

创伤后抑制性 T 细胞对活化 T 细胞内白介素 2 及白介素 2 受体 α 基因表达的影响*

梁华平 王正国 耿波 田丰群
(第三军医大学野战外科研究所 重庆 630042)

严重创伤可致抑制性 T 细胞(Ts)的活性增强,这是引起 T 细胞功能受抑的重要原因之一^[1]。我们以往的研究表明,创伤后 T 细胞白介素 2(IL-2)生成减少同 Ts 细胞活性增强密切相关^[2]。但对于 Ts 细胞发挥抑制作用的环节尚不清楚。本研究旨在观察创伤后 Ts 细胞对活化 T 细胞内 IL-2 及 IL-2 受体(IL-2R α)基因表达的影响,并探讨其作用机制。

材 料 和 方 法

1. 动物模型及分组

Balb/c 小鼠,雌雄兼备,6—8 周龄,体重 18—22 g,随机分为正常对照、伤后 1、2、4、7、10 天共 6 组,每组 10 只。小鼠致伤参照文献^[2]进行,即利用 35 g 重的砝码从 30 cm 高处垂直下落冲撞清醒状态小鼠的双侧股骨部,各侧接受撞击 15 次,使之累积撞击能量为 3.0 J。伤后皮下及肌肉严重变性坏死(组织切片证实)。各组动物于相应时间处死,按常规制备脾脏、胸腺及肠系膜淋巴结的混合细胞悬液。

2. T 细胞的分离及活化

参照文献^[3]以尼龙毛分离上述细胞悬液中的 T 细胞。ANAE 染色法鉴定 T 细胞纯度为 92%,台盼蓝染色证明分离出的 T 细胞存活率大于 95%。将 T 细胞以 RPMI 1640 培养液调成 $5 \times 10^6/\text{ml}$,加入 $10 \mu\text{g}/\text{m}_1$ 的 ConA,于 37°C、5%CO₂ 培养箱中温育 2 h 后收集细胞,测定细胞内环核苷酸含量及磷脂酰肌醇代谢指标;温育 10 h 后收集细胞,以异硫氰酸胍-苯酚-氯仿/异戊醇法提取细胞总 RNA 测定 IL-2 mRNA 及 IL-2R α mRNA 水平。

3. 检测指标和方法

1) IL-2 mRNA、IL-2R α mRNA 的测定 参照文献^[4]制备 IL-2 cDNA 及 IL-2R α cDNA 探针并以生物素标记,将 RNA 标本点膜,作斑点杂交。斑点的显色强度以薄层色谱仪扫描测定,结果以正常对照

显色强度的百分比(%)表示。

2) cAMP、cGMP 含量测定 以放射免疫法^[5]测定其含量。

3) 三磷酸肌醇(IP₃)含量测定 参照文献^[6]以³H-肌醇标记细胞,以层析柱分离 IP₃并测定其含量。

4) 钙离子(Ca²⁺)浓度测定 参照文献^[6]以 Fura-2/AM 荧光标记示踪法测定细胞内 Ca²⁺ 浓度。

5) 钙调素(CaM)活性测定 参照文献^[7]提取细胞内 CaM 并以磷酸二酯酶法测定其活性。

6) CaM 依赖性蛋白激酶(CaM-PK)活性测定 参照文献^[8]提取细胞内 CaM-PK,利用酶催化特异性底物蛋白磷酸化的原理定量测定酶的活性。

7) 蛋白激酶 C(PKC)活性测定 参照文献^[9]提取细胞内 PKC,利用酶催化特异性底物蛋白磷酸化的原理定量测定酶的活性。

8) Ts 细胞抑制作用测定 参照文献以盘化法^[10]分离获取 Ts 细胞。即大鼠抗小鼠 Lyt₂ 单抗与 T 细胞冰浴 30 min,加入到一包被有兔抗大鼠 Ig 单抗的塑料平皿中,这样 Lyt₂⁺ 细胞即被粘附在平皿上,轻轻洗脱未粘附细胞,即可获得高纯度的 Lyt₂⁺ 细胞(Ts 细胞)。以间接免疫荧光法(-抗为大鼠抗小鼠 Tyt₂ 单抗,二抗为兔抗大鼠 Ig 的荧光抗体)鉴定 Ts 细胞纯度大于 95%,台盼蓝染色证明分离出的 Ts 细胞存活率大于 95%。于正常 T 细胞($5 \times 10^6/\text{ml}$)活化的同时,分别加入正常及创伤各组 Ts 细胞(占细胞总数 10%),温育 2 h 后收集细胞,测定细胞内环核苷酸含量及磷脂酰肌醇代谢指标;温育 10 h 后收集细胞,提取细胞中 RNA 测定 IL-2 mRNA 及 IL-2R α mRNA 水平。计算各组 Ts 细胞对上述指标的抑制率(%)。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{加入 Ts 细胞时指标值}}{\text{未加 Ts 细胞时指标值}} \right) \times 100\%$$

9) 去除 T 细胞中 Ts 细胞对各指标的影响 参照文献^[2]将各组 T 细胞用适量的大鼠抗小鼠 Lyt₂ 单抗加豚鼠补体处理,以去除 Ts 细胞,观察 Ts 细胞去除前后各指标变化情况。

4. 数据处理

结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 以 *t* 检验进行显著性分析。

结 果

1. 各组 Ts 细胞对正常活化 T 细胞内 IL-2 mRNA 及 IL-2 R α mRNA 的抑制率

和正常对照组相比, 创伤各组 Ts 细胞对

正常活化 T 细胞内 IL-2 mRNA 及 IL-2 R α mRNA 的抑制作用增强, 以伤后 4 天最为明显, 伤后 10 天仍未完全恢复正常(见表 1)。

2. 各组 Ts 细胞对正常活化 T 细胞内 cAMP、cGMP、IP₃ 含量、Ca²⁺ 浓度、CaM、CaM-PK、PKC 活性的影响

和正常对照组相比, 创伤 4 天组 Ts 细胞对正常活化 T 细胞内 cAMP 含量、cAMP/

表 1 各组 Ts 细胞对正常活化 T 细胞内 IL-2 mRNA 及 IL-2 R α mRNA 的抑制率($\bar{x} \pm SD$, n=10)

指 标	抑 制 率 (%)					
	正常对照	1	2	4	7	10(伤后天数)
IL-2 mRNA	11±2.4	21±6.7	31±4.8*	37±8.0**	24±6.6*	23±5.8*
IL-2 R α mRNA	8±1.7	19±3.0	21±4.4*	39±6.3**	28±4.7*	16±3.8

和正常对照组相比: **P*<0.05, ***P*<0.01。

表 2 两组 Ts 细胞对正常活化 T 细胞抑制率比较($\bar{x} \pm SD$, n=10)

指 标	抑 制 率 (%)	
	正常对照组	创伤 4 天组
cAMP	-4±0.8	-25±1.1*
cGMP	4±0.7	21±4.7*
cAMP/cGMP	-6±0.4	-28±6.0*
IP ₃	1±0.1	32±2.7*
Ca ²⁺	-9±0.8	43±7.2**
CaM	0	45±8.8**
CaM-PK	7±2.1	38±3.3*
PKC	5±0.4	38±5.4**

和正常对照组相比: **P*<0.05, ***P*<0.01。

cGMP 比值具有明显升高作用, 但对 cGMP、IP₃ 含量、Ca²⁺ 浓度、CaM、CaM-PK 及 PKC 活性具有明显抑制作用(见表 2)。

3. 去除 T 细胞中 Ts 细胞对各指标的影响

和正常对照组相比, 创伤 4 天组活化 T 细胞内 IL-2 mRNA 及 IL-2 R α mRNA 水平均降低, cAMP 含量升高, cGMP 含量降低, cAMP/cGMP 比值增高, IP₃ 含量、Ca²⁺ 浓度、CaM、CaM-PK 及 PKC 活性均降低。去除 T 细胞中 Ts 细胞虽对正常对照组上述指标无明显影响, 但可明显逆转创伤 4 天组上述各项指标的变化(见表 3)。

表 3 去除 T 细胞中 Ts 细胞对各指标的影响($\bar{x} \pm SD$, n=10)

指 标	正常对照组		创伤 4 天组	
	未处理	去除 Ts	未处理	去除 Ts
IL-2 mRNA (%)	100±9.0	108±8.5	51±6.4**	93±7.7 ^{△△}
IL-2 R α mRNA (%)	100±11	104±10	56±5.8**	92±8.7 ^{△△}
cAMP (pmol/10 ⁷ cells)	23.3±3.3	21.6±3.5	39.2±4.4**	26.6±4.4 [△]
cGMP (pmol/10 ⁷ cells)	20.8±3.1	19.4±4.0	12.2±2.5**	18.4±3.5 [△]
cAMP/cGMP	1.1±0.2	1.1±0.3	3.2±0.4**	1.4±0.3 ^{△△}
IP ₃ (cpm/10 ⁶ cells)	476±28	481±31	294±21**	421±36 ^{△△}
Ca ²⁺ (nmol/L)	237±33	256±41	138±24**	226±23 ^{△△}
CaM (% hydrolysis of cAMP)	43±6.5	42±7.8	25±4.3**	38±5.6 [△]
CaM-PK (pmol/min/mg pro.)	53±11	59±13	22±8.0**	47±8.5 ^{△△}
PKC (pmol/min/mg pro.)	158±27	153±22	94±11**	139±29 [△]

和正常对照组(未处理)相比: ***P*<0.01, 和创伤 4 天组(未处理)相比: [△]*P*<0.05, ^{△△}*P*<0.01。

讨 论

创伤后抑制作用增强的 Ts 细胞可通过释放抑制性因子和/或直接的细胞接触方式抑制 T 细胞活化过程中 IL-2 的生成和 IL-2 R 的表达, 进而降低 T 细胞增殖能力^[1]。本研究发现, 创伤小鼠 Ts 细胞在体外对培养的正常活化 T 细胞中 IL-2 mRNA 及 IL-2 R α mRNA 水平的抑制作用增强, 以伤后 4 天的抑制作用最为明显。这表明创伤后 Ts 细胞可抑制 IL-2 及 IL-2 R α 的基因转录表达, 该作用可能是其对 IL-2 及 IL-2 R 发挥抑制效应的分子生物学基础之一。

资料表明^[4], cAMP 可介导免疫抑制效应。外源性导入可透性的 cAMP, 不仅可使 T 细胞增殖活性下降, IL-2 及 IL-2 R 产生减少, 还可致 IL-2 及 IL-2 R 基因转录表达受抑。与 cAMP 相反, cGMP 则有利于促进 T 细胞的功能。另据报道^[11], 磷脂酰肌醇代谢途径是 T 细胞活化的经典途径。在磷脂酰肌醇代谢过程中产生的 IP₃ 和甘油二脂(DG)可分别升高细胞内 Ca²⁺ 浓度及 PKC 活性。而两者是 T 细胞产生 IL-2、表达 IL-2 R 以及细胞克隆性增殖的先决条件。可见 T 细胞活化过程中环核苷酸含量、磷脂酰肌醇代谢的变化均可影响 IL-2 及 IL-2 R 的生成。本研究发现, 创伤 4 天小鼠 Ts 细胞可通过升高正常活化 T 细胞中 cAMP 含量, 降低 cGMP 含量, 进而增加 cAMP/cGMP 比值。且对 IP₃ 含量、Ca²⁺ 浓度、CaM、CaM-PK 及 PKC 活性均具有明显抑制作用。推测创伤后 Ts 细胞可能通过调节 T 细胞内环核苷酸含量, 阻碍磷脂酰肌醇代谢进而抑制 IL-2 及 IL-2 R α 的基因转录表达。我们还观察到, 去除创伤小鼠 T 细胞中 Ts 细胞, 不仅可明显升高其 IL-2 mRNA 及 IL-2 R α mRNA 水平, 还可明显降低 cAMP 含量, 升高 cGMP 含量, 降低 cAMP/cGMP 比值, 且对 IP₃ 含量、Ca²⁺ 浓度、CaM、CaM-PK 及 PKC 活性均具有明显升高作用。这一结果进一

步支持了上述推论。本研究对揭示创伤后 Ts 细胞发挥免疫抑制效应的分子机理具有重要指导意义。

摘 要

研究了创伤小鼠抑制性 T 细胞(Ts)对白介素 2(IL-2)及 IL-2 受体(IL-2 R) α 基因表达的抑制作用。结果表明, 创伤后 Ts 细胞对正常活化 T 细胞内 IL-2 mRNA 及 IL-2 R α mRNA 水平的抑制作用增强, 以伤后 4 天最为明显, 伤后 10 天仍未恢复正常。创伤后 Ts 细胞还可升高正常活化 T 细胞内 cAMP 含量, 降低 cGMP 含量, 增加 cAMP/cGMP 比值。且可降低三磷酸肌醇(IP₃)含量、游离钙(Ca²⁺)浓度、钙调素(CaM)、钙调素依赖性蛋白激酶(CaM-PK)及蛋白激酶 C(PKC)的活性。去除创伤小鼠活化 T 细胞中的 Ts 细胞, 则可使其 IL-2 mRNA 及 IL-2 R α mRNA 水平明显升高。并可使 cAMP、cGMP、IP₃ 含量、Ca²⁺ 浓度、CaM、CaM-PK 及 PKC 活性的变化发生逆转。表明创伤后 Ts 细胞可通过影响 T 细胞内环核苷酸含量及磷脂酰肌醇代谢途径, 进而抑制 IL-2 及 IL-2 R α 的基因表达。

关键词: 创伤 抑制性 T 细胞 白介素 2 白介素 2 受体 信使 RNA

参 考 文 献

- [1] 梁华平等, 1991, 国外医学军事医学分册, 4: 145-148.
- [2] 梁华平等, 1993, 解放军医学杂志, 18: 271-273.
- [3] 李绍康等, 1981, 上海免疫学杂志, 1: 10-12.
- [4] Anastassiou, E. D. et al., 1992, *J. Immunol.*, 148: 2845-2851.
- [5] 梁华平等, 1995, 第三军医大学学报, 17: 15-18.
- [6] Hoyt, D. B. et al., 1991, *J. Surg. Res.*, 51: 477-483.
- [7] 刘景生等, 1985, 中国医学科学院学报, 7: 453-456.
- [8] 张光毅等, 1990, 徐州医学院学报, 10: 79-82.

- [9] Christiansen, N. O. et al., 1986, *Biochem. Biophys. Acta.*, 885: 170—176.
 [10] Mage, M. G. et al., 1981, *Eur. J. Im-*

- munol.*, 11: 17—23.
 [11] Hadden, J. W. et al., 1988, *Immunol. Today*, 9: 235—239.

EFFECT OF SUPPRESSOR T CELLS POSTTRAUMA ON INTERLEUKIN 2 AND INTERLEUKIN 2 RECEPTOR α GENE EXPRESSION IN ACTIVATED T CELLS

Liang Huaping, Wang Zhengguo, Gen Bo, Tian Fengqun
 (Research Institute of Surgery, Third Military Medical College, Chongqing 630042)

ABSTRACT

Suppressive effect of suppressor T cells (Ts) from traumatized mice on interleukin 2(IL-2) and IL-2 receptor (IL-2 R) α gene expression was studied. The results showed that the suppressive effect of Ts cells posttrauma on IL-2 mRNA and IL-2 R α mRNA levels of normal activated T cells was enhanced, this effect was most obviously on day 4 and still not returned to normal on day 10 posttrauma. Ts cells posttrauma could elevate cAMP contents of normal activated T cells, decrease cGMP contents, increase the ratio of cAMP to cGMP, reduce inositol 1,4,5 trisphosphate(IP 3) contents, free calcium (Ca^{2+}) concentration, calmodulin (CaM), CaM-dependent protein kinase (CaM-PK) and protein kinase C (PKC) activities. Removal of Ts cells from activated T cells in traumatized mice could significantly elevate IL-2 mRNA and IL-2 R α mRNA levels, reverse the changes of cAMP, cGMP, IP 3 contents, Ca^{2+} concentration, CaM, CaM-PK and PKC activities. It is suggested that Ts cells posttrauma can suppress IL-2 and IL-2 R α gene expression by affecting cyclic nucleotide contents and phosphatidylinositol metabolism pathway in T cells.

Key words: Trauma Suppressor T cells Interleukin 2 Interleukin 2 receptor mRNA

克服昆明小鼠体外受精卵发育阻滞方法的研究

庞也非

李东 旭日千

(汕头大学医学院实验动物中心 515031) (内蒙古大学实验动物研究中心)

近年来,对哺乳动物的体外受精及胚胎发育的研究日益深入。这些研究的一个重要的基础就是胚胎的早期培养。因此,建立稳定、可靠的哺乳动物(包括人类)胚胎的体外培养系统,已成为当前这一领域里的重要研究课题之一。

小鼠作为哺乳动物胚胎发育研究的对象,具有很多优点。但一些常用的品系如NIH、昆明种等的早期胚胎在进行体外培养时,不同程度地呈现出“2细胞阻滞”现象^[1],而克服哺

乳动物胚胎的发育阻滞已成为目前的研究重点之一。

本研究以昆明小鼠为材料,用体外受精的方法获得早期胚胎,并采用不同的培养液及添加物进行对比试验,初步探索阻滞发生的机理,为发育生物学及其相关研究提供依据。

材料和方法

1. 体外受精及受精卵的获得

精子及卵子均采自40—45克的10周龄以上的成