文章编号:1000-5404(2005)16-1671-03

论著

T细胞表达CD137L分子介导对血管内皮细胞的活化刺激效应

张利永[1],傅晓岚[2],肖宇宏[1],黄 钢[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 探讨活化T细胞表面表达的CD137L分子对内皮细胞功能的影响。**方法** 将活化的T细胞与内皮细胞共培养,ELISA检测共培养上清中IL-1、IL-8的含量;流式细胞仪检测内皮细胞表面粘附分子ICAM-1的表达变化,并观察用融合蛋白CD137-Fc阻断CD137-CD137L共刺激通路后内皮细胞分泌细胞因子的变化。**结果** 活化的T细胞刺激了内皮细胞活化,诱导了内皮细胞合成和分泌细胞因子IL-1、IL-8以及粘附分子ICAM-1的表达;可溶性融合蛋白CD137-Fc成功地阻断了CD137-CD137L的相互作用,内皮细胞合成和分泌细胞因子的能力降低。**结论** 证明CD137-CD137L的相互作用在内皮细胞与T细胞的相互作用中发挥了重要的作用,提示CD137与其配体交联具有刺激内皮细胞活化的生物学功能。

关键词:CD137;CD137L;CD137-Fc;共刺激分子
中图法分类号:R322.12;R392.2 **文献标识码**:A

Effects of CD137 ligand on activated T cell on activation of human umbilical vein endothelial cell

ZHANG Li-yong[1], FU Xiao-lan[2], XIAO YU-hong[1], HUANG Gang[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 the activation of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) by CD137 ligand on activated T cell. **Methods** HUVEC was cocultured with activated T cells and the level of IL-1 and IL-8 in the supernatant of the coculture and expression of ICAM-1 on HUVEC were examined. **Results** Activated T cells augmented the release of IL-1 and IL-8 by HUVEC and the expression of the adhesion molecule ICAM-1 on HUVEC, which could be blocked by CD137-Fc. **Conclusion** CD137 transduces the activating signals to HUVEC by combining the CD137L on activated T cells.

Key words: CD137; CD137L; CD137-Fc; costimulatory molecule

T淋巴细胞活化需要两个信号,共刺激分子传导的第二信号对于T淋巴细胞的活化是必须的。共刺激分子均是以受体配体相互作用的方式介导信号,表达在人活化T细胞上的CD137和其配体相互作用,可维持$CD4^+$、$CD8^+$T细胞较长时间的存活,延长其免疫应答效应[1]。我们初步研究已经证实了内皮细胞表面有CD137分子的组成性表达。资料显示,活化T细胞可以诱导CD137L的表达[2],同时我们也成功诱导了活化T细胞表面CD137L分子的表达。所以,本研究采用共培养内皮细胞与T细胞,观察T细胞表达的CD137L与内皮细胞表达的CD137交联后对血管内皮细胞的活化刺激效应。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

ECGS、丝裂霉素C、PHA购自美国Sigma公司;IL-2由全军免疫研究所提供;IL-8、IL-1β ELISA试剂盒购自北京晶美公司;CD137-Fc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;ICAM-1(CD54)单克隆抗体购自美国eBioscience公司。

1.2 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15 min,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,

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999-054203),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)
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:13102910621
通讯作者:白 云,电话:(023)68752258
收稿日期:2005-06-09;修回日期:2005-07-15

pH 7.2)吹打成细胞悬液,计数后接种一次性塑料培养瓶(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 代时用于试验。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呈阳性,细胞纯度在 90% 以上,符合实验要求.

1.3 活化 T 细胞与内皮细胞混合培养

1.3.1 刺激细胞的准备 Ficoll 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 细胞作为刺激细胞。加入丝裂霉素 C(25 μg/ml),于 37 ℃水浴中作用 30 min ,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。

1.3.2 反应细胞的准备 用分离培养的脐静脉内皮细胞作为反应细胞,培养于 25 cm^2 塑料培养瓶中,达 80% ~ 90% 融合时,其细胞密度约为(1 ~ 2) × 10^6/ml。

1.3.3 试验分组 ①HUVEC;②HUVEC + 活化 T 细胞;③HUVEC + 活化 T 细胞 + CD137-Fc,步骤 1 制备的刺激细胞洗涤后加 CD137-Fc(10 μg/ml)继续孵育 2 h ,1 000 r/min 离心 10 min,用 Hanks 液洗涤 3 次,再加入到 HUVEC 培养瓶;④HUVEC + 活化 T 细胞 + 对照抗体,步骤 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 ,1 000 r/min 离心 10 min,用 Hanks 液洗涤 3 次,再加入到 HUVEC 培养瓶。

活化 T 细胞与 HUVEC 共培养,5 ~ 7 d 后分别收集上清和 HUVEC。IL-1β、IL-8 测定按照 ELISA 试剂盒说明操作进行细胞因子,检测原理为检测未知抗原的双抗体夹心法。流式细胞仪检测内皮细胞上粘附分子 ICAM-1 的表达。抗体 1∶400 稀释 ICAM-1。

1.4 统计学处理

统计学处理应用 SPSS 10.0 软件进行配对资料的 t 检验。

2 结果

2.1 活化的 T 细胞对内皮细胞的刺激效应及内皮细胞分泌的细胞因子的变化

经 ELISA 检测 4 组不同条件下 HUVEC 的培养上清中细胞因子 IL-1β、IL-8 水平的变化,结果显示:HUVEC 在活化 T 细胞刺激下细胞因子 IL-1β、IL-8 的分泌量较未刺激组和 CD137-Fc 阻断组明显升高,经统计学处理有显著差别($P < 0.01$),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 CD137-Fc 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 CD137-Fc 阻断了 CD137/CD137L 的相互作用(表 1)。

2.2 活化的 T 细胞对内皮细胞的刺激效应及内皮细胞分泌 ICAM-1 的变化

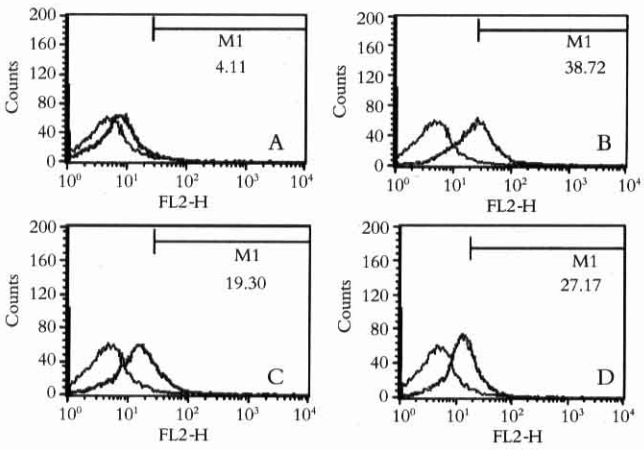
经流式细胞仪检测 4 组不同条件下 HUVEC 的表面粘附分子 ICAM-1 的水平变化,结果显示:HUVEC 在活化 T 细胞刺激下粘附分子 ICAM-1 的表达较未刺激组和阻断组明显升高,由 4.11% 升高到 38.72%;阻断组较刺激组下降到 19.30%(图 1)。经统计学处理有显著差异($P < 0.01$)。

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

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

Groups	IL-1β	IL-8
HUVEC	3.3 ± 0.3	101.5 ± 11.5
HUVEC + activated T cell	5.3 ± 0.4 **	463.3 ± 17.2 **
HUVEC + activated T cell + CD137-Fc	4.4 ± 0.3 *	406.6 ± 7.5 **
HUVEC + activated T cell + control Ab	5.4 ± 0.4 *	467.9 ± 6.5 **

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, *vs* HUVEC



A: HUVEC; B: HUVEC + activated T cell; C: HUVEC + activated T cell + CD137-Fc; D: HUVEC + activated T cell + control Ab

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

Fig 1 Detection of the ICAM-1 expression within coculture of endothelial cells and activated T cells

3 讨论

CD137L 所介导的共刺激信号与 CD28-B7 共刺激信号有协同作用,但两者在免疫应答的不同时期具有不同的作用优势。CD28 对于 T 细胞增殖的早期是至关重要的,而 CD137-CD137L 信号则影响免疫应答中较晚期的 T 细胞数量且对记忆性 $CD8^+$ T 细胞群的存活和/或应答是必需的[3]。Cannons 等的研究亦证实 CD28 在 T 细胞增殖早期具有重要的作用,而 CD137-CD137L 则主要在维持 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞应答以及增强其细胞分化和效应 T 细胞功能方面起作用[1]。

CD137-CD137L 可不依赖于 CD28/B7 而发挥信号传递功能。Saoulli 等[4]联合应用抗-CD3 和可溶性 CD137L 可诱导 $CD28^+$ 或 CD28-T 细胞产生 IL-2 ,也就是,CD137L 能够通过 CD28 非依赖途径协同刺激 T 细胞;而自 TRAF2 缺陷鼠或 TRAF2 阴性表达鼠分离的静息 T 细胞在对可溶性 CD137L 的应答中不能增加 IL-2 的产生,可见 CD137-CD137L 是通过 TRAF2 分子

给静息 T 细胞提供 CD28-非依赖的共刺激信号。

Wilocox 等近期研究表明 CD137 作为一重要的受体参与调节 DC 的功能，发现经新鲜分离的鼠脾脏 DC 和骨髓来源 DC 表面均有 CD137 表达，且有可溶性 CD137 存在，他们采用表达 CD137 的 DC 与表达 CD137L 的 P815 细胞共培养，发现 CD137 可以活化 DC，而且刺激 DC 分泌 IL-6、IL-12 等细胞因子，因此 DC 的功能增强是由表达于 DC 表面 CD137 受体参与调节的[5]。Futagawa 等[6]也采用共培养技术，他们将表达 CD137 的脾脏 DC 与 CD137L 转染的细胞获表达 CD137L 的肿瘤细胞系共培养，发现 CD137L 可以直接活化 DC，可以诱导 DC 合成和分泌 IL-6、IL-12 等细胞因子。

在前期研究中，我们将活化的内皮细胞与活化的 T 细胞共培养，结果发现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[7]。在本研究中我们将活化的 T 细胞与静止的内皮细胞共培养，活化的 T 细胞表达 CD137L，内皮细胞表达低量的 CD137，CD137/CD137L 结合引起了内皮细胞的活化，增强内皮细胞合成和分泌 IL-1β、IL-8 等细胞因子以及粘附分子 ICAM-1 上调表达。考虑到内皮细胞和活化 T 细胞表面分泌表达有多种蛋白分子，是否其他的蛋白分子参与了内皮细胞的活化？所以，我们使用可溶性融合蛋白 CD137-Fc 阻断 CD137/CD137L 的相互作用，并经统计学分析，结果显示有显著性差异，说明使用可溶性融合蛋白 CD137-Fc 阻断的效果有统计学意义。实验结果显示，CD137 在活化 T 细胞对内皮细胞的刺激过程中发挥了重要的作用，这也为进一步研究内皮细胞与 T 细胞的相互作用打开了思路。

参考文献：

[1] Cannons J L, Lau P, Ghumman B, *et al*. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy[J]. J Immunol, 2001, 167(3): 1313 - 1324.

[2] Goodwin R G, Din W S, Davis Smith T, *et al*. Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor[J]. Eur J Immunol, 1993, 23(10): 2631 - 2641.

[3] Bertram E M, Lau P, Watts T H. Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection[J]. J Immunol, 2002, 168(8): 3777 - 3785.

[4] Saoulli K, Lee S Y, Cannons J L, *et al*. CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand[J]. J Exp Med, 1998, 187(11): 1849 - 1862.

[5] Wilcox R A, Chapoval A I, Gorski K S, *et al*. Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells[J]. J Immunol, 2002, 168(9): 4262 - 4267.

[6] Futagawa T, Akiba H, Kodama T, *et al*. Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells [J]. Int Immunol, 2002, 14(3): 275 - 286.

[7] 张利永，黄　钢，傅晓岚. 内皮细胞表达 CD137 分子介导对 T 细胞的抑制效应[J]. 第三军医大学学报，2005，27(15)：1541 - 1543.

（编辑　周　芳）

（上接 1666 页）

置入 1 根引流管引流脾床。清点器械后关腹，逐层缝合手助切口，创可贴粘合脐部及左肋下小切口，手术结束。术中出血约 100 ~ 600 ml。手术时间 2 ~ 2.5 h。术中输血 200 ~ 600 ml。

1.4　术后处理

常规静脉输入止血药，渗出较多的病人静脉输入纤维蛋白原。术后病人恢复顺利，疼痛少，术后 2 d 取出腹腔引流管。病人多于术后 2 d 有肛门排气，并可下床活动，第 3 天能进食流质。手助切口 7 d 后拆线。术后使用抗生素 3 d。糖皮质激素应用 3 d。术后无发热，7 d 后病人出院。

2　讨论

腹腔镜脾切除术已成功用于治疗血液系统疾病，但腹腔镜用于门静脉高压症脾切除门奇断流术少有报道[3]。由于脾组织较脆、易碎、易于出血，术中很难抓持和牵引，故腹腔镜脾切除尤其是巨脾切除有一定困难。手助设备的出现，使术者的手可以通过腹壁小切口进入腹腔，使术者可以用手去进行触诊，鉴别组织，进行分离、牵引以及控制出血，降低腹腔镜手术的风险和难度。同时在整个手术期间很好地维持气腹。另外，超声止血刀的出现使得外科医生在腹腔镜下能切割、凝固较粗的血管[4]。使用超声刀分离脾周韧带及贲门周围血管可以切割、凝固多数血管，使门脉高压症曲张成团的血管于腹腔镜下处理成为可能。自 2001 年 11 月我们开展首例手助腹腔镜脾切除门奇静脉断流术以来，共完成了 22 例。均获得成功。除初始阶段手术时间较长、术中出血稍多外，所有的该种手术病例都顺利。因此，手助腹腔镜下超声刀脾切除门奇静脉断流术是可行的，既能达到传统手术的疗效，又能保持腹腔镜微创手术优点，值得推广使用。

关键词：腹腔镜；脾切除；门奇静脉断流术

中图法分类号：R657.6　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Lozano Salazar R R, Herrera M F, Vargas Voracekova F, *et al*. Laparoscopic versus open splenectomy for immune thrombocytopenic purpura [J]. Am J Surg, 1998, 176(4): 366 - 369.

[2] 冯泽荣. 手助腹腔镜下超声刀脾切除加门奇静脉断流术[J]. 中国实用外科杂志，2002，22(7)：436 - 437.

[3] 许瑞云，邱万寿，邓美海，等. 手助腹腔镜下门静脉高压症巨脾切除术[J]. 中国内镜杂志，2001，7(5)：47 - 49.

[4] 李传行，王存川，徐国良，等. 腹腔镜手术超声止血刀与电刀封合血管的对比实验研究[J]. 中国内镜杂志，2001，7(6)：42 - 44.

（编辑　陈聪连）