DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.002

内毒素条件下参与中性粒细胞-血管内皮细胞粘附过程的分子基础

周向东* 陈意生 史景泉 (第三军医大学基础部病理学教研室)重庆,630038

提 要 利用抗中性粒细胞(PMN)和血管内皮细胞(VEC)表面表达的粘附因子CD18、内皮细胞白细胞粘附分子-1(ELAM-1)及细胞间粘附分子-1(ICAM-1)单克隆抗体作为阻断因素,用细胞微管吸吮技术所测得的PMN-VEC间单细胞粘附力作为观察指标,观察了内毒素刺激所致PMN-VEC间粘附性增加过程中上述三种粘附分子各自的功能特征。结果发现:CD18的表达为PMN快相增加粘附力的主要分子基础,而E-LAM-1、ICAM-1则为VEC慢相增加粘附力的主要分子基础。

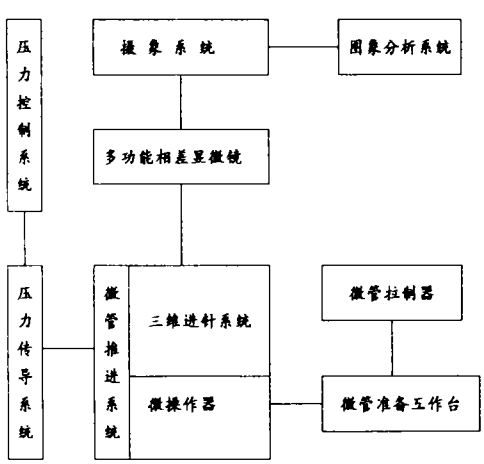
关键词 内毒素;嗜中性白细胞;内皮细胞;粘附分子

中图法分类号 R361.3

最近几年,随着分子生物学研究的进展,粘附分子家族不断扩展,许多新成员相继被发现和克隆,这使得我们可以从一个更新的观点来认识中性粒细胞(PMN)和血管内皮细胞(VEC)相互粘附的分子基础。深入了解这些粘附因子在全身炎性状态下对PMN-VEC粘附的效应作用,对于了解炎性损伤乃至多器官功能衰竭的发生机理具有重要作用[1]。此外,国内外兴起的细胞微管吸吮实验技术也使得对单细胞粘附力的定量检测成为可能,这种精确的定量检测技术保证了对各粘附分子致粘附作用的单细胞定量观察。

1 材料与方法

1.1 细胞微管实验系统结构(附图)



附图 细胞微管吸吮实验系统示意图

Fig The diagram of cell micromanipulation system

1.2 待测样本的准备

PMN为取正常人静脉血经percoll梯度密度离心法分离所得。VEC来自传代良好的人脐静脉VEC,VEC传代于粘于薄型载玻片的圆形样品小腔中,等细胞长满腔底面时,分下述几种情况分别准备样品。

PMN单纯内毒素组:收集的PMN加放内毒素(100 ng/ml)行常规孵育,分别于孵育后30 min、4 h、12 h取PMN洗二遍后加入养有VEC的样品腔。

PMN抗CD18组:PMN加入样品腔前半小时加放CD18 McAb60.3(美国Price.T.博士惠赠),终浓度为30 μg/ml,余处理均同单纯内毒素组。

VEC单纯内毒素组:培养于样品腔中的VEC加入内毒素(100 ng/ml)孵育:分别于孵育30 min、4 h、12 h将VEC冲洗二遍后加入正常PMN。

VEC抗内皮细胞白细胞粘附分子-1(ELAM-1)组:加入PMN前选加ELAM-1 McAb7A9(由美国Walte Newman博士惠赠)预处理30 min,终浓度为10 μg/ml,余处理同单纯内毒素组。

VEC抗细胞间粘附分子-1(ICAM-1)组:抗体改为ICAM-1 McAb 3Ado(由美国Jurgensen.C.H惠赠),终浓度为10 μg/ml。

1.3 PMN-VEC粘附力的测定

采用细胞微管吸吮系统经拉针(口径2~3 μm)并预灌悬浮待测细胞的溶液后,置针于进针器上,油镜下找到针尖,调整压力系统使之处于零位,调节针位使针尖刚刚接触粘附于VEC表面的PMN,从低压力开始加负压并操作推进器观察在此负压下能否拉离PMN,如不能拉离则继续加大负压,直至找到能拉离PMN所需的最小负压即阀值,细胞的粘附性以临界分离应力来表示[2]:

$$Sc=2(Rp/Ri)^2Pc。$$

其中Sc表示临界分离应力,Rp为微管半径,Ri为两细胞接触面半径,Pc为拉离粘附的PMN所需最小负压值。

1.4 统计学处理

对所得数据采用两组间均数t检验的方法进行处理。

* 研究生,现在附属大坪医院呼吸内科 重庆,630042

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

2 结果

实验结果显示 PMN 粘附性在内毒素刺激下迅速升高，至 30 min 时已达高峰并基本稳定保持于该粘附状态，这种粘附性的增加可以被 CD18 McAb 明显减弱。VEC 的粘附性在内毒素刺激下则在早期迅速升高的基础上呈持续升高的趋势，至刺激 12 h 后方达到最大值。ELAM-1 和 ICAM-1 McAb 均可以明显减弱这种粘附力的持续升高，其中 ELAM-1 McAb 对内毒素刺激 4 h 所致粘附力增高的减弱作用突出，而 ICAM-1 McAb 则对刺激 12 h 所致的粘附力增高有突出的削弱作用（见表 1、2）。

表 1　CD18 McAb 对 PMN 粘附力的影响（kPa，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　The effect of CD18 McAb on the PMN adhesive ability (kPa, $\bar{x}\pm s$)

	n	Control	30 min	4 h	12 h
LPS	25	0.086±0.007	0.329±0.037**	0.327±0.034**	0.321±0.038**
CD18 McAb	25	0.085±0.007	0.127±0.009*△△	0.123±0.009*△△	0.119±0.008*△△

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control；△△：$P<0.01$ *vs* LPS group

表 2　ELAM-1 ICAM-1 McAb 对 VEC 粘附力的影响（kPa，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　The effect of ELAM-1 McAb and ICM-1 McAb on the VEC adhesive ability (kPa, $\bar{x}\pm s$)

	n	Control	30 min	4 h	12 h
LPS	23	0.086±0.007	0.083±0.031**	0.534±0.057**	0.978±0.092
ELAM-1 McAb	23	0.087±0.007	0.279±0.029**	0.326±0.037**	0.774±0.083*△
ICAM-1 McAb	23	0.084±0.007	0.276±0.027**	0.518±0.063**	0.582±0.075*△△

**：$P<0.01$ *vs* control；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* LPS group

3 讨论

内毒素血症是广泛见于多种病理过程的重要症候，由严重感染内毒素血症引起的中毒性休克及进而导致的多器官功能衰竭，已成为诸多严重病理过程伴发感染时走向恶化并最后导致死亡的共同途径。故对内毒素性脏器损伤机理的研究也成为了外科基本问题研究的热点。

目前认为 PMN 粘附于 VEC 是炎性损伤的第一步，形态学的研究也证实内毒素性损伤脏器中总是有大量 PMN 滞留于脏器毛细血管，一方面机械堵塞使脏器微循环发生障碍，另一方面释放大量氧自由基及其它损伤性介质引起及加重组织损伤[3]。进一步的研究也提出这种 PMN 滞留的细胞学基础主要为 PMN-VEC 粘附性增高，由于国内以往尚不具备对细胞粘附性的单细胞定量检测条件，报告多采用吹打后计数的方法，这种方法粗糙而难以精确客观地控制条件，故此方面的研究受到很大限制[4]。本研究在国内首次应用细胞微管吸吮实验系统实现了对细胞粘附性单细胞精确定量研究，较系统地反映了两种细胞在内毒素刺激条件下粘附性的改变规律、两者间的差异及其分子基础。实验结果显示两种细胞的粘附力在内毒素刺激下较正常均有明显增加，两者的增加都是迅速的，但 PMN 在 30 min 后这种增加便停止并基本稳定于该水平，而 VEC 则仍持续增加直至 12 h 乃至以后。国外学者将细胞粘附性在刺激因素作用下的迅速增加称为快相反应，将细胞经较长时间刺激而增加的粘附称为慢相反应。

对于 PMN-VEC 粘附增加的分子基础，本研究显示 CD18 McAb 可以削弱 PMN 经内毒素刺激所增加粘附力的大部分，说明了 CD18 作为 PMN 表面所表达的与 VEC 粘附相关性最大的粘附分子，起着关键作用。而一般认为 CD18 的表达为颗粒释放并转移于膜表面的过程，不涉及诱导合成环节，故表达迅速，且其表达规律也应合了 PMN 粘附性的增加规律[5]。对于 VEC，本研究显示 ELAM-1 和 ICAM-1 McAb 均有所侧重地压低了 VEC 粘附力的增加，ELAM-1 McAb 削弱了 4 h 所测值的大部分，而 ICAM-1 McAb 削弱了 12 h 所测值的大部分，实验结果证实了 VEC 粘附力增高的慢相反应主要源于其表面 ELAM-1 和 ICAM-1 相继表达的结果。前者表达高峰出现较后者早，但衰减较后者快。这种表达由内毒素、TNF 及 IL-1 等启动转录、翻译、合成过程，一般无法在短时间内出现效应，故在 VEC 的慢相反应中起重要作用[6]。至于 VEC 粘附力增加快相反应的分子基础，国外研究者认为系由于其膜表面颗粒膜蛋白 140(GMP-140)表达的结果，此过程为 VEC 内 Weibel-Palade 小体中贮存的 GMP-140 释放并转移至膜表面的结果，该过程非常迅速，只需数分钟[6]。故这种表达在内毒素刺激的早期，对于 VEC 的粘附性增高起关键作用。

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

参考文献

1 Pattarryo M, Makyoba MW. Leukocyte adhesion to cells in immune and inflammtory response. Lancet, 1989; 2: 1193

2 Sung P, Kuhiman P, Maldonado *et al*. Force contribution of the LFA-1/ICAM-1 complex to T cell adhesion. Journal of Cell Science, 1992; 103: 25

3 Juan C Massimo M, Brace L. Neutrophil-endothelial cell binding in neutrophil-mediated tissue injury. Journal of Surgical Research, 1992; 53(11): 103

4 朱伟勇，方伟岗，郑 杰等. 全反式维甲酸对克隆化高转移肺癌细胞粘附性和运动性的影响. 中华肿瘤杂志，1994；16(5)：323

5 Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD *vs* Binding of the integrin Mac-1(CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. Cell, 1991; 65: 961

6 Mariscaico MM. Leukocyte and the inflammatory response. Cril Care Med, 1993; 21(9): 5347

(收稿：1995-07-22；修回：1995-12-10)

(编辑 张大春)

Molecular basis of the adhesive process of neutrophils to vascular endothelial cells under endotoxin condition

Zhou Xiangdong, Chen Yisheng, Shi Jingquan (Department of Pathology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The monocellular adhesive ability of polymorphonuclear neutrophils (PMN) to vascular endothelial cells (VEC) was determined with the micromanipulation technique when the cells were treated with endotoxin and adhesion-interruptive factass of anti-CD18 monoclonal antibodies (McAb), anti-endothelial-leucocytic adhesion molecule-1 (ELAM-1) McAb and anti-intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) McAb and the functional characteristics of these 3 adhesion-interruptive molecules in the course of increased adhesion between PMN and VEC were observed. It was found that the main molecular basis of the rapid increase of PMN adhesive ability was CD18 expression and that of the delayed increase of VEC adhesive ability was the expression of either ELAM-1 or ICAM-1.

Key words endotoxin; neutrophil; endothelial cell; adhesive molecuule

个案与短篇

西沙必利致频繁遗精一例报告

A case report of frequent involuntary emission induced by cisapride

钱银山 王益春 (第三军医大学附属新桥医院消化内科) 重庆，630037

患者陈××，男，56岁。因反复上腹饱胀隐痛、纳差伴嗳气2年，胃镜检查为慢性中～重度浅表性胃窦炎，曾服用吗丁啉等治疗，开始效果较好，近半年来症状加重，复查胃镜诊断同前，给予西沙必利(西安杨森制药有限公司生产，批文号×940071) 5 mg 3/d，庆大霉素片8 mg 3/d、猴头菇片3片3/d 治疗，用至第5天，自觉症状减轻，胃纳增加，但出现频繁遗精，1～3次/d，不分白天还是夜间，伴全身乏力，腰膝酸软。停用西沙必利，其他药物继续服用，4 d 后遗精次数减少，约4～5 次/d。追问病史，2年前在我院泌尿科确诊为慢性前列腺炎，亦经常有遗精史，但多在1周左右1次。

讨论

西沙必利是新的促动力型制剂，通过选择性地作用于胆碱能系统，影响整个胃肠道的运动活性[1]。它与胃复安、吗丁啉略有不同[2]，是一种全胃肠道运动促进剂。近年广泛应用于临床，治疗各种原因所致的胃肠运动障碍性疾病。其副作用轻微，主要有肠道痉挛，可致腹泻、腹鸣，偶有惊厥、锥体外系反应和尿频，未见致遗精报道。本例诊断为非溃疡性消化不良，服用西沙必利后症状明显减轻，但出现频繁遗精。因猴头菇及庆大霉素从未见有此副作用，故考虑与西沙必利有关而停服，数天后遗精次数明显减少，说明遗精确与西沙必利有关。其致遗精的机理尚不清楚，有待进一步探讨。

关键词 西沙必利；遗精

中图法分类号 R969.4

参考文献

1 Mchugh S, Lico S, Diamant NE. Cisapride vs metoclopramide an acute study in diabetic gastroparesis. Dig Dis Sci, 1992; 37(7): 997

2 (美)贝莱斯编著，查良锰主译. 胃肠病和肝病的最新治疗. 北京出版社，1994：136～137

(收稿：1995-09-03；修回：1996-01-25)

(编辑 冯崇英)

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