

pan-T lymphocyte Wu71. The immunoliposomes is pH-sensitive, it is stable in pH7.0~8.0 but easy to release its contents in the slightly acidic environment of target cell plasma, below pH6.0. Treatment of the human T-leukemic cell line CEM with these immunoliposomes and using scanning electron mi-

croscopy to observe its dynamic killing action. The result shows that it was highly target-sensitive to the target cells while little cytotoxicity to the human non-target cells.

Key words immunoliposome, scanning electron microscopy, CT, leukemic cells

磷脂酶A₂激活对中性粒细胞趋化和粘附的作用*

颜光涛 郝秀华 李振甲

(解放军总医院基础医学研究所, 北京 100853)

摘要 外源性磷脂酶 A₂ (I 型 PLA₂) 和钙离子载体 (A23187) 可明显促进中性粒细胞对 TNF, FMLP 的趋化及同玻璃球的粘附. PLA₂ 抑制剂二溴苯乙酮 (PBPB) 和 PLA₂ 抗体对 PLA₂ 诱发的趋化和粘附具有浓度相关的抑制作用, 而对 A23187 的相同作用并无影响. 提示 PBPB 和 PLA₂ 抗体可能通过直接同 PLA₂ 作用而抑制 PMN 趋化和粘附, A23187 诱导的促趋化及粘附作用可能不同于 PLA₂.

关键词 磷脂酶 A₂, 中性粒细胞, 趋化, 粘附

磷脂酶 A₂ (PLA₂) 于创伤、失血性休克后明显激活, 伴有细胞功能不同程度的损伤^[1]. 究其原因, 中性粒细胞 (PMN) 在创伤后感染及缺血再灌注过程中的损伤作用同 PLA₂ 激活密切相关^[2]. 研究表明 PMN 可合成、贮存及分泌各类 PLA₂, 参加自身功能调节^[3]. 因此, 我们拟探讨 I 型 PLA₂ 和 A23187 对 PMN 趋化粘附的影响, 以期进一步说明 PLA₂ 激活对机体损伤的机理.

1 材料和方法

1.1 试剂

人重组 TNF (军事医学科学院基础医学研究所), 猪胰 PLA₂、A23187、PBPB 和 FMLP 均为 Sigma 产品. PLA₂ 抗体由本室制备.

1.2 提取 PMN

采用 250 g Wistar 大鼠肝素抗凝血, 按文献 [4] 分离 PMN, 台盼蓝染色显示活细胞达 95% 以上.

1.3 实验分组

提取的 PMN 分为 PLA₂、PLA₂+PBPB、PLA₂+PLA₂ 抗体; A23187、A23187+PBPB、A23187+PLA₂ 抗体等不同处理组. 分别置于 24 孔板, 经 37℃ 培养 60 min, 分别测定 PMN 趋化及粘附效应.

1.4 PMN 趋化

取各组处理的 PMN 10 μ l (大约 10 000 个细胞), 按文献 [5] 所述测定 PMN 在琼脂糖中向 TNF 或 FMLP 趋化的变化.

1.5 PMN 粘附

制备装填直径 2 mm 玻璃球的粘附柱, 将不同处理的 PMN (10^7 个细胞) 过柱, 计数流出液中 PMN 的数目, 比较 PMN 粘附的变化^[6].

* 总后勤部“八五”攻关课题.

收稿日期: 1994-11-27, 修回日期: 1995-01-24

2 结果和讨论

2.1 PLA2 抑制剂和抗体可抑制 PLA2 诱导的 PMN 趋化

在相同条件下, 我们比较了外源性 PLA2

和钙离子载体 A23187 对 PMN 向 FMLP 趋化的影响, 同时测定不同浓度 PBPB 和 PLA2 抗体对上述趋化反应的抑制作用, 目的为证明 PLA2 对 PMN 趋化的促进作用。

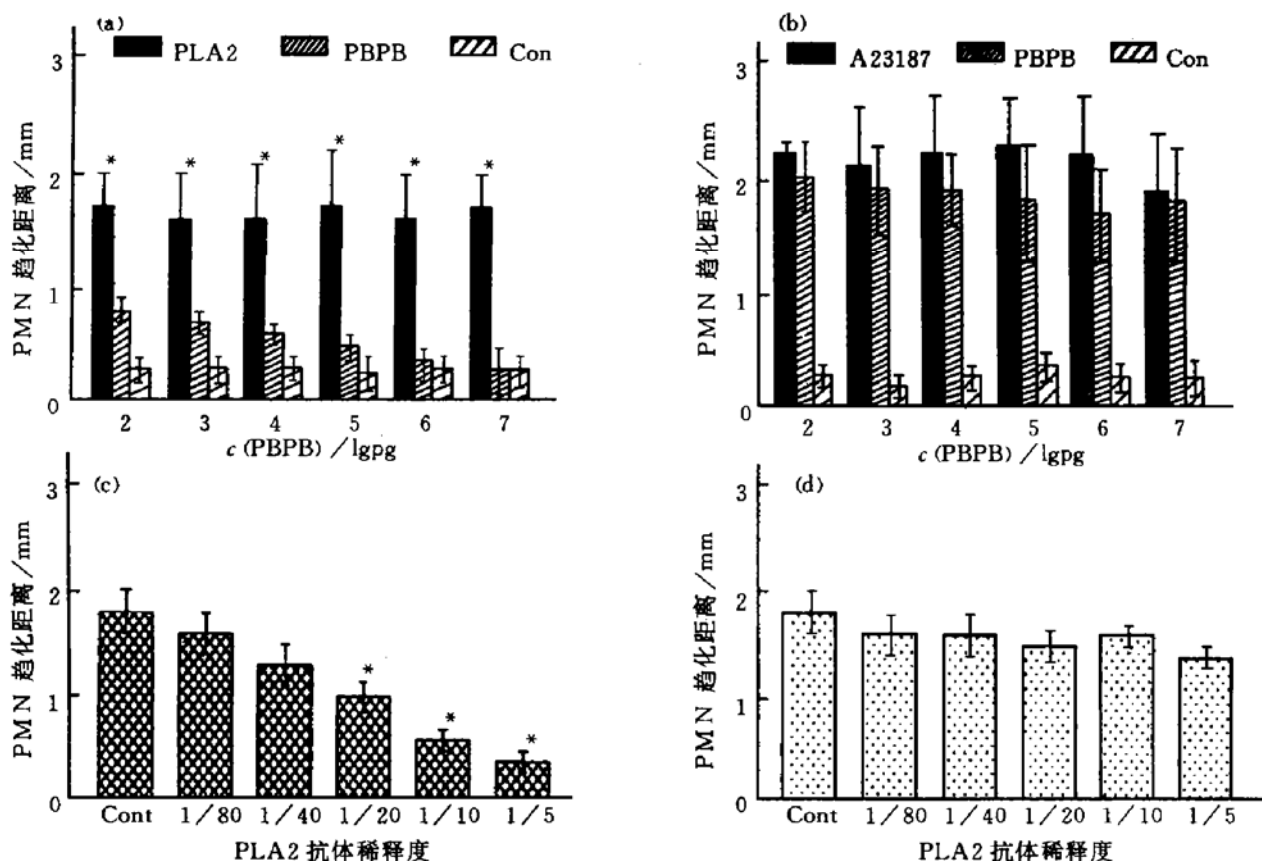


图 1 PLA2 抑制剂和抗体对 PMN 趋化的影响

(a)PBPB 对 A23187 诱导之 PMN 趋化的影响; (b)PBPB 对 PLA2 诱导之 PMN 趋化的影响; (c)PLA2 抗体对 PLA2 诱导之 PMN 粘附的影响; (d)PLA2 抗体对 A23187 诱导之 PMN 粘附的影响。

图 1 结果表明 PMN 受 PLA2 和 A23187 作用 1 h 后对 TNF 和 FMLP 趋化明显增强, 同对照比较差异非常显著 ($P < 0.01$). PLA2 抑制剂 PBPB 和 PLA2 抗体使用后 PLA2 诱导的 PMN 趋化明显抑制, 显示剂量依赖性. 但相同条件下 A23187 诱导的 PMN 趋化并不受影响。

PLA2 激活同膜磷脂动员、释放花生四烯酸类代谢产物密切相关, 在炎症损伤中发挥重要作用. 文献多报道 II 型 PLA2 是炎症反应中的主要成分, 而分子量相同结构不同的 I 型 PLA2 则主要由胰腺分泌进入消化道, 仅有急

性胰腺炎, 腹膜炎或腹外伤胰腺破坏时血中 I 型 PLA2 可剧烈增高, 直接作用于肺泡内皮和心血管内皮细胞, 影响肺泡通气和微循环, 可能是急性坏死性胰腺炎时易发呼吸衰竭的原因之一^[7]. 本结果发现 I 型 PLA2 可直接诱导 PMN 趋化, 从而可能为此型 PLA 导致炎症损伤的新途径. PLA2 抗体及其抑制剂阻断 PLA2 诱导的趋化, 也证明上述发现; 并提示通过使用 PLA2 抗体或抑制剂减轻炎症损伤的可能性. 由于 PLA2 活性依赖钙离子的存在, 而 A23187 是一种胞内外钙离子载体, 可显著提高胞内钙离子浓度, 因此, 我们发现 A23187 可

促进 PMN 趋化, 且不为 PBPB 和 PLA2 抗体所影响, 同现有研究的结果是一致的, 提示 I 型 PLA2 和胞内 PLA2 对 PMN 的激活途径是不同的。

2.2 PLA2 抑制剂和抗体抑制 PLA2 诱导的粘附

趋化和粘附均为 PMN 在炎症中的重要反应, PMN 消灭外来异物同时又造成自身组织损伤。体外 PMN 对玻璃珠粘附活性的改变可部分代表体内同内皮细胞的粘附作用。因此, 我们比较测定了 A23187 和 PLA2 处理 PMN 60 min 后粘附性的改变, 以及相同条件下 PBPB 和 PLA2 抗体对其的影响, 以期进一步证明 PLA2 在 PMN 功能调节中的作用。

图 2、3 结果表明在处理 PMN 60 min 后, PLA2 和 A23187 体外均显示明显促粘附作用,

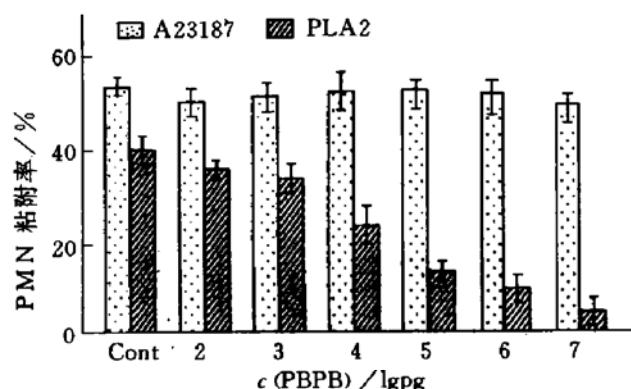


图 2 PLA2 抑制剂对 PLA2 和 A23187 诱导之 PMN 粘附的影响

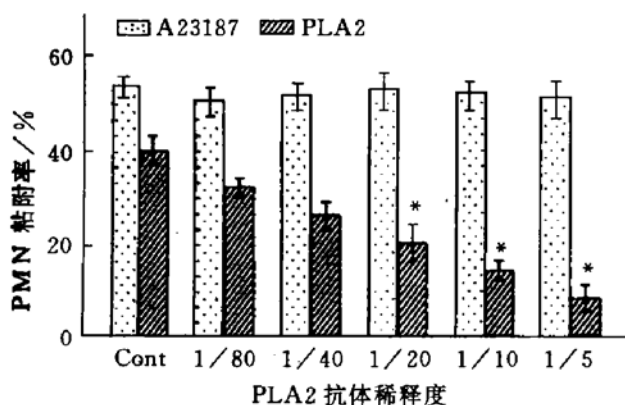


图 3 PLA2 抗体对 PLA2 和 A23187 诱导之 PMN 粘附的影响

20 ng PLA2 和 100 nmol A23187 可明显提高 PMN 对玻璃珠的粘附率, 未处理之 PMN 在相同条件下粘附率为 20% 左右。PBPB 和 PLA2 抗体分别使用时对 PLA2 的促粘附效应产生剂量相关的抑制, 当 PBPB 为 1 μ mol, 抗体稀释度为 1/20 以上时, 同对照产生明显差异 ($P < 0.01$)。但相同浓度的 PBPB 和抗体对 A23187 的作用没有影响。用 1/5 兔血清作阴性对照, PMN 的体外趋化和粘附活性不受其明显影响; 对 PLA2 诱导的 PMN 趋化和粘附也没有明显影响, 说明 PLA2 抗体特异针对外源性 PLA2。该结果提示外源性 I 型磷脂酶 A2 可直接促进 PMN 粘附, A23187 促粘附可能同内源性 PLA2 激活有关。

PMN 粘附同样是炎症的必要步骤, 已有研究表明 A23187 诱导 PMN 释放花生四烯酸 (AA), 同时表达多量粘附蛋白。此过程中, AA 的代谢产物血小板激活因子 (PAF) 是一种重要的信号分子。PLA2 抑制剂可阻断 PAF 合成而抑制 PMN 粘附分子的表达^[8]。我们的结果同上述结论基本一致。初步发现 PLA2、A23187 以及 AA 均能促进 PMN 释放 TXB2 (另发表), 后者是 AA 经过环氧化物酶作用的产物。

PBPB 是一种选择性 PLA2 抑制剂, 它可能同妨碍 PLA2 与磷脂底物形成复合物或直接干扰 PLA2 活性中心的形成而抑制 PLA2 活性^[9]。因此, PBPB 同 PLA2 抗体一样, 仅对抗 PLA2 对 PMN 的促粘附作用, 而对 A23187 无效。

尽管我们没有直接测定 PLA2 和 A23187 可以促进 PMN 释放 AA, 但如能测定 AA 在体外对 PMN 的作用相似于 PLA2 或 A23187, 也能部分证明 AA 在 PMN 激活中的作用。本实验还显示 AA 可以直接促进 PMN 的趋化和粘附 (另文), 提示 PLA2 或 A23187 可能通过激发 PMN 释放 AA 而促进趋化粘附。

综上所述, I 型 PLA2 和 A23187 一样, 能在体外促进 PMN 的趋化和粘附, 前者可为 PBPB 和 PLA2 特异抗体阻断, 推断两者调节 PMN 活性的机理, 可能是水解膜磷脂释放

AA, AA 进一步转化为 PAF 或 TXB₂ 等, 成为 PMN 激活的信号分子, 最终表现为 PMN 趋化和粘附活性的增强。

参 考 文 献

- 1 颜光涛, 于 勇, 付小兵等. 中国应用生理学报, 1992; 8 (2): 184
- 2 Anderson B O, Moore E E, Banerjee A. J Surg Res, 1994; 56: 199
- 3 Forehand J R, Johnston R B, Bomalaski J S. J Immunol, 1993; 151 (9): 4918
- 4 Duane M S, Waite M. J Leuk Biol, 1992; 52: 670
- 5 Nelson R D, Oyie P G, Simmons R L. J Immunol, 1975; 115: 1650
- 6 Lorente D A. J Immunol Meth, 1978; 19: 47
- 7 Kishino J, Ohara O, Nomura K. J Biol Chem, 1994; 269 (7): 5092
- 8 Jacobson P B, Schrier D J. J Immunol, 1993; 151 (10): 5639
- 9 Vernon L P, Bell J D. Pharmac Ther, 1992; 54: 269

Regulation Role of Phospholipase A₂ Activation on Polymorphonuclear Neutrophil Chemotaxis and Adherence. Yan Guangtao, Hao Xiu hua, Li Zhenjia (*Clinical Basic Institute of*

medicine, Great Wall Hospital, Beijing 100853, China).

Abstract The experimental results show that chemotaxis and adherence of polymorphonuclear neutrophil (PMN) are promoted obviously by exogenous phospholipase A₂ and calcium ionophore (A23187). Furthermore, for the PLA₂ inhibitor p-bromophenacyl bromide (PBPB) and the PLA₂ antibody, the inhibitory effect on PLA₂-induced PMN chemotaxis and adherence is concentration dependent but they have no effect on A23187-induced PMN chemotaxis and adherence. This result indicates that PLA₂ induced chemotaxis and adherence of PMN may be inhibited by direct interaction between PLA₂ and PBPB or PLA₂ antibody. A23187 induced PMN chemotaxis and adherence is different from that induced by PLA₂.

Key words phospholipase A₂, neutrophil, chemotaxis, adherence

人白细胞介素-2 的两个部分拮抗剂*

王志勇 郑仲承 孙兰英 刘新垣

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 通过定点诱变技术得到 6 个生物活性剧烈下降的人白细胞介素-2 (IL-2) 突变体, 其中两个突变体即 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 可以在一定浓度范围内使 IL-2 的生物效应降低。在对高亲和力 IL-2 受体 (IL-2R) 的竞争抑制实验中, 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 又表现了一定的竞争能力。这些结果表明 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 可部分拮抗天然 IL-2 的作用。结合 IL-2 二级结构分析及对 IL-2 与 IL-2R 相互作用的已有认识, 可认为 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 的部分拮抗作用产生的原因在于替换残基在空间上对 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ 亚基结合微环境的轻微扰动, 干扰了 IL-2 有关残基与 IL-2R $\beta\gamma$ 亚基的结合, 但尚不能完全阻止其与 IL-2R $\beta\gamma$ 亚基的结合。

关键词 白细胞介素-2 (IL-2), 白细胞介素-2 受体 (IL-2R), 定点诱变, 拮抗剂, 结构-功能