DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.06.002
第16卷第6期 第三军医大学学报 Vol,16,No.6
1994年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec.1994

创伤后巨噬细胞对T淋巴细胞的直接接触免疫抑制作用*

梁华平 耿 波 田丰群 (第三军医大学野战外科研究所) 630042

提 要 本实验研究了创伤小鼠巨噬细胞对T淋巴细胞的直接接触抑制作用。结果显示:创伤后巨噬细胞可通过直接的细胞接触方式抑制正常小鼠T淋巴细胞转化、IL-2的产生、IL-2R的表达以及IL-2介导的淋巴细胞增殖,但对IL-2——IL-2R反应及IL-1的产生无明显影响,可明显提高Ts细胞抑制活性。去除正常小鼠淋巴细胞中的Ts细胞,可阻断创伤后巨噬细胞的这一抑制活性。提示:(1)创伤后巨噬细胞可通过IL-1以外的途径直接接触抑制T淋巴细胞IL-2的产生、IL-2R的表达,进而导致T淋巴细胞转化及IL-2介导的淋巴细胞增殖反应受抑;(2)创伤后巨噬细胞对T淋巴细胞的直接接触抑制作用的实现可能是通过提高Ts细胞的活性而介导的。

关键词 创伤和损伤;巨噬细胞;T淋巴细胞;白细胞介素-2
中图法分类号 R329.24

创伤后巨噬细胞的抑制作用是导致伤后免疫功能低下的重要原因。多数学者认为,创伤后巨噬细胞抑制作用的发挥有赖于其分泌一系列免疫抑制成份如前列腺素-2(PGE_2)、β-转化生长因子(β-TGF)等[1]。我们在以往的实验中曾观察到,创伤后巨噬细胞在其分泌细胞因子的能力被阻断后,仍可通过直接的细胞—细胞接触方式抑制T淋巴细胞增殖反应[2]。本研究旨在进一步探讨其作用环节。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

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。小鼠致伤参照文献[2]进行。

1.2 巨噬细胞的处理

各组动物于相应时间活杀,按常规获取腹腔贴壁的巨噬细胞,调细胞浓度为2×10^6/ml,加入丝裂霉素C(终浓度为25 μg/ml)。于37℃,5% CO_2培养箱中孵育30 min,巨噬细胞经此处理后即丧失合成与分泌细胞因子的能力[3]。以Hanks液洗涤贴壁的巨噬细胞两次,待测其抑制活性。另取正常小鼠腹腔巨噬细胞及脾细胞悬液待测下述各项指标。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 T淋巴细胞转化测定:以同位素^{3}H-TdR掺入法测定[1],结果以cpm值表示。

1.3.2 IL-2的诱生及活性测定:参照文献[1]进行,结果以U/ml表示。

1.3.3 IL-2R的测定:以IL-2吸收试验进行测定[4],结果以吸收百分率(%)表示。

1.3.4 IL-2—IL-2R反应测定:参照文献[5]进行,结果以cpm值表示。

1.3.5 IL-2介导的淋巴细胞增殖反应测定:以同位素^{3}H-TdR掺入法测定[6],结果以cpm值表示。

1.3.6 IL-1的诱生及活性测定:参照文献[1]进行,结果以cpm值表示。

1.3.7 Ts细胞活性测定:参照文献[7]进行,结果以抑制指数(SI)表示。

1.3.8 巨噬细胞直接接触抑制作用测定:在上述各正常小鼠细胞培养系统中,加入经丝裂霉素C处理的巨噬细胞,使其细胞数占10%,观察其对各指标的影响。计算抑制百分率(%)。

$$\text{抑制百分率}(\%)=1-\frac{\text{创伤巨噬细胞组值}-\text{对照组值}}{\text{正常巨噬细胞组值}-\text{对照组值}}\times100\%$$

1.3.9 去除不同亚群淋巴细胞对巨噬细胞直接接触抑制作用的影响:参照文献[8]将脾淋巴细胞分别用适量的抗Ig、抗L_3T_4、抗Lyt_2单克隆抗体(北京医科大学免疫教研室提供)加豚鼠补体处理,以分别去除B细胞、Th细胞和Ts细胞,观察巨噬细胞对此种处理后的淋巴细胞的直接接触抑制作用变化。

1.4 数据处理

结果以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用成组或配对t检验进行显著性分析。

2 结果

2.1 创伤后巨噬细胞对正常小鼠T淋巴细胞转化的影响

创伤后各天巨噬细胞均可通过直接的细胞接触方式抑制正常小鼠T淋巴细胞转化,以伤后4 d最明显,伤后10 d基本恢复正常(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 创伤后巨噬细胞对正常小鼠T淋巴细胞转化的影响

Tab 1 Effect of macrophage from traumatized mice on T lymphocyte transformation of normal controls

Macrophage groups	T lymphocyte transformation (cpm)	Suppressive rate (%)
Normal controls	14210±1324	0
1st day post trauma	11936±947	16±5.8
2nd day post trauma	11226±763※	21±4.0
4th day post trauma	9663±412※	32±7.2
7th day post trauma	12931±644	9±3.7
10th day post trauma	13215±728	7±2.1

Compared with normal controls, ※ $P<0.05$

2.2 创伤后巨噬细胞对正常小鼠IL-2、IL-2R系统及IL-1、Ts细胞活性的影响

和正常小鼠巨噬细胞相比，创伤4 d巨噬细胞可通过直接的细胞接触方式抑制正常小鼠IL-2的产生、IL-2R表达以及IL-2介导的淋巴细胞增殖反应。对IL-2－IL-2R反应及IL-1的产生无明显影响，但可显著增强正常小鼠Ts细胞活性(见表2)。

表2 创伤后巨噬细胞对正常小鼠IL-2、IL-2R系统及IL-1、Ts细胞活性的影响

Tab 2 Effect of macrophage from traumatized mice on IL-2, IL-2R system, IL-1 and Ts activity of normal controls

Parameters	Macrophage groups		Suppressive rate (%)
	Normal controls	4 days post trauma	
IL-2	56±16	35±11※	37±7.8
IL-2R	67±11	49±8.0※	23±8.3
IL-2－IL-2R	5250±1130	5050±849	3.8±1.4
IL-2 mediated proliferation	9820±964	6137±448※	38±9.7
IL-1	6840±842	6732±635	1.6±0.8
Ts	1.5±0.2	2.4±0.4※※	−60±10

Compared with normal controls, ※ $P<0.05$, ※※ $P<0.01$

2.3 去除不同亚群淋巴细胞对创伤后巨噬细胞的直接接触抑制作用的影响

去除正常小鼠脾淋巴细胞中的B细胞、Th细胞，并不能消除创伤后巨噬细胞对其T淋巴细胞转化的直接接触抑制作用，而去除正常脾淋巴细胞中的Ts细胞后，则可使创伤鼠巨噬细胞的这一抑制作用消失(见表3)。

表3 去除不同亚群淋巴细胞对创伤后巨噬细胞的直接接触抑制作用的影响

Tab 3 Effect of removal of various lymphocyte subtypes on direct contact inhibition of macrophage post trauma

Cell content	Macrophage groups		Suppressive rate (%)
	Normal controls	4 th day post trauma	
Total of splenocyte	14210±1324	9663±412※	32±8.5
Removal of B cell	12780±1120	8230±447※	36±10
Removal of Th cell	9628±627	6021±446※	37±9.4
Removal of Ts cell	16450±1427	15780±1145	4.0±1.8

Compared with normal controls, ※ $P<0.05$

3 讨论

创伤后巨噬细胞对T淋巴细胞增殖的调节作用已有较多报道。但多数学者从巨噬细胞产生的细胞因子着手进行研究[1]，未能揭示出巨噬细胞对T淋巴细胞功能的细胞接触抑制作用。本研究在以往实验的基础上，观察了创伤后巨噬细胞对T淋巴细胞增殖的影响，进一步证实了创伤后巨噬细胞在其细胞因子的合成与分泌受到阻断时，仍可通过细胞接触方式直接抑制T淋巴细胞功能。动态观察的结果表明，伤后4 d巨噬细胞的抑制作用最强，这同以往观察到的伤后4 d T淋巴细胞增殖反应受抑最明显是相一致的[2]。

细胞增殖需要细胞因子与细胞膜上受体的结合。T淋巴细胞增殖反应以及IL-2介导的淋巴细胞增殖均是IL-2与细胞膜上IL-2R反应的结果[3]。本研究发现，创伤后巨噬细胞可通过直接的细胞接触方式抑制淋巴细胞IL-2的产生以及细胞膜IL-2R的表达，但对IL-2－IL-2R反应无明显影响。这说明淋巴细胞在合成分泌IL-2及表达IL-2R的过程中即可受到创伤小鼠巨噬细胞的抑制，而当IL-2及IL-2R一旦形成，巨噬细胞并不能通过其细胞接触方式干扰其反应性。据此可以推测，本实验中观察到的创伤后巨噬细胞对IL-2介导的淋巴细胞增殖反应的抑制作用也可能是通过抑制淋巴细胞IL-2R表达而实现的。

在T淋巴细胞激活过程中，IL-1是T淋巴细胞产生IL-2和表达IL-2R所必需的因子，激活的巨噬细胞所分泌的IL-1量的多少可影响IL-2的产生及应答。本研究发现，创伤后巨噬细胞对正常巨噬细胞IL-1的产生无明显影响。表明创伤后巨噬细胞可直接与T淋巴细胞作用或通过其它途径抑制T细胞IL-2的产生及

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

IL-2R 的表达。已有大量文献报道[8]，创伤后增强的 Ts 细胞活性是导致 IL-2产生受抑及 IL-2R 表达减少的重要原因之一。而 Ts 细胞活性的增强则同创伤后巨噬细胞分泌大量的 PGE_2进而刺激 Ts 细胞的活性有关。本研究发现，创伤后巨噬细胞在其丧失分泌细胞因子(包括 PGE_2等)的情况下，仍可显著增强 Ts 细胞活性。这一发现不仅提示创伤后巨噬细胞与 Ts 细胞可直接传递抑制信号，且这一作用环节可能是创伤后巨噬细胞发挥其对 T 淋巴细胞直接接触抑制作用的机制之一。本研究还观察到，巨噬细胞直接接触抑制作用有赖于 Ts 细胞的存在，这进一步说明巨噬细胞抑制作用的发挥可能是 Ts 细胞介导的。有关巨噬细胞如何通过细胞接触方式向 Ts 细胞传递抑制信号等问题值得深入研究。

参考文献

1 Gribic JT, Mannick JA, Gough DB, et al. The role of prostaglandin E_2 in immune suppression following injury. Ann Surg, 1991, 214(3): 253

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 Stephan RN, Saizawa M, Conrad PJ, et al. Depressed antigen presentation function and membrane interleukin-1 activity of peritoneal macrophages after laparotomy. Surgery, 1987, 102(2): 147

4 匡彦德，张　骅. IL-2吸收试验检测 $CTLL_2$细胞和 ConA 活化小鼠脾细胞的 IL-2受体. 上海医科大学学报，1988，15：259

5 Teodorczyk-Injeyan JA, Sparkes BG, Mills GB, et al. Increase of serum interleukin-2 receptor level in thermally injured patients. Clin Immunol Immunopathol, 1989, 51: 205

6 Zoch G, Hamilton G, Rath T, et al. Impaired cell-mediated immunity in the first week after burn injury: investigation of spontaneous blastogenic transformation, PHA, IL-2 response and plasma suppressive activity. Burn, 1988, 14(1): 7

7 吕　屏，唐生杰，姚光弼. 短寿命与刀豆素 A 诱导的两种抑制性细胞功能的比较. 上海免疫学杂志，1986，6：231

8 Suzuki F, Pollard RB. Suppressor Lyt^{2+} T cells demonstrated in mice late after thermal injury. Immunol Let, 1988, 19: 33

9 Cantrell DA, Smith KA. The interleukin 2 T-cell system: A new cell growth model. Science, 1984, 224: 1312

(收稿：1993-08-13；修回：1994-10-24)

Studies of the direct contact inhibition of macrophages on T-cells after trauma in mice

Liang Huaping, Geng Bo, Tian Fengqun (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract The direct contact inhibition of macrophages on the T-cells after trauma was observed in mice. It was found that the macrophages from traumatized mice could induce inhibitory effect through direct cellular contact on the transformation of T-cells, interleukin-2 (IL-2) production, IL-2 receptor expression and IL-2 mediated lymphocyte proliferation in normal mice but exert no significant effect on IL-1 production; and the macrophages could markedly enhance the inhibitory effect of T_S. This inhibitory effect of macrophages could be abrogated after Ts was removed from the normal mice.

These findings suggest that the direct contact inhibitory effect of macrophages after trauma on the T-cells might be carried out through the enhancement of T_S.

Key words wounds and injuries; macrophages; T lymphocytes; interleukin-2

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