DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.02.005

缺氧对家兔白细胞与肺微血管内皮细胞粘附的影响

黄 玉斌* 陈剑鸿** 罗德成 (第三军医大学基础医学部病理生理学教研室) 重庆, 400038

提 要 目的: 研究缺氧所致的兔多形核白细胞-肺微血管内皮细胞粘附与缺氧时间的关系以及探讨缺氧所致粘附分子变化在其中的作用。方法: 利用培养的家兔肺微血管内皮细胞及体外缺氧模型,测定家兔多形核白细胞与肺微血管内皮细胞的粘附率,运用免疫组化及流式细胞技术测定 CD18与 CD54的表达。结果: 随着缺氧时间的延长,粘附率进行性增加,缺氧可明显加强 CD18和 CD54的表达, CD18和 CD54单抗能明显降低粘附率的增加。结论: 缺氧可直接刺激白细胞 CD18和内皮细胞 CD54表达,并进一步参与介导白细胞与内皮细胞的粘附。

关键词 缺氧;细胞粘附;内皮细胞;白细胞
中图法分类号 R364.4

在高原肺水肿病人的肺泡灌洗液中有大量的白细胞[1],尸检也发现有大量白细胞[2]。说明缺氧引起了白细胞在肺内扣压(或白细胞募集, Leukocyte recruption)。 Sinclair等[3]将 ARDS病人支气管肺泡灌洗液中白细胞数与病情严重程度作相关分析,发现二者呈显著相关,说明白细胞扣压与病情恶化有重要关系。而白细胞扣压的关键则是白细胞与内皮细胞的粘附[4]。为了全面认识急性高原肺水肿等疾病的发生机制,以寻求有效的防治措施,我们研究了缺氧所致的兔多形核白细胞(PMN)-肺微血管内皮细胞(PMVEC)粘附与缺氧时间的关系;探讨了缺氧所致粘附分子变化在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM培养基、胰蛋白酶, Sigma;新生小牛血清(FCS),杭州四季青生物制品工程公司;第Ⅷ因子相关抗原(Ⅷ-r-Ag)单抗、S-P免疫组织化学染色试剂盒,福建迈新生物技术开发公司; CD18 CD54单抗(McAb CD18 McAb CD54)、DAB显色试剂盒,北京中山生物技术有限公司; FITC-羊抗鼠 IgG微孔滤膜(直径 25 mm,孔径 0.8μm),华美生物技术有限公司; Percoll分层液,宝灵曼;图像分析仪, Chromatopac C-RIB日本岛津;真彩色医学图象分析系统,空军总医院医学工程研究所;流式细胞仪, FACStar, Becton dickinson公司。血气分析仪, ABL-3, Denmark; CO_2培养箱, Shel-Lab1815Tc USA

1.2 实验方法

1.2.1 PMVEC分离、培养与鉴定 参照 Magee[5]的方法。削除肺脏层胸膜,取边缘组织剪碎洗净,滤除大块组织后 0.5%胰蛋白酶消化,加入等量含 20% FCS的 DMEM培养基中止消化;过滤,滤出液离心后悬浮于含 20% FCS的 DMEM培养基中;置于 37℃的 10% CO_2孵箱中, 2 d后换液,置于 37℃的 5% CO_2孵箱中;细胞长满后,胰酶消化传代。通过形态学及Ⅷ-r-Ag免疫组织化学染色进行鉴定。

1.2.2 PMN悬液的制备 Percoll梯度离心法。姬姆萨染色, PMN比例大于 95%,台盼蓝染色检查活细胞比例大于 90%者备用。

1.2.3 缺氧环境的设置 将各组细胞置密闭的缺氧操作小室中,用真空泵反复抽气然后充以 95% N_2和 5% CO_2的混和气,直至培养基内 P_{O_2}为 1.33~2.67 kPa(10~20 mmHg)为止。将小室放 37℃培养箱中,于不同缺氧时相点取样及测定指标。测定粘附率时,将 PMN悬液加入底层长满内皮细胞的细胞培养板中,然后将培养板置缺氧小室中。测定 CD18 CD54表达时,分别将 PMN PMVEC单独置缺氧小室中。

1.2.4 粘附率的测定 在缺氧小室中,取出各组部分 PMN悬液,在小室外计数,加入的 PMN总数与悬浮的 PMN数之差即为粘附的 PMN数,用粘附的 PMN数除以加入的总 PMN数即为粘附率(Adherence rate, AR)。

1.2.5 粘附分子表达的测定 CD54表达测定: S-P免疫组织化学法,用图象分析仪进行半定量。 CD18测定[6]:采用间接荧光免疫组织化学法及流式细胞仪半定量。

1.2.6 分组

1.2.6.1 缺氧对粘附率的影响 分为两大组:① 常氧(Normoxia)组:置常氧下;② 缺氧(Hypoxia)组:置缺氧下。每大组依时相点不同分为 0.5、1、4、6、8、12 h 6组,每组 6例。

1.2.6.2 CD18 CD54单抗对缺氧所致的粘附的影响 随机分为两大组,常氧组(Normoxia),缺氧(缺氧 1 h)组(Hypoxia),每大组又分为无单抗组(记为 C组)、加 McAbCD54组(记为 CD54组)和加 McAbCD18组(记为 CD18组),每组 6例。

1.2.6.3 缺氧对 CD18 CD54表达的影响 各分 3组:常氧

* 黄 玉斌,男, 29岁,讲师,硕士
** 附属西南医院药局

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

组(N组)、缺氧 1 h组(H1组)、缺氧 12 h组(H12组)。

1.2.7 统计学处理 所得数据用本校教研室提供的 SPMR医用统计程序包处理,各均数间采用 FLSD检验。

2 结果

2.1 缺氧对粘附率的影响

常氧组,随着共育时间的延长,二者的粘附率呈上升趋势,各时相点(1 h除外)的粘附率与 0.5 h时的粘附率相比,差异显著($P<0.05$),共育 4 h后则有一显著增长点($P<0.05$),随后,二者的粘附率相对于前一时相点无明显增长($P>0.05$)。在缺氧组,随共育时间的延长,二者的粘附率进行性增加,相邻时相点间(除 6和 8 h两点间外)的粘附率有显著增加;在各时相点,缺氧组和常氧组相比,均有明显增加($P<0.05$),见图 1

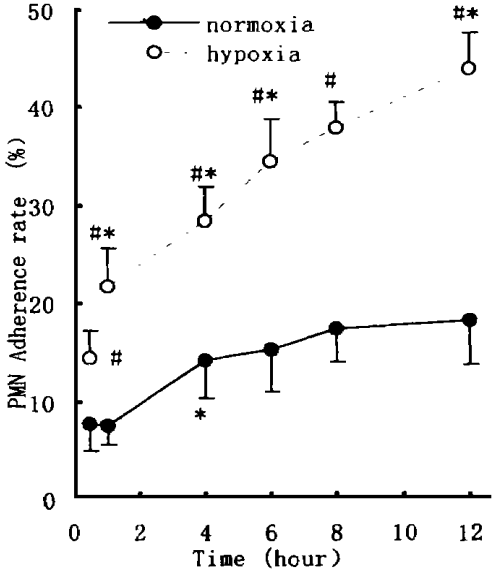


图 1 缺氧时粘附率的变化

Fig 1 Change of PMN-PMVES adherence during hypoxia

*: $P<0.05$ *vs* last point;

#: $P<0.05$ *vs* normoxia at same time point

2.2 McAbCD18、McAbCD54对粘附率的影响

见图 2,常氧组 McAbCD18和 McAbCD54对 PMN-PMVEC粘附率没有影响,各组间差异不显著($P>0.05$)。缺氧时与常氧时的无单抗组相比有显著增加($P<0.05$),CD18组和 CD54组均较缺氧时 C组有显著下降($P<0.05$)。但是,仍较常氧组中加入同种单抗时高。

2.3 缺氧对 CD18、CD54表达的影响

见表 1,缺氧 1 h与常氧组相比,CD18、CD54表达量均有明显地增加($P<0.05$),分别增加 3.35、2.21倍;而在缺氧 12 h组,也较常氧组显著增加($P<0.05$),分别增加 3.43、2.31倍,但与缺氧 1 h相比,差异均不显著($P>0.05$)。

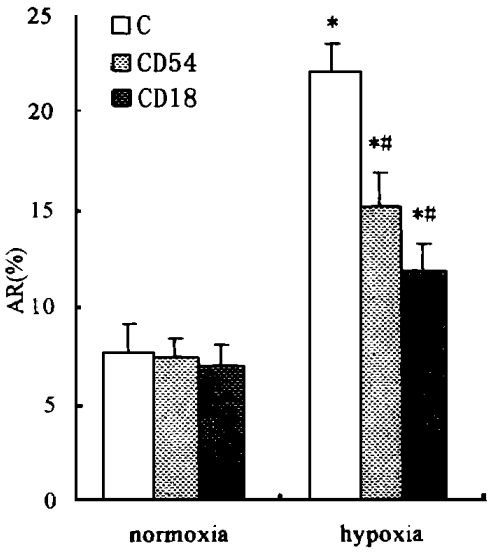


图 2 缺氧时 CD18、CD54单抗对 AR的影响

Fig 2 Effect of McAb CD18 or McAb CD54 on AR during hypoxia

*: $P<0.05$ *vs* normoxia;

#: $P<0.05$ *vs* C in hypoxia

表 1 缺氧对 CD54、CD18表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of hypoxia on expression of CD54 and CD18($\bar{x}\pm s$)

	CD54		CD18	
	$n1$	mD	$n2$	MF
N	121	0.0483± 0.0098	5	22.59± 9.768
H1	132	0.1067± 0.0216*	9	75.77± 4.664*
H2	114	0.117± 0.0172*	11	77.48± 3.244*

*: $P<0.05$ *vs* N; $n1$: Count of PMVEC; $n2$ Mount of sample

3 讨论

本实验结果表明,缺氧均可增强 PMN-PMVEC粘附,且呈时间依赖性增加。许多在体观察也支持这一点[7-10]。另外,在缺氧 0.5 h和 1 h时,粘附率增加的幅度较 2~12 h间的增加幅度不及 0.5 h和 1 h大,说明存在着快相和慢相粘附反应。

白细胞与内皮细胞的粘附有赖于白细胞与内皮细胞上的多种粘附分子。缺氧所致的 PMN-PMVEC粘附增强,乃是缺氧直接或间接作用于 PMN和 PMVEC粘附分子的合成、表达加强的结果。参与 PMN-PMVEC粘附的粘附分子主要有整合素 β_2 亚族、免疫球蛋白超家族、选择素族三大家族的粘附分子。

白细胞整合素家族 β_2 亚族成员和内皮细胞 CD54是其粘附的主要介导者,它们互为配受体。CD18为 β_2

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

亚族三个成员共同拥有的亚基。CD54分布在多种细胞膜上,在血管内皮上表达最强。在正常情况下,CD54表达较低,经刺激后其表达可快速大量增加[11]。本研究通过应用 CD18、CD54单克隆抗体明显降低了缺氧 1 h所致的粘附。常氧时其降低作用并不明显,说明在缺氧作用下,CD54和以 CD18为亚基的 β_2 亚族整合素表达量增加,并介导了 PMN-PMVEC的粘附。缺氧对其表达的刺激作用有直接和间接两种可能。我们进一步观察表明,单独缺氧 1 h和 12 h PMVEC、PMN上分别表达 CD54、CD18的量均明显高于常氧组。说明缺氧可直接刺激 CD54、CD18表达。缺氧 1 h CD54、CD18表达量明显增加,其机制可能是缺氧引起粘附分子发生化学修饰并由膜贮备状态向膜表面翻转暴露,这一过程反应迅速,从而参与介导快相粘附反应。但缺氧 12 h较 1 h组表达量并没有进一步增加。对于 CD18,可以解释为 CD18并不能从头合成。对于 CD54,此结果与在体实验不同,这可能与在体实验时,多种因子,如干扰素、白细胞介素等的作用有关。另外,缺氧还可能直接或间接刺激其它粘附分子表达,从而介导慢相粘附反应。

缺氧时白细胞与肺微血管内皮细胞粘附的动态变化及其机制的初步研究,使我们对缺氧时白细胞的行为有了新的认识,为寻找高原肺水肿的抗粘附治疗用药时间的选定提供了理论依据。

参考文献

1 Koyama S, Kubo K, Takabayashi Y, *et al*. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a case of high altitude pulmonary edema. Nippon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi, 1993, 31(6): 775

2 高京生.高原肺水肿的发生机制.见:孙秉庸,李楚杰,李修竹,等 主编.病理生理学进展.第 5册.北京:科学技术文献出版社, 1993. 318~ 320

3 Sinclair D G, Braude S, Haslam P L, *et al*. Pulmonary endothelial permeability in patients with severe lung injury. Clinical correlates and natural history. Chest, 1994, 106(2): 535

4 Hynes R O, Lander A D. Contact and adhesive specificities in the association, migrations, and targeting of cells and axons. Cell, 1992, 68(2): 303

5 Magee J C, Stone A E, Oldham K T, *et al*. Isolation, culture, and characterization of rat lung microvascular endothelial cells. Am J Physiol, 1994, 267(4 Pt 1): L433

6 翟建才.流式细胞术(FCM)在免疫细胞化学中的应用.见:蔡文琴,王伯　主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川省科学技术出版社, 1994. 194~ 196

7 Zund G, Nelson D P, Neufeld E J, *et al*. Hypoxia enhances stimulus-dependent induction of E-selectin on aortic endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(14): 7075

8 Pinsky D J, Naka Y, Liao H, *et al*. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. J Clin Invest, 1996, 97(2): 493

9 Klein C L, Kohler H, Bittinger F, *et al*. Comparative studies on vascular endothelium *in vitro*. 3. Hypoxia: its influences on endothelial cell proliferation and expression of cell adhesion molecules. Pathobiology, 1995, 63(1): 1

10 Iinis I, Mentzer S J, Li X, *et al*. Characterization of a hypoxia-responsive adhesion molecule for leukocytes on human endothelial cells. J Immunol, 1995, 155(2): 802

11 Fingar V H, Taber S W, Buschemeyer W C, *et al*. Constitutive and stimulated expression of ICAM-1 protein on pulmonary endothelial cells *in vivo*. Microvasc Res, 1997, 54(2): 135

(收稿: 1998-09-30;修回: 1998-12-24)
(编辑　汪勤俭)

Effects of hypoxia on adhesion of polymorphonuclear neutrophils to pulmonary microvascular endothelial cells in rabbits

Huang Jian, Chen Jianhong, Luo Decheng (Department of Pathophysiology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the effects of hypoxia on adhesion of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) to pulmonary microvascular endothelial cells (PMVECs) in rabbits. Methods: PMNs and/or cultured PMVECs were exposed to hypoxia (P_{O_2} = 15~ 20 mmHg) and some of them were added with CD18 or CD54. The adhesion rate and the expression of CD18 and CD54 were determined with immunohistochemistry and flow cytometry. Results: The adhesion rate was increased by hypoxia in a time-dependent manner and the expression of CD15 and CD54 was also increased by hypoxia. The two antibodies could antagonize the increase in adhesion rate. Conclusion: Hypoxia increases the expression of CD15 and CD54 which is involved in the adhesion of PMNs to PMVECs.

Key words hypoxia; cell adhesion; vascular endothelial cell; rabbit

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