DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.029
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

文章编号:1000-5404(2001)07-0813-03

论著

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

万志红,陈惠孙,陆松敏,刘建仓 (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 以小鼠内毒素血症为模型,研究小鼠腹腔巨噬细胞膜脂改变,及其对受体CD14表达及血浆TNFα产生的影响。方法 48只小鼠分为3组。①对照组(n=8);②内毒素血症组:小鼠尾静脉注射LPS,200 μg/只,分1、3、5、8 4个观察时相点,每个时相点8只动物;③脂质体预处理组(n=8):小鼠腹腔注射卵磷脂脂质体1 ml(1 mg/ml),18 h后尾静脉注射LPS,200 μg/只,5 h后观察巨噬细胞膜脂成分、膜流动性及CD14阳性率、血浆中TNFα含量的变化。结果 LPS刺激下,巨噬细胞主要膜脂成分降解,细胞膜荧光偏振度、微粘度和分子排列有序系数增加,膜流动性显著降低;CD14阳性率增加,5 h达高峰,8 h降至正常水平;TNFα含量显著升高,3 h达高峰,8 h降至正常水平。磷脂脂质体预处理后,膜损伤减轻,CD14阳性率及TNFα含量均明显降低。结论 内毒素血症小鼠腹腔巨噬细胞膜磷脂降解,细胞膜从相对比较流动变为相对固化,这可能是膜受体CD14阳性率增加,TNFα产生增多的重要原因。脂质体预处理能修复膜损伤,减少膜CD14表达,减轻炎症反应。

关键词:内毒素;CD14;肿瘤坏死因子α;脂质体
中图法分类号:R392.12;R394.2;R631.1 文献标识码:A

Effect of changes of macrophage membrane phospholipids on CD14 expression and TNFα secretion in endotoxemia mice

WAN Zhi-hong, CHEN Hui-sun, LU Shong-min, LIU Jian-cang (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of phospholipids in macrophage membrane and its effect on the expression of CD14 and the secretion of TNFα in endotoxemia mice. Methods A total of 48 mice were divided into 3 groups: ①Control group (n=8); ②Endotoxemia group: 200 μg LPS was given via tail vein into 32 mice and samples were taken 1, 3, 5, 8 h after medication; ③ Liposome pretreatment group (n=8): 1 mg liposome was given intraperitoneally 18 h before LPS was given and samples were taken 5 h later. The contents of phospholipids, membrane fluidity, the expression of CD14 on the macrophage membrane and the plasma level of TNFα were observed. Results After the treatment of LPS, the main phospholipids of macrophage membrane was degraded, membrane polarization, micorviscocity and order parameters were increased, but the membrane fluidity was decreased significantly. The positive rate of CD14 on the membrane was increased, reached a peak at hour 5 after the treatment and declined to normal level at hour 8. The plasma TNFα was elevated markedly, came to peak at hour 3 and returned to normal at hour 8. In the mice with liposome treatment, the contents of membrane phospholipids and membrane fluidity rose remarkably, but the positive rate of membrane CD14 and the plasma TNFα level was decreased obviously. Conclusion The degradation of membrane phospholipids and the decrease of membrane fluidity in the macrophage after LPS treatment might be the reasons that result in the increase of CD14 expression and TNFα secretion. The LPS pretreatment can attenuate the membrane injury, inhibit membrane CD14 expression and reduce inflammatory reaction.

Key words: lipopolysaccharides (LPS); CD14; TNFα; liposomes

内毒素(LPS)刺激巨噬细胞产生各种细胞因子在内毒素血症发生发展中的作用已经得到证实,但其作用机制仍在探讨。mCD14(膜CD14)是一种糖磷脂肌醇(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的主要膜结合受体。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[1],膜脂微环境状态同样可能会影响膜蛋白CD14的功能。内毒素血症中巨噬细胞膜脂改变并不明确,而且其膜脂改变在LPS诱导的炎症反应中的作用地位如何?是否影响CD14的表达及功能,目前也尚无确切报道。本实验以小鼠内毒素血症为模型,研究小鼠腹腔巨噬细胞膜脂的改变,及其对CD14表达及TNFα分泌的影响。从一个新的角度研究内毒素血症的发生机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及实验模型

健康昆明种小鼠,雌雄不拘,体重(20±2) g,随机分为:①正常对照组(n=8):小鼠尾静脉注射生理盐水;②内毒素血症组:小鼠尾静脉注射LPS(O111:B4)200 μg/只,分1、3、5、8 h,每个时相点8只动物;③脂质体预处理组(n=8):小鼠腹腔注射卵磷脂脂质体(1 mg/ml)1 ml,18 h后尾静脉注射LPS(O111:B4)200 μg/只,5 h后观察结果。动物实验结束后,常规分离腹腔巨噬细胞用于实验。

1.2 磷脂脂质体制备[2]

10 mg磷脂溶于氯仿/甲醇(4:1)10 ml,旋转蒸发仪上抽干,加10 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 μmol/L滤过除菌,4 ℃保存。

1.3 巨噬细胞膜磷脂测定

按文献[3]稍加改进。用50 mmol/L Tris-HCl缓冲液悬浮分

作者简介:万志红(1970—),女,安徽省长丰县人,博士,主治医师,讲师,主要从事LPS致炎机制及感染病方面的研究,发表论文10篇,现在附属西南医院全军感染病研究所,重庆 400038。电话:(023)68754141
收稿日期:2000-09-10;修回日期:2000-11-28

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

离纯化的小鼠腹腔巨噬细胞，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。

1.4 小鼠腹腔巨噬细胞膜流动性的变化[4]

荧光探针：DPH 检测细胞膜脂平均流动性 EX360 EM430 Slit10；12-AS 检测细胞膜膜脂深层次流动性 EX365 EM420 Slit10。

方法：12-AS 用甲醇配成 1 mg/ml 储存液，用前用 PBS 配成 12.5 μg/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。

分离纯化小鼠腹腔巨噬细胞(PMΦ)，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)。

1.5 巨噬细胞膜 CD14 间接免疫荧光分析[5]

分离纯化小鼠腹腔巨噬细胞(PMΦ)，用 PBS 洗 2 遍，调浓度为 1×10^{6}/ml，取细胞悬液 100 μl 于硅化的尖底离心管中，加大鼠抗小鼠 CD14 抗体 0.5 μg，混匀，置 4 ℃ 30 min；用含 2%小牛血清，0.1%NaN_3的 D-Hanks 液洗 3 遍，每次 4 000 r/min，5 min；细胞沉淀加 FITC-羊抗鼠 IgG(1∶100) 100 μl，置 4 ℃ 30 min，用含 2%小牛血清，0.1% NaN_3的 D-Hanks 液洗 3 遍，每次 4 000 r/min，5 min；沉淀细胞用 0.5 ml 1%多聚甲醛 PBS 固定，避光保存于 4 ℃。在流式细胞仪上测定 5 000 个细胞，计算阳性细胞率(%)。

1.6 血浆 TNFα 的测定

参照试剂盒说明书，用双抗体夹心 ELISA 法测定。

1.7 统计学方法

采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 巨噬细胞膜脂改变

与正常对照组小鼠相比，尾静脉注射 LPS 1 h 后小鼠巨噬细胞膜主要磷脂组分已经降解，磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰乙醇胺(PE)含量显著减少($P<0.05$)，随着时间延长，各磷脂组分含量进一步减少($P<0.01$)，LPS 注射 8 h 后巨噬细胞膜磷脂含量降至最低，PC、PI、磷脂酰丝氨酸(PS)、PE 分别仅为正常组的 26%、16%、13%及 21%。与 LPS 作用 5 h 小鼠比较，卵磷脂脂质体预处理后小鼠腹腔巨噬细胞各主要膜脂成分(PC、PE、PS、PI)含量均有显著增加，见表 1。

表 1 LPS 及脂质体对小鼠巨噬细胞膜脂含量的影响(μg/10^7cells $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of LPS and liposome on memberane phospholipids of macrophages in mice(μg/10^7cells $\bar{x}\pm s$)

	n	PI	PS	PC	PE
Control	8	16.95±0.88	12.99±0.09	66.27±4.38	24.36±1.32
LPS 1 h	8	11.86±0.89 *	10.93±1.12	45.56±2.21 *	15.92±0.12 *
3 h	8	9.22±0.35 **	4.81±0.85 **	32.52±4.89 **	13.35±0.13 **
5 h	8	6.27±0.41 **	2.64±0.13 **	18.33±2.06 **	7.33±0.66 **
8 h	8	4.43±0.19 **	2.06±0.07 **	9.82±1.20 **	5.05±1.03 **
Liposome pretreated	8	13.7±0.45 ##	7.16±0.15 ##	34.14±1.38 ##	16.73±0.47 #

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

2.2 巨噬细胞膜脂流动性变化

LPS 注射后巨噬细胞膜荧光偏振度升高($P<0.05$)，膜流动性下降，微粘度和脂双层分子排列有序性系数增加($P<0.05$)。磷脂脂质体预处理后，巨噬细胞膜荧光偏振度降低，膜流动性显著升高($P<0.05$)，见表 2。

2.3 LPS 及磷脂脂质体对小鼠巨噬细胞膜 CD14 阳性率及 TNFα 含量的影响

与正常对照小鼠相比较，内毒素血症小鼠腹腔巨噬细胞膜 CD14 阳性率增加，5 h 达高峰($P<0.01$)，到 8 h 已降至正常水平($P>0.05$)；LPS 刺激巨噬细胞 TNFα 分泌显著增加，3 h TNFα 含量达最高($P<0.01$)，5 h 开始下降，8 h 基本降至正常水平($P>0.05$)。与 LPS 注射 5 h 小鼠比较，磷脂脂质体预处理后可显著降低细胞膜 CD14 表达及减少细胞因子 TNFα 分泌，见表 3。

表 2 LPS 及脂质体对小鼠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($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of LPS and liposome on membrane polarization(ρ), microviscocity(η) and order parameter(γ) of mice macrophages($\bar{x}\pm s$)

		Control (*n*=8)	Time after LPS injection				Liposome pretreated (*n*=8)
			1 h (*n*=8)	3 h (*n*=8)	5 h (*n*=8)	8 h (*n*=8)	
DPH	ρ	0.198±0.013	0.212±0.005 *	0.236±0.02 *	0.274±0.015 *	0.323±0.019 *	0.228±0.007 #
	γ	0.152±0.003 *	0.171±0.013 *	0.201±0.010 *	0.204±0.009	0.241±0.013 *	0.165±0.005 #
	η	1.511±0.058	1.711±0.022 *	2.107±0.091 *	2.946±0.067 *	4.715±0.086 *	1.966±0.031 #
12-AS	ρ	0.300±0.025	0.332±0.010 *	0.361±0.010 *	0.377±0.010 *	0.421±0.007 *	0.324±0.007 #
	γ	0.222±0.016	0.249±0.007 *	0.274±0.007 *	0.287±0.007 *	0.326±0.005 *	0.242±0.005 #
	η	3.750±0.114	5.187±0.044 *	7.293±0.044 *	9.084±0.044 *	21.590±0.031 *	4.765±0.031 #

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

表 3 LPS 及卵磷脂脂质体对小鼠巨噬细胞膜 CD14 阳性率及血浆 TNFα 含量的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Changes of CD14 positive rate in macrophage and contents of plasma TNFα treated with LPS or liposome($\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	CD14(%)	TNFα(ng/ml)
Control	8	43.95±3.74	30.21±2.87
LPS 1 h	8	54.80±1.49 **	56.32±5.22 **
3 h	8	64.75±1.92 **	78.33±6.98 **
5 h	8	70.48±3.92 **	45.88±5.74 *
8 h	8	41.18±4.20	39.14±4.10
Liposome pretreated	8	56.30±6.51 ##	33.45±2.79 #

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

3 讨论

巨噬细胞是机体炎症反应的主要参加者，内毒素脂多糖(LPS)刺激巨噬细胞产生各种细胞因子，诱发炎症反应。但各种细胞因子的拮抗剂均不能有效降低内毒素血症的死亡率，促使人们更进一步研究内毒素血症的机制及寻求有效的抗炎方法。我们以往的实验证实 LPS 及其脂 A 可以激活 PLA_2 导致膜降解[6]，提示细胞膜脂改变在 LPS 诱发炎症反应的病理生理中起重要

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

作用。

PI、PS、PC、PE 是膜磷脂的重要组成部分。本实验发现注射 LPS 1 h 后巨噬细胞膜磷脂成分显著降低, 3 h 降低非常显著, 8 h 膜脂含量仅为正常的 20%左右, 这在严重失控的炎症反应中可能起十分重要的作用。细胞膜脂改变与 LPS 及其脂 A 激活磷脂酶 A_2(PLA_2)导致膜降解有密切关系[6]。生理情况下, PIA_2 水解细胞膜上的磷脂改变细胞膜的动力学, 维持细胞的正常功能, 但 PIA_2 活性太高, 水解超过限度就破坏了细胞的结构。PIA_2 还能活化环氧化酶和脂氧化酶, 后两者分解细胞膜花生四烯酸(AA)产生脂介质, 同时有自由基形成。自由基对膜脂损伤的主要结果是脂质过氧化, 形成一些短链物质, 改变膜脂微环境和膜的通透性。此外有研究表明内毒素血症时, 磷脂的生物合成减少[7], 这可能也是细胞膜磷脂成分发生改变的重要原因。

为精确阐述膜脂流动性状态, 本实验采用两种荧光探针标记巨噬细胞膜脂, DPH 嵌入脂双层中, 反映整个脂肪链流动性的平均值; 而 12-AS 结合于膜磷脂的第 12 位碳上, 反映脂深层次的变化。结果表明小鼠尾静脉注射 LPS 后, 巨噬细胞膜荧光偏振度升高, 膜微粘度和脂双层分子排列有序性系数增加, 膜流动性显著下降, 细胞膜从相对较流动变得更趋于凝胶相, 且随时间延长, 流动性降低更为明显。造成细胞膜流动性变化的机制可能为[8]: ①多不饱和脂肪酸的过氧化, 导致细胞膜流动性降低, 膜上酶、受体及离子信道的脂质微环境改变。②活性氧与脂质过氧化产物可使蛋白质分子交联形成变性的高聚物, 从而使细胞膜流动性下降。另一方面膜流动性与膜上内源性磷脂酶 A_2 呈负相关, 即膜的硬化可激活内源性磷脂酶 A_2, 产生溶血磷脂。溶血磷脂分子的疏水头部横截面积大于亲水尾部, 似契状, 当它插入膜脂双层时, 膜流动性降低。此外溶血磷脂还可对膜脂产生去垢样作用, 加速膜结构的破坏作用。

本实验发现小鼠尾静脉注射 LPS 1 h 后腹腔巨噬细胞膜 mCD14 阳性率已显著增加, 到 5 h 达最高点, 8 h 降至正常水平。提示在 LPS 刺激巨噬细胞早期即可上调膜 CD14 的表达。mCD14 是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的蛋白质分子, 作为 LPS 的受体已得到公认, LPS 与 LBP(LPS 结合蛋白)形成复合物, 然后与单核/巨噬细胞膜 CD14 结合, 引起细胞内信号转导及细胞效应的产生, 触发一系列炎症反应综合征[9]。TNFα 是 LPS 刺激巨噬细胞产生的主要细胞因子, 它能模拟 LPS 的作用, 引起机体脓毒症反应。本实验结果显示: 小鼠尾静脉注射 LPS 后血浆 TNFα 含量显著增加, 3 h TNFα 含量达最高, 5 h 开始下降, 8 h 基本降至正常水平。研究表明 LPS 与 mCD14 结合后, 通过一系列信号转导过程激活核因子, 诱导 TNFα 产生, TNFα 又可诱导 mCD14 表达, 产生更多的炎症因子加重炎症反应。

脂质体是由磷脂双分子层膜形成的微球体, 在体内主要由单核/巨噬细胞吞噬, 通过膜成分交换可以改变细胞的膜脂质, 从而改变细胞功能[10]。本实验证实经磷脂脂质体预处理后, 小鼠腹腔巨噬细胞膜脂含量增加, 平均膜脂流动性和膜脂深层次流动性明显升高; 与小鼠尾静脉注射 LPS 5 h 相比, 用磷脂脂质体预处理的腹腔巨噬细胞膜 mCD14 阳性率明显降低, 而巨噬细胞分泌 TNFα 减少, 表明磷脂脂质体预处理可减少巨噬细胞膜 mCD14 表达, 减少 LPS 与细胞膜 CD14 结合, 由此减轻 LPS 诱发巨噬细胞分泌细胞因子 TNFα。

参考文献:

[1] 孙志贤 主编. 现代生物化学理论与研究技术[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1993. 287－288.

[2] 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.

[3] Hotman R T, Johnson S B. Arachidonic acid deficiency in streptozotocin-induced diabetes[J]. Proc Natl Acac Sci USA, 1983, 80: 2 375－2 379.

[4] 陆松敏, 刘建仓, 郭素清 等. 失血性休克时红细胞膜脂流动性及其相变温度的变化[J]. 第三军医大学学报, 1995, 17(5): 399－403.

[5] Landmann R, Knopf H P, Link S, *et al*. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide[J]. Infect Immun, 1996, 64(5): 1 762－1 769.

[6] Lu S M, Song S M, Liu J C, *et al*. Mechanism of erythrocytic membrane impairment in endotoxic shock in rabbits[J]. Chinese J Traumatology, 1996, 12(5): 37－41.

[7] Benito E, Bosch M A. Impaired phosphatidylcholine biosynthesis and ascorbic acid depletion in lung during lipopolysaccharide-induced endotoxaemia in guinea pigs[J]. Mol Cell Biochem, 1997, 175(2): 117－123.

[8] 吴其夏 主编. 体液因素和血液循环病理生理学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1992. 282－294.

[9] Schletter J, Heine H, Ulmer A J, *et al*. Molecular mechanism of endotoxin activies[J]. Arch Micobiol, 1995, 164(6): 383－389.

[10] Bankey P, Bcecherl E, Bibus D, *et al*. Liposomes modulate Kupffer cell endotoxin response[J]. Arch Surg, 1995, 130(5): 1 266－1 272.

(编辑　陈聪连)

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