DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.026
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
1306 2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)11-1306-03

细胞膜磷脂对 LPS-CD14 结合的影响

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 研究不同成分磷脂与巨噬细胞膜的结合特性及对 LPS-CD14 结合的影响,阐明磷脂的抗炎机制。方法 用 ^{14}C-PE 或 ^{14}C-PS 检测磷脂与膜的结合特性,同时观察小鼠血浆对结合的影响;并用 CD14 抗体阻断法测定磷脂对 LPS-CD14 结合的影响。结果 在正常小鼠血浆存在条件下,随磷脂浓度增加,磷脂与细胞膜的结合量也增加,而 ^{14}C-PS 和 ^{14}C-PE 相比较与细胞结合更多。不加血浆的实验组,磷脂与细胞膜的结合量明显减少。PE(10 μmol/L)能显著抑制 ^{14}C-PE(1 μmol/L)与细胞膜结合,PS(10 μmol/L)能非常显著抑制 ^{14}C-PS(1 μmol/L)与细胞膜结合。CD14 抗体能显著抑制 ^{14}C-PE 及 ^{14}C-PS 与细胞膜的结合,而小鼠 IgG 并无此抑制作用。结论 不同磷脂与细胞膜的结合量不同,不同磷脂在细胞膜上有各自的特异性位点;PE、PS 与 LPS 结合至 mCD14 是同一或邻近位置,从而调节依赖于 mCD14 的 LPS 炎症反应。

关键词:磷脂;脂多糖;CD14
中图法分类号:R329.24;R392.12;R631.1 文献标识码:A

Effect of cellular membrane phospholipids on LPS-CD14 binding

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

Abstract: Objective To study the characteristics of different phospholipids binding to macrophage membrane and its effects on LPS-CD14 binding. Methods Different phospholipids binding to macrophage membrane were detected by ^{14}C-PE or ^{14}C-PS and effects of mouse plasma on binding were studied at the same time. The effect of phospholipids on LPS-CD14 binding were deteted by anti-CD14 monoclonal antibodies inhibition method. Results Phospholipids binding to membrane were increased in the presence of mouse plasma, but PS bound to membrane with apparently higher affinity than PE. In 10-fold molar excess, PE inhibited ^{14}C-PE and ^{14}C-PS and psinhibited binding to membrane obviously. PE and PS binding to membrane was inhibited by CD14 anti-monoclonal antibody CD14 but not by mouse IgG. Conclusion PS, PE and LPS bind to the same or near-by regions of mCD14, thus it can modulate inflammation caused by LPS.

Key Words: Phospholipids; LPS; CD14

LPS(内毒素脂多糖)与单核/巨噬细胞膜 CD14 结合,促发一系列炎症反应,在内毒素血症的发生发展中起重要作用。以往的研究提示细胞膜脂改变可能会调节 LPS 诱发的炎性反应,但是否通过影响 CD14 功能尚不清楚。加入外源性磷脂改善膜成分,抑制 LPS 作用,究竟是使膜 CD14 表达减少?抑或是因为脂质体掩盖 CD14 结合位点而使 LPS-CD14 结合减少所致?尚不清楚。而阐明这些问题对研究内毒素血症发生机制,及采取相应的治疗措施有重要意义。因此,本实验旨在研究外源性磷脂与巨噬细胞膜的结合特性及磷脂对 LPS 与 mCD14 结合的影响,阐明磷脂的抗炎机制,为内毒素血症的预防及治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验细胞:健康昆明种小鼠,体重(20±2)g,腹腔内注射3%硫代乙醇酸钠0.6 ml/只诱生腹腔巨噬细胞,4 d 后分离正常小鼠腹腔巨噬细胞用于实验,每组 6 只(n=6)。

试剂:磷脂酰胆碱(Phosphatidylcholine, PC),磷脂酰丝氨酸(Phosphatidy-lethanolamine, PE),磷脂酰乙醇胺(Phosphatidylserine, PS):Sigma 产品。LPS, FITC-LPS(O111:B4):Sigma 产品。大鼠抗小鼠 CD14:购自 Pharamigen 公司;^{14}C-PE, ^{14}C-PS:购自 Amersham 公司。

1.2 磷脂脂质体制备[1]

不同成分磷脂溶于氯仿/甲醇(4:1)5 ml,旋转蒸发仪上抽干,加 1 ml PBS 缓冲液,超声振荡器振荡 4 次,15 s/次,再用探头超声仪冰浴超声 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 磷脂脂质体与巨噬细胞孵育不同时间对 FITC-LPS 与细胞膜结合的影响

10 μmol/L 混合磷脂脂质体(PC:PE:PS 摩尔比为 4:2:1),与小鼠腹腔巨噬细胞 3× 10^6 共同孵育 0、1、3、5、8 h 后,换培养基,再加 100 ng/ml FITC-LPS 刺激细胞 3 h,上流式细胞仪测定 5 000 个细胞,计算细胞平均通道荧光。

1.4 不同浓度 ^{14}C-PE, ^{14}C-PS 与细胞膜的结合[2]

调巨噬细胞浓度为 5× 10^6/ml,取 50 μl 细胞悬液 37 ℃与不同浓度 ^{14}C-PE 或 ^{14}C-PS(0、5、10、15、20 μmol/L)孵育 10 min 后,抽滤到玻璃纤维滤纸上,膜片在 80 ℃烤干,液闪法测定 cpm 值。

1.5 用不同种未标记的磷脂(PC、PE、PS)与 ^{14}C-PE 或 ^{14}C-PS 竞争结合到细胞膜上

调巨噬细胞浓度为 5× 10^6/ml,取 100 μl 细胞悬液分别与 10 μmol/L PC、PE、PS 37 ℃孵育 10 min 后,各管再加入 ^{14}C-PE 或 ^{14}

作者简介:万志红(1970—),女,安徽省长丰市人,博士,助理研究员,主要从事 LPS 致炎机制及感染病方面的研究,发表论文 5 篇。现在附属西南医院全军感染病研究所工作。重庆 400038。电话:(023)68754141

收稿日期:2001-03-20;修回日期:2001-06-05

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

C-PS 1 μmol/ L, 37 ℃孵育 10 min。抽滤到玻璃纤维滤纸上, 膜片在 80 ℃烤干, 液闪法测定 cpm 值。

1.6　CD14 抗体对^{14}C-PE 或^{14}C-PS 与细胞膜结合的影响

调细胞浓度为 5× 10^6 ml, 取 50 μl 细胞悬液与 CD14 抗体 2 μg 37 ℃孵育 30 min 后, 分别加入 10 μmol/ L ^{14}C-PE 或^{14}C-PS, 37 ℃再孵育 10 min。抽滤到玻璃纤维滤纸上, 膜片在 80 ℃烤干, 液闪法测定 cpm 值。

2　结果

2.1　磷脂脂质体对 FITC-LPS 与膜结合的影响

5 μmol/ L 磷脂脂质与巨噬细胞孵育不同时间(0、1、3、5、8 h)后, 检测细胞膜结合 FITC- LPS 的平均通道荧光。结果发现: 磷脂脂质体与巨噬细胞孵育 1 h 后, 细胞膜平均通道荧光减少, 表明 LPS 与细胞膜结合减少, 共同孵育 5 h 对 LPS 与细胞膜的结合作用抑制最强, 见图 1。

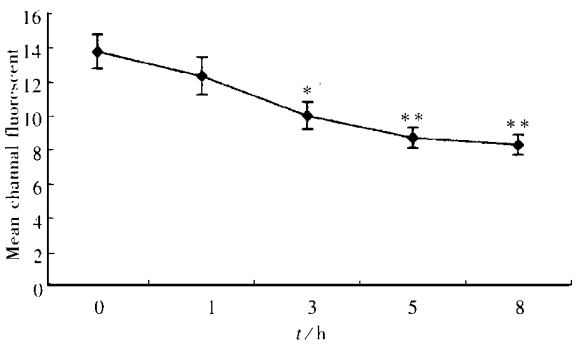


图 1　与脂质体孵育不同时间的巨噬细胞和 FITC-LPS 结合的作用

Fig 1　Binding of FITC-LPS to macrophage membrane pre-incubated with liposome in different time

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* control

2.2　不同浓度^{14}C-PE、^{14}C-PS 与细胞膜的结合及血浆的作用

分别用不同浓度的^{14}C-PS, ^{14}C-PE 与巨噬细胞孵育, 结果显示: 在正常小鼠血浆存在的条件下, 随磷脂浓度增加, 磷脂与细胞膜的结合量也相应增加, 而^{14}C-PS 与细胞膜结合比^{14}C-PE 更多。不加血浆的实验组, 磷脂与细胞膜的结合量明显减少。可见血浆中含有促进磷脂与膜结合的成分, 见图 2、3。

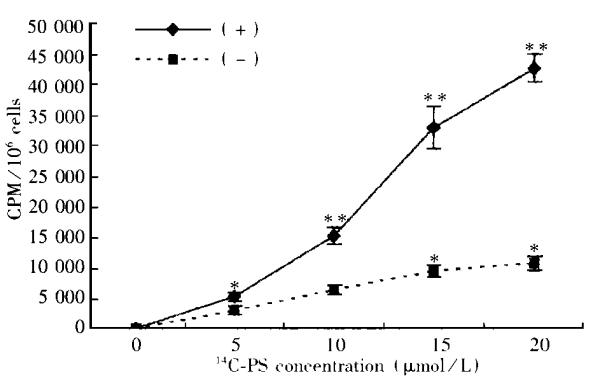


图 2　不同浓度^{14}C-PS 与细胞膜结合及血浆的作用

Fig 2　Binding of defferent concentration of ^{14}C-PS to membrane in and the effects of plasma

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control (+) plasma, (-) no plasma

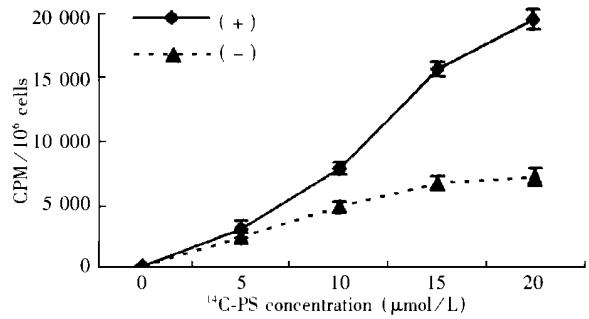


图 3　不同浓度^{14}C-PE 与细胞膜结合及血浆的作用

Fig 3　Binding of defferent concentration of ^{14}C-PE to membrane and the effects of plasma

*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* control (+) plasma, (-) no plasma

2.3　不同未标记的磷脂(PC、PE、PS)与 ^{14}C-Phospholipids 竞争结合到细胞膜

未标记磷脂浓度 10 倍于标记磷脂浓度时, PE(10 μmol/ L)能显著抑制^{14}C-PE(1 μmol/ L)与细胞膜结合, 而 PC、PS 抑制^{14}C-PE 与细胞膜结合的能力很弱; 同时 PS(10 μmol/ L)能非常显著抑制^{14}C-PS(1 μmol/ L)与细胞膜结合, 而 PC、PE 仅有较弱的抑制^{14}C-PS 与细胞膜结合的作用。结果提示同种脂类可竞争性与细胞膜结合, 而不同种脂类几乎不能相互竞争, 见表 1。

表 1　^{14}C-PE 或^{14}C-PS 和不同磷脂竞争性抑制与细胞膜结合

Tab 1　Competitive inhibition of different phospholipids with ^{14}C-PE or ^{14}C-PS and membrane binding

	^{14}C-PE(cpm)	^{14}C-PS(cpm)
Control	9 765.47±658.93	12 966.54±864.12
10 μmol/ L PC	7 538.67±526.15	9 857.77±576.23
10 μmol/ L PE	4 954.60±212.27 *	9 534.34±753.34
10 μmol/ L PS	7 951.64±604.36	6 345.23±412.56 *

*: $P<0.01$ *vs* Control

2.4　CD14 抗体对^{14}C-PE 或^{14}C-PS 与细胞膜结合的影响

分别用 10 μg/ ml 的大鼠抗小鼠 CD14 抗体及小鼠 IgG 与巨噬细胞孵育后, 检测对^{14}C-PE, ^{14}C-PS 与细胞膜结合的影响。结果表明: CD14 抗体能显著抑制^{14}C-PE 及^{14}C-PS 与细胞膜的结合, 且 CD14 抗体对^{14}C-PS 与细胞膜结合的抑制作用明显强于对^{14}C-PE 与细胞膜结合的作用。此外, 小鼠 IgG 对^{14}C-PE, ^{14}C-PS与细胞膜的结合无显著影响, 见表 2。

表 2　抗 CD14 抗体对^{14}C-PE 或^{14}C-PS 与细胞膜结合的影响

Tab 2　Effect of auti CD14 antibody on ^{14}C-PE or ^{14}C-PS binding to cell membrane

	^{14}C-PE(cpm)	^{14}C-PS(cpm)
Control	15 341.2±1 342.10	25 333.05±2 293.49
CD14 Ab	12 975.4±894.40 *	19 248.44±845.81 **
Mouse IgG	14 956.4±1 242.10	23 871.24±1 922.10

*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* control

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

3 讨论

LPS 与膜 CD14 结合是炎症反应的始发过程。我们用磷脂脂质体与巨噬细胞预孵育后，发现细胞膜平均通道荧光减少，表明磷脂脂质体可以抑制 LPS 与细胞膜受体结合。

3.1 磷脂脂质体与细胞膜的结合特性

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。在正常小鼠血浆存在条件下，随磷脂浓度增加，磷脂与细胞膜的结合量也增加，而^{14}C-PS 和^{14}C-PE 相比较与细胞结合更多。不加血浆的实验组，磷脂与细胞膜的结合量明显减少。PE(10 μmol/L)能显著抑制^{14}C-PE(1 μmol/L)与细胞膜结合，而 PC、PS 抑制作用较弱；同时 PS(10 μmol/L)能非常显著抑制^{14}C-PS(1 μmol/L)与细胞膜结合，而 PC、PE 抑制作用很弱。提示血浆中含有促进磷脂与膜结合的成分；同时细胞膜上不同磷脂结合量不同，而不同磷脂在细胞膜上有各自的特异性位点；PS 结合位点可能和 LPS 接近或相同，所以能更有效地抑制 LPS 与膜结合。

3.2 血浆成分对磷脂转运的影响

从实验中我们发现血浆成分有增强磷脂与细胞膜结合的作用。已证实血浆中 LBP 为一脂质转运蛋白，它与脂类转运蛋白(LTP)，磷脂转运蛋白(PLTP)及胆固醇酯转运蛋白(CEPT)有较高同源性；血浆中 sCD14 也能结合磷脂，LBP 在其中起催化作用，因此血浆中 LBP 和 sCD14 共同参与磷脂转运[3,4]。磷脂能被 LBP，sCD14运送至脂蛋白，磷脂脂质体及与细胞膜相结合[5,6]。正常情况下，LBP 和 sCD14 可能与其它磷脂转运蛋白一起在脂蛋白，血浆和细胞膜之间结合转运磷脂，维持机体脂质平衡。

Hailman 等[4]先用 BODIPY-LPS 与 sCD14 结合形成复合物，再与 LBP 及荧光标记磷脂酰乙醇胺(R-PE)共同孵育，发现 LBP 能促使 R-PE 与 sCD14 结合增加，同时减少 BODIPY-LPS 与 sCD14 结合量，且有时间依赖性，说明 R-PE 能与 BODIPY-LPS 竞争性结合 sCD14。我们的结果发现磷脂脂质体能与 LPS 竞争性结合血浆成分(可能为 LBP 及 sCD14)，从而减少 LPS/LBP 刺激细胞膜 CD14，这可能是磷脂脂质体抗炎的重要机制。

3.3 磷脂脂质体对 LPS-CD14 结合的抑制作用

我们分别用 10 μg/ml 的大鼠抗小鼠 CD14 抗体及小鼠 IgG 与巨噬细胞孵育后，检测对^{14}C-PE，^{14}C-PS 与细胞膜结合的影响。结果表明：CD14 抗体能显著抑制^{14}C-PE 及^{14}C-PS 与细胞膜的结合，而对^{14}C-PS 与细胞膜结合的抑制作用程度明显强于^{14}C-PE。此外，作为对照的小鼠 IgG 对^{14}C-PE，^{14}C-PS 与细胞膜的结合无显著影响。表明磷脂能与巨噬细胞膜 CD14 结合，且 PS 与 CD14 结合的能力强于 PE，CD14 与磷脂结合后无法与 LPS 结合，磷脂脂质体能阻止 LPS 与 CD14 结合。

尽管 mCD14 的磷脂结合特性还不够清楚，但已有研究表明细胞膜上 mCD14 能与带负电荷的磷脂结合[7]。Wang 等[8]实验用放射性标记的磷脂与转染 mCD14 的 THP-1 细胞和不表达 mCD14 的 THP-1 细胞共同孵育，发现 LBP 能促使磷脂与 mCD14＋ THP-1 细胞结合增加 5 倍，却并不能使磷脂与缺乏 mCD14 的 THP-1 细胞结合。不仅 LPS-mCD14 结合能被 mCD14 抗体拮抗，且 PI，PS 结合至 mCD14＋细胞作用也能被 mCD14 抗体所拮抗。结果提示 PI、PS 与 LPS 结合至 mCD14 是同一或邻近位置，从而调节依赖于 mCD14 的 LPS 炎症反应。我们的实验结果提示正常情况下细胞膜 mCD14 周围可能结合有很多磷脂，当 LPS 刺激细胞使细胞膜脂降解后，mCD14 结合位点暴露，与 LPS 结合增多，从而促发炎症反应。

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] Wadee A A，Rabson A R. Binding of phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol to OKT8＋ lymphocytes activates suppressor cell activity [J]. J Immunol，1983，130(5)：2 271－2 276.

[3] Day J R，Albers J J，Lofton C E，*et al*. Complete cDNA encoding human phospholipid transfer protein from human endothelial cells[J]. J Biol Chem，1994，269(Suppl 12)：9 388－9 392.

[4] Haliman Y E，Wright S D. Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids[J]. J Clin Invest，1997，99(2)：315－324.

[5] Wurfel M M，Wright S D. Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers[J]. J Immunol，1997，158(7)：3 925－3 934.

[6] Schromm A B，Brandenburg K，Rietschel F，*et al*. Lipopolysaccharide-binaing protein mediates CD14-independent intercalation of lipopolysacharede into phospholipid membranes[J]. FEBS Lett，1996，399(1)：267－271.

[7] Devitt A，Moffatt O D，Raykundalia C，*et al*. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells[J]. Nature，1998，392(Apr 2)：505－509.

[8] Wang P Y，Kitchens R L，Munford R S. Phosphatidylinositides bind to plasma membrane CD14 and can prevent monocyte activation by bacterial lipopolyscharide[J]. J Biol Chem，1998，273(38)：24 309－24 313.

（编辑 陈聪连）

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