

文章编号:1004-7220(2011)03-0205-06

• 细胞与分子生物力学专栏 •

## $\beta 2$ 整合素介导的人中性粒细胞在 ICAM-1 袪衬表面的铺展动力学

展冬颖<sup>a, b</sup>, 章燕<sup>a, b</sup>, 龙勉<sup>a, b</sup>

(中国科学院力学研究所 a. 微重力重点实验室; b. 生物力学与生物工程中心, 北京 100190)

**摘要:** 目的 研究由表达于人中性粒细胞表面的  $\beta 2$  整合素与胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 袪衬表面相互作用介导人中性粒细胞铺展的动力学过程。方法 以袪衬 2% 人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 和空白的底板为对照, 分别考察袪衬了 10、20 和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ICAM-1 的底板上人中性粒细胞铺展比例随时间的变化规律。通过流式细胞仪检测人中性粒细胞  $\beta 2$  整合素的表达量, 以及采用抗体阻断  $\beta 2$  整合素的 CD11a 或 CD11b 亚基, 观察其在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ICAM-1 袪衬表面细胞铺展比例随时间的改变情况。结果 中性粒细胞在袪衬 2% HSA 的表面不铺展, 在袪衬 ICAM-1 表面的铺展动力学依赖于 ICAM-1 浓度, 并与  $\beta 2$  整合素表达量相关; 抗 CD11b 抗体阻断后, 中性粒细胞在袪衬 ICAM-1 表面的铺展明显减少。结论 人中性粒细胞在 ICAM-1 表面的铺展是由  $\beta 2$  整合素与其配体 ICAM-1 特异性相互作用介导的, 并且 CD11b 亚基对铺展过程起主要调控作用。  
**关键词:** 中性粒细胞;  $\beta 2$  整合素; 胞间黏附分子-1; 细胞铺展; 底板; 动力学; 生物力学

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

## Spreading dynamics of $\beta 2$ integrin-expressed human neutrophils onto ICAM-1-immobilized substrate

ZHAN Dong-ying<sup>a, b</sup>, ZHANG Yan<sup>a, b</sup>, LONG Mian<sup>a, b</sup> (a. Key Laboratory of Microgravity; b. Center of Biomechanics and Bioengineering, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

**Abstract:** Objective To elucidate the spreading dynamics of  $\beta 2$  integrin-expressed human neutrophils (PMNs) on ICAM-1-immobilized substrate. Methods The fraction of PMN spreading on the substrate pre-coated by 10, 20, or 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  intercellular adhesive molecule-1 (ICAM-1) was quantified when that on 2% human serum albumin (HSA)-immobilized or that on blank substrate was served as control. The site density of  $\beta 2$  integrin expressing on PMNs was determined using flow cytometry and the regulation of  $\beta 2$  integrin subunits was defined using the fraction of PMN spreading on 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ICAM-1 substrate by blocking CD11a or CD11b subunit of  $\beta 2$  integrin. Results PMN spreading was presented on ICAM-1-immobilized substrate but absent on 2% HSA-immobilized substrate, supporting the specificity of  $\beta 2$  integrin-induced spreading. Time course of neutrophil spreading on ICAM-1 substrate was density-dependent of both ICAM-1 and  $\beta 2$  integrin molecules. The fraction of PMN spreading was reduced significantly when the expression of CD11b subunit was blocked. Conclusions PMN spreading was mediated specifically by  $\beta 2$  integrin-ICAM-1 interactions and determined by the expression of  $\beta 2$  integrin and ICAM-1, in which CD11b subunit played a dominate role.

**Key words:** Neutrophils;  $\beta 2$  integrin; Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1); Cell spreading; Substrates; Dynamics; Biomechanics

收稿日期:2011-02-14; 修回日期:2011-03-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(0730032, 10902117)。

通讯作者:龙勉, Tel: (010)82544131; E-mail: mLong@imech.ac.cn。

炎症反应发生时,在炎症附近的毛细血管后微静脉内,选择素和配体的相互作用介导了白细胞被内皮细胞捕获后的滚动和初始黏附。随后,在整合素和配体相互作用的介导下,白细胞与内皮细胞发生稳态黏附,并铺展变形后跨过内皮细胞渗出血管,在炎症部位募集<sup>[1]</sup>。

作为白细胞中最多的一类细胞,中性粒细胞参与了急性炎症反应。在初始黏附后,中性粒细胞通过表面 $\beta 2$ 整合素(主要是结构相似的 $\alpha L\beta 2$ 和 $\alpha M\beta 2$ )与内皮细胞表面配体ICAM-1相互作用,参与中性粒细胞的稳态黏附过程<sup>[1-3]</sup>。 $\alpha L\beta 2$ (CD11a/CD18,也称为LFA-1(lymphocyte function-associated antigen-1),即淋巴细胞功能相关抗原-1)表达在中性粒细胞的表面,细胞活化时通过构象改变参与了中性粒细胞由滚动到稳态黏附的过程<sup>[4-6]</sup>;  $\alpha M\beta 2$ (CD11b/CD18,也称为Mac-1(macrophage antigen-1),即巨噬细胞抗原-1),是中性粒细胞内表达最多的整合素,其中只有5%的CD11b分布在静息中性粒细胞膜外表面,而95%的CD11b储存在细胞膜内特异性颗粒和分泌囊泡内,在IL-8、fMLP等炎症因子刺激下在激活细胞的膜外上调表达<sup>[7]</sup>,并可以与血清蛋白等多种蛋白或非蛋白配体发生反应<sup>[8]</sup>。

已有研究表明,LFA-1和Mac-1协同作用参与了中性粒细胞与内皮细胞的黏附。LFA-1与内皮细胞ICAM-1的作用可以介导细胞在低流速下的捕获参与初始黏附过程,随后由Mac-1与ICAM-1的作用加强了稳态黏附<sup>[4,6,9]</sup>。但是对于中性粒细胞稳态黏附后铺展变形的生理现象,特别是中性粒细胞表面 $\beta 2$ 整合素是否以及如何参与铺展现象的研究较少<sup>[10-11]</sup>。本文建立了研究中性粒细胞与衬ICAM-1表面特异性相互作用的方法,考察了人中性粒细胞 $\beta 2$ 整合素与ICAM-1表面相互作用引起中性粒细胞铺展随时间变化的动力学过程;并且通过阻断实验,初步揭示了 $\beta 2$ 整合素的CD11b亚基在铺展过程中所起的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 蛋白和抗体

重组的人ICAM-1蛋白(R&D公司,ADP4)粉末,用纯水溶解成1 mg/mL的准备溶液;人血清白蛋白HSA(ZLB Behring公司);鼠抗人CD11a单克

隆抗体MEM-25(Caltag公司,MHCD11a00);鼠抗人CD11b单克隆抗体44(Chemicon公司,CBL145);鼠抗人CD18单克隆抗体212701(R&D公司,MAB1730);绿色荧光蛋白(FITC)标记的山羊抗鼠二抗(Sigma公司,F5262)。

### 1.2 人中性粒细胞的分离

人中性粒细胞由密度梯度离心法分离于健康成人静脉血<sup>[7]</sup>,悬浮于0.2% HSA和10 mmol/L Hepes(HyClone公司,SH30237.01)的平衡盐溶液HBSS(Hank's balanced salt solution,无 $Ca^{2+}$ 和 $Mg^{2+}$ 、无酚红,HyClone公司,SH30588.01)内。在中性粒细胞分离后的3 h内完成不同条件下的功能检测实验。

### 1.3 研究中性粒细胞铺展的方法

#### 1.3.1 基底表面蛋白衬与中性粒细胞铺展观测

1 mg/mL的ICAM-1准备溶液,用40 mmol/L  $NaHCO_3$ (pH=9.0)溶液分别稀释为10、20和100  $\mu g/mL$ <sup>[5]</sup>。在无菌的聚苯乙烯玻片(NUNC公司,160004)背面标记出5 mm×5 mm大小的区域,在标记区域正面衬10  $\mu L$  ICAM-1、或2% HSA、或PBS溶液(空白底板),室温静置1 h,然后放4℃冰箱当天使用。

带有入口和出口的透明盖板和衬有蛋白的玻片,中间夹着厚100  $\mu m$ 的塑料垫圈(三星复印投影胶片)垫圈中心有方形镂空区域连接透明盖板入口和出口(见图1(a))。使方形区域内充满HBSS溶液(有 $Ca^{2+}$ 和 $Mg^{2+}$ 、无酚红,HyClone公司,SH30268.01),固定密封后放在显微镜(Olympus IX71)载物台上,并使物镜(Cplan 10×/0.25 PhC, Olympus)对准蛋白衬区域,视野大小0.6 mm×0.45 mm。在实验开始时,中性粒细胞以 $0.5 \times 10^6/mL$ 的浓度悬浮于含有0.2% HSA和10 mmol/L Hepes的HBSS(有 $Ca^{2+}$ 和 $Mg^{2+}$ 、无酚红)溶液内,由入口导入蛋白衬区域内停止流动,对蛋白衬区域内中性粒细胞进行实时录像观察。由实验录像得到不同时刻的单帧图像,用图像处理软件(Image J)计算典型细胞的投影面积。细胞铺展比例(fraction of spreading cells)定义为视野内铺展细胞个数占细胞总数的比例。

1.3.2 抗体阻断中性粒细胞 $\beta 2$ 整合素后的铺展观测 对刚分离的 $(0.5 \sim 1) \times 10^6$ 个中性粒细胞,

通过阻断抗体孵育阻断其表面的  $\beta_2$  整合素相应亚基。鼠抗人 CD11a 抗体 MEM-25 的终浓度为  $9.5 \mu\text{g/mL}$ ; 鼠抗人 CD11b 抗体 44 的终浓度为  $9.1 \mu\text{g/mL}$ 。室温孵育 15 min 后, 将中性粒细胞放在 ICAM-1 袪衬的表面进行铺展观测。

#### 1.4 中性粒细胞表面 $\beta_2$ 整合素的表达

分别用荧光抗体标记  $\beta_2$  整合素的 CD11a、CD11b 和 CD18 亚基, 用流式细胞仪 (BD 公司, FACS Calibur) 检测抗体标记后中性粒细胞的平均荧光强度 (geometric mean, GM) [12]。鼠抗人 CD11a 抗体 MEM-25 的终浓度为  $9.5 \mu\text{g/mL}$ , 鼠抗人 CD11b 抗体 44 的终浓度为  $9.1 \mu\text{g/mL}$ , 鼠抗人 CD18 抗体 212701 的终浓度为  $9.8 \mu\text{g/mL}$ 。

## 2 实验结果

### 2.1 中性粒细胞的铺展现象

通过光镜观察, 发现人中性粒细胞与袪衬 ICAM-1 的基底或空白的基底相互作用时, 初始时刻的细胞呈白色、形状滚圆均一; 随着时间的变化, 一部分细胞仍然保持初始时的形态特征, 而另一部分细胞形状变得不规则、中间区域颜色变深、面积变大、周围有一圈白晕 (见图 1(b)), 说明细胞呈现铺展的行为特征。单个中性粒细胞的这种铺展行为可自发发生, 并在 1 min 左右的时间内快速完成; 中性粒细胞铺展后的形态和大小随时间会有细微的变化, 但保持铺展状态 (见图 1(c))。

### 2.2 中性粒细胞在 ICAM-1 表面的铺展及其 ICAM-1 密度依赖性

如图 2 所示, 基底袪衬 2% HSA 时, 在整个 10 min 的观察时间内, 中性粒细胞几乎完全不会铺展; 虽然 HSA 是  $\beta_2$  整合素 Mac-1 的配体, 但是两者的相互作用不会引起中性粒细胞的铺展。基底没有蛋白袪衬 (空白) 时, 中性粒细胞与聚苯乙烯相互作用, 细胞铺展比例随时间增加而增加, 但是这种非特异性铺展的比例不高 ( $\leq 0.23$ )。中性粒细胞在袪衬 ICAM-1 基底上的铺展比例显著高于 HSA 袪衬或空白基底, 表明由  $\beta_2$  整合素-ICAM-1 介导的中性粒细胞铺展具有特异性。更进一步, 同一供血者的中性粒细胞在袪衬 ICAM-1 基底上的铺展比例随时间增加而增加, 存在密度依赖性。中性粒细胞在袪衬  $100 \mu\text{g/mL}$  的 ICAM-1 表面铺展的比例最高

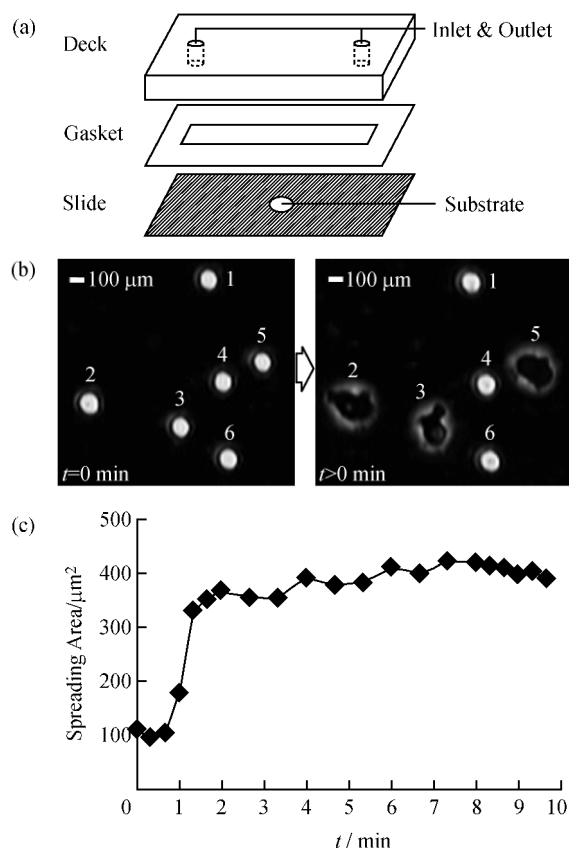


图 1 中性粒细胞铺展的观测 (a) 中性粒细胞铺展的观测方法; (b) 中性粒细胞铺展现象的说明。初始时刻 ( $t = 0 \text{ min}$ ) 未铺展的 6 个中性粒细胞 (左图), 随时间变化 ( $t > 0 \text{ min}$ ) 2、3、5 细胞铺展, 而 1、4、6 细胞没有铺展 (右图); (c) 典型的中性粒细胞铺展时, 其投影面积随时间的变化过程

Fig. 1 Visualization of neutrophil spreading on substrates

(a) Schematic of cell chamber for visualizing neutrophil spreading; (b) Images of neutrophil spreading on substrate. For six intact neutrophils at  $t = 0 \text{ min}$  (left panel), three cells (#2, #3, and #5) spread out and the other three (#1, #4, and #6) remain intact (right panel) at  $t > 0 \text{ min}$ ; (c) Time course of a typical projected area when neutrophils spread out

( $\leq 0.77$ ), 高于  $10 \mu\text{g/mL}$  ( $\leq 0.54$ ) 和  $20 \mu\text{g/mL}$  的基底 ( $\leq 0.67$ )。而  $10 \mu\text{g/mL}$  和  $20 \mu\text{g/mL}$  ICAM-1 袪衬的基底在最初的 3 min 内铺展比例的趋势相似 (由 0 分别增至 0.18 和 0.21) 随后在  $10 \mu\text{g/mL}$  的 ICAM-1 底板的铺展比例 (0.18 ~ 0.54) 小于在  $20 \mu\text{g/mL}$  的 ICAM-1 底板铺展比例 (0.21 ~ 0.67), 表明中性粒细胞随时间增加的铺展动力学受 ICAM-1 袪衬密度调控。

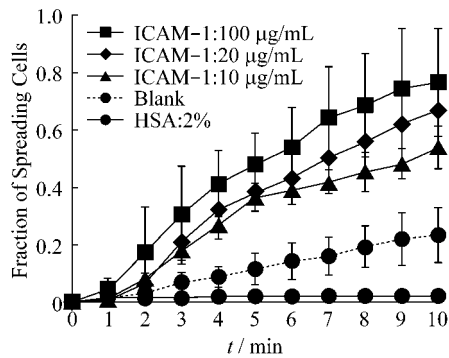


图2 中性粒细胞在 ICAM-1 表面铺展的特异性和 ICAM-1 的密度依赖性(2 个供血者结果的平均值  $\pm$  标准差)

Fig.2 Specificity and ICAM-1 site density dependence of neutrophil spreading on ICAM-1-immobilized substrate (Data were presented as Mean  $\pm$  SD from two healthy donors)

### 2.3 中性粒细胞表面 $\beta 2$ 整合素的表达及其对细胞铺展动力学的影响

为了验证不同供血者的个体差别,采用流式细胞仪方法对 4 个不同供血者中性粒细胞表面  $\beta 2$  整合素的 CD11a、CD11b 和 CD18 亚基表达进行了测量(见图 3)。相比于 CD11b(相对荧光强度  $GM = 273.91 \pm 35.23$ )和 CD18( $GM = 215.48 \pm 29.94$ )亚基,CD11a( $GM = 105.61 \pm 8.93$ )亚基的表达量最低、标准差最小。CD11b 和 CD18 亚基的表达对于不同供血者标准差略大,CD11b 亚基表达最高,CD18 亚基介于 CD11a 和 CD11b 之间。

对于同一供血者来源的中性粒细胞,其中一半用于在裱衬  $100 \mu\text{g/mL}$  ICAM-1 的基底进行铺展实验,另一半用于流式细胞仪检测其表面  $\beta 2$  整合素的表达,从而获得中性粒细胞在 ICAM-1 裱衬基底铺展动力学与其表面  $\beta 2$  整合素 CD18 表达的关联(见图 4)。基底采用高浓度( $100 \mu\text{g/mL}$  ICAM-1)的目的是尽量避免非特异性影响。研究发现,当中性粒细胞 CD18 亚基表达很接近(分别为  $GM = 379.02$ 和  $GM = 370.96$ )时,10 min 内中性粒细胞在 ICAM-1 基底铺展的比例也很接近(由 0 分别增至为 0.85 和 0.87);但相对于 CD18 亚基表达较低( $GM = 178.5$ )的中性粒细胞,其在 ICAM-1 基底铺展的比例也较低( $\leq 0.57$ ),说明中性粒细胞在 ICAM-1 裱衬基底的铺展随中性粒细胞表面  $\beta 2$  整合素表达的增加而增加。

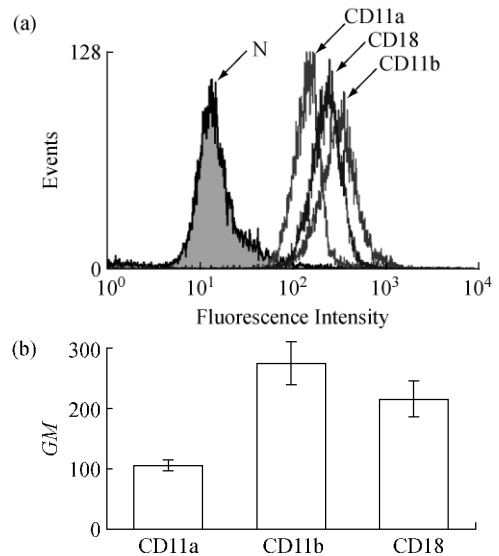


图3 中性粒细胞表面  $\beta 2$  整合素 CD11a、CD11b 和 CD18 的表达 (a) 同一供血者中性粒细胞表面  $\beta 2$  整合素 CD11a、CD11b 和 CD18 的表达,(b) 不同供血者中性粒细胞表面  $\beta 2$  整合素 CD11a、CD11b 和 CD18 的表达值(4 个供血者结果的平均值  $\pm$  标准差)

Fig. 3 Expressions of  $\beta 2$  integrin CD11a, CD11b, and CD18 subunits on neutrophils (a) Expressions of  $\beta 2$  integrin CD11a, CD11b, and CD18 subunits from one healthy donor, (b) Fluorescent intensities of  $\beta 2$  integrin CD11a, CD11b and CD18 subunits (Data were presented as Mean  $\pm$  SD from four healthy donors)

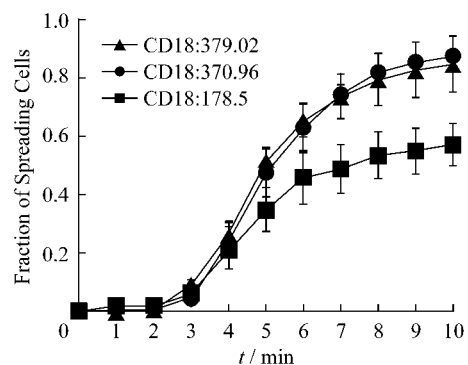


图4 中性粒细胞在 ICAM-1 表面的铺展与粒细胞表面  $\beta 2$  整合素表达相关(ICAM-1 :  $100 \mu\text{g/mL}$ ) (结果为 4 次独立实验结果的平均值和标准差)

Fig.4 Correlation between fraction of neutrophil spreading and CD18 expression at ICAM-1 concentration of  $100 \mu\text{g/mL}$  (Data were presented as Mean  $\pm$  SD from four independent measurement)

## 2.4 抗体阻断 $\beta 2$ 整合素后中性粒细胞在 ICAM-1 表面的铺展

进一步考察了  $\beta 2$  整合素不同亚基 CD11a 和 CD11b 对中性粒细胞铺展的不同调控作用。对于同一个供血者的中性粒细胞, 分别采用阻断抗体对 CD11a 和 CD11b 进行阻断后, 在袂衬 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ICAM-1 的基底进行铺展实验, 并与无阻断结果进行对照(见图 5)。结果显示, CD11b 抗体阻断的中性粒细胞在 ICAM-1 底板铺展的比例 ( $\leq 0.19$ ) 明显小于没有阻断的中性粒细胞的铺展比例 ( $\leq 0.74$ )。而 CD11a 被阻断后并不能显著降低中性粒细胞的铺展, 呈现不同的动力学行为, 即其铺展比例在初始 7 min 内小于, 尔后高于没有抗体阻断的细胞。上述结果表明, CD11b 主导了中性粒细胞在 ICAM-1 表面的铺展过程, 而 CD11a 调控中性粒细胞铺展的机制则较为复杂。

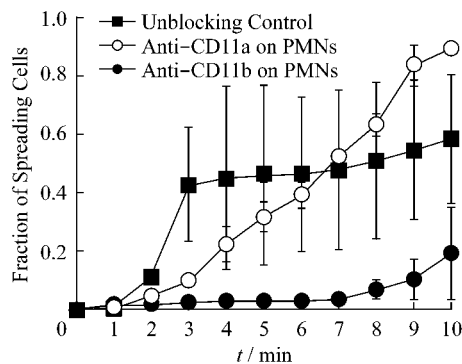


图 5  $\beta 2$  整合素亚基的作用。抗体阻断后中性粒细胞在 ICAM-1 表面的铺展 (ICAM-1 : 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (2 个供血者结果的平均值  $\pm$  标准差)

Fig. 5 Function of  $\beta 2$  integrin subunits. Neutrophils spread on ICAM-1-immobilized substrate at ICAM-1 concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Data were presented as Mean  $\pm$  SD from two healthy donors)

## 3 讨论

人中性粒细胞在 ICAM-1 基底上的铺展是细胞表面的  $\beta 2$  整合素和其配体 ICAM-1 相互作用引起的从外向内 (outside-in) 信号转导过程, 并通过细胞骨架肌动蛋白的解离、重新聚合使细胞形成铺展的形态<sup>[13]</sup>。本文发现, 在无流体剪切下, 人中性粒细胞与 ICAM-1 基底相互作用后, 部分细胞表现出主

动铺展的现象(见图 1), 并且铺展比例依赖于基底 ICAM-1 的密度变化(见图 2); 而中性粒细胞在同为  $\beta 2$  整合素配体的 HSA 基底上几乎没有铺展。结果验证了 ICAM-1 对于中性粒细胞铺展的必需作用。

在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的 ICAM-1 基底情况下, 实验结果发现 CD18 亚基表达较低的中性粒细胞, 其在 ICAM-1 基底铺展的比例也较低(见图 4), 说明中性粒细胞的铺展同时也显著依赖于粒细胞表面  $\beta 2$  整合素的表达; 而且单独阻断 CD11b 明显降低了中性粒细胞的铺展比例, 说明 Mac-1 分子在稳态黏附之后铺展的过程中起主要作用, 与文献报道中其使细胞间稳态黏附更稳定、并抵抗流体的作用相符合<sup>[9]</sup>(见图 5)。值得注意的是, 虽然阻断 CD11b 明显降低了中性粒细胞的铺展比例, 但是 CD11a 阻断时, 其铺展的比例在开始的 7 min 内小于, 尔后高于没有抗体阻断的细胞(见图 5)。结果表明, 对于中性粒细胞而言, 抗体一方面可以阻断  $\beta 2$  整合素-ICAM-1 分子间的相互作用, 另一方面也可引起细胞某些与铺展相关的功能活化<sup>[4, 14]</sup>。

流式细胞仪检测发现不同供血者中性粒细胞表面  $\beta 2$  整合素的表达有一定的差异(见图 3), 这也是不同供血者中性粒细胞的铺展现象呈现差异的主要原因(见图 4、5)。CD11a 和 CD11b 的表达量与 CD18 的表达量不匹配(即 CD18 表达量小于 CD11a 和 CD11b 表达量之和, 见图 3), 可能是因为检测抗体结合位点以及空间位阻的影响<sup>[4]</sup>, 也可能是存在整合素特定的组装方式<sup>[15]</sup>。此外, 中性粒细胞作为一种易于活化的生理细胞, 其提取过程可造成中性粒细胞表面 CD11b 表达的增加<sup>[16-17]</sup>, 因而体外实验所用中性粒细胞的轻度活化难以避免。

在生理情况下, 血管壁上中性粒细胞的铺展, 可以增加参与相互作用的受体-配体数目、提升稳定黏附的细胞对血流的抵抗作用, 从而有助于细胞完成渗出血管的过程, 最终到达炎症部位。由于在体环境十分复杂, 为避免其他因素的影响, 本文立足于炎症反应时中性粒细胞与内皮细胞相互作用的背景, 仅考虑了基底袂衬 ICAM-1 分子的影响, 与在体环境有较大差异。尽管如此, 本文工作对于研究白细胞的铺展行为在炎症反应中的作用具有重要意义。简而言之, 人中性粒细胞表面  $\beta 2$  整合素和 ICAM-1 表面特异性的相互作用介导了人中性粒细胞的铺

展 并且  $\beta 2$  整合素的 CD11b 亚基在铺展过程中起主要作用。

#### 参考文献:

- [1] Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules [J]. *Annu Rev Immunol*, 1993, 11: 767-804.
- [2] Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction from and prerequisite for adhesion through integrins [J]. *Cell*, 1991, 65 (5): 859-873.
- [3] Schenkel AR, Kim M. Adhesion Molecules: Function and Inhibition [M]. Switzerland: Birkhauser Verlag AG, 2007: 175-197.
- [4] Ding ZM, Babensee JE, Simon SI, *et al.* Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration [J]. *J Immunol*, 1999, 163(9): 5029-5038.
- [5] Sigal A, Bleijs DA, Grabovsky V, *et al.* The LFA-1 integrin supports rolling adhesions on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment [J]. *J Immunol*, 2000, 165(1): 442-452.
- [6] Green CE, Schaff UY, Sarantos MR, *et al.* Dynamic shifts in LFA-1 affinity regulate neutrophil rolling, arrest, and transmigration on inflamed endothelium [J]. *Blood*, 2006, 107(5): 2101-2111.
- [7] Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, *et al.* Subcellular localization and dynamics of Mac-1 ( $\alpha M\beta 2$ ) in human neutrophils [J]. *J Clin Invest*, 1993, 92(3): 1467-1476.
- [8] Yakubenko VP, Lishko VK, Lam SC, *et al.* A molecular basis for integrin  $\alpha M\beta 2$  ligand binding promiscuity [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(50): 48635-48642.
- [9] Hentzen ER, Neelamegham S, Kansas GS, *et al.* Sequential binding of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 defines neutrophil capture and stable adhesion to intercellular adhesion molecule-1 [J]. *Blood*, 2000, 95(3): 911-920.
- [10] Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Cell fitting to adhesive surfaces: A prerequisite to firm attachment and subsequent events [J]. *Eur Cell Mater*, 2002, 3: 31-45.
- [11] Sengupta K, Aranda-Espinoza H, Smith L, *et al.* Spreading of neutrophils: From activation to migration [J]. *Biophys J*, 2006, 91(12): 4638-4648.
- [12] 贾潇凌, 王世琪, 陈娟, 等. IL-8 刺激 L-选择素水解断裂对细胞膜拓扑结构和刚度的影响 [J]. *医用生物力学*, 2009, 24(5): 47-50.
- Jia XL, Wang SQ, Chen J, *et al.* Impacts of IL-8-induced L-selectin shedding on microtopology and stiffness of cell membrane [J]. *J Med Biomech* 2009, 24(5): 47-50.
- [13] Dewitt S, Hallett M. Leukocyte membrane "expansion": A central mechanism for leukocyte extravasation [J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81(5): 1160-1164.
- [14] Sheterline P, Rickard JE, Richards RC. Fc receptor-directed phagocytic stimuli induce transient actin assembly at an early stage of phagocytosis in neutrophil leukocytes [J]. *Eur J Cell Biol*, 1984, 34(1): 80-87.
- [15] Li R, Mitra N, Gratkowski H, *et al.* Activation of integrin  $\alpha 5\beta 1$  by modulation of transmembrane helix associations [J]. *Science*, 2003, 300(5620): 795-798.
- [16] Forsyth KD, Levinsky RJ. Preparative procedures of cooling and re-warming increase leukocyte integrin expression and function on neutrophils [J]. *J Immunol Methods*, 1990, 128(2): 159-163.
- [17] Kaba NK, Knauf PA. Hypotonicity induces L-selectin shedding in human neutrophils [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281(4): 1403-1407.