

- 6 Yu HW, Lee J, Kim S, *et al.* Photoelectronic characterization of IgG antibody molecule – quantum dot hybrid as biosensing probe [J]. Nanotechnology, 2010, 21(42): 425–501
- 7 Biju V, Itoh T, Anas A, *et al.* Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications [J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 391(7): 2469–2495
- 8 Ghasemi Y, Peymani P, Afifi S. Quantum dot: magic nanoparticle for imaging, detection and targeting [J]. Acta Biomed, 2009, 80(2): 156–165
- 9 De Dios AS, Díaz – García ME. Multifunctional nanoparticles: analytical prospects [J]. Anal Chim Acta, 2010, 666(1–2): 1–22
(收稿日期: 2013–07–22)
(修回日期: 2013–08–26)

LPS 对 THP – 1 细胞 sCD14 和 mCD14 表达的影响

张 颖 王金文 李向阳

摘 要 目的 观察不同浓度脂多糖(LPS)刺激 THP – 1 细胞(human acute monocytic leukemia cell line)不同时间对可溶性 CD14(soluble CD14, sCD14)和膜 CD14(Membrane CD14, mCD14)表达的影响及 sCD14、mCD14 表达之间的关系。方法 不同浓度 LPS(0、0.1、1.0、10、50ng/ml)刺激经佛波酯(PMA)诱导的 THP – 1 细胞不同时间(0.5、1、3、5、8h),用酶联免疫吸附法检测 sCD14 的量,流式细胞术检测 mCD14 的量。结果 LPS 浓度为 0ng/ml 时, sCD14 的表达与时间呈正相关($r=0.915, P=0.029$), 8h 达最高值(1044.39 ± 12.21 pg/ml), mCD14 的表达与时间呈正相关($r=0.945, P=0.015$), 8h 达最高值($4.23\% \pm 2.11\%$), 且随着时间的延长, sCD14 的表达与 mCD14 的表达呈正相关($r=0.969, P=0.006$); LPS 浓度为 0.1ng/ml 时,随着时间的延长, sCD14 的表达与 mCD14 的表达呈正相关($r=0.944, P=0.016$);当 LPS 刺激细胞 0.5h 时, sCD14 的表达与 mCD14 的表达呈负相关($r=-0.839, P=0.037$);1h 时, mCD14 的表达与 LPS 浓度呈正相关($r=0.839, P=0.037$), 100ng/ml 时达最高值($3.24\% \pm 1.95\%$)。结论 未经 LPS 刺激的 THP – 1 细胞可以表达 sCD14 及 mCD14; LPS 的浓度及刺激细胞的时间促进 sCD14 和 mCD14 表达。

关键词 LPS THP – 1 细胞 sCD14 mCD14

[中图分类号] R392 [文献标识码] A

Effect of LPS on THP – 1 Expressing sCD14 and mCD14. Zhang Ying, Wang Jinwen, Li Xiangyang. Clinical laboratory, Wenzhou Hospital of Integrated and Western Medicine, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the effect of different concentrations of LPS on THP – 1 cell expressing soluble CD14 and mCD14 for different time. **Methods** Cultured THP – 1 monocyte cell was induced by PMA to macrophage and stimulated it with different concentrations of LPS(0, 0.1, 1.0, 10 and 50ng/ml) for different time(0, 0.5, 1, 3, 5 and 8h). Then sCD14 was detected by Enzyme – linked immunosorbent assay, and mCD14 by Flow cytometry. **Results** When the concentration of LPS was 0ng/ml, sCD14 enhanced along time($r=0.915, P=0.029$), and reached the highest value(1044.39 ± 12.21 pg/ml) at 8h. When LPS concentration was 0ng/ml, mCD14 enhanced as time extended($r=0.945, P=0.015$), and reached the highest value ($4.23\% \pm 2.11\%$) at 8h. And as time extended, the expression of sCD14 and mCD14 were positively correlated($r=0.969, P=0.006$). When LPS concentration was 0.1ng/ml, sCD14 and mCD14 had a positive correlation as time extended($r=0.944, P=0.016$). When LPS stimulated cells 0.5h, sCD14 and mCD14 had a negative correlation with LPS concentration increasing($r=-0.839, P=0.037$). At 1h, mCD14 enhanced as the LPS concentration increasing($r=0.839, P=0.037$). And at 100ng/ml it reached the highest value ($3.24\% \pm 1.95\%$). **Conclusion** THP – 1 cells induced by PMA spontaneously expressed sCD14 and mCD14 without LPS stimulation. The concentration of LPS and stimulation time increased the expression of sCD14 and mCD14.

Key words Lipopolysaccharide; THP – 1 cell; sCD14; mCD14

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y20080596);温州市科技计划项目(Y20100094)

作者单位:325000 温州市中西医结合医院(张颖);163000 大庆油田总医院(王金文);325000 温州医科大学附属第二医院(李向阳)

通讯作者:李向阳, 电子信箱:lxxy@wzhealth.com

LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要成分,也是全身炎症反应的重要触发剂,可以和体内多种蛋白结合,引起各种炎症效应。CD14 是一种髓系膜糖蛋白,是 LPS 和脂多糖结合蛋白(LBP)复合物的受体。低浓度 LPS 可刺激机体免疫系统,增强固有免疫功能;高

浓度 LPS 则引起广泛而强烈的炎症反应。内毒素血症(胆汁淤积引起)时, LPS 促进 CD14 的表达^[1,2]。CD14 作为 LPS 的重要受体之一起着非常关键的作用。本实验通过 LPS 刺激经 PMA 诱导的 THP-1 细胞, 从时间-效应、剂量-效应角度研究 LPS 对 mCD14 和 sCD14 表达的影响。

材料与方法

1. 主要材料及试剂: 人 THP-1 细胞株(TCHu57), 购自中国科学院细胞库; LPS、PMA 购自 Sigma 公司; 人 sCD14ELISA 试剂盒、鼠抗人 CD14-FITC 单克隆抗体、Mouse-IgG1-FITC 单克隆抗体同型对照购自 RnD 公司; RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司。

2. THP-1 细胞的转化: 收到细胞株后, 转移到细胞培养瓶中, 放入 37℃ 二氧化碳孵箱培养。细胞浓度达到 5×10^6 /ml 时, 加到 24 孔板中, 同时加入 PMA, 其终浓度为 100ng/ml, 转化为贴壁细胞。

3. 不同浓度 LPS 刺激 THP-1 巨噬细胞: 将 1mg/ml LPS 液用无血清 RPMI 1640 进行 100 倍稀释, 浓度为 10000ng/ml, 再依次稀释得到 100、10、1ng/ml 的 LPS; 稀释好的 LPS 直接加入到 THP-1 巨噬细胞培养板中, 终浓度分别为 50、10、1、0.1、0ng/ml, 放入孵箱继续培养。分别于 0.5、1、3、5 及 8h 收取细胞培养上清液和细胞待测。

4. sCD14 的检测: 不同时间取上清液 200μl, 按照人 sCD14ELISA 试剂盒操作说明测定 sCD14 的表达量。

5. mCD14 的检测: 采用 CELLQUEST 软件收取 5000 个细胞, 测定 mCD14 阳性细胞比例。

结 果

1. THP-1 细胞的转化: PMA 诱导 6h 观察时已经有部分细胞贴壁, 18h 大部分细胞已经贴壁, 24h 后几乎所有细胞贴壁。

2. LPS 浓度和刺激时间对于 sCD14 表达的影响: 见图 1。(1)在时间-效应关系上: 随着 LPS 刺激时间的延长, sCD14 的表达增强, 3、5h 和 0.5、1、8h 比较 sCD14 的表达均有统计学差异 ($P < 0.01$); LPS 浓度为 0ng/ml 时, sCD14 的表达随时间的延长而增强 ($r = 0.915$, $P = 0.029$), 8h 达最高值 ($1044.39 \pm 12.21\text{pg/ml}$) 与 0.5h ($265 \pm 13.93\text{pg/ml}$) 和 1h ($201.45 \pm 9.46\text{pg/ml}$) 比较有统计学差异 ($P < 0.01$); LPS 浓度为 0.1ng/ml 时, 8h sCD14 的表达 ($445.64 \pm 8.64\text{pg/ml}$) 降幅最大, 与对照组 ($1044.39 \pm 12.21\text{pg/ml}$) 比较有统计学差异 ($P < 0.01$); LPS 浓度为 10ng/ml 时, 5h sCD14 的表达达最高值 ($1216.66 \pm 3.35\text{pg/ml}$), 与其余各组比较有统计学差异 ($P < 0.05$); LPS 浓度为 100ng/ml 时, 3h sCD14 的

表达达最高值 ($1320.25 \pm 107.37\text{pg/ml}$), 与对照 ($768.43 \pm 19.98\text{pg/ml}$) 及其余各组比较有统计学差异 ($P < 0.01$)。(2)在剂量-效应关系上: 随着 LPS 浓度的增高, 3、5、8h sCD14 的表达变化较大; 当 LPS 刺激细胞 3h 时, sCD14 的表达随 LPS 浓度的升高而增强 ($r = 0.963$, $P = 0.002$), 且 100ng/ml 时达最高值 ($1320.25 \pm 107.37\text{pg/ml}$) 与对照 ($768.43 \pm 19.98\text{pg/ml}$) 比较有统计学差异 ($P < 0.01$); 5h 时, sCD14 的表达随 LPS 浓度的增高先增强后减弱, 10ng/ml 时达最高值 ($1216.66 \pm 3.35\text{pg/ml}$); 刺激 8h, sCD14 的表达随 LPS 浓度的增高而减弱, 0.1ng/ml 时 sCD14 的表达降幅最大 ($445.64 \pm 8.64\text{pg/ml}$), 100ng/ml 时达最低值 ($211.6 \pm 14.14\text{pg/ml}$), 与对照 ($1044.39 \pm 12.21\text{pg/ml}$) 比较有统计学差异 ($P < 0.01$)。

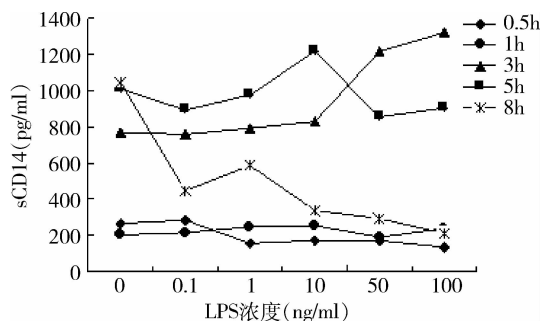


图 1 不同浓度 LPS 刺激经 PMA 诱导的 THP-1 细胞不同时间表达 sCD14 的量

3. LPS 刺激 THP-1 细胞对 mCD14 表达的影响: 见图 2。经统计分析时间对 mCD14 的表达影响显著 ($F = 4.306$, $P = 0.015$); 浓度对 mCD14 的表达影响不明显 ($F = 1.28$, $P = 0.315$)。(1)在时间-效应关系上: 随着 LPS 刺激时间的延长, mCD14 的表达增强, 3、5h mCD14 的表达最高; LPS 浓度为 0 时, mCD14 的表达随时间的延长而增强 ($r = 0.945$, $P = 0.015$), 8h 达最高值 ($4.23\% \pm 2.11\%$); LPS 浓度为 0.1ng/ml 时, 随着时间的延长 mCD14 的表达先增高后降低, 8h ($1.95\% \pm 0.74\%$) 降幅最大, 与对照 ($4.23\% \pm 2.11\%$) 比较有统计学差异 ($P < 0.01$), 但时间与 mCD14 的表达之间无相关性, 而随着时间的延长; 刺激前 3h 内, 随着时间的延长 mCD14 的表达增强, 当 LPS 浓度为 100ng/ml 时达最高值 ($6.9\% \pm 2.19\%$); 直至 5h, 1ng/ml 时 mCD14 的表达开始减弱。(2)在剂量-效应关系上: 随着 LPS 浓度的增高, 3、5、8h sCD14 的表达变化较大; 当 LPS 刺激细胞 1h 时, mCD14 的表达随 LPS 浓度的升高而增强 ($r = 0.839$,

$P=0.037$), 100ng/ml 时达最高值 ($3.24\% \pm 1.95\%$) 与对照 ($1.25\% \pm 0.34\%$) 比较有统计学差异 ($P < 0.01$); 3h 时, 100ng/ml 时达最高值 ($6.9\% \pm 2.19\%$) 与对照 ($2.41\% \pm 1.09\%$) 比较有统计学差异 ($P < 0.01$); 5h 时, mCD14 的表达随 LPS 浓度的增高先增强后减弱, 1ng/ml 时达最高值 ($6.42\% \pm 2.18\%$); 刺激 8h, mCD14 的表达都比对照弱, 1、10ng/ml 时达最低值 ($1.58\% \pm 0.48\%$) 与对照 ($4.23\% \pm 2.11\%$) 比较有统计学差异 ($P < 0.01$)。

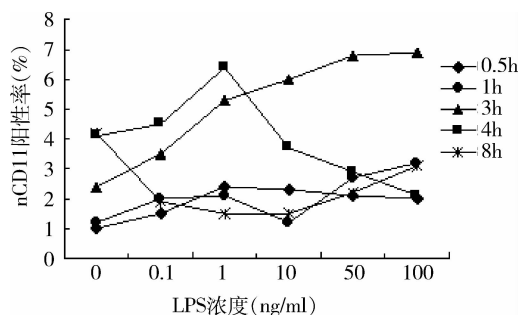


图 2 不同浓度 LPS 不同时间刺激经 PMA 诱导的 THP-1 细胞 mCD14 表达

4. mCD14 与 sCD14 表达间的关系: LPS 浓度为 0 时, 随着时间的延长, sCD14 的表达与 mCD14 的表达呈正相关 ($r=0.969, P=0.006$); LPS 浓度为 0.1ng/ml 时, sCD14 的表达随着时间的延长与 mCD14 的表达呈正相关 ($r=0.944, P=0.016$); 当 LPS 刺激细胞 0.5h 时, 随着 LPS 浓度的增高 sCD14 的表达与 mCD14 的表达呈负相关 ($r=-0.839, P=0.037$)。

讨 论

CD14 有两种结构形式, 一种是以糖基磷脂酞脂醇 (GPI) 锚蛋白形式附着于细胞膜上的 mCD14, 主要表达在单核-吞噬细胞上。另一种是溶解于血清中的 sCD14, 无 GPI 结构, 来源于 mCD14 的直接脱落或直接分泌。作为 LPS 的受体, CD14 表达受 LPS 及其介导产生的炎性介质的调节, 并具有时间及剂量依赖性。

CD14 是一种急性时相蛋白, CD14 mRNA 表达水平增高增加 CD14 的释放^[3,4]。脓毒症患者组与非脓毒症患者组比较, 血浆 sCD14 水平显著升高^[5]。sCD14 的表达减弱, 可能是由于逐渐增多的 sCD14 直接与 LPS 结合为 LPS-sCD14 复合物。另外 γ 干扰素 (IFN- γ) 和白介素 4 (IL-4) 也可以下调 sCD14 在人单核-吞噬细胞中的表达^[6]。sCD14 的释放是一种免疫调节作用, 当免疫应答反应 IL-4 和 IFN-

γ 水平增高时, 选择性下调细胞 sCD14 释放并不受巨噬细胞分化过程影响, 其表达的减少的因素很大可能是随 LPS 浓度增高而增多的 sCD14 抑制了 LPS 对 THP-1 细胞的活化。经 PMA 诱导分化成熟的具有巨噬细胞性质的 THP-1 细胞本身就可表达 CD14, 可能是由于 THP-1 细胞经 PMA 诱导成熟过程中, 促进 CD14 的合成。Marcos 等^[7]用 LPS 刺激经 PMA 诱导的外周血细胞, 发现 1h 后 sCD14 释放量开始增加, 而 mCD14 表达下降, 40h 后表达增强。此项研究显示经 PMA 诱导 THP-1 细胞在体外经 LPS 刺激作用后 mCD14 的变化的双向性。这可能是由于膜结合蛋白酶被激活, mCD14 从细胞表面脱落形成分子质量较小的 sCD14。因此各实验室的结果不同可能是由于所用 LPS 的剂量、类型、与细胞作用时间以及细胞的类型、分化成熟程度不同所致。

sCD14 可与 LPS 结合, 对于 mCD14 阴性细胞 (如上皮细胞), sCD14 可以增强 LPS 介导的细胞反应; 而对于 mCD14 阳性细胞 (如 MO/M ψ), sCD14 则与 mCD14 竞争, 从而减弱 LPS 的作用。急性感染时, sCD14 含量随 mCD14 表达增加而升高。高浓度 sCD14 ($>5\mu\text{g/ml}$) 抑制 mCD14 阳性细胞对 LPS 的应答^[8,9]。阻断 mCD14 可抑制低浓度 LPS-sCD14 复合物 ($<10\text{ng/ml}$) 激活中性粒细胞, 而提高 LPS-sCD14 复合物浓度则可消除抑制效应^[10]。这说明 LPS-sCD14 复合物可越过 mCD14 直接作用于中性粒细胞。但 mCD14 阳性细胞对低浓度 LPS ($<10\text{ng/ml}$) 的应答则需要 LPS 与 mCD14 的结合。因此, sCD14 和 mCD14 都可以介导细胞对 LPS 的应答, 二者协同作用可提高细胞对 LPS 的敏感度。

参考文献

- Ming HC, Jiin HC, Hock-Liew E, et al. Effects of hepatocyte CD14 upregulation during cholestasis on endotoxin [J]. Sensitivity, 2012, 7 (4): e34903
- Wadhvani SI, Turmelle YP, Nagy R, et al. Prolonged neonatal jaundice and the diagnosis of biliary atresia: a single-center analysis of trends in age at diagnosis and outcomes [J]. Pediatrics, 2008, 121 (5): e1438-1440
- Bas S, Gauthier B, Spenato U, et al. CD14 is a acute-phase protein [J]. J Immunol, 2004, 172 (7): 4470-4479
- Ge J, Li-hong Q, Ren L, et al. Effect of lipopolysaccharides extracted from porphyromonas [J]. Shanghai Journal of Stomatology, 2010, 19 (10): 1006-1248
- 董宁, 姚永明, 于燕, 等. 内毒素增敏系统与严重烧伤脓毒症的关系及其临床意义 [J]. 解放军医学杂志, 2011, 36 (1): 21-23
- Kimmings AN, van Deventer SJ, Obertop H, et al. Endotoxin, cyto-

- kines, and endotoxin binding proteins in obstructive jaundice and after preoperative biliary drainage[J]. Gut, 2000, 46: 725-731
- 7 Marcos V, Phillip LZ, Andreas H, *et al.* Expression, regulation and clinical significance of soluble and membrane CD14 receptors in pediatric inflammatory lung diseases[J]. Respiratory Research, 2010, 11(1): 32
- 8 Chuang JH, Chou MH, Wu CL, *et al.* Implication of innate immunity in the pathogenesis of biliary atresia[J]. Chang Gung Med J, 2006, 29(3): 240-250
- 9 Kitchens RL, Thompson PA. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions[J]. J Endotoxin Res, 2005, 11(4): 225-229
- 10 Hailman E, Vesselon T, Kelley M, *et al.* Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14[J]. J Immunol, 1996, 156(11): 4384-4390
- (收稿日期: 2013-08-25)
(修回日期: 2013-08-30)

血浆纤维蛋白原水平与大肠癌淋巴结转移相关性的临床研究

魏 星 张 琪 裘华森

摘 要 **目的** 探讨血浆纤维蛋白原(FIB)水平与大肠癌淋巴结转移的关系。**方法** 回顾性分析笔者医院 2008~2012 年确诊大肠癌无远处转移患者行手术治疗 80 例,术前测取血浆 FIB 值,术中记录肿瘤大小及淋巴结转移情况,并与术后病理对照,评价两者关系。**结果** FIB 水平与大肠癌是否发生淋巴结转移有明显相关性($P < 0.05$),而与患者年龄,肿瘤部位,浸润深度无统计学差异。*Logistic* 回归分析显示高 FIB 血症($> 382.25\text{mg/dl}$)是大肠癌患者淋巴结转移的重要影响因素。**结论** 高 FIB 血症是大肠癌淋巴结转移的高危险因素,可以作为预测大肠癌淋巴结状态的有效指标。

关键词 纤维蛋白原 大肠癌 淋巴结转移

[中图分类号] R735 [文献标识码] A

High Preoperative Plasma Fibrinogen Levels are Associated with Lymph Node Metastasis in Patients with Colorectal Cancer. Wei Xing, Zhang Qi, Qiu Huasen. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Traditional Medicine University, Zhejiang 310006, China

Abstract **Objective** To investigate the relationship between the level of plasma fibrinogen (FIB) with lymph node metastasis in colorectal cancer. **Methods** Preoperative plasma fibrinogen levels were examined in 80 patients who underwent surgery for colorectal cancer at the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Traditional Medicine University from 2008 to 2012. Preoperative plasma fibrinogen levels were correlated with clinicopathologic findings. **Results** There was a positive correlation between high plasma fibrinogen levels and the lymph node involvement of colorectal cancer ($P < 0.05$), but not correlated to the age, tumor location, and the depth of tumor invasion. Logistic regression analysis demonstrate that hyperfibrinogenemia ($> 382.25\text{mg/dl}$) was independently associated with lymph node metastasis. **Conclusion** Our results support the idea that hyperfibrinogenemia can increase the risk of lymphatic metastasis in patients with colorectal cancer. Hyperfibrinogenemia can be served as an useful biomarker to predict lymph node metastasis.

Key words Plasma fibrinogen; Colorectal cancer; Lymph node metastasis

血液的高凝状态与恶性肿瘤的发生发展、复发转移及预后有着密切的关系^[1]。血浆纤维蛋白原(FIB)是凝血系统中的中心蛋白质,其升高可致血液高凝状态。不少研究显示高 FIB 血症与恶性肿瘤浸润和转移关系密切,提示纠正血浆 FIB 异常可能延缓

恶性肿瘤的进展^[2~7]。目前大肠癌患者尚无特异性较高的转移预测因子,本研究通过回顾性分析大肠癌患者术前血浆 FIB 水平与术后病理特点及淋巴结转移情况,探讨血浆 FIB 与大肠癌淋巴结转移之间的关系。

资料与方法

1. 研究对象:选择笔者医院 2008 年 1 月~2012 年 12 月间的大肠癌初诊患者 80 例,所有患者均经术前活检或术后病理确诊为结直肠癌且无远处转移。其中回盲部及升结肠癌 13 例,横结肠癌 10 例,降结肠癌 9 例,乙状结肠癌 10 例,直肠