

method. The results showed that the mean optical density of positive Bcl-2-immunoreaction (Bcl-2-IR) in hippocampal neurons was significantly increased after anoxia for 2h, then decreased after anoxia for 4h and reoxygenation for 24 and 72h, as compared with control. The positive rate of Bcl-2-IR neurons were gradually decreased with reduction of survival neurons. These results demonstrate that the early increase of Bcl-2-IR neurons during anoxia is self-protective effect of brain cell under anoxia conditions, and that Bcl-2 may involve in the modulation of anoxia injury in hippocampal neurons.

Key words: Bcl-2 Anoxia Hippocampal neurons Cell culture Immunohistochemistry

创伤小鼠血清、巨噬细胞、Ts 细胞对反抑制 T 细胞的影响*

梁华平 王正国 朱佩芳 耿波 罗艳 徐祥

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所 重庆 400042)

严重创伤可致机体免疫功能紊乱,其中 T 细胞介导的细胞免疫功能受抑现象尤为突出,且这一变化同伤后感染及预后均密切相关^[1],因此有关创伤与 T 细胞的研究正成为创伤免疫领域中的研究热点。目前有关创伤后辅助性 T 细胞(Th)、抑制性 T 细胞(Ts)的研究已有大量报道^[1-3],但创伤后反抑制 T 细胞(Contrasuppressor T cells, Tcs)的变化情况如何,尚不清楚。本研究着重观察创伤小鼠 Tcs 细胞比例、功能的变化,并探讨创伤血清、巨噬细胞、Ts 细胞对正常小鼠反抑制 T 细胞的影响。

材料和方法

1. 动物模型及分组

Balb/c 小鼠(本校动物所提供),雌雄兼备,6-8 周龄,体重 18-22g,随机分为正常对照、伤后 1、4、7、10、14 天共 6 组,各组 8 只。参照文献^[3]采用双后肢膝关节离断术制备小鼠截肢伤模型。各组动物于相应时间取材,采取断头取血,制备血清无菌滤过待用;利用腹腔细胞中巨噬细胞的玻璃粘附特性,获取巨噬细胞,取脾脏并制备脾细胞悬液。

2. VVL⁺细胞百分率测定

根据 Tcs 细胞可表达长柔毛野豌豆凝集素(Vicia villosa lectin, VVL)受体这一特性,参照文献^[4]在脾细胞悬液(5×10^6 /ml)中,加入终浓度为 0.1mg/ml 的 VVL-FITC(Sigma 公司),冰浴 30min,洗涤细胞后调至原浓度,滴片,于荧光显微镜下计数 200 个细胞,计

算阳性细胞百分率(%)。

3. VVL⁺细胞、Ts 细胞的分离

以粘附盘化法从脾细胞悬液中分离获取 VVL⁺细胞^[5],以直接免疫荧光法鉴定 VVL⁺细胞含量>92%。参照文献^[6]分离获取 Ts 细胞,即于脾细胞悬液中加入大鼠抗小鼠 Lyt₂ 单抗,冰浴 30min,洗涤二次,加入预先包被有兔抗大鼠 Ig 的无菌塑料平皿中,室温 70min,轻轻冲出非粘附细胞,再用滴管用力冲下粘附的 Lyt₂ 阳性细胞(即 Ts),洗涤三次,以间接免疫荧光法(一抗为小鼠抗大鼠 Lyt₂⁺单抗,二抗为兔抗大鼠 Ig 的荧光抗体)鉴定 Ts 细胞纯度>95%,台盼蓝染色证明 VVL⁺细胞及 Ts 细胞存活率均>95%。

4. Tcs 细胞反抑制活性测定

于正常脾细胞悬液(5×10^6 /ml)中,加入终浓度为 10 μ g/ml 的有丝分裂原 ConA(Sigma 公司),置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中进行细胞培养,以 MTT 法检测 T 淋巴细胞转化,以 CTLL-2 细胞株检测细胞培养上清中 IL-2 活性,以间接免疫荧光法检测活化脾细胞中 IL-2R 阳性细胞百分率^[2]。于上述脾细胞培养系统中,加入伤后 4 天小鼠的 Ts 细胞(此时 Ts 细胞活性增强),可明显抑制 T 淋转、IL-2 诱生、IL-2R 表达,如在加入 Ts 细胞的同时,加入各组 VVL⁺细胞(各占细胞总数的 10%),则可根据 VVL⁺细胞对 Ts 细胞抑制活性的拮抗作用计算 Tcs 细胞反抑制率(%)^[7]。

$$\text{Ts 细胞抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{加 Ts 细胞组值}}{\text{未加 Ts 细胞组值}}\right) \times 100\%$$

$$\text{Tcs 细胞反抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{加 Tcs 细胞时 Ts 抑制率}}{\text{未加 Tcs 细胞时 Ts 抑制率}}\right) \times 100\%$$

*国家自然科学基金资助项目(No. 39400136)。

5. 各组血清、巨噬细胞、Ts 细胞在体外对 Tcs 细胞反抑制活性的影响

于正常 VVL⁺细胞悬液(1×10^6 /ml)中,分别加入各组血清(终浓度 10%)、巨噬细胞(占细胞总数 10%)、Ts 细胞(占细胞总数 10%),置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24h,离心弃上清以去除血清,根据巨噬细胞的贴壁特性可去除巨噬细胞,利用补体依赖的细胞毒方法去除 Ts 细胞,以 Hank's 液洗涤 VVL⁺细胞并调至原浓度,台盼蓝拒染试验测定 VVL⁺细胞存活率,并测定反抑制活性变化。

6. 创伤血清在体内对正常小鼠 Tcs 细胞的影响

收集正常小鼠及伤后 4 天小鼠的血清,分别输入至正常小鼠腹腔 1ml,1 次/天,连续 4 天,第 5 天处死小鼠,测定小鼠脾细胞中 VVL⁺细胞百分率及反抑制活性变化。

7. 数据处理

结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示,用 *t* 检验进行统计学分析。

结 果

1. 各组脾细胞中 VVL⁺细胞百分率及反抑制活性的变化

正常对照组脾细胞中 VVL⁺细胞百分率为 $8.1 \pm 1.2\%$,伤后 1、4、7、10、14 天组脾细胞中 VVL⁺细胞百分率分别为 $9.0 \pm 1.8\%$ 、 $6.1 \pm 1.0\%$ ($P < 0.01$)、 $6.9 \pm 1.3\%$ ($P < 0.05$)、 $7.7 \pm 1.3\%$ 、 $8.6 \pm 0.9\%$,即创伤小鼠脾细胞中 VVL⁺细胞百分率于伤后 4-7 天一过性降低;创伤后 4 天 Ts 细胞在体外对正常脾细胞 T 淋转具有明显抑制作用,正常小鼠脾细胞中 VVL⁺细胞在体外对此具有明显逆转效应,显示强烈的反抑制活性,创伤后 VVL⁺细胞反抑制活性于伤后 1 天即有降低,伤后 4~10 天降低更甚,伤后 14 天尚未完全恢复正常(见表 1)。

表 1 各组脾细胞中 VVL⁺细胞反抑制活性(T 淋转检测系统)的变化($\bar{x} \pm SD$, n=8)

| 组 别 | +伤后 4 天 Ts | +VVL ⁺ 细胞 | T 淋转(OD) | Ts 抑制率(%) | Tcs 反抑制率(%) |
|-------|------------|----------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| 正常脾细胞 | - | - | 0.53 ± 0.04 | | |
| 正常脾细胞 | + | - | $0.27 \pm 0.05^{**}$ | 49.1 ± 5.4 | |
| 正常脾细胞 | + | +正常对照 | $0.52 \pm 0.06^{**}$ | $1.9 \pm 0.3^{**}$ | 96.1 ± 10.2 |
| 正常脾细胞 | + | +伤后 1 天 | $0.40 \pm 0.05^{**}$ | $24.5 \pm 3.7^{***}$ | $50.1 \pm 8.6^{\#}$ |
| 正常脾细胞 | + | +伤后 4 天 | $0.32 \pm 0.06^{**\#}$ | $39.6 \pm 5.5^{**}$ | $19.3 \pm 5.5^{**}$ |
| 正常脾细胞 | + | +伤后 7 天 | $0.34 \pm 0.05^{**\#}$ | $35.8 \pm 6.2^{***}$ | $27.1 \pm 7.8^{**}$ |
| 正常脾细胞 | + | +伤后 10 天 | $0.34 \pm 0.06^{**\#}$ | $35.8 \pm 6.4^{***}$ | $27.1 \pm 6.4^{**}$ |
| 正常脾细胞 | + | +伤后 14 天 | $0.45 \pm 0.08^{**}$ | $15.1 \pm 2.2^{***\#}$ | $69.2 \pm 10.4^{\#}$ |

与正常脾细胞组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

与正常脾细胞+伤后 4 天 Ts 组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

与正常脾细胞+伤后 4 天 Ts+正常对照 Tcs 组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2. 各组血清、巨噬细胞、Ts 细胞在体外对 Tcs 细胞反抑制活性的影响

来源于正常对照及创伤小鼠的血清、巨噬细胞、Ts 细胞与正常 Tcs 细胞共同培养 24h 后,经台盼蓝染色,Tcs 细胞存活率均大于 95%(数据未列);和正常对照组相比,创伤小鼠血清、巨噬细胞、Ts 细胞在体外对正常 Tcs 细胞反抑制活性(T 淋转、IL-2、IL-2R 检测系统)

均具有不同程度的降低作用(见表 2-4)。

3. 创伤血清在体内对正常小鼠 VVL⁺细胞数目及活性的影响

和正常对照组相比,创伤后 4 天小鼠血清在体内对正常小鼠脾脏 VVL⁺细胞百分率无明显影响($P > 0.05$);但可明显降低正常小鼠 Tcs 细胞在 T 淋转、IL-2、IL-2R 检测系统中的反抑制活性(见表 5)。

表 2 各组血清、巨噬细胞、Ts 细胞在体外对正常 Tcs 细胞反抑制活性(T 淋转检测系统)的影响($\bar{x} \pm SD, n=8$)

| 组 别 | Tcs 反抑制率(%) | | |
|---------|-------------|------------|------------|
| | 血清组 | 巨噬细胞组 | Ts 细胞组 |
| 正常对照 | 64.0±8.7 | 68.8±5.5 | 55.3±4.5 |
| 伤后 1 天 | 24.1±4.5** | 40.5±7.9* | 45.2±3.7 |
| 伤后 4 天 | 4.1±0.7** | 18.8±3.4** | 34.5±3.9** |
| 伤后 7 天 | 12.1±2.1** | 37.4±6.8* | 32.6±4.8** |
| 伤后 10 天 | 68.0±9.7 | 53.6±6.9 | 38.5±6.5* |
| 伤后 14 天 | 72.0±8.4 | 66.4±9.3 | 49.7±5.8 |

与正常对照组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 3 各组血清、巨噬细胞、Ts 细胞在体外对正常 Tcs 细胞反抑制活性(IL-2 检测系统)的影响($\bar{x} \pm SD, n=8$)

| 组 别 | Tcs 反抑制率(%) | | |
|--------|-------------|------------|------------|
| | 血清组 | 巨噬细胞组 | Ts 细胞组 |
| 正常对照 | 91.2±8.2 | 62.4±6.7 | 81.2±8.4 |
| 伤后 4 天 | 39.2±4.5** | 24.9±3.7** | 25.0±4.2** |

与正常对照组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 4 各组血清、巨噬细胞、Ts 细胞在体外对正常 Tcs 细胞反抑制活性(IL-2R 检测系统)的影响($\bar{x} \pm SD, n=8$)

| 组 别 | Tcs 反抑制率(%) | | |
|--------|-------------|------------|------------|
| | 血清组 | 巨噬细胞组 | Ts 细胞组 |
| 正常对照 | 71.7±8.5 | 66.7±5.9 | 79.8±8.8 |
| 伤后 4 天 | 41.2±3.5** | 29.7±4.8** | 45.0±6.8** |

与正常对照组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 5 创伤血清在体内对正常小鼠 VVL⁺ 细胞数目及活性的影响($\bar{x} \pm SD, n=8$)

| 血清组别 | VVL ⁺ 细胞(%) | Tcs 反抑制率(%) | | |
|--------|------------------------|-------------|------------|-----------|
| | | T 淋转 | IL-2 | IL-2R |
| 正常对照 | 7.4±1.0 | 70.9±11.5 | 58.4±7.7 | 60.5±8.1 |
| 伤后 4 天 | 7.5±0.9 | 31.6±4.8** | 24.6±6.4** | 39.6±7.6* |

与正常对照组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

讨 论

Tcs 细胞的研究多数来自于小鼠的工作, 其表面标志与 Th 细胞同为 CD4⁺, 而人的 Tcs 却主要是 CD8⁺ 细胞的一个亚群。然而, 不管是小鼠还是人的 Tcs, 均表达 VVL 受体, 由于其功能与 Ts 细胞相反, 故命名为反抑制 T 细胞 (Tcs)^[4]。它可分泌反抑制因子作用于 Th 细

胞, 使之不能接受 Ts 细胞的抑制信号。故 Tcs 和 Th-Ts 细胞共同平衡着机体的免疫网络, 即“辅助-抑制-反抑制”调节网络。如果 T 细胞亚群的比例和/或功能发生改变, 就可破坏这一调节网络, 最终导致 T 细胞功能紊乱。有学者认为, 创伤后 Th 数目减少、Ts 数目增多伴活性增强、Th/Ts 比例倒置是导致创伤后 T 细胞功能受抑的重要原因^[2,3,6]。Decker 等^[7]近来证实, 手术应激可致 Th1/Th2 细胞平衡向 Th2

方向移动,并认为这一变化是导致手术患者 T 细胞介导的细胞免疫功能降低的原因之一。但上述研究均只是从 T 细胞的“辅助-抑制”调节网络变化的角度探讨创伤后 T 细胞功能受抑的发生机理,并未从反抑制调节的角度去探索。Kobayashi 等^[5]发现,甘草甜素可通过作用于 Tcs 细胞进而阻止烧伤小鼠 Ts 细胞的活性增高,这一结果间接说明了 Tcs 细胞可能参与了烧伤后的免疫抑制反应。但仍未直接回答创伤(或烧伤)后 Tcs 细胞是否发生改变这一问题。本研究发现,截肢伤小鼠脾脏中 VVL⁺细胞百分率于伤后 4-7 天明显降低;相比之下,Tcs 细胞活性变化的程度及持续时间则更为突出,Tcs 细胞在 T 淋转检测系统中的反抑制活性于伤后 1 天即有降低,伤后 4-10 天降低更甚,伤后 14 天尚未恢复正常。Tcs 细胞在 IL-2、IL-2R 检测系统中的反抑制活性于伤后 4 天均明显受抑。表明创伤可引起 Tcs 细胞比例(VVL⁺细胞百分率)及功能发生不同程度的改变。结合以往文献分析,我们推测,创伤体内可能存在着 T 细胞的辅助-抑制-反抑制免疫调节网络失衡。我们在另一实验中,曾观察到创伤后 Tcs 细胞的变化同多项 T 细胞功能的降低密切相关(另文报道),提示创伤后 Tcs 细胞的改变可能参与了 T 细胞功能受抑的调节过程。

大量研究证实,创伤后血清、巨噬细胞、Ts 细胞的免疫抑制作用增强^[3,8,9],这可能与创伤后血清中免疫抑制因子的形成、抑制型巨噬细胞及 Ts 细胞数目增多与抑制活性增强有关。我们在以往的研究中曾观察到,创伤后血清、巨噬细胞、Ts 细胞对 T 淋巴细胞功能的抑制作用增强^[10]。本实验进一步证实,创伤小鼠血清、巨噬细胞、Ts 细胞在体外对正常 Tcs 细胞在 T 淋转检测系统中的反抑制活性均具有不同程度的降低作用,其中创伤血清、巨噬细胞的抑制作用出现较早(伤后 1-7 天),Ts 细胞抑制作用的出现相对较迟(伤后 4-10 天),这可能与创伤后 Ts 细胞常在免疫抑制因子形成及抑制型巨噬细胞活性增强之后才被激活有关^[6]。此外,

创伤小鼠血清、巨噬细胞、Ts 细胞在体外对正常 Tcs 细胞在 IL-2、IL-2R 检测系统中的反抑制活性均具有明显的抑制作用,但三者与正常 Tcs 细胞共同培养 24h,并不影响 Tcs 细胞存活率。提示创伤小鼠血清、巨噬细胞、Ts 细胞在体外对 Tcs 细胞功能抑制效应的发挥并非是通过其直接的细胞毒杀伤作用而介导。我们还观察到,创伤后 4 天小鼠血清在体内虽对正常小鼠脾脏 VVL⁺细胞百分率无明显影响,但可明显降低正常小鼠 Tcs 细胞在 T 淋转、IL-2、IL-2R 检测系统中的反抑制活性。上述结果表明,创伤后血清、巨噬细胞、Ts 细胞均参与介导了 Tcs 细胞功能的改变过程。有关创伤后 Tcs 细胞变化的详细机理尚须深入研究。

摘 要

研究了创伤小鼠反抑制 T 细胞(Tcs)比例、功能的变化及创伤血清、巨噬细胞、抑制性 T 细胞(Ts)对正常小鼠 Tcs 细胞的影响。结果表明,创伤小鼠脾细胞中 VVL⁺细胞百分率于伤后一过性减少,Tcs 细胞在 T 淋转、IL-2、IL-2R 检测系统中的反抑制活性均明显受抑;创伤小鼠血清、巨噬细胞、Ts 细胞在体外对正常 Tcs 细胞反抑制活性(T 淋转、IL-2、IL-2R 检测系统)均具有不同程度的抑制作用,创伤后 4 天小鼠血清在体内对正常小鼠脾脏 VVL⁺细胞百分率无明显影响,但可明显降低正常小鼠 Tcs 细胞的反抑制活性。表明创伤可致 Tcs 细胞比例及功能发生改变,创伤后血清、巨噬细胞、Ts 细胞参与介导了 Tcs 细胞功能的受抑过程。

关键词: 创伤 反抑制 T 细胞 血清 巨噬细胞 抑制性 T 细胞

参 考 文 献

- [1] De, A. K., et al., 1997, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 82(1):73-77.

- [2] O'Riordain, D. S., et al., 1995, *Arch. Surg.*, 130:165-170.
- [3] Zapata-Sirvent, R., et al., 1986, *Arch. Surg.*, 121: 116-122.
- [4] Ptak, W., et al., 1992, *Cell. Immunol.*, 144: 95-99.
- [5] Kobayashi, M., et al., 1993, *Immunol. Cell. Biol.*, 71: 181-188.
- [6] Suzuki, F., et al., 1988, *Immunol. Lett.*, 19: 33-38.
- [7] Decker, D., et al., 1996, *Surgery.*, 119 (3):316-322.
- [8] Miller-Graziano, C. L., et al., 1990, *J. Trauma.*, 30(S12):S86-S94.
- [9] Quattrocchi, K. B., et al., 1992, *J. Neurosurg.*, 77: 694-699.
- [10] 梁华平等, 1996, 解放军医学杂志, 21(1): 32-34.

EFFECTS OF SERUM, MACROPHAGES, SUPPRESSOR T CELLS FROM TRAUMATIZED MICE ON CONTRASUPPRESSOR T CELLS

LIANG Hua Ping Wang Zheng Guo ZHU Pei Fang GENG Bo LUO Yan XU Xiang
(Research Institute of Surgery, Daping Hospital,
Third Military Medical University, Chongqing 400042)

ABSTRACT

Changes of contrasuppressor T cells (Tcs) proportion and function in traumatized mice were studied, and effects of serum, macrophages, suppressor T cells (Ts) posttrauma on Tcs cells from normal mice were investigated. The results showed that the percentage of vicia villosa lectin (VVL) positive (VVL⁺) cells in splenocytes from traumatized mice was transiently decreased, while contrasuppressive activity of Tcs was obviously depressed in the cell culturing system measuring T lymphocytes transformation, interleukin 2 (IL-2) and IL-2 receptor (IL-2R). Serum, macrophages, Ts cells from traumatized mice in vitro showed suppressive effect on contrasuppressive activity of normal Tcs cells (in the cell culturing system measuring T lymphocytes transformation, IL-2 and IL-2R) at various degrees, serum from traumatized mice on day 4 in vivo had no significant effect on percentage of VVL⁺ cells in splenocytes from normal mice, but markedly decreased contrasuppressive activity of Tcs cells. It is suggested that trauma may result in changes of Tcs proportion and activity, and serum, macrophages, Ts posttrauma are involved in mediating the suppression of Tcs cells function.

Key words: Trauma Contrasuppressor T cells Serum Macrophages Suppressor T cells

This work was supported by national natural science foundation of China (No. 39400136).

实验技术

实验性肾炎鼠肾小球巨噬细胞的分离与鉴定*

蔡松敏 李惊子 王海燕

(北京医科大学第一医院、北京医科大学肾脏病研究所 北京 100034)

巨噬细胞(MΦ)在实验动物和人类增殖性肾小球肾炎发病过程中的作用正受到人们的重视^[1]。MΦ可产生中性蛋白酶、活性氧代谢产物

*本课题获国家自然科学基金(39070389)及卫生部“九五”攻关基金资助。