

# 人 NK 细胞对猪/人血管内皮细胞的差异粘附\*

冯志民 张晓峰 丰美福\*\*

(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)

**摘要** 采用<sup>51</sup>Cr 标记法和<sup>3</sup>H TdR 摄入量研究了人外周血 NK 细胞 (PBNK) 和人 NK 细胞系——NK92 对猪主动脉内皮细胞 (PAEC) 和人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的粘附作用。结果表明, NK92 和 PBNK 对 PAEC 的粘附率显著高于对 HUVEC 的粘附率; rhTNF- 预刺激 PAEC/HUVEC 后, PBNK 的粘附率呈现 TNF- 剂量依赖性的增高; rhIFN- 预刺激 NK92/PBNK 后, 两者对 PAEC 粘附率的增幅均高于对 HUVEC 的增幅; CD11a (LFA-1) 单抗可以不同程度地抑制 PBNK 对静息和 TNF- 激活的 PAEC 的粘附作用。这些结果提示, NK 细胞在细胞介导的异种移植排斥反应中起重要作用。

**关键词** 人 猪 PAEC HUVEC PBNK NK92 粘附作用

迄今为止, 器官移植术已经挽救了无数人的生命, 但人供体器官的严重缺乏却限制了人供体器官的进一步发展。因此, 异种器官移植作为解决人供体器官严重缺乏的可能途径受到了广泛的重视。猪器官由于在大小、解剖学特点和生理特征等方面与人器官极为相似, 且易于大量养殖而成为异种器官移植的首选对象。由于转基因猪和基因敲除术的应用, 目前已基本能克服由宿主体内预存的天然抗体所引发的超急性排斥反应 (hyper acute rejection, HAR)。而对于由免疫细胞介导的延缓性异种排斥反应 (delayed xenograft rejection, DXR), 虽然取得了一定进展, 但仍存在大量未知因素。在豚鼠对大鼠的心脏移植模型中, 发现大量宿主 NK 和 Monocytes 的浸润 (Blakely *et al.*, 1994)。在细胞介导的免疫反应中, 粘附是免疫细胞识别、发挥功能的第一步, 也是最重要的一步。血管内皮是移植器官与宿主免疫细胞之间的第一道天然屏障, 因此, NK 细胞与内皮细胞的粘附作用决定了 NK 细胞的活化及杀伤功能的发挥。本文研究了人 NK 细胞与猪和人血管内皮细胞的差异粘附, 从而在细胞水平上揭示了 NK 细胞对异种移植细胞性排斥反应的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

rhTNF- (R & D Systems 公司)、rhIFN- (德

国 B. M. 公司)、Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub><sup>3-</sup>、<sup>3</sup>H TdR (英国 Amersham 公司)、MACS CD56 正选磁珠 (德国 Miltenyi Biotec 公司) 和抗人 CD11a 单抗 (H111) 及同型对照抗体 (IgG1) (Pharmingen 公司)。

### 1.2 内皮细胞的分离与培养

参照 Jaffe 等 (1973) 的方法, 取新鲜猪主动脉及人脐带, PBS 冲洗, 0.1% 胶原酶消化, 获取细胞后以 M199 培养, 其中含 15% FBS, 50 μg/ml ECGF, 100 μg/ml 肝素, 1 × 10<sup>-5</sup> mol/L 脱氧胸苷, 青、链霉素各 100 μ/ml, 胰蛋白酶消化传代。经形态学观察及因子相关抗原免疫组化鉴定, 均未发现混杂细胞。选用 4~10 代的内皮细胞用于本研究。

### 1.3 NK 细胞的获得

NK92 细胞系购自加拿大 Immue Medicine Inc., 由 Klingemann 等 (1994) 建系, 表型为 CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>, 为活化的人 NK 细胞。以 RPMI1640 培养, 含 15% FBS, 300 U/ml rhIL-2。

人外周血 NK 细胞 (PBNK) 分离自新鲜外周血浓缩白细胞 (北京市红十字中心血站)。首先以 Ficoll 常规分离单个核细胞, 贴壁去单核细胞, 再按 MACS 公司提供的操作流程, 以 CD56 正选磁珠分离 PBNK, 经 FACS Calibur (B. D. 公司) 鉴定, NK 细胞 (CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>) 纯度在 90% 以上。在某些实验中, NK92 和 PBNK 以 100 U/ml hIFN- 预刺激 24 h。

1999-06-15 收稿, 1999-11-08 修回

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39770700)

\*\* 通讯作者

第一作者简介 冯志民, 男, 35 岁, 博士研究生。研究方向: 异种移植免疫以及细胞免疫。

## 1.4 NK细胞的标记

按 Mackay 等 (1993) 的方法标记 NK92, 略有改进, NK92 悬浮于含 10% FBS 的 1640 培养液中, 加入适量  $^3\text{H}$ -TdR, 37 标记 2 h; 按 Chuluyan 等 (1993) 的方法标记 PBNK, 略有改变, 在含 5% 去除血小板的自体血浆的 RPMI1640 中, 以适量  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  37 标记 PBNK 1 h, 标记完毕后, 用 1640 培养液充分洗涤、备用。

## 1.5 粘附测定

PAEC/HUVEC 分别在预先铺有 2% 明胶的 96 孔板中生长至汇合。以不同浓度的 rhTNF- 刺激内皮细胞 24 h, 用 37 预热的 1640 培养液浸洗 3 次, 分别按效靶比 3:1 和 10:1 加入  $^3\text{H}$ -TdR 标记的 NK92 或  $^{51}\text{Cr}$  标记的 PBNK, 37 5%  $\text{CO}_2$  共培养 1 h。用预热 1640 洗去未粘附的 NK 细胞。以 0.25% 胰蛋白酶消化粘附的 NK92, 用 2.5% Triton X-100 裂解粘附的 PBNK。分别用液闪仪和  $\beta$ -计数仪测定  $^3\text{H}$ -TdR 的摄入量和  $^{51}\text{Cr}$  标记量, 按下列公式计算粘附率:

$$\text{NK92 粘附率 \%} = \frac{\text{实验组 } ^3\text{H-TdR 的 DPM}}{\text{总摄入 } ^3\text{H-TdR 的 DPM}} \times 100 \%$$

$$\text{PBNK 粘附率 \%} = \frac{\text{实验组 } ^{51}\text{Cr 的 CPM}}{\text{总标记 } ^{51}\text{Cr 的 CPM}} \times 100 \%$$

## 1.6 抗体阻断

在含 2 mmol/L EDTA 和 0.5% HSA 人血清白蛋白的 PBS 中以饱和浓度的抗人 CD11a 单抗 (H111) 及同型对照 IgG1 分别于 37 孵育 PBNK 30 min, 充分洗涤后用于粘附测定。

## 1.7 统计

本文采用 *t*-检验进行统计处理。

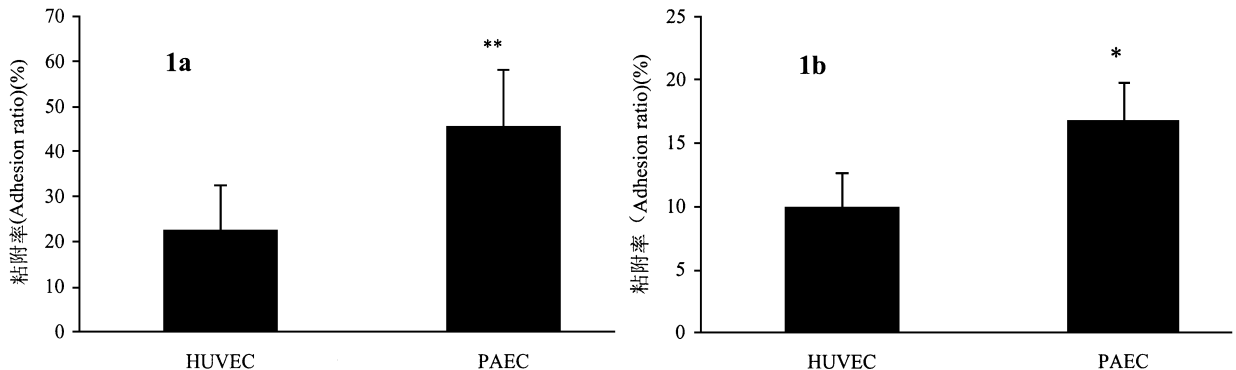


图 1 人 NK 细胞对 PAEC/HUVEC 的粘附作用

Fig. 1 Adhesion of human NK cells to PAEC/HUVEC

1a.  $^3\text{H}$ -TdR 标记 NK92,  $n=6$ , E/T 为 3/1 (NK92,  $n=6$ , NK92 was labeled with  $^3\text{H}$ -TdR, E/T ratio was 3/1)

1b.  $^{51}\text{Cr}$  标记 PBNK,  $n=4$ , E/T 为 10/1 (PBNK,  $n=4$ , PBNK was labeled with  $^{51}\text{Cr}$ , E/T ratio was 10/1)

每次实验 4 个复孔 (The wells were arranged in quadruplicates)

## 2 结果

### 2.1 PBNK 和 NK92 对 PAEC/HUVEC 的粘附

NK92 和 PBNK 对 PAEC 的粘附率显著高于对 HUVEC 的粘附率 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.02$ , *t*-检验, 下同) (图 1: a, b)。由于 NK92 是活化的 NK 细胞, 无论对 PAEC 还是 HUVEC, 其粘附率均高于 PBNK 相应的粘附率 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 rhTNF- 对 PBNK 和 NK92 粘附作用的影响

在较低浓度的 rhTNF- (1~5 ng/ml) 预刺激下, NK92 和 PBNK 对 HUVEC 的粘附率呈 TNF- 剂量依赖性上升, 在 TNF- 3 ng/ml 时, 它们的粘附率达到峰值, 分别是对照的 1.86 倍 ( $P < 0.05$ ) 和 2.15 倍 ( $P < 0.02$ ) (表 1)。在较高浓度 rhTNF- (2.5~20 ng/ml) 预刺激下, NK92 对 PAEC 的粘附率虽然有增加的趋势, 但同对照相比均没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。而 PBNK 对 PAEC 的粘附率呈现 TNF- 剂量依赖性增长, 在 TNF- 10 ng/ml 时, 其粘附率达到峰值, 是对照的 1.72 倍 ( $P < 0.02$ ) (表 2)。

### 2.3 IFN- 对 NK92/PBNK 粘附作用的影响

NK92 经 100 U/ml rhIFN- 预刺激 24 h 后, 对 HUVEC 和 PAEC 的粘附率均显著上升, 分别是对照的 1.45 倍 ( $P < 0.05$ ) 和 1.66 倍 ( $P < 0.01$ )。PBNK 经同样浓度的 rhIFN- 预刺激 24 h 后, 对 HUVEC 和 PAEC 粘附率的升高更加显著, 分别是对照的 2.45 倍 ( $P < 0.02$ ) 和 3.12 倍 ( $P < 0.002$ ) (图 2: a, b)。

### 2.4 LFA-1 在 NK 细胞粘附中的作用

PBNK 经饱和浓度的 CD11a 孵育后, 对静息

表 1 NK92/ PBNK对 HUVEC的粘附

Table 1 The adhesion of NK92/ PBNK to HUVEC

rhTNF <sup>-</sup> (ng/ ml)	0	1	2	3	4	5
NK92 粘附率 (%) (NK92 adhesion ratio)	20.6 ±9.9	26.4 ±11.5	30.6 ±12.6	38.4 ±10.1	36.9 ±11.7	38.0 ±10.6
PBNK 粘附率 (%) (PBNK92 adhesion ratio)	9.4 ±2.4	16.0 ±2.5	19.8 ±2.9	20.2 ±3.2	20.1 ±3.7	19.6 ±3.5

注 (Notes): 表中数据为平均值 ±SD; HUVEC 用 rhTNF<sup>-</sup> (0~5 ng/ml) 预刺激 24 h (NK92: n=5; PBNK: n=4; 每次 3 个复孔)  
[ The data in the table was expressed as mean ±SD. HUVEC was prestimulated with rhTNF<sup>-</sup> (0~5ng/ml) for 24 h (NK92: n=5; PBNK: n=4; In triplicates) ]

表 2 NK92/ PBNK对 PAEC的粘附

Table 2 The adhesion of NK92/ PBNK to PAEC

rhTNF <sup>-</sup> (ng/ ml)	0	2.5	5	10	15	20
NK92 粘附率 (%) (NK92 adhesion ratio)	45.1 ±10.5	50.2 ±13.2	53.3 ±9.6	56.0 ±11.4	55.7 ±12.3	56.6 ±14.2
PBNK 粘附率 (%) (PBNK92 adhesion ratio)	15.8 ±3.0	18.7 ±4.2	23.3 ±5.1	27.2 ±5.5	27.3 ±6.1	26.8 ±4.9

注 (Notes): 表中数据为平均值 ±SD; PAEC 用 rhTNF<sup>-</sup> (0~20 ng/ml) 预刺激 24 h (NK92: n=5; PBNK: n=4; 每次 3 个复孔)  
[ The data in the table was mean ±SD. PAEC was prestimulated with rhTNF<sup>-</sup> (0~20 ng/ml) for 24 h (NK92: n=5; PBNK: n=4; In triplicates) ]

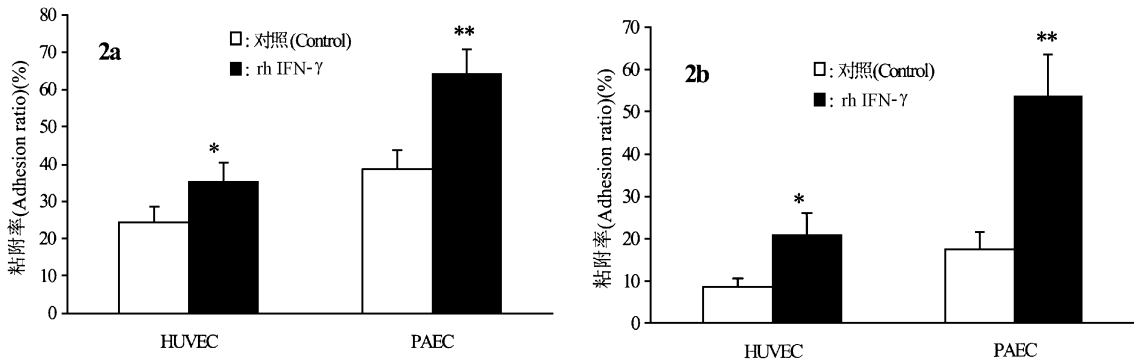


图 2 IFN<sup>-</sup> 对 NK92/ PBNK粘附作用的影响

Fig. 2 The effect of IFN<sup>-</sup> on the adhesion of NK92/ PBNK

2a. NK92 2b. PBNK

n=3 每次 3 个复孔 (In triplicates)

HUVEC 和 TNF<sup>-</sup> 激活的 HUVEC 粘附率均显著下降, 分别抑制了 22.1% ( $P < 0.05$ ) 和 57.9% ( $P < 0.002$ ) 图 3: a。

同样, PBNK 经 CD11a 孵育后, 对静息 PAEC 和 TNF<sup>-</sup> 激活的 PAEC 粘附率也呈显著下降, 分别抑制了 38.6% ( $P < 0.05$ ) 和 25.0% ( $P < 0.05$ ) 图 3: b。

### 3 讨 论

在细胞介导的免疫反应中, 粘附是细胞间相互

识别的第一步, NK 细胞对内皮细胞粘附能力的强弱关系到内皮的完整性和损伤程度 (Malyguine *et al.*, 1996)。本实验研究表明两类 NK 细胞对 PAEC 的粘附能力均显著高于对 HUVEC 的粘附能力, 这表明 NK 细胞在异种免疫排斥应答中可能起着更为重要的作用。细胞间粘附能力的大小取决于两种细胞的活性状态。本研究表明无论 hTNF<sup>-</sup> 作用于 HUVEC 还是 PAEC, 均可使 PBNK 的粘附率显著升高。虽然对前者的效用高于后者, 但这一结果提示 hTNF<sup>-</sup> 又可以跨越种属障碍, 激活猪内皮

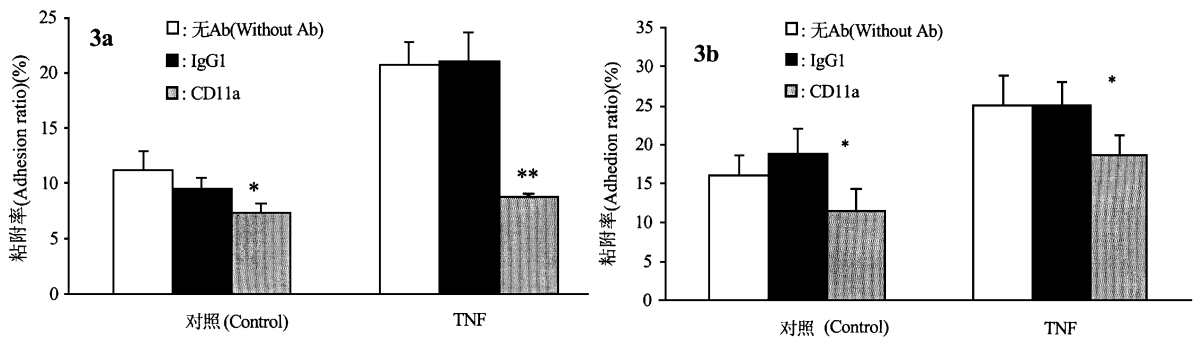


图3 LFA-1 在 PBNK 与 HUVEC/PAEC 粘附中的作用

Fig. 3 The effect of LFA-1 on the adhesion of PBNK to HUVEC/PAEC

3a. HUVEC, TNF<sup>-</sup> : 2.5 ng/ml, n = 3

3b. PAEC, TNF<sup>-</sup> : 10 ng/ml, n = 3

前 3 列为对照, 后 3 列是经 TNF<sup>-</sup> 预刺激的内皮细胞 (n = 3) (The first three lanes were controls, while the last three lanes represented the EC stimulated with TNF<sup>-</sup>)

细胞。hTNF<sup>-</sup> 的这一作用国外亦有类似报道 (Batten *et al.*, 1996)。就 NK92 细胞而言, 由于 NK92 细胞是活化的 NK 细胞, 对于静息的 PAEC 粘附能力极高, 所以 hTNF<sup>-</sup> 刺激 PAEC 后粘附 NK92 的增势就不显著。

IFN<sup>-</sup> 可由 T 细胞 NK 细胞产生, 并可进一步作用于 NK 细胞, 提高其功能活性。本研究表明, IFN<sup>-</sup> 刺激两类 NK 细胞后, 它们对 PAEC 的粘附能力均大幅度地提高了, 并均高于对 HUVEC 的增幅, 这进一步提示 NK 细胞在异种识别中有着重要作用。

LFA-1 (CD11a, CD18) 是白细胞粘附中至关重要的粘附分子, 它同内皮细胞的相应配体——ICAM-1 配合, 在白细胞与内皮细胞的紧密结合中起重要作用。本研究表明抗人 CD11a 单抗均可以一定程度地抑制 PBNK 对静息 HUVEC 和静息 PAEC 的粘附。这表明 LFA-1 具有种间交叉活性,

可介导 NK 细胞的异种粘附。当 HUVEC 和 PAEC 经 TNF<sup>-</sup> 激活后, CD11a 极大地抑制了 PBNK 对 HUVEC 的粘附, 抑制率由 22.1% 提高至 57.9%。而对 PAEC 粘附的抑制程度下降, 抑制率由 38.6% 降为 25.0%, 这提示 PAEC 经 TNF<sup>-</sup> 刺激后, 其它粘附分子的表达可以上调, 从而掩盖了 LFA-1 和 ICAM-1 这一对分子的作用; 而对 HUVEC 而言, ICAM-1 在静息状态表达较低, TNF<sup>-</sup> 刺激后, ICAM-1 的表达上调, 所以 LFA-1 介导的粘附起到了更重要的作用, 也就导致了抑制率的提高。

通过 PAEC 和 HUVEC 的对比研究, 本文揭示了 NK 细胞在异种排斥中的重要性, 为临床实践提供了必要的靶点。

致谢 北京市红十字中心血站在本研究中提供了大力协助, 在此表示感谢!

### 参 考 文 献 (References)

- Batten, P., M. H. Yacovb and M. L. Rose 1996 Effect of human cytokines (IFN<sup>-</sup>, TNF<sup>-</sup>, IL-1, IL-4) on porcine endothelial cells: induction of MHC and adhesion molecules and functional significance of these changes. *Immunology* **87**: 127 ~ 133.
- Blakely, M. L., W. J. Van Der Werf and M. C. Berndt 1994 Activation of intragraft endothelial & mononuclear cells during discordant xenograft rejection. *Transplantation* **58**: 1 059 ~ 1 066.
- Chuluyan, H. E. and A. C. Issekutz 1993 VLA-4 integrin can mediate CD11/CD18-independent transendothelial migration of human monocytes. *J. Clin. Invest.* **192**: 2 768 ~ 2 777.
- Gong, J. H., G. Maki and H. G. Klingemann 1994 Characterization of a human cell line (NK92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* **8**: 625 ~ 658.
- Jaffe, E. A., R. L. Nachman, C. G. Becker and R. Minick 1973 Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.* **52**: 2 745 ~ 2 756.

- Mackay, F., H. Loetscher and D. Stueber 1993 TNF $\alpha$ -induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type TNFR55. *J. Exp Med.* **177**: 1 277 ~ 1 286.
- Malyguine, A. M., S. Saadi, J. L. Platt and J. R. Dawson 1996 Human natural killer cells induce morphological changes in porcine endothelial cell monolayers. *Transplantation* **15**: 161 ~ 164.

### 外 文 摘 要 (Abstract)

## DIFFERENTIAL ADHESION OF HUMAN NK CELLS TO PORCINE/ HUMAN VESSEL ENDOTHELIAL CELLS\*

FENG Zhi-Min ZHANG Xiao-Feng FENG Mei-Fu\*\*

(State Key Lab. of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology,  
The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

The accumulated evidences demonstrate that natural killer (NK) cells may play an important role in the immune cell mediated xenograft rejection. The adherent recognition of xenograft by NK cells is the first and most important step, which NK cells may perform in the exograft rejection. Endothelium is the first natural barrier between exograft and host immune cells. So the study on adhesion between NK cells and endothelial cells is very important for preventing the exograft rejection.

Using  $^{51}\text{Cr}$  labelling and  $^3\text{H}$ -TdR uptake, we studied the adhesions of human peripheral blood NK cells (PBNK) and human NK cell line—NK92 to porcine aortic endothelial cells (PAEC) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The results indicated that the adhesion ratios of NK92 and PBNK to PAEC were markedly higher than those to HUVEC. The adhesion ratios of PBNK showed that the hTNF $\alpha$ -dose-dependent increase after PAEC/HUVEC were pretreated with hTNF $\alpha$ . The increases in adhesion ratios of NK92/PBNK prestimulated with hIFN $\gamma$  to PAEC were significantly higher than those to HUVEC. Blocking with anti-CD11a mAb could differentially inhibit the adhesion of PBNK to resting and TNF $\alpha$  stimulated PAEC. The results suggested that NK cells play an important role in the cell mediated xenograft rejection, LFA-1 have the adherent activities across species and proinflammatory cytokines rhTNF $\alpha$  and could also activate PACE and HUVAE cells and exacerbate the exograft rejection.

**Key words** Human, Porcine, PAEC, HUVEC, PBNK, NK92, Adhesion

\* This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 39770700)

\*\* Corresponding author