文章编号: 1000-5404(1999)12-0896-03

P物质对大鼠脾细胞免疫功能的影响

李成仁[1],蔡文琴[1],邓晓林[1],肖茂磊[1],杨 忠[1],何家全[1],肖光夏[2] (第三军医大学: [1]基础医学部组织学与胚胎学教研室; [2]附属西南医院烧伤研究所; 重庆 400038)

【提要】 目的: 研究 P物质(SP)对脾细胞免疫功能的调节作用。方法: 采用^{3}H-TdR掺入法、放射免疫测定和流式细胞仪等方法,检测了 SP对体外培养的大鼠脾细胞的增殖和分泌 IL-2、IL-6、TNF功能及 T细胞表型表达的影响。结果: SP能明显刺激脾细胞的增殖,其中浓度为 1×10^{-4}mmol/L时作用最强; SP能促进 T细胞 CD分子的表达,使 CD_4^+/CD_8^+升高; SP能显著促进脾细胞分泌 IL-2,对脾细胞分泌 IL-6具有抑制作用,而对分泌 TNF无作用。结论: 证实了 SP是具有广泛的免疫调节作用的一种神经肽。

关键词 P物质;脾细胞;白介素-2;白介素-6;肿瘤坏死因子
中图法分类号 R392.1 文献标识码 A

P物质(Substance P, SP)是神经内分泌系统反应时分泌的一种生物活性多肽。文献[1]报道 SP除了能作为神经递质传递信息之外,还具有广泛的免疫调节作用,能促进 T细胞、B细胞等的增生,促进它们 DNA的合成,增强淋巴细胞合成和分泌细胞因子与抗体[2,3]。已有的实验表明,在创伤、烧伤等伤害性刺激作用下,机体的神经内分泌系统产生明显的变化[4,5]。研究这种变化对机体免疫防御功能的影响,对研究创伤的发病机制及防治将具有重要意义。本研究观察了不同浓度的 SP对体外培养的大鼠脾细胞的增殖和分泌功能及 T细胞 CD分子表达的影响,以期更深入了解 SP对免疫的调节功能。

1 材料与方法

1.1 动物

成年 Wistar大鼠 5只,体重 180~220 g,由本校动物研究所提供。

1.2 试剂

SP(美国 Sigma公司); IL-2(本校免疫教研室); RPMI 1640(Gibcobrl公司);胎牛血清(美国 Sigma公司); ^{3}H-TdR(中科院上海原子能研究所); anti-CD_4-IgG-PE和 anti-CD_8-IgG-PE(美国 Pharllingen公司); ^{125}I标记的 IL-6、TNF放射免疫试剂盒(北京东亚免疫技术研究所)。

1.3 脾细胞的制备

大鼠麻醉,无菌操作取出脾脏,浸于 D-Hank's液中,经 200目钢网研磨,将细胞悬液吸入离心管,静置 10 min,弃去沉淀的组织团块,用 D-Hank's液洗 3遍,再用培养液将细胞浓度调整为 1×10^6/ml,于 37℃、5% CO_2培养箱中培养。培养液为加 10%胎牛血清的 RPMI 1640(后均同)。

1.4 SP对脾细胞增殖的影响

96孔培养板每孔加入大鼠脾细胞悬液 0.1 ml及 SP 0.1 ml, SP终浓度为: 0、1×10^{-9}、1×10^{-7}、1×10^{-5}、1×10^{-4}、1×10^{-3}、1×10^{-2} mmol/L,每种浓度设平行孔 3孔。培养 48 h,每孔加入 ^{3}H-TdR 1 μCi,再继续培养 24 h后用自动多头细胞收集器将细胞收集在玻璃纤维滤纸上,用 β-闪烁计数仪测量 cpm值。

1.5 SP对脾细胞分泌 IL-2功能的影响

1.5.1 IL-2的收集 24孔培养板中每孔加入大鼠脾细胞悬液 0.5 ml及 SP 0.5 ml, SP终浓度为 0、1×10^{-9}、1×10^{-7}、1×10^{-5}、1×10^{-4}、1×10^{-3}、1×10^{-2} mmol/L,每种浓度设平行孔 3孔。培养 48 h后,离心,收集的上清即为 IL-2粗制品, -20℃冻存待测。

1.5.2 IL-2活性测定(^{3}H-TdR掺入法) 采用生长旺盛的 CTLL细胞株(IL-2依赖细胞株)(由本校免疫教研室邹强博士惠赠),用 RPMI 1640培养液洗涤 3遍,配成 1×10^5/ml细胞悬液, 96孔培养板每孔加 CTLL细胞悬液 0.1 ml,将 IL-2的标准品稀释成 1×10^4、1×10^3、1×10^2、10、1、1×10^{-1}、1×10^{-2}、1×10^{-3}、1×10^{-4}、1×10^{-5} U/ml等 10种浓度,与备测样品分别加入培养的 CTLL细胞中,每孔 0.1 ml,每一浓度设 3平行孔。培养 48 h,每孔再加入 ^{3}H-TdR 1 μCi,继续培养 24 h,用自动多头细胞收集器将细胞收集在玻璃纤维滤纸上,用 β-闪烁计数仪测量 cpm值。

1.6 SP对脾细胞分泌 IL-6、TNF功能的影响

24孔培养板中每孔加入大鼠脾细胞悬液 0.5 ml及 SP 0.5 ml, SP终浓度为 0、1×10^{-9}、1×10^{-7}、1×10^{-5}、1×10^{-4}、1×10^{-3}、1×10^{-2} mmol/L,每种浓度设 3平行孔。培养 48 h,离心收集上清,进行 IL-6、TNF放射免疫测定。

1.7 SP对脾细胞中 T细胞表型表达的影响

取终浓度为 1×10^{-2}mmol/L SP进行以下实验, 24孔培养板中每孔加入大鼠脾细胞悬液 0.5 ml,实验组再加入 SP 0.5

基金项目: 军队"九五"攻关课题项目(96L042)
作者简介: 李成仁,男, 1970.08.10生,浙江省东阳市人,硕士,助教,主要从事神经生物学方面的研究,发表论文 4篇。电话: (023)68752229
收稿日期: 1998-11-10;修回日期: 1999-08-11

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

ml,对照组加入培养液 0.5 ml,每组设平行孔 6孔(CD_4^+ CD_8^+各 3孔)。培养 48 h后,离心收集细胞,4% 多聚甲醛固定 15 min,荧光素标记的 CD_4^+ CD_8^+单抗 37 °C过夜,在荧光显微镜下观察有荧光细胞,上 FACStar^{PLUS}型流式细胞仪检测 1× 10^4个细胞。

1.8 数据处理

各组数据采用 Gwbasic统计程序中单因素方差分析程序 PDA-2处理。

2 结果

2.1 SP对脾细胞增殖及分泌 IL-2 IL-6 TNF功能的影响

不同 SP浓度组的 cpm较对照组有明显的提高($P < 0.01$),见表 1。其中 1× 10^{-4} mmol/L SP组的 cpm达到最高。各组之间在低浓度时 cpm有显著性差异($P < 0.05$),但浓度达 1× 10^{-4} mmol/L后,浓度再增高相差也不显著($P > 0.05$)。以上结果表明 SP能明显促进脾细胞的增生。

加入不同浓度 SP的脾细胞条件培养上清液对 CTLL细胞增殖的作用较对照组有了显著的提高,也即不同浓度的 SP对脾细胞分泌 IL-2有明显的促进作用($P < 0.01$),见表 1,各组之间也存在显著性差异($P < 0.05$),其中 1× 10^{-3} mmol/L SP促进脾细胞分泌 IL-2的作用达到顶峰,而 1× 10^{-3} mmol/L和 1× 10^{-2} mmol/L两组之间无统计学意义。

脾细胞培养上清液用 IL-6放射免疫试剂盒测试后的结果,见表 1。一定浓度的 SP对脾细胞分泌 IL-6有明显抑制作用($P < 0.01$),在 SP浓度达到 1× 10^{-2} mmol/L时,抑制作用最高;而在 SP浓度低时,1× 10^{-9} mmol/L对脾细胞分泌 IL-6无明显的抑制作用($P > 0.05$)。

用 TNF放射免疫试剂盒测试的结果,见表 1。脾细胞分泌 TNF很低,低于放射免疫试剂盒标准曲线的最低值,无法计算 TNF的具体含量,用所测得的 cpm来表示。显示 SP对脾细胞分泌 TNF的功能无明显影响($P > 0.05$)。

表 1　SP对大鼠脾细胞增殖、分泌 IL-2 IL-6 和 TNF的影响($n = 3$)

Tab 1　Effect of SP on proliferation, secretion of IL-2, IL-6 and TNF of rat spleen cells($n = 3$)

Group	cpm(min^{-1})	IL-2(U/ml)	IL-6(pg/ml)	TNF(min^{-1})
Control	5 217± 124	4.3± 0.98	0.46± 0.01	4 833± 307
10^{-9} mmol/L	7 567± 41**	7.4± 0.99*	0.45± 0.01	4 803± 12
10^{-7} mmol/L	7 792± 48**	9.9± 0.94*	0.33± 0.02**	5 565± 223*
10^{-5} mmol/L	8 278± 36**	18.7± 1.1**	0.32± 0.02**	5 284± 20
10^{-4} mmol/L	8 716± 41**	22.4± 1.8**	0.42± 0.02	4 729± 204
10^{-3} mmol/L	8 507± 75**	38.1± 1.4**	0.39± 0.08*	4 200± 335*
10^{-2} mmol/L	8 594± 30**	33.4± 1.3**	0.30± 0.01**	4 967± 676

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

2.2 SP对 T细胞表型表达的影响

流式细胞仪的测定结果,见表 2。1× 10^{-5} mmol/L SP对脾细胞中 T细胞亚群表型的表达有促进作用,其中对 CD_4^+ T细胞的促进作用最明显($P < 0.01$),对 CD_3^+(CD_4^+和 CD_8^+ T细胞的总和)T细胞也有促进作用($P < 0.05$),而对 CD_8^+ T细胞的作用不明显,无统计学意义($P > 0.05$),因此 CD_4^+/CD_8^+比值升高($P < 0.01$)。

表 2　SP对大鼠脾细胞中 T细胞亚群表型表达的影响($n = 3$)

Tab 2　Effects of SP on phenotype of T lymphocyte of rat spleen cells($n = 3$)

Group	CD_4^+	CD_8^+	CD_3^+($CD_4^+ + CD_8^+$)	CD_4^+/CD_8^+
Control	709± 16	775± 19	1 484± 35	0.9149± 0.0018
SP(1× 10^{-2} mmol/L)	821± 19**	753± 17	1 574± 36*	1.0898± 0.0043**

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

3 讨论

SP是体内最常见的神经肽,也是第一个被发现的脑肠肽。它在体内广泛存在,几乎遍布全身,其中在胃肠道内含量最为丰富。SP除了可作为神经递质传递信息之外,还具有广泛的生物学活性。近年来 SP对免疫功能的调节作用越来越受到人们的关注,已有实验证明在多种免疫细胞上均有 SP的特异性受体[1,6,7],SP对免疫功能的多个方面均有促进作用。

我们用^{3}H-TdR掺入法观察了 SP对体外培养大鼠脾细胞增殖作用的调节,结果发现 SP对脾细胞的增殖作用有明显的促进作用,这与多位研究工作者的文献报道 SP对淋巴细胞的增殖有促进作用的结果相一致[2,3,8,9]。

对于脾细胞分泌功能,我们选用了检测 IL-2 IL-6和 TNF。IL-2具有极为重要的免疫调节功能,因此研究 SP对 IL-2产生的调节作用,有助于更深入了解它对免疫调节的机制。对 IL-2活性的生物学检测,本实验采用^{3}H-TdR掺入法来检测 CTLL细胞的增殖情况,同时设标准品组,结果显示 SP对脾细胞分泌 IL-2有明显的促进作用,并且与 SP的浓度存在明显的量效关系,但达到一定浓度(本实验是 1× 10^{-3} mmol/L)后,浓度再高,对脾细胞的促进作用不再加强。我们实验的结果与 Calvo[10]的报道 SP增强 Jurkat T细胞的 IL-2 mRNA信号,促进活化 T细胞的 IL-2的分泌的相一致。

IL-6和 TNF也是近年来免疫学研究的热点,IL-6是一种生物学活性极为广泛的细胞因子,TNF也是一种多功能细胞因子。SP对淋巴细胞分泌 IL-6和 TNF的作用,文献报道不多。我们用放免法测定加入 SP的脾细胞培养上清液,结果发现加入 SP的上清液中 IL-6含量明显低于对照组,而 TNF却无明显变化,即 SP具有显著抑制脾细胞分泌 IL-6的作用,而对分泌 TNF无作用。

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

近年来研究指出,T细胞表面的 CD_3、CD_4以及 CD_8分子都是 T细胞识别抗原、传递活化信号以及发挥杀伤靶细胞效应时所不可缺少的分子[11]。本实验用流式细胞仪检测的结果证实 SP在一定剂量范围内可促进这些 CD分子的表达,脾细胞内 T细胞表达 CD_3^+(T细胞总数)和 CD_4^+(辅助/诱导 T细胞)T淋巴细胞明显增加,而对 CD_8^+(抑制/杀伤 T细胞)T细胞的表达无影响,CD_4^+与 CD_8^+细胞的比值升高。这与 SP促进脾细胞增殖和分泌 IL-2的结果相符,SP促进脾细胞中的 T细胞(CD_3^+)增殖,主要是促进 CD_4^+ T细胞增生,该细胞亚型 T细胞分泌 IL-2。这些提示 SP对免疫应答的促进作用有部分机制可能是通过促进这些分子的表达,从而增强 T细胞对抗原识别及信号传递的能力。

SP在全身分布广泛,尤其在胃肠道内分布最为丰富,它可能在胃肠道的舒缩、肠壁血液供应及肠道免疫功能等方面起重要的调节作用。在病理情况下,尤其在一些强应激状态中,胃肠道内的 SP含量发生明显的变化。蔡文琴等[5]对枪弹伤及 20 Gy-γ射线照射后胃肠道 SP的变化进行了研究,结果显示在强应激状态下胃肠道的 SP变化不仅存在,而且呈现有明显的反应性。我们对烧伤后大鼠肠道的 SP含量也进行的测定,发现伤后 SP明显升高(具体资料正在整理中)。在这些情况下,SP的变化对肠道粘膜免疫屏障以及肠道免疫功能的相关性,可能会影响烧伤和创伤后肠源性感染的发生及病程发展。

参考文献

[1] Goetzl E J, Xia M, Ingram A M, *et al*. Neuropeptide signaling of lymphocyte in immunological responses[J]. Int Arch Allergy Immunol, 1995, 107(1-3): 202-204.

[2] Kavelaars A, Jeurissen F, Heijnen C J. Substance P receptors and signal transduction in leukocyte[J]. J Immunol Method, 1994, 5(1): 41-48.

[3] Stanisz A M, Befus D, Bienenstock J. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen[J]. J Immunol, 1986, 136(1): 152-156.

[4] Hu D, Chen B, Lin S, et al. Changes in substance P in the jejuna of rats after burns[J]. Burns, 1996, 22(6): 463-467.

[5] 蔡文琴,王正品.大鼠肠型放射病时 VIP、SP、L-EN及 SOM的变化-放射免疫测定、免疫组化和电镜观察[J].解剖学报, 1989, 20(Suppl): 60-63.

[6] Bost K L, Breeding S A, Pascual D W. Modulation of the mRNAs encoding substance P and its receptor in rat macrophages by LPS[J]. Reg Immunol, 1992, 4(2): 105-112.

[7] Payan D G, Brewster D R, Goetzl E J. Stereospecific receptors for substance P on cultured human IM-9 lymphoblasts[J]. J Immunol, 1984, 133(6): 3260-3265.

[8] Payan D G, Brewster D R, Goetzl E J. Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P[J]. J Immunol, 1985, 135(Suppl 2): 802-807.

[9] Luber-Narod J, Kage R, Leeman S E. Substance P enhances the secretion of tumor necrosis factor-alpha from neuroglial cells stimulated with lipopolysaccharide[J]. J Immunol, 1994, 152(2): 819-824.

[10] Calvo C F. Substance P stabilizes interleukin-2 mRNA in activated Jurkat T cells[J]. J Neuroimmunol, 1994, 51(1): 85-91.

[11] Abbas A K, Lichtman A H, Pober J S. Cellular and Molecular Immunology[M]. USA: W B Saunders Company, 1994. 128-130.

(编辑 冷怀明)

Effects of substance P on immune function of splenic cells in rats

LI Cheng-ren, CAI Wen-qin, DENG Xiao-lin, XIAO Mao-lei, YANG Zhong, HE Jia-quan, XIAO Guang-xia

(Department of Histology and Embryology, Faculty of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract **Objective**: To explore the effects of substance P (SP) on immune function of splenic cells. **Methods**: After the splenic cells from rats were cultured *in vitro*, their proliferative activity was determined with incorporation of ^{3}H-TdR, production of cytokines detected by RIA and phenotype of T lymphocytes investigated with FCM. **Results**: ① SP augmented the proliferation of splenic cells to a peak of 1×10^{-4} mmol/L. ② SP promoted the expression of phenotype of T lymphocytes to result in the increase in number of CD_3 and CD_4 T lymphocytes. ③ SP significantly promoted the secretion of IL-2 but decreased that of IL-6 and did not affect that of TNF from the splenic cells. **Conclusion**: SP is a kind of neuropeptide with high capacity of immunity regulation.

Key words substance P; splenic cell; interleukin; tumor necrosis factor; rat

Foundation item: "Ninth five" obligatory budget of PLA(96L042)

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