

[文章编号] 1000-4718(2005)03-0533-04

# 蛋白酶体抑制剂对 T 淋巴细胞增殖活化的影响\*

宋朋红, 谢海洋, 郑树森, 吴健

(浙江大学医学院附属第一医院外科研究所, 卫生部多器官联合移植研究重点实验室, 浙江 杭州 310003)

**[摘要]** 目的: 探讨蛋白酶体(proteasome)抑制剂 LAC(lactacystin)和 $\beta$ -LAC( $\beta$ -lactacystin)对外周血 T 淋巴细胞增殖、活化的影响。方法: 以植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)作为刺激剂, 经流式细胞仪检测 T 淋巴细胞增殖(BrdU 掺入率), 检测 CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>及 CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>细胞比例, 同时用 RT-PCR 检测蛋白酶体 11S 调节蛋白 PA28 及细胞因子 IL-2 mRNA 的表达。结果: (1)对预先活化的 T 淋巴细胞, LAC 和 $\beta$ -LAC 降低 T 淋巴细胞 BrdU 掺入率( $P < 0.05$ ); (2)LAC 和 $\beta$ -LAC 不影响 T 淋巴细胞 CD69 的表达(各时点,  $P > 0.05$ ), 而显著抑制 T 细胞表面抗原 CD25 表达(48 h、72 h,  $P < 0.05$ ); (3)与对照组相比, LAC 和 $\beta$ -LAC 明显下调 T 淋巴细胞 PA28、IL-2 mRNA 的表达(48 h、72 h,  $P < 0.05$ )。结论: LAC 和 $\beta$ -LAC 能够显著抑制 T 淋巴细胞增殖, 这一效应与其抑制 T 淋巴细胞表面早期活化抗原 CD25 表达, 下调 PA28、IL-2 mRNA 的表达有关。

[关键词] 蛋白酶体抑制剂; T 淋巴细胞; 免疫抑制

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

蛋白酶体是一种存在于细胞质和细胞核内的蛋白水解酶复合物, 主要降解细胞内的蛋白质, 它对维持细胞正常的新陈代谢以及主要组织相容性抗原(major histocompatibility complex I, MHC I)类分子限制性的抗原递呈均起十分重要的作用<sup>[1,2]</sup>。已有学者对蛋白酶体在肿瘤发生相关机制的作用方面进行了研究, 但对蛋白酶体在淋巴细胞的激活、增殖方面研究未见有相关报道。LAC(lactacystin)和 $\beta$ -LAC( $\beta$ -lactacystin)是两种常用的蛋白酶体抑制剂, 两者的主要区别是: LAC 不能直接进入细胞内, 而是通过内酯化作用转化为活性形式的 $\beta$ -LAC 进入胞内发挥作用<sup>[3]</sup>, 本研究拟通过观察两者对 T 淋巴细胞增殖、活化的影响, 初步探讨其涉及的免疫调节作用机制, 为进一步临床应用提供实验依据。

## 材 料 和 方 法

### 1 主要试剂

RPMI-1640 培养液、胎牛血清(Gibco 公司), PHA、LAC 及 $\beta$ -LAC(Sigma 公司), PE-CD3、FITC-CD25、FITC-CD69 及 FITC-BrdU 单抗均购自美国 BD 公司。

### 2 外周血单个核细胞分离及实验分组

用 Fico400 在无菌条件下分离抗凝外周血的有核细胞(PBMC), 经 PBS 洗涤 2 遍后重悬于 RPMI-

1640 培养液, 并接种于 24 孔培养板中, 每孔 1 mL。实验分 4 组, A 组: 淋巴细胞培养对照组; B 组: 淋巴细胞加 PHA 刺激培养组; C 组: PHA 刺激加 LAC 处理组; D 组: PHA 刺激加 $\beta$ -LAC 处理组, 各组 3 复孔。

### 3 BrdU 掺入法检测 T 淋巴细胞增殖

各实验组在培养 72 h 时加入 BrdU, 使终浓度为 60  $\mu$ mol/L, 继续培养过夜(12 h), 收集细胞经流式细胞仪检测 BrdU 掺入率。

### 4 流式细胞仪检测 T 淋巴细胞表面活化抗原

各实验组培养 24 h、48 h、72 h 后收集细胞, 以 PBS 洗涤 2 遍后, 重悬, 加入单抗 20  $\mu$ L/10<sup>6</sup> 细胞, 孵育 30 min。样本在 Q-PREP 流式细胞仪(Coulter 公司)及其配套软件上进行双色荧光参数获取及分析。根据 Isotype 的非特异性荧光强度设定界限, 以确定双阳性、双阴性及单阳性区。T 淋巴细胞活化抗原 CD69、CD25 的数据均采用 CD25<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>、CD69<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> 双阳性细胞占 CD3<sup>+</sup> 单阳性细胞百分率来表示。

### 5 半定量 RT-PCR 检测 PA28、IL-2 mRNA 的表达

采用 Trizol 法提取总 RNA, 按试剂说明书操作; 按逆转录酶说明书上的步骤将 2  $\mu$ g 总 RNA 逆转录成 cDNA, PCR 引物序列及反应条件: PA28 上游序列, 5'-GAGCAGCTCAACCTGGTCAC-3', 下游序列, 5'-CATGACCATCAGCCGGATGT-3' (产物长度 276 bp); IL-2 上游序列, 5'-GCACCTACTTC-AAGTTCTAC-3', 下游序列, 5'-AAGTCC-CTGGTCTTAAGTG-3' (产物长度 254 bp); GAPDH 上游序列, 5'-ATGCTGGCGCTGAGTACGTC-3', 下

[收稿日期] 2003-08-22 [修回日期] 2003-11-17

\* [基金项目] 教育部高校博士点基金资助

Tel: 0571-87236570; E-mail: sph129@sina.com

游序列, 5' - AGCCATGCCAGTGAGCTTC- 3' (产物长度 432 bp)。反应体系: 10 × buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTP 1 μL, MgCl<sub>2</sub> 2 μL, cDNA 2 μL, 上下游引物各 1 μL 加水至 25 μL 体系。反应条件: 95 °C 2 min, 94 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 45 s, 循环 32 次, 72 °C 延伸 10 min。扩增产物行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 采用 Kodak Science 成像系统扫描电泳条带, 用目的基因与内参照 GAPDH 的吸光度比值表示各基因的相对表达水平。

### 6 统计学处理

实验所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示 ( $n = 5$ ), 用 SPSS 11.0 软件作方差分析及  $q$  检验, 不同参数之间进行 One Way Anova 分析。

## 结 果

### 1 LAC 及 β-LAC 对 T 淋巴细胞增殖的影响

A 组培养 72 h 后 Brdu 掺入率为 17.95% ± 1.42%, B 组为 28.00% ± 1.16%, 而 C 组及 D 组掺入

率分别为: 13.65% ± 0.72%、8.05% ± 0.47%, 明显低于 A、B 两组 ( $P < 0.05$ )。

### 2 LAC 及 β-LAC 对 T 淋巴细胞表面早期活化抗原表达的影响

A 组 CD25 呈低水平的基础表达, 各时点无明显变化, B 组随着时间的增加各时点 CD25 表达明显高于 A 组 ( $P < 0.05$ ), C 组经 LAC 处理后 24 h、48 h CD25 表达明显低于 A 组 ( $P < 0.05$ ), 48 h、72 h CD25 表达明显低于 B 组 ( $P < 0.05$ )。D 组各时点 CD25 表达明显低于 B 组 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

### 3 LAC 及 β-LAC 对 T 淋巴细胞 PA28、IL-2 mRNA 表达的影响

A、B 两组 PA28、IL-2 mRNA 在 24 h、48 h 时点表达变化不明显, 72 h 时点 B 组 PA28、IL-2 mRNA 表达明显高于 A 组 ( $P < 0.05$ ), C 组及 D 组在 48 h、72 h PA28、IL-2 mRNA 表达 A 组明显低于 B 组 ( $P < 0.05$ ), 分别见图 2、图 3。

表 1 不同时点 LAC 及 β-LAC 对 T 淋巴细胞 CD25、PA28、IL-2 表达的影响

Tab 1 Influence of LAC and β-LAC on the expression of CD25, PA28 and IL-2 of T-lymphocytes at different time scale ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

	CD25 expression (CD25 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> / CD3 <sup>+</sup> , %)			PA28 expression (A <sub>PA28</sub> / A <sub>GAPDH</sub> )			IL-2 expression (A <sub>IL-2</sub> / A <sub>GAPDH</sub> )		
	1 d	2 d	3 d	1 d	2 d	3 d	1 d	2 d	3 d
Control	2.94 ± 1.63 <sup>#</sup>	3.70 ± 1.15 <sup>#</sup>	5.37 ± 2.33 <sup>#</sup>	0.5962 ± 0.0188	0.6555 ± 0.0052	0.6577 ± 0.0511 <sup>#</sup>	0.3669 ± 0.0618	0.5364 ± 0.1307	0.6669 ± 0.2071 <sup>#</sup>
PHA	30.19 ± 8.36 <sup>*</sup>	36.68 ± 3.90 <sup>*</sup>	39.98 ± 2.62 <sup>*</sup>	0.5149 ± 0.0456	0.6827 ± 0.0101	0.8117 ± 0.0722 <sup>*</sup>	0.3953 ± 0.1450	0.6874 ± 0.1516	1.008 ± 0.2449 <sup>*</sup>
PHA+ LAC	25.97 ± 4.56 <sup>*</sup>	11.66 ± 2.64 <sup>#*</sup>	8.77 ± 1.22 <sup>#</sup>	0.4481 ± 0.0284 <sup>*</sup>	0.3952 ± 0.0187 <sup>#*</sup>	0.3587 ± 0.0310 <sup>#*</sup>	0.3837 ± 0.1188	0.3222 ± 0.0783 <sup>#*</sup>	0.3726 ± 0.1049 <sup>#*</sup>
PHA+ β-LAC	11.95 ± 3.80	5.27 ± 0.89 <sup>#</sup>	4.30 ± 0.61 <sup>#</sup>	0.4999 ± 0.0421 <sup>*</sup>	0.3305 ± 0.0280 <sup>#*</sup>	0.2339 ± 0.0256 <sup>#*</sup>	0.3515 ± 0.1187	0.2336 ± 0.0748 <sup>#*</sup>	0.1837 ± 0.0512 <sup>#*</sup>

\*  $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup>  $P < 0.05$  vs PHA group.

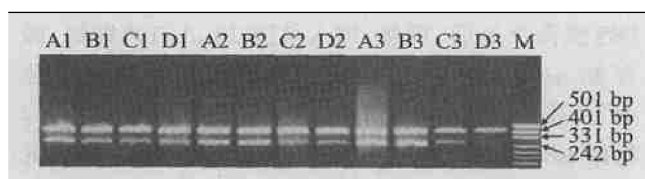


Fig 2 Influence of LAC and β-LAC on the expression of PA28 of T-lymphocytes at different time scale.

M: PUC 19 Msp I marker; A1, B1, C1, D1: group A (control), group B (treated with PHA), group C (treated with PHA and LAC), group D (treated with PHA and β-LAC) after cultured for 1 d; A2, B2, C2, D2: group A (control), group B (treated with PHA), group C (treated with PHA and LAC), group D (treated with PHA and β-LAC) after cultured for 2 d; A3, B3, C3, D3: group A (control), group B (treated with PHA), group C (treated with PHA and LAC), group D (treated with PHA and β-LAC) after cultured for 3 d.

图 2 不同时点 LAC 及 β-LAC 对 T 淋巴细胞 PA28 表达的影响

## 讨 论

蛋白酶体降解大约 70% - 90% 的细胞蛋白, 但是这种降解具有精密的控制机制, 它可降解许多与细胞增殖和细胞激活有关的调节因子, 一些与细胞增殖有关的重要的调节因子, 如细胞周期素 2、细胞周期素 3、细胞周期素 B、p53、p27<sup>Kip1</sup> 等的降解都与蛋白酶体有关, 一些与细胞激活有关的调节因子也由蛋白酶体调控, 过去的研究提示蛋白酶体在抗原肽提呈过程中起着重要作用, 用蛋白酶体特异性抑制剂可阻断活细胞的抗原提呈<sup>[4]</sup>。1995 年 Fenteany 等<sup>[5]</sup>发现 lactacystin(LAC) 是具有蛋白酶体特异性的蛋白酶抑制剂, 能够抑制蛋白酶体的糜蛋白酶、胰蛋白酶等多种肽酶的活性。因此, 本研究在体外观察了蛋白酶体抑制剂 LAC 及 LAC 的内酯化活性形式 β-LAC 对 T 淋巴细胞增殖的影响, CD69 及 CD25 是 T 淋巴细胞活化的两个重要表面标志, CD69 是 T 淋

巴细胞激活后最早表达的抗原,当其表达以后可作为辅助刺激分子使细胞进一步活化和增殖<sup>[6]</sup>; CD25 即 IL-2R(白细胞介素 2 受体),对 T 淋巴细胞的分化成熟有重要促进作用,为 T 淋巴细胞中期活化抗原<sup>[7]</sup>。流式结果显示 LAC 及  $\beta$ -LAC 可显著下调 CD25 的表达,而对 CD69 的改变无明显影响,由此可见,LAC 及  $\beta$ -LAC 抑制 T 淋巴细胞增殖效应并非发生在 T 淋巴细胞激活的早期。

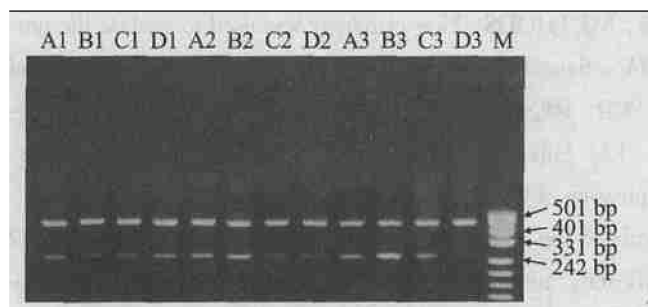


Fig 3 Influence of LAC and  $\beta$ -LAC on the expression of IL-2 of T-lymphocytes at different time scale.

M: PUC 19 Msp I marker; A1, B1, C1, D1: group A (control), group B (treated with PHA), group C (treated with PHA and LAC), group D (treated with PHA and  $\beta$ -LAC) after cultured for 1 d; A2, B2, C2, D2: group A (control), group B (treated with PHA), group C (treated with PHA and LAC), group D (treated with PHA and  $\beta$ -LAC) after cultured for 2 d; A3, B3, C3, D3: group A (control), group B (treated with PHA), group C (treated with PHA and LAC), group D (treated with PHA and  $\beta$ -LAC) after cultured for 3 d.

图 3 不同时点 LAC 及  $\beta$ -LAC 对 T 淋巴细胞 IL-2 表达的影响

PA28 是蛋白酶体重要的活化调节因子,具有增强 20S 蛋白酶体核心肽酶活性的作用<sup>[4,8]</sup>。蛋白酶体的活性有赖于 PA28 的调节,PA28 表达上调时,蛋白酶体活性明显增强,MHC-I 抗原递呈能力亦随之明显增高<sup>[9]</sup>,促进淋巴细胞增殖活化<sup>[10]</sup>,本研究结果证实应用蛋白酶体抑制剂 LAC 及  $\beta$ -LAC 处理可显著下调 PA28 的表达,因此,LAC 或  $\beta$ -LAC 可能通过下调 PA28 表达以达到抑制蛋白酶体的活性。

T 淋巴细胞活化后的增殖过程是通过自分泌生长模式完成的<sup>[11]</sup>,T 淋巴细胞激活时白细胞介素-2 (IL-2) 基因大量转录,并与 CD25 (IL-2 受体) 结合使得 T 淋巴细胞不断增殖。而 IL-2 基因的表达是受核转录因子调控。近年来研究发现蛋白酶体对降解只有短期生物作用的调控蛋白具有重要意义,如核转录因子 NF- $\kappa$ B 的前体通过蛋白酶体降解而具有活性,NF- $\kappa$ B 的抑制因子 I $\kappa$ B $\alpha$ 、c-Jun 蛋白的降解失活也是通过蛋白酶体途径,因此蛋白酶体抑制

剂 LAC 及  $\beta$ -LAC 下调 IL-2 表达至少部分与淋巴细胞 NF- $\kappa$ B 的蛋白酶体降解失活途径有关,因此我们认为蛋白酶体抑制剂正是通过抑制 IL-2 及其受体 CD25 的表达使 T 淋巴细胞增殖受抑。

#### [参 考 文 献]

- [1] Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, et al. Hybrid proteasomes. Induction by interferon- $\gamma$  and contribution to ATP-dependent proteolysis [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(19): 14336-14345.
- [2] Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis [J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 1015-1068.
- [3] Lawrence R, Dick, Amy A. Cruikshank, Antonia T. Destree, et al. Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin in cultured cells [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(1): 182-188.
- [4] Rechsteiner M, Realini C, Ustrell V. The proteasome activator 11S REG (PA28) and class I antigen presentation [J]. *Biochem J*, 2000, 346(Pt1): 1-15.
- [5] Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, et al. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin [J]. *Science*, 1995, 268(5211): 726-731.
- [6] Craston R, Koh M, Dermott AM, et al. Temporal dynamics of CD69 expression on lymphoid cells [J]. *J Immunol Methods*, 1997, 209(1): 37-45.
- [7] Russel SM, Keegan AD, Harada N, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor [J]. *Science*, 1993, 262(5141): 1880-1883.
- [8] Ahn K, Erlander M, Letureq D, et al. *In vivo* characterization of the proteasome regulator PA28 [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(30): 18237-18242.
- [9] Stohwasser R, Soza A, Eggers M, et al. PA28 alpha beta double and PA28beta single transfectant mouse B8 cell lines reveal enhanced presentation of a mouse cytomegalovirus (MCMV) pp89 MHC class I epitope [J]. *Mol Immunol*, 2000, 37(1-2): 13-19.
- [10] Wang X, Omura S, Szveda LI, et al. Rapamycin inhibits proteasome activator expression and proteasome activity [J]. *Eur J Immunol*, 1997, 27(11): 2781-2786.
- [11] WE 保罗 编著. 基础免疫学 [M]. 北京: 科学技术出版社, 2003. 460-501.

## Effect of lactacystin and $\beta$ - lactacystin on the activation and proliferation of T- lymphocytes

SONG Peng- hong, XIE Hai- yang, ZHENG Shu- sen, WU Jian

(The First Affiliated Hospital, College of Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To evaluate the effects of lactacystin (LAC) and  $\beta$ - lactacystin ( $\beta$ - LAC), proteasome inhibitor, on the proliferation and activation of T lymphocytes. **METHODS:** Flow cytometry was used to analyse the proliferation and the expression of CD69, CD25 and CD3 in PHA activated T- lymphocytes. Furthermore, the expression of PA28 and IL- 2 mRNA were assayed by competitive RT- PCR. **RESULTS:** (1) LAC and  $\beta$ - LAC significantly decreased the incorporation in PHA activated T- lymphocytes. (2) Although LAC and  $\beta$ - LAC did not affect the expression of CD69 at any time, they significantly inhibited the expression of CD25 (48 h, 72 h,  $P < 0.05$ ). (3) In comparison with control, LAC and  $\beta$ - LAC significantly down- regulated the expression of PA28 and IL- 2 mRNA (48 h, 72 h,  $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** LAC and  $\beta$ - LAC significantly inhibit the proliferation and activation of T lymphocytes. Mechanisms involved are inhibition of CD25 and down- regulation of PA28 and IL- 2 mRNA expression.

**[KEY WORDS]** Proteasome inhibitors; T- lymphocytes; Immunosuppression

---

### 优秀论文征稿评选活动

《中华现代外科学杂志》编辑部将于 2005 年 2 月 1 日至 2005 年 6 月 30 日举行优秀论文征稿评选活动!

在此活动期间,本刊将为获得国家自然科学基金、国家级、省部级基金项目资助的论文以及取得前沿课题突破性进展的论文颁发优秀论文证书,并对相应文章的第一作者给予每千字符 50 元的优秀论文奖励;同时本刊专家编辑委员会和中华首席医学网联合推出优秀论文专栏,凡在此次评选活动中获得优秀论文奖的文章将有机会被中华首席医学网优秀论文专栏收录。希望广大专家、作者、读者能不吝赐教,踊跃来稿!

《中华现代外科学杂志》是由中华临床医药学会主办的专业医学学术期刊。本刊为半月刊,具有 ISSN/CN 标准刊号,现已被中华首席医学网和中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)等收录,您可以在中华首席医学网([www.chouxin.net](http://www.chouxin.net))免费查看本刊各期的全部内容。

本刊近期投稿栏目的主题是:

1. 有实际指导意义的述评、临床研究、经验介绍、临床病理(例)讨论和病例报告,以及反映国内外外科重要进展的文献综述等。
2. 探讨大外科领域(普通外科、骨外科、神经外科、泌尿外科等)某一方面的理论研究、临床基础研究和实验研究工作成果的论文。
3. 中医药、中西医结合防治常见耳鼻咽喉-头颈外科疾病的经验和科研进展。
4. 新技术、新疗法、新器械的创制,书评,学术讨论,学术动态等。

投稿信箱: 北京 100035- 55 信箱

邮编: 100035

咨询电话: 010- 62242528

E- mail: [waikexue@sohu.com](mailto:waikexue@sohu.com)

《中华现代外科学杂志》编辑部

2005 年 1 月 25 日