氢化可的松抑制人中性粒细胞与滑膜细胞粘附机理研究

李良成, 侯 琦, 郭 颖, 程桂芳*

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所,北京 100050)

摘要: 目的 研究氢化可的松对正常人中性粒细胞(PMN)与滑膜细胞(HSC)粘附的作用及其机理。方法 MTT 比色法检测 PMN 与 HSC 的粘附,Cell-ELISA 和 RT-PCR 法检测 HSC 粘附分子的表达,EMSA 研究核转录因子 NF-κB 的活化。结果 氢化可的松可显著抑制 50 U·mL^{-1} rhTNF-α 与 IL-1β 刺激的 HSC 与 PMN 的粘附;显著抑制 HSC 表面 VCAM-1 的表达及 VCAM-1 mRNA 表达,但对 ICAM-1 mRNA 的表达无显著影响;同时对 TNF-α 诱导的 NF-κB 活化有显著抑制作用。结论 氢化可的松显著抑制 PMN 与 HSC 的粘附,其作用机理可能是通过抑制 NF-κB 的活化,进而抑制滑膜细胞中 VCAM-1 mRNA 及蛋白表达而实现的。

关键词: 氢化可的松; 人滑膜细胞; 中性粒细胞; 粘附; 核因子 κB(NF-κB)

中图分类号: R977.2; R967 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2001)06-0401-06

类风湿性关节炎(RA)是严重危害人类健康的顽症之一。对 RA 发病机理的认识尚处于进展中,近年来研究发现 RA 病人关节腔内有多种炎性细胞因子,如 IL-1,IL-8,TNF-α 等[1],它们可刺激人骨膜细胞(human synovial cell, HSC)增殖,并表达多种粘附分子,如 ICAM-1, VCAM-1 等[2,3]。同时 RA 病人关节腔内有大量粒细胞和巨噬细胞的浸润,这些粒细胞表面有粘附分子的相应配基。因而我们推测 RA 关节腔内浸润的 PMN 与 HSC 的粘附作用对 RA 的病理进程有重要作用,为此我们建立了 PMN 与 TNF-α 和 IL-1β 诱导的正常大鼠膝关节滑膜细胞(RSC)粘附模型[4],本文在此基础上建立 PMN 与 HSC 的粘附模型,并通过分析传统的治疗 RA 的甾体类抗炎药氢化可的松的抗粘附作用及机理,为寻找治疗 RA 的药物作用靶点提供新思路。

材 料 和 方 法

药品和试剂 rhTNF-α, IL-1β(比活力 > 10^7 U·mL^{-1}) 邦定泰克生物技术公司产品; MTT, Trypsin, Collagenase type II, OPA(O-phenylenediamine) 及 BSA 均为 Sigma 公司产品;胎牛血清(FBS)为 Hyclon 公司产品; F-12 培养基(Gibco); CD54, CD106 鼠抗人单克隆抗体(Pharmingen);羊抗鼠-IGg-HRP(SABC); Poly(dI-dC), T4 激酶(T4 polynucleotide kinase)和 NF-κB 探针为 Pharmacia 公司产品;[γ-^{32}P-ATP]为北京亚辉公司产品; NF-κB 探针突变序列及 Pestle B 为美国宋新生教授惠赠; RT-PCR 引物序列用 Premier 3.0 软件设计后由上海生物工程有限公司合成,细胞内总 RNA 提取试剂盒为 BioDev 公司产品, RT-PCR 试剂盒为 Promega 公司产品;氢化可的松(hydrocortisone)由中国药品生物制品检定所提供。

仪器 RCO3000T-5VBA CO_2 培养箱(REVCO 公司产品),显微镜(重庆光学仪器厂),细胞培养瓶和 96 孔培养板(Costar 公司产品), Model 450 酶标仪(Bio-Rad 产品), PE-2400 RT-PCR 仪为 PE 公司产品。

健康志愿者 男性健康志愿者(年龄 20-23 岁)及正常人膝关节滑膜组织。

正常人关节滑膜细胞(HSC)的分离和培养[5,6] 取正常人膝关节滑膜组织,无菌条件下仔细分离出膝关节滑膜组织,并分离出滑膜层,用无钙、镁 Dulbecco 缓冲液洗涤滑膜组织,剪成 1-2 mm^3 小块。放入 25 cm^2 培养瓶内,同时加入 10% FBS-F-12 培养液 2 mL 和胶原酶(终浓度 0.4%) 2 mL,在 37 ℃ 5% CO_2 培养箱中消化 2 h。将未贴壁细胞移入离心管,离心(300 × g, 10 min),弃上清液,再加入 0.25% trypsin 4 mL,在 37 ℃ 5% CO_2 培养箱内消

收稿日期: 2000-09-17.

作者简介: 李良成,男,博士研究生;
程桂芳,女,研究员,博士生导师.
* 通讯作者 Tel:(010)63165192, Fax:(010)63017757,
E-mail:chenggf@imm.ac.cn

化 0.5 h。经 200 目不锈钢网过滤,离心(300 × g,10 min),计数,用 10 % FBS-F-12 培养液 4 mL 在 37 ℃ 5 % CO_2 培养箱内培养 24 h,弃去未粘附细胞,此时的贴壁细胞为原代 HSC,用台盼蓝拒斥实验检测细胞活力大于 95 %,原代细胞主要为巨噬细胞样细胞,继续培养约 7 d 后,用 0.25 % trypsin-0.02 % EDTA 消化使细胞游离,进行传代培养,选用 3 - 8 代 HSC 进行实验。

人外周血中性粒细胞(PMN)的分离[7] 健康志愿者静脉采血,用 3.8 %枸橼酸钠(10∶1)抗凝,上述血浆与溶液 I (5 %葡聚糖 T500 生理盐水) 5∶1 混匀,37 ℃ 5 % CO_2 培养箱内静置 60 min,室温下 400 × g 离心 45 min,弃上清液,沉淀用溶液 II(NaCl 0.84 g,枸橼酸钠 0.38 g,BSA 0.25 g,重蒸水 100 mL)洗一次,400 × g,离心 5 min,弃上清液,低渗液除红细胞(4 mL 0.05 % NaCl 与底部细胞混匀加入 4 mL 含 0.25 % BSA 的 1.75 % NaCl 溶液,400 × g,离心 5 min),用 10 % FBS-DMEM 悬浮粒细胞,计数,并用台盼蓝拒染法检测细胞活力大于 95 %。

人外周血 PMN 与人关节 HSC 粘附模型的建立[4] HSC 以 1.5×10^5 cell·mL^{-1} 0.2 mL 传入 96 孔细胞培养板。10 % FBS-F-12 培养基调 PMN 浓度为 2×10^6 cell·mL^{-1},以 4∶1 与 MTT(5 mg·mL^{-1})混匀,37 ℃ 5 % CO_2 培养箱内温孵 2 h,80 × g 离心 5 min,并用 2 % FBS-F-12 培养基洗 MTT 标记细胞一次,用 10 % FBS-F-12 培养基调细胞浓度为 2×10^6 cell·mL^{-1}。取上述 MTT 标记的 PMN 0.1 mL 加入预先长满、并用各种刺激剂激活的人 HSC 的 96 孔细胞培养板中,37 ℃ 5 % CO_2 温孵 30 min,用 2 % FBS-F-12 培养基 0.1 mL 洗板两次,吸干培养液,各孔内加入 DMSO 0.1 mL,震摇 10 min 后 540 nm 处测定吸光度。

Cell-ELISA 测定 HSC 表面粘附分子 ICAM-1 (CD54)和 VCAM-1 (CD106)蛋白表达[8] 参考 Philippe 等方法略做改进。接种 HSC 于 96 孔板,每孔 3×10^4 细胞,24 h 后换液一次,与 TNF-α 温孵 12 h 后,加入每孔 100 μL 丙酮固定 10 min,PBS 洗 3 次,5 min 后,加入 1∶500 稀释的鼠抗人 CD54 或 CD106 单抗 50 μL,37 ℃温孵 1 h,0.05 % Tween-20-PBS 洗 3 次,5 min 后,加入 1∶500 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IGg 50 μL,0.05 % Tween-20-PBS 洗 3 次,5 min 后,加入低物工作液(含 2 % OPD 的磷酸盐缓冲液) 50 μL,37 ℃温孵 20 min,然后加入 50 μL 2.25 mol·L^{-1} H_2SO_4 终止反应,490 nm 比色测定。吸光度可反应 HSC 表面粘附分子 CD54 或 CD106 蛋白水平。氢化可的松在 TNF-α 刺激前 30 min 加入。

HSC 中总 RNA 提取 按 BioDev 细胞内总 RNA 提取试剂盒说明书进行。即接种 HSC 于 6 孔板,每孔 1×10^6 细胞,24 h 后换液一次,与 TNF-α 温孵 6 h 后,将细胞收集,吹匀,转移至 1.5 mL Eppendorf 管中,4 ℃ 110 × g 离心 5 min,弃上清液。加入 Trizol 试剂 1 mL,用振荡器充分振荡混匀,加入氯仿 350 μL,充分振荡 10 s,稍静置后,随即于 4 ℃ 10 000 × g 离心 10 min。将上清液(水相)转移至另一个 1.5 mL Eppendof 离心管中(注意不要吸到中间层的蛋白沉淀)。加入等体积异丙醇混匀。- 20 ℃放置 1 h 后。4 ℃ 10 000 × g 离心 20 min。小心弃上清液,沉淀即所需要的总 RNA。加入 70 %乙醇 0.5 mL 洗涤一次,小心倾出乙醇,干燥。加入 DEPC 处理过的水 20 μL 溶解沉淀,- 70 ℃保存。

经甲醛变性凝胶电泳,紫外灯下观察可见 18 s 和 28 s 两条明亮的条带,其比值约为 1∶2,证明所制备的样品未降解,RNA 样品的完整性及操作的平行性。

反转录聚合酶链式反应(reverse tansription polymerase chain reation, RT-PRC) 按 Promega RT-PCR 试剂盒说明书进行,即将上述 RNA 模板 2 μL 加入到终体积为 25 μL 的反应体系中(AMV/Tfl: 5 × reation buffer 2.5 μL; dNTP 0.2 mmol·L^{-1}; Primer 1 μmol·L^{-1}; $MgSO_4$ 1 mmol·L^{-1}; AMV 反转录酶 0.5 u·μL^{-1}; Tfl DNA 合成酶 0.5 u·μL^{-1})。引物核苷酸序列为,ICAM-1: Sense 5′-GGC AGT CAA CAG CTA AAA CC-3′; antisense 5′-AGT GCG GCA CGA GAA ATT-3′, 269 bp; VCAM-1: Sense 5′-CTG CAA GGT TCT AGC GTG TA -3′, antisense 5′-GGA AGG GCT GAC CAA GAC G-3′, 292 bp; GAPDH: sense 5′-GAG GGG CCA TCC ACA GTC TT C-3′; antisense 5′-CAT CAC CTC TTC CAG GAG CG-3′, 357 bp。ICAM-1, VCAM-1 和 GAPDH 分别反转录和扩增。ICAM-1 的反应条件为:48 ℃ 45 min; 94 ℃ 2 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 1 min, 68 ℃ 2 min 40 个循环,68 ℃延伸 7 min,冷却至 4 ℃。VCAM-1 的反应条件为:48 ℃ 45 min; 94 ℃ 2 min; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 1 min, 68 ℃ 2 min 40 个循环,68 ℃延伸 7 min,冷却至 4 ℃。GAPDH 的反应条件为:48 ℃ 45 min; 94 ℃ 2 min;

94 ℃1 min, 55 ℃1 min, 72 ℃1 min 35 个循环; 72 ℃延伸 8 min,冷却至 4 ℃。

准确吸取上述 PCR 产物 10 μL,在 2 %琼脂糖凝胶中电泳,用紫外凝胶成像系统照相。

EMSA 检测 NF-κB 的活化 参照文献[9]进行。

数据分析与统计 所得数据用 Excel 软件进行方差分析并进行 Student′s *t*-test。

结 果

1 氢化可的松对正常人中性粒细胞(PMN)与滑膜细胞(HSC)粘附的影响

1.1 TNF-α 和 IL-1β 对 PMN 与 HSC 粘附功能的影响 IL-1β 和 TNFα 1 - 50 U·mL^{-1}可显著促进 PMN 与 HSC 的粘附功能,以 50 U·mL^{-1}作用最显著,结果如图 1 所示。

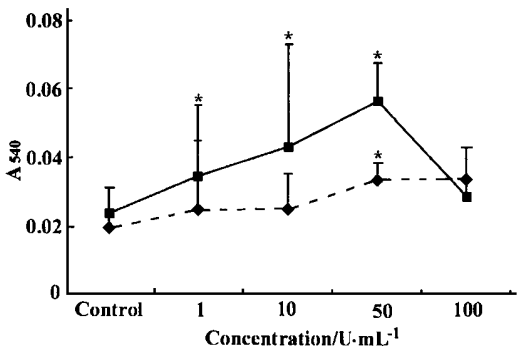

Fig 1 Effect of IL-1β and TNFα on polymorphonuclear leukocyte (PMN) adhesion to human synovial cell (HSC). The concentration of stimulants were 1, 10, 50, 100 U·mL^{-1} for 12 h. n = 3, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ *vs* control

1.2 氢化可的松对 PMN 与 TNF-α 和 IL-1β 诱导的 HSC 粘附的影响 表 1,2 显示,氢化可的松在 1 ×10^{-8} - 1 ×10^{-5} mol·L^{-1}范围内,可剂量依赖性的抑制 PMN 与 50 U·mL^{-1} TNF-α 和 IL-1β 作用 12 h 诱导的 HSC 粘附,其 IC_{50} 分别为 9.12 × 10^{-7} mol·L^{-1}和 2.13 × 10^{-7} mol·L^{-1}。

2 氢化可的松对 HSC 表面粘附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响

结果如表 3,4 所示,氢化可的松在 1 × 10^{-5} mol·L^{-1}浓度下可显著抑制 50 U·mL^{-1} TNF-α 作用 12 h 诱导的 HSC 表面 ICAM-1, VCAM-1 的表达。

Tab 1 Inhibitory effects of hydrocortisone at concentration of 1 × 10^{-8} to 1 × 10^{-5} mol·L^{-1} on PMN adhesion to HSC which was stimulated by 50 U·mL^{-1} IL-1β for 12 h

Group	Concentration/ mol·L^{-1}	Adhesion effects/ A_{540}	Inhibition/ %	IC_{50}/ mol·L^{-1}
Control		0.022 ±0.009		
IL-1β	50 U·mL^{-1}	0.069 ±0.024$^{\#\#}$		
Hydrocortisone	1 ×10^{-8}	0.049 ±0.024	29.06	2.13 ×10^{-7}
	1 ×10^{-7}	0.041 ±0.015	39.82	
	1 ×10^{-6}	0.024 ±0.009	65.12**	
	1 ×10^{-5}	0.015 ±0.009	77.76***	

n = 6, $\bar{x} \pm s$, $^{\#\#}$ $P < 0.001$ *vs* control, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ *vs* IL-1β. PMN: Polymorphonuclear leukocyte; HSC: Human synovial cell

Tab 2 Inhibitory effects of hydrocortisone at concentration of 1 × 10^{-8} to 1 × 10^{-5} mol·L^{-1} on PMN adhesion to HSC which was stimulated by 50 U·mL^{-1} TNF-α for 12 h

Group	Concentration/ mol·L^{-1}	Adhesion effects/ A_{540}	Inhibition/ %	IC_{50}/ mol·L^{-1}
Control		0.026 ±0.010		
TNF-α	50 U·mL^{-1}	0.043 ±0.015$^{\#}$		
Hydrocortisone	1 ×10^{-8}	0.040 ±0.013	18.53	9.12 ×10^{-7}
	1 ×10^{-7}	0.031 ±0.016	36.86	
	1 ×10^{-6}	0.024 ±0.010	51.79*	
	1 ×10^{-5}	0.017 ±0.009	64.61**	

n = 6, $\bar{x} \pm s$, $^{\#}$ $P < 0.01$ *vs* control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *vs* TNF-α

Teb 3 Inhibitory effects of hydrocortisone on surface expression of ICAM-1 in HSC induced by TNF-α 50 U·mL^{-1}

Group	Concentration/ mol·L^{-1}	ICAM-1 Expression/ A_{490}	Inhibition/ %
Control		0.078 ±0.025	
TNF-α	50 U·mL^{-1}	0.27 ±0.04$^{\#\#\#}$	
Hydrocortisone	1 ×10^{-8}	0.19 ±0.04	30.02**
	1 ×10^{-7}	0.180 ±0.028	33.82**
	1 ×10^{-6}	0.166 ±0.010	38.88***
	1 ×10^{-5}	0.168 ±0.019	38.19***

n = 6, $\bar{x} \pm s$, $^{\#\#\#}$ $P < 0.001$ *vs* control; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ *vs* TNF-α

3 氢化可的松对 HSC 粘附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达的影响

图 2 显示,氢化可的松对粘附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达的影响,表明在 1 ×10^{-6} - 1 ×

10^{-5} mol·L^{-1}下均可显著抑制 50 U·mL^{-1}作用 6 h 诱导的 HSC ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达,对 VCAM-1 的抑制作用更明显。

Teb 4 Inhibitory effects of hydrocortisone on surface expression of VCAM-1 in HSC induced by TNF-α 50 U·mL^{-1}

Group	Concentration/ mol·L^{-1}	VCAM-1 Expression/ A_{490}	Inhibition/ %
Control		0.018 ±0.009	
TNF-α	50 U·mL^{-1}	0.063 ±0.023 ###	
Hydrocortisone	1×10^{-7}	0.058 ±0.014	7.45
	1×10^{-6}	0.049 ±0.024	20.61
	1×10^{-5}	0.037 ±0.004	40.95 *

$n=6$, $\bar{x}\pm s$, ## $P<0.01$ *vs* control; * $P<0.05$ *vs* TNF-α

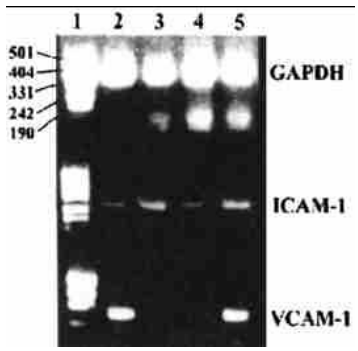

Fig 2 The inhibitory effects of hydrocortisone at concentration of 1.0×10^{-6} mol·L^{-1} and 1.0×10^{-5} mol·L^{-1} on ICAM-1 and VCAM-1 mRNA expression in cultured HSC stimulated with TNF-α (50 U·mL^{-1} for 6 h). GAPDH, ICAM-1 and VCAM-1 levels in cultured HSC were detected with the method of RT-PCR. The samples were loaded on a 2% agarose gel. Lane 1: pUC19DNA/MspI DNA ladder. Lane 2: TNF-α + hydrocortisone 1.0×10^{-6} mol·L^{-1}. Lane 3: TNF-α + hydrocortisone 1.0×10^{-5} mol·L^{-1}. Lane 4: Control. Lane 5: TNF-α

4 对 NF-κB 活化的影响

氢化可的松在 1×10^{-6} - 1×10^{-5} mol·L^{-1}下可显著抑制 50 U·mL^{-1} TNF-α 作用 1 h 诱导的 HSC NF-κB 活化,结果见图 3。

讨 论

细胞与细胞之间的粘附作用是自身免疫性疾病发生、发展以及肿瘤的侵袭、转移的重要环节。有文献报道 HSC 表面粘附分子与基质层粘联蛋白的结合可诱导基质蛋白酶的释放[12]。近年来研究发现粘附分子,如 ICAM-1 和 VCAM-1 在正常人关节滑膜组织低表达,而在炎性因子,如 TNF-α 或 IL-1 刺激下高表达[10,11]。RA 病人关节腔内存在大量炎性细胞因子及粒细胞浸润[1],因而粒细胞与 HSC 之间的粘附在 RA 的病理进程中可能具有重要作用。

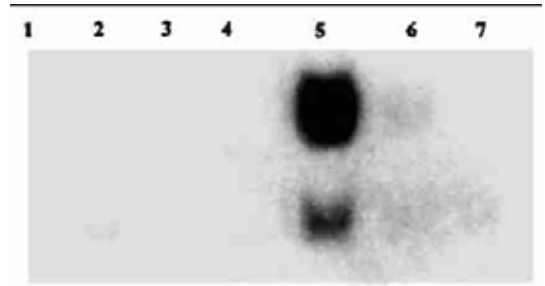

Fig 3 The inhibitory effects of hydrocortisone at concentration of 1.0×10^{-6} mol·L^{-1} and 1.0×10^{-5} mol·L^{-1} on NF-κB acitivity in cultured HSC stimulated with TNF-α (50 U·mL^{-1} for 1 h). 1. Probe alone; 2. Control; 3. κB + Extracts; 4. Mut + extracts; 5. TNF-α alone; 6. TNF-α + hydrocortisone 1.0×10^{-6} mol·L^{-1}; 7. TNF-α + hydrocortisone 1.0×10^{-5} mol·L^{-1}. Nuclear extracts were prepared from cultured HSC treated for 60 min with the indicated amount of TNF-α and incubated with ^{32}P-labeled oligonucleotides encompassing NF-κB or mutational consensus motifs followed by analysis with EMSA. In lane 3 a 100-fold molar excess of unlabeled specific oligonucleotide was added to the binding reactions

甾体类抗炎药可通过抑制淋巴细胞与血管内皮细胞之间的粘附,而用于治疗脉管炎,同时也可抑制滑膜成纤维细胞表面 ICAM-1 和 VCAM-1 的 mRNA 及蛋白水平的表达而抑制其与淋巴细胞的粘附[13,14]。氢化可的松是传统的治疗类风湿性关节炎(RA)的甾体类抗炎药,从不同的角度阐明其作用机理将有助于了解 RA 的发病机理,并提供抗炎药物作用的新靶点。

我们研究发现[4],氢化可的松可显著抑制正常大鼠 PMN 与 TNF-α 和 IL-1β 诱导的大鼠关节 HSC (RSC) 的粘附。本文中我们同样观察到氢化可的松可剂量依赖性的抑制 PMN 与 50 U·mL^{-1} TNF-α 及 IL-1β 诱导的 HSC 粘附,这表明抑制 PMN 与 HSC 的粘附功能,可能是氢化可的松治疗 RA 的机制之一。

为了阐明氢化可的松抑制 PMN 与 HSC 粘附作用的机理,我们进一步研究了氢化可的松对 HSC 表面粘附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响。结果表明,在正常 HSC 表面粘附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 低表达,而在 TNF-α 刺激下高表达,氢化可的松则可剂量依赖性的抑制 HSC 表面粘附分子 VCAM-1 的表达,同时也可抑制其 mRNA 水平升高,而对 ICAM-1 仅见氢化可的松影响了其蛋白水平的表达,对 mRNA 未见明显影响。提示氢化可的松抑制 PMN 与 HSC 的粘附作用可能与其抑制 HSC 表面粘附分子 VCAM-1 的表达有关,另外可能与 ICAM-1 转录后调控过程有关。

为了进一步阐明氢化可的松抑制粘附分子表达可能的机理,本文又研究了氢化可的松对 ICAM-1 和 VCAM-1 基因调控区共有[15,16]的核转录因子 NF-κB 活化的影响。结果表明,氢化可的松在 10^{-6} - 10^{-5} mol·L^{-1} 浓度范围内可剂量依赖性的抑制 TNF-α 诱导的 NF-κB 的活化,提示氢化可的松抑制正常人 HSC 粘附分子 VCAM-1 的表达,可能与其抑制 TNF-α 诱导的核转录因子 NF-κB 的活化有关。

综上所述,本文研究结果表明氢化可的松抑制 PMN 与 HSC 的粘附功能,可能与其抑制核转录因子 NF-κB 的活化,进而抑制 VCAM-1 mRNA 及蛋白水平的表达,或者与其影响 ICAM-1 转录后调控有关。提示调节 HSC 表面粘附分子表达过程有望成为治疗 RA 新型药物的作用靶点。

REFERENCES:

[1] Lettesjo H, Nordstrom E, Strom H, *et al*. Synovial fluid cytokines in patients with rheumatoid arthritis or other arthritic lesions [J]. *Scand J Immunol*, 1998, **48**(3) :286 - 292.

[2] Koch AE, Shah MR, Harlow LA, *et al*. Soluble intercellular adhesion molecules in arthritis [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994, **71**(2) :208 - 215.

[3] Shingu M, Hashimoto M, Ezaki I, *et al*. Effect of cytokine-induced soluble ICAM-1 from human synovial cells on synovial cell-lymphocyte adhesion [J]. *Clin Exp Immunol*, 1994, **98**(1) :46 - 51.

[4] Li LC, Hou Q, Cheng GF, *et al*. Establishment of a model for adhesion of polymorphonuclear leukocyte to synovial cell [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 2000, **35**(2) :99 - 102.

[5] Wang B, Chen MZ, Xu SY. Isolation and culture of rat synovial cell [J]. *Chin Phormacol Bull* (in Chinese), 1994, **10** :73 - 74.

[6] Goto M, Sasano M, Miyamoto T, *et al*. Spontaneous production of an interleukin 1-like factor by cloned rheumatoid synovial cells in long-term culture [J]. *J Clin Invest*, 1987, **80**(3) :786 - 796.

[7] Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g [J]. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1968, **97** :77 - 89.

[8] Tessier P, Audette M, Cattaruzzi P, *et al*. Up-regulation by tumor necrosis factor α of intercellular adhesion molecule 1 expression and function in synovial fibroblasts and its inhibition by glucocorticoids [J]. *Arthritis Rheum*, 1993, **36**(11) :1528 - 1539.

[9] Guo Y, Hu YF, Cheng GF. The inducing effect of inflammation mediators on the activation of NF-κB of mouse peritoneal macrophage [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1999, **34**(8) :586 - 589.

[10] Carballeda JF, Varela JA. Interleukin-8, Interleukin-10, Intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression levels are higer in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis than in osteoarthritis [J]. *Scan J Immunol*, 1999, **50**(2) :215 - 222.

[11] Lindsley HB, Smith DD, Cohick CB, *et al*. Proinflammatory cytokines enhance human synoviocyte expression of functional intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1993, **68**(3) :311 - 320.

[12] Bei X, Laouar A, Huberman E. Fibronectin-mediated cell adhesion is required for induction of 92-kDa type IV collagenase/gelatinase (MMP-9) gene expression during macrophage differentiation [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**(19) :11576 - 11582.

[13] Zhang XW, Thorlacius H. Dexamethasone inhibits arteriolar leukocyte rolling and adhesion induced by tumor necrosis factor-α *in vivo* [J]. *Inflamm Res*, 2000, **49**(3) :95 - 97.

[14] Tessier PA, Cattaruzzi P, McColl SR. Inhibition of lymphocyte adhesion to cytokine-activated synovial fibroblasts by glucocorticoids involves the attenuation of vascular cell adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecular 1 gene expression [J]. *Arthritis Rheum*, 1996, **39**(2) :226 - 234.

[15] Stade BG, Messer G, Riethmuller G, *et al*. Structural characteristics of 5′ region of the human ICAM-1 gene [J]. *Immunobiology*, 1990, **182**(1) :79 - 87.

[16] Iademarco MF, McQuillan JJ, Rosen GD, *et al*. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) [J]. *J Biol Chem*, 1992, **267**(23) :16323 - 16329.

INHIBITORY EFFECTS OF HYDROCORTISONE ON HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTE ADHESION TO HUMAN SYNOVIAL CELL

LI Liang-cheng, HOU Qi, GUO Ying, CHENG Gui-fang

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

ABSTRACT: AIM To investigate the inhibitory effects of hydrocortisone on human polymorphonuclear leukocyte (PMN) adhesion to human synovial cell (HSC), and to explore its mechanism. **METHODS** MTT colorimetry was used to determine the adhesion effect of PMN to HSC. Cell-ELISA and RT-PCR methods were used to determine the expression of adhesion molecular ICAM-1 and VCAM-1. EMSA method was also used to observe the activity of nucleus transcription factor-κB (NF-κB). **RESULTS** Hydrocortisone inhibited TNF-α (50 U·mL^{-1} for 12 hours) and IL-1β (50 U·mL^{-1} for 12 hours)-induced adhesion of PMN to HSC (IC_{50} 2.05×10^{-6} mol·L^{-1} and 2.13×10^{-7} mol·L^{-1}, respectively) in a concentration-dependent manner. Adhesion molecular VCAM-1 and ICAM-1 protein and mRNA (rather than ICAM-1) expression in HSC induced by TNF-α (50 U·mL^{-1}) were inhibited significantly by hydrocortisone at 1×10^{-6} - 10^{-5} mol·L^{-1}. The activity of NF-κB was also extensively inhibited by hydrocortisone at 1×10^{-6} - 10^{-5} mol·L^{-1}. **CONCLUSION** Hydrocortisone inhibited TNF-α-stimulated PMN-HSC adhesion, and expression of VCAM-1 by suppressing the activity of NF-κB.

KEY WORDS: hydrocortisone; human synovial cell (HSC); polymorphonuclear leukocyte (PMN); adhesion; NF-κB