

引用本文: 胡雅琦, 李茹祥, 牛晓媛, 王连永. 功能性磷脂分子修饰细胞膜及对细胞行为的影响 [J]. 离子交换与吸附, 2026, 42(1): 32-38.

Citation: HU Ya-qi, LI Ru-xiang, NIU Xiao-yuan, WANG Lian-yong. Modification of Cell Membrane by Functional Phospholipid and Its Effect on Cell Behaviors [J]. Ion Exchange and Adsorption, 2026, 42(1): 32-38.

· 研究论文 ·

文章编号: 1001-5493(2026)01-0032-07

DOI: 10.16026/j.cnki.ica.2026010032

功能性磷脂分子修饰细胞膜及对细胞行为的影响*

胡雅琦, 李茹祥, 牛晓媛, 王连永**

(南开大学生命科学学院, 教育部生物活性材料重点实验室, 天津, 300071)

摘要: 细胞表面修饰是工程化细胞的关键策略之一, 对研究细胞功能及拓展其应用具有重要意义。文章通过迈克尔加成反应制备了一种含有 Kim-1 靶向肽 (KBP) 的 DMPE-PEG-KBP (DMPK) 磷脂分子, 并利用非共价疏水相互作用将 DMPK 修饰到间充质干细胞 (MSCs) 表面。通过共聚焦显微镜, 系统考察了 DMPK 浓度、修饰时间、修饰温度以及修饰环境对表面修饰效果的影响, 同时评估了修饰对 MSCs 行为的影响。实验结果表明, DMPK 能在 MSCs 表面实现均匀修饰, 且不影响 MSCs 的增殖能力及表型特征。本研究为干细胞工程化修饰提供了一种可行方法, 对推动干细胞的相关应用具有重要价值。

关键词: 磷脂分子, 细胞修饰, 疏水作用, 间充质干细胞, 细胞行为

中图分类号: Q2-33 **文献标志码:** A

1 前言

细胞膜是细胞与外界环境之间的重要屏障, 它不仅能维持细胞的形态和结构, 还参与细胞内外物质交换、信号传导等诸多重要的生理过程。通过化学、生物修饰等手段, 在细胞表面引入特定功能分子, 如蛋白质、表面受体、抗体、肽和聚合物等, 可实现对细胞的精准调控, 并赋予其特定功能^[1-3]。这为疾病的诊断、治疗及生物材料的研发提供了新的思路和方法^[4]。目前, 利用各类天然和合成高分子材料进行细胞表面修饰的方法主要包括共价偶联、静电相互作用和疏水相互作用3类^[5]。

共价偶联是常见的细胞膜修饰方法之一, 通过化学反应, 将特定的化学基团或分子引入细胞膜表面, 从而改变细胞膜的性质和功能。例如, 亲水性基团的修饰有助于细胞在特定环境中存活并发挥作用。此外, 生物分子偶联也是重要的修

饰方法。将蛋白质、多肽、核酸等生物分子偶联至细胞膜, 可赋予细胞新的生物学功能。例如, 抗体偶联能使细胞具备特异性识别与结合目标分子的能力, 在肿瘤靶向治疗中具有重要应用价值。

基于疏水相互作用的修饰方法, 主要利用两亲性分子 (如功能性磷脂分子) 的疏水片段与细胞膜磷脂双分子层的疏水相互作用, 将两亲性分子插入细胞膜表面, 实现非侵入性修饰。与共价偶联修饰相比, 这种修饰方法操作简便, 细胞毒性更低, 修饰后细胞仍可进行正常的生理活动^[6-7], 是一种适用于几乎所有类型细胞的快速、无毒的细胞膜表面修饰方法, 具有广泛的应用潜力^[8-9]。

Kim-1 是肾脏疾病的重要生物标志物, KBP 是能与 Kim-1 有效结合的多肽分子, 其氨基酸序列为 CLTHVVWL^[10]。本研究通过迈克尔加成反应, 将马来酰亚胺活化的磷脂分子 DMPE-PEG-MAL 与 KBP 偶联, 合成 DMPE-PEG-KBP (DMPK) 分子。利用激光扫描共聚焦显微镜

* 收稿日期: 2025-03-14

基金项目: 国家重点研发计划 (项目号 2020YFA0710801)。

作者简介: 胡雅琦 (2000—), 女, 硕士研究生。

**通信作者: 王连永, E-mail: wly@nankai.edu.cn。

(CLSM) 优化了 DMPK 的修饰浓度、时间、温度, 并通过细胞增殖实验考察修饰后的间充质干细胞 (MSCs) 的行为, 最后通过流式细胞仪评估 DMPK 修饰对细胞表型的影响。本研究为干细胞工程化修饰提供了一种可行方法, 有助于拓展干细胞在肾脏疾病治疗中的应用前景。

2 实验部分

2.1 试剂和仪器

主要试剂: KBP 购自杭州固拓生物科技有限公司; DMPE-PEG-MAL ($M_w=5$ kDa) 购自上海芃硕生物科技有限公司; 异硫氰酸荧光素 (FITC) 购自上海麦克林生化科技有限公司; N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 购自天津索罗门生物科技有限公司; 脐带间充质干细胞 (MSCs) 购自南京泰盛生物科技有限公司; DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶 (Trypsin)、胎牛血清 (FBS) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 青霉素-链霉素双抗溶液购自天津联星生物技术有限公司; CCK-8 试剂盒购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 活/死细胞染色试剂盒购自天津索罗门生物科技有限公司; CD29、CD105、CD14、CD34 和 CD45 多克隆抗体均购自 Abcam 公司。其余化学试剂均为分析纯, 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

主要仪器: 核磁共振波谱仪, Varian Mercury Plus 400 MHz, 瑞士 Mercury 公司; 激光扫描共聚焦显微镜, Leica TCS SP5, 德国徕卡仪器有限公司; 流式细胞仪, FACS Calibur, 美国 B&D Company 公司。

2.2 实验方法

2.2.1 DMPK 分子和 DMPK-F 分子的合成

首先, 将 DMPE-PEG-MAL (100 mg, 20 μ mol) 和 KBP (29.1 mg, 30 μ mol) 溶于 10 mL DMF 中, 滴加三乙胺调节溶液 pH 至 8.0, 混合物在氮气保护下搅拌反应过夜。反应结束后, 将混合物置于透析袋 ($M_w=3000$) 中用超纯水透析 2 d, 冷冻干燥后得到产物 DMPK。其次, 将制得的一定量的 DMPK 和 FITC 共同溶解于 5 mL pH=8.5 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 在避光条件下搅拌反应过夜。反应结束后, 将混合物置于透析袋 ($M_w=3000$) 中用去离子水透析 3 d, 冷冻干燥后得到产物 DMPK-F。

2.2.2 DMPE-PEG-MAL 和 DMPK 的表征

使用 Varian Mercury Plus 400 MHz 核磁共振

波谱仪对 DMPE-PEG-MAL 和产物 DMPK 的化学结构进行表征。

2.2.3 MSCs 培养

将复苏的 MSCs 接种于培养瓶, 加入 DMEM/F12 (含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗) 培养基, 置于温度为 37 $^{\circ}$ C、二氧化碳质量分数为 5% 的细胞培养箱中培养, 并传代至第 5 代用于后续实验。

2.2.4 DMPK-F 修饰 MSCs

优化 DMPK-F 的修饰浓度。用胰蛋白酶消化传代至第 5 代的 MSCs, 用 5 mL 的 PBS 重悬细胞离心洗涤 3 次, 得到细胞密度为 1.25×10^6 个/mL 的细胞悬液。将 DMPK-F 粉末溶于 PBS 中, 配制 500 μ M 的 DMPK-F 溶液。分别取 1、5、25 和 50 μ L 的 DMPK-F 溶液, 加入 MSCs 细胞悬液中, 用 PBS 定容至 0.5 mL, 使其浓度分别为 1、5、25 和 50 μ M。所上述体系在 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育 10 min, 随后在室温下 1000 r/min 离心 5 min, 并用 PBS 洗涤 MSCs 3 次, 最后用 1 mL 无血清培养基重悬, 即可获得不同浓度 DMPK-F 修饰的 MSCs。通过 CLSM 成像及荧光强度分析, 对 DMPK 修饰 MSCs 的效果进行评估。为排除 FITC 对细胞修饰的影响, 用 500 μ M 的 FITC 溶液以同样的方法修饰 MSCs 作为对照。

为优化 DMPK-F 的修饰时间, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下, 分别将 5 μ M 和 25 μ M 的 DMPK-F 溶液与 MSCs 孵育 2、10、30 min, 随后按上述步骤洗涤, CLSM 拍照和荧光强度分析与前述相同。

为优化 DMPK 的修饰温度, 在 4 $^{\circ}$ C 和室温条件下, 分别将 5 μ M 和 25 μ M 的 DMPK-F 溶液与 MSCs 孵育 10 min, 随后按上述步骤洗涤, CLSM 拍照和荧光强度分析与前述相同。

参照前述方法考察在有血清或无血清的培养基环境中, DMPK-F 在 MSCs 表面修饰的稳定性。

2.2.5 细胞增殖检测

根据 2.2.4 中所述的方法, 将不同浓度 DMPK-F 修饰的 MSCs 接种于 48 孔板中 ($n=5$, 加入 200 μ L 的完全培养基), 分别培养 1、3、5 d 后, 用 CCK-8 试剂盒检测 MSCs 的增殖活性。同时, 使用活/死细胞染色试剂盒对细胞进行染色, 并通过 CLSM 拍摄细胞的荧光照片来分析细胞的增殖和存活情况。

2.2.6 MSCs 细胞干性检测

采用流式细胞仪检测 DMPK-F 修饰对

MSCs表面干性标志物的影响。根据2.2.4中所述的方法,用PBS将25 μM DMPK-F修饰的MSCs洗涤3次后,再用FACS Bufer洗涤1次。用FACS Bufer重悬得到细胞密度为 1×10^6 个/mL的细胞悬液。取200 μL 细胞悬液,分别加入1 μL 0.2 mg/mL的CD29、CD105、CD14、CD34和CD45荧光抗体,室温孵育30 min,用1 mL的FACS Bufer洗涤3次后重悬于FACS Bufer中,得到修饰的MSCs悬液,使用流式细胞仪对MSCs悬液进行检测,并用FlowJo软件进行数据分析。

3 结果与讨论

3.1 DMPK分子的合成与表征

DMPK分子的合成反应如图1(a)所示,通过KBP分子末端的巯基与DMPE-PEG-MAL分子末端的马来酰亚胺基团中的碳碳双键发生迈克尔加成反应,成功合成DMPK分子。在 ^1H NMR谱图中,DMPE-PEG-MAL中马来酰亚胺基团对应的化学位移峰($\delta=6.9$ ppm, a峰)在DMPK中消失了;同时,在 $\delta=7.0\sim 7.6$ ppm (b~e峰)范围内出现KBP吡啶环对应的化学位移峰(图1(b)),表明了DMPK分子已成功合成。

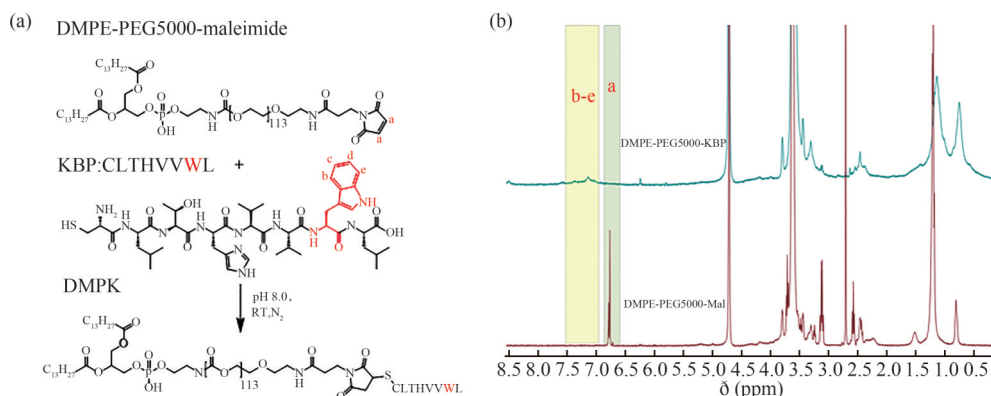


图1 DMPK分子的合成与表征: (a) DMPK合成反应示意图; (b) DMPE-PEG-MAL和DMPK的 ^1H NMR (D_2O)。

Figure 1 Synthesis of DMPK molecules: (a) Schematic diagram of the reaction of DMPE-PEG-MAL with KBP molecules; (b) ^1H NMR of DMPE-PEG-MAL and DMPK in D_2O .

3.2 DMPK-F修饰浓度对细胞修饰的影响

考察DMPK-F修饰浓度对细胞修饰的影响。结果显示,当DMPK-F浓度为0~25 μM 时,细胞表面均能检测到荧光信号,荧光强度(图2(a))与DMPK-F浓度呈正相关(图2(b))。当DMPK-F浓度提高至50 μM 时,平均荧光强度

(MFI)未出现显著增加。因此,将25 μM 确定为最佳修饰浓度。作为对照,FITC主要分布在细胞内部,未见明显的细胞表面修饰,表明FITC不影响DMPK-F对细胞的修饰。DMPK-F对细胞的修饰主要依靠DMPK与细胞膜之间的疏水相互作用。

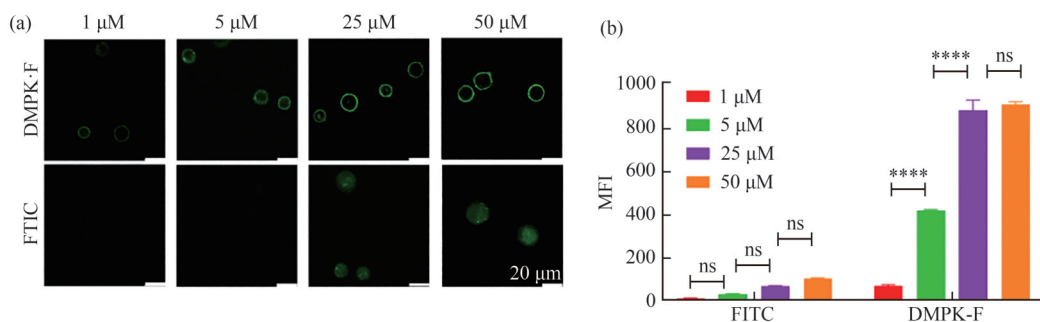


图2 不同浓度DMPK-F及FITC修饰MSCs的效果: (a) DMPK-F及FITC修饰MSCs效果CLSM成像; (b) 不同浓度DMPK-F及FITC修饰MSCs的MFI统计 (ns表示无显著差异,**** $P < 0.0001$)。

Figure 2 Effects of DMPK-F and FITC at different concentrations on MSCs: (a) CLSM imaging of MSCs modified by DMPK-F and FITC; (b) MFI statistics of MSCs modified by DMPK-F and FITC at different concentrations (ns indicates there is no significant difference, **** $P < 0.0001$).

3.3 DMPK-F 修饰时间对细胞修饰的影响

考察 DMPK-F 修饰时间对细胞修饰的影响。采用不同浓度 (5 μM 和 25 μM) 的 DMPK-F, 观察当修饰时间分别为 2、10、30 min 时其对 MSCs 的修饰效果。CLSM 成像和 MFI 统

计结果显示, 修饰 10 min 的效果明显优于修饰 2 min, 修饰 10 min 和 30 min 的效果无显著差异 (图 3)。因此, 将 10 min 确定为 DMPK-F 的最佳修饰时间, 表明 DMPK-F 对细胞的修饰时间较快。

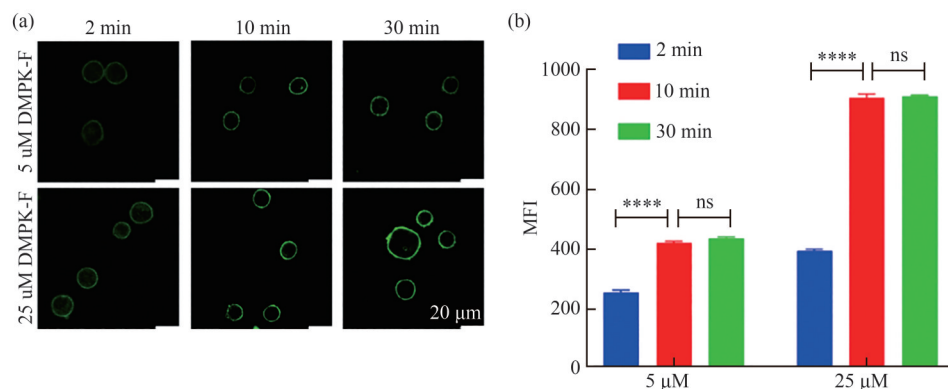


图3 修饰时间对MSCs修饰效果的影响: (a) 修饰效果的CLSM成像; (b) 修饰时间对MSCs修饰效果的MFI统计 (ns表示无显著差异, **** $P < 0.0001$)。

Figure 3 Influence of modification time on MSCs modification effect: (a) CLSM imaging of modification effects; (b) MFI statistics of modification time on modification effect of MSCs (ns indicates there is no significant difference, **** $P < 0.0001$).

3.4 DMPK-F 修饰温度对细胞修饰的影响

考察 DMPK-F 修饰温度对细胞修饰的影响。采用不同浓度 (5 μM 和 25 μM) 的 DMPK-F, 观察分别在 4 $^{\circ}\text{C}$ 和室温条件下修饰 10 min 其对 MSCs 的修饰效果。CLSM 成像和 MFI 统计结果

显示 (图 4(a)~(b)), 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的修饰效果明显优于室温条件下的修饰效果。此外, 在室温条件下, 浓度为 25 μM 的 DMPK-F 易被 MSCs 内吞, 难以均匀分布在细胞膜表面。因此, 将 4 $^{\circ}\text{C}$ 确定为 DMPK-F 的最佳修饰温度。

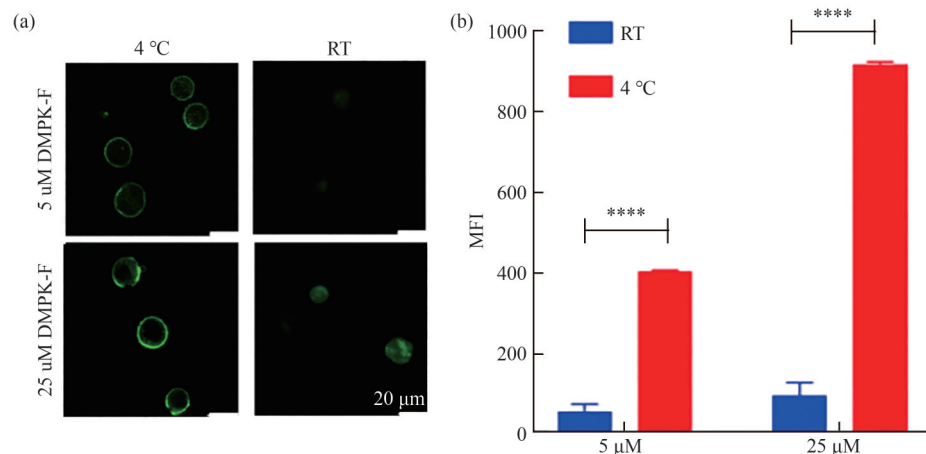


图4 修饰温度对MSCs修饰效果的影响: (a) 不同温度下修饰效果的CLSM成像; (b) 不同温度下修饰效果的MFI统计 (**** $P < 0.0001$)。

Figure 4 Influence of modification temperature on modification effect of MSCs: (a) CLSM imaging of modification effects at different temperatures; (b) MFI statistics of modification effects at different temperatures (**** $P < 0.0001$).

3.5 DMPK-F 在细胞表面的稳定性

如图 5 所示, 血清的存在对修饰稳定性具有

一的影响。随着时间的延长, 荧光强度逐渐降低, 4 h 后, 与初始 MFI 相比, 有血清和无血清

组的 MFI 分别为 $44.91\% \pm 2.5\%$ 和 $67.50\% \pm 2.3\%$ 。这表明在血清存在的条件下, 荧光强度下降更快, 在无血清存在的条件下, DMPK-F 的修饰更稳定。荧光强度的减弱是由细胞正常生理活

动过程中的膜流动引起的^[11]。因此, 为确保 DMPK 对 MSCs 的修饰效果最佳且最稳定, 后续实验条件如下: 修饰浓度为 $25 \mu\text{M}$ 、修饰时间为 10 min、修饰温度为 4°C 。

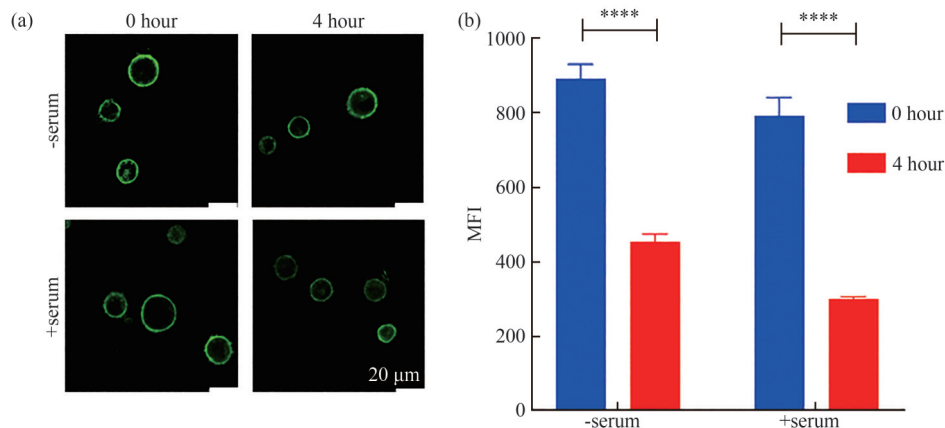


图5 DMPK-F 在 MSCs 表面的稳定性: (a) $25 \mu\text{M}$ DMPK-F 在有血清存在下修饰的 MSCs 的 CLSM 成像; (b) 有无血清存在下细胞表面 MFI 的变化 (**** $P < 0.0001$)。

Figure 5 Stability of DMPK-F on MSCs surface: (a) CLSM imaging of MSCs modified MSCs with $25 \mu\text{M}$ DMPK-F in the presence or absence of serum; (b) Changes of MFI on cell surface in the presence or absence of serum (**** $P < 0.0001$).

3.6 DMPK 修饰对细胞增殖的影响

如图 6 所示, 经 5、25、50 μM 的 DMPK 修饰后, MSCs 的增殖能力与未修饰组相比无显著差异, 且不受 DMPK 修饰浓度的影响 (图 6(a))。细胞活/死染色结果显示, 未发现

明显的死亡细胞 (红色), 细胞形态呈梭形, 伸展情况良好, 说明 DMPK 修饰对细胞增殖能力无显著影响 (图 6(b))。这表明 DMPK 修饰是一种安全、无细胞毒性的细胞表面修饰方法。

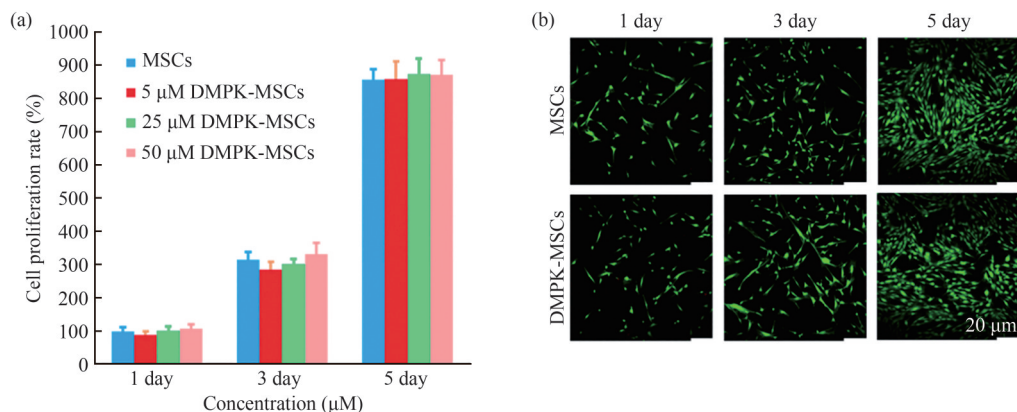


图6 DMPK 修饰对细胞增殖的影响: (a) 不同浓度 DMPK 对 MSCs 的细胞增殖的影响; (b) DMPK 修饰后 MSC 的活/死染色照片 (死细胞为红色, 活细胞为绿色)。

Figure 6 Effect of DMPK modification on cell proliferation: (a) The effects of different concentrations of DMPK on cell proliferation of MSCs; (b) Live /dead staining photos of MSCs after DMPK modification, with dead cells in red and living cells in green.

3.7 细胞表面表型检测

如图 7 所示, CD29 和 CD105 表达阳性性率分别为 94.6% 和 94.3%, CD14、CD34 和 CD45 表达阳性率分别为 0.42%、0.34% 和 0.32%。该

结果表明, DMPK 修饰与未修饰的 MSCs 表面干性标志物无显著差异, DMPK 修饰不会改变 MSCs 的干性表型^[12]。因此, DMPK 修饰对 MSCs 干性的维持是安全的。

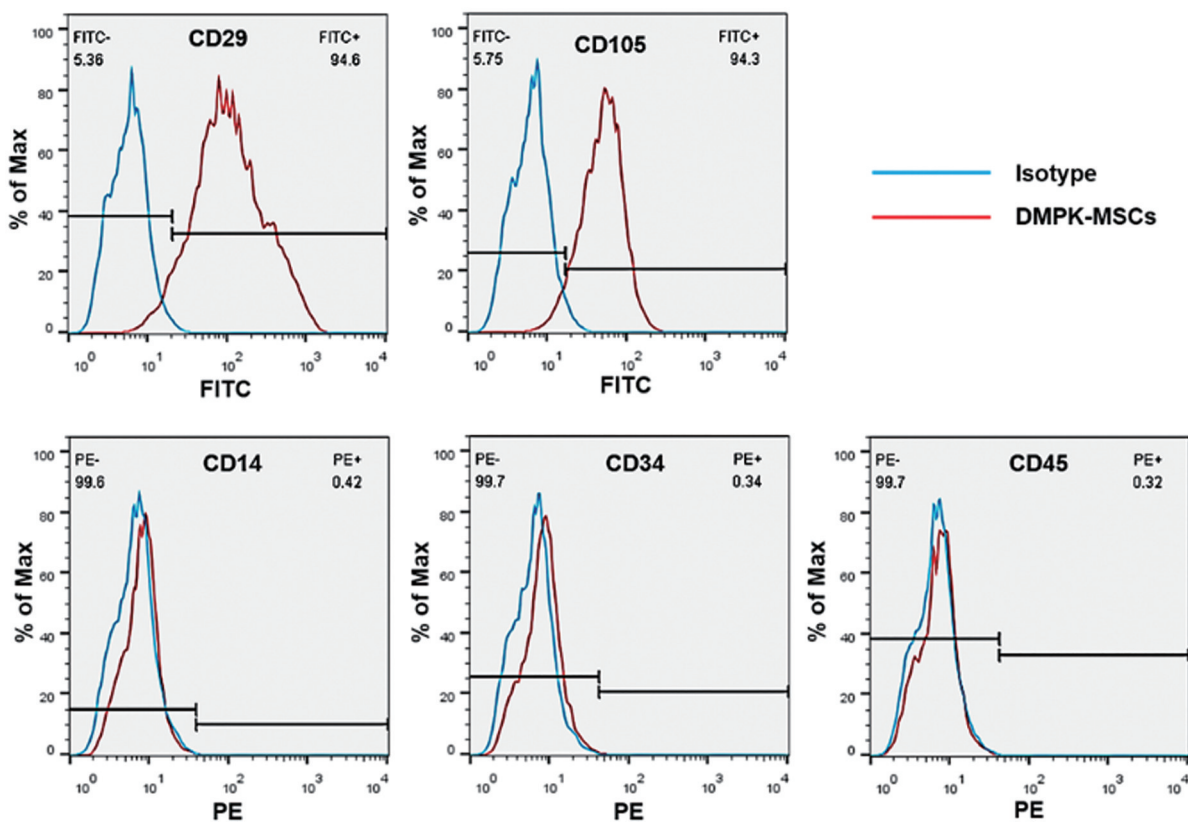


图7 DMPK 修饰的MSCs 与不同抗体孵育后的细胞流式图。

Figure 7 Flow cytometry of DMPK modified MSCs incubated with different antibodies.

4 结论

通过克尔加成反应成功合成了一种可用于 MSCs 表面修饰的大分子 DMPK。细胞修饰的最佳

条件为: 在 4 °C 下, 使用浓度为 25 μM 的 DMPK 修饰 10 min。实验表明, DMPK 修饰对 MSCs 细胞增殖能力及干性表征无显著影响, 是一种简便、安全、有效的干细胞工程化修饰策略。

参考文献

- 1 Teramura Y, Iwata H. Cell surface modification with polymers for biomedical studies [J]. *Soft Matter*, **2010**, 6(6): 1081-1091.
- 2 Tomita U, Yamaguchi S, Sugimoto Y, et al. Poly(ethylene glycol)-lipid-conjugated antibodies enhance dendritic cell phagocytosis of apoptotic cancer cells [J]. *Pharmaceutics*, **2012**, 5(5): 405-416.
- 3 Zhao W A, Teo G S L, Kumar N, et al. Chemistry and material science at the cell surface [J]. *Materials Today*, **2010**, 13(4): 14-21.
- 4 Abbina S, Siren E M J, Moon H, et al. Surface engineering for cell-based therapies: Techniques for manipulating mammalian cell surfaces [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **2018**, 4(11): 3658-3677.
- 5 Lee D Y, Cha B H, Jung M J, et al. Cell surface engineering and application in cell delivery to heart diseases [J]. *Journal of Biological Engineering*, **2018**, 12: 11.
- 6 Inui O, Teramura Y, Iwata H. Retention dynamics of amphiphilic polymers PEG-lipids and PVA-Alkyl on the cell surface [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2010**, 2(5): 1514-1520.
- 7 Miura S, Teramura Y, Iwata H. Encapsulation of islets with ultra-thin polyion complex membrane through poly(ethylene glycol)-phospholipids anchored to cell membrane [J]. *Biomaterials*, **2006**, 27(34): 5828-5835.
- 8 Itagaki T, Arima Y, Kuwabara R, et al. Interaction between cells and poly(ethylene glycol)-lipid conjugates [J].

- Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **2015**, 135: 765-773.
- 9 Paulick M G, Forstner M B, Groves J T, et al. A chemical approach to unraveling the biological function of the glycosylphosphatidylinositol anchor [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2007**, 104(51): 20332-20337.
- 10 Tang T T, Wang B, Li Z L, et al. Kim-1 targeted extracellular vesicles: A new therapeutic platform for RNAi to treat AKI [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, **2021**, 32(10): 2467-2483.
- 11 Teramura Y, Kaneda Y, Totani T, et al. Behavior of synthetic polymers immobilized on a cell membrane [J]. *Biomaterials*, **2008**, 29(10): 1345-1355.
- 12 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, **2006**, 8(4): 315-317.

Research paper

Modification of Cell Membrane by Functional Phospholipid and Its Effect on Cell Behaviors

HU Ya-qi, LI Ru-xiang, NIU Xiao-yuan, WANG Lian-yong *

(Key Laboratory of Bioactive Materials of Ministry of Education, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Cell surface modification is one of the main methods of engineering cells, which is of great significance for the study of cell function and application. In this paper, a DMPE-PEG-KBP (DMPK) phospholipid molecule containing Kim-1 targeting peptide (KBP) was prepared by Michael addition reaction, and DMPK was modified on the surface of mesenchymal stem cells (MSCs) by non-covalent hydrophobic interaction. The effects of DMPK concentration, modification time, modification temperature and modification environment on the modification were investigated by confocal microscopy. The effects of modification on the behavior of MSCs were also studied. The results showed that DMPK could modify the surface of MSC uniformly, and had no effect on the proliferation and phenotype of MSCs. This study provides an effective method for the engineering modification of stem cells and has important value for the development of stem cell applications.

Keywords Phospholipid molecule, Cell modification, Hydrophobic interaction, Mesenchymal stem cells, Cell behavior

* Corresponding author: WANG Lian-yong, E-mail:wly@nankai.edu.cn.