performance. Can J Fish Aquat Sci, 1995, 52: 1376~ 1384

(1999-05-24 收稿, 1999-08-09 收修改稿)

人外周血单个核细胞不同亚群 对猪内皮细胞的粘附作用

张晓峰 冯志民 丰美福* 王宏芳 班立勤

(中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100080. * 联系人)

摘要 细胞介导的免疫应答是异种器官移植面临的主要障碍, 细胞粘附是细胞间相互识别的第一步. 采用流式细胞术粘附测定法研究了人外周血单个核细胞(PBMC)中单核细胞(Mo)、自然杀伤细胞(NK)和T淋巴细胞(T)对猪主动脉内皮细胞(PAEC)粘附的差异性, 以及人细胞因子 γ -干扰素(hIFN- γ)或/和肿瘤坏死因子- α (hTNF- α)预刺激PAEC 24 h对PBMC不同亚群粘附的影响. PBMC不同亚群对PAEC粘附能力的大小以Mo, NK和T细胞为序, 其中T细胞的粘附作用极其微弱; hTNF- α 具有种间交叉活性, 可使Mo, NK和T细胞的粘附率分别提高40%, 110%和3倍. 这些结果在细胞水平上直接证实了宿主Mo和NK细胞是异种移植细胞性排斥反应的主要参与者, 为进一步研究人Mo/NK与PAEC间的作用机制打下了基础.

关键词 人外周血单个核细胞(PBMC) 猪主动脉内皮细胞(PAEC) 人肿瘤坏死因子- α (hTNF- α) 细胞粘附表型分析

异种器官移植是生物医学研究的一个重要热点, 它将从根本上解决人供体器官严重缺乏问题. 猪器官由于在尺寸大小、解剖结构和生理功能等方面均具有与人器官的相似性而成为异种移植的首选对象. 异种移植物植入受体后首先会遇到超急性排斥反应, 这是由宿主体内存在的与异种移植物反应的天然抗体所致^[1]. 虽然通过使用转基因猪和去除预存抗体可以克服这种体液免疫应答, 但是移植物还将受到宿主强烈的细胞性免疫排斥作用, 即延缓性异种排斥反应^[2], 目前就这一排斥反应的机制仍不甚明了.

内皮细胞是血液和组织之间的主要屏障, 具有重要的生理和病理功能, 而白细胞对内皮细胞的粘附在细胞免疫系统的传入及传出途径中起着至关重要的作用. 本研究采用流式细胞术测定了人外周血单个核细胞(PBMC)中单核细胞(Mo)、自然杀伤细胞(NK)和T淋巴细胞(T)对猪主动脉内皮细胞(PAEC)的粘附作用, 比较了各亚群对PAEC粘附的差异性, 并探讨了人促炎症性细胞因子—— γ -干扰素(hIFN- γ)或/和肿瘤坏死因子- α (hTNF- α)预刺激PAEC对靶细胞相互粘附的影响.

1 材料与方

() 试剂. PAEC培养液: M199(Gibco), 15%灭活胎牛血清(FCS), 0.01 mmol/L 胸腺嘧啶和 30 μ g/mL 内皮细胞生长因子(EGGF, Boehringer Mannheim)等. PBMC培养液: RPMI1640(Gibco)和 10% FCS等, 用于粘附培养. 细胞因子: 重组的人 γ -干扰素(rhIFN- γ)为 Boehringer

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-22-2419>

Mannheim 公司产品; 重组的人肿瘤坏死因子- α (rhTNF- α) 为 R&D systems 公司产品. 荧光标记的单抗: 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的单抗: FITC-CD45; 藻红蛋白 (PE) 标记的单抗: PE-CD14, PE-CD56 和 PE-CD3, 各荧光标记的单抗均为 Pharmingen 公司产品.

() 内皮细胞分离与培养. 采用胶原酶消化法分离猪主动脉内皮细胞 (PAEC)^[3]. 简言之, 无菌猪主动脉管经磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗后, 以 0.1% 胶原酶 (Gibco) 37 °C 消化 10 min. 收获的 PAEC 培养于经 1% 明胶包被的细胞培养瓶中. 本实验采用 5~9 代的 PAEC, (1) 因子相关抗原染色 (ZYMED) 表明其纯度在 85%~95% 之间.

() 人外周血单个核细胞分离. 外周血单个核细胞分离自人浓缩白细胞 (购于北京市中心血站). 浓缩血经含 5% FCS 及 2 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA) 的 PBS 适量稀释后, 在淋巴细胞分离液上离心分离, 收集界面细胞层并用上述稀释液清洗两次. 所得细胞悬于培养液中, 台盼蓝排阻实验表明细胞存活率高于 95%.

() 流式细胞术粘附测定. 采用流式细胞术测定 PBMC 对 PAEC 的粘附作用^[4]. PAEC 按 1×10^5 /孔接种于 24 孔板, 生长至汇合. 一些细胞以 rhIFN- γ (500 U/mL), rhTNF- α (2.5~15 ng/mL) 或两者组合刺激 24 h. 用 PBS 清洗 2 次单细胞层, 按 5×10^5 /孔加入 PBMC, 如果不另加说明, 培养板于 37 °C 孵育 1 h. 以热 PBS 浸洗 3 次单细胞层, 除去非粘附的 PBMC. 余留细胞由 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 剥离板壁并分散成单细胞悬液.

这种由 PAEC 和粘附的 PBMC 构成的单细胞悬液 4 °C 用 FITC-CD45 标记 20 min. 为了分析粘附 PBMC 不同亚群的表型, 细胞还需按表 1 所列方式双染. 此外, 未用于粘附测定的 PBMC 亦需双染以同粘附的相应亚群对照.

表 1 PBMC 不同亚群的表型分析

标本	1	2	3
染色方式	PE-CD14, FITC-CD45	PE-CD56, FITC-CD45	PE-CD3, FITC-CD45
细胞亚群	Mo	NK	T

应用 FACS Calibur (Becton Dickinson) 收集 10 000 个细胞, 以 CellQuest 软件 (Becton Dickinson) 分析数据. 粘附率表示为粘附细胞数与 PAEC 数的比值. 进行统计学 *t* 检验, $P > 0.05$ 为无显著性差异.

2 结果

2.1 PBMC 不同亚群粘附的测定

根据细胞粒度 (SSc) 和相对荧光强度, 流式细胞术可以将 FITC-CD45 染色的粘附 PBMC 同未染色的 PAEC 区分开来, 图 1(a) 示 PBMC 和 PAEC 共培养 1 h 后, 粘附 PBMC 与 PAEC 的流式分析散点分布图. 由区域 R2 与区域 R1 细胞数的比值表示 PBMC 对 PAEC 的粘附率, 则 PBMC 的粘附率为 0.60 ± 0.15 ($N = 4$, 每次 3 个复孔). 粘附 PBMC 不同亚群的表型分析表明 PBMC 中 Mo 和 NK 均能粘附到 PAEC (图 1(b) 和 (c)), 而 T 细胞对 PAEC 的粘附极微弱 (图 1(d)), 它们的粘附率分别为: 0.31 ± 0.05 (Mo), 0.23 ± 0.07 (NK) 和 0.02 ± 0.01 (T) ($N = 4$, 每次 3 个复孔. Mo 与 NK 粘附率相比, $P > 0.05$; T 与 Mo/NK 粘附率相比, $P < 0.01$).

由于分离到的 PBMC 中不同亚群丰度不一, 粘附率的高低就不能表征不同亚群对 PAEC

图1 流式细胞术粘附分析散点图

(a) PAEC 和粘附 PBMC 的分布; (b) PAEC 和粘附 Mo 的分布; (c) PAEC 和粘附 NK 的分布; (d) PAEC 和粘附 T 细胞的分布, 其中(b)、(c)和(d)由选定相应侧向角光散射——FITC-CD45 散点图中的 PAEC 门及 CD45⁺ (粘附 PBMC) 门得出. R1 表示未染色的 PAEC; R2 分别表示 FITC-CD45 染色的粘附 PBMC(a), PE-CD14/FITC-CD45 染色的粘附 Mo (b), PE-CD56/FITC-CD45 染色的粘附 NK(c) 和 PE-CD3/FITC-CD45 染色的粘附 T 细胞(d)

结合的优劣. 如果将粘附 PBMC 中各亚群的百分数与粘附前 PBMC 中相应亚群的百分数进行对比, 那么该比值即可反映出不同亚群对 PAEC 的粘附差异, 比值愈大, 表明愈能优先结合到靶细胞上. 图 2 示出了 PBMC 不同亚群对 PAEC 的差异结合, 其强弱顺序为 Mo > NK > T.

2.2 粘附的时间过程

将 PBMC 和 PAEC 共同孵育 15~120 min, 测定 PBMC 不同亚群对 PAEC 粘附的动力学过程. 表 2 表明 PBMC 中 NK 和 T 细胞粘附较快, 30 min 即可达到峰值,

图2 PBMC 不同亚群对 PAEC 的差异结合
比值是指粘附 PBMC 中某亚群的百分数与原初 PBMC 中相应亚群的百分数之比. $N=4$, 每次 3 个复孔, 平均数 $\pm$ S.D., 两两相比, $P<0.01$

表2 细胞粘附的时间过程^{a)}

共培养时间/min	15	30	60	90	120
Mo 粘附率	0.15 ± 0.02	0.24 ± 0.04	0.34 ± 0.04	0.33 ± 0.06	0.36 ± 0.05
NK 粘附率	0.11 ± 0.03	0.21 ± 0.05	0.21 ± 0.04	0.20 ± 0.04	0.19 ± 0.05
T 粘附率	0	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00

a) 3次实验的1次代表性结果, 每次3个复孔. 平均数 ± S. D.

而Mo细胞粘附较慢, 需60 min才能达到平台. 这3类细胞一旦稳定结合, 至少可以维持120 min.

2.3 细胞因子刺激下的粘附

以rhIFN- γ (500 U/mL)、rhTNF- α (10 ng/mL) 或两者共同预刺激PAEC 24 h, PBMC对各种不同处理靶细胞的粘附率分别为: 0.56 ± 0.11(对照), 1.13 ± 0.16(rhTNF- α 刺激的PAEC, 与对照相比, $P < 0.01$), 0.61 ± 0.14(rhIFN- γ 刺激的PAEC, 与对照相比, $P > 0.05$) 和 1.19 ± 0.21(rhTNF- α 和rhIFN- γ 共同刺激的PAEC, 与rhTNF- α 单独刺激相比, $P > 0.05$) ($N = 3$, 每次3个复孔). rhIFN- γ 预先处理PAEC 24 h, 不能影响PBMC的粘附, 而PAEC经rhTNF- α

图3 rhTNF- α 对PBMC不同亚群粘附的影响
□为对照, ■为rhTNF- α . rhTNF- α (10 ng/mL) 预刺激PAEC 24 h, 测定PBMC不同亚群的粘附率. $N = 3$, 每次3个复孔, 平均数 ± S. D. * ——与对照相比 $P < 0.05$, ** ——与对照相比 $P < 0.02$, *** ——与对照相比 $P < 0.01$

作用后, 结合PBMC的能力极显著地提高了. 表型分析进一步表明, rhTNF- α 作用PAEC后, PBMC中Mo, NK和T细胞的粘附得到不同程度的升高, 其粘附率分别增加了40%, 110%和3倍(图3). 不同剂量的rhTNF- α (2.5~15 ng/mL) 预刺激PAEC 24 h, Mo, NK和T细胞的粘附率亦表现出一定的量效关系(表3), rhTNF- α 在10 ng/mL时, 它们对PAEC的粘附率达到最大值.

表3 rhTNF- α 刺激依赖的细胞粘附^{a)}

rhTNF- α /ng·mL ⁻¹	0	2.5	5	10	15
Mo	0.29 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.36 ± 0.03 ^{b)}	0.41 ± 0.05 ^{b)}	0.38 ± 0.04 ^{b)}
NK	0.21 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.37 ± 0.02 ^{c)}	0.50 ± 0.04 ^{c)}	0.47 ± 0.05 ^{c)}
T	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01 ^{b)}	0.07 ± 0.01 ^{c)}	0.08 ± 0.01 ^{c)}

a) 3次实验的1次代表性结果, 每次3个复孔. 平均数 ± S. D.; b) 与对照相比 $P < 0.05$, c) 与对照相比 $P < 0.01$

3 讨论

延缓性异种排斥反应是目前异种器官移植面临的主要难题. 在发生延缓性排斥反应的豚鼠对大鼠的心脏异种移植模型^[5]及猪对狒狒的心肺异种移植模型^[6, 7]中, 免疫组化的研究表明在移植物的活体组织切片中均有大量的宿主单核巨噬细胞及NK细胞的浸润, 而T细胞的数量则很少, 提示宿主的单核细胞和NK细胞可能是这种排斥反应的主要介导者. 此外, 人PBMC和PAEC体外共培养研究表明了在效靶细胞的相互作用中白细胞介素-1(IL-1)和白细胞介素-2(IL-2)的产生^[6]及NK的细胞毒作用^[6, 8]. 然而, 对于人PBMC和PAEC相互作用的第

一步——粘附识别的研究尚未见详细报道。本研究以人外周血单个核细胞和猪主动脉内皮细胞的共培养为研究模型,探讨了人单个核细胞不同亚群对 PAEC 粘附的差异性。流式细胞术粘附测定表明在 PBMC 中,Mo 和 NK 细胞可优先粘附到 PAEC 上,而 T 细胞对 PAEC 的粘附能力很弱,从而在细胞水平上进一步证实了宿主单核细胞和 NK 细胞在异种移植排斥中发挥着重要的作用。

在同种异体移植排斥反应中,细胞因子和内皮细胞间的相互作用对于放大炎症应答起着关键的作用。就异种移植而言,有必要探讨人细胞因子是否能够跨越物种从而对猪内皮细胞施加影响。众所周知,IFN- γ 和 TNF- α 可由 NK 和 Mo 分别产生,具有多种免疫效应功能。本研究表明 rhIFN- γ 预先处理 PAEC 24 h,不能影响 PBMC 对 PAEC 的粘附作用,而 PAEC 经 rhTNF- α 预刺激 24 h 后, PBMC 的结合数量升高了 1 倍,提示与 rhIFN- γ 形成对照, rhTNF- α 改变了 PAEC 的粘附特性。关于 rhTNF- α 的种间交叉反应性,他人也有类似报道。Batten 等人^[9]表明 rhTNF- α 可以上调 PAEC iv 类猪白细胞抗原(SLA iv)及 $\oplus$ 类猪白细胞抗原(SLA $\oplus$),并诱导 PAEC 血管细胞粘附分子(VCAM)和 E-选择素(E-selectin)的表达。Kwiatkowski 等人^[10]亦表明 PAEC 经 rhTNF- α 刺激后,其粘附分子 VCAM-1 的表达升高了 75%~85%。因此, hTNF- α 作为一种促炎症因子在异种移植排斥反应中可能充当重要角色。

值得注意的是,虽然 PBMC 对 rhTNF- α 预处理的 PAEC 的粘附率显著升高了,但 PBMC 不同亚群粘附率上升的幅度并不一致,提示 Mo, NK 和 T 细胞对 PAEC 粘附的机制不同,不同亚群在同 PAEC 的相互粘附中所涉及的粘附分子可能存在着差异。因此,尚需进一步研究 PBMC 各亚群细胞对 PAEC 粘附的作用机理,以期提供有效的干扰手段,使这种延缓性排斥反应得以克服。

参 考 文 献

- 1 Millan M T, Ferran C, Winkler H, et al. Xenotransplantation: problems and approaches. *Transplant Proc*, 1994, 26: 3593~ 3596
- 2 Bach F H, Winkler H, Ferran C, et al. Delayed xenograft rejection. *Immunol Today*, 1996, 17: 379~ 384
- 3 Goodman D J, Albertini M V, Willson A, et al. Direct activation of porcine endothelial cells by human natural killer cells. *Transplantation*, 1996, 61: 763~ 771
- 4 Prasad Korlinara L V, Leon M P, Rix D A, et al. Development of a flow cytometric assay to quantify lymphocyte adhesion to cytokine-stimulated human endothelial and biliary epithelial cells. *J Immunol Methods*, 1996, 191: 121~ 130
- 5 Blakely M L, Van der Werf W J, Berndt M C, et al. Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection. *Transplantation*, 1994, 58: 1059~ 1066
- 6 Itescu S, Kwiatkowski P, Wang S F, et al. Circulating human mononuclear cells exhibit augmented lysis of pig endothelium after activation with interleukin 2. *Transplantation*, 1996, 62: 1927~ 1933
- 7 Michler R E, Xu H, O' Hair D P, et al. Newborn discordant cardiac xenotransplantation in primates: a model of natural antibody deletion. *Transplant Proc*, 1996, 28: 651~ 652
- 8 Itescu S, Kwiatkowski P, Artrip J H, et al. Role of natural killer cells, macrophages, and accessory molecule interactions in the rejection of pig-to-primate xenografts beyond the hyperacute period. *Human Immunol*, 1998, 59: 275~ 286
- 9 Batten P, Yacoub M H, Rose M L. Effect of human cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4) on porcine endothelial cells: induction of MHC and adhesion molecules and functional significance of these changes. *Immunology*, 1996, 87: 127~ 133
- 10 Kwiatkowski P, Artrip J H, Ankersmit J, et al. Importance of CD49d-VCAM interactions in human monocyte adhesion to porcine endothelium. *Xenotransplantation*, 1998, 5: 67~ 74

(1999-04-09 收稿, 1999-07-12 收修改稿)