DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.020
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
1430 2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)12-1430-03

严重烫伤对小鼠脾脏T淋巴细胞经$TCR_{\alpha/\beta}$、CD28活化通路和T细胞功能的影响

郑峻松,吴 军,黄文华,彭代智,肖 光夏,罗中华 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨严重烧伤对小鼠脾脏T淋巴细胞经T细胞抗原受体活化通路的影响及其与伤后T细胞增殖能力和白细胞介素2(IL-2)分泌改变的关系。方法 检测18%Ⅲ度烫伤小鼠T淋巴细胞表面抗原受体$TCR_{\alpha/\beta}$、共刺激分子CD28阳性表达率,及蛋白酪氨酸激酶(PTK)、蛋白激酶C(PKC)活性改变,胞浆游离Ca^{2+}浓度变化,观察伤后不同时相T淋巴细胞增殖功能及IL-2分泌活性,并分析上述信号转导分子活性变化与伤后T细胞功能改变的关系。结果 烧伤后T细胞膜受体$TCR_{\alpha/\beta}$和共刺激分子CD28表达阳性率降低,胞膜PTK活性受抑,但于伤后168 h恢复,$TCR_{\alpha/\beta}$和CD28阳性表达率及PTK活性改变与T细胞增殖功能及IL-2分泌呈现显著相关性;胞浆游离[Ca^{2+}]伤后12 h明显降低,并持续到伤后168 h,胞浆PKC活性出现先升后降的双相改变。结论 烧伤后T淋巴细胞经$TCR_{\alpha/\beta}$、CD28活化通路活性降低和胞膜PTK活性受抑是伤后T细胞功能受抑的重要分子机制。

关键词:烧伤;T淋巴细胞;$TCR_{\alpha/\beta}$;信号转导
中图法分类号:R644;R392.12 文献标识码:A

Effect of severe scalding on function of murine splenic T lymphocytes and their activation by $TCR_{\alpha/\beta}$ and CD28 signaling pathway

ZHENG Jun-song, WU Jun, HUANG Wen-hua, PENG Dai-zhi, XIAO Guang-xia, LUO Zhong-hua(Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of murine splenic T lymphocyte activity mediated by T cell antigen receptor (TCR)$_{\alpha/\beta}$ and CD28 signaling pathway, and explore the proliferation and IL-2 production of T lymphocytes after severe burn injury. **Methods** After 60 mice were inflicted with 18% TSBA (total body surface area) full-thickness scalding by vapor and sacrificed at different time points, the splenic T lymphocytes were collected. The activities of $TCR_{\alpha/\beta}$, CD28, membrane PTK, cytoplasmic PKC and calcium concentrations were detected respectively. The proliferation and IL-2 secretion of T lymphocytes were determined. The relationship of the activities of signal transducers mentioned above and the T cell functions was analyzed. **Results** Compared with control group, membrane $TCR_{\alpha/\beta}$, CD28 and PTK activities were suppressed after scalding, but recovered 168 h later, which having a significantly negative correlation with the functions of T lymphocytes. The calcium concentration was lowered significantly 12 h after scalding and remained the reduction to the 168 th hour. Cytoplasmic PKC activity was increased just after the scalding and then decreased 24 h later. **Conclusion** The suppression of $TCR_{\alpha/\beta}$, CD28 and PTK activities may be the main molecular mechanism by which T cells exert dysfunction after scalding.

Key words: burn; T lymphocyte; $TCR_{\alpha/\beta}$; signal transduction

大面积深度烧伤后,机体免疫系统包括多种免疫活性细胞和体液免疫均发生了不同程度的改变,出现超常或异常的免疫应激反应。具体表现为特异性细胞免疫功能受抑和非特异性炎症反应亢进两方面,而细胞免疫受抑又以T细胞功能受抑尤为突出,它是严重烧伤后机体免疫功能下降和并发感染及其他并发症的重要原因[1]。虽然过去对烧伤后机体T细胞功能改变报道较多,但从信号转导系统分析T细胞功能受抑的分子机制尚鲜有报道。基础研究表明经$TCR_{\alpha/\beta}$和CD28通路活化是T淋巴细胞活化增殖并执行功能的主要信号通路[2,3]。本研究以18%Ⅲ度烫伤小鼠为模型,以T淋巴细胞$TCR_{\alpha/\beta}$和CD28通路为研究对象,对T细胞功能受抑的分子机制进行实验研究。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39500149)
作者简介:郑峻松(1971—),男,四川省南充市人,博士研究生,讲师,主要从事烧伤后细胞免疫抑制机制及移植免疫研究。电话:(023)68754148-8021;Email:Zhengalpha@yahoo.com
收稿日期:2001-04-05;修回日期:2001-06-05

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型

昆明种小鼠60只,雌雄各半,体重23~26 g,随机分为正常对照、伤后2、12、24、96、168 h共6组,每组10只。制备烧伤模型:将小鼠背部剪毛,清醒状态下高压热蒸汽造成18%TBSA Ⅲ度烫伤(病理切片证实)。伤后腹腔注射等渗盐水3 ml预防休克,各组动物于相应时相腋动脉放血活杀,无菌制备脾淋巴细胞悬液。

1.2 T淋巴细胞分离纯化

参照文献[4]方法,以尼龙纤维分离细胞悬液中的T细胞,酸性α-醋酸萘酯酶(ANAE)染色,96%以上为T细胞,台盼蓝染色证明分离出T细胞存活率>95%。

1.3 指标检测及方法

1.3.1 流式细胞仪测定T细胞膜表面分子$TCR_{\alpha/\beta}$及CD28

取调整浓度至1×10^6/ml分离纯化的T细胞悬液1 ml,以1 400 r/min(普通台式离心机)离心5 min,去上清,以冷磷酸盐缓冲液(pH 7.2)200 μl洗涤,去上清,加入Anti-mouse $TCR_{\alpha/\beta}$FITC(美国Sigma公司)4 μl,阴性对照加入小鼠IgG,置4 ℃避光孵育

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

30 min, 离心, 弃上清, 反复洗涤 2 次, 以相同缓冲液 1 ml 重悬后检测。间接法测定 CD28: 一抗为 Purified anti-mouse CD28 (Hamster IgG), 二抗为 Anti-hamster IgG-FITC。以加入荧光抗体测得的阳性率减阴性对照阳性率为测定结果。

1.3.2　膜 PTK 酶的分离及活性测定　取 1 ml 分离纯化调浓度至 3×10^6/ml 的 T 细胞的悬液 ConA 5×10^{-3}g/L 刺激 15 min, 离心去上清后压积细胞立即于 4 ml 胞浆 PTK 提取液(1 mmol/L $MgCl_2$、1 mmol/L EDTA、10 mmol/L DTT、1 mmol/L PMSF、50×10^{-3} g/L Aprotinin、10%(体积比) Glycerol、10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4)混悬。冰浴中超声破碎(250 mA、20 s×3) 4 ℃, 7 000× g 离心去除细胞核及完整细胞。上清 37 000× g, 4 ℃离心 1 h, 弃上清, 沉淀复悬于 4 ml 膜 PTK 提取液(20 mmol/L $Mg(AC)_2$、5 mmol/L NaF、0.2 mmol/L EDTA、1.0 mmol/L DTT、0.5%(体积比) NP-40)中, 冰上提取 1 h。再次冰浴中超声破碎(250 mA、20 s×3), 4 ℃、37 000× g 离心 1 h, 所得上清即为膜 PTK 提取物(-20 ℃冻存备测蛋白含量及酶活性); 活性测定参照 Kong[5] 方法进行。

1.3.3　胞浆 PKC 酶分离及活性测定　同样取新鲜分离纯化调浓度至 3×10^6/ml 的 T 细胞悬液 1 ml, ConA 5×10^{-3}g/L 刺激 15 min, 离心去上清, 加入 4 ℃预冷缓冲液(50 mmol/L β-2ME, 1 mmol/L PMSF、1 mmol/L EGTA、2.5 mmol/L $MgCl_2$、0.34 mol/L 蔗糖、10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5) 4 ml, 超声破碎(300 mA, 20 s×3), 37 000× g, 4 ℃离心 60 min, 收集上清, 上清即含胞浆 PKC 酶。(-20 ℃冻存备测蛋白含量及酶活性); 活性测定参照文献[6]进行。

1.3.4　Ca^{2+} 浓度测定　以 ConA(5×10^{-3}g/L)为刺激原, Fura-2/AM 荧光探针法[7]测定。

1.3.5　T 淋巴细胞功能试验　取 5×10^6/ml 纯化 T 细胞悬液 0.5 ml, 加入 10 g/L ConA 0.5 ml 混匀, 5%(体积比)CO_2、37 ℃孵箱培养 24 h, 离心收集上清, ELISA 法测定 IL-2 含量(试剂购自深圳晶美公司)。T 淋巴细胞增殖活性测定按 MTT 法进行[8]。

1.4　统计学处理

结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 STAT5.0 统计程序处理, 包括行方差分析、方差齐性检验和 t 检验、相关分析。

2　结果

2.1　烧伤后小鼠脾脏 T 细胞抗原受体 $TCR_{\alpha/\beta}$ 及共刺激分子 CD28 阳性表达率改变

与正常对照组相比, 烧伤后脾脏 T 淋巴细胞膜 $TCR_{\alpha/\beta}$ 呈不同程度降低, 以伤后 24~96 h 最明显; 烧伤后 T 淋巴细胞膜表面共刺激分子 CD28 阳性表达亦降低, 且降低时相明显早于 $TCR_{\alpha/\beta}$, 即伤后 12 h 已明显降低, 并持续到伤后 96 h, 见表 1。

2.2　烧伤后小鼠脾脏 T 细胞胞膜 PTK 及胞内信号转导分子 PKC、[Ca^{2+}] 活性改变

与正常对照组相比, 参与跨膜信号转导的 PTK 活性于伤后 2h 即出现明显受抑, 伤后 12、、24 h 抑制非常显著, 伤后 168 h 出现回升; 胞浆游离钙 Ca^{2+} 浓度伤后各时相均降低, 其变化趋势与 PTK 活性改变较一致, 胞浆 PKC 活性出现先升高(12 h, $P<0.01$), 后降低(96~168 h, $P<0.01$)的双相改变, 见表 2。

2.3　烧伤后 T 淋巴细胞增殖活性及 IL-2 分泌的改变

与正常对照组相比, 烧伤小鼠脾脏 T 细胞增殖能力减弱, 明显减弱出现于伤后 12 h, 伤后 24、96 h 显著减弱。IL-2 分泌伤后明显降低, 伤后 24~168 h 降低有非常显著性意义($P<0.01$)。二者变化趋势与 $TCR_{\alpha/\beta}$ 及 CD28 阳性率改变较一致。相关性分析表明: 参与跨膜信号转导的 PTK 活性、IL-2 分泌及 T 淋巴细胞增殖能力呈非常显著正相关($r_{PTK/IL\text{-}2}=0.569$, $r_{PTK/IL2}=0.733$), 见表 3。

表 1　烫伤后小鼠脾脏 T 细胞抗原受体 $TCR_{\alpha/\beta}$ 及共刺激分子 CD28 阳性率改变(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Positive rates of $TCR_{\alpha/\beta}$ and CD28 on splenic T cell membranes in scalded mice (%, $\bar{x}\pm s$)

Parameter	Control	Postburn(h)				
		2	12	24	96	168
$TCR_{\alpha/\beta}$	89.82±2.09	83.24±1.48	60.32±1.48	52.43±1.24**	52.95±1.79**	70.04±2.30
CD28	72.73±1.96	64.29±1.78	51.68±1.90*	51.31±2.45*	59.87±1.62*	66.35±1.50

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

表 2　烫伤后小鼠脾脏 T 细胞胞膜 PTK 及胞内信号转导分子 PKC、[Ca^{2+}] 活性改变($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Activities of membrane PTK and cytoplasmic PKC and [Ca^{2+}] of splenic T cells in scalded mice ($\bar{x}\pm s$)

Parameter	Control	Postburn(h)				
		2	12	24	96	168
P-PKC(pmol·mg^{-1}·min^{-1})	91.22±3.93	107.78±8.41	132.37±11.39**	79.31±4.16	61.23±6.07**	70.66±3.34*
M-PTK(pmol·mg^{-1}·min^{-1})	44.65±5.73	26.37±3.22*	12.47±1.65**	19.86±2.73**	30.74±4.57	59.28±12.18
[Ca^{2+}](nmol/L)	272.04±23.83	262.24±9.20	222.05±9.53*	218.82±10.04*	160.30±16.33**	198.12±14.07*

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

表 3　烫伤后小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖能力及 IL-2 分泌改变($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Proliferation and IL-2 secretion of splenic T cells in scalded mice ($\bar{x}\pm s$)

Parameter	Control	Postburn(h)				
		2	12	24	96	168
SI MTT(%)	263.78±10.28	250.08±36.44	210.76±5.81*	143.78±10.61**	137.91±10.75**	181.24±27.68*
IL-2(pg/ml)	3 291±129.30	2 285±68.80*	1 542±40.80**	341±23.30**	328±19.30**	549±21.80**

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

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

严重烧伤后机体特异性细胞免疫功能降低是诱发感染和其它并发症的重要原因。改善伤后机体免疫功能是防治感染和多脏器功能衰竭及提高大面积深度烧伤治愈率的关键。从根本上纠正伤后受损的细胞免疫功能，必须首先弄清导致烧伤后特异性细胞免疫功能下降的分子机制[1,9]。

基础研究表明，$TCR_{\alpha/\beta}$和CD28通路是T细胞活化的主要信号通路[2,3]。$TCR_{\alpha/\beta}$和CD28接收胞外信号后，经具有PTK活性的CD3ζ链跨膜信号转导入胞以后，即由肌醇磷脂特异性磷脂酶C水解肌醇磷脂产生三磷酸肌醇(IP_3)和二脂酰甘油(DG)，升高胞浆游离钙[Ca^{2+}]浓度和活化PKC，进而激活核因子NF-κB、AP-1、NFAT等，调节基因表达，从而影响细胞功能。虽然已有报道[11]，严重烧伤后TH_1/TH_2平衡破坏，T细胞反应偏向TH2型反应，引起TH_1型细胞因子(IL-2、IFN-γ)产生减少，而TH_2型细胞因子(IL-4、IL-10)等分泌增加，但这种倾斜是伤后T细胞总体活性受抑条件下的相对偏移[10,11]。

本实验以$TCR_{\alpha/\beta}$、CD28信号途径为研究对象，探索严重烧伤后T细胞功能受抑的分子机制。综合分析本实验结果可以证明：严重烧伤后，参与T细胞跨膜信号转导的$TCR_{\alpha/\beta}$和CD28、PTK活性受抑是制约严重烧伤后T淋巴细胞活化信号转导的重要因素。而从$TCR_{\alpha/\beta}$、CD28、PTK三者关系比较分析中可以发现，伤后PTK活性受抑又处于核心地位，其发生时相甚至早于$TCR_{\alpha/\beta}$和CD28。胞浆游离钙浓度是淋巴细胞活化的最灵敏指标，是各种胞外刺激引起细胞激活的早期变化之一[3]。本实验研究结果表明[Ca^{2+}]于伤后12 h即出现明显降低，并持续整个时相。虽然决定胞浆[Ca^{2+}]浓度有胞外进入量和胞内钙储释放两种因素，但由于PI-PLC活性伤后12 h即已降低，故推测，严重烧伤后胞浆游离[Ca^{2+}]水平降低主要由于PI-PLC下游产物三磷酸肌醇(IP_3)动员胞内钙储释放减少所致。国内外亦有研究报道，胞内游离[Ca^{2+}]浓度降低是伤后T细胞增殖能力减弱和IL-2分泌降低的重要原因之一。烫伤后胞浆PKC活性升高，可能是胞外内流信号减弱后胞内出现的补偿机制，或与PKC参与介导伤后T细胞其他功能的执行有关[12]。

胞浆PKC活性和Ca^{2+}浓度的降低将直接导致活化核因子NF-κB、AP-1、NF-AT的信号减弱。总之，介导T细胞活化的$TCR_{\alpha/\beta}$、CD28信号通路活性受抑，是严重烧伤后T淋巴细胞功能损伤和细胞免疫受抑的主要分子机制。

参考文献：

[1] Teodorczyk. Injeyan J A. Immunosuppression follows systemic T hymphoyte activation in burn patient[J]. Clin Exp Immunol, 1996, 85(3): 193—198.

[2] Alberola Ila J, Takaki S, Kerner J D, *et al*. Differential signaling by lymphocyte antigen receptors[J]. Ann Rev Immunol, 1997, 15(2): 125—154.

[3] Crabtree G R, Clipstone N A. Signal transmission between the plasma membrane and Nucleus of T lymphocytes[J]. Annu Rev Biochem, 1994, 63(11): 1 045—1 083.

[4] 李绍康，沈瑞珍. 用国产龙尼毛分离小鼠T淋巴细胞鉴定[J]。上海免疫学杂志，1981，10(1)：10—14.

[5] Kong S K, Wang J H. Purification and characterization of a protein tyrosine kinase from bovine spleen[J]. J Biol Chem, 1987, 262(11): 2 597—2 603.

[6] David L, Adams D, Thomas A, *et al*. Characterization of protein kinase C activity in interferon gamma treated murine peritonedal macrophages. J Cellular Physiology[J]. 1985, 125(3): 486—491.

[7] Grynkiewic Z G, Poenie M, Tsien R Y, *et al*. A new generation of Ca^{++} indicators with greatly improved fluorescence properties[J]. J Biol Chem, 1985, 260(9): 3 440—3 447.

[8] 李泽玲，崔正言，李淑贞. MTT比色分析法的改良与初步应用[J]。上海免疫学杂志，1996，16(4)：306—307.

[9] Sparkes B G. Immunological responses to thermal injury[J]. Burns, 1997, 23(20)106—113.

[10] Osullivan S T, James A L, Douglas H L, *et al*. Major injury leads to predominance of Th2 lymphocyte phenotype and diminished IL-2 production associated with decreased resistance to infection[J]. Ann Surg, 1995, 222(4): 482—492.

[11] Dorothee D M. Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 T helper cell balance, suggesting down regulation of cell-mediated and up-regulation of antibody mediated immunity commensurate to the trauma[J]. Surgery, 1996, 19(2): 316—325.

[12] James D. Signal transduction events leading to T cell lymphokine gene expression. Immuno Today[J]. 1993, 14(7): 357—362

（编辑 潘式文）

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神，血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg)，但首次使用时应注明mmHg与千帕斯卡(kPa)的换算系数。

（本刊编辑部）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net