DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.040



论著

文章编号:1000-5404(2001)09-0960-03

# LBP对LPS诱导大鼠肺巨噬细胞TNFα、IL-10 mRNA表达的调节作用

侯一峰,毛宝龄,钱桂生,徐剑铖 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

**提 要:目的** 探讨脂多糖结合蛋白(Lipopolysaccharide binding protein,LBP)对脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)诱导肺巨噬细胞中TNFα和IL-10表达的调节作用机制。**方法** 经硫酸铵盐析、Bio-Rex70阳离子交换层析和MonoQ阴离子交换层析,从大鼠急性反应期血清中分离纯化LBP。分别用10 ng/ml和1 000 ng/ml的LPS刺激肺泡巨噬细胞,并加入不同浓度LBP,观察肺泡巨噬细胞中TNFα和IL-10 mRNA的表达。**结果** 纯化的大鼠LBP在SDS-PAGE的$60\times10^3$处呈现单一条带,并可增强LPS与单核细胞的结合。当LPS为10 ng/ml时,LBP可明显增强LPS诱导肺巨噬细胞中TNFα和IL-10 mRNA的表达,但LBP为10 μg/ml时,对LPS的增敏作用反而有所减弱。当LPS为1 000 ng/ml时,LBP对LPS无调节作用。**结论** LBP对LPS的调节作用呈明显的剂量依赖性,而高浓度LPS不需要LBP的增敏作用,可能通过LBP非依赖途径直接激活靶细胞。

**关键词:** 脂多糖;脂多糖结合蛋白;肿瘤坏死因子-α;白细胞介素10;肺泡巨噬细胞
**中图法分类号:** R322.35;R343.8;R392.1 **文献标识码:** A

# Regulatory effects of LBP on the expressions of TNFα and IL-10 mRNA induced by LPS in alveolar macrophages of rats

HOU Yi-feng, MAO Bao-ling, QIAN Gui-sheng, XU Jian-cheng (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract: Objective** To investigate the regulatory effects of lipopolysaccharide binding protein (LBP) on expressions of TNFα and IL-10 mRNA induced by lipopolysaccharide (LPS) in alveolar macrophages. **Methods** LBP was purified from serum of rat in acute phase by precipitating with ammonium sulphate and passed through Bio-Rex 70 resin and MonoQ column. Rat alveolar macrophages were exposed to LPS(10 ng/ml or 1 000 ng/ml) in different concentrations of LBP. Total RNA was extracted for assay of TNFα and IL-10 mRNA expressions by RT-PCR. **Results** The purified preparation of rat LBP showed a homogeneity with a molecular weight of $60\times10^3$ in SDS-PAGE analysis. The binding of lipopolysaccharide to mononuclear cells was enhanced by purified rat LBP. Stimulation of rat alveolar macrophages with LPS at the concentration of 10 ng/ml was LBP depeudent. LBP of concentrations up to 1 μg/ml was able to increase TNFα and IL-10 mRNA expressions both TNFα and IL-10 mRNA level were lower at 10 μg/ml as compared with that in the presence of 1 μg/ml. Stimulation of rat alveolar macrophages with LPS at concentrations of 1 000 ng/ml was LBP independent. **Conclusion** The regulatory effects of LBP on LPS is dose dependent and the macrophages could be directly activated by LPS at higher concentration.

**Key words:** lipopolysaccharids; lipopolysaccharids binding protein; tumor necrosis factor-α; interleukin-10; alveolar macrophages

脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)是引起全身炎性反应综合征(Systemic inflammatory response syndrome,SIRS)和急性呼吸窘迫综合征(Acute respiratory distress syndrome,ARDS)的重要原因,而脂多糖结合蛋白(Lipopolysaccharide binding protein,LBP)对LPS的致病性具有重要的调节作用[1]。LPS侵入机体后,首先在LBP介导下,与单核巨噬细胞膜上的CD14结合,激活细胞内多条信号通路以及转录因子,启动细胞因子和炎性介质的基因表达,进而导致一系列病理过程。但也有人观察到:LBP还可促进LPS与高密度脂蛋白或巨噬细胞膜上清除受体(Scavenger receptor)的结合而增强巨噬细胞对LPS的吞噬作用,从而减轻LPS的毒性作用[2]。目前就LBP对LPS不同调节作用的机制仍不清楚。本研究首先从大鼠血清中分离、纯化了LBP,并对LBP在LPS诱导大鼠肺泡巨噬细胞TNFα、IL-10 mRNA表达中的调节作用进行了研究。

**基金项目:** 国家自然科学基金重点资助项目(39730210)
**作者简介:** 侯一峰(1963-),男,山西省太原市人,博士研究生,主治医师,主要从事炎症反应方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68755320
**收稿日期:** 2001-03-14;**修回日期:** 2001-05-20

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

Wistar大鼠由第三军医大学动物所提供,Bio-Rex-70树脂为Bio-Rad产品,LPS(0111:B4)和FITC-LPS为Sigma产品,MonoQ预装柱为Pharmacia产品,M-MLV逆转录酶为Promega产品,Taq DNA聚合酶为上海生工产品,其它试剂为国产分析纯。

### 1.2 大鼠LBP的分离、纯化

1.2.1 急性反应期血清的制备 Wistar大鼠90只,皮下注入硝酸银24 h后,取血清。

1.2.2 硫酸铵盐析 参照文献[3]的方法,用50%饱和硫酸铵溶液盐析血清,沉淀溶于50 mmol/L的$Na_2HPO_4$-$NaH_2PO_4$缓冲液(pH 7.3 PB)中,并在缓冲液中透析24 h。

1.2.3 阳离子交换层析 参照文献[4]的方法并略加改进。上样后,依次用含41 mmol/L和220 mmol/L NaCl的PB(含EDTA 2 mmol/L,pH 7.3)洗脱,用紫外分光光度仪(PE公司)测定$D_{280}$值。当$D_{280}<0.2$时,再用含220 mmol/L和500 mmol/L NaCl的PB(含EDTA 2 mmol/L,pH 7.3)行梯度洗脱。最后用含1 mol/L NaCl的PB(含EDTA 2 mmol/L,pH 7.3)洗脱,直到$D_{280}<0.2$。合并各吸收峰的洗脱物,并在50 mmol/L的PB(pH 7.3)中透析,最后用PEG6000浓缩。

1.2.4 阴离子交换层析 MonoQ预装柱与高压液相色谱仪

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

(Waters 510 Pump, 484 Tumable absorbance detector)相连，用 20 mmol/L 的二乙醇胺-盐酸缓冲液(pH 8.3)平衡柱子。上样完毕后，用含 0 和 333 mmol/L 硫酸铵的二乙醇胺-盐酸缓冲液(pH 8.3)行梯度洗脱。洗脱过程中，收集各蛋白峰的洗脱物，经透析、浓缩后待测 LBP 活性和蛋白含量。

1.2.5　LBP 活性测定　　按文献[5]的方法，通过观察 FITC-LPS 与外周血单个核细胞(PBMC)的亲和力，测定 LBP 活性。用淋巴细胞分离液从外周血中分离 PBMC，1640 培养液将细胞数调整为 $1\times10^6$/ml 后置入 1 ml 的 EP 管中，加入 FITC-LPS(1 μg/ml)和待测 LBP 活性的洗脱组分，并设只加 FITC-LPS 的对照组。37 ℃孵育 1 h，用磷酸缓冲液(0.01 mol/L pH 7.4)漂洗 2 次。流式细胞仪检测 PBMC 的荧光密度值。

1.2.6　纯度和分子量测定　　采用 SDS-PAGE。

1.2.7　蛋白质含量测定　采用 Lowry 方法进行，以牛血清白蛋白为标准。

### 1.3　肺泡巨噬细胞中 TNFα、IL-10 mRNA 的表达

1.3.1　实验方法　　用 24 ml Hanks 液分 3 次灌洗大鼠全肺，在 6 孔培养板中获取贴壁的单层肺泡巨噬细胞($2\times10^5$ 个/孔)，在 LPS = 10 ng/ml 和 LPS = 1 000 ng/ml 时，分别加入不同浓度 LBP(0、0.01、0.1、1 和 10 μg/ml)，37 ℃孵育 3 h。上述实验均重复 5 次。

1.3.2　RT-PCR　　按 Tripure 核酸提取试剂说明书中的方法提取细胞总 RNA，根据分子克隆技术中逆转录 PCR 技术对大鼠 TNFα、IL-10 和 β-actin 的 mRNA 进行扩增。TNFα 上游引物 5' CAT GAT CCG AGA TGT GGA ACT GGC 3'，下游引物 5' CTG GCT CAG CCA CTC CAG C 3'，扩增产物 315 bp，扩增条件：94 ℃ 45 s；55 ℃ 50 s；72 ℃ 90 s；IL-10 上游引物 5' TGC CTT CATG TCA AGT GAA GAC 3'，下游引物 5' AAA CTC GTT CAT GGC CTT GTA 3'，扩增产物 346 bp；扩增条件：94 ℃ 45 s；60 ℃ 55 s；72 ℃ 90 s；β-actin 引物序列为：5' CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C 3' 和 5' AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C 3'，扩增产物 587 bp，扩增条件：94 ℃ 45 s；60 ℃ 55 s；72 ℃ 2 min；35 个循环后行琼脂糖(2%)凝胶电泳，用 SxImag 软件将扩增片段的积分光密度与 β-actin 的积分光密度相比，数据以标准化积分密度(Normalized integrated intensity, NII)表示。

### 1.4　统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用方差分析和 $t$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　LBP 的分离、纯化

大鼠急性期血清经 50% 饱和硫酸铵溶液盐析、Bio-Rex70 阳离子交换层析和 MonoQ 阴离子交换层析后，得到在 SDS-PAGE 呈单一区带，分子量为 $60\times10^3$ 的大鼠 LBP，见图 1，活性实验结果显示：纯化的大鼠 LBP 可明显增强 FITC-LPS 与 PBMC 的结合，见图 2。

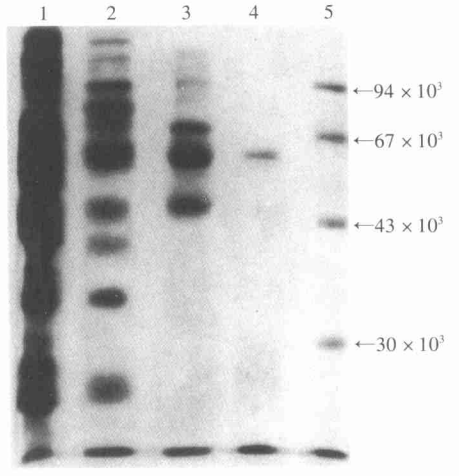



**图 1　大鼠急性期血清分离、纯化的 SDS-PAGE 分析**

**Fig 1　SDS-PAGE analysis of rat LBP purified from acute phase rat serum**

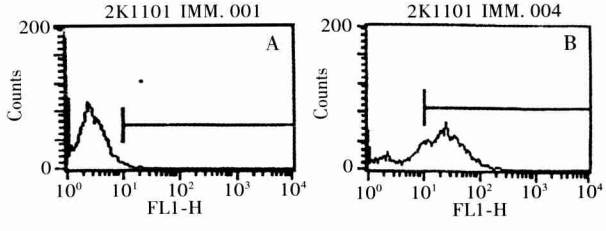



**图 2　流式细胞仪检测 FITC-LPS 与 PBMC 的亲和力**

**Fig 2　Determination of affinity of FITC-LPS and PBMC with flowcytometer**

A: PMBC incubated with FITC-LPS at 37℃ for 1 h; B: PMBC incubated with FITC-LPS + purified LBP at 37℃ for 1 h; x axis: Intensity of fluorescence; y axis: Number of monocytes

### 2.2　肺泡巨噬细胞中 TNFα、IL-10 mRNA 的表达

见表 1

**表 1　不同 LBP 浓度对 TNFα、IL-10 mRNA 表达的影响(NII)**

**Tab 1　Effects of LBP on the expression of TNFα and IL-10 mRNA(NII)**

| | LBP(μg/ml) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 |
| TNFα(LPS = 10 ng/ml) | 0.38 ± 0.02 | 0.49 ± 0.04** | 0.79 ± 0.04++ | 0.82 ± 0.03++ | 0.71 ± 0.02△+ |
| TNFα(LPS = 1 000 ng/ml) | 1.14 ± 0.01 | 1.08 ± 0.04 | 1.11 ± 0.04 | 1.13 ± 0.02 | 1.12 ± 0.02 |
| IL-10(LPS = 10 ng/ml) | 0.37 ± 0.02 | 0.44 ± 0.03* | 0.52 ± 0.04+ | 0.53 ± 0.03++ | 0.46 ± 0.03△ |
| IL-10(LPS = 1 000 ng/ml) | 0.66 ± 0.03 | 0.69 ± 0.04 | 0.67 ± 0.04 | 0.68 ± 0.03 | 0.67 ± 0.03 |

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* 0 μg/ml LBP; +: $P<0.05$, ++: $P<0.01$ *vs* 0.01 μg/ml LBP; △: $P<0.05$ *vs* 0.1 μg/ml LBP

## 3　讨论

LBP 是一个分子量为 $60\times10^3$ 的急性反应期蛋白，其血浆浓度为 2 ~ 7 μg/ml，在诱导急性反应后，血清 LBP 浓度可明显增高[1]。本实验主要参照 Tobias 等[4]首次从兔血清中分离、纯化 LBP 的方法。但我们在实验中观察到：如直接将血清上样于 Bio-Rex70 阳离子交换层析柱，则由于血清的粘稠度较大，流速难以达到1 ml/min。为此，参照 Schletter 等[3]的方法，首先用 50% 饱和硫酸铵沉淀血清，不仅除去了大量杂蛋白，而

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

且也缩短了血清的上样时间。经 Bio-Rex70 阳离子交换层析和 MonoQ 预装柱的阴离子交换层析后，在 SDS-PAGE 的 $60\times10^3$ 处得到呈单一条带的 LBP。Wurfel[6] 的研究发现：LBP 基因敲除小鼠的血清无增敏 LPS 的作用，提示：LBP 是血清中唯一可增强 LPS 与单核巨噬细胞结合的成分。在本实验的 LBP 活性检测中观察到：纯化的大鼠 LBP 可明显增强 LPS 与单核巨噬细胞的结合，说明所纯化的 LBP 具有生物学活性。

LBP 对 LPS 的增敏作用是 LPS 导致 SIRS 和 ARDS 的一个重要机制，而前炎性因子 TNFα、IL-10 又在继发性的炎症级联反应和致炎、抗炎的动态平衡中具有重要作用。本研究结果显示：当 LPS 为 10 ng/ml 时，1 μg/ml 以下浓度的 LBP 对 LPS 诱导肺巨噬细胞中 TNFα、IL-10 mRNA 的表达有增敏作用，并且增敏作用随 LBP 浓度的增加而增强。在 LBP 浓度为 10 μg/ml 时，LBP 对 LPS 的这种增敏作用有所减弱，但无抑制作用；当 LPS 为 1 000 ng/ml 时，LBP 对 LPS 无增敏或抑制作用。LBP 对 LPS 调节作用的这种剂量依赖性有重要的病理生理意义。在 LPS 侵入机体的早期，LBP 可识别少量 LPS 的存在并将 LPS 的效应放大，以充分调动机体的防御机能；随着 LBP 的上调，LBP 的这种预警作用也可导致机体产生难以控制的炎症反应。但 LBP 并不能无限增敏 LPS 的作用，而且还可能通过加速 LPS 与巨噬细胞上清除受体(Scavenger receptor)的结合而增强巨噬细胞对 LPS 的吞噬和清除，本实验中只观察到 10 μg/ml 的 LBP 对 LPS 的增敏作用有所减弱，而并无抑制作用。大剂量 LPS 并不需要 LBP 的增敏作用，可通过 LBP/CD14 非依赖途径，如新近发现的 Toll 样受体[7] 而直接激活靶细胞，产生大量的细胞因子和炎性介质。另外，本研究结果还提示：LBP 对 LPS 诱导肺巨噬细胞中致炎因子和抗炎因子的表达可能具有相同的调节机制。

由于 LBP 与 LPS 相互作用的结果决定着炎症反应的启动、程度和转归。在不同病理生理过程中，LBP 对 LPS 有不同的调节作用，深入研究 LBP 和 LPS 间的相互作用关系，不仅会在分子水平上丰富内毒素的致病机制理论，而且还可为 LPS 所致的全身炎症反应综合征、急性呼吸窘迫综合征的防治提供新途径，争取在各种炎症因子产生之前即阻断 LPS 所致的病理过程。

**参考文献：**


[1] Schumann R R, Leong S R, Flaggs G W, *et al*. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein[J]. Science, 1990, 249(4 975): 1 429 - 1 431.

[2] Amura C R, Kamei T, Ito N, *et al*. Differential regulation of lipopolysaccharide (LPS) activation pathways in mouse macrophages by LPS-binding proteins[J]. J Immunol, 1998, 161(5): 2 552 - 2 560.

[3] Schletter J, Kruger C, Lottspeich F, *et al*. Improved method for preparation of lipopolysaccharide-binding protein from human serum by electrophoretic and chromatographic separation techniques[J]. J Chromatogr B Biomed Appl, 1994, 654(1): 25 - 34.

[4] Tobias P S, Soldau K, Ulevitch R J. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum[J]. J Exp Med, 1986, 164(3): 777 - 793.

[5] Gallay P, Carrel S, Glanser M P, *et al*. Purification and characterization of murine lipopolysaccharide-binding protein[J]. Infect Immun, 1993, 61(2): 378 - 383.

[6] Wurfel M M, Monks B G, Ingalls R R, *et al*. Targeted deletion of the LBP gene leads to profound suppression of LPS responses *ex vivo*, whereas *in vivo* responses remain intact[J]. J Exp Med, 1997, 186(12): 2 051 - 2 056.

[7] Yang H, Young D W, Gusovsky F, *et al*. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1[J]. J Biol Chem, 2000, 275(27): 20 861 - 20 866.


(编辑 陈聪连)

## 消息

# 第九届全国创伤学术交流会征文通知

中华医学会创伤学分会、《中华创伤杂志》编辑部拟于2002年5月下旬在太原市联合召开第九届全国创伤学术交流会。本次会议除进行大会交流外，届时将邀请多位国内创伤医学界知名专家讲学，争鸣答疑。

**1.征文重点内容：**(1)严重多发伤的院外、院内急救，各部位伤(包括烧伤)的临床救治，创伤治疗新手术的开展。(2)创伤急救模式的建立，创伤 ICU 的作用与管理。(3)创伤评分的实际应用及所遇到的问题。(4)创伤基础医学，如创伤愈合、组织工程、创伤并发症发生机制及防治等的研究。

**2.征文要求：**(1)未曾发表过论文的500字以内摘要1份，论文应具有科学性、先进性和实用性。(2)按结构式摘要撰写，顺序为文题、作者单位及邮政编码、姓名、目的、方法、结果、结论。(3)请寄打印稿并加盖公章，同时附该文软盘(Word 格式)，自留底稿不退稿。欢迎通过 E-mail 投稿。

**3.优秀论文评选：**拟参加青年优秀论文评选者(45岁以下)，除寄摘要外，需附全文1份，并另纸注明第一作者的年龄、职称及职务。符合本刊要求的获奖论文将优先在本刊发表。

**4.证书颁发：**参加会议者，将颁发中华医学会学术会务部论文证书和中华医学会继续教育部学分证书。

**5.收稿地点：**来稿请寄重庆市大坪长江支路10号《中华创伤杂志》编辑部向勇主任收。邮政编码：400042。电话：(023)68757524，68818654，传真：(023)68818654，E-mail：cma chz@public.cta.cq.cn。信封上请注明创伤会议。

**6.截稿日期：**2002年2月20日前(以当地邮戳为准)，逾期不予受理。

中华医学会创伤学分会
《中华创伤杂志》编辑部

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