DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.004

烧伤血清对中性粒细胞 CD11/CD18和内皮细胞 ICAM-1表达的变化*

李志清 杨宗诚 罗向东 罗 勤 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆, 630038

提 要 目的:探讨烧伤血清作用下中性粒细胞 CD11/CD18和内皮细胞 ICAM-1表达的变化。方法:流式细胞术检测烧伤病人伤后第 1、3、5、7天多核中性粒细胞(PMN) CD11a/CD18和 CD11b/CD18的表达和烧伤血清刺激后人脐静脉内皮细胞(HUVEC) ICAM-1的表达,并应用免疫胶体金银染色观察烧伤血清刺激 PMN后 1、3、6、12、24 h表达 CD11a/CD18和 CD11b/CD18情况。结果:烧伤病人伤后第一天 PMN膜表面 CD11a/CD18和 CD11b/CD18表达明显升高达峰值,并在伤后一周内维持此高水平状态。烧伤血清刺激正常人 PMN后 1 h, CD11a/CD18和 CD11b/CD18表达迅速增高达峰值, 24 h内仍维持此高水平。而烧伤血清作用于培养良好的 HUVEC后, ICAM-1表达逐渐增多, 12 h达高峰。结论:烧伤早期 PMN激活而表达 CD11a/CD18和 CD11b/CD18,烧伤血清可分别刺激 PMN和 HUVEC表达 CD11a/CD18、CD11b/CD18和 ICAM-1,从而导致烧伤后 PNN与内皮细胞粘附,对 PMN在各脏器中滞留和组织损伤起作用。

关键词 灼伤;中性粒细胞;内皮细胞; CD11/CD18; ICAM-1

中图法分类号 R644

中性粒细胞与内皮细胞粘附是急性炎症反应的现象,也是 PMN发挥其吞噬等功能的关键,涉及到多种粘附因子参与,其中较重要的是 CD11/CD18和 ICAM-1。CD11/CD19属于白细胞粘附因子β2亚家族,包括 CD11a/CD18, CD11b/CD18和 CD11c/CD18。CD11a/CD18和 CD11b/CD18通过与内皮细胞上 ICAM-1结合在 PMN-EC粘附中起重要作用[1]。适当的 PMN-EC粘附有利机体的防御反应,过度的 PNN-EC粘附导致 PMN损伤各组织。严重烧伤后 PMN在内脏器官组织中滞留并发挥其损伤作用[2]。我们推测此与 CD11a/CD18, CD11b/CD18和 ICAM-1表达改变有关。

1 材料与方法

1.1 细胞分离与培养

1.1.1 内皮细胞培养 人脐静脉内皮细胞按我所安静建立方法进行[3]。将细胞接种于直径 35 mm培养皿中。

1.1.2 PMN分离 应用淋巴细胞分离液从 7例健康志愿者和 7例烧伤病人(Ⅲ°20%~50% TBSA,无烧伤复合伤和吸入伤,伤后未行手术,常规治疗,伤前健康)股静脉血中分离。

1.2 烧伤血清

取伤后 24 h至 48 h内 2例烧伤病人(条件同上)外周血分离,灭活补体,按 20%比例与 M199培养液混合。

1.3 流式细胞术检测

从 7例健康人和 7例烧伤病人伤后第 1、3、6、7天取血分离 PMN,制成 1×10⁵/ml细胞悬液。另用 20%烧伤血清刺激人脐静脉内皮细胞(HUVEC)后 0、1、3、6、12、18、24 h,制成 1×10⁵/ml细胞悬液。加一抗(大鼠抗人 CD11a/CD18单抗 mAb,大鼠抗人 CD11b/CD18 mAb和小鼠抗人 ICAM-1 mAb,均为宝灵曼产品)和相应 IgG(作对照),再加荧光素标记二抗(即抗大鼠 IgG-FITC: DAKO产品,抗小鼠 IgG-FITC: Sigma产品),最后上机检测。

1.4 免疫胶体金银染色

20%烧伤血清刺激健康人 PMN后 0、1、3、6、12、24 h,行 PMN涂片, 0.5%甲醇-HBSS固定。① 加一抗(大鼠抗人 CD11a/CD18 mAb和大鼠抗人 CD11b/CD18 mAb宝灵曼产品)。② 加蛋白 A-金。③ 加硝酸银显影液。④ 苏木素复染。

1.5 数据处理

结果以 $\bar{x}\pm s$表示,组间数据比较采用两样本均数 t检验。

2 结果

应用流式细胞术间接免疫荧光法检测平均荧光密度(Mean fluorescence intensity, MFI)以反映 CD11/CD18和 ICAM-1表达强弱。实验发现健康人 PMN膜表面有少量 CD11a/CD18和 CD11b/CD18,且健康者 PMN膜表面 CD11a/CD18和 CD11b/CD18阳性细胞百分率均与烧伤后各时相点 CD11a/CD18和 CD11b/CD18阳性细胞百分率无差别。但烧伤后第一天 CD11a/CD18和 CD11b/CD18平均荧光密度迅速增

* 国家自然科学基金资助项目 NO. 39290700-03

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

高达峰值,在伤后第 3 5 7天保持此高水平(表 1)。

表 1 烧伤病人 PMN CD11a/CD18 CD11b/CD18阳性细胞百分率和平均荧光密度变化 (n= 7)

Tab 1 Positive rate of PMN and mean fluorescence intensity of CD11a/CD18 and CD11b/CD18(n= 7)

		Control	Postburn time (t /d)			
			1	3	5	7
CD11a/CD18	%	97.8± 0.5	98.3± 0.6	98.0± 0.2	97.3± 0.6	97.5± 0.4
	MFI	105.62± 21.39	283.64± 36.21*	260.51± 34.20*	280.16± 40.52*	275.03± 35.95*
CD11b/CD18	%	97.5± 0.6	98.1± 0.8	97.6± 0.6	97.6± 0.5	96.9± 0.7
	MFI	58.09± 8.08*	313.04± 28.53*	297.25± 35.74*	305.24± 33.74*	281.50± 38.62*

* P < 0.01 *vs* control

烧伤血清刺激 HUVEC后 1 h 3 h 6 h 12 h 18 h 24 h与未受刺激的 HUVEC ICAM-1阳性细胞百分率均无明显差异(P > 0.05),但 HUVEC在刺激后,ICAM-1平均荧光密度汽车增大,至 12 h达高峰,在以后 12 h内无明显变化(表 2)。

表 2 烧伤血清刺激下 HUVEC ICAM-1阳性细胞百分率和平均荧光密度变化 (n= 7)

Tab 2 Positive rate and mean fluorescence intensity of ICAM-1 of HUVEC in response to burn sera (n= 7)

	Before stimulation	Hours after stimulation (t /h)					
		1	3	6	12	18	24
%	98.4± 1.3	98.7± 0.5	97.8± 0.6	98.1± 0.9	97.6± 1.0	98.8± 1.1	98.2± 0.7
MFI	26.52± 1.81	31.07± 5.38	38.42± 7.53*	51.03± 6.62*	78.11± 6.34*	77.92± 9.13*	79.87± 11.05*

* P < 0.01 *vs* before stimulation

应用胶体金银染色发现健康人 PMN表面有少量 CD11a/CD18和 CD11b/CD18胶体金颗粒,烧伤血清刺激后 1 h,CD11a/CD18和 CD11b/CD18胶体金颗粒均明显增多,且刺激后 1 3 6 12 24 h各时相点之间表达无明显差异见图 1~ 4。



图 1 健康人 PMN膜表面有少量 CD11a/CD18胶体金颗粒(Immunogold-silver staining× 1000)

Fig 1 CD11a/CD18 was weakly expressed on the surface of PMN of healthy volunteer (IGSS× 1000)

图 2 烧伤血清刺激 PMN 1 h后,CD11a/CD18胶体金颗粒增多 (IGSS× 1000)

Fig 2 Expression of CD11a/CD18 was increased significantly 1 h after PMN stimulated by burn sera (IGSS× 1000)

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

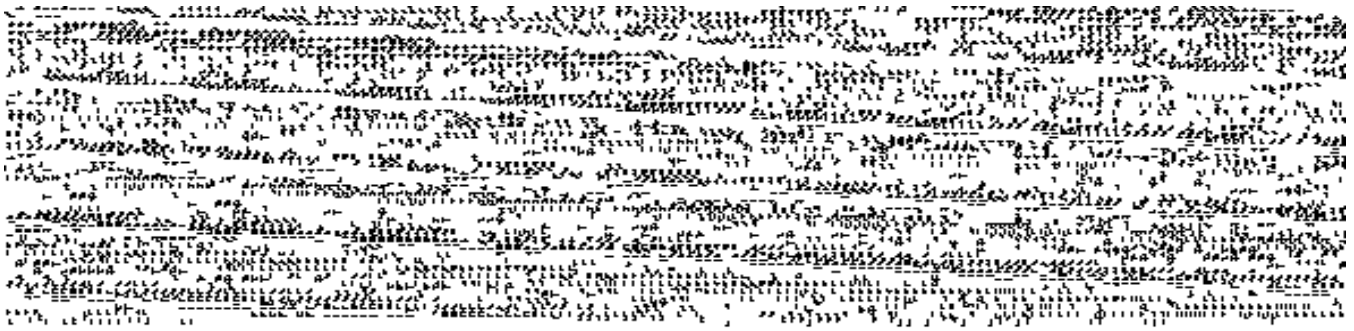


图 3　健康人 PMN膜表面有少量 CD11b/CD18胶体金颗粒　(IGS×1000)

Fig 3　CD11b/CD18 was weakly expressed on the surface of PMN of healthy volunteer　(IGS×1000)

图 4　烧伤血清刺激 PMN 1 h后,CD11b/CD18胶体金颗粒增多　(IGS×1000)

Fig 4　Expression of CD11b/CD18 was increased significantly 1 h after PMN stimulated by burn sera　(IGS×1000)

3　讨论

既往研究表明烧伤后 PMN激活,并滞留于各脏器中,在烧伤后内皮细胞及组织器官损害中起重要作用[2]。而 PMN上 CD11/CD18(主要是 CD11a/CD18)和 CD11b/CD18)与内皮细胞上其配体 ICAM-1结合介导的 PMN-EC粘附则是 PMN发挥其组织损伤的关键[4],为此,了解烧伤早期 PMN膜表面 CD11a/CD18 CD11b/CD18和 EC膜表面 ICAM-1的变化有重要意义。

本实验应用流式细胞术检测 7例健康人和 7例严重烧伤病人伤后 1 3 5 7 d PMN表达 CD11a/CD18和 CD11b/CD18情况,发现健康人 PMN表面有少量 CD11a/CD18和 CD11b/CD18,且 CD11a/CD18比 CD11b/CD18多($P < 0.05$),提示在生理情况下 PMN-EC粘附中,CD11a/CD18可能比 CD11b/CD18起更重要作用。严重烧伤后第一天 CD11a/CD18和 CD11b/CD18均迅速表达增多达峰值,在伤后一周内维持此高水平状态。为进一步了解烧伤后 CD11b/CD18的表达规律及烧伤血清在其中作用,用烧伤血清刺激 PMN后行免疫金银染色,发现类似上述的变化规律,说明烧伤后 PMN可迅速表达 CD11a/CD18和 CD11b/CD18 烧伤血清在其中起重要作用,烧伤后 PMN粘附增强的重要原因之一就是 CD11/CD18表达的增高。这与 Read RA报道的 CD11b介导 LPS引起的 PMN-EC粘附增强一致[5]。有报道证实,PMN在 TNF IL-1内毒素等刺激后,其胞内颗粒释放 CD18,在 10 min~30 min内迅速表达于 PMN膜表面,并达饱和点[6],此过程不是一个诱导合成过程,发现快,达饱和点后就基本维持于此水平。烧伤后即可迅速产生 TNF IL-1和内毒素等,它们的产生可能是烧伤后 PMN迅速表达 CD11a/CD18和 CD11b/CD18的一个重要因素。

PMN-EC粘附还需内皮细胞粘附因子参与,EC膜面表达的 ICAM-1属免疫球蛋白超家族粘附因子,通过与 CD11/CD18结合,在 PMN-EC粘附中起重要作用。本实验发现 HUVEC表面有少量结构性表达的 ICAM-1,在烧伤血清刺激后 ICAM-1在 1 h即开始增多,12 h达高峰,以后 12 h内仍维持于此高水平。而各时相点之间 ICAM-1阳性细胞百分率无明显差异($P > 0.05$),则说明烧伤血清作用下 ICAM-1表达增多,是每个细胞上 ICAM-1表达量增多,而非表达 ICAM-1细胞数增多。而在预试验中正常人血清对 CD11/CD18和 ICAM-1表达 1 h内始增高,在 8 h可达 30~40倍的高峰,至少 7 d内保持此水平[7]。与我们应用烧伤血清刺激 HUVEC表达 ICAM-1规律基本一致。

人体在烧伤后,烧伤血清可同时作用于 PMN和 EC,导致 CD11a/CD18 CD11b/CD18和 ICAM-1表达均增多,从而引起 PMN-EC粘附增强。而烧伤后或烧伤血清刺激后 CD11a/CD18 CD11b/CD18和 ICAM-1表达规律则提示:烧伤后 PMN-EC粘附增强可能先源于表达增多 CD11a/CD18 CD11b/CD18与

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

EC上结构表达的 ICAM-1结合,继而由于 ICAM-1表达渐增多,从而导致烧伤后 PMN-EC粘附增强并在较长时间内维持于高粘附状态.

参考文献

1 Yoshida N, Granger D N, Evans J R *et al*. Mechanisms involved in helicobacter pylori-inflammation. Gastroenterology, 1993; 105(5): 1431

2 罗向东,杨宗城,黎 鳌.家兔烧伤早期内脏血管内皮细胞损伤的变化.第三军医大学学报, 1995; 17(4): 279

3 安 静,黎 鳌,杨宗诚.胎儿脐静脉内皮细胞的培养.第三军医大学学报, 1990; 12(3): 102

4 Barnett C C, Moore E E, Moore F A *et al*. Intercellular adhesion molecule-1 promotes neutrophil-mediated cytotoxicity. Surgery, 1995; 118(2): 171

5 Read R A, Moore E E. Moore F A *et al*. Lipopolysaccharide-induced CD11b-mediated neutrophil-endothelial adhesion is not required for polymorphonuclear cell priming. J Trauma, 1994; 37(1): 13

6 Vedder N B, Winn R K, Rice C L *et al*. A monoclonal antibody to the adherence-promoting leukocyte glycoprotein, CD18, reduces organ injury and improves survival from hemorrhagic shock and rescuscitation in rabbits. J Clin Invest, 1993; 81(3): 939

7 Pober J S, Gimbrone M A, Lapierre L A *et al*. Over-Lapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin-1, tumor necrosis factor, and immune interferon. J Immunol, 1986; 137(6): 1893

(收稿: 1996-09-05;修回: 1997-01-20)

(编辑 刘 鹏)

Effects of burn serum on expression of CD11/CD18 on polymorphonuclear neutrophils and ICAM-1 on endothelial cells*

Li Zhiqing, Yang Zongcheng, Luo Xiangdong, Luo Qin (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To observe the changes of expression of CD11/CD18 on polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and ICAM-1 on endothelial cells (ECs) under the stimulation of burn serum. Methods: Cytometry was employed to detect the expression of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 on PMNs on the 1st, 3rd, 5th and 7th postburn day in burn patients and that of ICAM-1 on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) after the stimulation with burn serum. Meanwhile, immunogold-silver staining was used to observe the expression of CD11a/CD18 and CD11b/CD on PMNs on the 1st, 3rd, 6th, 12th and 24th hour after the stimulation with burn serum. Results: ① The expression of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 on PMNs was rapidly increased to the peak value on the 1st postburn hour in burn patients and remained the same within one week; ② The expression of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 on PMNs from healthy individuals was also rapidly increased to the peak value on the 1st hour after the stimulation with burn serum but remained the same for only 24 hours; ③ The expression of ICAM-1 on well-cultured HUVECs was gradually increased and reached its peak value on the 12th hour after the stimulation with burn serum. Conclusion: In the early stage after burns, PMNs were activated to express CD11a/CD18 and CD11b/CD18. Burn serum can respectively stimulate PMNs to express CD11a/CD18 and CD11b/Cd18 and HUVECs to express ICAM-1, which might result in PMN-EC adhesion.

Key words burns; polymorphonuclear neutrophil; endothelial cell; CD11/CD18; ICAM-1

* Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 39290700-03

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