DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.03.012

创伤后活化T细胞内游离钙、钙调素、钙调素依赖的蛋白激酶的变化及其与T细胞功能的关系*

梁华平 王正国 耿 波 田丰群 罗 艳 (第三军医大学附属野战外科研究所)重庆,630042

提 要 研究了创伤小鼠活化T细胞内游离钙浓度($[Ca^{2+}]i$)、钙调素(CaM)、钙调素依赖的蛋白激酶(CaM-PK)活性的变化及其与T细胞功能之间的关系。结果显示,创伤后活化T细胞内$[Ca^{2+}]i$降低,且这一变化同创伤小鼠T细胞白介素2(IL-2)mRNA、IL-2受体α(IL-2Rα)mRNA水平降低,IL-2生成减少,IL-2Rα表达受抑,T淋巴细胞转化(TLT)降低密切相关。创伤后活化T细胞内CaM、CaM-PK活性明显降低。钙离子导入剂A_{23187}在体外可提高创伤小鼠活化T细胞内$[Ca^{2+}]i$至正常对照水平,并明显提高其CaM、CaM-PK活性及IL-2 mRNA、IL-2Rα mRNA水平,但不能使之恢复正常。提示活化T细胞内$[Ca^{2+}]i$、CaM、CaM-PK活性降低是导致创伤后T细胞功能受抑的重要原因。

关键词 创伤和损伤;T-淋巴细胞;钙;钙调素;蛋白激酶类

中图法分类号 R641

已有证据表明,细胞内钙离子(Ca^{2+})作为T细胞激活、增殖过程中的信使分子,在传递抗原等外界分子的刺激、启动相关基因的转录及其后续过程中,发挥重要作用[1]。我们在以往的研究中曾观察到创伤小鼠T细胞对丝裂原ConA的增殖反应降低[2]。这一变化是否同T细胞胞浆内游离钙浓度($[Ca^{2+}]i$)的改变及其信号传递障碍有关,尚不清楚。本研究利用小鼠闭合性创伤模型对此进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 动物分组及创伤模型

Balb/c小鼠,雌雄各半,体重18~22 g。随机分为正常对照、伤后1、2、4、7、10 d共6组,每组10只。参照文献[2]制备小鼠闭合性创伤模型。即利用35 g重的砝码从30 cm高处垂直下落冲撞清醒状态的小鼠股骨部,各侧接受撞击15次,使之累积接受能量为3.0 J。各组动物于相应时间活杀,制备脾细胞、胸腺细胞及肠系膜淋巴结细胞悬液。

1.2 T细胞的分离

参照文献[3]以尼龙毛纤维分离上述细胞悬液中的T细胞。ANAE染色法鉴定T细胞纯度为92%,台盼蓝染色证明分离出的T细胞活存率大于95%。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 活化T细胞内$[Ca^{2+}]i$测定 将T细胞调成1×10^7个/ml,加入ConA(Sigma)使其终浓度为10 μg/ml,37℃温育2 h以活化T细胞,洗涤细胞两次。参照文献[4]以Fura-2/AM(Sigma)测定细胞内$[Ca^{2+}]i$。

1.3.2 活化T细胞内CaM、CaM-PK活性测定 按上法以ConA活化T细胞后,超声破膜,离心取上清。蛋白质含量的测定按Lowry氏法进行,参照文献[5,6]测定上清液中CaM、CaM-PK活性。

1.3.3 IL-2 mRNA、IL-2Rα mRNA的测定 于T细胞悬液(5×10^6个/ml)中,加入ConA(10 μg/ml),于37℃、5%CO_2培养箱中培养10 h后收集细胞。细胞总RNA的提取参照文献[7]进行,探针制备、斑点杂交及显色强度测定参照文献[7,8]进行。标记的cDNA探针包括:BamH I酶切的IL-2 cDNA 1.0 kb片段和EcoR I酶切的IL-2Rα cDNA 0.92 kb片段(ATCC)。结果以正常对照显色强度的百分比(%)表示。

1.3.4 IL-2的诱生及活性测定 参照文献[7]以$CTLL_2$细胞株检测活化T细胞培养上清中IL-2活性。

1.3.5 IL-2Rα测定 以间接免疫荧光法[9]检测活化T细胞中阳性细胞百分率。

1.3.6 TLT测定 以^3H-TdR掺入法[2]测定。

1.3.7 A_{23187}对上述各指标的影响 于ConA加入T细胞悬液中的同时,加入A_{23187}(Sigma)使其终浓度为100 nmol/L,观察其对各指标的影响。

1.4 数据处理

结果以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,显著性分析采用t检验,并进行相关分析。

2 结果

2.1 创伤后活化T细胞内$[Ca^{2+}]i$的变化

与正常对照相比,创伤后活化T细胞内$[Ca^{2+}]i$均呈不同程度的降低,以伤后4 d最为明显(见表1)。

* 国家自然科学基金资助项目,No.39170744

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

表 1　创伤后活化 T 细胞内[Ca^{2+}]i 和 T 细胞功能的变化

Tab 1　Changes of [Ca^{2+}]i in activated T cells and T cell functions after trauma

Parameters	Normal control	Day post trauma				
		1	2	4	7	10
[Ca^{2+}]i (nmol/L)	237±33	226±27	173±21*	138±24**	159±32*	179±26*
IL-2 mRNA (%)	100±9.0	91±10	71±7.2*	51±6.4**	68±4.6*	72±8.3*
IL-2Rα mRNA (%)	100±11	92±8.5	69±5.4*	56±5.8**	67±6.9*	74±6.6*
IL-2 (u/10^6 cells)	67±11	66±12	44±4.5*	37±8.0**	41±6.5*	47±4.7*
IL-2Rα (%)	59±8.5	54±7.5	39±7.7*	31±5.5**	36±11*	40±6.6*
TLT (cpm)	15210±2245	14215±2836	10327±2329*	7824±1010**	8126±1129*	11247±1168*

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

2.2　创伤后活化 T 细胞功能的变化

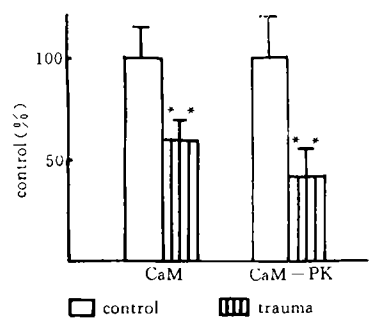
与正常对照相比，创伤后活化 T 细胞内 IL-2 mRNA 及 IL-2Rα mRNA 水平降低，IL-2生成减少，IL-2Rα 表达受抑，TLT 活性下降。这些改变同[Ca^{2+}]i 的变化均呈非常显著的正相关，r 分别为0.74，0.79，0.78，0.68，0.63，P 值均小于0.01（见表1）。

2.3　创伤后活化T细胞内CaM、CaM-PK活性的变化

与正常对照相比，创伤4 d 小鼠活化 T 细胞内 CaM 活性下降了42%（$P<0.01$），CaM-PK 活性下降了58%（$P<0.01$）（见附图）。

2.4　A_{23187}对创伤后活化 T 细胞内[Ca^{2+}]i、CaM、CaM-PK、IL-2 mRNA、IL-2Rα mRNA 的影响

在 ConA（10 μg/ml）活化 T 细胞的同时，加入 A_{23187}（100 nmol/L），不仅可使正常小鼠活化 T 细胞内[Ca^{2+}]i、CaM、CaM-PK、IL-2 mRNA、IL-2Rα mRNA 水平明显提高，还可使创伤小鼠活化 T 细胞内[Ca^{2+}]i 升高到正常对照水平。对创伤小鼠活化 T 细胞内其它指标虽有明显升高作用，但并不能使之恢复到正常对照水平（见表2）。



附图　创伤后活化 T 细胞内 CaM、CaM-PK 活性的变化

Fig　Changes of CaM, CaM-PK activities in activated T cells after trauma

**：$P<0.01$ *vs* control group

表2　A_{23187}对创伤后活化 T 细胞内[Ca^{2+}]i、CaM、CaM-PK、IL-2 mRNA、IL-2Rα mRNA 的影响

Tab 2　Effect of A_{23187} on [Ca^{2+}]i, CaM, CaM-PK, IL-2 mRNA, IL-2Rα mRNA in activated T cells after trauma

Parameters	Normal control		Closed trauma	
	ConA	ConA+A_{23187}	ConA	ConA+A_{23187}
[Ca^{2+}]i (nmol/L)	237±33	763±61**	138±24**	759±48$^{\triangle\triangle}$
CaM (hydrolysis of cAMP%)	43±6.5	74±7.8*	25±4.3**	52±8.2$^{\triangle\triangle\#}$
CaM-PK (pmol/mg/min)	53±11	83±16*	22±8.0**	39±8.7$^{\triangle\triangle\#\#}$
IL-2 mRNA (%)	100±9.0	131±13*	51±6.4**	94±6.8$^{\triangle\#}$
IL-2Rα mRNA (%)	100±11	139±9.0*	56±5.8**	92±7.3$^{\triangle\#}$

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* normal control (ConA) group；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* closed trauma (ConA) group；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* normal control (ConA+A_{23187}) group

3　讨论

严重创伤可致 T 细胞的功能受抑，主要表现为：T 细胞经丝裂原活化后的增殖能力降低，IL-2生成减少，IL-2Rα 表达受抑[2,10]。但其发生机理尚不清楚。已知细胞内[Ca^{2+}]i 增加是 T 细胞活化的必需条件，而 T 细胞的活化又导致 IL-2的合成及 IL-2Rα 的表达。IL-2可通过与 IL-2Rα 反应，进而引起 T 细胞的克隆性增殖[1,9]。可见活化 T 细胞内[Ca^{2+}]i 的高低可影响 T 细胞的功能。本研究发现创伤小鼠活化 T 细胞内[Ca^{2+}]i 降低，且这一变化同 T 细胞 IL-2 mRNA、IL-2Rα mRNA 水平降低，IL-2生成减少，IL-2Rα 表达受抑，TLT 活性降低密切相关。提示创伤后活化 T 细胞内[Ca^{2+}]i

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

降低是导致T淋巴细胞功能受抑的重要原因之一。创伤后活化T细胞内$[Ca^{2+}]i$降低除与T细胞活化过程中磷酯酰肌醇代谢发生障碍，三磷酸肌醇生成减少[11]有关外，还与其cAMP的生成增多[12]有关。

Ca^{2+}在体内主要通过与CaM结合使其活化，活化的CaM再通过CaM-PK而发挥其生物学效应[5,6]。可见在T细胞活化过程中，CaM及CaM-PK活性的高低可影响Ca^{2+}的信号传递，进而影响T细胞的功能。本研究发现，创伤后活化T细胞内CaM、CaM-PK活性均明显降低，其后果是导致T细胞功能进一步受抑。由于CaM、CaM-PK活性是Ca^{2+}依赖性的[5,6]，推测活化T细胞内$[Ca^{2+}]i$降低是引起CaM及CaM-PK活性下降的重要原因。但我们观察到，Ca^{2+}导入剂A_{23187}在体外虽可使创伤小鼠活化T细胞内$[Ca^{2+}]i$提高到正常对照水平，并明显提高CaM、CaM-PK活性，但并不能使二种酶的活性恢复正常。提示创伤小鼠体内可能还存在着Ca^{2+}以外的调节机制降低了CaM及CaM-PK活性或干扰其活性的发挥。因此单纯应用A_{23187}纠正活化T细胞内$[Ca^{2+}]i$的降低并不能完全恢复T细胞IL-2 mRNA及IL-2Rα mRNA到正常水平。可见在提高细胞内$[Ca^{2+}]i$的同时，如何纠正CaM、CaM-PK活性可能是逆转创伤后受抑的T细胞功能的关键。这一问题值得深入研究。

参考文献

1 Hadden JW. Transmembrane signals in the activation of T lymphocytes by mitogenic antigens. Immunol Today, 1988; 9(7): 235

2 梁华平，张 艳，耿 波. 闭合性创伤小鼠巨噬细胞对T淋巴细胞增殖的影响. 第三军医大学学报，1993；15(5)：405

3 李绍康，沈瑞珍. 用国产尼龙毛纤维分离小鼠T淋巴细胞及T细胞鉴定. 上海免疫学杂志，1981；1：10

4 Hoyt DB, Ozkan AN, Frevert J et al. Alteration in Ca^{2+} homeostasis by a trauma peptide. J Surg Res, 1991; 51(6): 477

5 刘景生，刘 晔，金荫昌. 钙调蛋白的制备及活性测定. 中国医学科学院学报，1985；7(6)：453

6 张光毅，张明志，纵艳艳等. 钙调素依赖性蛋白激酶在平滑肌细胞增殖周期中的变化. 徐州医学院学报，1990；10(2)：79

7 Anastassiou ED, Paliogianni F, Balow JP et al. Prostaglandin E2 and other cyclic AMP-elevating agents modulate IL-2 and IL－2R gene expression at multiple levels. J Immunol, 1992; 148(9): 2845

8 李银太，林万明，王 津等. 国产生物素标记DNA探针及其应用的研究. 中华流行病学杂志，1990；11(特刊6号)：1

9 Diamantstein T, Osawa H, Mouzaki A et al. Regulation of interleukin 2 receptor expression and receptor release. Molec Immunol, 1986; 23(11): 1165

10 梁华平，李建南，赵鄞生. 烧伤与淋巴细胞IL-2R表达. 中国实验临床免疫学杂志，1992；4：48

11 梁华平，王正国，耿 波等. 创伤对活化T淋巴细胞内IP_3、Ca^{2+}、CaM及PKC含量的影响. 基础医学与临床，1995；15(2)：52

12 梁华平，田丰群，王正国等. 创伤小鼠淋巴细胞内cAMP、cGMP的变化. 第三军医大学学报，1995；17(1)：15

(收稿：1994-10-18；修回：1995-05-13)

Changes of free calcium, calmodulin, calmodulin-dependent protein kinase in activated T-cells after trauma and their relationship with T-cell functions in mice

Liang Huaping, Wang Zhengguo, Gen Bo, Tian Fengqun, Luo Yan (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

Abstract The changes of free calcium level (Ca^{2+}), calmodulin (CaM) and CaM-dependent protein kinase (CaM-PK) activity in the activated T-cells after trauma and their relationship with T-cell functions were studied in mice. It was found that Ca^{2+} in activated T-cells was reduced after trauma, which was closely related to the reduction of interleukin 2 (IL-2) mRNA and IL-2 receptor alpha mRNA levels, a decrease of IL-2 production, a suppression of IL-2 receptor alpha expression and a reduction of T-cell transformation in T-cells. CaM and CaM-PK activities in the activated T-cells were significantly decreased after trauma. Calcium cation ionophore A_{23187} could restore Ca^{2+} level in activated T-cells of traumatized mice to the control level *in vitro* and it could also inncrease CaM and CaM-PK activities and IL-2 mRNA and IL-2 receptor alpha mRNA levels significantly though they were still under the normal levels. It is suggested that the reduced Ca^{2+} and CaM and CaM-PK activities are the important factors to result in the suppression of T-cell functions after trauma.

Key words wounds and injuries; T lymphocytes; calcium; calmodulin; protein kinases

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