

淋巴细胞转输对线粒体腺苷酸转位酶诱导的自身免疫性心肌病小鼠细胞因子的抑制作用*

汪朝晖¹ 廖玉华¹ 袁璟¹ 王敏¹ 张景辉² 田元² 董继华³ 王金平³

[摘要] 目的:研究淋巴细胞转输对线粒体腺苷酸转位酶(ANT)合成肽诱导的自身免疫性心肌病传染性耐受的小鼠 Th1/ Th2 亚群及血清和心肌组织细胞因子的影响。方法:用 ANT 多肽多次免疫 Balb/ C 小鼠得到心肌病组,单抗组小鼠在给予 ADP/ ATP 肽免疫的第 0、1 和 2 天,同时接受尾静脉注射 400 μg 抗 L3 T4 单抗;第 6 个月末时,将单抗组小鼠的脾细胞取出转输到正常小鼠体内(转输组),此小鼠亦同时给予多肽免疫,方法与心肌病组。对照组以不含 ANT 的相同免疫进行假性免疫,时间和剂量同心肌病组。采用流式细胞术检测脾 T 细胞内细胞因子 IFN- / IL-4 的含量;以 ELISA 法检测其血清中 IFN-、白细胞介素-2(IL-2)、IL-4、IL-6 和肿瘤坏死因子(TNF-)水平;实时荧光定量 PCR 法检测其心肌细胞因子 mRNA 表达。结果:转输组 Th 细胞 IFN-、IL-4 含量与对照组和单抗组接近且明显低于心肌病组;转输组小鼠血清 IFN- 和 IL-2 水平明显高于心肌病组而低于单抗组,IL-4 和 IL-6 水平显著低于心肌病组;TNF- 水平在转输组则最高;心肌细胞因子 mRNA 的表达则转输组显著低于心肌病组,与对照组和单抗组相近。结论:淋巴细胞转输能够阻断心肌病诱导过程中绝大部分细胞因子的生成,与单抗早期干预的结果类似。

[关键词] 心肌疾病;单克隆抗体;转输;T 细胞;细胞因子;CD4

[中图分类号] R542.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-1439(2008)08-0609-04

Transferred splenic lymphocytes suppressed cytokine expression in mice with experimental autoimmune cardiomyopathy induced by ANT peptides

WANG Zhaohui¹ LIAO Yuhua¹ YUAN Jing¹ WANG Min¹
ZHANG Jinghui² TIAN Yuan² DONG Jihua³ WANG Jinping³

(¹Department of Cardiology; ²Laboratory of General Surgery; ³Laboratory of Virology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Technology and Science University, Wuhan, 430022, China)

Abstract Objective: To explore the T helper-1 (Th1)/ T helper-2 (Th2) subset balance of splenic T cells, serum cytokine levels, and myocardial cytokine mRNA levels in mice with experimental autoimmune cardiomyopathy induced by adenine nucleotide translocator (ANT) peptides after transferring toleranced lymphocytes. **Method:** Mice immunized several times with the synthesized ANT peptides were used as the cardiomyopathy (DCM) group. Mice in the anti-L3 T4 McAb treated group were immunized with same peptides, followed by tail-vein injection of 400 μg of anti-L3 T4 on days 0, 1 and 2 post-immunization. On the 180th day, the splenic lymphocytes from the anti-L3 T4 group were transferred into syngeneic recipients (transfer group). These mice were also immunized with same peptides as the DCM group. Control mice were immunized with the same solution as that injected into the DCM group, without the peptides. We examined the percentages of interferon (IFN-) and interleukin-4 (IL-4) producing cells in splenic CD4-positive lymphocytes using flow cytometry analysis. Serum IFN-, IL-2, IL-4, IL-6 and TNF- levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the levels of myocardial cytokine were detected by real-time PCR. **Result:** IFN- and IL-4 levels in Th cells in the transfer group were almost the same as in the control and anti-L3 T4 groups, which were significantly lower than the DCM group. In the transfer group, serum IFN- and IL-2 levels were higher than the DCM group and lower than the anti-L3 T4 group, while IL-4 and IL-6 levels were lower than the DCM group. TNF- level significantly increased in transfer group as compared with the former three groups. Cytokine production in the myocardium was dramatically inhibited in the transfer and the anti-L3 T4 groups, both of which were similar to the control group. **Conclusion:** These results suggest that cytokines production in mice immunized with ANT peptides may be suppressed by transferred splenic lymphocytes. Transferred splenic lymphocytes and anti-L3 T4 antibody immunization produce a similar result.

Key words Cardiomyopathy; Monoclonal antibody; Transfer; T cell; Cytokine; CD4

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:30000070)

¹华中科技大学协和医院心内科 华中科技大学同济医学院心血管病研究所(武汉,430022)

²华中科技大学协和医院普外科实验室

³华中科技大学协和医院病毒学实验室

通讯作者,廖玉华, E-mail: liaoyh27@hotmail.com

随着近年来一系列抗心肌抗体(包括抗肌球蛋白、线粒体腺苷酸转位酶(ANT)和 α -肾上腺素能受体等抗体)在扩张型心肌病(DCM)患者血清中检出及实验鼠自身免疫性心肌炎模型的建立,T细胞介导的自身免疫应答与DCM发病之间的关系越来越引起人们的重视^[1,2]。CD4(相当于小鼠L3T4)是Th细胞活化途径中的一重要信号分子。我们研究发现,抗L3T4单抗早期干预治疗能够防治鼠自身免疫性心肌病,而将单抗治疗的心肌病鼠脾淋巴细胞转输到同时给予心肌自身抗原免疫的小鼠,能够阻止小鼠自身免疫性心肌病的发生^[3]。为什么转输的脾淋巴细胞能够有此作用?本研究将从细胞因子的角度分析淋巴细胞介导小鼠对自身免疫性心肌病传染性耐受的机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

本实验选用健康雄性同源近交系Balb/c小鼠24只(购自湖北省医学科学院实验动物中心),6~8周龄,体重16g左右。随机平均分为4组:心肌病组,予ANT合成肽进行免疫,ANT合成肽的合成和免疫方法同我们以前的报道^[3];对照组,以不含有此肽的相同免疫液进行假性免疫;单抗组,在给予ANT合成肽免疫(方法同心肌病组)的同时,于实验的第0、1和2天连续3d每天注射400 μ g抗L3T4单抗(GK1.5,美国BD公司);转输组,接受单抗组小鼠喂养到第6个月未分离的脾淋巴细胞,该组小鼠同时接受ANT合成肽的免疫,方法同心肌病组,继续观察半年。上述各组小鼠均喂养6个月后取血、心肌组织和脾细胞标本。

1.2 脾淋巴细胞的分离及转输

无菌取新鲜脾脏,经清洗、研磨、200目不锈钢筛网滤过后,以Ficoll-Hypaque分离单个脾淋巴细胞,然后细胞被悬于含有10%FBS和10%青霉素/链霉素的RPMI 1640(美国Gibco公司)递质中,移至24孔培养板,并加入1mg/L concanavalin A(ConA,美国Sigma公司),37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育10h;并将其重悬于PBS缓冲液中(pH7.4),用2%台盼蓝染色,显微镜下鉴定细胞存活率>95%。将细胞悬液浓度调至5 \times 10⁹/L,取1ml细胞悬液腹腔注射予转输组小鼠。

1.3 小鼠T淋巴细胞的分离

无菌取新鲜脾脏制备脾细胞悬液,然后用T细胞分离柱试剂盒(购自美国R&D公司)收集其中的T淋巴细胞。

1.4 流式细胞术检测Th细胞内细胞因子IFN- γ 和白细胞介素-4的含量

实验第6个月未处死小鼠后,立即取新鲜的脾组织,分离、洗涤并悬于1640培养液中。按本组以前报道的方法^[3],应用流式细胞仪(FACSalibur),

以CD3⁺CD8⁻设门,用Cell Quest软件(美国BD公司)分别检测胞内细胞因子白细胞介素-4(IL-4)和IFN- γ 的含量。

1.5 ELISA法检测小鼠血清中IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6和TNF- α

根据相应的ELISA试剂盒说明书^[4],检测各组小鼠血清中IFN- γ 、IL-2、IL-4、肿瘤坏死因子(TNF- α) (以上试剂盒购自奥地利Bender公司)和IL-6(购自美国R&D公司)水平。

1.6 实时荧光PCR法检测小鼠心肌细胞IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6和TNF- α mRNA的表达

用实时荧光PCR法检测细胞因子基因的相对表达量^[4]。将新鲜的心肌组织匀浆后,以TRIzol试剂盒(Invitrogen,USA)抽提T细胞总RNA,进行逆转录,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 3min,94 $^{\circ}$ C 30s,56 $^{\circ}$ C 30s,共45个循环。数据分析均由FTC-2000分析软件自动进行。所得靶基因相对定量=2^{-(Ct靶基因-Ct-actin)} \times 10⁵,其中-actin为内参照,Ct值为模板扩增到一定量的拷贝数时所需反应循环数,其大小与基因的表达量成反比。本文所需引物及探针序列(均由美国Gibco公司合成)参照参考文献[5]。

1.7 统计学处理

实验所得数据统计学处理采用SPSS10.0软件,数值变量以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间数据比较采用t检验,多组数据采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组小鼠Th细胞内细胞因子IFN- γ 和IL-4的含量

与对照组相比,心肌病组小鼠Th细胞内CD3⁺CD8⁻IFN- γ ⁺(Th₁)和CD3⁺CD8⁻IL-4⁺(Th₂)百分含量均明显增高,且以Th₂更为显著;单抗组差异无统计学意义,但明显低于心肌病组;而转输组与对照组和单抗组接近。详见表1。

表1 各组小鼠Th1和Th2细胞百分含量及Th1/Th2比值
%, $\bar{x}\pm s$

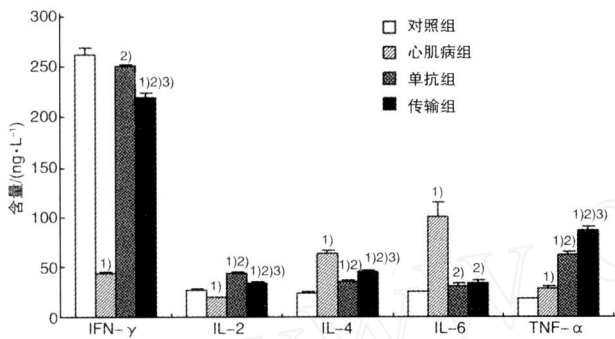
组别	只数	Th1	Th2	Th1/Th2
心肌病组	6	7.85 \pm 1.42 ¹⁾	9.45 \pm 1.70 ²⁾	0.83 \pm 0.01 ²⁾
单抗组	6	6.56 \pm 0.21 ³⁾	2.54 \pm 0.20 ⁴⁾	2.58 \pm 0.16 ⁴⁾
转输组	6	6.56 \pm 0.12 ³⁾	2.41 \pm 0.06 ⁴⁾	2.72 \pm 0.06 ⁴⁾
对照组	6	5.87 \pm 0.19	2.16 \pm 0.09	2.71 \pm 0.08

与对照组比较,¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与心肌病组比较,³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01

2.2 各组小鼠血清IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6和TNF- α 水平

如图1所示,心肌病组小鼠IFN- γ 和IL-2水

平低于对照组,IL-4、IL-6 和 TNF- α 均明显高于对照组;单抗组 IFN- γ 和 IL-6 与对照组相近而 IFN- γ 显著高于心肌病组,IL-6 明显低于心肌病组,IL-2 和 TNF- α 均高于对照组和心肌病组,IL-4 介于对照组和心肌病组之间且与它们差异均有统计学意义;转输组 IFN- γ 、IL-2 和 IL-4 水平介于心肌病组和单抗组之间,IL-6 水平与单抗组相当而明显低于心肌病组,TNF- α 水平在转输组则最高。



与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与心肌病组比较,²⁾ $P < 0.01$;与单抗组比较,³⁾ $P < 0.01$

图 1 各组小鼠血清 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6 和 TNF- α 的含量比较

2.3 各组小鼠心肌细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达

如表 2 所示,心肌病组小鼠心肌细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达均明显高于对照组;而单抗组和转输组所有细胞因子的表达均受到抑制,其相对 mRNA 的量接近于对照组。

表 2 各组小鼠心肌细胞因子 mRNA 表达 $\bar{x} \pm s$

组别	只数	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-6	TNF- α
心肌病组	6	193.3 \pm 48.5	91.1 \pm 5.2	503.1 \pm 65.6	412.7 \pm 57.3	240.5 \pm 33.4
单抗组	6	5.2 \pm 1.5 ¹⁾	2.8 \pm 0.4 ¹⁾	1.6 \pm 1.2 ¹⁾	1.4 \pm 0.8 ¹⁾	1.5 \pm 0.8 ¹⁾
转输组	6	5.3 \pm 1.0 ¹⁾	2.5 \pm 0.5 ¹⁾	1.7 \pm 1.2 ¹⁾	1.5 \pm 1.3 ¹⁾	1.7 \pm 1.0 ¹⁾
对照组	6	4.3 \pm 1.4 ¹⁾	2.0 \pm 0.8 ¹⁾	1.1 \pm 1.1 ¹⁾	1.3 \pm 0.8 ¹⁾	1.4 \pm 0.7 ¹⁾

与心肌病组比较,¹⁾ $P < 0.01$

3 讨论

根据分泌细胞因子的不同,Th0 细胞可分化为主要介导细胞免疫应答的 Th1 和主要介导体液免疫应答的 Th2 细胞亚群。Th1 和 Th2 细胞均由 CD4⁺ T 细胞分化而来,IL-12 诱导 CD4⁺ T 细胞分化为 Th1,而 IL-4 则诱导 CD4⁺ T 细胞分化为 Th2^[6]。本研究以三色荧光标记的流式细胞技术检

测心肌病组和不同阶段单抗组小鼠 Th 细胞内的 IFN- γ 和 IL-4 百分含量,分别代表 Th1 和 Th2 的相对分布趋势。结果发现,心肌病组 Th1 和 Th2 的百分含量均有增高,且以 Th2 更明显,Th1/Th2 比值显著低于对照组;而单抗组 Th1 和 Th2 的百分含量与对照组相近,明显低于心肌病组;脾细胞转输的结果显示与使用单抗有相似的作用。这说明细胞免疫和体液免疫均参与了自身免疫性心肌病的发生发展;抗 L3T4 单抗能够治疗线粒体 ANT 合成肽诱导的小鼠自身免疫性心肌病^[6],能够抑制 Th1 和 Th2 细胞的活化,而且这种作用可以通过脾细胞的转输传染给同样接受 ANT 合成肽免疫的同系小鼠,使后者 Th1 和 Th2 细胞的活化亦受到抑制。

IFN- γ 是 T 细胞免疫应答中的重要调节和效应因子,主要由活化的 Th0、Th1 及几乎所有的 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞产生,它可以促进 Th0 细胞向 Th1 细胞分化。IL-2 主要由 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞产生,可促进 T 细胞和 B 细胞的增殖分化及 IFN- γ 的产生。IL-4 主要由 CD4⁺ T 细胞产生,是 B 细胞生长和分化因子,可促进 Th2 细胞分化和 B 细胞分泌抗体,介导体液免疫反应,它与 IFN- γ 在生成过程中相互抑制。IL-6 是 Th2 类细胞因子,但在外周系统中的来源较为丰富。TNF- α 为非 T 细胞来源细胞因子,主要来源于活化的单核/巨噬细胞^[7]。从血清细胞因子水平来看,单抗组和转输组的 IL-4 和 IL-6 水平均明显低于心肌病组,显然单抗治疗和脾细胞转输均是主要抑制 Th2 细胞相关的细胞因子,因此我们推测后两者对自身免疫性心肌病的治疗作用主要与它们对 Th2 细胞相关的细胞因子的负面作用有关;Th1 相关细胞因子 IFN- γ 和 IL-2 水平在单抗组和转输组均高于心肌病组,这与上述 CD4⁺ T 细胞的细胞内细胞因子表达情况似有矛盾,我们考虑与下列因素有关:DCM 外周血中 CD8⁺ T 细胞活性降低、分泌相关细胞因子减少^[8],而抗 L3T4 单抗主要是抑制 CD4⁺ Th 细胞,对 CD8⁺ T 细胞无明显作用,同时这种作用亦由于脾细胞的转输而传染给受体,故单抗组和转输组小鼠血清 IFN- γ 和 IL-2 水平反而高于心肌病组;自身免疫性心肌病发生后,IFN- γ 和 IL-2 在由细胞内至外周血的分泌可能存在障碍,单抗干预及脾细胞转输能够防止或减轻心肌病的发生从而使分泌障碍不同程度减轻。TNF- α 的结果在对照组、心肌病组、单抗组、转输组中呈逐渐增高而以转输组最高,分析其原因可能为:TNF- α 为非 T 细胞来源细胞因子,在 T 细胞来源的细胞因子如 IL-4 等被阻断后,非 T 细胞来源细胞因子可因反馈调节而生成增多^[9];同时单一的细胞因子只能在一定程度上起作用,而要导致疾病的发生发展或控制疾病

是多种因素和多种细胞因子共同作用的结果。

促炎症细胞因子在正常心脏中不表达,当心肌受损时可激活丝裂原活化的蛋白激酶、信号转导物、转录激活剂、钙调神经磷酸酶通路,这些信号通路激活转录因子 NF- κ B 及 AP-1,促进细胞因子基因表达,导致局部细胞因子大量产生^[10]。本研究发现,IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6 和 TNF- α 等细胞因子在正常心脏组织中基本不表达,而心肌病组呈现明显的高表达,单抗治疗和脾细胞转输均能明显减少心肌局部细胞因子的合成。心肌组织中的细胞因子可能来源于血中也可能是局部组织本身合成,而我们检测心肌组织中细胞因子 mRNA 的表达即可以断定是由局部组织合成而非移行而来。这说明通过脾淋巴细胞转输不仅可抑制全身免疫系统所产生的相关致病性细胞因子,对局部靶器官的免疫异常亦有防治作用。

由此可见,细胞因子在心肌病的发生发展中有复杂的作用,淋巴细胞的转输能够阻断自身免疫性心肌病诱导过程中绝大部分细胞因子的生成,与单抗早期干预的结果类似。

参考文献

- [1] FU M, MATSUI S. Is cardiomyopathy an autoimmune disease? [J]. Keio J Med, 2002, 51: 208 - 212.
- [2] RATCLIFFE N R, HUTCHINS J, BARRY B, et al. Chronic myocarditis induced by T cells reactive to a single cardiac myosin peptide: persistent inflammation, cardiac dilatation, myocardial scarring and continuous myocyte apoptosis[J]. J Autoimmun, 2000, 15: 359 - 367.
- [3] LIAO Y H, YUAN J, WANG Z H, et al. Infectious tolerance to ADP/ATP carrier peptides induced by anti-L3T4 monoclonal antibody in dilated cardiomyopathy mice[J]. J Clin Immunol, 2005, 25: 376 - 384.
- [4] 袁璟, 廖玉华, 汪朝晖, 等. 腺苷酸转位酶诱导自身免疫性心肌病小鼠的异常 T 细胞受体信号通路[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(2): 214 - 218.
- [5] ULETT G C, KETHEESAN N, HIRST R G. Cytokine gene expression in innately susceptible BALB/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during infection with virulent Burkholderia pseudomallei [J]. Infect Immun, 2000, 68: 2034 - 2042.
- [6] MOSMANN T R, CHERWINSKI H M, BOND M W, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins[J]. J Immunol, 1986, 136: 2348 - 2357.
- [7] GRABSTEIN K H J, EISENMAN K, SHANEBECK D, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the b chain of the interleukin-2 receptor[J]. Science, 1994, 264: 965 - 968.
- [8] BOZKURT A, CANATAROGLU A, CETINER S, et al. Lymphocyte subsets in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy[J]. Anadolu Kardiyol Derg, 2001, 1: 98 - 100.
- [9] SMITH S C, ALLEN P M. Neutralization of endogenous tumor necrosis factor ameliorates the severity of myosin-induced myocarditis [J]. Circ Res, 1992, 70: 856 - 863.
- [10] MANN D L. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation[J]. Ann Rev Physiol, 2003, 65: 81 - 101.

(收稿日期:2007-12-14)

“第二届国际心血管病靶向治疗论坛”于 2008 年 6 月在武汉召开

随着分子生物学和免疫学对心脑血管病发病机制的认识,逐步从组织、细胞、蛋白和分子水平发现与发病机制相关的特异性靶点,开始了针对细胞受体、关键基因和调控分子为靶点的生物治疗,从而开创了心血管病研究的生物靶向治疗时代。为生物靶向治疗提供学术交流平台,由华中科技大学同济医学院心血管病研究所、华中科技大学附属协和医院心内科、华中科技大学附属同济医院心内科、湖北省生物靶向治疗研究重点实验室、《临床心血管病杂志》编辑部联合主办的“第二届国际心血管病靶向治疗论坛”于 2008 年 6 月 19~21 日在武汉召开。本次大会汇集国内外 400 多位学者,专题报告、互动研讨为与会者打造了知识与智慧的殿堂。此次会议纪要将在本刊 2008 年第 9 期刊出,欢迎大家浏览。

《临床心血管病杂志》编辑部