

[文章编号] 1671-587X(2006)02-0221-03

不同浓度脂多糖对 J774A.1 细胞 CD14 表达的影响

张海玉¹, 单玉兴², 武 宁³, 陈光伟[△]

(1. 吉林大学第一医院儿外科, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学第一医院骨科, 吉林 长春 130021;
3. 吉林大学公共卫生学院放射生物学教研室, 吉林 长春 130021)

[摘 要] 目的: 探讨不同时间和不同浓度脂多糖 (LPS) 对小鼠巨噬细胞株 J774A.1 细胞 CD14 表达的影响。方法: 用不同浓度 LPS 刺激 J774A.1 细胞后, FITC-CD14 单克隆抗体染色 45 min, 用流式细胞术检测 J774A.1 细胞 CD14 的表达, 观察用 LPS 刺激不同时间 (1、2、4、8 及 16 h) 后 J774A.1 细胞 CD14 表达的变化; 选择最佳时间后, 观察不同浓度 (1、10、50、100、500 及 1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) LPS 对 J774A.1 细胞 CD14 表达的变化。结果: 在时间-效应关系上, 当 LPS 浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 刺激 1、2 及 4 h 后 CD14 表达增强 (分别为 23.80 ± 5.07 、 23.04 ± 2.88 、 28.22 ± 1.54), 与对照组 (12.50 ± 3.71) 比较差异有显著性 ($P < 0.01$), LPS 浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 刺激 1 和 2 h 后 CD14 表达增强 (分别为 40.85 ± 6.05 、 26.63 ± 6.17), 与对照组 (12.50 ± 3.71) 比较差异有显著性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 LPS 浓度为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 刺激 1 h 后 CD14 表达增强 (47.40 ± 2.85), 与对照组 (12.50 ± 3.71) 比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。在剂量-效应关系上, 刺激 4 h 时 LPS 浓度为小于 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 CD14 表达蛋白明显高于对照组 ($P < 0.01$)。结论: 用 LPS 刺激 J774A.1 细胞表达 CD14 时, LPS 刺激时间最好是在 4 h 以内, 刺激浓度最好不要超过 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

[关键词] 巨噬细胞; 脂多糖类; 抗原, CD14

[中图分类号] R961 **[文献标识码]** A

Effect of LPS with different doses on CD14 surface expression in J774A.1 cell line

ZHANG Hai-yu¹, SHAN Yu-xing², WU Ning³, CHEN Guang-wei[△]

(1. Department of Pediatric Surgery, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China;

2. Department of Orthopedics, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China;

3. Department of Radiobiology, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: Objective To study the dose- and time-effect relationship between lipopolysaccharide (LPS) and CD14 expression in the cell line J774A.1 of mouse macrophages. **Methods** The cell line J774A.1 was stimulated with different doses of LPS, and the CD14 surface-positive cells from the cell line J774A.1 were detected by flow cytometry (FCM) 45 min after stained with FITC-CD14 monoclonal antibody. The changes of CD14 surface expression in the cell line J774A.1 at different time (1, 2, 4, 8 and 16 h) after stimulated with LPS were observed. After the best stimulant time was selected, the cell line J774A.1 was treated with different doses (1, 10, 50, 100, 500 and 1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) of LPS and the changes of CD14 surface expression were observed. **Results** In view of time-effect, compared with control group (the positive rate was 12.50 ± 3.71), LPS significantly enhanced the CD14 expression at 1, 2 and 4 h after stimulation (the positive rates were 23.80 ± 5.07 , 23.04 ± 2.88 and 28.22 ± 1.54 , respectively) when the dose of LPS was 1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$). When the concentration of LPS was 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, CD14 expression strengthened at 1 and 2 h after stimulation (the positive rates were 40.85 ± 6.05 and 26.63 ± 6.17 , respectively) ($P < 0.05$, $P < 0.01$). LPS obviously stimulated CD14

[收稿日期] 2005-05-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题 (30400447)

[作者简介] 张海玉 (1965-), 女, 吉林省和龙市人, 副主任医师, 医学博士, 主要从事小儿外科疾病及其免疫机制研究。

expression at 1 h after stimulation (the positive rate was 47.40 ± 2.85) when the dose of LPS was $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$). In the dose-effect, the stimulant effect of LPS occurred when LPS was administered only below the dose of $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ at 4 h after stimulation ($P < 0.01$). Conclusion LPS can significantly stimulate the expression of CD14 in the cell line J774A.1 below the dose of $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ within 4 h.

Key words: macrophages; lipopolysaccharides; antigens, CD14

CD14 是 20 世纪 90 年代初确认的脂多糖 (LPS) /LBP (LPS-binding protein) 复合物的受体^[1,2]。它有 2 种结构形式, 一种是以糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 一锚蛋白形式附着于细胞膜上 (mCD14), 相对分子质量为 53 000~55 000, 主要表达在单核/巨噬细胞上。CD14 被认为是 LPS 信号传导中最重要的 LPS 受体, 在有 LBP 存在下, CD14 以 LPS-LBP-CD14 三联体形式可介导低剂量 LPS 诱导细胞活化, 释放 IL-1、IL-6、TNF α 等多种细胞分子。目前有关 LPS 和 CD14 之间量效方面, 系统的研究报道甚少, 本研究从时间-效应和剂量-效应角度出发, 找出 LPS 的最佳刺激时间和刺激剂量。

1 材料与方 法

1.1 细胞株 小鼠巨噬细胞株 (J774A.1), 购自上海细胞研究所。用 DMEM 培养基 (内含 10% 新生牛血清及泰来酶素 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。均用 0.25% 胰酶消化贴壁细胞并传代。

1.2 试剂 大鼠抗小鼠 FITC-McAb-CD14 购自 Pharmingen 公司。

1.3 方法 用 24 孔板接种 J774A.1 细胞, 分为对照组和不同时间 (1、2、4、8 及 16 h) LPS 刺激组、不同浓度 (1、10、50、100、500 及 $1\,000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) LPS 刺激组, 用 0.25% 胰酶消化细胞, 再用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗涤 2 次, 调细胞浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 用 FITC-CD14 抗体染色 45 min (4°C 、避光), 用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗 2 次, 用流式细胞仪检测 CD14 阳性细胞百分数。

1.4 统计学处理 用 FACSscan 软件收集细胞, 用 Lysis 软件分析。结果均使用 t 检验。

2 结 果

2.1 不同剂量 LPS 刺激下 J774A.1 细胞表达 CD14 的时间-效应关系 用不同剂量 (1、10 及 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) LPS 刺激后 1 和 2 h, J774A.1 细胞表面跨膜分子 CD14 表达增强, 8 h 开始下降, 16 h 恢复到正常水平, 见表 1。

Tab. 1 The time-effect relationship of CD14 expression in J774A.1 cell stimulated with different doses of LPS

($n=5, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Dose ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	(t/h)	Positive cell of CD14				
			1	2	4	8	16
Control	0		12.50 ± 3.71	12.50 ± 3.71	12.50 ± 3.71	12.50 ± 3.71	12.50 ± 3.71
LPS	1		$23.80 \pm 5.07^{**}$	$23.04 \pm 2.88^{**}$	$28.22 \pm 1.54^{**}$	11.21 ± 2.46	10.23 ± 1.46
	10		$40.85 \pm 6.05^*$	$26.63 \pm 6.17^{**}$	19.59 ± 10.05	8.33 ± 1.68	12.61 ± 3.08
	50		$47.40 \pm 2.85^{**}$	19.25 ± 2.85	10.19 ± 1.60	7.68 ± 1.03	$12.77 \pm 1.24^*$

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

2.2 不同剂量 LPS 刺激 4 h 后 J774A.1 细胞表达 CD14 的表达变化 用 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (4 h 以内) 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (2 h 以内) LPS 刺激后, J774A.1 细胞表面跨膜分子 CD14 的表达与对照组比明显增强 ($P < 0.01$), 而大于 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (1 h 时) 时其表达与对照组比明显降低 ($P < 0.01$)。

3 讨 论

免疫系统分为固有免疫系统和适应性免疫系

统, 这两种免疫系统通过直接的细胞接触和通过包括化学介质、细胞因子和趋化因子的相互作用而发生效应。此外, 固有免疫系统和适应性免疫系统所用的细胞都有许多表面受体; 有些涉及细胞与血管内皮壁的黏连 (如 LFA-1), 有些识别细胞释放的化学物, 还有些引发细胞功能, 如吞噬过程的活化。固有免疫和适应性免疫不是对病原菌免疫的简单线性或互补性机制, 而是通过细胞接触和可溶性介质的分泌互相调节。特别是在对病原菌的炎症性

固有免疫应答过程中建立的细胞因子环境, 其致使抗原特异性 T 细胞向淋巴结的迁移, 并在这里遇到抗原呈递细胞 (APCs), 其中巨噬细胞的活化成为固有免疫中重要的效应细胞。

Ulevitch 等提出了一套完整的跨膜信号通路学说。该学说认为, LPS 介导的细胞激活需要血浆或细胞表面能够和内毒素结合的蛋白参与, 这些蛋白包括 LBP 和 CD14。1986 年 Tobias 等^[3,4] 实验室首先发现并克隆了 LBP, 继而又发现了 LPS-LBP 复合物与 CD14 结合, 介导细胞反应。哺乳动物的膜 CD14 (mCD14), 主要存在于髓样细胞 (如单核巨噬细胞) 表面, 通过糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 连接于细胞膜的外侧, 在 LPS 对髓样细胞系的激活过程中, LBP 负责将 LPS 转运到细胞膜上与 CD14 结合, 以 LPS-LBP-CD14 三联体形式可介导低剂量 LPS 诱导细胞活化, 释放 IL-1、IL-6、TNF α 等多种细胞分子^[5,6]。

mCD14 是 LPS 关键的膜结合位点, 是一些细胞因子如 TNF- α 的转录所必需分子^[4]。sCD14 是调控非髓样细胞的重要介质, 与 LPS 结合后可作用于 CD14 阳性细胞, 如内皮细胞、上皮细胞等相应部位, 激活细胞。

本实验结果显示, $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 刺激 J774A.1 细胞后 4 h 以内 CD14 的表达明显增强 ($P < 0.01$), 而且 LPS 的剂量越大维持时间越短。这说明 LPS 与 J774A.1 细胞膜表面的 CD14 结合, 表达膜表面的 CD14 蛋白, 但 LPS 剂量过大时可能有毒性作用, 其机理有待于进一步探讨。同时, 又观察不同剂量 (1、10、50、100、

500 及 $1\,000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) LPS 刺激 4 h 时 J774A.1 细胞膜表面的 CD14 表达情况。结果显示, 当 LPS 浓度为 1 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时刺激细胞表达 CD14 明显增强, 而大于 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时明显受到抑制, 说明 LPS 不是任何浓度都能刺激细胞表达 CD14, 也不是刺激时间无限度。

本实验结果提示, CD14 蛋白表达时, LPS 刺激时间最好是在 4 h 以内, 刺激浓度最好不要超过 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 并且根据不同的哺乳动物细胞也可能不同。

[参考文献]

- [1] Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, et al. MAP3K-related kinase involved in NF κ B induction by TNF, CD95 and IL-1 [J]. *Nature*, 1997, 385 (6616): 540-544.
- [2] Kopp E, Medzhitov R, Carothers J, et al. ECSTT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway [J]. *Genes Dev*, 1999, 13 (16): 2059-2071.
- [3] Tobias PS, Soldau K, Ulevich RJ. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum [J]. *J Exp Med*, 1986, 164 (3): 777-793.
- [4] Arbibe L, Mira JP, Teusch N, et al. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway [J]. *Nat Immunol*, 2000, 1 (6): 533-540.
- [5] Muzio M, Natoli G, Saccani S, et al. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) [J]. *J Exp Med*, 1998, 187 (12):2097-2101.
- [6] 金顺子, 单玉兴, 刘树铮. 电离辐射对小鼠巨噬细胞表面 CD14 表达的量效变化 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2004, 30 (4): 503-505.