DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.03.005



# CD11/CD18介导PMN-EC粘附在烧伤早期PMN损伤血管内皮细胞中的作用*

李志清 杨宗城 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** 将烧伤早期病人中性粒细胞(PMN)与体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)孵育,观察内皮细胞的病理形态变化和检测培养液中LDH、ACE、6-keto-$PGF_{1\alpha}$含量,以反映细胞损伤程度。并计数PMN与HUVEC粘附百分率。发现烧伤早期PMN可使HUVEC变形、细胞收缩、细胞间裂隙形成、胞浆出现小空泡、核固缩、部分内皮细胞从培养皿上脱落。培养液中LDH、ACE、6-keto-$PGF_{1\alpha}$含量升高。预先用CD11a/CD18单抗(mAb)和CD11b/CD18 mAb处理PMN后,降低了PMN与HUVEC粘附百分率,HUVEC损伤也明显减轻,尤其是二者联合应用时。结果提示:烧伤早期PMN可引起EC损伤,损伤与CD11/CD18介导的PMN-EC粘附相关,应用CD11a/CD18 mAb和CD11b/CD18 mAb可部分阻断PMN对EC的粘附和损伤。

**关键词** 中性粒细胞;内皮细胞;CD11a/CD18;CD11b/CD18;细胞粘附

**中图法分类号** R644.02

CD11/CD18复合物在调节白细胞与内皮细胞粘附中起必需作用,属于粘附因子整合素家族,包括三种糖蛋白即CD11a/CD18、CD11b/CD18和CD11c/CD18。CD11a/CD18和CD11b/CD18通过与内皮细胞(endothelial cell,EC)上ICAM-1结合而介导中性粒细胞(polymorphonuclear,PMN)与EC的粘附[1]。白细胞可以产生多种介质、酶、自由基等损伤EC。而对白细胞介导的血管内皮损伤,白细胞与内皮细胞粘附是必需的。只有当白细胞粘附到EC上后,其释放的产物才能引起EC严重损伤与脱落[2]。我们利用体外实验观察了烧伤早期病人PMN对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell,HUVEC)的影响,并应用CD11a/CD18单抗(monoclonal antibodies mAb)及CD11b/CD18 mAb观察阻断PMN与HUVEC粘附后PMN对HUVEC损伤作用的改变,试图证明CD11/CD18在烧伤早期PMN与EC粘附及此粘附在烧伤早期PMN对EC损伤中的作用,为临床内皮细胞保护治疗提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养与分离

1.1.1 人脐静脉内皮细胞培养 采用我所安静建立的方法略加改进[3]。用0.25%胰蛋白酶灌注消化胎儿脐静脉,收集消化的细胞悬液,用M199培养液调整细胞密度,以(1~1.5)×$10^5$/ml将细胞放入直径35 mm培养皿内,在5%$CO_2$、95%$O_2$、37℃条件下培养。待细胞融合后使用。

1.1.2 PMN分离 应用淋巴细胞分离液和红细胞裂解液从健康人和烧伤后48 h内病人(40%~60%TBS)静脉血中分离PMN。经台盼蓝染色计数,PMN存活率>95%。

### 1.2 分组

将分离的PMN按PMN与HUVEC 1∶1比例。第一组:将烧伤后早期PMN直接加入生长良好的HUVEC内。第二组:将烧伤早期PMN调整至1×$10^6$/ml细胞悬液,取其中1 ml加入100 μl CD11a/CD18 mAb(医科院产品)混合后置4 ℃作用30 min再加入EC培养皿内。第三组:类似第二组将烧伤早期PMN用CD11b/CD18 mAb(宝丽曼产品)$10^6$PMN 100 μl处理后放入EC培养皿内。第四组:类似第二组用CD11a/CD18 mAb和CD11b/CD18 mAb联合同时处理PMN后加入EC培养皿内。经PMN加入后续孵育24 h。

### 1.3 检测指标

1.3.1 培养液中的LDH 常规生化检测。单位:IU·$ml^{-1}$。

1.3.2 培养液中血管紧张素转化酶原(ACE) 采用紫外法测定,按海军总医院药盒说明书操作。单位:mmol·$g^{-1}$·$min^{-1}$。

1.3.3 培养液中6-keto-$PGF_{1\alpha}$ 采用放免法测定,按301医院药盒说明书操作。单位:pg·$ml^{-1}$。

1.3.4 PMN与HUVEC粘附百分率 先计数加入培养皿中PMN数,再计数PMN与HUVEC共孵育1 h后培养液中未与HUVEC粘附的PMN,最后求粘附百分率。

### 1.4 数据处理

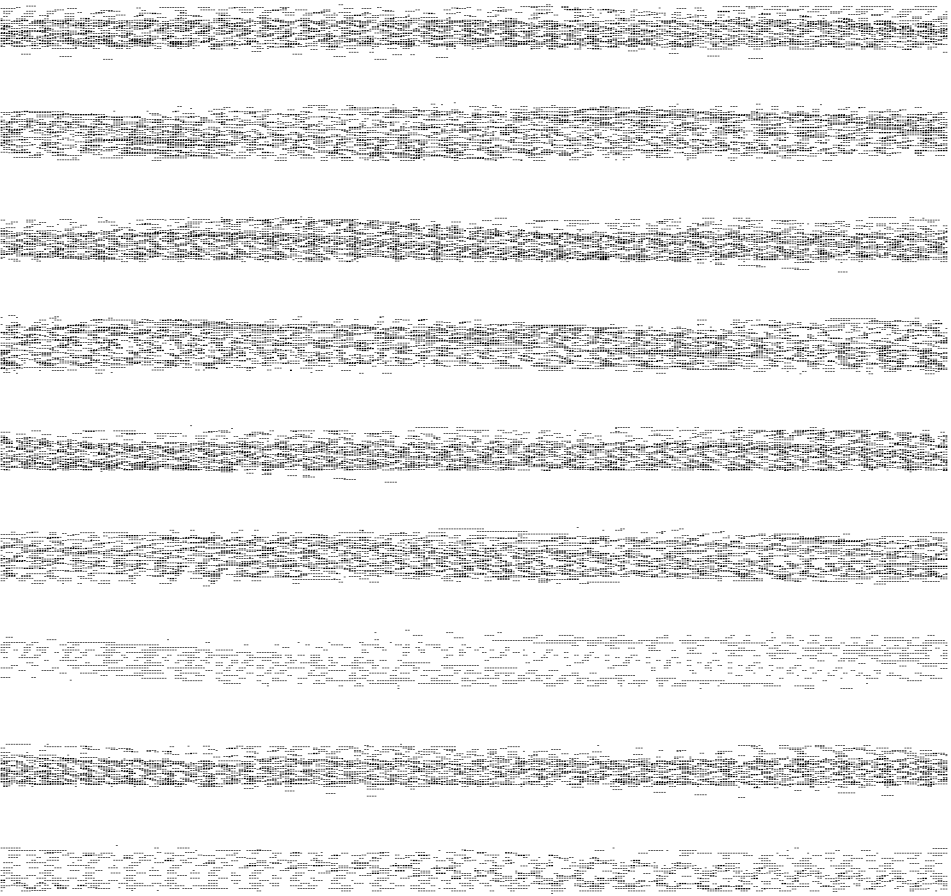
结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据比较采用两样本均数$t$检验。

## 2 结果

生长良好融合的正常内皮细胞在倒置相差显微镜下观察

* 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



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

附表 培养液中 LDH、ACE、6-keto-$PGF_{1\alpha}$

Table LDH, ACE, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ in Media ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

| Group | LDH | | ACE | | 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Before incubation with PMN | After incubation | Before incubation | After incubation | Before incubation | After incubation |
| Normal PMN | 2.90±0.87 | 3.10±1.21 | 2.18±0.46 | 3.24±0.85 | 599.26±27.91 | 621.35± 32.19 |
| Burn PMN | 2.90±0.87 | 13.20±2.94 | 2.18±0.46 | 27.74±4.39 | 599.26±27.91 | 2321.80±311.74 |
| CD11b/CD18 mAb | 2.90±0.87 | 5.80±1.29* | 2.18±0.46 | 16.13±3.54* | 599.26±27.91 | 880.93±156.79* |
| CD11a/CD18 mAb | 2.90±0.87 | 7.10±1.83*# | 2.18±0.46 | 15.03±3.32* | 599.26±27.91 | 1015.64±211.17* |
| CD11a/CD18 mAb +CD11b/CD18 mAb | 2.90±0.87 | 4.50±1.35*△ | 2.18±0.46 | 8.62±4.39*△## | 599.26±27.91 | 710.37±101.34*△# |

△: $P<0.01$ *vs* CD11a/CD18 mAb; #: $P<0.05$ *vs* CD11b/CD18 mAb; ##: $P<0.01$ *vs* CD11b/CD18 mAb; *: $P<0.01$ *vs* normal PMN and burn patients' PMN respectively

CD11a/CD18 mAb、CD11b/CD18 mAb 和二者联合应用分别降低烧伤早期 PMN 与 EC 共育1 h 时 PMN-HUVEC 粘附百分率62%、73%和81%($n=7$)。

## 3 讨论

血管内皮细胞损伤是烧伤早期血管通透性增加继而引发低血容量休克的病理基础，是烧伤后脏器损害的共同通路[4]。在内皮细胞损伤中 PMN 起了重要作用，Okrent 研究表明：PMN 颗粒中主要成分(髓过氧化酶、Lactoferrin、组织蛋白酶 G、弹性蛋白酶、溶菌酶和 defensin)对人脐静脉内皮细胞均有明显损伤作用[5]。与 EC 粘附后 PMN 释放的介质诱导内皮细胞功能障碍导致通透性水肿、血栓、出血，在 ARDS 和异体移植排斥反应中均起重要作用[6]。

本实验应用培养的 HUVEC，通过倒置显微镜观察及伊红卡马斯亮蓝染色光镜下摄像。发现烧伤早期 PMN 与 HUVEC 一同孵育 24 h 后，部分 HUVEC 发生变性、坏死，成片从培养皿上脱落，存留的细胞失去原有的形状，细胞间裂隙增大，核固缩等。而加入健康人 PMN 者，未见 HUVEC 有明显损伤。可见烧伤早期 PMN 可损伤内皮细胞，这是由于烧伤后 PMN 立即激活，释放介质等所致。

LDH 是糖酵解酶，广泛存在于人体组织细胞内，当细胞受到损伤时可释放出来，损伤越重释放的量越多。培养液中 LDH 包括内皮细胞自发性释放的 LDHe，PMN 自发性释放的 LDHp 和 EC 受损释放的 $LDH_I$，只有 $LDH_I$ 才反映 EC 损伤程度，本文所列 LDH 值即为 $LDH_I$。ACE 是一种肽酰二肽水解酶，血清中 ACE 主要来自于 VEC，EC 受损后 ACE 便从 EC 表面脱落，使 ACE 增多。6-keto-$PGF_{1\alpha}$是 $PGI_2$ 的稳定代谢产物，$PGI_2$ 主要由 EC 合成，其释放量与 EC 损伤程度有关。本实验显示：烧伤早期病人 PMN 与 HUVCE 共育 24 h 时培养液中 ACE、LDH、6-keto-$PGF_{1\alpha}$较健康人 PMN 组和加入 PMN 前培养液中含量明显升高，也提示烧伤早期 PMN 可损伤 EC。

在 PMN 对 EC 损伤中，PMN 与 EC 粘附起了关键作用，有文献报道激活的白细胞如果不与内皮细胞粘附，其释放产物对内皮的损伤只是短暂可逆的，只有在白细胞粘附到 EC 上，其释放产物才能引起 EC 严重损伤和脱落[2]。这也说明白细胞粘附与激活是两个相互分离的过程。

目前所知，PMN 与 EC 粘附主要有两种机理：即 PMN 启动机理和 EC 启动机理[1]。在 PMN 启动机理中，PMN 在 TNF、IL-1、内毒素等作用下激活，而 EC 未受到直接刺激。PMN 膜上表达 CD11a/CD18、CD11b/CD18 分别均与 EC 上结构表达的 ICAM-1 结合，介导 PMN 与 EC 粘附。应用 CD18 单抗、CD11a 单抗和 CD11b 单抗可分别阻断用 FMLP、$C_{5d}$、TNF 等激活后的 PMN 与 EC 粘附的 80%～90%、40%～60%、50%～70%、CD11c 单抗无效[1]。说明 CD11a/CD18、CD11b/CD18 均参与了此情况下的 PMN 与 EC 粘附而 CD11c/CD18 未参与。另有报道在激活的 PMN 与 EC 粘附中 ICAM-1 单抗与 CD18 单抗阻断粘附无相互加强作用[7]，说明 PMN-EC 粘附在 PMN 启动机理中主要通过 CD11/CD18 与 ICAM-1 结合而介导。而在 EC 启动机理中涉及 ICAM-1、ELAM-1、CD11/CD18 等[1]。烧伤早期病人 PMN 在体内已被激活[8]，因此它与 HUVEC 的粘附可能主要由 CD11/CD18 与 ICAM-1 介导。本实验应用 CD11a/CD18 mAb、CD11b/CD18 mAb 及二者联合应用分别降低烧伤早期 PMN 与 HUVEC 粘附 62%、73%、87%，证明 CD11a/CD18、CD11b/CD18 均参与了烧伤早期 PMN 与 HUVEC 粘附，且 CD11/CD18 在此粘附中起了关键作用。

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

在实验中还观察到 CD11a/CD18、CD11b/CD18 及两者联合应用显著减轻了烧伤早期 PMN 对 EC 的损伤，提示 CD11/CD18 介导的 PMN-EC 粘附在烧伤早期 PMN 对 EC 损伤中起了重要作用。其机理在于白细胞与内皮细胞粘附后紧密连接在一起，允许一些 PMN 释放的短活性介质如氧化物等发生作用，同时形成了一个保护损伤作用的微环境以阻止血浆抑制因子的进入[9]。另外 PMN 与 EC 粘附后 EC 内 $Ca^{2+}$ 升高导致 EC 收缩等改变，也可能有助于 PMN 对 EC 的损伤。有学者报道在出血性休克的再灌注损伤中应用 CD11b 和 CD18 mAb 由于抑制了白细胞的粘附从而阻断血管和组织损伤[6]。目前抗粘附治疗研究中一个重要方面就是阻断白细胞介导的血管内皮损伤。

## 参考文献


1 Nicolae Simiconescu, Maya Simionescu. Endothelial cell dysfunctions. New York: Plenum Press, 1992: 212～216

2 Patterson CE, Barnard JW, Lafuze JE *et al*. The role of activation of neutrophils and microvascular pressure in acute pulmonary edema. Am Rev Respir Dis, 1989; 140(4): 1052

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

4 杨宗城，高建川. 血管内皮细胞在烧伤脏器损害发病中的作用. 中华整形烧伤外科杂志，1995; 11(3): 225

5 Okrent DG, Lichtenstein AK, Granz T *et al*. Direct cytotoxicity of polymorphonuclear leukocyte granule protein to human lung-derived cells and endothelial cells. Am Rev Respir Dis, 1990; 141(1): 179

6 Nicolae Simionescu, Maga Simionescu. Endothelial cell dysfunctions. New York: Plenum Press, 1992: 144～150

7 Smith CW, Rothlein R, Hughes BJ *et al*. Recognition of an endothelial determinant for CD18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. J Clin Invest, 1988; 82: 1746

8 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

9 Shosby DM, Shasby SS, Peach MH *et al*. Granulocytes and phorbol myristate acetate increase permeability to albumin of cultured endothelial monolayer and isolated perfused lungs: role of Oxygen radicals and granulocyte adherence. Am Rev Respir Dis, 1983; 127: 72


（收稿：1995-10-31；修回：1996-05-10）

（编辑　刘　鹏）

# Study of the effects of CD11/CD18-mediated PMN-EC adhesion on PMN-induced EC damages in the early stage postburn *in vitro*

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

**Abstract** Polymorphonuclear neutrophils obtained from patients in the early stage postburn were incubated together with cultured endothelial cells (ECs) of human umbilical vein. Then the morphological changes of ECs were observed, the content of LDH, ACE and 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ in the culture fluid determined and the percentage of PMN-EC adhesion calculated in order to assess the severity of EC damages. It was found that the ECs were deformed showing shrinkage of the cells and formation of intercellular space, small vacuoles appeared in the cytoplasm with karyopyknosis. Some of the ECs were detached from the wall of the incubation plate. The content of LDH, ACE and 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ was increases. When the PMNs were pretreated with the monoclonal antibodies (McAb) of CD11a/CD18, CD11b/CD18 or the 2 kinds of McAbs, the adhesion rate between PMNs and ECs was decreased especially when the 2 kinds of McAbs were used in combination. The findings indicate that PMNs can induce damages of ECs in the early stage postburn and the damages result from the CD11/CD18 mediated adhesion of PMNs and ECs. Administration of the McAbs of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 is able to block partially the adhesion between PMNs and ECs and minimize the damages on ECs.

**Key words** polymorphonuclear neutrophil; endothelial cell; monoclonal antibody; CD11/CD18; cellular adhesion

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