DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.24.033
第26卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 24
2258 2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)24-2258-03

# 芳维A酸乙酯对HL-60细胞CD11b、CD15表达的影响

陈胜平,张国威,何 威,阎国富,何云志 (第三军医大学新桥医院皮肤科,重庆 400037)

提 要:目的 观察芳维A酸乙酯(arotinoid ethylester, AE)在HL-60细胞分化成熟过程中对其CD11b、CD15表达的影响,初步探讨AE治疗脓疱型银屑病的可能机制。方法 HL-60细胞以二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)、全反式维A酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)、AE诱导培养,5 d后用流式细胞仪检测HL-60细胞表面CD11b和CD15的表达。结果 HL-60细胞经DMSO、ATRA、AE诱导后CD11b和CD15荧光标记率均比诱导前提高;ATRA组HL-60细胞CD11b和CD15荧光强度显著低于DMSO组,AE组HL-60细胞CD11b和CD15荧光强度显著低于ATRA组。结论 AE可明显抑制HL-60细胞表达CD11b、CD15;AE可能通过抑制参与炎症反应的中性粒细胞表达CD11b、CD15而降低中性粒细胞参与炎症反应的过程。

关键词:芳维A酸乙酯;脓疱型银屑病;粘附分子;HL-60细胞
中图法分类号:R392.11;R758.630.5;R986 文献标识码:A

# Effects of arotinoid ethylester on expressions of CD11b and CD15 on HL-60 cells

CHEN Sheng-ping, ZHANG Guo-wei, He Wei, YAN Guo-fu, HE Yun-zhi (Department of Dermatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract**: Objective To observe the effects of arotinoid ethylester (AE) on the expressions of CD11b and CD15 during the differentiation process of HL-60 cells and to investigate the possible mechanisms for the treatment of pustular psoriasis (PP) with AE. Methods The expressions of CD11b and CD15 on differentiated HL-60 cells, cultured for 5 d after induction with dimethylsulfoxide (DMSO) at a final concentration of 1.3% (DMSO group), all-trans-retinoic acid (ATRA) at $1\times10^{-6}$ mmol/L (ATRA group), and AE at $1\times10^{-8}$ mmol/L (AE group) respectively, were examined by flow cytometry. Results The expressions of CD11b and CD15 on HL-60 cells were enhanced after induction with DMSO, ATRA, and AE. The expressions of CD11b and CD15 on HL-60 cells in both ATRA group and AE group were lower than those in DMSO group. The expressions of CD11b and CD15 on HL-60 cells in AE group were the lowest among the above-mentioned three groups. Conclusion AE can suppress the expressions of CD11b and CD15 on HL-60 cells during the differentiation process. AE may inhibit the inflammation of PP by affecting the expressions of CD11b and CD15 on polymorphonuclear leukocytes.

**Key words**: arotinoid ethylester; pustular psoriasis; adhesion molecule; HL-60 cell

脓疱型银屑病(pustular psoriasis, PP)是一种以全身或局部发生无菌性脓疱为特点,以炎症为主的亚型银屑病。近20年来,维A酸类制剂在银屑病的治疗中扮演了重要角色,尤其是第二代维A酸如阿维A酯被作为治疗银屑病的首选[1],其可通过降低人外周血白细胞表面粘附分子CD11b的表达,减少皮损内白细胞发挥抗炎作用[2]。芳维A酸乙酯(arotinoid ethylester, AE)作为第三代维A酸的代表,小剂量用于治疗银屑病等炎症性疾病可取得满意疗效[3],但其抗炎机制不明。人类早幼粒白血病细胞株(human promyelocyte leukemia cell line, HL-60细胞株)常被用于骨髓分化的研究,当其与二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)或维A酸共同孵育能逐步分化为成熟粒细胞,且具有成熟粒细胞的诸多功能特征[4]。本研究通过观察AE对HL-60细胞CD11b、CD15的表达的影响来探讨AE治疗PP的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株与主要试剂

HL-60细胞株购于中科院上海细胞所。AE纯品和全反式维A酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)由重庆必扬生物工程公司

基金项目:中华医学会皮肤科学科研基金资助项目(2001)
Supported by Dermatological Research Foundation of Chinese Medical Association (2001)

作者简介:陈胜平(1968-),女,江西省樟树市人,硕士,主治医师,主要从事皮肤变态反应性疾病方面的研究,现在在南京军区福州总医院皮肤科工作,发表论文6篇。电话:(0591)22859765

收稿日期:2003-12-22;修回日期:2004-02-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

惠赠。PE 标记的小鼠抗人 CD11b 单克隆抗体(PE-CD11b 单抗)和 PE 标记的小鼠 IgG(PE-IgG)购于深圳晶美生化公司。小鼠抗人 CD15 单克隆抗体(CD15 单抗)和 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体(FITC-IgG)购于武汉博士德生化试剂公司。DMSO 购于美国 Sigma 公司。

### 1.2　实验分组

共分 6 组: 第 1~5 组为 HL-60 细胞株组, 第 6 组为正常人中性粒细胞组。第 1 组为空白对照组, 只加细胞培养基; 第 2 组为溶剂对照组, 细胞培养基中 DMSO 浓度为 0.1%; 第 3 组为 DMSO 组, 细胞培养基中 DMSO 浓度为 1.3%; 第 4 组为 ATRA 组, 细胞培养基中 ATRA 浓度为 $10^{-6}$ mmol/L; 第 5 组为 AE 组, 细胞培养基中 AE 浓度为 $10^{-8}$ mmol/L。第 6 组亦作为对照组: 取正常人外周血, 肝素抗凝, 分离中性粒细胞。

### 1.3　HL-60 细胞培养

1.3.1　细胞培养基　　含 10%小牛血清、4 mmol/L L-谷氨酰胺的 RMPI-1640 培养基。

1.3.2　培养条件　　在 37 ℃, 5%$CO_2$ 的细胞培养箱中悬浮培养。每 3 天换液 1 次。

### 1.4　细胞免疫染色

1.4.1　单重染色法　　用于培养 5 d 的 HL-60 细胞 CD11b 或 CD15 单独染色: ①HL-60 细胞 CD11b 直接染色法: 将准备好的细胞用 0.01 mol/L PBS 洗涤 1 次, 分成 2 管, 每管约 $10^6$ 个细胞, 其中 1 管加 PE-IgG 20 μl 作对照管, 另 1 管加 PE-CD11b 单抗 20 μl, 2 管在 4 ℃下反应 1 h, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次后悬浮于 300 μl 流式细胞仪工作液中待测。②HL-60 细胞 CD15 间接染色法: 将准备好的细胞用 0.01 mol/L PBS 洗涤 1 次, 分成 2 管, 每管约 $10^6$ 个细胞, 其中 1 管加 20 μl 0.01 mol/L PBS 作对照管, 另 1 管加 20 μl CD15 单抗, 2 管在 4 ℃下反应 1 h, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次后, 2 管分别滴加 20 μl 的 FITC-IgG, 在 4 ℃下再反应 1 h, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次, 悬浮于 300 μl 流式细胞仪工作液中待测。

1.4.2　双重染色法　　用于正常人外周血中性粒细胞 CD11b 和 CD15 共同染色。将用 0.01 mol/L PBS 洗涤后的正常人外周血中性粒细胞分成分成 2 管, 每管约 $10^6$ 个细胞, 其中 1 管加 20 μl 0.01 mol/L PBS 作对照管, 另一管加 20 μl CD15 单抗, 在 4 ℃下反应 1 h, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次后 2 管各加 20 μl 的 FITC-IgG, 在 4 ℃下再反应 1 h; 用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次后 2 管分别加 20 μl PE-IgG、20 μl PE-CD11b 单抗, 4 ℃下反应 1 h, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次, 悬浮于 300 μl 流式细胞仪工作液中待测。

### 1.5　流式细胞仪检测

FACSCALIBUR 流式细胞仪(BECTON DICKINSO 公司)激光管预热 30 min 后用荧光微球调整仪器, 使放大器接收信号的 HCV<2%, 用对照管进行空白定标, 使非特异性染色<2%, 计数 $10^4$ 个细胞, 检测 HL-60 细胞和正常人外周血中性粒细胞的荧光标记率和细胞平均荧光强度。

### 1.6　统计学处理

荧光标记率用百分数(%)表示。细胞平均荧光强度用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用 SPSS10.0 统计软件, 采用单因素方差分析。

## 2　结果

### 2.1　AE 对 HL-60 细胞 CD11b 表达的影响

只有 2.1%的 HL-60 细胞表达 CD11b, 而经 DMSO、ATRA 及 AE 作用后其表达率均达到了 60%以上, 尤其是 DMSO 组, 表达率与正常人组接近。

各组 CD11b 荧光强度均高于空白对照和溶剂对照组; AE 组和 ATRA 组均低于 DMSO 组; AE 组低于 ATRA 组(表 1)。

表 1　AE 对 HL-60 细胞 CD11b 表达的影响

Tab 1　Effects of AE on CD11b expression on HL-60 cells

| Group | $n$ | Ratio of expression (%) | Fluorescent intensity ($\bar{x}\pm s$) |
|---|---|---|---|
| Blank control | 6 | 2.10 | 52.33±12.05 |
| Dissolvent control | 6 | 14.97 | 85.39±23.17 |
| DMSO group | 6 | 93.51 | 399.05±65.78 ** |
| ATRA group | 6 | 76.42 | 233.43±93.54 **★★ |
| AE group | 6 | 68.99 | 95.98±22.79 **★★☆☆ |
| Normal PMN | 13 | 96.98 | 397.79±73.88 |

PMN: polymorphonuclear leukocyte;　**: $P<0.01$, *vs* blank control;　★★: $P<0.01$, *vs* DMSO group;　☆☆: $P<0.01$, *vs* ATRA group

### 2.2　AE 对 HL-60 细胞 CD15 表达的影响

HL-60 细胞 CD15 表达率只有 22%, 经诱导后其表达率也有不同程度的升高, 但均较正常人低。DMSO 组 CD15 荧光强度较空白对照组升高, 与正常人组无显著性差异; ATRA 组较空白对照组升高而比 DMSO 组降低; AE 组较空白对照组无显著性差异, 但低于 DMSO 组、正常人组、ATRA 组(表 2)。

表 2　AE 对 HL-60 细胞 CD15 表达的影响

Tab 2　Effects of AE on CD15 expression on HL-60 cells

| Group | $n$ | Ratio of expression (%) | Fluorescent intensity ($\bar{x}\pm s$) |
|---|---|---|---|
| Blank control | 5 | 22.13 | 30.34±8.54 |
| Dissolvent control | 5 | 22.27 | 67.22±20.27 |
| DMSO group | 5 | 36.85 | 131.41±43.61 ** |
| ATRA group | 5 | 43.59 | 63.10±21.42 ★ |
| AE group | 5 | 36.95 | 34.50±10.31★★☆ |
| Normal PMN | 13 | 93.21 | 142.06±66.17 |

PMN: polymorphonuclear leukocyte;　*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* blank control;　★: $P<0.05$, ★★: $P<0.01$, *vs* DMSO group;　☆: $P<0.05$, *vs* ATRA group

## 3　讨论

PP 病情危重, 常呈周期性发作。其组织病理特点为表皮内形成较大的海绵状脓疱, 在海绵状脓疱内有大量的中性粒细胞浸润, 并且在脓疱的下方也可见大量的淋巴细胞和中性粒细胞等炎症细胞[5]。目前临床上治疗 PP 可选择甲氨喋呤、环孢菌素、甲砜霉素、肾上腺糖皮质激素等, 但因这些药物易引起严重的副作用而受到限制[6]。自 20 世纪 80 年代以来, 维 A 酸类制

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

剂不论是单独还是与其它措施联合治疗PP，都有较好疗效[7]，临床上能迅速控制炎症，使皮损内脓疱消退，但其确切抗炎机制仍不清楚。

中性粒细胞在炎症局部聚集依赖于粘附分子的表达，主要与3个家族的粘附分子有关：整合素$\beta_2$亚族、免疫球蛋白超家族和选择素家族。在血流中自由运动的白细胞首先是沿着血管滚动，由被激活的内皮细胞表达P和E选择素与白细胞表面的L选择素作用而启动。接着粘附增强，迁移入组织，与白细胞表面CD11b/CD18和内皮细胞表面ICAM-1的激活与上调有关[8]。CD11b属整合素$\beta_2$亚族，主要分布于NK细胞、单核细胞、巨噬细胞、粒细胞以及部分T细胞表面，介导上述细胞对C3bi包被物质的吞噬及有关细胞-细胞间的粘附。他们均能与免疫球蛋白超家族的ICAM-1结合，而介导炎症反应的发生[2]。CD15- Lewis(x)是与蛋白和糖脂连接的三糖类选择素配体，在正常人PMN表面高表达[9]，与选择素结合可介导炎症反应的第一步炎症细胞在血管壁上滚动。由此推测，若白细胞表面CD11b和CD15的表达受到抑制，则直接影响到炎症的最早期。本研究观察到HL-60细胞经过DMSO、ATRA及AE诱导后CD11b和CD15荧光标记率均比诱导前提高，尤其是DMSO组，表达率接近正常人；且经沙皇染色证实，经AE、ATRA及DMSO诱导后，80%以上的HL-60细胞具有成熟粒细胞的形态特征，说明AE能与DMSO、ATRA一样诱导HL-60细胞分化成熟。ATRA组HL-60细胞CD11b和CD15的荧光强度显著低于DMSO及正常人组；而AE($10^{-8}$ mmol/L)在作用浓度较ATRA($10^{-6}$ mmol/L)低100倍时，其HL-60细胞CD11b和CD15的荧光强度还是显著低于ATRA组。说明AE与ATRA在HL-60细胞分化成熟过程中均能抑制其表达CD11b和CD15，而且AE比ATRA的抑制作用更强。早期研究表明，维A酸及其衍生物在体外不能抑制成熟白细胞由fMLP刺激而引起的CD11b高表达[10]。因此，我们推测AE治疗PP的部分临床效应可能是通过抑制参与炎症反应的中性粒细胞表达CD11b、CD15，进而影响中性粒细胞参与炎症的附壁、粘附等功能而达到的；这种抑制作用可能发生在由骨髓幼稚细胞向成熟粒细胞的分化成熟过程中，而不是直接作用于成熟白细胞。

参考文献：


[1] Lowe N J. Systemic retinoid therapy[A]. In: Weinstein G D, Gottlieb A B, eds. Therapy of moderate-to-severe psoriasis[M]. Portland: National psoriasis Foundation, 1993. 94－105.

[2] Sjogren F, Ljunghusen O, Baas A, *et al*. Expression and function of β2 intergrin CD11B/CD18 on leukocytes from patients with psoriasis[J]. Acta Derm Venereol, 1999, 79(2): 105－110.

[3] Merot Y, Camenzind M, Geiger J M, *et al*. Arotinoid ethyl ester (Ro 13-6298): a long term pilot study in various dermatoses[J]. Acta Derm Venereol, 1987, 67(3): 237－242.

[4] Dufer J, Biakou D, Joly P, *et al*. Quantitative morphological aspects of granulocytic differentiation induced in HL-60 cells by dimethyl sulfoxide and retinoic acid[J]. Leuk Res, 1989, 13(7): 621－627.

[5] 杨国亮，王侠生. 现代皮肤病学[M]. 上海：上海医科大学出版社出版，1996. 518－519.

[6] 奥多姆(Odom, R B). 安德鲁斯皮肤病学[M]. 北京：科学出版社，2001. 231－233.

[7] Muchenberger S, Schopf E, Simon J C. *et al*. The combination of oral citretin and bath PUVA for the treatment of sever psoriasis[J]. Br J Dermatol, 1997, 137(4): 587－589.

[8] Crockett Torabi E. Selectins and mechanisms of signal transduction[J]. J Leukoc Biol, 1998, 63(1): 1－14.

[9] Capurro M, Ballare C, Bover L, *et al*. Differential lytic and agglutinating activity of the anti-Lewis(x) monoclonal antibody FC-2.15 on human polymorphonuclear neutrophils and MCF-7 breast tumor cells[J]. Cancer Immunol Immunother, 1999, 48(2-3): 100－108.

[10] Camisa C, Eisenstat B, Ragaz A, *et al*. The effects of retinoids on neutrophil functions *in-vitro*[J]. Am Acad Dermatol, 1982, 6(4 Pt 2 Suppl): 620－629.


（编辑 薛国文）


## 欢迎订阅《中国康复理论与实践》杂志

《中国康复理论与实践》杂志是由中国残疾人康复协会、中国医师协会和中国康复研究中心主办的国家级核心学术期刊，为国家科技部中国科技论文统计源期刊，中国科技核心期刊，中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊，国家药监局批准的处方药广告专业媒体。该刊创于1995年，大16开本，铜版纸印刷，月刊，64页，ISSN 1006－9771，CN 11－3759/R，邮发代号：82－35，国外邮发代号：Q－6607。每期定价：8元，全年96元（含邮费）。年终出版合订本，每套80元。

在办刊方针上，以康复医学为龙头，以宣传全面康复为宗旨，不断增加社区康复内容，充分体现理论与实践相结合，普及与提高并重的特点。以专题为特色，体现“新、高、快”，突出科学性和创新性。欢迎订阅。

地 址：北京市丰台区角门北路10号《中国康复理论与实践》编辑部 邮 编：100068

电 话：(010)67567673 传 真：(010)67567673 E-mail：zamzhang@263.net


?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net