

一种异硫氰酸荧光素标记脂多糖的新方法

龚建平 韩本立

【摘要】 目的 介绍一种异硫氰酸荧光素(FITC)标记脂多糖(LPS)的新方法。方法 用三乙胺将 4 mg LPS 双链离解为单链结构后,再用 FITC 标记 LPS,通过分光光度计测定其标记率,并与旧式 FITC 标记 LPS 的方法进行比较。同时测定标记后 FITC-LPS 的生物活性、刺激单核细胞分泌肿瘤坏死因子(TNF⁻)的能力及与单核细胞膜的结合能力。结果 新方法 FITC 标记 LPS 的标记率为 1 mol LPS 中 FITC 占 0.980 mol,原方法 FITC 的标记率为 1 mol LPS 中 FITC 占 0.025 mol,两者比较差异有显著性($P < 0.05$)。而 FITC-LPS 与标准 LPS 的生物学活性、刺激单核细胞分泌 TNF⁻ 的能力及与单核细胞膜的结合能力差异无显著性($P > 0.05$)。结论 新式 FITC 标记 LPS 的方法其标记率高,方法简单,且保存 LPS 的生物学特性,是实验外科中研究 LPS 有效的方法。

【关键词】 脂多糖; 异硫氰酸荧光素; 标记方法

A new method of fluorescein isothiocyanate-labeled lipopolysaccharide GONG Jianping, HAN Benli.
Center of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China

【Abstract】 Objective To introduce a new method of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled lipopolysaccharide(LPS). **Methods** LPS was made monomeric by treatment with triethylamine and labeled with FITC. The concentration of FITC in the final preparation was determined spectrophotometrically and compared with that in the old method of FITC-labeled LPS. The bioactivity of FITC-LPS, TNF⁻ induction of monocytes by FITC-LPS and percentage of monocyte-associated FITC-LPS binding to the cell surface were measured and were compared with those of native LPS. **Results** The new technique led to a highly efficient labeling (with a FITC to LPS ratio being 1:1.02) when compared with old one (with a FITC to LPS ratio being 1:40, $P < 0.05$). But the bioactivity of FITC-LPS, its capability of TNF⁻ induction in monocytes and efficiency that bound to monocytes behaved indistinctively from those of native LPS ($P > 0.05$). **Conclusion** The method of FITC-LPS had a higher labeled percentage, was safe and could maintain the bioactivity of LPS.

【Key words】 Lipopolysaccharide; Fluorescein isothiocyanate; Labeling methodology

本研究旨在探讨一种异硫氰酸荧光素(FITC)标记脂多糖(LPS)的新方法,其标记率高、方法简单,且为非放射性标记,具有较广泛的应用前景,现报道如下。

材料与方 法

1. 实验材料:LPS(O₁₁₁ B₄)和 FITC 购于 Sigman 公司,肿瘤坏死因子(TNF⁻)试剂盒购于华美生物工程公司,鲎试剂盒购于上海医化所。

2. 标记方法:旧式 FITC 标记 LPS 的方法按 Weersink 等^[1]介绍的方法进行。新式标记法步骤

为:将 4 mg LPS 加入 0.5% 三乙胺 2 ml 内 0 搅拌 20 min,使 LPS 双链离解为单链结构。用 10 μl 1 mol/L 的盐酸将其 pH 值调节为 5,然后加入含 5 mg FITC 的 0.1 mol/L 磷酸钠溶液 1.5 ml (pH 9.5),并在 37 ℃ 下搅拌孵育 3 h,孵育后,在 4 ℃ 下将其混合物与磷酸钠溶液彻底分离、离心后,去上清即得 FITC-LPS。将 2 种方法所得到的 FITC-LPS 溶液用分光光度计(492 nm)测定 FITC 的浓度。

3. 单核细胞的分离方法:参照 Medvedey 等^[2]介绍的方法进行。将分离的单核细胞放入 1640 培养液中培养 12 h,调整细胞浓度为 1 × 10⁹ 个/L 待用。

4. 检测指标:(1) FITC-LPS 生物活性测定:FITC-LPS 用鲎试验微量基质显色法,测定其生物活性并与标准 LPS(O₁₁₁ B₄)相比较。(2)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970719)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院肝胆外科中心

FITC-LPS 诱导单核细胞 TNF α 释放:不同浓度(0、20、40、60 和 100 μg) LPS 或 FITC-LPS 与单核细胞 (1×10^9 个/L) 共同孵育 2 h, 取其上清液用 ELISA 法测 TNF α 含量(重复 3 次测定, 结果取其平均值), 具体方法按试剂盒说明书进行。(3) FITC-LPS 与单核细胞膜结合能力的测定: 采用台盼兰灭活法^[2], 主要步骤为: 分别在 4 和 37 条件下, 将单核细胞 (1×10^9 个/L) 与 FITC-LPS 一起孵育 2 h, 冲洗, 再放入醋酸钠缓冲液内 (pH 5.8), 用流式细胞仪 (FCM) 测定结合有荧光素的 10 000 细胞的荧光强度; 然后将该标本与含有 0.02% 台盼兰的醋酸钠缓冲液孵育 20 s, 细胞再用醋酸钠缓冲液冲洗, 再次测其荧光强度。结合到细胞表面的 FITC-LPS 的百分率按以下公式计算: $100(A - b_{gr}) / (B - b_{gr}) \times 100\%$ 。其中 A 是台盼兰染色后的平均荧光强度, B 是染色前的平均荧光强度, b_{gr} 是对照细胞的背景荧光强度(重复 3 次测定, 结果取其平均值)。

结 果

1. FITC 标记 LPS 的标记率: 旧式方法 1 mol LPS 溶液中 FITC 的含量为 0.025 mol, 即 FITC:LPS 的标记比例为 1:40。新式方法 1 mol LPS 溶液中 FITC 的含量为 0.980 mol, 即 FITC:LPS 的标记比较为 1:1.02, 新式方法 FITC 的标记率显著高于旧式法 ($P < 0.05$)。

2. 鲎试验法测定结果: FITC-LPS 与标准 LPS (O₁₁₁ B₄) 生物活性基本一致, 两者间相比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。

3. 单核细胞分泌 TNF α 量变化: 分别将不同浓度 FITC-LPS 和 LPS 与单核细胞一起孵育 2 h, 观测其分泌 TNF α 的情况, 发现 2 种 LPS 刺激单核细胞分泌 TNF α 的量相比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。

4. FITC-LPS 与单核细胞膜的结合能力: 在 4 时, FITC-LPS 与单核细胞膜的结合能力为 47%, LPS 与单核细胞膜的结合能力为 50%; 在 37 时, FITC-LPS 与单核细胞膜的结合能力为 86%, LPS 与单核细胞膜的结合能力为 93%。各时相点比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。

讨 论

LPS 是研究感染的重要材料之一, LPS 与细胞

表面的结合是观察细胞激活及激活后信号传导的关键步骤^[3]。本实验中介绍的 FITC 标记 LPS 的方法, 其基本原理是先将 LPS 转化成单链状态, 在此基础上再用 FITC 进行标记, 其标记率高 (1/1.02)、方法简单, 且为非放射性标记, 结合 FCM 的应用, 是实验外科中研究 LPS 的一种比较有效的方法, 具有较广泛的应用前景。

为了观察用 FITC 标记后的 LPS 的生物学特性及与细胞结合能力有无变化, 我们用 FITC-LPS 刺激单核细胞观测其分泌 TNF α 的能力, 发现在 FITC-LPS 刺激下, 单核细胞分泌 TNF α 的量与天然 LPS 刺激下分泌的量基本一致, 说明 FITC 标记后的 LPS 仍保留刺激单核细胞分泌细胞因子的生物活性, 这与文献报道不一致, 其差异有待进一步分析^[4]。标记后的 LPS 与单核细胞在 0 和 37 时与单核细胞膜的结合率分别为 47% 和 86%, 与标准 LPS 的结合力一致, 说明标记 FITC 后并未影响 LPS 与细胞膜的结合能力。

FITC 结合到 LPS 分子上的确切机理仍不清楚, 根据有关 LPS 生物活性区的研究发现, LPS 由多糖部分和脂质部分构成, 前者是 LPS 的主要生物学活性成分, 后者的主要成分为脂质 IVa, 它不参与 LPS 诱导细胞合成和分泌肿瘤坏死因子 (TNF)、白细胞介素 (IL)-1 和白细胞介素 (IL)-6 等炎性介质, 所以 FITC 可能是与 LPS 的脂质部分即 IVa 结合^[5]。通过对 IVa 或 LPS 的去酰基不引起对 CD14 依赖的结合抑制, 表明 FITC 与 LPS 的结合和 LPS 对细胞的刺激是两个独立的过程。

参 考 文 献

- 1 Weersink AL, Kessel KP, Torensma R, et al. Binding of rough lipopolysaccharides (LPS) to human leukocytes. *J Immunol*, 1990, 145:318-324.
- 2 Medvedey AE, Flo T, Ingalls RR, et al. Involvement of CD14 and complement receptors CR3 and CR4 in nuclear factor- κ B activation and TNF production induced by lipopolysaccharide and group B streptococcal cell walls. *J Immunol*, 1998, 160:4535-4542.
- 3 Bellezzo JM, Britton RS, Bacon BR, et al. LPS-mediated NF- κ B activation in rat kupffer cells can be induced independently of CD14. *Am J Physiol*, 1996, 270:956-961.
- 4 Troelstra A, Szalmas PA, Miltenburg LA, et al. Saturable CD14-dependent binding of fluorescein-labeled lipopolysaccharide to human monocytes. *Infection Immunity*, 1997, 65:2272-2277.
- 5 Netea MG, Kullberg BJ, Meer WM. Lipopolysaccharide-induced production of tumour necrosis factor and interleukin-1 is differentially regulated at the receptor level: the role of CD14-dependent and CD14-independent pathways. *Immunology*, 1998, 94:340-344.

(收稿日期: 1999-09-13)