

[文章编号] 1000-4718(2007)05-1008-05

TMB-8 对小鼠 T 淋巴细胞体外活化、增殖和细胞周期的影响*

叶雪仪, 曾耀英[△], 黄秀艳, 王通, 臧宁, 周建国, 林长乐
(暨南大学组织移植与免疫实验中心, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 研究胞内钙离子释放阻断剂 8-(N,N-二乙胺)辛基-3,4,5-三甲氧基苯甲酸酯(TMB-8)对刀豆蛋白 A(Con A)介导的小鼠 T 淋巴细胞体外活化、增殖和细胞周期的影响。方法: 以 Con A 作为 T 细胞活化、增殖的刺激剂, 以不同浓度的 TMB-8 及与环孢菌素 A(CsA)联合作用于该系统, 用流式细胞术检测 T 细胞早期活化标志 CD69 分子的表达; 以活体染料羧基荧光素乙酰乙酸(CFDA-SE)染色流式细胞术, 分析 TMB-8 在 Con A 刺激下小鼠淋巴细胞的增殖相关指数(PI); 以碘化丙啶染色分析细胞周期的分布情况。结果: Con A 作用 6 h 后, CD69⁺ T 细胞的比率为(74.88 ± 1.88)%, TMB-8 在终浓度 10、20、40 μmol/L 下均抑制 Con A 介导的 T 细胞 CD69 表达(P < 0.01), 其中, 40 μmol/L 的 TMB-8 为(52.55 ± 1.54)%, 达到最高抑制率。培养 48 h 和 72 h, Con A 刺激下的 PI 值分别为 1.24 ± 0.01 和 2.05 ± 0.07, TMB-8 从 5 μmol/L 起均抑制 Con A 介导的淋巴细胞增殖(P < 0.01), 以 40 μmol/L 的效果最为显著, PI 值分别为 1.01 ± 0.01 和 1.10 ± 0.01; 10 μmol/L 的 TMB-8 与 25 μg/L 的环孢菌素 A(CsA)具有明显的协同抑制作用(P < 0.01)。细胞周期分析显示, 培养 48 h 的 TMB-8 从 10 μmol/L 起即显著抑制 S 期(P < 0.01)。结论: TMB-8 可明显抑制 Con A 介导下的 T 细胞早期活化及增殖, 并具 T 细胞周期的 S 期阻滞作用。

[关键词] 三甲氧基苯甲酸酯; T 淋巴细胞; CD69; 细胞增殖; 细胞周期; 流式细胞术

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effect of TMB-8 on the activation, proliferation and cell-cycle distribution of the mouse T lymphocytes *in vitro*

YE Xue-yi, ZENG Yao-ying[△], HUANG Xiu-yan, WANG Tong, ZANG Ning, ZHOU Jian-guo, LIN Chang-le

(Institute of Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China. E-mail: tzengyy@jnu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the effects of [8-(diethylamino) octyl-3, 4, 5-trimethoxybenzoate] (TMB-8), an intracellular Ca²⁺ antagonist, on the activation, proliferation and cell-cycle distribution of the mouse T lymphocytes stimulated by concanavalin A (Con A) *in vitro*. **METHODS:** After stimulated with Con A, T cells were treated with different concentrations of TMB-8 alone and its combination with cyclosporine A (CsA). The expression of CD69, the early marker of CD3⁺ T cell activation, was measured by FACS. The proliferation-related index was determined by carboxyl fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE) flow cytometry. The cell-cycle distribution was analyzed by propidium iodide staining. **RESULTS:** After 6 h culture, the activation rate of CD69⁺ T cell in Con A group was (74.88 ± 1.88)%. 10, 20 and 40 μmol/L of TMB-8 inhibited the expression of CD69 (P < 0.01), especially in 40 μmol/L (52.55% ± 1.54%). After 48 h and 72 h culture, the PI of Con A group was 1.24 ± 0.01, 2.05 ± 0.07, respectively. TMB-8 with the concentration up to 5 μmol/L exerted a definite inhibitory effect on the proliferation with a maximal inhibition in 40 μmol/L (P < 0.01). In the combination of 10 μmol/L of TMB-8 with 25 μg/L of CsA, an evident synergistic effect was observed (P < 0.01). Moreover, the cell-cycle distribution analysis showed that after 48 h culture, the concentration of TMB-8 over 10 μmol/L showed an evident suppression in S phase. **CONCLUSION:** TMB-8 significantly inhibites the early steps of the Con A-induced T cell activation and proliferation, as well as the progression of T lymphocytes in S phase.

[KEY WORDS] Trimethoxybenzoate; T-lymphocytes; CD69; Cell proliferation; Cell cycle; Flow cytometry

[收稿日期] 2006-06-15 [修回日期] 2006-10-09

* [基金项目] 国家自然科学基金重点基金资助项目(No. 30230350); 广东省自然科学基金资助项目(No. 5300413)

△通讯作者 Tel: 020-85226219; E-mail: tzengyy@jnu.edu.cn.

Ca^{2+} 作为细胞内信号分子参与信息传递一直是人们关注的热点。8-(N,N-二乙胺)辛基-3,4,5-三甲氧基苯甲酸酯(以下称 TMB-8)是细胞内钙离子释放阻断剂,其一般是作为神经系统保护以及对脑血管调节的药物使用。有研究表明,TMB-8 可在体内抑制小鼠的迟发型超敏反应^[1],而 Kumar 等^[2]报道其对小鼠 T 细胞的增殖具有抑制作用,提示可能具免疫抑制调节作用。本研究拟通过流式细胞术等免疫学技术评价 TMB-8 对小鼠淋巴细胞活化、增殖及周期等行为的影响,并探讨其与经典免疫抑制剂环孢菌素 A (CsA)联合使用的效果,为该药物的免疫学相关药理作用及应用提供理论和实验资料。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 实验动物 清洁级 BALB/c 小鼠,雄性,6-8 周龄,体重(20±2)g,购自广东省实验动物中心。

1.2 主要试剂 TMB-8·HCl、刀豆蛋白 A (concanavalin A, Con A)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)均购自 Sigma;环孢菌素 A (CsA)注射液购自 Sandimmun Ciclosporin;羧基荧光素乙酰乙酸(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFDA-SE)购自 Invitrogen-Molecular Probes;RPMI-1640 完全培养液:含 10% 胎牛血清(Gibco)、L-谷氨酰胺(2 mmol/L, Sigma)、二巯基乙醇(50 μmol/L, Sigma)、 1×10^5 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素、RPMI-1640 培养基粉末(Gibco)。CD3-PE、CD69-FITC 单克隆抗体购自美国 BD-PharMingen 公司, FACSCalibur 流式细胞仪为 Becton Dickinson 公司产品。

2 方法

2.1 淋巴细胞悬液的制备 将 BALB/c 小鼠断髓处死,无菌分离小鼠颈部、双侧颌下、锁骨下、腋窝、腹股沟浅淋巴结及肠系膜淋巴结,去掉被膜,200 目筛网过滤。收集细胞,用冷 PBS 洗涤细胞 2 次(250 × g, 5 min)后,得到淋巴细胞悬液。

2.2 T 细胞 CD69 表达测定 采用直接免疫荧光标记法染色,细胞培养 6 h 后,取样离心 2 次后将细胞悬液浓缩至 50 μL,加入 CD69-FITC 和 CD3-PE 单克隆抗体各 0.5 μg,室温下避光放置 30 min,用冷 PBS 离心洗涤 1 次,重悬于 250 μL 的 PBS 中,立即上机检测。

2.3 CFDA-SE 染色检测淋巴细胞增殖 按参考文献^[3],将淋巴细胞悬液用 CFDA-SE 染色,所得的淋巴细胞悬液接种在 96 孔细胞培养板上,并设计不同的分组:对照组,Con A 组,Con A + TMB-8 处理组,

Con A + CsA 处理组,Con A + TMB-8 + CsA 处理组。每一细胞分组各设 4 个复孔。最后将每孔定容至 200 μL。在 37 °C、50 mL/L CO₂ 培养箱预孵 2 h 使其均匀分布,然后加入 Con A(终浓度 5 mg/L),置于 37 °C、50 mL/L CO₂ 培养箱培养 48 h、72 h,分别于不同时间收获细胞,加入 200 μL 的 PBS 后,用流式细胞术分析。

2.4 PI 染色分析细胞周期 48 h 收获培养细胞, PBS 洗涤 1 次(250 × g, 5 min),用 70% 乙醇固定 30 min,再用 PBS 洗涤细胞 2 次(250 × g, 5 min),PI 染液避光染色 15 min,流式细胞术分析细胞周期分布情况。

2.5 流式细胞仪检测及分析 全部数据经 FACS-Calibur 流式细胞仪和 CellQuest 软件获取,获得的数据用 CellQuest 软件和 ModFit™ V3.0 软件分析。

3 统计学处理

实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用统计学软件包 SPSS 10.0 for Windows 进行 One-way ANOVA 分析,两组间的比较用非配对 Student's *t*-test。

结 果

1 TMB-8 对小鼠 T 细胞早期活化标记 CD69 分子表达的影响

对照组小鼠淋巴结 CD3⁺ T 细胞 CD69 的表达率为(3.88 ± 0.58)%,在 Con A 刺激 6 h 后其 CD69 表达明显增加,为(74.88 ± 1.88)%。TMB-8 在终浓度 10、20、40 μmol/L 下均抑制 Con A 介导的 T 细胞 CD69 表达($P < 0.01$),其 CD3⁺ CD69⁺ T 细胞/CD3⁺ T 细胞的百分比分别为(59.41 ± 1.74)%、(57.29 ± 1.64)% 和 (52.55 ± 1.54)%。其中,40 μmol/L 的 TMB-8 达到最高抑制率(图 1)。

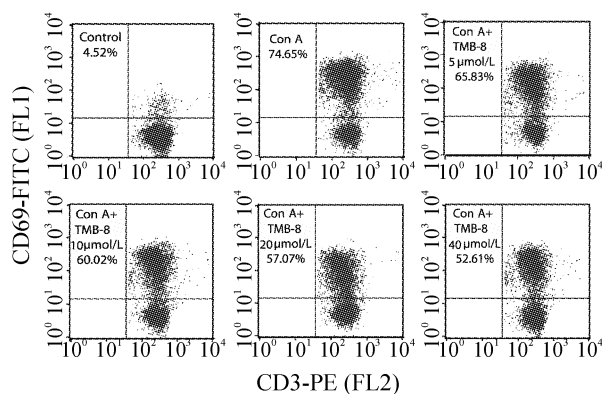


Fig 1 Flow cytometric analysis of the effects of TMB-8 on CD69 expression in CD3⁺ T cells stimulated by Con A.

图 1 流式细胞术分析 TMB-8 对 Con A 刺激下 CD3⁺ T 细胞 CD69 表达水平影响的代表性结果图

2 培养 48 h 和 72 h TMB-8 对淋巴细胞增殖的影响

CFDA-SE 标记后的细胞在其分裂后能够平均分配到两个子代细胞中,因此其荧光强度是亲代细胞的一半,本实验就是利用该技术在连续传代细胞

中以荧光强度减半的特征,结合流式细胞术,动态追踪分析淋巴细胞增殖的情况。经 ModFit™ V3.0 软件拟合后,得到的淋巴细胞增殖动力模型图,并计算出各代细胞所占的百分率和增殖指数(PI)(图 2)。从图 2-A 中可以看出,培养 48 h 后,正常对照组只有

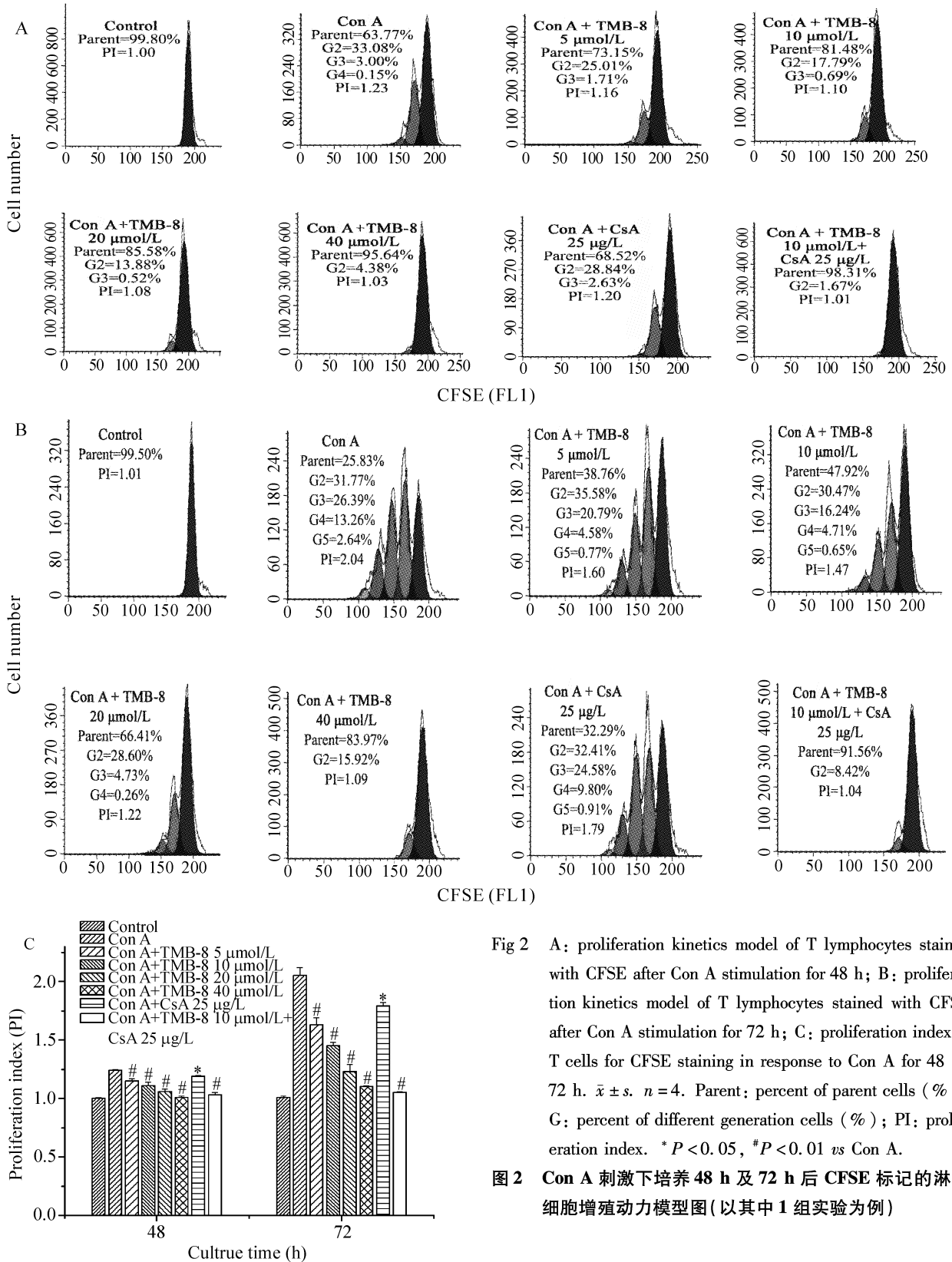


Fig 2 A: proliferation kinetics model of T lymphocytes stained with CFSE after Con A stimulation for 48 h; B: proliferation kinetics model of T lymphocytes stained with CFSE after Con A stimulation for 72 h; C: proliferation index of T cells for CFSE staining in response to Con A for 48 h, 72 h. $\bar{x} \pm s$. $n = 4$. Parent; percent of parent cells (%); G; percent of different generation cells (%); PI; proliferation index. * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ vs Con A.

图 2 Con A 刺激下培养 48 h 及 72 h 后 CFSE 标记的淋巴细胞增殖动力模型图(以其中 1 组实验为例)

1 个亲代峰, PI 值为 1.00 ± 0.01 , 细胞没有增殖现象。而 Con A 刺激组出现子峰, PI 值为 1.24 ± 0.01 。与 TMB-8 共孵育的药物组(5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)可明显抑制这种增殖作用($P < 0.01$), 表现在明显减少其分裂代数, 亲代峰细胞数增多。其中, 以 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 TMB-8 抑制效果最明显, PI 值为 1.01 ± 0.01 。同时, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 TMB-8 (1.11 ± 0.03) 与 25 $\mu\text{g/L}$ 的 CsA (1.19 ± 0.01) 具有明显的协同抑制作用(1.03 ± 0.02) ($P < 0.01$)。而培养 72 h 的增殖动力模型如图 2B 所示, Con A 刺激后子代峰数量较 48 h 增多, 各处理组对 Con A 刺激后 CFDA-SE 衰减影响趋势同 48 h。48 h 和 72 h 的增殖指数的变化

趋势见图 2C 所示。

3 培养 48 h TMB-8 对淋巴细胞分裂周期的影响

在 Con A 诱导的淋巴细胞增殖模型中, 观察 TMB-8 对淋巴细胞进入细胞周期的影响。如表 1 所示, 正常对照组的淋巴细胞大部分处于 G_0/G_1 期, S 期的细胞只有 (2.60 ± 0.61)%; Con A 刺激 48 h 后, 其 S 期的细胞百分率为 (14.18 ± 1.91)%。10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 TMB-8 能使进入 S 期的细胞百分率与 Con A 组相比明显降低 ($P < 0.01$), 其中, 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 TMB-8 抑制效应最明显, 其细胞百分率为 (8.65 ± 1.54)%。同时, TMB-8 并没有使凋亡亚二倍体峰明显增高(表 1)。

表 1 TMB-8 对 Con A 刺激下 48 h 淋巴细胞分裂周期分布的影响

Tab 1 The effect of TMB-8 on the cell cycle distribution of mouse lymphocytes treated with Con A for 48 h (% $\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Group	Ap peak(M1)	G_0/G_1 (M2)	S(M3)	G_2/M (M4)
Control	1.01 ± 0.47	92.88 ± 1.29	2.60 ± 0.61	3.52 ± 1.64
Con A	1.28 ± 0.92	73.25 ± 2.10	14.18 ± 1.91	10.27 ± 1.26
Con A + TMB-8 5 $\mu\text{mol/L}$	1.30 ± 0.98	78.30 ± 3.39	$10.63 \pm 1.95^*$	9.92 ± 2.54
Con A + TMB-8 10 $\mu\text{mol/L}$	1.30 ± 0.83	79.55 ± 3.98	$9.33 \pm 2.30^\#$	9.77 ± 2.66
Con A + TMB-8 20 $\mu\text{mol/L}$	1.57 ± 1.27	78.78 ± 4.18	$9.20 \pm 2.00^\#$	10.47 ± 3.48
Con A + TMB-8 40 $\mu\text{mol/L}$	2.69 ± 2.31	77.93 ± 4.93	$8.65 \pm 1.54^\#$	10.69 ± 5.06

* $P < 0.05$, $^\#P < 0.01$ vs Con A.

讨 论

T 细胞活化信息转导通路是一个 Ca^{2+} 依赖的过程。三磷酸肌醇(IP_3)与胞内特定的钙储备囊泡上的特异受体结合, 促使 Ca^{2+} 进入胞质; 同时开放的胞膜 Ca^{2+} 通道使 Ca^{2+} 流入胞内, 胞内升高的 Ca^{2+} 与二酰甘油(DAG)协同活化蛋白激酶 C(PKC), 以及与钙调蛋白一起增加钙调磷酸酶(Cn)的活性, 最后共同促进白介素 2(IL-2)等细胞因子合成以及 CD69 表达^[4-6]。TMB-8 作为一种胞内 Ca^{2+} 阻断剂, 王斌等^[7]、Battalora 等^[8] 分别报道, 它除了抑制细胞肌浆网内钙释放外, 也可以抑制细胞外钙的内流。但也有证据表明, 其只可以特异地阻止激动剂诱导的 Ca^{2+} 从钙库中的释放, 而这种作用却没有影响包括 T 细胞在内的很多细胞中 Ca^{2+} 的流入^[9,10]。T 细胞丝裂原 Con A 是经 T 细胞表面的膜受体 TCR/CD3 而激活细胞内信号转导途径, 通过 Zap-70、Lck 等上游的蛋白酪氨酸激酶(PTK)进行传递, 从而介导 CD69 表达的^[4,5]。本研究结果显示, TMB-8 对 Con A 介导的 T 细胞早期活化标记分子 CD69 的表达有抑制作用, Kumar 等^[2] 报道 TMB-8 抑制 TCR/CD3 信号通路的早期活化相关的 PTK 及 PKC θ , 而且这种抑制位点特异地作用于 PKC 活化途径的上游, 间接

地使 PKC 途径受阻。这可能是本研究中 TMB-8 阻滞 T 细胞活化的重要原因。

T 细胞活化是增殖的前提条件, 本研究同时发现了 TMB-8 对 Con A 介导的细胞增殖有抑制作用, 并且发现了它与 CsA 的协同抑制作用(图 2A、2B)。进一步的分析表明 TMB-8 能抑制淋巴细胞进入 S 期, 从而使进入分裂期的细胞减少, 导致细胞增殖受到影响。这些现象可能均与 Ca^{2+} 途径相关信号通路有关。

Saxena 等^[1] 利用 TMB-8 成功地在体内抑制了小鼠的迟发型超敏(DTH)反应, 提示通过在体内用钙离子释放阻断剂处理有可能抑制宿主抗移植反应(HVGR)。本实验证明了 TMB-8 能抑制淋巴细胞的早期活化、增殖以及进入细胞周期的结果从另一个方面证实它是一种潜在的免疫抑制剂, 值得进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Saxena HM, Dikshit M. Abrogation of DTH response and mitogenic lectin- and alloantigen-induced activation of lymphocytes by calcium inhibitors TMB-8 and BAPTA-AM[J]. Immunol Lett, 2005, 101(1): 60-64.
- [2] Kumar S, Chakrabarti R. [8-(Diethylamino)Octyl-3,4,5-Trimethoxybenzoate, HCl], the inhibitor of intracel-

- lular calcium mobilization, blocked mitogen - induced T cell proliferation by interfering with the sustained phase of protein kinase C activation[J]. J Cell Biochem, 2000, 76 (4): 539 - 547.
- [3] 肇静娴, 曾耀英, 何贤辉, 等. 活体染料 CFSA - SE 在淋巴细胞增殖中的应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19(2): 109 - 111.
- [4] Craston R, Koh M, Dermott AM, et al. Temporal dynamics CD69 expression on lymphoid cells [J]. J Immunol Methods, 1997, 209(1): 37 - 45.
- [5] Altman A, Isakov N, Baier G. Protein kinase C θ : a new essential superstar on the T - cell stage[J]. Immunol Today, 2000, 21(11): 567 - 573.
- [6] Van Leeuwen JE, Samelson LE. T cell antigen - receptor signal transduction [J]. Curr Opin Immunol, 1999, 11 (3): 242 - 248.
- [7] 王 斌, 肖继皋. TMB - 8 抑制 5 - HT 和 HCl 引起大鼠脑血流量减少[J]. 药学报, 2003, 38(5): 342 - 345.
- [8] Battalora M, Johnston D, DiGiovanni J. The effects of calcium antagonists on anthrone skin tumor promotion and promoter - related effects in SENCAR mice [J]. Cancer Lett, 1995, 98(1): 19 - 25.
- [9] Chakrabarti R, Chang JY. T cell receptor - mediated Ca^{2+} signaling: release and influx are independent events linked to different Ca^{2+} entry pathways in the plasma membrane [J]. J Cell Biochem, 1995, 58(3): 344 - 359.
- [10] Li HZ, Leeman SE, Slack BE, et al. A substance P (neurokinin - 1) receptor mutant carboxyl - terminally truncated to resemble a naturally occurring receptor isoform displays enhanced responsiveness and resistance to desensitization [J]. Pharmacology, 1997, 94(17): 9475 - 9480.

中国病理生理学会第八届理事会 常务理事分工及各工作委员会人员名单

理 事 长: 韩启德

副理事长: 陆大祥、卢 建、朱广瑾、王建枝、高钰琪

秘 书 长: 吴立玲

副秘书长: 张幼怡、张立克

组织工作委员会: 组 长: 朱广瑾

副组长: 黄启福

委 员: 张海鹏、郑世民、李保罗、黄秀榕、王家富、刘永年、徐成丽

学术工作委员会: 组 长: 高钰琪

副组长: 陈国强

委 员: 王树人、高广道、陈 琪、李 萍、姜 勇、李永渝、何韶衡、贾玉杰、肖献忠、席修明

教育工作委员会: 组 长: 卢 建

副组长: 金惠铭、王建中

委 员: 王万铁、朱学良、徐长庆、丛 斌、孙连坤、胡维诚、李志超、李树清、杨惠玲、张根葆、陈命家、王小川、祝世功、王学江、高维娟

对外交流工作委员会: 组 长: 王建枝

副组长: 张幼怡、吴立玲

委 员: 唐佩弦、管又飞、刘秀华、于艳秋、李树清、乔 健、鲍 朗、董伟华、段 红、余细勇、夏晓红、张 力、欧阳静萍、雷 霆、杜 斌

出版工作委员会: 组 长: 陆大祥

副组长: 李楚杰

委 员: 王华东、胡必利、余正伟

学会网站工作组: 组 长: 张立克

委 员: 刘秀华、王 雯、郝 刚、赵明耀