DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.06.005

Fas抗原在超抗原诱导T细胞凋亡中的作用*

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**:研究Fas抗原介导的死亡效应在超抗原诱导T细胞凋亡中的作用。**方法**:SEA诱导从人外周血建立的短期SEA反应T细胞系凋亡,1.8%琼脂凝胶DNA电泳观察凋亡的特征条带;FCM检测Fas、FasL的表达量变化,Fura-2/AM荧光指示剂检测胞浆$[Ca^{2+}]i$的变化。**结果**:使用FCM特异性检测凋亡亚G0/G1峰大小及1.8%琼脂糖凝胶电泳检测凋亡DNA梯状图谱证明,SEA能诱导短期SEA反应T细胞凋亡,其凋亡的时间与程度与SEA的使用剂量有关。SEA 1 μg/ml建立的短期SEA反应T细胞对SEA 1 μg/ml的再次刺激,凋亡量随作用时间的延长而增多,在作用的第16 h最高,达58%。FCM间接荧光染色法检测发现,Fas及FasL亦随SEA作用时间的延长而表达增多,16 h时表达最多,分别为92%和60%。用Fura-2/AM荧光指示剂检测此时细胞胞浆$[Ca^{2+}]i$已从刺激前的(290±33)nmol/L上升到(680±16)nmol/L。**结论**:Fas抗原与SEA诱导的T细胞凋亡密切相关,换言之,Fas抗原在超抗原诱导T细胞凋亡中起作用,而胞浆$[Ca^{2+}]i$升高与SEA诱导的凋亡T细胞DNA断裂及其它凋亡形态变化有关。

关键词 Fas抗原;T细胞;细胞凋亡;Ca^{2+};超抗原

中图法分类号 R329.25;R392.1

许多研究发现,超抗原(Superantigen,SAg)在激活大量特异性T细胞后,可导致激活诱导的细胞死亡(Activation-induced cell death,AICD),即T细胞凋亡,与SAg诱导的T细胞克隆缺失有关。SAg诱导T细胞凋亡的机制比较复杂,影响因素比较多,如抗原递呈细胞(Antigen-presenting cells, APC)存在与否,细胞因子是否缺乏,T细胞所处的生长时期等等。有研究显示,Fas抗原在SAg诱导的T细胞凋亡中起重要作用[1];也有相反的观点,认为SAg诱导体内T细胞凋亡与环境中的某些细胞因子有关(如γ-INF,IL-2),Fas抗原在其中不起作用[2];也有折中观点,认为Fas抗原在其中起作用,但不是唯一因素[3,4]。但无论如何,Fas抗原作为"死亡分子"在其中的作用正日益受到重视。本研究采用SAg中的金黄色葡萄球菌A型肠毒素(Staphylococcal enterotoxin A, SEA)诱导人外周血中特异性T细胞凋亡,研究Fas抗原在其中的作用,并对此凋亡过程中$[Ca^{2+}]i$的变化进行了观察。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 SEA(1 mg,军事医科院产品),白细胞成份血液标本(重庆西南医院输血科,批号971124~1538)。碘化丙啶(PI,Sigma),非离子去污剂Triton X-100(Sigma)。荧光指示剂Fura-2/AM(BM)。DNA Marker:λDNA/*EcoR*Ⅰ+*Hind*Ⅲ(华美)。酶:蛋白酶K、RNase A(华美)。抗体:鼠抗人Fas mAb DX2、鼠抗人FasL mAb(PharMingen),异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗鼠IgG(华美)。

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

1.1.3 主要仪器 FACStar plus FCM(Becton-Dickinson);MPF-4荧光分光光度计(Hitachi)。

1.2 方法

1.2.1 短期人外周血SEA反应T细胞系的建立 参照文献[5]进行。

1.2.2 SEA诱导短期人外周血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RPMI1640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 1μg/ml,继续培养。

1.2.3 短期人外周血SEA反应T细胞凋亡检测 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[6],FCM检测亚G0/G1峰大小(Ao),反映已固缩和降解核DNA的细胞数,即凋亡细胞比率。实验2次,取平均值。②常规方法提取细胞DNA[7],1.8%琼脂糖凝胶电

* 全军"九五"重点项目,No. 96Z038

** 宋建勋,男,31岁,讲师,博士

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

泳，观察凋亡细胞 DNA 梯状电泳带。

1.2.4　SEA 反应 T 细胞凋亡过程中 Fas、FasL 表达量检测

采用间接免疫荧光染色法。即于培养的不同时间（同上）收集培养细胞（5×10^5/孔），用冷染色溶液 PBA（PBS+2%BSA+0.1%NaN_3）离心洗涤 2 次后加入第一抗体——鼠抗人 Fas mAb 或鼠抗人 FasL mAb 200μl（1∶50 PBS 稀释），以等量正常小鼠 IgG 为对照，4℃ 孵育 30 min，冷 PBA 离心洗涤 2 次后，加入荧光素标记的第二抗体——羊抗小鼠 IgG-FITC 200μl（1∶50 PBA 稀释），4℃ 避光孵育 30 min，冷 PBS 离心洗涤 2 次，将细胞重悬于 200μl PBS 中，混匀，置 FACS 测试管，上机 FCM 检测。实验 2 次，取平均值。

1.2.5　SEA 诱导 SEA 反应 T 细胞凋亡过程中胞浆游离 $[Ca^{2+}]i$ 的变化　SEA 1μg/ml 诱导 SEA 反应 T 细胞（SEA 1μg/ml 刺激后建立）凋亡，于 0、2、4、8、16、24、32 h，收集细胞，参照文献[7]进行 Fura-2/AM 负载及 $[Ca^{2+}]i$ 测定。实验 2 次，取平均值。

2　结果

2.1　SEA 诱导人外周血短期 SEA 反应 T 细胞凋亡

短期 SEA 反应 T 细胞聚集生长，母细胞化现象多见，见图 1A。SEA 1μg/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，见图 1B。作用 16 h 则出现比较明显的凋亡细胞特征，见图 1C。FCM 分析亚 G0-G1 峰（A0）显示，随着诱导时间的延长，凋亡量逐步升高，至作用的第 16 h，细胞凋亡量可达 52%，见图 2A。SEA 反应 T 细胞（SEA 1μg/ml 使用剂量诱导建立）凋亡量随 SEA 再次刺激浓度（0.5～6μg/ml）的升高而增加，见图 2B。

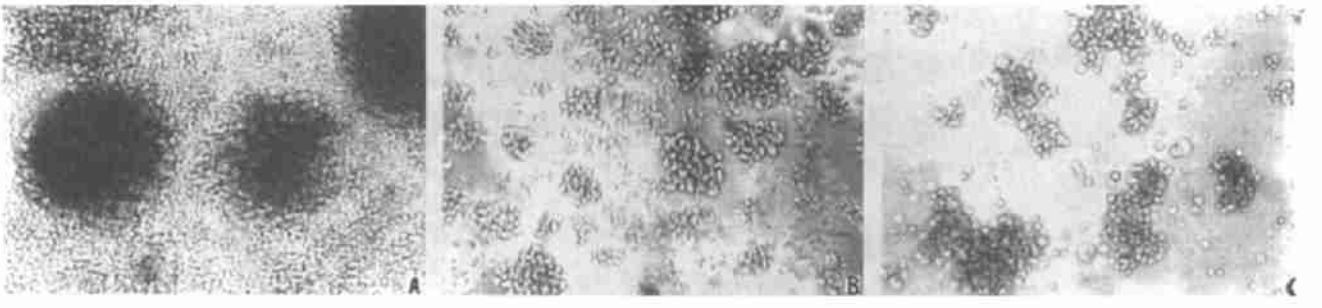


图 1　SEA 诱导 SEA 反应 T 细胞凋亡的形态　（LM×100）

A：SEA 反应 T 细胞系　B：SEA 1 μg/ml 再次作用 8 h　C：SEA 1 μg/ml 再次作用 16 h

Fig 1　Morphology of apoptosis induced by SEA in SEA-reactive T cells　（LM×100）

A：SEA-reactive T cell line　B：8 h treated again by SEA 1 μg/ml　C：16 h treated again by SEA 1 μg/ml

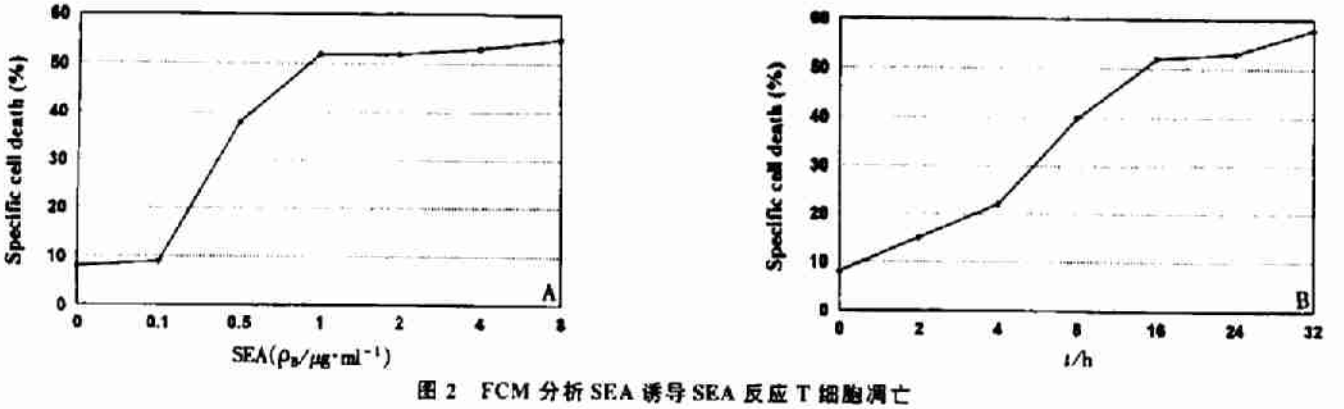


图 2　FCM 分析 SEA 诱导 SEA 反应 T 细胞凋亡

A：SEA 作用剂量与凋亡量的关系　B：SEA 1 μg/ml 作用时间与凋亡量的关系

Fig 2　Analysis of apoptosis induced by SEA in SEA-reactive T cells by flow cytometry

A：Dose response of SEA-reactive T cells to addition of SEA for 16 h　B：Kinetics of apoptosis induced by SEA 1 μg/ml in SEA-reactive T cells

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

1.8%琼脂糖凝胶细胞DNA电泳显示,SEA 1μg/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电泳成较明显梯形泳带。至作用的第24 h和32 h时,由于死亡细胞增多,DNA梯形渐弱,而近呈模糊的片状条带,见图3。

2.2 SEA反应T细胞凋亡过程中Fas、FasL表达量变化

短期SEA反应T细胞Fas抗原已有较高表达,荧光密度强度(MFI)已达到近85%,当受SEA再次作用后,Fas抗原表达继续升高,至作用的第16 h时达到最高值92%,见图4A。

FasL在未受到SEA再次作用前,荧光密度强度为8%,以后逐步升高,但速度较慢,至作用的第16 h,达60%,见图4B。

2.3 SEA诱导SEA反应T细胞凋亡与Fas、FasL表达相关

SEA再次作用的第16 h,细胞凋亡征达58%的最高值,此时Fas与FasL表达亦最高,分别为92%、60%,说明Fas、FasL表达与SEA反应T细胞凋亡相关。

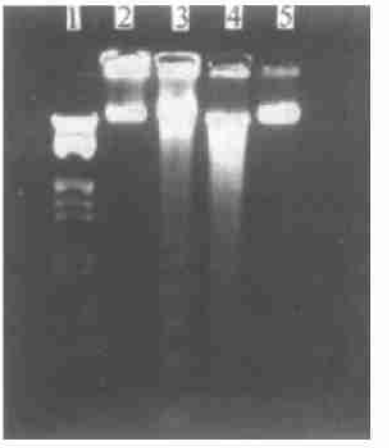


图3 DNA琼脂糖凝胶电泳分析SEA诱导SEA反应T细胞凋亡

1. DNA标准(λ DNA/*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-reactive T cells by DNA electrophoresis with 1.8% agarose gel

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

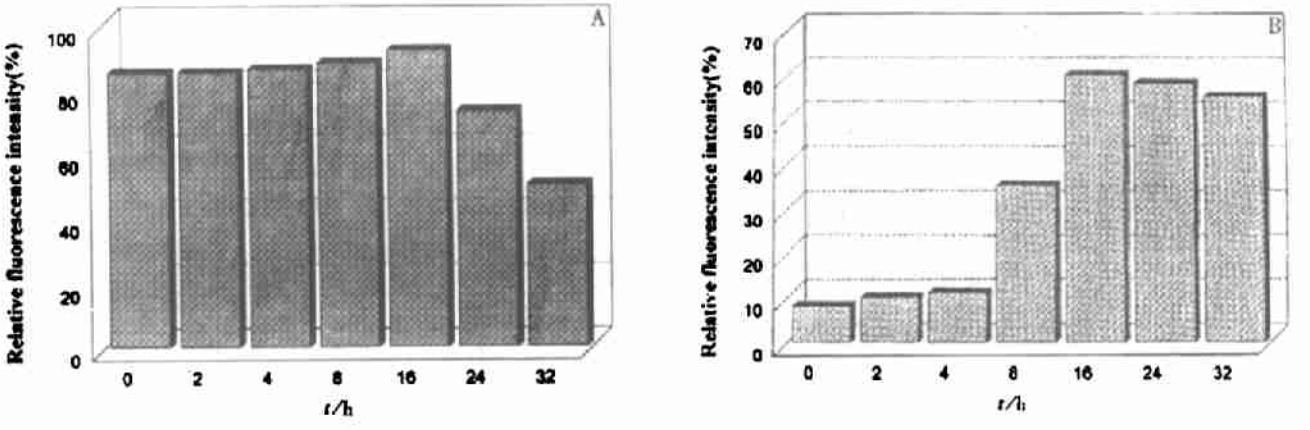


图4 SEA诱导SEA反应T细胞Fas、FasL表达情况

A:SEA 1 μg/ml诱导SEA反应T细胞Fas表达的动态观察 B:SEA 1 μg/ml诱导SEA反应T细胞FasL表达的动态观察

Fig 4 Functional expression of Fas, FasL induced by SEA in SEA-reactive T cells

A: Kinetics of Fas expression induced by SEA 1 μg/ml in SEA-reactive T cells B: Kinetics of FasL expression induced by SEA 1 μg/ml in SEA-reactive T cells

2.4 SEA诱导SEA反应T细胞凋亡过程中胞浆游离$[Ca^{2+}]i$的变化

SEA反应T细胞在SEA 1 μg/ml再次刺激前胞浆游离$[Ca^{2+}]i$为(290±8)nmol/L,至刺激后8 h和16 h,$[Ca^{2+}]i$则明显升高,分别达(330±21)nmol/L和(680±16)nmol/L,以后$[Ca^{2+}]i$又下降,见图5。

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

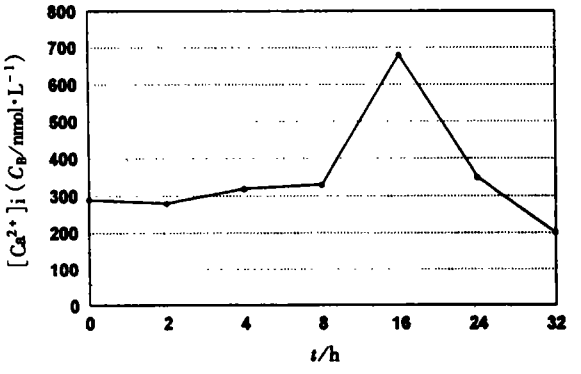


图 5　SEA(1 μg/ml)诱导 SEA 反应 T 细胞凋亡过程中胞浆游离[Ca^{2+}]i 的变化

Fig 5　Changes of cytosolic free [Ca^{2+}]i during apoptosis induced by SEA (1 μg/ml) in SEA-reactive T cells

3　讨论

SAg 诱导 T 细胞凋亡常使机体产生免疫耐受或相关细胞克隆缺失，而对再次刺激出现无反应性，现今虽然对其作用机制的理解尚有分歧，但许多研究显示，Fas 抗原可能在 SAg 诱导 T 细胞凋亡中起重要作用。体内实验发现，金黄色葡萄球菌 B 型肠毒素(Staphylococcal enterotoxin B, SEB)10μg 注入小鼠体内后，优先激活 Vβ8$^+$ T 细胞，使之数量迅速增高，随后逐渐降低，最后降至比 SAg 注入前还低的水平。使用 FCM 技术检测发现，SEB 激活的 Vβ8$^+$ T 细胞 Fas 与 FasL 呈高效表达。可能由于二者结合介导 Vβ8$^+$ T 细胞凋亡而使 Vβ8$^+$ T 细胞数量下降所致。而在 FasL 缺陷的 gld 小鼠体内，体内注射 SEB 并未使 Vβ8$^+$ T 细胞数量明显降低。从正常小鼠外周血分离的 CD4$^+$T 细胞受到 SEB 诱导可发生 AICD，加入可溶性 Fas-IgG 融合蛋白则可阻止 AICD，细胞数量并不减少，提示 Fas/FasL 的相互作用导致了 SEB 诱导的 AICD[8,9]。而从 Fas 抗原缺陷的 Lpr 小鼠和 FasL 缺陷的 gld 小鼠外周血分离的 CD4$^+$ T 细胞受到 SEB 同样诱导下，并不发生 AICD，细胞处于增殖状态。同样，利用基因敲除技术获得的 Fas 抗原阴性小鼠，受到内源性 SAg 作用时，外周血特异性 T 细胞并不发生克隆缺失，而是持续大量增生，伴随淋巴细胞在肝、肺浸润[10]；SEA 和小鼠腺肿瘤病毒(MMTV)编码的内源性超抗原 Mtv-7-SAG 在诱导外周血 T 细胞克隆缺失中，Fas 系统亦起重要的作用[4,5]。从我们检测 SEA 诱导短期 SEA 反应 T 细胞凋亡过程中 Fas 与 FasL 的表达情况看，发生 T 细胞凋亡的最高点是 Fas 与 FasL 表达的最多之时(SEA 作用的第 16 h)，此时，T 细胞胞浆游离[Ca^{2+}]i 亦最高。因此，认为 SAg 在无 APC 或相关辅助分子存在情况下，刺激 T 细胞高效表达 Fas、FasL，Fas/FasL 相互交联，传导死亡信号入胞内，激活相关酶类，引起胞浆游离[Ca^+]i 升高，再激活 Ca^{2+}依赖的核酸内切酶等，发生 T 细胞凋亡。

在有 APC 存在情况下，APC 表面的 B7 分子与 T 细胞表面的 CD28 分子相互作用，提供一个共刺激信号，使 SAg 作用的特异性 T 细胞上调 Bcl-2 或 Bcl-X_L 等基因，反式抑制 FasL 表达，从而绕过了 Fas 抗原死亡信号途径，T 细胞增殖而不是凋亡[11]。辅助分子抗 CD28 mAb 可模拟 APC 表面上的 B7 分子与 T 细胞上 CD28 分子结合，而促使 T 细胞增殖。高浓度 IL-2 本身对 T 细胞就起增殖作用，在体内能诱导 SAg 作用的特异性 T 细胞 bcl-2 基因表达，拮抗 Fas 抗原介导的 T 细胞凋亡。这是移植 IL-2 泵能抑制 SAg 诱导 T 细胞凋亡的原因，至于 SAg 在体内激活大量 T 细胞之后出现的 IL-2 缺乏的原因尚不清楚[12]。PMA 协助 SAg 诱导 T 细胞增殖是通过激活 PKC 途径而促进 IL-2 的高效表达来实现的。

因此，SAg 在 APC 存在的情况下，特异性 T 细胞接受两个信号刺激，起始信号是通过 TCR-CD3 复合分子，即 SAg 一端与 T 细胞表面 TCRVβ 链结合和(或无)另一端与 MHC Ⅱ 类分子的非多态区结合所产生。协同刺激信号来自 APC 上的 B7 分子与 T 细胞上的辅助分子 CD28 分子相互作用。在这两信号刺激下，特异性 T 细胞大量增殖。而当无 APC 和辅助分子存在时，SAg 诱导特异性 T 细胞高效表达 Fas 与 FasL，二者交联，传导死亡信号入胞内，而引起 T 细胞凋亡。高浓度 IL-2 能抑制 SAg 在无 APC 及辅助分子存在下所诱导的 T 细胞凋亡，而促使其增殖，原因是上调 T 细胞 Bcl-2 基因表达，抑制了 Fas 抗原介导的凋亡。

参考文献

1　Wang J K M, Zhu B, Ju S T, *et al*. CD4$^+$ T cells reactivated with superantigen are both more sensitive to FasL-mediated killing and express a higher level of FasL. Cell Immunol, 1997, 179(2): 153

2　Cauley L S, Cauley K A, Shub F, *et al*. Transferable aner-

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

gy: superantigen treatment induces $CD4^+$ T cell tolerance that is reversible and requires $CD4^-CD8^-$ cells and interferon gamma. J Exp Med, 1997,186(1):71

3 Mountz J D, Wu J, Zhou T, *et al*. Cell death and longevity: implications of Fas-mediated apoptosis in T-cell senescence. Immunol Rev,1997,60(1):19

4 Papiernik M, Pontoux C, Golstein P. Non-exclusive Fas control and age dependence of viral superantigen-induced clonal deletion in lupus-prone mice. Eur J Immunol,1995, 25(6):1517

5 Alderson M, 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):71

6 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(2):271

7 Malgaroli A, Milani d, Meldolesi J, *et al*. Fura-2 measurement of cytosolic free Ca^{2+} in monolayers and suspensions of various types of animal cells. J Cell Biol,1987,105(5):2145

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

9 Renno T, Hahne M, Tschopp J, *et al*. Peripheral T cells undergoing superantigen-induced apoptosis in vivo express B220 and upregulate Fas and Fas ligand. J Exp Med,1996, 183(2):431

10 Adachi M, Suematsu S, Suda T, *et al*. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. Proc Natl Acad Sci USA, 1996,93(5):2131

11 Boise L H, Minn A J, Noel P J, *et al*. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing expression of Bcl-X_L. Immunity,1995,3(1):87

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

(收稿:1998-10-30;修回:1999-01-25)

(编辑 汪勤俭)

The role of Fas antigen in superantigen-induced apoptosis of T-cells*

Song Jianxun, Zhu Xihua, Chen Kemin (Institute of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing,400038)

Abstract Objective: To study the role of Fas antigen-mediated killing effect in the superantigen-induced T-cell apoptosis. Methods: T-cell apoptosis was induced by SEA in the SEA-reactive T-cell line established from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The features of apoptosis were observed with optical microscope, flow cytometry (FCM) and DNA electrophoresis. The Fa/FasL ratio and cytosolic Ca^{2+} concentration were measured with FCM and fluorescent probe Fura-2/AM. Results: A short term SEA reactive T-cell line was established by stimulating PBMC 106 with 1 μg/ml SEA for 3 days and expanding the cells in rIL-2(200 U/ml). The cells were maintained in rIL-2 for 2 weeks before use. Both FCM and DNA electrophoresis could demonstrate that apoptosis appeared obviously by second stimulation of the SEA-reactive T-cells with SEA 1 μg/ml. Fas/FasL was substantially upregulated with an increase of cytosolic free Ca^{2+}. Conclusion: These findings suggest that Fas antigen plays an important role in the superantigen-induced T-cell apoptosis and the increase of cytosolic Ca^{2+} was related to DNA fragmentation and morphological changes of T-cell apoptosis.

Key words Fas antigen; T cell; apoptosis Ca^{2+}; superantigen

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

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