DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.07.017

运用短期外周血超抗原反应T细胞系研究超抗原诱导的T细胞凋亡*

宋建勋** 朱锡华 陈克敏 (第三军医大学基础医学部免疫学教研室、全军免疫学研究所) 重庆,400038

提 要 目的:建立短暂外周血超抗原金黄色葡萄球菌A肠毒素(SEA)反应T细胞系,研究SEA诱导的T细胞凋亡。方法:采用超抗原SEA刺激PBMC增殖,rIL-2维持细胞生长,高速度Ficoll离心去除死细胞建立细胞系。FCM及琼脂糖凝胶电泳检测SEA诱导短期外周血SEA反应T细胞系凋亡。结果:SEA 0.5~5 μg/ml,rIL-2 200 U/ml能有效建立SEA反应T细胞系,此细胞系能在体外维持生长40 d,对SEA的再次刺激有明显应答能力。1 μg/ml SEA诱导同样剂量建立的SEA反应T细胞凋亡,16 h能明显观察到凋亡特征。结论:SAg与rIL-2能成功建立短期SAg反应T细胞系,受到SEA再次作用后T细胞可发生凋亡。

关键词 超抗原;T细胞;细胞凋亡;细胞系;PBMC

中图法分类号 R329.25;R392.11

超抗原(Superantigen,SAg)是一种新型的蛋白质抗原分子,可以在MHC Ⅱ类分子非限制性辅助下,以T细胞抗原识别受体Vβ(T cell receptor Vβ,TCRVβ)特异性的方式激活比普通抗原多达数千倍的$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞,促使它们增生及分泌细胞因子,因此,超抗原在抗肿瘤中的作用愈发受到重视[1]。然而,SAg在激活大量特异性T细胞之后,常伴随克隆缺失和免疫耐受,可能与T细胞凋亡有关[2]。由于超抗原对T细胞的作用有TCRVβ特异性,其激活的T细胞种类必须是其所针对的TCRVβ类型,这给实验工作带来了不便。金黄色葡萄球菌A型肠毒素(SEA)只能激活TCRVβ3、Vβ11等细胞,而现有的大多数T细胞株TCRVβ与之不同,故需要另外建立SEA反应T细胞系,才便于进行相关试验。我们从人外周血中建立了一短期超抗原反应T细胞系,并以此研究了SAg诱导的T细胞凋亡。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 SEA(1mg,军事医科院产品),rIL-2(10 000 U,重庆解放军分子免疫学重点实验室产品,批号971027)。淋巴细胞分离液(中国医科院血液研究所,批号970311);Ficoll(上海试剂二厂,批号970809)。碘化丙啶(PI,Sigma),非离子去污剂Triton X-100(Sigma)。DNA Marker:λDNA/*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ(华美)。酶:蛋白酶K、RNase A(华美)。

1.1.2 白细胞成份血液标本(重庆西南医院输血科,批号971124-1538)。

1.1.3 细胞培养液 10% NCS的RPMI 1640培养液,其中含100U/ml青霉素,100μg/ml链霉素,10 mmol/L HEPES,2 mmol/L L-Gln。

1.2 方法

1.2.1 人外周血单核细胞(Peripheral blood monocyte cell,PBMC)的分离 按常规方法进行。

1.2.2 SEA反应T细胞的诱导 参照文献[3,4],略有修改。PBMC 10^6/ml,加入SEA (0.5~5)μg/ml,37℃,5% CO_2的饱和温度条件下培养3 d,第4天换液,洗涤,尽可能去除SEA和单核巨噬细胞。培养液中加入200 U/ml的rIL-2,经过14 d含rIL-2的完全RPMI 1640培养液培养,短时SEA反应T细胞系即可建立。

1.2.3 SEA反应T细胞系中细胞碎渣的去除 SEA反应T细胞系经离心洗涤后,用少量Hanks液(约2 ml)悬浮,加入含5ml Ficoll液的5 ml离心管的上层,离心1 000×g,15 min,取上层白雾状细胞层,RPMI 1640不全培养液洗涤2次后,继续培养。

1.2.4 SEA诱导SEA反应T细胞系凋亡 收集短期人外周血SEA反应T细胞,Hanks溶液洗涤离心,细胞用含10% NCS的RPMI 1640完全培养液悬浮,调整密度为5×10^5/ml,加入24孔平底细胞培养板(Costar),1 ml/孔,37 ℃,5% CO_2的饱和湿度条件下培养2 h。细胞培养液中加入SEA 1 μg/ml,继续培养。

1.2.5 短期人外周血SEA反应T细胞凋亡 于培养的不同时间(0、2、4、8、16、24、32 h)收集细胞检测。①用PI低渗荧光染色液染色(PI 50 μg/ml,枸橼酸钠0.1%,Triton X-100 0.1%),参照文献[5],FCM检测亚G_0/G_1峰大小(A_0),反映已固缩和降解核DNA的细胞数,即凋亡细胞比率。试验2次,取平均值。②常规方法提取细胞DNA[6],1.8%琼脂糖凝胶电泳,观察凋

---

* 全军"九五"医药卫生重点项目,No. 96Z038

** 宋建勋,男,32岁,讲师,博士

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

亡细胞 DNA 梯状电泳带。

2 结果

2.1 SEA 反应 T 细胞系的特点

经 SEA 刺激，rIL-2作用后，PBMC 的 T 淋巴细胞于第4天开始大量增殖，细胞数量明显增多，形成大量聚集在一起的细胞集落，细胞增大，拉长，母细胞化现象明显。而不经 SEA 刺激，仅由 rIL-2作用的 PBMC 细胞，虽然 T 淋巴细胞也有增多现象，少量细胞拉长，分裂，但没有大的细胞集落形成，细胞总数量较 SEA 刺激组明显少，见图1。SEA 刺激后，从第7天开始，细胞出现死亡，数量逐渐增多，死亡细胞主要是 B 细胞和 SEA 非特异 T 细胞，至第14天死亡细胞开始减少，细胞生长与死亡达一个平衡状态。SEA 反应 T 细胞系可在体外连续培养40 d 左右，在此过程中必须维持 rIL-2的作用，否则细胞增殖后很快死亡[7]。

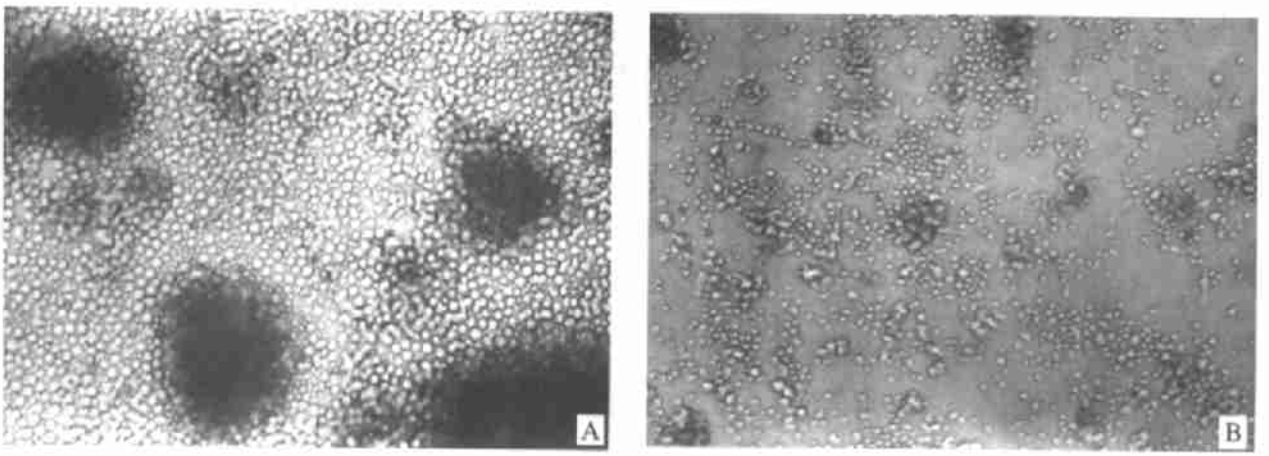


图1 从人外周血中建立短期 SEA 反应 T 细胞系 (×100)

A：SEA 反应 T 细胞系(SEA 1 μg/ml，rIL-2 200 U 作用第4天)；B：rIL-2作用的 PBMC(仅 rIL-2 200 U 作用第4天)

Fig 1 Establishment of short-term SEA-specific T-cell line from human peripheral blood (×100)

A：SEA-reactive T-cell line treated with SEA 1 μg/ml，rIL-2 200 U (4th day)；B：PBMC treated with rIL-2 200 U(4th day)

2.2 SEA 反应 T 细胞系的保存及细胞碎渣的去除

SEA 反应 T 细胞经10% DMSO 小牛血清冻存，复苏后仍然保持较强的对 SEA 反应性。经一次 SEA 刺激诱导后，可以大量冻存一批，以备以后实验使用。SEA 刺激诱导过程中，有许多对 SEA 不反应的细胞在培养中逐步死亡，故需清除细胞死亡碎片，采用 Ficoll 液及较高离心速度基本可以排除。

2.3 SEA 刺激浓度对 SEA 反应细胞的影响

SEA 0.5～5 μg/ml 对 PBMC 都有较强的刺激效果，由此建立的 SEA 反应 T 细胞系对 SEA 的再次刺激都可产生应答。SEA 刺激浓度再高(如8 μg/ml)虽也能产生强的应答增殖能力，但随后的细胞死亡也较快，SEA 反应 T 细胞不易建立。

2.4 SEA 诱导人外周血短期 SEA 反应 T 细胞凋亡

SEA 1 μg/ml 诱导同样剂量刺激建立的短期 SEA 反应 T 细胞凋亡非常明显。光镜下，作用8 h 可观察到部分细胞死亡，作用16 h 则出现比较明显的凋亡细胞特征。FCM 分析亚 G_0-G_1 峰(A_0)显示，随着诱导时间的延长，凋亡量逐步升高，至作用的第16小时，细胞凋亡量可达58%，见图2。SEA 反应 T 细胞(SEA 1 μg/ml 使用剂量诱导建立)凋亡量随 SEA 再次刺激浓度(0.5～6 μg/ml)的升高而增加。

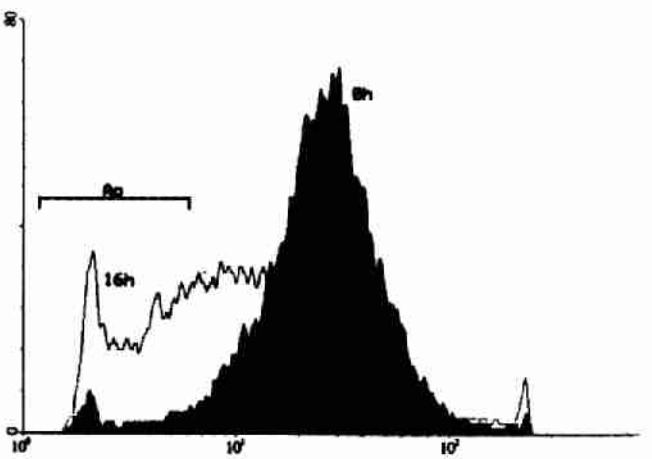


图2 FCM 分析 SEA 诱导 SEA 反应 T 细胞凋亡
(A_0代表凋亡细胞)

Fig 2 Analysis of apoptosis induced by SEA in SEA-specific T cells by flow cytometry (The A_0 peak represents apoptotic cells)

1.8%琼脂糖凝胶细胞 DNA 电泳显示，SEA 1 μg/ml 诱导同样剂量刺激建立的短期 SEA 反应 T 细胞于作用的第16 h，DNA 电泳成梯形泳带较明显。至作用的第24 h 和32 h 时，由于

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

死亡细胞增多，DNA梯形渐弱，而近呈模糊的片状条带，见图3。

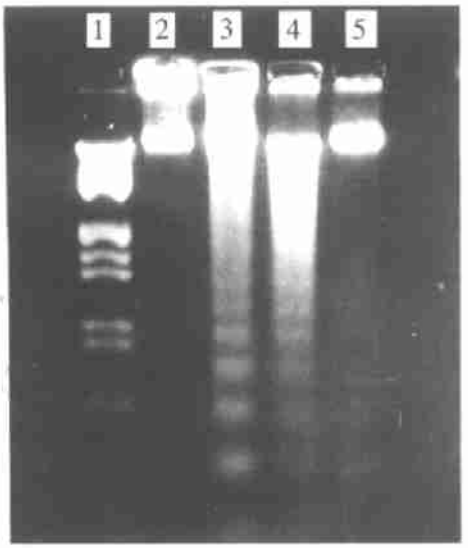


图3　DNA琼脂糖凝胶电泳分析SEA诱导SEA反应T细胞凋亡　1. DNA标准(λDNA/*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ)；2. 0 h；3. 16 h；4. 12 h；5. 8 h

Fig 3　Analysis of apoptosis induced by SEA in SEA-specific T cells by DNA electrophoresis with 1.8% agarose gel

1. DNA Marker(λDNA/*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ)；2. 0 h；3. 16 h；4. 12 h；5. 8 h

3　讨论

PBMC主要由T、B淋巴细胞和单核细胞组成，SAg可以与单核细胞、B细胞表面的MHC Ⅱ类分子结合，通过TCRVβ激活大量T细胞。激活的T细胞随后在IL-2的作用下，继续大量扩增。经过2周左右在IL-2存在的条件下扩增生长，特异性的SAg反应T细胞系即可建立。此时，B细胞与非特异性的T细胞已大量死亡，单核细胞因贴在瓶壁在换瓶培养中可去除。因此，由此建立的短期SAg反应T细胞系主要由SAg特异的T细胞组成。用这种方法建立起来的SAg反应T细胞系在SAg基础和应用研究方面起到重要作用[4]。

超抗原诱导特异性T细胞发生激活诱导的细胞死亡(Activation-induced cell death，AICD)，导致T细胞克隆缺失，在某种程度上降低机体的抵抗力，其过程比较复杂，受到环境中多方面因素的作用。现已明确，Fas系统在超抗原诱导的T细胞克隆缺失中起重要的作用[8]。超抗原作用于机体后，可特异性地激活某些T细胞使之增殖，同时细胞表面标志B_{220}、Fas、FasL等表达升高，细胞因子IL-10、IFN-γ和TNF-α等分泌增加。在超抗原继续刺激细胞生长环境中表达MHC Ⅱ类分子的APC时，则APC的B_7分子与T细胞的CD_{28}分子可相互作用，促进存活基因Bcl-2、Bcl-X_L等表达上调，绕过Fas死亡信号的传导途径，继续促进特异性T细胞增殖。反之，若T细胞生长环境无表达MHC Ⅱ类分子的APC存在，或缺乏其它一些促进细胞增殖与分化的分子存在(如IL-2)，则T细胞经过Fas/FasL途径而诱导凋亡，产生特异性T细胞克隆缺失[9,10]。超抗原通过Fas/FasL途径诱导特异性T细胞克隆缺失的问题，有望通过注入IL-2加以克服，使超抗原既能激活大量的特异性T细胞使之增殖，增强机体的免疫功能，又能避免其产生的AICD[7]，这在超抗原的抗肿瘤等应用方面将起重要的作用。

参考文献

1 Litton M I, Dohlsten M, Lando P A, *et al*. Antibody-targeted superantigen therapy induces tumor-infiltrating lymphocytes, excessive cytokine production, and apoptosis in human colon carcinoma. Eur J Immunol, 1996, 26(1): 1

2 Cauley L S, Cauley K A, Shub F, *et al*. Transferable anergy: superantigen treatment induces $CD4^+$ T cell tolerance that is reversible and requires $CD4^-CD8^+$ cells and interferon gamma. J Exp Med, 1997, 186: 71

3 Alderson M R, Tough T W, Davis-Smith T, *et al*. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. J Exp Med, 1995, 181(1): 717

4 Boshell M, Mcleod J, Walker L, *et al*. Effects of antigen presentation on superantigen-induced apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interaction in human T cells. Immunology, 1996, 87(4): 586

5 Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci M C, *et al*. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods, 1991, 139: 271

6 Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al*. 精编分子生物学实验指南. 北京：科学出版社，1998. 35～36

7 Kuroda K, Yagi J, Imanishi K, *et al*. Implantation of IL-2 containing osmotic pump prolongs the survival of superantigen-reactive T cells expands in mice injected with bacterial superantigen. J Immunol, 1996, 157(4): 1422

8 Ettinger R, Panka D J, Wang J K M, *et al*. Fas ligand-mediated cytotoxicity directly responsible for apoptosis of normal $CD4^+$ T cells responding to a bacterial superantigen. J Immunol, 1995, 154(9): 4302

9 Renno T, Hahne M, Tschopp J, *et al*. Peripheral T cells undergoing superantigen induced apoptosis *in vivo* express B_{220} and upregulate Fas and Fas ligand. J Exp Med, 1996, 183(2): 431

10 Aroeira L S, Moreno M C, Martinez C. *In vivo* activation of T-cell induction into the primed phenotype and programmed cell death by staphylococcal enterotoxin B. Scand J Immunol, 1996, 43(5): 545

(收稿：1998-12-09；修回：1999-06-23)

(编辑　王　红)

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

A study of superantigen-induced T-cell apoptosis using establishment of short-term superantigen-specific T cell line from human peripheral blood*

Song Jianxun, Zhu Xihua, Cheng Keming (Department of Immunology, Faculty of Basic Medical Sciences, Institute of Immundogy PLA, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To establish the short-term superantigen-specific T cell line from human peripheral blood and study the superantigen-induced T-cell apoptosis. Methods: The short-term SEA-reactive T-cell line was established by simulation of PBMC 10^6 with 0.5～5 μg/ml SEA for 3 d and followed by expansion of cells in rIL-2 (200 U/ml) for 2 weeks. The apoptosis of the cell line was detected with both FCM and DNA electrophoresis analysis. Results: The short-term SEA-reactive T-cell line was established by 0.5～5 μg/ml SEA and 200 U/ml rIL-2 from PBMC and the cell line could be maintained for 40 d *in vitro*. Meanwhile, it was found that the apoptosis appeared after the second stimulation of the SEA-reactive T cells with SEA 1 ug/ml. Conclusion: The short-term superantigen-specific T cell line from human peripheral blood can be established by stimulation of SAg and rIL-2. T-cell apoptosis appears after the second stimulation with SEA in the anergy induced by superantigen.

Key words superantigen; T cell; apoptosis; cell line; PBMC

* This project was supported by the "Ninth five" obligatory budget of PLA, No. 96Z038

(上接502页)

2 结果

4种 ELISA 试剂检测 anti-HIV(1/2型)抗体结果见表1。

表1 4种 ELISA 试剂检测 anti-HIV (1/2型)抗体结果

试剂	实验总人次	阳性例数	比例
上海实业科华生物技术有限公司试剂	832	7	0.0084
华美生物工程公司试剂	428	4	0.0093
厦门新创科技有限公司试剂	273	2	0.0073
珠海丽珠医药集团股份有限公司试剂	744	40	0.0538
总 体	2277	53	0.0233

3 讨论

ELISA 法初筛献血员 anti-HIV 时，凡献血员 ELISA 法检测 anti-HIV(1/2型)阳性结果者要求进行双孔复试。复试阴性的可以确定为阴性，复试阳性的要求送 HIV 确认实验室进一步确认，现常用免疫印迹法(WB)和明胶颗粒法(PA)两种方法进行检测[1]。确认试验阴性的血制品可以应用临床，同时首次 ELISA 法阳性结果被判定为假阳性。本结果中53名初筛阳性者中50人双孔复试结果为阴性，3人双孔复试结果阳性，送交重庆市防疫站 HIV 确认实验室，经确认为阴性，故该53份阳性结果全都是假阳性。

我们在进行 ELISA 法初筛献血员的同时，对 ELISA 法首次试验阳性标本采用免疫金标记斑点渗滤法(总后勤部卫生部提供试剂)检测。结果与 ELISA 法双孔复试结果相符。

目前临床应用的 anti-HIV ELISA 法试剂灵敏度较高，但特异性较差，易出现假阳性结果。这可能缘于：加样方式影响 ELISA 法检测结果；加样时吹吸血清产生气泡；洗板不彻底；扣干不完全孔内残留液体过多等实验操作不标准因素。另一个最主要的原因是：献血员血清中所含有的高浓度的非特异性 IgG[2,3]。献血员血清中受检的特异性 IgG 只占总 IgG 中的一小部分，IgG 对聚苯乙烯有较强的吸附性能，抗体或蛋白质抗原吸附其上后保留原来的免疫活性。ELISA 板的制作过程中，为了增加聚苯乙烯对蛋白质尤其是免疫球蛋白的吸附性能，往往使用射线照射聚苯乙烯后再包被制板。如果包被过程中聚苯乙烯表面没有被蛋白质完全覆盖，或封闭过程不完全，实验时加入的血清标本中的免疫球蛋白甚至酶结合物中的蛋白质部分地吸附到包被抗原的表面上，从而使本底增加，出现假阳性[2,3]。

关键词 献血员；ELISA；HIV

中图法分类号 R446.61；R512.91

参考文献

1 肖星甫 主编. 输血技术手册. 成都：四川科学技术出版社，1992. 478～479

2 陈 宇. 加样方式影响 ELISA 检测抗 HCV 结果. 临床检验杂志，1996，14(13)：151

3 陶义训 主编. 免疫学和免疫学检验. 北京：人民卫生出版社，1991. 129～131

(收稿：1997-09-04；修回：1998-12-29)

(编辑 刘 鹏)

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