维普资讯 http://www.cqvip.com

253-255

第24卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol.24 No.3
1999 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1999

新生儿T细胞功能暂时性低下机理探讨*

儿科学院肾脏免疫科 刘恩梅** 李成荣 杨锡强 王莉佳

提 要 本文通过观察经anti-CD3活化后脐血淋巴细胞(CBMC)内钙离子(Ca^{2+})浓度、蛋白激酶(PKC)激动剂PMA对CBMC IL-2 mRNA表达、增殖反应及凋亡的影响,进一步探讨新生儿T细胞(TL)功能暂时性低下的机理。结果发现经anti-CD3刺激后,CBMC Ca^{2+}明显升高,与成人外周血淋巴细胞(PBMC)无明显差异($P>0.05$)。PKA不仅可纠正anti-CD3诱导的CBMC凋亡,而且显著提高anti—CD3诱导的新生儿TL增殖反应及IL—2 mRNA表达,提示CBMC Ca^{2+}/PKC信号传导不平衡是其活化、增殖功能低下,易于凋亡的生理基础,推测CBMC PKC产生不足与其TL表型有关。

关键词 新生儿;细胞因子;凋亡;信号传导
中图分类号 R392.11

新生儿抗体反应低下是其易于感染的重要原因。已先后发现新生儿T细胞(TL)增殖反应低下、IFN—γ、IL—4、IL—6、IL—12等细胞因子分泌减少,并证实上述因素与新生儿抗体反应低下有关。但导致新生儿TL增殖反应低下和细胞因子(CK)产生不足的机理仍不清楚,我们已有的研究结果发现脐血淋巴细胞(CBMC)较成人外周血淋巴细胞(PBMC)易发生凋亡,其机理可能是新生儿TL发育不成熟或由于特定微环境影响,导致新生儿TL信号传导障碍所致。本文拟通过观察经anti—CD_3活化后CBMC细胞内钙离子(Ca^{2+})浓度、蛋白激酶C(PKC)激动剂PMA对CBMC IL—2 mRNA、凋亡及增殖的影响,进一步探讨细胞内信号传导对新生儿TL功能的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 新生儿 19例足月顺产新生儿,平均胎龄39周,产重3000克。其母无异常妊娠史。

1.1.2 健康成人 14例健康成人,平均年龄22岁,采血前4周无明显感染史,无血制品及免疫增强剂或抑制剂用药史。

1.2 材料与方法

1.2.1 TL增殖反应 常规分离肝素抗凝的CBMC或成人PBMC,取CBMC 1×10^5/100μl加入55孔板中,另加100μl RPMI-1640培养液,分别加入anti-CD3(1μg/ml)、PMA(20ng/ml)、anti-CD3+PMA,同时设空白对照,置37℃,5%CO_2培养72h。培养结束前16~18h加入^{3}H-TdR,计算增殖活性:

$$PI=\frac{anti-CD_3/PMA/anti-CD_3+PMA各三孔CPM均值-本底}{未加上述丝裂原三孔CPM均值-本底}$$

1.2.2 IL—2 mRNA表达 1×10^6CBMC或成人PBMC经anti-CD3,anti-CD3-PMA刺激培养12小时后,用TRIzol试剂盒抽提细胞总RNA,逆转录合成cDNA,PCR扩增IL—2 mRNA。

1.2.3 细胞内Ca^{2+}浓度测定 将CBMC和成人PBMC细胞浓度调至2×10^6/ml,Hank's液洗涤后,重悬,加入5μl Fura-2/Am,置37℃负载45分钟,洗涤后上Hitachi-3010荧光分光光度计测定Ca^{2+}浓度,激发波长340mm,发射波长500mm,狭缝10mm,首先测定F值,然后加入0.1%Triton X-100得Fmax,再加3mM EDTA,得Fmin。

$$[Ca^{2+}]=224\times\frac{F-Fmin}{Fmax-F}(nM)$$

1.2.4 PMA对CBMC凋亡的影响 在CBMC中加入PMA(20ng/ml)培养24小时,观察凋亡细胞百分率及片断DNA。

2 结果

2.1 TL增殖反应 CBMC经anti-CD3诱导的TL增殖反应明显低于成人PBMC($P<0.001$),PMA可显著提高anti-CD3诱导的CBMC增殖反应,使之与成人PBMC无明显差异($P>0.05$)。(表1)

*本课题接受国家自然科学基金(39670675)资助

**女,1969-08出生,主治医师

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 TL增殖反应(PI)

	n	anti-CD_3	PMA	anti-CD_3+PM
CBMC	9	1.52±0.55	1.05±0.27	3.90±1.42
PBMC	9	5.85±3.66	2.34±1.99	5.64±3.52
t		4.93	0.32	
p		<0.001	>0.05	>0.05

2.2 IL-2 mRNA表达 anti-CD3刺激后CBMC有IL-2mRNA表达,anti-CD3+PMA可增强CBMC IL-2mRNA表达(图1)。

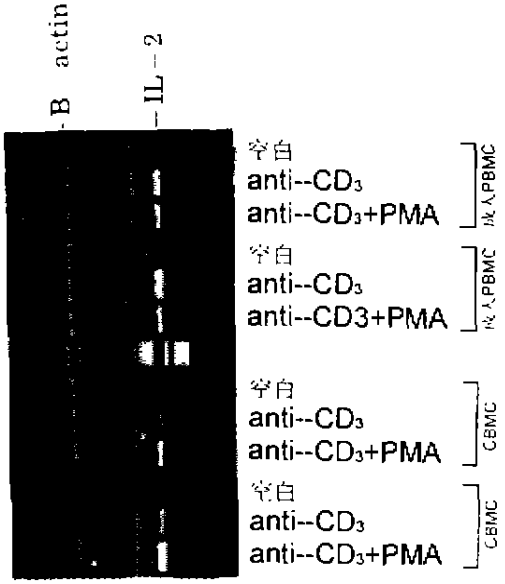
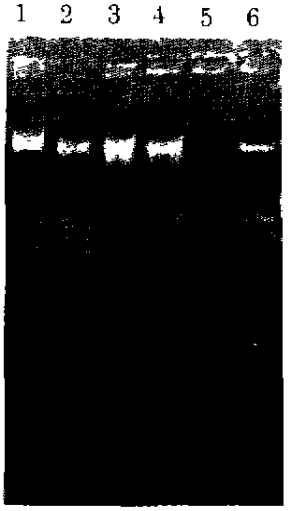


图1 IL-2 mRNA表达

2.3 细胞内Ca^{2+}浓度 未经刺激CBMC细胞内Ca^{2+}浓度为88.55±35.20nm,PBMC细胞内Ca^{2+}浓度为107.86±34.26nm,两者比较无明显差异($P>0.05$),anti-CD3刺激后5',10'CBMC与成人PBMC细胞内Ca^{2+}深度上升幅度无明显差异。(表2)

2.4 PMA对CBMC凋亡的影响 CBMC凋亡可被PMA纠正。(图2)



第1列: λDNA EoRI/Mind III

第2列: Oh

第3列 空白(24h)

第4列: anti-CD_3(24h)

第5列: PMA(24h)

第6列: anti-CD_3+PMA(24h)

图2 PMA对CBMC凋亡的影响

3 讨论

已知TL受体(TCR)与抗原或丝裂原结合后,通过一系列酪氨酸磷酸化活化磷脂酶Cr(PL-Cr),PLCr催化4,5-磷脂酰二磷酸肌醇分解为三磷酸肌醇(IP_3)和甘油二酯(DAG),IP_3使细胞内Ca^{2+}储存池中Ca^{2+}释放,DAG则活化PKG,Ca^{2+}释放后通过钙神经蛋白、活化转录因子NF-AT,产生IL-2,而PKC则通过NF-kB或直接将信号传导至核内,协

表2 细胞内Ca^{2+}浓度(nM)

n		oh	anti-CD_3			
			5'	ratio	10'	ratio
CBMC	19	88.59±35.20	144.55±53.36	1.72±0.57	181.46±82.09	2.09±0.74
PBMC	14	107.96±34.26	194.49±43.35	1.93±0.80	235.09±50.24	2.33±0.73
t		1.58		1.09		0.89
p		>0.05		>0.05		>0.05

维普资讯 http://www.cqvip.com

同Ca^{2+}诱导细胞活化、增殖。近年来细胞内信号传导与凋亡的关系日趋引人注目，而凋亡过甚与不足与感染性疾病、退行性病变、自身免疫性疾病及肿瘤的发生密切相关[3,4]。McConkey等发现anti-CD3刺激后Ca^{2+}升高与PKC产生不足或转位异常引起的细胞内信号传导不平衡是胸腺细胞易于凋亡的原因[5]。我们的研究表明，CBMC易于凋亡，PMA不仅纠正anti-CD3诱导的CBMC凋亡，而且能显著提高anti-CD3诱导的TL增殖反应及IL-2 mRNA表达，经anti-CD3刺激后，CBMC细胞内Ca^{2+}浓度明显升高，其上升幅度与成人PBMC无明显差异，提示经TCR通道活化后，CBMLCa^{2+}/PKC信号传导失衡，尤其是PKC产生不足或转位异常是其活化、增殖功能低下，易于凋亡的生理基础，从TL功能表达的时间顺序，CBMC信号传导障碍至活化功能降低，进一步导致凋亡增强及增殖反应低下。而CBMC PKC产生不足可能与新生儿TL>90%为$CD_{45}RA^{+}$表型有关[6]。

参考文献

1.刘恩梅，等.中华儿科杂志 1998;6:341
2.Bertotto A,et al.Cell Immunol 1990;127:247
3.Strasser A,et al.Proc Natl Acad USA 1991;88:8861
4.Mryarrd L,et al.Science 1992;257.217
5.McCondey DJ,J Immunol 1989;143:1801
6.Peakamn M,et al.Clin Exp Immunol 1992;90:345

(收稿日期 1998－10－20)

Study of the mechanism of transient T lymphocyte dysfunction in neonates

Liu Enmei, et al
Department of kidney and immunology, the college of paediatrics.

Abstract In order to study the mechanism of transient T lymphocyte dysfunction in neonates, we observed the concentration of cytosolic calcium, the effects of PMA (which is an activator of protein kinase (PKC) on IL-2 mRNA expression), and apoptosis in core blood mononuclear cells(CBMC) after stimmulation by anti-CD3. The data showed that the cytosolic calcium concentration of CBMC increased after stimulation by anti-CD3, but there was no difference compared with adult peripheral blood mononuclear cell(PBMC).PMA not only corrected apoptosis of CBMC,but also enhanced TL proliferation and IL－2 mRNA expression in induced by anti－CO_3 in neonate.These results suggested that Ca^{2+}/PKC signal thansduction im balance of CBMC may be the physiological basis of low activation, proliferation and tendency towards apoptosis.

KEY WORDS Neonate; Cytokine; Apoptosis; Signal transduction