

[文章编号] 1000-2200(2004)03-0193-04

·基础医学·

神经酰胺对人 $\gamma\delta$ T 细胞和 $\alpha\beta$ T 细胞的诱导凋亡作用

梅传忠^{1,2}, 沈继龙¹, 陈 勇³, 李柏青³

[摘要] 目的: 观察神经酰胺对人 $\gamma\delta$ T 细胞和 $\alpha\beta$ T 细胞的诱导凋亡作用。方法: 用结核杆菌低分子多肽抗原 (Mtb-Ag) 和 CD3 单抗 (CD3mAb) 分别刺激正常人外周血单个核细胞, 获得 Mtb-Ag 激活的 T 细胞 ($\gamma\delta$ T 细胞为主) 及 CD3mAb 激活的 T 细胞 ($\alpha\beta$ T 细胞为主); 用不同浓度的神经酰胺 (C2-Cer) 分别作用于 $\gamma\delta$ T 细胞和 $\alpha\beta$ T 细胞, 培养 3 h 后收获细胞, 应用 Annexin-V-FITC/PI 染色, 流式细胞术检测不同亚群 T 细胞的凋亡, 应用四甲基噻唑氮蓝 (MTT) 比色法检测 T 细胞的活性。结果: Mtb-Ag 激活的 T 细胞中 $\gamma\delta$ T 细胞比例可达 70%~90%, CD3mAb 激活的 T 细胞中 $\alpha\beta$ T 细胞比例 > 90%; 与对照组比较, 低浓度的 C2-Cer ($\leq 10 \mu\text{mol/L}$) 对人 $\gamma\delta$ T 细胞和 $\alpha\beta$ T 细胞的诱导凋亡作用和细胞活性抑制作用均不明显 ($P > 0.05$); 而高浓度的 C2-Cer 对 $\gamma\delta$ T 细胞和 $\alpha\beta$ T 细胞的诱导凋亡作用和细胞活性抑制作用存在显著差异: $100 \mu\text{mol/L}$ 的 C2-Cer 诱导 $\gamma\delta$ T 细胞、 $\alpha\beta$ T 细胞凋亡比例分别增加 10.4% ($P > 0.05$) 及 73.5% ($P < 0.01$), 活细胞区 (R1 区) 的细胞比例分别为对照组的 88.1% ($P > 0.05$) 和 7.8% ($P < 0.01$); 而 $500 \mu\text{mol/L}$ 时诱导 $\gamma\delta$ T 细胞和 $\alpha\beta$ T 细胞凋亡比例分别增加 71.9% 和 73.8% ($P < 0.01$), R1 区的细胞比例分别为对照组的 36.5% 和 2.7% ($P < 0.01$)。结论: 神经酰胺能诱导活化的人 $\gamma\delta$ T 细胞和 $\alpha\beta$ T 细胞发生凋亡, 诱导 $\gamma\delta$ T 细胞发生凋亡所需的 C2-Cer 浓度明显高于诱导 $\alpha\beta$ T 细胞所需浓度。

[关键词] 细胞凋亡; 神经酰胺; $\gamma\delta$ T 细胞; $\alpha\beta$ T 细胞; 结核杆菌抗原

[中国图书资料分类法分类号] R 329.25 [文献标识码] A

Apoptosis of $\gamma\delta$ T cells and $\alpha\beta$ T cells induced by ceramide

MEI Chuan-zhong, SHEN Ji-long, CHEN Yong, LI Bai-qing

(Department of Microbiology and Parasitology, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China)

[Abstract] Objective: To investigate the role of apoptosis of $\gamma\delta$ T cells and $\alpha\beta$ T cells induced by ceramide. **Methods:** The peripheral blood mononuclear lymphocytes of healthy donors were stimulated respectively with the low molecular peptide antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis* antigen (Mtb-Ag) and CD3mAb to generate Mtb-Ag activated T cells ($\gamma\delta$ T cells were predominant) and CD3mAb activated T cells ($\alpha\beta$ T cells were predominant). These two T cell subsets were treated with Ceramide (C2-Cer) at different concentration; after 3 hours of cultivation, the apoptosis of different subsets of T cells was measured by flowcytometry (FCM), using Annexin-V-FITC/PI staining; and the availability of T cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric assay. **Results:** The percentage of $\gamma\delta$ T cells in Mtb-Ag activated T cells and $\alpha\beta$ T cells in CD3mAb activated T cells were 70% to 90% and > 90%, respectively. The apoptosis and the inhibition of the availability of $\gamma\delta$ T cells and $\alpha\beta$ T cells induced by lower concentration of C2-Cer ($\leq 10 \mu\text{mol/L}$) appeared weak in contrast to their control. There were significant differences in the role of apoptosis of $\gamma\delta$ T cells and $\alpha\beta$ T cells induced by higher concentration of C2-Cer; the percentage of the apoptotic $\gamma\delta$ T cells and $\alpha\beta$ T cells induced by C2-Cer ($100 \mu\text{mol/L}$) increased by 10.4% ($P > 0.05$) and 73.5% ($P < 0.01$) in contrast with their control, and the percentage of cells in the region live cells (R1) was 88.1% ($P > 0.05$) and 7.8% ($P < 0.01$) of the ones of their control; whereas the percentage of the apoptotic $\gamma\delta$ T cells and $\alpha\beta$ T cells induced by C2-Cer ($500 \mu\text{mol/L}$) increased by 71.9% and 73.8% ($P < 0.01$) in contrast with their control, and the percentage of cells in R1 was

36.5% and 2.7% ($P < 0.01$) of the ones of their control. **Conclusions:** The apoptosis of $\gamma\delta$ T cells and $\alpha\beta$ T cells can be induced by ceramide; it needs higher concentration of C2-Cer to induce the apoptosis of $\gamma\delta$ T cells than to induce the apoptosis of $\alpha\beta$ T cells.

[Key words] apoptosis; ceramide; $\gamma\delta$ T cells; $\alpha\beta$ T cells; *Mycobacterium tuberculosis* antigen

[基金项目] 国家自然科学基金(NO30070721)资助项目

[收稿日期] 2003-11-25

[作者单位] 1. 安徽医科大学 病原生物学教研室, 安徽 合肥 230032; 蚌埠医学院 2. 生化与分子生物学教研室, 3. 免疫学教研室, 安徽 蚌埠 233003

[作者简介] 梅传忠(1972-), 男, 安徽宿州人, 硕士研究生, 讲师, 研究方向: 细胞免疫与细胞凋亡。

[通讯作者] 李柏青, 教授 (E-mail: bb-bqj@yahoo.com)

神经酰胺(ceramide, C2-Cer), 又称 N-脂酰鞘氨醇, 是鞘磷脂信号转导途径的第二信使分子, 参与细胞的多种生理、病理过程, 并在介导细胞凋亡方面具有重要作用^[1]。而 T 细胞作为机体细胞免疫的重要执行者, 对其各种生物学功能的研究和探讨, 有助于人们对于细胞免疫机理的认识。宋秀宇等^[2] 研究证实, 高浓度 C2-Cer 能诱导 $\gamma\delta$ 细胞发生凋亡, 但尚不清楚不同浓度 C2-Cer 在诱导 $\gamma\delta$ 细胞和 $\alpha\beta$ T 细胞凋亡作用方面有何不同。本文以结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 低分子多肽抗原激活的 T 细胞 ($\gamma\delta$ 细胞为优势增殖细胞) 和 CD3mAb 激活的 T 细胞 ($\alpha\beta$ T 细胞为优势增殖细胞) 作为研究对象, 用不同浓度 C2-Cer 分别作用于活化的 $\gamma\delta$ 细胞及 $\alpha\beta$ T 细胞 3 h, 观察两组细胞凋亡情况, 进一步探讨外源性神经酰胺对不同亚群活化 T 细胞的致凋亡作用。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 健康人外周血来自蚌埠医学院健康教工和学生。RPMI 1640 (GIBCO 公司产品); 淋巴细胞分离液 (中国医学科学院血液所产品); 新生牛血清 (NBS) (杭州四季青生物公司产品); rIL-2 (长春长生基因药业股份有限公司产品); 结核杆菌低分子多肽抗原 (Mtb-Ag), 根据文献^[3] 本室自行制备; CD3mAb (OKT3), 美国宾夕法尼亚大学医学院微生物系 Carding 博士惠赠; 神经酰胺 (N-acetyl-D-sphingosine, C2-Cer) (Sigma 公司产品), 用 DMSO 配制成 10 mmol/L, 分装后 -20°C 保存; 四甲基噻唑氮蓝 (MTT) (Fluka 公司产品); 十二烷基磺酸钠 (SDS) 及二甲基甲酰胺 (N,N' -dimethylformamide, DMF) (Amersco 公司产品); anti-TCR $\gamma\delta$ -PE (BD 公司产品); anti-CD3-PE 及 anti-CD3-FITC (Ancell 公司产品); Annexin-V-FITC/PI 试剂盒 (Bender Medsystems 公司产品); 酶联免疫检测仪 (DG3022 型) (南京华东电子管厂生产); 流式细胞仪 (FACS Calibur) (BD 公司产品)。

1.2 活化 T 细胞的诱导及扩增 常规分离健康人外周血单个核细胞, 用含 5% NBS, 5% 人自体血清的 RPMI 1640 培养液制备细胞悬液 [$(1\sim 2)\times 10^6/\text{ml}$], 加入 24 孔细胞培养板, 每孔 1 ml; 实验孔 1 分别加入 Mtb-Ag 5 μg 和 rIL-2 50 u, 实验孔 2 加入

CD3mAb 5 μg 和 rIL-2 50 u。每隔 3~4 天根据细胞增殖情况分孔培养, 每孔补加 rIL-2 50 u。

1.3 活化 T 细胞亚群比例检测 用上述荧光抗体对待测的细胞进行染色^[4], 过程如下: 取混匀的细胞悬液 100 μl , 加入 anti-CD3-PE 或 anti-TCR $\gamma\delta$ -PE 4 μl , 另加 anti-CD3-FITC 3 μl 4°C 避光, 30 min; 用 PBS-5% NBS-0.1% NaN₃ 洗细胞两遍 (500 g, 4°C , 离心 5 min); 加含 1% 多聚甲醛 (PFA) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 150 μl 固定, 然后在流式细胞仪上检测, CellQuest 软件分析。

1.4 C2-Cer 诱导人 $\gamma\delta$ 细胞和 $\alpha\beta$ T 细胞的凋亡作用检测 分别取已培养 15~25 天、生长良好的 $\gamma\delta$ 细胞、 $\alpha\beta$ T 细胞, 调整细胞浓度为 $(1\sim 2)\times 10^6/\text{ml}$ (含 IL-2; 50 u/ml), 于 24 孔板中 37°C , 5% CO₂, 过夜平衡。每种活化 T 细胞分 5 个实验组, 各实验组均加入相应细胞悬液 0.4 ml, 分别加入 C2-Cer, 使各实验组的 C2-Cer 的终浓度分别为 0 $\mu\text{mol/L}$ (对照组)、1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$; 置 37°C , 5% CO₂ 培养 3 h 后, 分别作如下处理: 取混匀的细胞悬液 100 μl , 加入 anti-CD3-PE 或 anti-TCR $\gamma\delta$ -PE 4 μl , 4°C 避光, 30 min, 用 PBS-5% NBS-0.1% NaN₃ 洗细胞两遍 (500 g, 4°C , 离心 5 min); 弃上清, 按 Annexin-V-FITC/PI 试剂盒说明书操作, 然后在流式细胞仪上检测。检测结果使用 CellQuest 软件作分析: 在 FSC、SSC 散点图 (Dot Plot), 设置活细胞区 (R1 区)^[5], 尽可能把坏死的细胞排除在 R1 区外; 在 anti-CD3-PE (或 anti-TCR $\gamma\delta$ -PE)、Annexin-V-FITC 散点图上, 设置 G1=R1, 并以被 anti-CD3-PE (或 anti-TCR $\gamma\delta$ -PE) 荧光抗体染色的细胞设为 R2 区; 在 PI、Annexin-V-FITC 散点图上, 设置 G2=R1 \times R2, 进行 T 细胞凋亡的分析。

1.5 C2-Cer 对人 $\gamma\delta$ 细胞和 $\alpha\beta$ T 细胞活性影响检测 参照文献^[6] 的 MTT 比色法进行检测: 取上述经过 C2-Cer 处理的细胞悬液于 96 孔培养板中, 三复孔为一组 (每孔 90 μl), 加 MTT 溶液 (每孔 10 μl); 置 37°C , 5% CO₂, 4 h 后, 加 10% SDS-50% DMF 溶解剂, 37°C 16 h 后, 在酶标仪上比色, 测 570 nm 处的 OD 值, 分析细胞的活性。

1.6 统计学方法 采用 Poisson 分布的 u 检验。

2 结果

2.1 活化 T 细胞亚群的比例 经流式细胞仪分

析,活化 T 细胞在培养 10 天后,经 Mtb-Ag 激活的 T 细胞中 $\gamma\delta T$ 细胞所占比例高达 70%~90%;经 CD3mAb 激活的 T 细胞中 $\alpha\beta T$ 细胞所占比例高达 90%以上。

2.2 不同浓度 C2-Cer 对 $\gamma\delta T$ 细胞、 $\alpha\beta T$ 细胞的致凋亡作用 与对照组相比,低浓度 C2-Cer ($\leq 10 \mu\text{mol/L}$)对人 $\gamma\delta T$ 细胞和 $\alpha\beta T$ 细胞的诱导凋亡作用均不明显 ($P > 0.05$),如在 $10 \mu\text{mol/L}$ 时 $\gamma\delta T$ 细胞的凋亡细胞比例仅增加 4.9%,而 $\alpha\beta T$ 细胞的凋亡细胞比例仅增加 3.0%。高浓度 C2-Cer 对 $\gamma\delta T$ 细胞的诱导凋亡作用仅在 $500 \mu\text{mol/L}$ 时明显增加 ($P < 0.01$),而在 $100 \mu\text{mol/L}$ 时增加不明显 ($P > 0.05$),如在 $100 \mu\text{mol/L}$ 和 $500 \mu\text{mol/L}$ 时凋亡细胞比例分别比对照组增加 10.4%和 71.9%,R1 区内细胞比例分别为对照组的 88.1% ($P > 0.05$)及 36.5% ($P < 0.01$)。高浓度 C2-Cer 对 $\alpha\beta T$ 细胞的诱导凋亡作用尤其明显 ($P < 0.01$),如在 $100 \mu\text{mol/L}$ 和 $500 \mu\text{mol/L}$ 时凋亡细胞比例分别比对照组增加 73.5%和 73.8% ($P < 0.01$),R1 区内细胞比

例分别为对照组的 7.8%和 2.7% ($P < 0.01$) (见表 1,图 1)。

表 1 不同浓度 C2-Cer 对 $\gamma\delta T$ 细胞、 $\alpha\beta T$ 细胞的诱导凋亡作用比较[百分率(%)]

Ce-Cer 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	$\gamma\delta T$ 细胞			$\alpha\beta T$ 细胞		
	R1 区 的细胞	u* P	凋亡 细胞	R1 区 的细胞	u* P	凋亡 细胞
0	73.7	— —	9.5	— —	62.7	— —
1	73.0	0.06>0.05	13.4	0.81>0.05	63.0	0.03>0.05
10	72.5	0.10>0.05	14.4	1.00>0.05	63.5	0.07>0.05
100	64.9	0.75>0.05	19.9	1.92>0.05	4.9	7.03<0.01
500	26.9	4.67<0.01	81.4	7.54<0.01	1.7	7.60<0.01

*示均与 $0 \mu\text{mol/L}$ 浓度比较

2.3 不同浓度 C2-Cer 对人 $\gamma\delta T$ 细胞和 $\alpha\beta T$ 细胞活性的抑制作用 随着作用于 $\gamma\delta T$ 细胞的 C2-Cer 浓度 ($0 \sim 500 \mu\text{mol/L}$) 的增加,MTT 比色法显示,相应实验组 OD₅₇₀ 的值逐渐变小;而 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 C2-Cer 作用于 $\alpha\beta T$ 细胞,OD₅₇₀ 的值下降小于 0.1 (与对照组相比), $100 \mu\text{mol/L}$ 的 C2-Cer 作用于 $\alpha\beta T$ 细胞,OD₅₇₀ 的值下降了 0.4 (与对照组相比) (见图 2)。

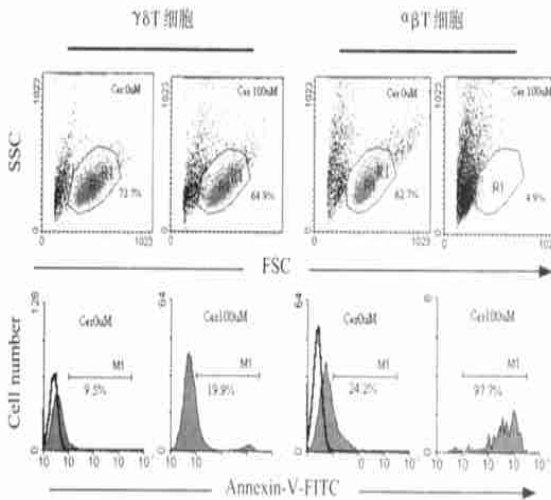


图 1 不同浓度的 C₂-Cer 作用 $\gamma\delta T$ 细胞与 $\alpha\beta T$ 细胞 3h 的细胞凋亡情况

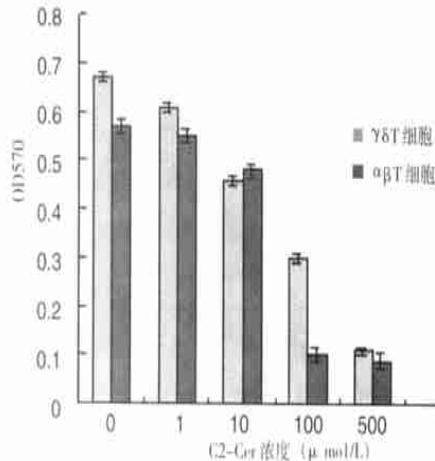


图 2 不同浓度的 C₂-Cer 对 $\gamma\delta T$ 细胞与 $\alpha\beta T$ 细胞活性的影响

3 讨论

T 细胞受体 (TCR) 按其组成多肽链的性质可分为 TCR $\alpha\beta$ 和 TCR $\gamma\delta$ 由此把表达 TCR $\alpha\beta$ 和 TCR $\gamma\delta$ 的 T 细胞分别称为 $\alpha\beta T$ 细胞和 $\gamma\delta T$ 细胞。 $\alpha\beta T$ 细胞主要参与细胞免疫,而 $\gamma\delta T$ 细胞是不同于 $\alpha\beta T$ 细胞的另一种 T 细胞,与 $\alpha\beta T$ 细胞相比 $\gamma\delta T$ 细胞在人外周血中比例甚低。我们用 Mtb-Ag、CD3mAb 分别作用于人 PBMC,经 15~25 天培养后分别获得以

$\gamma\delta T$ 细胞、 $\alpha\beta T$ 细胞为绝对优势的 T 细胞亚群^[7]。

本研究采用细胞表面分子标记技术及荧光标记 Annexin-V 膜联蛋白分析技术,对 T 细胞进行三种荧光抗体染色,用流式细胞仪分析 T 细胞的凋亡,此种分析对于某一细胞群体中的优势细胞亚群的分析更加有利。我们认为在使用 CellQuest 软件处理实验数据时,应在 FSC、SSC 散点图上正确地设立 R1 区,尽量将坏死细胞排除在 R1 区外^[7];在分析细胞的凋亡程度时,应采用分析 R1 区的细胞数量

与分析凋亡细胞数量相结合方法,这样可以保证实验结果准确可靠。MTT 比色法常用于细胞生长及增殖的研究,也可用于评价细胞活性的研究^[6],但其在细胞群水平的检测,故与细胞水平的实验相比是一种较粗糙的实验。若 C2-Cer 作用于人 $\gamma\delta$ T 细胞和 $\alpha\beta$ T 细胞后,MTT 试验的 OD570 的值下降,说明细胞的活性受到抑制,OD570 的值下降愈明显,说明 C2-Cer 对细胞活性的抑制作用愈强。因此细胞活性的抑制可以从另一个方面验证 C2-Cer 对于 T 细胞的致凋亡作用。

神经酰胺作为一个第二信使分子,可以介导多种生物学效应。目前发现愈来愈多的刺激因素,包括细胞因子、免疫分子、紫外线、热休克、激素和某些抗癌药物等都可以通过神经鞘磷脂循环途径产生神经酰胺充当第二信使介导细胞凋亡^[8]。本文应用人工合成的可渗透性 C2-Cer 诱导 $\gamma\delta$ T 细胞及 $\alpha\beta$ T 细胞的凋亡,选取了 5 种 C2-Cer 浓度(0 ~ 500 $\mu\text{mol/L}$)作用 3h 后,应用 Annexin-V-FITC/PI 染色流式细胞术检测 T 细胞的凋亡,应用 MTT 法检测 T 细胞的活性;从细胞凋亡、抑制细胞活性两个方面验证了高浓度的外源性 C2-Cer 能诱导人 $\gamma\delta$ T 细胞和 $\alpha\beta$ T 细胞发生凋亡,但诱导 $\gamma\delta$ T 细胞发生凋亡所需的 C2-Cer 浓度明显高于诱导 $\alpha\beta$ T 细胞所需浓度。我们亦观察到 $\gamma\delta$ T 细胞与 $\alpha\beta$ T 细胞在活化信号的传导机制中存在不同, $\gamma\delta$ T 细胞对活化信号的传导明显慢于 $\alpha\beta$ T 细胞对活化信号的传导。另外据文献^[1]报道,在不同的细胞,神经酰胺在信息传

递中所处的位置与作用也不相同。据此我们认为, $\gamma\delta$ T 细胞和 $\alpha\beta$ T 细胞对 C2-Cer 致凋亡作用的敏感性不同,可能由于神经酰胺在这两种 T 细胞中启动凋亡的机制存在不同;或可能由于 $\gamma\delta$ T 细胞中缺少某种信息分子,导致神经酰胺对其的致凋亡作用延迟,其中具体的分子机制还有待于进一步的深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Hannun YA. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress[J]. *Science*, 1996, 274 (5 294): 1 855 ~ 1 859.
- [2] 宋秀宇,李柏青,杨贵贞.神经酰胺对结核杆菌低分子多肽抗原诱导的 $\gamma\delta$ T 细胞活化及凋亡作用[J].中国免疫学杂志,2000,16(12):663~665.
- [3] Boom WH, Bakji KN, Nayak R, *et al.* Characterization of a 10- to 14-kilodalton protease sensitive GMycobacterium tuberculosis H37Ra antigen that stimulates human $\gamma\delta$ T cells[J]. *Infect Immun*, 1994, 62(12): 5 511~5 518.
- [4] 胡建国,侯彦强,陈 勇,等.M tbAK 细胞与 CD3AK, LAK 细胞体外增殖和杀瘤活性比较[J].蚌埠医学院学报,2001,26(5):377~379.
- [5] 彭黎明,王曾礼.细胞凋亡的基础与临床[M].北京:人民卫生出版社,2000:164.
- [6] Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation[J]. *J Immunol Methods*, 1986, 94(1-2): 57~63.
- [7] 高学平,宋秀宇,陈 勇,等. $\gamma\delta$ T 细胞的细胞毒活性研究[J].肿瘤,2001,21(2):94~97.
- [8] Pfeilschifter J, Huwiler A. Ceramides as key players in cellular stress response[J]. *News Physiol Sci*, 2000, 15(2): 11~15.

常用药物标准名称摘编(十)

宜用	不宜用	宜用	不宜用	宜用	不宜用
甲紫	龙胆紫	玻璃酸酶	透明质酸酶	高锰酸钾	灰锰氧
鞣酐	鞣丸素	曲安奈德	去炎松	奥拉米特	阿卡明
碘普胺	碘普罗胺	甲氧沙林	甲氧补骨脂素	吡诺克辛	白内停
地蒎酚	蒎林	苯扎溴铵	新洁尔灭	克罗米通	优力肤
氟轻松	氟西奈德	琥珀胆碱	司可林	哈西奈德	氯氟舒松
丁卡因	地卡因	莫雷西嗪	安脉静	乌洛托品	优洛托品
甲萘酮	安眠酮	地芬尼多	眩晕停	蔡甲唑林	鼻眼净
度米芬	消毒宁	鬼臼毒素	足叶草酯毒素	卡巴克络	安络血
维 A 酸	维甲酸	倍氯米松	丙酸酯	阿法罗定	安那度
解氟灵	乙酰胺	氟尿嘧啶	5-Fu	咪达唑仑	米唑安定
含氯石灰	漂白粉	甲醛溶液	福尔马林	过氧化氢溶液	双氧水

[摘自:《国家基本药物(西药)》(1999 年版)、《中国药典》(1995 年版)和药典委员会《药名词汇》]