文章编号:1000-5404(2005)15-1541-03

论著

内皮细胞表达CD137分子介导对T细胞的抑制效应

张利永[1],黄 钢[1],傅晓岚[2],肖宇宏[1],张立群[1],白 云[1] (第三军医大学:[1]基础医学部分子遗传学教研室,[2]高原军事医学系中心实验室,重庆 400038)

提 要:目的 研究内皮细胞表达的CD137分子与活化的T细胞表达的CD137L交联后对T细胞的刺激效应。**方法** 将活化的内皮细胞与活化的T细胞共培养,ELISA检测共培养上清中IL-2、IL-10和IFN-γ的含量;流式细胞仪检测内皮细胞表面标志分子CD25、CD69的表达变化;CCK-8试剂盒检测T细胞存活率,并观察用融合蛋白抗-CD137阻断CD137-CD137L共刺激通路后T细胞分泌细胞因子的变化。**结果** 采用细胞共培养后,T细胞分泌IL-2、IL-10和IFN-γ的水平下降,而且CD25、CD69的表达水平降低,T细胞存活率下降,应用抗-CD137单克隆抗体阻断CD137-CD137L相互作用后,IL-2、IL-10和IFN-γ的分泌水平升高,CD25、CD69的表达上调,T细胞存活率上升。**结论** 活化的内皮细胞诱导表达CD137蛋白分子与活化的T细胞上诱导表达的CD137L相互作用,通过CD137L向T细胞内传递抑制信号,抑制了T细胞合成和分泌细胞因子的功能。表明CD137-CD137L信号通路在内皮细胞与T细胞的信号作用中有着重要的地位。

关键词: CD137;CD137L;共刺激分子
中图法分类号: R322.123; R392-33; R392.11 **文献标识码:** A

Inhibition effect of CD137 from human umbilical vein endothelial cell on activated T cell

ZHANG Li-yong[1], HUANG Gang[1], FU Xiao-lan[2], XIAO Yu-hong[1], ZHANG Li-qun[1], BAI Yun[1] ([1]Department of Molecular Genetics, College of Medicine, [2]Central Laboratory, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To detect that CD137 expressed by human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) provides costimulatory signals to inhibit the function of synthesizing cytokines and the release of activated T cells by its combination with CD137L from activated T cells. **Methods** HUVECs were cultured with activated T cells, and the level of IL-2, IL-10 and IFN-γ in the supernanant of the coculture and the expression of CD25, CD69 on activated T cells and the viability of T cells were examined. **Results** The secretion of IL-2, IL-10, IFN-γ were obviously decreased by activated T cells. The expression of CD25, CD69 was down-regulated on activated T cells, and the viability of T cells also decreased. However, the blocking of CD137-CD137L interaction by anti-CD137 monoclonal antibodies enhanced the expression and the release of these cytokines. **Conclusion** CD137L on activated T cells mediates an inhibitory signal to T cells and leads to decrease the synthesis and secretary of cytokines. CD137-CD137L plays a critical role in the interaction of HUVECs and T cells.

Key words: CD137; CD137L; costimulatory molecule

T细胞活化依赖于双信号作用[1],即除Ag-MHC复合物提供的特异性抗原刺激信号外,还需要非抗原特异的和非MHC限制的共刺激信号,T细胞只有获得这两重信号后,才能发生有效的活化、增殖进而发挥其功能,如分泌细胞因子或细胞毒性T细胞(CTL)的溶细胞效应。若失去第一信号,可导致T细胞失活和死亡。同样,若缺乏共刺激信号,T细胞将进入无反应状态,甚至发生凋亡[2]。

CD137及其配体CD137L之间的作用是双向作用相互活化,介导双向信号传导,促进免疫反应。CD137与其配体CD137L结合后,CD137L可以传递反向信号诱导细胞的增殖或凋亡。研究表明,CD137L分子持续表达在人外周血单核细胞上,CD137作用于CD137L产生的反向信号可诱导M-CSF的产生和刺激人外周血单核细胞增殖。因此,目前CD137L被认为是一种新的单核细胞活化和增殖因子,也参与机体的多种免疫应答[3]。就其表达于T细胞而言,CD137L可协同刺激活化表达CD137的T细胞;另一方面,CD137可使表达CD137L的T细胞发生凋亡,以起到免疫调节作用,然而,CD137在诱导凋亡时,CD137可

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973项目",G1999054203);国家自然科学基金资助项目(30271246)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054203) and the National Natural Science Foundation of China (30271246)

作者简介: 张利永(1970-),男,河北省保定市人,博士研究生,主管技师,主要从事分子免疫方面的研究。电话:(023)68753925
通讯作者: 白 云,电话:(023)68752258

收稿日期: 2005-06-09;**修回日期:** 2005-06-25

通过促进 Fas 的表达，诱导 T 细胞凋亡，CD137 可能还可介导不依赖 Fas 的凋亡途径[4]。

基于以上分析，CD137L 可以和 CD137 蛋白分子结合传递细胞增值或凋亡信号，但是，在内皮细胞与 T 细胞的相互作用中，CD137L 所传递的刺激信号会对 T 细胞的生物效应产生怎样的影响？以及在与其它的蛋白分子的协同刺激中占有怎样的地位呢？我们将通过以下的实验进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

IFN-γ、IL-1β 购自英国 Peprotech 公司；ECGS、丝裂霉素 C、PHA 购自美国 Sigma 公司；IL-2 由全军免疫学研究所提供；IL-2、IL-10、IFN-γ 3 种 ELISA 试剂盒购自北京晶美公司；抗-CD25 单克隆抗体、抗-CD69 单克隆抗体、抗-CD137 单克隆抗体购自美国 Ancell 公司；PE 标记的羊抗鼠抗体、PE 标记的同型对照抗体、同型对照抗体购自北京晶美公司；Cell counting kit 购自日本 Dojindo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HUVEC 培养及鉴定

用 D-Hanks 将脐静脉冲洗干净，以 0.1% 胶原酶 37 ℃消化 15min，收集消化液离心（1 000 r/min，10 min）后弃上清，加入内皮细胞培养基（M199 培养基 9.6 g/L、20% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml、ECGS 45 μg/ml、肝素 100 μg/ml，pH 7.2）吹打成细胞悬液，计数后接种于一次性塑料培养瓶（25 cm^2），37 ℃、5% CO_2 孵箱孵育，24 h 后换液，细胞呈现典型内皮细胞形态－鹅卵石样，以后每天换液 1 次。细胞 2～3 d 融合成片后传代培养，细胞在 3～6 代时用于实验。台盼蓝染色细胞活性在 95% 以上，经Ⅷ因子相关抗原免疫组化鉴定阳性，细胞纯度在 90% 以上，符合实验要求。

1.2.2 活化 T 细胞与内皮细胞混合培养实验步骤

1.2.2.1 刺激细胞的制备 用分离培养的脐静脉内皮细胞作为刺激细胞，培养于 25 cm^2 塑料培养瓶中，用 IFN-γ（1 000 U/ml）+ IL-1β（10 ng/ml）、刺激 48 h。加入丝裂霉素 C（25 μg/ml），于 37 ℃水浴中作用 30 min，弃上清，细胞用 Hanks 液洗涤 3 次。于新鲜完全培养基中继续培养，达 80%～90% 融合时，其细胞密度为（1～2）×10^6/ml。

1.2.2.2 反应细胞的制备 密度梯度离心法分离 PBMC，用尼龙毛柱分离纯化 T 细胞，用 PHA（20 μg/ml）+ IL-2（20 U/ml）刺激活化 3 d 的 T 细胞作为反应细胞。1 000 r/min 离心 10 min，弃上清，沉淀细胞用 Hanks 液洗涤 3 次。离心后重悬于新鲜完全培养基中，调整细胞数为（1～2）×10^6/ml。

1.2.2.3 实验分组 ①活化 T 细胞；②活化 T 细胞 + 活化 HUVECs；③活化 T 细胞 + 活化 HUVECs + 抗-CD137：按 1.2.2.1 制备的刺激细胞洗涤后加抗-CD137（10 μg/ml）继续孵育 2 h，用 Hanks 液洗涤 3 次，再加入活化的 T 细胞到 HUVECs 培养瓶中；④活化 T 细胞 + 活化 HUVECs + 对照抗体：按 1.2.2.1 制备的刺激细胞洗涤后加对照抗体（10 μg/ml）继续孵育 2 h，用 Hanks 液洗涤 3 次，再加入活化的 T 细胞到 HUVECs 培养瓶中。

内皮细胞与 T 细胞共培养，5～7 d 后分别收集上清和 T 细胞。

1.2.3 细胞因子 IL-2、IL-10 和 IFN-γ 测定 按照 ELISA 试剂盒说明操作进行，检测原理为检测未知抗原的双抗体夹心法。

1.2.4 T 细胞上 CD25 的表达检测 流式细胞仪检测活化 T 细胞上 CD25 的表达。抗体稀释 1∶100 CD25。

1.2.5 T 细胞的存活率的检测 Cell counting kit 8 试剂盒，按操作手册说明，酶标仪以 450 nm 波长测定每孔的吸光度值（A）。计算细胞存活率：

$$细胞存活率(\%) = \frac{A(显色后实验组)-A(空白组)}{A(显色前实验组)-A(空白组)} \times 100\%$$

1.3 统计学处理

应用 SPSS 10.0 软件进行配对资料的 t 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 活化的内皮细胞对活化 T 细胞的刺激效应及其分泌的细胞因子的变化

经 ELISA 检测 4 组不同条件下活化 T 细胞共培养上清中细胞因子 IL-2、IL-10 和 IFN-γ 水平的变化。结果显示：活化 T 细胞在活化的内皮细胞刺激下细胞因子 IL-2、IL-10 和 IFN-γ 的分泌量较未刺激组和抗-CD137 mAb 阻断组明显降低，经统计软件 SPSS 10.0 分析有显著统计学意义；加入对照抗体的对照组与未刺激组相比也有统计学意义；而且抗-CD137 mAb 阻断组与加入对照抗体的对照组相比也有显著统计学意义。说明抗-CD137 mAb 阻断了 CD137-CD137L 的相互作用（表 1）。

表 1 活化 T 细胞对 HUVECs 分泌细胞因子的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Effect of activated HUVECs on cytokine release from activated T cells（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Group	IL-2	IL-10	IFN-γ
Activated T cell	54.4 ± 4.0	554.0 ± 13.7	697.4 ± 3.6
Activated T cell + activated HUVECs	40.2 ± 1.9 *	445.0 ± 9.0 *	317.6 ± 17.5 *
Activated T cell + activated HUVECs + anti-CD137	83.1 ± 2.1 *	821.5 ± 11.9 *	824.1 ± 5.3 *
Activated T cell + activated HUVECs + control	40.9 ± 2.3 *	459.8 ± 12.2 *	293.7 ± 14.9 *

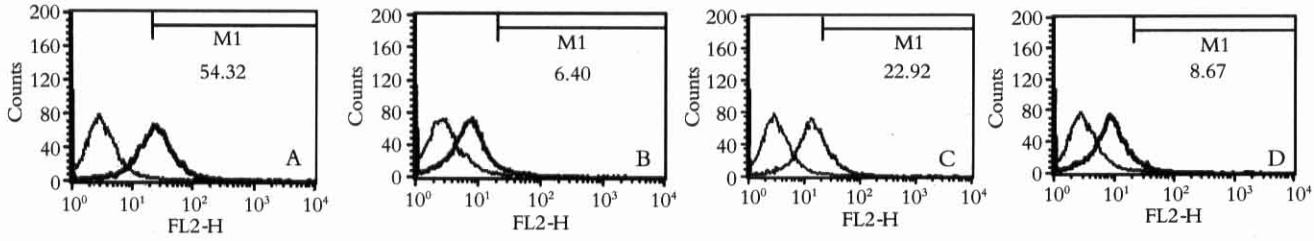
*：$P<0.05$，*vs* activated T cell

2.2 活化 T 细胞在活化的内皮细胞刺激下分泌 CD25 的变化

经流式细胞仪检测 4 组不同条件下，活化的内皮细胞与活化 T 细胞共培养 5 d 后，活化 T 细胞表面的 CD25 的变化。结果显示：CD25 的表达较未刺激组降低 46.92%；较阻断组降低 31.4%。经统计学处理有显著差别（$P<0.01$）（图 1）。

2.3 活化的内皮细胞对活化 T 细胞的刺激及对 T 细胞存活率的变化

应用 Cell counting kit 8 检测活化 T 细胞经活化的内皮细胞刺激后 T 细胞的存活率。结果显示：活化 T 细胞与 HUVECs 共培养情况下与活化 T 细胞相比较，T 细胞的存活率从 94% 下降到 57%，应用抗-CD137 阻断 CD137-CD137L 共刺激通路后，T 细胞的存活率又上升至 88%。所以，内皮细胞与活化 T 细胞共培养组较未刺激组和应用抗体阻断组明显降低，经统计学处理有显著差异（$P<0.01$）。



A: Activated T cell; B: Activated T cell + activated HUVECs; C: Activated T cell + activated HUVECs + anti-CD137; D: Activated T cell + activated HUVECs + control

图 1　流式细胞仪检测活化 T 细胞与活化内皮细胞共培养过程中 CD25 分子的表达

Fig 1　Detection of CD25 expression by coculture of activated endothelial cells and activated T cells

3　讨论

迄今为止，CD137L 传导的反向信号介导了细胞的功能尚不确定，包括增生、抑制和凋亡。CD137L 表达于单核细胞、树突状细胞、B 细胞、骨髓细胞及癌细胞上是往往介导的是诱导细胞增殖及细胞因子合成和分泌的功能[5,6]。Schwarz 等[7]将表达 CD137 的 CHO 细胞与 CD3 单抗刺激的初级 PBMC 或预活化的 PBMC 共同培育，发现后两者的增殖均被抑制。Kienzle 等[8]应用细胞共培养技术研究发现，单核细胞和 B 细胞的直接接触引起 CD137 分子与其配体交联后导致 B 细胞凋亡水平上升，说明 CD137 分子具有调节 B 细胞的凋亡的作用。

有关 CD137L 介导细胞凋亡的原因还有另外一个解释，Langstein 等[9]研究发现，表达在单核细胞上的 CD137L 所传导的信号诱导了 M-CSF 的合成和分泌，而 M-CSF 是影响单核细胞存活的重要细胞因子，它很大程度的延长细胞的存活时间。但是，同时发现 CD137L 也诱导了单核细胞的凋亡。所以，其可能的原因就是，CD137L 诱导单核细胞增殖的能力远远超过了其诱导凋亡的程度。

我们采用细胞共培养技术，用活化的内皮细胞与活化的 T 细胞共培养，我们用活化的内皮细胞是因为 CD137 在内皮细胞上的表达量低，活化后表达量上调后能更好的进行功能观察。混合培养时用丝裂霉素 C 处理活化的内皮细胞使失去增殖能力，进而观察共培养过程中 CD137-CD137L 的相互作用对 T 细胞的刺激效果。

结果显示 CD137-CD137L 的相互作用抑制了 T 细胞的增殖和分泌能力。活化的内皮细胞通过 CD137-CD137L 刺激通路抑制了 T 细胞合成和分泌 IL-2、IL-10 和 IFN-γ，而且 T 细胞的表面标志分子 CD25 表达降低。另外，检测 T 细胞存活率得知细胞存活率下降，说明部分 T 细胞发生了死亡。实验中应用 anti-CD137 mAb 阻断 CD137-CD137L 的相互作用，得出的结果有统计学意义，说明了 CD137-CD137L 刺激通路发挥了重要作用，CD137L 向 T 细胞内传递了抑制或凋亡信号。但是 CD137-CD137L 在内皮细胞与 T 细胞作用中的作用也还有待进一步的研究明确。

另外，因为活化的内皮细胞表达了 MHC-Ⅱ类分子，经 IFN-γ 刺激后内皮细胞也上调表达了其它的共刺激分子，而且 T 细胞活化后也可表达相应的共刺激分子，CD137-CD137L 刺激通路与其它共刺激分子之间的关系还有待进一步研究。本实验也为以后研究奠定了基础，尤其是在移植方面的研究提供了新的思路，可以建立和增强 CD137-CD137L 的相互作用来诱导 T 细胞的凋亡，从而抑制移植排斥的发生。

参考文献：

[1] DeFina R, Christopher K, He H, *et al*. Analysis of costimulation by 4-1BBL, CD40L, and B7 in graft rejection by gene expression profiles [J]. J Mol Med, 2003, 81 (10): 655 - 663.

[2] Seo S K, Park H Y, Choi J H, *et al*. Blocking 4-1BB/4-1BB ligand interactions prevents herpetic stromal keratitis [J]. J Immunol, 2003, 171 (2): 576 - 583.

[3] Kim H H, Kwack K, Lee Z H. Activation of c-jun N-terminal kinase by 4-1BB (CD137), a T cell co-stimulatory molecule[J]. Mol Cells, 2000, 10 (3): 247 - 252.

[4] Ebata T, Mogi S, Hata Y, *et al*. Rapid induction of CD95 ligand and $CD4^+$ T cell-mediated apoptosis by CD137 (4-1BB) costimulation [J]. Eur J Immunol, 2001, 31 (5): 1410 - 1416.

[5] Laderach D, Wesa A, Galy A. 4-1BB-Ligand is regulated on human dendritic cells and induces the production of IL-12[J]. Cell Immunol, 2003, 226(1): 37 - 44.

[6] Saito K, Ohara N, Hotokezaka H, *et al*. Infection-induced up-regulation of the costimulatory molecule 4-1BB in osteoblastic cells and its inhibitory effect on M-CSF/RANKL-induced *in vitro* osteoclastogenesis [J]. J Biol Chem, 2004, 279(14): 13555 - 13563.

[7] Schwarz H, Blanco F J, von Kempis J, *et al*. ILA, a member of the human nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family, regulates T-lymphocyte proliferation and survival[J]. Blood, 1996, 87 (7): 2839 - 2845.

[8] Kienzle G, von Kempis J. CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes[J]. Int Immunol, 2000, 12 (1): 73-82.

[9] Langstein J, Schwarz H. Identification of CD137 as a potent monocyte survival factor[J]. J Leukoc Biol, 1999, 65(6): 829 - 833.

（编辑　周　芳）