光偏振度升高, 膜流动性下降, 微粘度和脂双层分子排列有序性系数增加。不仅细胞膜平均流动性(DPH 标记)下降, 细胞膜深层次流动性(12-AS 标记)也显著降低。而磷脂脂质体预处理后巨噬细胞膜脂区平均流动性及深层次流动性与 LPS 刺激 5 h 比较均有显著升高, 见表 2。

2.5 混合脂质体预处理对巨噬细胞膜 CD14 蛋白表达的影响

100 ng/ml LPS 刺激巨噬细胞 5 h 后 mCD14 蛋白表达明显增加; 用混合磷脂脂质体预处理后, 巨噬细胞膜 CD14 蛋白表达显著低于 LPS 刺激巨噬细胞 5 h 组。可见混合磷脂脂质体可明显抑制 mCD14 的表达, 见表 3, 图 3。

表 2 LPS 及脂质体对巨噬细胞膜荧光偏振度(ρ)、微粘度(η)、分子排列有序系数(γ)的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of LPS and liposome on fluorescence polarization(ρ), microviscocity(η) and order parameter (γ) of cultured macrophages($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

		Control	LPS 5 h	Liposome pretreated and LPS 5 h
DPH	ρ	0.100±0.005	0.277±0.010**	0.242±0.008#
	γ	0.069±0.003	0.203±0.012**	0.175±0.009#
	η	0.556±0.031	3.027±0.024**	2.220±0.015#
12-AS	ρ	0.251±0.003	0.435±0.010**	0.372±0.005##
	γ	0.183±0.011	0.339±0.010**	0.283±0.007##
	η	2.402±0.051	34.800±2.850**	8.455±0.825##

**: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* LPS 5 h

表 3 脂质体预处理对 LPS 刺激巨噬细胞 CD14 表达的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effect of stimulation by LPS pretreated with liposome on CD14 expression in macrophage membrane($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Groups	CD14	Percent of control
Control	3.08±0.17	100.00±3.21
LPS 5h	4.85±0.25**	157.58±4.87
Liposome pretreated	3.70±0.33#	120.21±2.98

**: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$ *vs* LPS 5 h

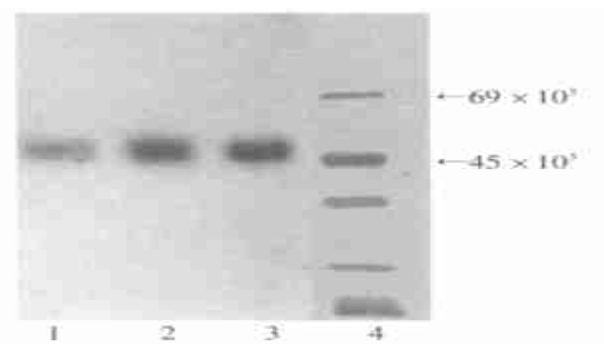


图 3 脂质体预处理对 LPS 刺激巨噬细胞 CD14 表达的影响

Fig 3 Effect of stimulation by LPS pretreated with liposome on CD14 expression

3 讨论

细胞膜结构和功能的完整性是维持细胞一定生理功能所必需的, 而膜脂不仅是构成细胞膜的主要成分, 更是膜上活性蛋白(如酶、受体、泵)赖以生存的环境和功能单位, 膜脂微环境状态改变同样可能会影响膜受体的功能[5,6]。内毒素血症时细胞膜上蛋白变性和交联, 使细胞膜相关受体受损, 受体数目和亲和力变化[7]。如糖皮质激素受体、肾上腺素能受体、胰岛素受体在内毒素休克时出现下调, 从而导致相应的代谢和功能障碍。

mCD14 是 GPI 锚定的蛋白质, 主要分布在单核/巨噬细胞膜表面脂质丰富的区域, 是 LPS 的主要膜结合

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

受体，已证实 LBP(LPS 结合蛋白)/CD14 系统是一类迄今唯一得到阐明的在机体识别内毒素和调控内毒素作用方面起关键作用[8]。但 LPS 对细胞膜 CD14 蛋白表达的影响文献报道并不一致，有报道认为 LPS 可上调巨噬细胞和中性粒细胞膜 CD14 蛋白的表达，而 Bazil 等认为 LPS 能下调 CD14 蛋白表达。本研究证实随 LPS 刺激巨噬细胞的时间不同，CD14 表达及 CD14 mRNA 水平发生不同变化。LPS 作用 1 h 后 CD14 表达及 CD14 mRNA 水平显著增加，CD14 表达 5 h 达高峰，8 h 降至正常水平；CD14 mRNA 水平 3 h 达最高，随之下降。可见 LPS 刺激早期即能够上调巨噬细胞膜 CD14 蛋白表达。

同时 LPS 作用下，细胞膜磷脂成降解及膜流动性降低，胆固醇/磷脂比例增高，LPS 受体 mCD14 蛋白表达及 mRNA 水平增加。近来发现缺乏胆固醇的单核细胞中，CD14 表达阳性细胞率和平均荧光强度明显减少，补充胆固醇后可以恢复 CD14 表达。已知胆固醇增多能降低膜流动性，通过改变膜生物物理特性而改变某些受体蛋白、离子通道蛋白结构与功能以及膜结合酶活性，影响细胞膜对外源性信号接收、传递等，从而调节膜受体蛋白表达[9]。因此 LPS 刺激巨噬细胞后使细胞膜的主要膜磷脂组分降解，膜磷脂含量降低，胆固醇/磷脂比例增高可能是 LPS 上调 CD14 的其中原因。

磷脂抗炎作用最初是在对脂蛋白抗炎作用的研究中发现的，但对它抗炎作用的机制却知之甚少。因此本实验研究了磷脂脂质体对 CD14 蛋白表达及 CD14 mRNA 水平的影响，探讨脂质体的抗炎机制。本实验结果表明，LPS 刺激巨噬细胞可使细胞膜脂环境改变(膜成分降解、膜流动性降低)，从而上调膜 CD14 的表达。用混合磷脂脂质体(PC∶PE∶PS＝4∶2∶1)与巨噬细胞预孵育后，能显著增加细胞膜主要磷脂含量，降低胆固醇/磷脂比例，升高细胞膜流动性，从而可能降低巨噬细胞膜 CD14 蛋白表达的上调程度。

参考文献：

[1] 王庆达，崔大敷，林其谁. 磷脂组成对脱脂蛋白模型多肽与脂质体相互作用的影响[J]. 生物化学与生物物理学报，1996，28(6)：624－632.

[2] Hotman R T，Johnson S B. Arachidonto acid defiency in streptozotocin-induced diabetes[J]. Proc Natl Acac Sci USA，1983，80(6)：2375－2379.

[3] 万志红，陆松敏，陈惠孙，等. 内毒素血症小鼠巨噬细胞膜脂改变对 CD14 表达及 TNFα 分泌的影响[J]. 第三军医大学学报，2001，23(7)：813－815.

[4] Sambrook J，Fritsch E F，Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1996. 672.

[5] 万志红，陈惠孙. LPS 受体及信号转导研究进展[J]. 国外医学分子生物学分册，2001，23(3)：160－162.

[6] Sugar I P，Mizuno N K，Momsen M M，*et al*. Regulation of lipases by lipid-lipid interactions：implications for lipid-mediated signaling in cells[J]. Chem Phys Lipids，2003，122(1－2)：53－64.

[7] Gwozdzinski K，Pieniazek A，Kaca W. Lipopolysaccharide from Proteus mirabilis O29 induces changes in red blood cell membrane lipids and proteins[J]. Int J Biochem Cell Biol，2003，35(3)：333－338.

[8] Wang S C，Klein R D，Wahl W L，*et al*. Tissue coexpression of LBP and CD14 mRNA in a mouse model of sepsis[J]. J Surg Res，1998，76(1)：67－73.

[9] Mojtaba E，Robert D B，John J A，*et al*. Cholesterol regulates the cell surface expression of glycophospholipid-anchored CD14 antigen on human monocytes[J]. Biochim Biophys Acta，1993，1149(2)：217－223.

(编辑　陈聪连)

(上接 1535 页)

发症，合理掌握剖宫产指征，已成为关注的问题。

胎儿因素是剖宫产率上升的主要因素，围产保健将孕产妇与胎婴儿并重，围产儿的安全，新生儿的健康，以及今后的生存质量，已作为对分娩质量的评判标准之一，因此胎儿窘迫成为剖宫产的重要指征。先进的胎儿监护手段，使早期胎儿缺氧得以及时发现。臀位分娩易发生、胎儿窘迫、死产(脐带脱垂)、产伤以及不易估计后出头的难易，在决定分娩方式时应先行 westin 评分，＞ 8 分阴道分娩可能性大，＜5 分则以剖宫产为宜。

以母亲因素作为剖宫产指征在各指征构成比上发生了变化；妊娠期肝内胆汁淤积症易发生不可预测的胎死宫内，近几年受到重视，我院在 1991 年以 ICP 作为剖宫产指征仅占 3.31%，2000 年占 26.9%，已位居首位。糖尿病合并妊娠及妊娠期糖尿病的孕产妇，产科并发症的发生率显著多于正常孕产妇[1]，并发症常使糖尿病病情复杂化，GDM 不是剖宫产指征，但常因各种并发症而需剖宫产结束分娩。

随着保护母婴安全的社会氛围的增加，孕产妇及家属不愿胎儿冒丝毫风险，也不愿产妇忍受分娩的疼痛，产科医生常也担心阴道分娩中出现母婴并发症而受到惩罚，以致医生失去阴道分娩助产的信心[2]。孕产妇及家属认为剖宫产是唯一安全的分娩方式。也是形成产科纠纷增多的原因。剖宫产率增加不是单纯的医疗问题，而是一个社会问题。我院 1991 年以社会因素作为剖宫产指征仅占 5.6%，2000 年已上升至 13.48%，社会因素也是导致剖宫产率增加的原因之一。

剖宫产率的上升与剖宫产指征变化存在一定的关系，让孕产妇及家属对分娩的生理过程有所了解，以及对医疗纠纷的公正处理，有助于产科医生以科学的态度来选择分娩方式。

关键词：剖宫产率；指征
中图法分类号：R719.801　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 薛建芳. 妊娠期糖尿病对母婴影响的分析[J]. 实用妇产科杂志，2001，17(5)：280.

[2] 黄醒华. 剖宫产的现状与展望[J]. 中国实用妇科与产科杂志，2000，16(5)：259.

(编辑　张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net