

[文章编号] 1000-4718(2003)03-0325-04

迟发型超敏反应中小鼠脾淋巴细胞 与细胞外基质粘附能力的变化^{*}

刘建礼¹, 徐强^{1,2}(¹中国药科大学中药药理教研室, 江苏南京 210038; ²南京大学生命科学学院医药生物技术国家重点实验室, 江苏南京 210093)

[摘要] 目的: 探讨迟发型超敏反应中淋巴细胞与细胞外基质粘附能力的变化及细胞因子的调节作用。方法: 以 2,4,6-三硝基氯苯(picryl chloride, PCI)两次致敏小鼠后, 在耳部攻击造成超敏反应。取攻击后不同时间点的脾淋巴细胞, 以 Mn^{2+} 为诱剂, 检测细胞与细胞外基质蛋白的粘附活性变化; 或取攻击后 18 h 的脾淋巴细胞, 分别在体外与 IL-2, IFN- γ , TNF- α 单独或联合培养 4 h 后, 检测细胞与细胞外基质的粘附作用; 将脾淋巴细胞纯化为 T 细胞后, 检测 TNF- α 对其粘附能力的影响。结果: 脾淋巴细胞与细胞外基质的粘附能力在攻击后 6 h 时开始上升, 18 h 达到高峰, 之后下降, 在 36 h 基本恢复正常水平。IL-2 在 10×10^4 U/L 显著促进脾淋巴细胞的粘附, TNF- α 剂量依赖性促进脾淋巴细胞的粘附, IFN- γ 对 TNF- α 的作用具有明显的协同效应。TNF- α 对脾 T 细胞粘附能力的促进作用强于对总脾淋巴细胞的作用。结论: 迟发型超敏反应中, T 淋巴细胞与细胞外基质的粘附随炎症的进展发生相应的变化, 这种粘附作用受各种细胞因子的调节。

[关键词] 淋巴细胞; 粘附; 细胞外基质; 超敏反应; 迟发型; 小鼠

[中图分类号] R392.8 [文献标识码] A

在炎症的发生和发展中, 淋巴细胞的迁移与浸润是关键性的环节之一。在这一过程中, 淋巴细胞必须与外周组织中的细胞外基质发生相互作用, 才能到达炎症部位^[1]。最近, 淋巴细胞与细胞外基质的粘附作用在炎症中的重要性正逐渐受到关注。Pitzalis^[2]和 Kupiec-Weglinski 等^[3]分别报道, 淋巴细胞与细胞外基质之间的粘附作用在类风湿性关节炎(rheumatic arthritis, RA)和移植排斥反应中发挥着重要作用。De Fougères 等^[4-6]报道, 阻断淋巴细胞与细胞外基质之间粘附作用的单克隆抗体或合成肽类可以有效地抑制炎症的发生。因此, 进一步探讨这种粘附作用在炎症反应中的变化规律, 对于阐明一些疾病的发病机理并在此基础上寻找新药具有重要意义。本研究拟利用 2,4,6-三硝基氯苯所致的小鼠接触性皮炎(PCI-induced contact sensitivity, PCI-CS)作为炎症反应的动物模型, 检测炎症过程中淋巴细胞与细胞外基质粘附功能的变化及数种细胞因子的调节作用。

材料和方法

1 实验动物

雌性 ICR 小鼠, 体重(20±2) g, 购于本校实验动物中心。

[收稿日期] 2001-12-17 [修回日期] 2002-04-01

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 39925041)

Tel: 025-5322010; E-mail: Lzchengfeng@sohu.com

2 实验材料

2,4,6-三硝基氯苯(picryl chloride, PCI)(Tokyo Kasei Industry Co. Ltd., Japan); 橄榄油(olive oil)(上海化学试剂站分装, 上海); I 型胶原(Collaborative Biomedical Products, USA); 牛血清白蛋白(BSA)(Sigma); 纤维粘连蛋白(fibronectin, FN)(岩城硝子株式会社, 日本); 重组人白介素-2(IL-2)(长春长生基因药业股份有限公司, 长春); 重组人肿瘤坏死因子- α (TNF- α)(南京军事医学研究所, 南京); 重组人干扰素- γ (IFN- γ)(南京军事医学研究所, 南京); 小鼠 T 细胞纯化柱(R&D Systems, USA)。

3 实验方法

3.1 2,4,6-三硝基氯苯致小鼠接触性皮炎(PCI-CS) 取小鼠, 刮去腹毛, 涂以 1% PCI 的乙醇溶液 100 μ L 致敏, 5 d 后再次同法致敏, 再 5 d 后用 1% PCI 橄榄油溶液 30 μ L 涂于右耳两侧攻击, 18-24 h 后可观察到右耳的炎症肿胀。

3.2 脾淋巴细胞的制备^[7] 取攻击后不同时点的小鼠, 断头放血处死。无菌取出脾脏, 置冰冷的分离缓冲液中, 轻轻挤压、吹打使其分离为单个细胞。经八层纱布过滤后, 4℃, 1 000 r/min 离心 5 min。沉淀加入 10 mL Tris-NH₄Cl(pH 7.5), 冰浴 5 min 去除红细胞, 离心收集细胞。洗涤一次后混悬于实验缓冲液或 RPMI-1640 培养基中备用。

3.3 T 细胞的分离纯化 取制备好的小鼠脾淋巴细胞, 用小鼠 T 细胞纯化柱参照试剂盒的说明进行纯

化分离,得到的 CD3⁺细胞的纯度为81%以上。

3.4 细胞粘附实验^[8,9] 将I型胶原或FN用PBS分别稀释成50 mg/L和2 mg/L,取50 μL加入96孔ELISA板中,4℃过夜。用PBS洗2次,再用2%的BSA室温封闭1 h, PBS再洗两次。将制备好的脾淋巴细胞或脾T细胞加入处理好的ELISA板中,800 r/min离心2 min使细胞下沉,于37℃作用30 min。用PBS洗3次洗去未粘附细胞后,加甲醛/丙酮(1:1)液固定10 min,再用PBS洗3次。然后加0.5%结晶紫染色10 min,洗3次后,每孔加入1%十二烷基硫酸钠(SDS)100 μL,振荡10 min,在酶联免疫检测仪上于592 nm测定吸光度。以只用BSA包被的孔作为对照孔,以加入细胞不经冲洗直接固定染色的孔测得的吸光度作为A_{total},数据表示为粘附细胞百分数。

粘附细胞百分数(%) = (A_{测定孔} - A_{对照孔}) / A_{total} × 100

4 统计学处理

数据表示为 $\bar{x} \pm s$, 两组间均数比较采用 *t* 检验。

结 果

1 脾细胞与细胞外基质粘附能力的时程变化

分别于攻击后0 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 30 h, 36 h各时点取脾淋巴细胞,进行粘附功能检测。结果发现,体外在Mn²⁺的诱导下,小鼠脾淋巴细胞与FN和I型胶原的粘附能力均在6 h时开始显著上升,18 h达到高峰,之后逐渐下降,在36 h时基本恢复正常水平(图1)。

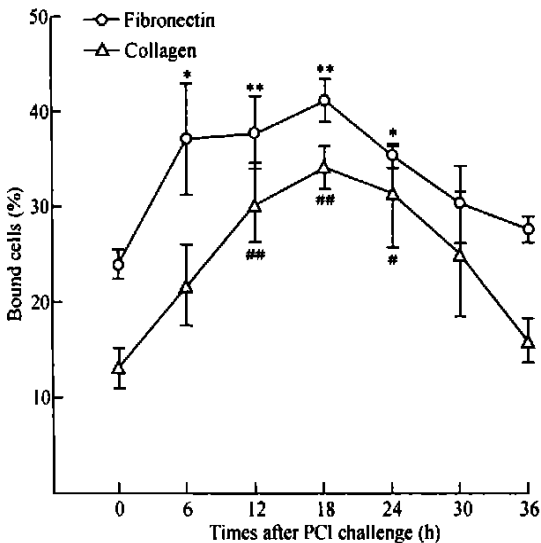


Fig 1 Kinetics of spleen cell adhesion to extracellular matrices in PCI-CS. $\bar{x} \pm s$, *n* = 3. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs 0 h for fibronectin; # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01 vs 0 h for collagen.

图1 PCI-CS模型中脾细胞与细胞外基质粘附能力的变化时程

2 细胞因子对脾细胞粘附功能的调节

取攻击后18 h脾淋巴细胞,体外与细胞因子共孵4 h后,测定细胞粘附功能。结果发现,IL-2在10 × 10⁴ U/L时显著增强脾淋巴细胞对I型胶原的粘附能力,TNF-α显示剂量依赖性的促进作用,IFN-γ有一定的促进粘附的趋势。将这几种细胞因子两两应用时,TNF-α和IFN-γ具有显著的协同作用,而这两种细胞因子与IL-2均无协同作用(表1)。

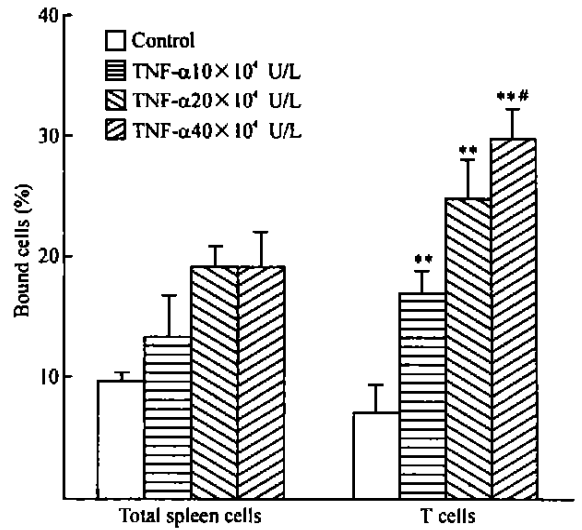


Fig 2 Comparison of the effects of TNF-α on the adhesion of total spleen cells and T cell. $\bar{x} \pm s$, *n* = 3. ** *P* < 0.01 vs control; # *P* < 0.01 vs TNF-α 40 × 10⁴ U/L of total spleen cells.

图2 TNF-α对脾细胞和T细胞粘附功能的作用比较

表1 各种细胞因子对PCI-CS小鼠脾淋巴细胞粘附功能的影响

	Concentration (10 ³ × U/L)	Bound cells (%)
Control	—	8.78 ± 3.24
IL-2	50	9.84 ± 3.19
	100	15.87 ± 2.97*
	200	7.57 ± 1.08
	50	14.44 ± 3.66
IFN-γ	100	11.85 ± 3.24
	200	12.33 ± 3.12
	100	13.76 ± 1.35
TNF-α	200	18.89 ± 4.02*
	400	20.48 ± 2.94**
	IL-2 + IFN-γ	100 + 100
IL-2 + TNF-α	100 + 200	12.33 ± 5.33
IFN-γ + TNF-α	100 + 200	32.00 ± 1.79***#

* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs control; Δ *P* < 0.01 vs IFN-γ 10 × 10⁴ U/L; # *P* < 0.01 vs TNF-α 20 × 10⁴ U/L.

3 TNF- α 对 T 细胞的粘附功能调节

取攻击后 18 h 的脾淋巴细胞, 将其纯化后为 T 淋巴细胞, 然后与不同浓度的 TNF- α 共孵。结果发现, TNF- α 剂量依赖性促进 T 淋巴细胞与 I 型胶原的粘附。与总脾淋巴细胞相比, 同浓度的 TNF- α 促进 T 细胞粘附的作用更为显著(图 2)。

讨 论

迟发型超敏反应是由 T 淋巴细胞介导的以淋巴细胞和巨噬细胞浸润为主的炎症反应, 它参与了许多免疫性疾病的病理过程。PCI-CS 是一种典型的迟发型超敏反应, 小鼠耳壳的炎症肿胀通常在攻击后 6 h 开始上升, 18—24 h 达到高峰, 之后开始消退, 48 h 时基本恢复正常水平^[10]。本研究发现, 小鼠脾淋巴细胞与细胞外基质成分 FN 和 I 型胶原的粘附能力与炎症肿胀的时程基本一致。这表明, 随着炎症的发生和消退, 淋巴细胞与细胞外基质的粘附能力相应出现上升和下调。这为淋巴细胞粘附能力变化与炎症的关系提供了相关的证据。

我们的研究还发现, 体外在无刺激剂的情况下, 在上述攻击后各时点所取的细胞的粘附能力均维持在极低水平(数据未出示)。这提示, 抗原攻击后, 淋巴细胞虽具备粘附的潜能, 但只有在适当的刺激下, 才能表现出粘附能力的增强。那么, 在体内, 脾淋巴细胞的粘附能力是如何被激发的呢? 已知在迟发型超敏反应中, 抗原特异性的淋巴细胞被活化后, 会产生各种细胞因子, 这些细胞因子进一步可调节各种相关细胞的功能。为此, 我们研究了 IL-2、TNF- α 及 IFN- γ 对脾淋巴细胞粘附功能的影响。结果发现, IL-2 和 TNF- α 单独使用均有增强脾淋巴细胞粘附能力的功能, IFN- γ 有增强的趋势, 其中, TNF- α 的作用较为显著。将这些细胞因子两两合并使用时, TNF- α 和 IFN- γ 有明显的协同效应。但是, IL-2 与 TNF- α 或 IFN- γ 合用时, 其促进粘附的能力反而有所降低。这表明, 淋巴细胞与细胞外基质的粘附功能受炎症过程中产生的细胞因子调节, 各种细胞因子之间通过特定的相互协调而发挥其功能。其具体的机理有待进一步研究。

我们进一步将脾淋巴细胞纯化后为 T 细胞, 检测

TNF- α 对其粘附功能的影响, 结果发现, TNF- α 剂量依赖性地促进了抗原攻击后 18 h T 细胞的粘附能力, 并且, 这种促进作用明显高于对脾总淋巴细胞的作用。这提示, PCI-CS 小鼠脾淋巴细胞中与细胞外基质粘附的主要为 T 淋巴细胞, T 细胞与细胞外基质之间的粘附能力受细胞因子的调节而上升可能是迟发型超敏反应初期的细胞病理学特征之一。

[参 考 文 献]

- [1] Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte—endothelial adhesion molecules[J]. *Blood*, 1994, 84(7): 2068—2101.
- [2] Pitzalis C. Role of adhesion mechanisms in the pathogenesis of chronic synovitis[J]. *Br J Rheumatol*, 1996, 35(12): 1198—1215.
- [3] Kupiec—Weglinski JW, Gorski A. Role of extracellular matrix proteins in organ transplantation[J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 1997, 45(1): 7—13.
- [4] De Fougerolles AR, Sprague AG, Nickerson—Nutter CL, et al. Regulation of inflammation by collagen—binding integrins $\alpha\beta_1$ and $\alpha\beta_2$ in models of hypersensitivity and arthritis[J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(6): 721—729.
- [5] Haworth D, Rees A, Alcock PJ, et al. Anti-inflammatory activity of c(ILDV—NH(CH₂)₅CO), a novel, selective, cyclic peptide inhibitor of VLA—4—mediated cell adhesion[J]. *Br J Pharmacol*, 1998, 126(8): 1751—1760.
- [6] Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against $\alpha\beta_1$ integrin[J]. *Nature*, 1992, 356(6364): 63—66.
- [7] Xu Q, Cao J, Wu F, et al. Role of Th1 and Th2 cytokines in regulating the liver injury induced by delayed—type hypersensitivity to picryl chloride[J]. *Liver*, 1999, 19(6): 473—480.
- [8] Robert GA, Diana PP, Lourdes B, et al. Pentoxifylline inhibits adhesion and activation of human T lymphocytes[J]. *J Immunol*, 1998, 161(1): 65—72.
- [9] Wilkins JA, Stupack D, Stewart, S, et al. β_1 integrin—mediated lymphocyte adherence to extracellular matrix is enhanced by phorbol ester treatment[J]. *Eur J Immunol*, 1991, 21(2): 517—522.
- [10] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 1226.

Adhesion of mice lymphocytes to extracellular matrix in delayed-type hypersensitivity

LIU Jian-li¹, XU Qiang^{1, 2}

(¹Department of Pharmacology for Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China;

²State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

[**ABSTRACT**] **AIM:** To investigate the adhesion between lymphocytes and extracellular matrix (ECM) in delayed-type hypersensitivity (DTH) in mice as well as the regulatory effect of several cytokines on it. **METHODS:** DTH was induced by the application of picryl chloride (PCl) to mice that had been sensitized twice by PCl, followed by isolating the spleen lymphocytes at different times. The adhesion of spleen lymphocytes to fibronectin or type I collagen were examined. In some cases, spleen lymphocytes obtained at 18 h were incubated with various concentrations of IL-2, IFN- γ , and TNF- α for 4 h at 37 °C before the adhesion assay. T cells purified from the spleen lymphocytes were also used for the assay in the presence of TNF- α . **RESULTS:** The adhesion of spleen lymphocytes to ECM began to increase at 6 h after PCl challenge, reached a peak at 18 h, then decreased and returned to normal level at 36 h. IL-2 significantly increased the adhesion of lymphocytes to ECM at a dose of 1×10^5 U/L and TNF- α enhanced the adhesion in a concentration-dependent manner. The combined use of TNF- α and IFN- γ showed a significantly enhanced adhesion. TNF- α was more effective to accelerate the adhesion of spleen T Cells than that of total spleen lymphocytes. **CONCLUSION:** In the process of DTH, the adhesion of lymphocytes to ECM was regulated by several cytokines and associated with the development of inflammation.

[**KEY WORDS**] Lymphocytes; Adhesions; Extracellular matrix; Hypersensitivity, delayed; Mice

全国第三届心脑血管病学术会议通知

由中国药理学学会和中国临床药理学与治疗学杂志社主办的“全国第三届心脑血管病学术会议”，将于 2003 年 8 月在厦门召开(具体时间另行通知)。会议将授予国家级继教 I 类学分 10 分，入选论文将以全文或摘要的形式刊登于“中国临床药理学与治疗学”杂志(CN34-1206/R, ISSN 1009-2501)，并颁发论文证书。现将有关事宜通知如下：

1. 内容：心脑血管疾病的基础与应用基础研究；心脑血管疾病的临床研究；心脑血管药理的基础与应用基础研究；心脑血管疾病的药物治疗研究；心脑血管疾病介入治疗学研究；心脑血管疾病护理；临床研究方案的设计以及新药临床研究的设计与统计等。

2. 要求：必须是未公开发表的学术论文，或具有本人研究工作的综述。文稿首页加盖单位公章，文责自负并声明未一稿多投。来稿须用 Word 格式打印并寄软盘，也可通过 E-mail 投稿。来稿请注明“征文”字样，每篇论文交审稿费 50 元。

3. 格式：参照“中国临床药理学与治疗学”杂志论文格式要求撰写，中英文摘要按结构式书写。

4. 来稿请寄：安徽省芜湖市弋矶山医院内“中国临床药理学与治疗学”杂志编辑部收

邮政编码：241001

联系电话：0553-5738856-2333；0553-5738350(传真)

E-mail: editors@mail.wh.ah.cn