单核细胞及中性粒细胞与内皮细胞粘附的区别

林勇 黎健 孙颂三 汪钟④

(首都医科大学药理学教研室,北京 100054)

主题词 内皮; 细胞; 单核细胞; 中性粒细胞; 粘附; 肿瘤坏死因子-α; 细胞间粘附分子-1; E-选择素; 血管细胞粘附分子-1

摘 要 为探讨单核细胞及中性粒细胞与肿瘤坏死因子-2诱导的内皮细胞粘附的区别,采用髓过氧化酶法测定白细胞与内皮细胞的粘附和抗粘附分子单克隆抗体对其粘附的影响,用酶联免疫法测定内皮细胞粘附分子的表达。结果表明,肿瘤坏死因子-α呈浓度依赖性地增加内皮细胞与中性粒细胞或单核细胞的粘附,并可诱导内皮细胞上粘附分子的表达增加。肿瘤坏死因子-α激活内皮细胞后6小时,与中性粒细胞的粘附率最高,而激活后24小时,与单核细胞的粘附率最高。抗细胞间粘附分子-1及抗E-选择素单克隆抗体可显著抑制中性粒细胞与肿瘤坏死因子-α激活的内皮细胞的粘附,而抗细胞间粘附分子-1及抗血管细胞粘附分子-1单克隆抗体则可抑制单核细胞与肿瘤坏死因子-α激活的内皮细胞的粘附。结果提示,两种类型的白细胞与肿瘤坏死因子-α诱导的内皮细胞的粘附具有不同的特点。

The Difference Between Endothelial- Monocyte and Endothelial- Neutrophil Adhesion

LIN Yong, LI Jian, SUN Song- San and WANG Zhong

(Department of Pharmacology, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China)

MeSH Endothelial; Cells; Monocytes; Neutrophils; Adhesions; Tumer Necrosis Factor-α; Intercellular Adhesion Molecule-1; E-Selectin; Vascular Cell Adhesion Molecule-1

ABSTRACT **Aim** To study the difference between endothelial- monocyte and endothelial- neutrophil adhesion. **Methods** Cell adhesion was measured by testing leukocyte myeloperoxidase activity, the cell adhesion was blocked by monoclonal antibodies to ICAM-1, E-selectin and VCAM-1, the expression of adhesion molecules was measured by ELISA. **Results** TNF-α (100~1 000 ku/L) increased the adhesion of EC to neutrophils or monocytes concentration- dependently. The increased expression of ICAM-1, E-selectin and VCAM-1 was contributed to TNF-α induced upregulation of leukocyte- endothelial adhesion. The neutrophil- endothelial adhesion was peaked at 6 h after TNF-α stimulation of endothelial, while monocyte- endothelial adhesion was peaked at 24 h. The monoclonal antibodies to ICAM-1 and E-selectin significantly inhibited TNF-α induced endothelial- neutrophil adhesion, nevertheless, the antibody to VCAM-1 had no effect on endothelial- neutrophil adhesion. On the other hand, the antibodies to ICAM-1 or VCAM-1 but not the antibody to E-selectin inhibited TNF-α induced endothelial- monocyte adhesion. **Conclusion** Neutrophil and monocyte showed different characteristics in adhesion to TNF-α induced endothelial cells.

白细胞特别是单核细胞进入动脉血管壁吞噬脂质后转化为泡沫细胞是动脉粥样硬化的早期病理变化,而白细胞与内皮细胞的粘附是白细胞进入血管壁的第一步,所以白细胞与内皮细胞的粘附与动脉粥样硬化的发生、发展关系密切[1]。机体在正常状态下,白细胞与内皮细胞的粘附非常少,缺血再灌注等炎症反应可引起白细胞及内皮细胞释放肿瘤坏死因子-α(tumer necrosis factor-α,TNF-α)、白细胞介素-1等细胞因子[2],这些细胞因子反过来又刺激内皮细胞,增加其与白细胞的粘附。白细胞与内皮细胞的粘附主要由内皮细胞上的细胞间粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、E-选择素(E-selectin)及血管细胞粘附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)介导,而抗粘附分子单克隆抗体是研究细胞-细胞粘附特点的最常用手段。单核细胞及中性粒细胞是外周血中参与炎症反应的重要细胞,它们与内皮细胞的粘附有何差别值得探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐带(北京医院产科新生儿)。人血(北京医院健康自愿者)。M199培养基,胎牛血清,纤维连接蛋白,胶原酶(II型),胰酶,Hepes(Gibco产品)。鼠抗人ICAM-1单克隆抗体,鼠抗人VCAM-1单克隆

卫生部老年医学研究所生化室

④中国医学科学院基础医学研究所

抗体,辣根过氧化酶(HRP)标记的兔抗鼠单克隆抗体(北京中山生物公司)。鼠抗人 E- selectin 单克隆抗体(R&D System)。十六烷基三甲基溴化铵(HTAB)(北京西中化工厂)。邻联茴香胺(Dianisidin)(Fluka),加 HCl 溶解后,用 pH 6.0 的 PBS 稀释至所需浓度,再用 NaOH 调 pH 至 6.0。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养

将约 8 mL 0.1% 的胶原酶(用 PBS 配制)注入 25 cm 左右的脐静脉中,于室温下消化 20~ 30 min,离心(800 r/min, 8 min)。加 5 mL M199 培养液(含 100 mg/L 内皮细胞生长因子),种入铺有纤维连接蛋白的培养瓶内,置 CO_2 孵育箱培养,传 2 代后进行实验。

1.3 白细胞的分离

在枸橼酸钠抗凝血中加入终浓度为 0.6% 的 6% 右旋糖苷(Dextran T500),在 37℃水浴中静置 30 min,使红细胞沉淀。将上层白细胞加入 3 mL 淋巴细胞分离液中(比重 1.077),离心(2 000 r/min, 30 min)后,中层为单核细胞,底层为中性粒细胞,将它们分别取出,中性粒细胞内加入 1 mL 双蒸水溶血 30 s,使混杂的红细胞破膜,再加入 2×PBS 1 mL,混匀,使中性粒细胞恢复等渗状态,离心(800 r/min, 10 min)。两种白细胞均用 PBS 洗 3 次,离心(800 r/min, 10 min),用 M199 培养基将白细胞数调至 5×10^9 细胞/L。

1.4 白细胞与内皮细胞粘附的测定[3]

将内皮细胞接种于 96 孔板,每孔 3×10^4 细胞,24 h 后换液一次,与不同浓度 TNF- α(0、100、300、500 和 1000 ku/L)孵育一定时间,然后加入 100 μL 人镶周血单核细胞或中性粒细胞,孵育 30 min,用 100 μL PBS 洗孔 3 次,以洗去未粘附的白细胞。每孔加 0.5% HTAB(用 pH 6.0 的 PBS 配制) 50 μL,37℃放置 30 min,加入含 0.4 mmol/L H_2O_2 的 0.63 mmol 的 Dianisidin 200 μL, 37℃显色 7 min, 450 nm 测光吸收度(A_{450})。抗粘附分子单克隆抗体于 TNF- α 激活内皮细胞后 6 h 加入,终浓度为 10 mg/L。37℃孵育 20 min 后再加入白细胞。

1.5 酶联免疫法测定内皮细胞表面粘附分子[4]

接种内皮细胞于 96 孔板,每孔 3×10^4 细胞,24 h 后换液一次,与不同浓度 TNF- α(0、50、100、200、500 和 1 000 ku/L)孵育 6 h 后加 1% 多聚甲醛 100 μL,固定 30 min,用 PBS 洗 3 次,加入 1∶100 稀释的鼠抗人 ICAM- 1(或 VCAM- 1、E- selectin)单克隆抗体 50 μL,37℃孵育 30 min,控干,用含 0.05% Tween 20 的 PBS 洗 3 次,加入 1∶500 稀释的 HRP 标记的兔抗鼠单克隆抗体 50 μL,37℃反应 30 min。用含 Tween20 的 PBS 洗 3 次,加入 100 μL 0.04% 邻苯二胺(pH 5.0),37℃反应 20 min,加终止液 50 μL(浓硫酸 20 mL,水 160 mL),490 nm 测光吸收度(A_{490})。空白对照组不加鼠抗人 ICAM- 1(或 VCAM- 1、E- selectin)单克隆抗体。

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验分析组间均数的差异性。

2 结 果

2.1 肿瘤坏死因子- α 诱导的内皮细胞与白细胞的粘附

从图 1(Figure 1)可见,未被 TNF- α 激活的内皮细胞与中性粒细胞或单核细胞的粘附率很低,450 nm 光吸收度分别为 0.268 ±0.11 和 0.298 ±0.12,而随着 TNF- α 浓度的增加,内皮细胞与中性粒细胞或单核细胞的粘附也增加($P<0.05$, $P<0.01$)。TNF- α 为 500 ku/L 时,粘附的白细胞数约为静息状态的 3 倍。

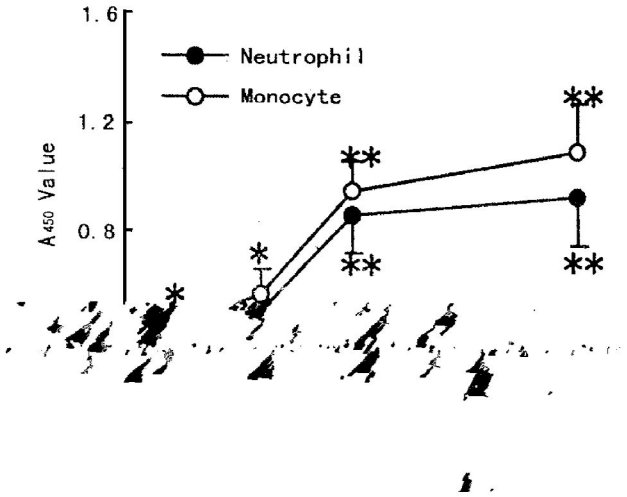

图 1. TNF-α 对内皮细胞与中性粒细胞或单核细胞粘附的影响

Figure 1. Effect of TNF-α on endothelial cells binding to neutrophils or monocytes. Endothelial cells were stimulated with TNF-α for 6 h, then incubated with neutrophils or monocytes for 30 min, adhesive neutrophils or monocytes were tested by myeloperoxidase activity ($\bar{x}\pm s$, $n=7$). * : $P<0.05$, * * : $P<0.01$, compared with corresponding control group

2.2 内皮细胞表面粘附分子的表达

从图 2(Figure 2)可见,静息状态的内皮细胞表面即有 ICAM- 1 的表达(A_{490}为 0.266 ±0.03),随 TNF- α 剂量增加其表达也增加,但 TNF- α 浓度大于 100 ku/L 时,ICAM- 1 的表达进一步增加不明显。

静息状态的内皮细胞表面无 E- selectin 的表达(A_{490}为 0.11 ±0.01),与无相关抗体对照组相同。TNF- α 刺激 4 h 可诱导 E- 选择素表达,其表达量随 TNF- α 的浓度增加而增加。未激活的内皮细胞表面几乎没有 VCAM- 1 的表达(A_{490}为 0.142 ±0.017),加入 TNF- α 12 h,其表达显著增加。

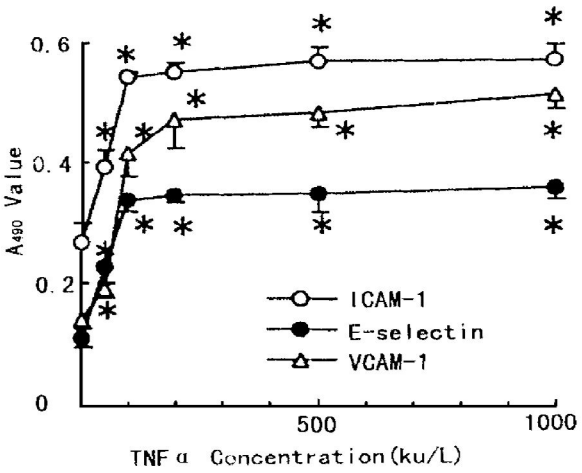

图 2. TNF-α 对内皮细胞粘附分子表达的影响

Figure 2. Effect of TNF-α on endothelial cells expression of adhesion molecules. Endothelial cells were stimulated with TNF-α for 6 h, adhesion molecules were tested by ELISA ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$). * : $P < 0.01$, compared with corresponding control group

2.3 内皮细胞与白细胞粘附的时效关系

内皮细胞被肿瘤坏死因子- α 激活 2 h 后,其与中性粒细胞的粘附开始增加,6 h 粘附率最高(A_{450}为 0.765 ±0.13),粘附率比静息状态增加了 185.82%,24 h 时有所下降,但仍显著高于未激活的内皮细胞与中性粒细胞或单核细胞的粘附($P < 0.01$)。TNF - α 激活内皮细胞后 6 h,单核细胞与其粘附率与中性粒细胞相似,激活后 24 h,单核细胞的粘附不但没有下降反而有所增加($P < 0.01$)(图 3, Figure 3)。

2.4 抗粘附分子单克隆抗体对白细胞与内皮细胞粘附的影响

抗 ICAM- 1 单克隆抗体及抗 E- selectin 单克隆抗体可显著抑制中性粒细胞与 TNF- α 激活的内皮细胞的粘附($P < 0.01$),抑制率分别为 43.79% 和 46.41%,而抗 VCAM- 1 单克隆抗体对其粘附则无影响。相反,抗 ICAM- 1 单克隆抗体及抗 VCAM- 1 单克隆抗体则可抑制单核细胞与 TNF- α 激活的内皮细胞的粘附($P < 0.05$),抑制率分别为 26.73% 和 24.18%,而抗 E- selectin 单克隆抗体的作用却不明显(图 4, Figure 4)。

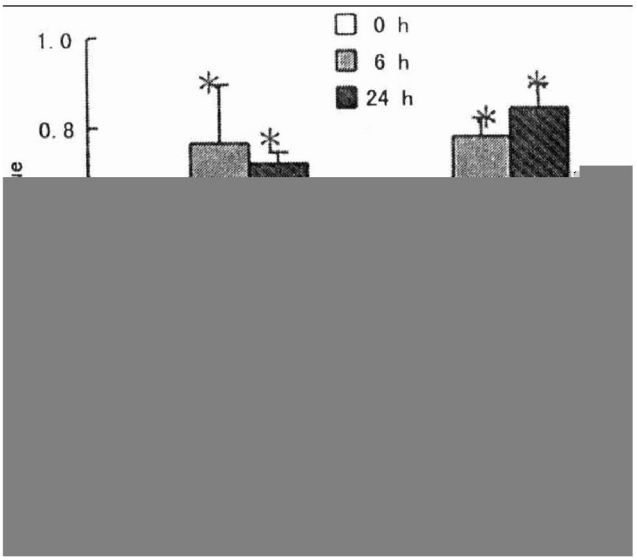

图 3. 中性粒细胞或单核细胞与 TNF-α 诱导的内皮细胞粘附的时效关系

Figure 3. Time- effect course of neutrophils or monocytes binding to TNF-α stimulated endothelial cells. Endothelial cells were stimulated with TNF-α for different period of time, then incubated with neutrophils or monocytes for 30 min, adhesive neutrophils or monocytes were tested by myeloperoxidase activity ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$). * : $P < 0.01$, compared with corresponding control group

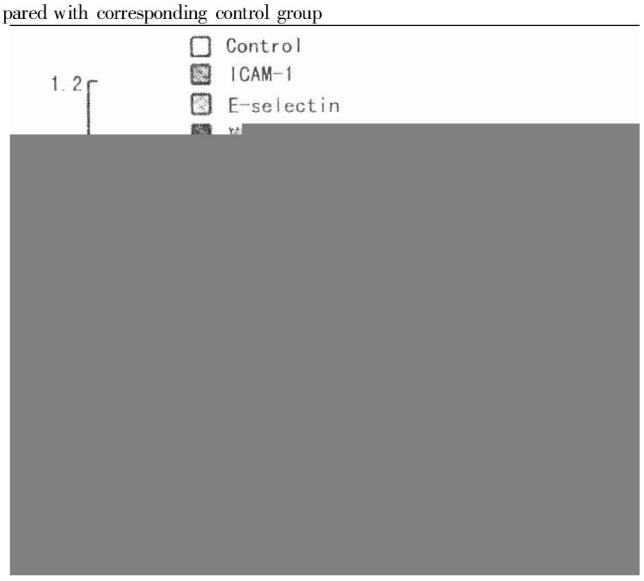

图 4. 抗粘附分子单克隆抗体对中性粒细胞或单核细胞与 TNF-α 诱导的内皮细胞粘附的影响

Figure 4. Effect of monoclonal antibodies against adhesion molecules on TNF-α stimulated adhesion of endothelial neutrophil or endothelial- monocyte. Endothelial cells were stimulated with TNF-α for 6 h, then incubated with different monoclonal antibodies for 20 min. Finally neutrophils or monocytes were added and incubated for 30 min, adhesiove neutrophils or monocytes were tested by myeloperoxidase activity ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$). * : $P < 0.05$, * * : $P < 0.01$, compared with corresponding control group

3 讨论

肿瘤坏死因子- α 可浓度依赖性地增加内皮细

胞与中性粒细胞及单核细胞的粘附,推测其是通过诱导内皮细胞表面细胞间粘附分子- 1、E- selectin 及血管细胞粘附分子- 1 的表达而促进上述粘附的。单核细胞与内皮细胞的粘附较中性粒细胞与内皮细胞的粘附略多。中性粒细胞与内皮细胞的粘附在肿瘤坏死因子- α 激活内皮细胞后 6 h 多于 24 h,而单核细胞与内皮细胞的粘附在肿瘤坏死因子- α 激活内皮细胞后 24 h 多于 6 h,这与在急性炎症中主要是中性粒细胞的着边(margination)增强,而在慢性炎症中则更多地是单核细胞与微血管的相互作用[5]相符。由于本实验为体外实验,受观察时间限制,只观察了 24 h,所以在急、慢性炎症中,这种不同类型白细胞的功能差别还表现得不够明显。

抗细胞间粘附分子- 1 单克隆抗体、抗 E- selectin 单克隆抗体和抗血管细胞粘附分子- 1 单克隆抗体可抑制白细胞与肿瘤坏死因子- α 激活的内皮细胞粘附,提示这三种粘附分子介导了肿瘤坏死因子- α 诱导的内皮细胞与白细胞的粘附。有趣的是,抗 E- selectin 单克隆抗体对单核细胞与内皮细胞的粘附作用不明显,抗血管细胞粘附分子- 1 单克隆抗体对中性粒细胞与内皮细胞的粘附则无影响。后一种情况是因为血管细胞粘附分子- 1 的配体为 VLA- 4[6],已知 VLA- 4 只表达于单核细胞及淋巴细胞,不表达于中性粒细胞。前一种情况也可能是由于类似的原因,但因 E- selectin 的配体尚未阐明[7],所以无法确定是否是由于单核细胞上无 E- selectin 的配体所致。另一种可能性是这种抗 E- selectin 单克隆抗体与 E- selectin 结合后,并不影响其与单核细胞上配体的结合。有报道认为抗 E- selectin 单克隆抗体可抑制单核细胞系 U937 细胞与肿瘤坏死因子- α 激活的内皮细胞粘附。U937 细胞与单核细胞上的 E- selectin 配体是否有区别尚待阐明。

参考文献

1 O' Brien KD, McDonald TO, Chait A. Neovascular expression of E- selectin, intercellular adhesion molecule- 1, and vascular cell adhesion molecule- 1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*, 1996, **93**: 672- 682

2 Pietersma A, Koster JF, Sluiter W. Effect of hypoxia on adherence of granulocytes to endothelial cells in vitro. *Heart Circ Physiol*, 1994, **36**: H874- H879

3 Hassall DG, Bath PMW, Gladwin AM, et al. CD11/CD18 cell surface adhesion glycoproteins: Discordance of monocyte function and expression in response to stimulation. *Exp Cell Res*, 1991, **196**: 346- 352

4 Kacimi R, Karkiner JS, Koudssi F, et al. Expression and regulation of adhesion molecules in cardiac cells by cytokines, response to acute hypoxia. *Circ Res*, 1998, **82**: 576- 586

5 Kacimi R, Karliner JS, Koudssi F. Expression and regulation of adhesion molecules in cardiac cells by cytokines. *Circ Res*, 1998, **82**: 576 - 586

6 Foster CA. VCAM- 1/- α4- integrin adhesion pathway: Therapeutic target for allegic inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol*, 1996, **98**: S270- S277

7 Nelson RM, Dolich S, Aruffo A. Higher- affinity oligosaccharide ligands for E- selectin. *J Clin Invest*, 1993, **91**: 1 157- 166

(1999- 06- 07 收到, 1999- 08- 01 修回)

(此文编辑 朱雯霞)