

• 临床研究 •

脂多糖结合蛋白与 CD14 基因多态性分布及其意义初步探讨

蔺静 姚咏明 黄志红 于燕 柴家科 于勇

【摘要】 目的 通过探讨脂多糖结合蛋白(LBP)Leu436→Phe 基因多态性对 CD14 合成与释放的影响以及 CD14 C-159T 对 LBP 蛋白浓度的调节效应,阐明这两种基因多态性的可能作用机制。方法 研究对象为 118 例健康献血员及 26 例烧伤面积>30%的患者,采用限制性片段长度多态性分析 LBP Leu436→Phe 及 CD14 C-159T 基因多态性,同时检测 CD14 mRNA 表达、可溶性 CD14 (sCD14)及 LBP 浓度。结果 体外全血培养实验中,脂多糖刺激与否,LBP Leu436→Phe 对 CD14 mRNA 表达、sCD14 水平均无明显影响($P>0.05$),CD14-159 位点基因型也与 LBP 浓度无关($P>0.05$)。而对烧伤面积>30%的患者研究显示,CD14-159 位点 TT 基因型患者 LBP 浓度于伤后第 3、21 天明显高于 CC 基因型($P<0.05$)。结论 CD14C-159T 基因多态性可能通过间接调节机制影响 LBP 产生,并与严重烧伤患者预后不良有关。

【关键词】 烧伤;脂多糖类;抗原,CD14;基因多态性

The distribution and potential significance of lipopolysaccharide binding protein and CD14 gene polymorphism

LIN Jing, YAO Yongming, HUANG Zhihong, et al

Burns Institute, First Hospital Affiliated to the PLA General Hospital

(formerly 304th Hospital), Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To determine the possible mechanism of lipopolysaccharide binding protein (LBP) Leu436→Phe and CD14 C-159T genetic polymorphism in terms of the influence of LBP Leu436→Phe genetic polymorphism on lipopolysaccharide receptor CD14 gene expression as well as protein release, and the potential regulating effect of CD14 C-159T on LBP levels. Methods The study group consisted of 118 healthy blood donors and 26 patients with burns covering more than 30% of total body surface area. The LBP and CD14 genetic polymorphisms were detected by restriction-fragment length polymorphism analysis. Meanwhile, the CD14 mRNA expression, soluble CD14 (sCD14) and LBP levels were determined with ELISA methods. Results LBP Leu436→Phe had no marked influence on CD14 mRNA expression as well as CD14 levels (all $P>0.05$), and the genotype of CD14 at position -159 site was not related to LBP levels in *in vitro* whole blood culture with or without lipopolysaccharide stimulation (100 $\mu\text{g}/\text{L}$ for 12 h). However, in patients with burns covering more than 30% of total body surface area, TT genotype showed significantly higher LBP levels than CC homozygotes on days 3 and 21 post burn ($P<0.05$). Conclusion CD14C-159T polymorphism might affect LBP production indirectly through the action of cytokines, which appears to be associated with the poor outcome of patients with major burns.

【Key words】 burns; lipopolysaccharides; antigen, CD14; genetic polymorphism

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是介导革兰

阴性菌脓毒症(sepsis)及多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的重要致病因子,通过与脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide-binding protein, LBP)形成 LPS-LBP 复合物并与细胞表面受体 CD14 分子作用,从而激活细胞内炎症信号转导通路。LBP/CD14 作为内毒素反应的增敏系统,参与了革兰阴性菌脓毒症和多器官损害的病理生理过程。笔者既往研究表明,

收稿日期:2006-08-04

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(2005CB522602); 国家杰出青年科学基金资助项目(30125020); 北京市科技计划重大项目(H020920020530); 首都医学发展基金重点项目(2003-2023)

作者单位:100037 北京市,解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所
作者简介:蔺静,女,1971年12月生,北京市人,在读博士研究生,主治医师。

通讯作者:姚咏明, Tel:010-66867394, E mail: e_ff@sina.com

LBP Phe436Leu、CD14 C-159T 基因多态性分别与 LBP 浓度、CD14 mRNA 表达有关^[1,2]。由于信号分子之间存在交互作用,LBP Phe436Leu 是否会影响到 CD14 表达,LBP 合成又是否受到 CD14-159 位点基因型的反馈调节尚不清楚,笔者通过体外、体内实验对此进行了初步探讨。

1 对象与方法

1.1 研究对象 (1)体外实验:118例健康献血员,汉族,男102例,女16例;年龄18~51岁,平均(23.7±4.7)岁。试验前经检查未发现任何慢性疾病且未服用任何药物。无菌收集乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝全血标本,取1ml全血培养,100μg/L 内毒素刺激,另取1ml全血培养不加内毒素刺激,12h后分离上清及细胞并于-70℃保存^[3]。(2)临床试验:26例热力烧伤总面积>30%的患者来源于解放军总医院第一附属医院烧伤研究所和北京军区总医院分院烧伤科,其中男23例,女3例;年龄19~57岁。分别于伤后24h内,第3、7、14、21、28天无菌操作收集 EDTA-K₂ 抗凝全血标本(受检前经医院医学伦理委员会批准,并签署自愿接受医学实验知情同意书)。

1.2 LBP Leu436→Phe 及 CD14 C-159T 基因多态性分析 (1)基因组 DNA 的提取:采用北京赛百盛基因技术有限公司的 UltraPure™ 基因组 DNA 提纯试剂盒,严格按照说明书进行操作。(2)LBP Leu436→Phe 基因多态性分析^[4]:LBP 基因 PCR 扩增的正向引物为 5'-TCC TCA ACT ATT ACA TCC TTA AGG CC-3',反向引物为 5'-TTT CCT CCA GAC AGC AGT GTT CAC-3'。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 1.5min,然后 93℃ 20s,56℃ 30s 和 72℃ 30s,35 个循环后 72℃ 延伸 10min。PCR 反应产物为 102bp。取 6 μl PCR 产物与限制性核酸内切酶 Stu I (购自美国 Promega 公司)于 37℃ 温育 4 h。Phe436 纯合子产生 78bp 和 24bp 两个片段;杂合子产生 102bp,78bp 和 24bp 三个片段;Leu436 纯合子只有 102bp 一个片段。酶切产物于 4% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下判定结果。取 40 份 DNA 样本测序,进行基因型验证。(3)CD14 C-159T 基因多态性分析^[5]:CD14 基因启动子 PCR 扩增的正向引物为 5'-TGCCAGGAGA-CACAGAACCC-3',反向引物为 5'-TGTCATTCA GTTCCCTCCTC-3'。PCR 反应条件为:96℃ 预变性 3 min,然后 96℃ 40 s,56℃ 40 s 和 72℃ 50 s,38

个循环后 72℃ 延伸 10 min。PCR 反应产物为 166 bp。取 6 μl PCR 产物与限制性核酸内切酶 HaeIII (购自美国 Promega 公司)于 37℃ 温育 4 h。HaeIII 识别位点为 5'-GGCC-3',纯合子 CC 产生 115 bp 和 51 bp 两个片段;杂合子 TC 产生 166 bp,115 bp 和 51 bp 三个片段;纯合子 TT 只有 166 bp 一个片段。酶切产物于 4% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下判定结果。取 40 份 DNA 样本测序,进行基因型验证。

1.3 CD14 mRNA 表达检测 提取烧伤患者外周血白细胞总 mRNA(美国 Promega 公司产品),采用逆转录 PCR 技术检测 CD14 mRNA 的表达,以 β-actin 作为内参对照。人 CD14 扩增片段引物正义链为:5'-GGT GCC GCT GTG TAG GAA AGA-3',反义链为:5'-GGT CCT CGA GCG TCA GTT CCT-3'^[6];人 β-actin 扩增片段引物正义链为:5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3',反义链为:5'-GTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'^[7]。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后照相,照片采用 LEICA Q-500IW 图像分析处理系统进行分析,采用目的基因与内参对照的积分光密度比值表示 mRNA 相对表达量。

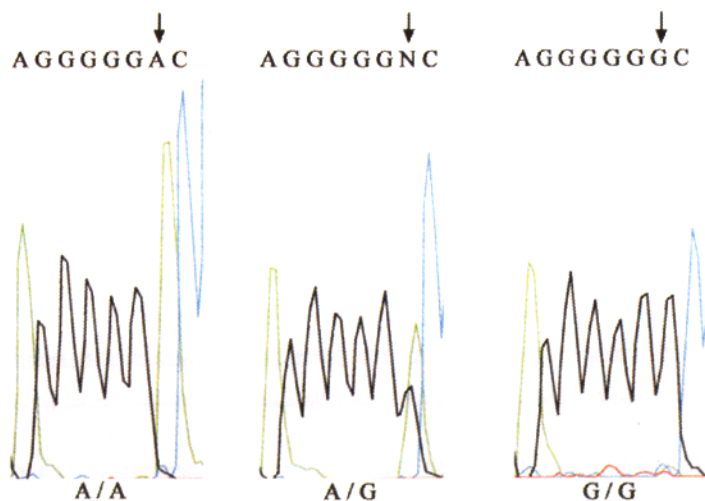
1.4 LBP 及 sCD14 蛋白水平检测 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测烧伤患者血清 LBP 及可溶性 CD14(sCD14)浓度。所用人 LBP ELISA 检测试剂盒(荷兰,Hbt 公司),灵敏度为 1μg/L,人 sCD14 ELISA 检测试剂盒(德国 IBL 公司产品),灵敏度为 0.24μg/L。严格按照试剂盒说明书进行操作,计算出标准曲线回归方程,将样品光密度值代入标准曲线,并乘以相应的稀释倍数,计算出样品的含量。

1.5 统计学处理 观察指标以平均±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS11.0 统计软件进行 χ^2 检验、*t* 检验和单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

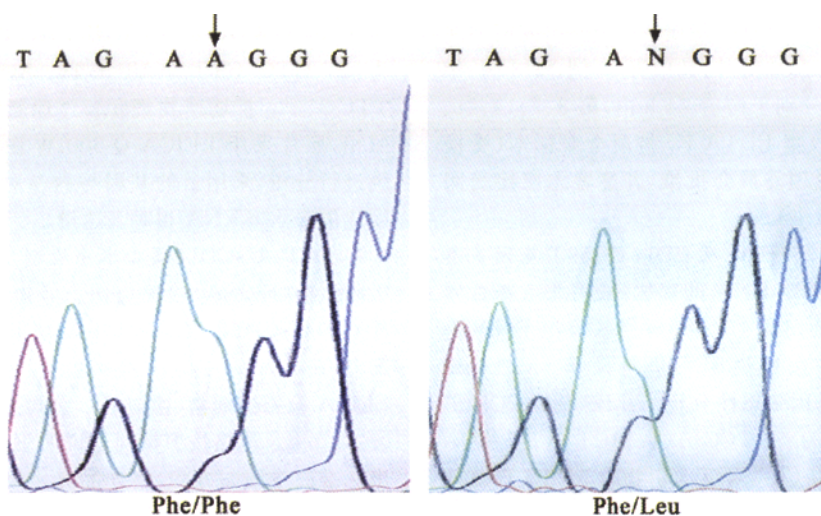
2.1 CD14-159 位点基因多态性的分布 118 例健康献血员中 40 例为 T 等位基因纯合子,62 例为 TC 杂合子,C 等位基因纯合子有 16 例。26 例烧伤患者检出 8 例 TT 纯合子,14 例 TC 杂合子,4 例 CC 纯合子。DNA 测序结果见图 1、2。

2.2 LBP Leu436→Phe 基因多态性的分布 118 例健康献血员中,检出 Phe436 纯合子 104 例,杂合子 14 例,未检出 Leu436 纯合子。26 例烧伤患者中



从左至右依次为 TT、TC、CC 基因型反方向(3'-5') DNA 序列

图1 CD14 基因测序结果



从左至右依次为 Phe/Phe (ttc/ttc)及 Phe/Leu (ttc/ctc)基因型反方向(3'-5')DNA 序列

图2 LBP 基因测序结果

只有 1 例为杂合子,其余均为 Phe436 纯合子。

2.3 LBP Phe436Leu 基因多态性对 CD14 mRNA 表达及 sCD14 浓度的影响 全血细胞体外培养, LPS 刺激组及未刺激组,在 CD14-159 位点基因型相同的情况下, LBP Phe436Leu 基因多态性对 CD14 mRNA 表达及 sCD14 水平均无明显影响 ($P>0.05$,表 1,2)。

2.4 CD14 C-159T 基因多态性对 LBP 浓度的影响

全血细胞体外培养, LPS 刺激组及未刺激组, CD14 C-159T 基因多态性对 LBP 浓度影响均不明显 ($P>0.05$,表 3)。

2.5 烧伤患者 CD14 C-159T 基因多态性对 LBP 浓度的影响 CD14-159 位点三种基因型 LBP 浓度到达峰值及持续时间有所不同。TT 及 TC 基因型于伤后第 3 天即达到较高水平,并且一直持续至伤后 3 周之后,而 CC 纯合子第 7 天才明显升高,仅持续了 2 周时间便明显下降。其中伤后第 3 天和第 21 天,TT 纯合子患者血浆 LBP 浓度明显高于 CC 纯合子 ($P<0.05$,表 4)。

2.6 烧伤患者血浆 LBP 浓度与预后的关系 伤后 3 周内死亡患者 LBP 浓度均高于存活患者,其中伤后第 14、21 天存在显著性差异 ($P<0.05$,表 5)。

表 1 LBP Phe436Leu 基因多态性对 CD14 mRNA 表达的影响 (光密度比值, $\bar{x} \pm s$)

分组	TT		TC		CC	
	Phe/Phe	Phe/Leu	Phe/Phe	Phe/Leu	Phe/Phe	Phe/Leu
组 1	0.869±0.157	0.959±0.010	0.925±0.207	0.936±0.233	0.890±0.135	0.713±0.000
组 2	1.413±0.209	1.626±0.257	1.408±0.201	1.461±0.234	1.236±0.303	1.152±0.000

注:组 1 为 LPS 未刺激组,组 2 为 LPS 刺激组(表 2,3 同)

表 2 LBP Phe436Leu 基因多态性对 sCD14 水平的影响 (mg/L, $\bar{x} \pm s$)

分组	TT		TC		CC	
	Phe/Phe	Phe/Leu	Phe/Phe	Phe/Leu	Phe/Phe	Phe/Leu
组 1	3.18±0.23	3.40±0.38	2.66±0.31	2.97±0.42	2.07±0.07	1.90±0.00
组 2	3.53±0.74	3.81±1.20	3.00±0.63	3.46±1.16	2.43±0.36	1.97±0.00

表 3 全血细胞体外培养 CD14 C-159T 基因多态性对 LBP 浓度的影响 (mg/L, $\bar{x} \pm s$)

分组	Phe/Phe			Phe/Leu		
	TT	TC	CC	TT	TC	CC
组 1	21.58±9.71	14.96±2.23	11.04±0.61	21.93±12.49	22.04±6.72	16.58±0.00
组 2	13.82±7.12	11.50±1.76	14.82±5.45	20.48±9.26	20.61±3.43	16.16±0.00

表 4 烧伤患者 CD14 C-159T 基因多态性对 LBP 浓度的影响 (mg/L, $\bar{x} \pm s$)

基因型	伤后时间(d)					
	1	3	7	14	21	28
TT(n=8)	28.25±11.74	54.40±30.85*	55.93±18.51	55.91±25.01	49.71±6.32*	46.98±11.43
TC(n=14)	30.03±9.89	49.96±17.58	54.75±10.84	47.08±11.91	44.19±8.05	46.47±18.68
CC(n=4)	20.14±3.27	32.76±10.75	47.96±20.10	51.06±28.11	36.02±17.75	36.46±18.95

注:与 CC 基因型相应时间比较, * P<0.05

表 5 LBP 浓度与烧伤预后的关系 (mg/L, $\bar{x} \pm s$)

组 别	伤后时间(d)					
	1	3	7	14	21	28
存活组(n=19)	22.75±4.56	38.21±14.82	52.33±15.96	44.93±16.18	42.29±12.06	45.13±15.14
死亡组(n=7)	28.69±5.23	44.03±14.04	59.39±13.54	70.33±24.97*	54.31±10.87*	44.03±7.11

注:与存活组相应时间比较, * P<0.05

3 讨 论

脓毒症及 MODS 的发生与糖尿病、哮喘或高血压等常见多基因疾病相似,不遵循孟德尔遗传表型——基因型的规律,难以用一般的家系遗传连锁分析取得突破,而受到多基因调控。多基因疾病是由多个微效基因的累加作用和某些环境因子作用所致,其发生和发展是多基因或多通路间平衡失调的结果。因此,脓毒症和 MODS 的发生与其调节通路中候选基因的相互作用以及炎症反应的网络调控密不可分^[8]。

LPS 作为革兰阴性菌内毒素的主要成分及致病因子,系脓毒症及 MODS 的重要诱发因素。由于 LBP 与 CD14 在 LPS 诱导的信号通路中存在密切联系,LBP Phe436Leu 与 CD14 C-159T 基因多态性是否分别对 CD14 以及 LBP 表达产生交互影响,目

前尚不清楚。本组资料中,体外全血培养实验证实 LBP Phe436Leu 多态性与 CD14 mRNA 表达及 sCD14 水平无关,而且 CD14 C-159T 多态性也未明显影响 LBP 浓度。然而不能忽视的是,上述结果很可能与 LBP 浓度在体外 LPS 刺激组与未刺激组并未发生显著变化有关。虽然有研究表明,LBP 除主要由肝细胞合成外,少部分可在肝外组织(如肺、肠、肾等)合成^[9],但尚未见在白细胞中合成的相关报道,并且笔者体外实验结果也证实了白细胞中 LBP mRNA 表达为阴性^[1]。因此体外细胞培养只能反映 LBP 生理浓度时 LBP Phe436Leu 多态性与 CD14 mRNA 表达及 sCD14 水平无关,CD14 C-159T 基因多态性对 LBP 浓度没有明显影响也只能反映 LPS 未刺激组的状况。

鉴于体外实验的缺陷,笔者进一步以大面积烧伤患者为研究对象,探讨 CD14-159 位点基因型与

LBP 血浆浓度之间的关系。由于 26 例烧伤患者中仅 1 例为 Phe/Leu 杂合子,其余均为 Phe/Phe 纯合子,因此暂不能用以分析 LBP Phe436Leu 多态性对 CD14 表达的影响。本临床观察显示,烧伤后第 3、21 天,TT 基因型患者 LBP 浓度明显高于 CC 纯合子,且峰值持续时间较长。因此 CD14-159 位点多态性可能间接影响 LBP 蛋白浓度。据报道,LBP 的合成受到白细胞介素-6(IL-6)水平的调节,用 IL-6 刺激人 HepG2 细胞,第 1 天 LBP 的合成量高于基础值 10 倍,第 2 天高于 100 倍^[10]。笔者既往研究发现,CD14 C-159T 基因多态性不仅与 CD14 表达有关,而且与 IL-6 水平有关;体外全血细胞 LPS 刺激后,TT 纯合子与 TC 杂合子上清液中 IL-6 水平明显高于 CC 纯合子^[11]。可以推测,CD14 C-159T 基因多态性可能通过调控其下游信号通路中炎症因子 IL-6 的水平,从而影响肝脏等器官合成分泌 LBP。升高的 LBP 与 CD14 相互作用,实现对 LPS 刺激的增敏效应,由此信号通路的正反馈调节对炎症反应起到放大作用^[12]。

本组临床资料显示,死亡患者伤后第 14、21 天 LBP 浓度明显高于存活患者。与此结果相一致的是血中 sCD14、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)浓度愈高,患者易于并发 MODS,其预后愈差^[13~15]。因此,CD14-159 位点多态性通过调节 CD14 表达,进而影响 sCD14、TNF- α ^[2]及 LBP 浓度,对烧伤后患者并发脓毒症、MODS 和预后不良起到促进作用。而 LBP Phe436Leu 多态性的确切临床意义尚待大宗临床病例深入探讨。

参考文献

- [1] 蔺静,姚咏明,威力明,等.脂多糖结合蛋白(LBP)基因多态性对 LBP 及细胞因子诱生的影响.中华实验外科杂志,2005,22:1425-1426.
- [2] 蔺静,姚咏明,黄志红,等.CD14-159C/T 基因多态性对全血培养 CD14 表达的影响.中华外科杂志,2005,43:1024-1027.
- [3] Louis E,Franchimont D,Piron A,et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. Clin Exp Immunol,1998,113:401-406.
- [4] Hubacek JA,Stuber F,Frohlich D,et al. Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. Crit Care Med,2001,29:557-561.
- [5] Gibot S,Cariou A,Drouet L,et al. Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. Crit Care Med,2002,30:969-973.
- [6] Cario E, Rosenberg IM,Brandwein SL,et al. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. J Immunol,2000,164:966-972.
- [7] De Waal Malefyt R,Abrams J,Bennett B,et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes; an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med,1991,174:1209-1220.
- [8] Lin MT,Albertson TE. Genomic polymorphisms in sepsis. Crit Care Med,2004,32:569-579.
- [9] Tobias PS,Tapping RI,Gegner JA. Endotoxin interactions with lipopolysaccharide-responsive cells. Clin Infect Dis,1999,28:476-481.
- [10] Grube BJ,Cochane CG,Ye RD,et al. Lipopolysaccharide binding protein expression in primary human hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. J Biol Chem,1994,269:8477-8482.
- [11] 蔺静,姚咏明,威力明,等.CD14-159 C/T 基因多态性对 CD14 表达及炎症介质平衡的影响.中国急救复苏与灾害医学杂志,2006,1:32-35.
- [12] 姚咏明,柴家科,林洪远,主编.现代脓毒症理论与实践.北京:科学出版社,2005.96-130.
- [13] 姚咏明,于燕,吴叶,等.烧伤后多器官功能障碍综合征患者可溶性脂多糖受体 CD14 的变化.中华外科杂志,1998,36:668-670.
- [14] Carrillo EH,Gordon L,Goode E,et al. Early elevation of soluble CD14 may help identify trauma patients at high risk for infection. J Trauma,2001,50:810-816.
- [15] Ismail N,Stevenson HL,Walker DH. Role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-10 in the pathogenesis of severe murine monocytotropic ehrlichiosis; increased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to fatal ehrlichial infection. Infect Immun,2006,74:1846-1856.