

# CD28 和 Fas 在辐射所致 T 细胞凋亡中作用的研究

周建华 苏燎原 童建 王春雷 王爱清

(苏州大学核医学院 苏州 215007)

**摘要** 采用双标记直接免疫荧光—流式细胞仪分析技术,测定了不同剂量 $\gamma$ 射线照射后 T 细胞 CD28 分子和 Fas 受体(CD95)表达的变化。用乙醇抽提法—流式细胞仪分析技术和 JAM 检测技术,研究了不同剂量 $\gamma$ 射线照射、CD28 单抗和 IL-18 处理后 T 细胞凋亡的情况。结果显示,正常人淋巴细胞用不同剂量 $\gamma$ 射线照射后,CD3<sup>+</sup>T 细胞中 CD28 的表达随着剂量的增加而下降,T 细胞凋亡的增加并与 Fas 表达上升有关。照射前用 CD28 单抗和 IL-18 处理细胞后,Fas 表达下调,细胞 DNA 断裂明显减少。表明 $\gamma$ 射线可影响 T 细胞 CD28 受体分子的表达及其信号转导,加速 T 细胞凋亡的进程,而 CD28 单抗和 IL-18 对辐射所致 T 细胞凋亡有一定的拮抗作用。

**关键词** CD28, Fas, 电离辐射, 细胞凋亡

**中图分类号** R811.5

启动 T 细胞增殖除了需要由 T 细胞受体(TCR)/CD3 复合物产生的信号外,还需要由 CD28 受体与 B7 结合产生的共刺激信号。相反,凋亡反应由于共刺激信号的缺乏或与死亡受体如 Fas(现又称为 TNFRSF6)的结合而引起<sup>[1-4]</sup>。CD28 是存在于大多数 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞上的一个 T 细胞表面分子,作为 T 细胞共刺激分子的受体,通过与抗原呈递细胞(APC)上的 B7 分子结合,起着信号传递、增强或放大免疫反应的作用<sup>[5-7]</sup>。因此,CD28 表达的调节对 T 细胞功能的发挥有重要作用。

Fas 抗原(CD95)是介导凋亡的一种细胞表面蛋白,是肿瘤坏死因子受体(TNF-R)家族的一个成员。当细胞受理化因素,如电离辐射、紫外线照射、病毒感染等作用后,Fas 表达可明显上升<sup>[8,9]</sup>,当与 Fas 配体或竞争性抗体(Fas 抗体)结合时,可诱导细胞凋亡。Fas-Fas 配体(FasL)系统在免疫系统中起着重要作用,它涉及免疫反应的下调与体内免疫系统平衡的保持。

细胞表面受体表达可调节细胞信号通道,从而影响免疫反应。文献<sup>[10]</sup>报道,电离辐射可使 T 细胞 CD3 分子表达下降,使 TCR/CD3 信号的转导受阻。但对共刺激分子 CD28 和 Fas 表达的影响国内尚未见报道。本研究旨在了解电离辐射对 T 细胞共刺激信号的影响,探讨电离辐射致 T 细胞凋亡的机制和 CD28 与 Fas 介导的凋亡之间的关系,以便进一步研究如何减少放疗的副作用和制定放疗保护措施。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

RPMI1640 培养基,美国 GIBCO 产品;人 AB 血清,本实验室自制,即采自健康 AB 型血型献血人员的外周血,4℃放置一周后离心(1500r/min),取上层血清,-20℃存储备用;CD28 单

原苏州医学院博士研究生基金(9808)资助

第一作者:周建华,女,1955 年出生,1982 年毕业于南京医学院,副教授,放射医学博士

收稿日期:初稿 2000-09-12, 修回 2001-02-19

克隆抗体(McAb)、FITC-PE 双标记 McAb 均由美国 Exalphas 公司提供;PE 标记的 Fas (CD95)McAb 为法国 immunitical 公司产品;CD3McAb 购自 DAKO 公司;IL-18、IL-2 均由苏州大学基因工程研究室赠送; $^3\text{H}$ -TdR 由上海原子核研究所提供;植物血凝素(PHA)由上海生物制品所提供。主要仪器设备有 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 放射源、EPIC-XL 型流式细胞仪(Coulter, USA)和液体闪烁仪(Pharmacia, Sweden)。

## 1.2 细胞制备和培养

健康献血人员外周静脉血,肝素抗凝,常规方法分离单个核细胞(PBMC),单克隆抗体纯化制备 T 细胞。即用 RPMI1640 培养液将分离得到的 PBMC 加入预先用 CD3McAb 包被的平皿内,置 $4^\circ\text{C}$ 、95min,吸出上清液,用无菌橡皮球将平皿底层刮下,即为基本纯化的 CD3<sup>+</sup>T 细胞,纯度在 95%以上。用含 10%AB 血清和青、链霉素的 RPMI1640 调整细胞浓度为 $10^6/\text{mL}$ ,置 $37^\circ\text{C}$  5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。在进行 DNA 断裂程度检测时,培养液中加淋巴细胞激活剂 PHA( $50\mu\text{g}/\text{mL}$ )或 PHA 和 T 细胞生长依赖的细胞因子 IL-2( $30\text{u}/\text{mL}$ )。并根据实验需要,在照射前加 CD28McAb( $10\text{ng}/\text{mL}$ )或 IL-18( $30\text{u}/\text{mL}$ )。

## 1.3 照射条件和方法

纯化的 T 细胞在不同培养时间给予不同剂量  $\gamma$  射线照射,源活度为 2.22PBq,照射剂量分别为 0.5、2.0、4.0、8.0Gy,剂量率为 1.0Gy/min。照射后分别培养不同时间收集细胞进行检测。

## 1.4 T 细胞 CD28 分子表达的检测

采用双色标记单克隆抗体直接免疫荧光——流式细胞仪分析技术<sup>[2]</sup>。经不同剂量照射的 T 细胞,在培养 48h 后,加入 $10\mu\text{L}$  FITCCD3-PECD28 标记的 McAb,混匀,室温避光反应 30min,用 PBS 洗 2 次。每一组样品均设非特异对照组。流式细胞仪检测分析,记录 CD28 阳性细胞百分率,减去非特异对照值。

## 1.5 乙醇抽提法测定 DNA 凋亡峰

培养到点的细胞先用乙醇固定,再用碘化丙啶(PI)染色,在流式细胞仪上分析 DNA 凋亡峰。

## 1.6 JAM 法<sup>[11]</sup>检测 DNA 断裂

纯化的 T 细胞经不同剂量照射后,培养 4d,在终止培养前 6h 加入 $^3\text{H}$ -TdR 标记,然后收集细胞于玻璃纤维滤纸上,液闪仪测定,计算 DNA 断裂程度。

## 1.7 Fas 受体表达的检测

用直接免疫荧光——流式细胞仪分析技术,即培养到点的细胞加 PE 标记的 CD95McAb,同时设非特异对照组,室温避光反应 30min, PBS 洗 2 次,流式细胞仪检测分析,记录 CD95 阳性细胞百分率,减去非特异对照值。

# 2 实验结果

## 2.1 $\gamma$ 射线对 T 细胞 CD28 表达的影响

图 1 为经不同剂量  $\gamma$  射线照射后, T 细胞 CD28 阳性细胞百分率的变化。从图 1 可见,随照射剂量的增加,CD28 阳性细胞百分率下降,表明  $\gamma$  射线对 T 细胞 CD28 分子表达有影响,2、4、8Gy 组与未照射组比较,差别有非常显著性意义( $p < 0.001$ )。

### 2.2 不同剂量 $\gamma$ 射线对 T 细胞凋亡和 DNA 断裂的影响

采用流式细胞仪检测发现,人外周血 T 细胞培养 1d 后,T 细胞凋亡峰为 1.5%,经 4Gy  $\gamma$  射线照射 6h 后,DNA 凋亡峰增加到 17.7%。图 2 为不同剂量  $\gamma$  射线照射后 T 细胞 DNA 断裂程度的变化。从图 2 可见,经 4d 培养再经 4Gy 和 8Gy 照射 24h 后 T 细胞 DNA 断裂程度明显增加,与未照射组比较,有非常显著性差异( $p < 0.01$ )。

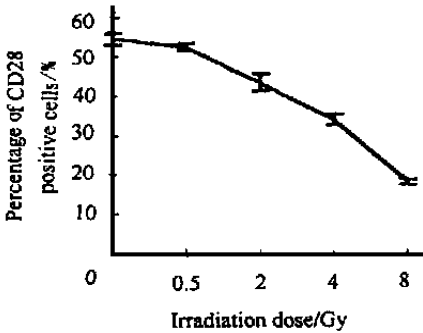


Fig. 1 The percentage of CD28 expression in T cells after  $\gamma$  rays irradiation. Data are from a triplicate experiment and given as mean  $\pm$ SD ( $n = 3$ )

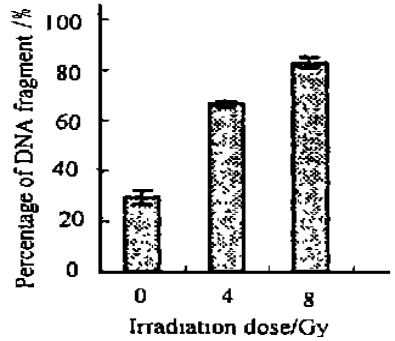


Fig. 2 The percentage of T cell DNA fragment after  $\gamma$  rays irradiation. Data are from a triplicate experiment and given as mean  $\pm$ SD ( $n = 6$ )

### 2.3 $\gamma$ 射线对 T 细胞 Fas 受体表达的影响

经 4d 培养再经 4Gy 照射 24h 后测定,T 细胞 Fas 受体的表达率为 13.57%,比未照射组 (2.03%)明显增加。

### 2.4 CD28McAb、IL-18 对辐射所致 T 细胞凋亡及 Fas 表达的影响

2.4.1 CD28McAb 或 IL-18 处理前后 T 细胞 DNA 断裂程度的变化 表 1 为用 CD28McAb 和 IL-18 处理后, T 细胞断裂程度的变化。由表 1 可见,用 CD28McAb 或 IL-18 预处理后再给予照射,可减少 T 细胞断裂程度,与 4Gy 组比较,差别有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。含有 IL-2 组,T 细胞 DNA 断裂程度均低于仅含有 PHA 组,表明 IL-2 与 CD28McAb 或 IL-18 在减少 T 细胞 DNA 断裂方面有协同作用。图 3 为含有 PHA 培养组,用 CD28McAb 或 IL-18 预处理,再用 8Gy  $\gamma$  射线照射后 T 细胞 DNA 断裂百分率的变化,由图 3 可见,CD28McAb 和 IL-18 对辐射所致 T 细胞 DNA 断裂有拮抗作用。

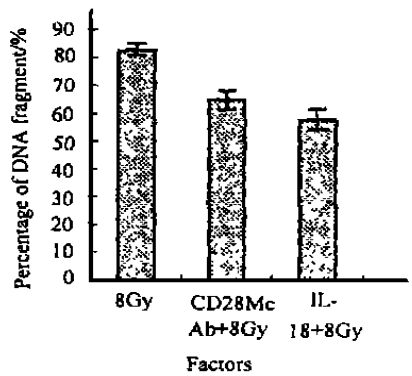


Fig. 3 The change of T cell DNA fragment irradiation after dealing with CD28McAb or IL-18 ( $n = 6$ )

Tab. 1 The percentage of irradiated T cell DNA fragment after dealing with CD28 or IL-18 ( $p \pm S_p$ )

Groups	0Gy	4Gy	CD28McAb+4Gy	IL-18+4Gy
PHA	29.15 $\pm$ 2.74	66.51 $\pm$ 1.28	47.51 $\pm$ 3.28 <sup>(1)</sup>	45.96 $\pm$ 1.49 <sup>(1)</sup>
PHA+IL-2	9.80 $\pm$ 1.75 <sup>(2)</sup>	16.29 $\pm$ 2.52 <sup>(2)</sup>	23.4 $\pm$ 3.73 <sup>(2)</sup>	17.81 $\pm$ 2.49 <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Compared with 4Gy,  $p < 0.05$ , <sup>(2)</sup>Compared with PHA,  $p < 0.01$

2.4.2 CD28McAb 或 IL-18 预处理后再照射, T 细胞 Fas 表达的变化 在照射前加入 CD28McAb 或 IL-18, 经 4Gy 照射后, Fas 的表达有所下降, 加 CD28McAb 组 CD95 阳性细胞百分率为 7.53%, 加 IL-18 组为 8.23%, 分别比 4Gy 组下降了 6.04% 和 5.34%。

2.4.3 CD28McAb 或 IL-18 预处理后, T 细胞凋亡峰的变化 照射前用 CD28McAb 或 IL-18 预处理后再经 4Gy 照射, T 细胞凋亡峰比 4Gy 组分别下降了 5.3% 和 5.1%, 与对 Fas 表达的影响基本一致。表明 CD28McAb 和 IL-18 对减少 T 细胞凋亡有一定作用。

### 3 讨论

CD28 是一个有效的共刺激分子, CD28 与它的天然配体(B7.1)结合可协同增强 TCR 介导的信号传递, 启动和维持 T 细胞反应<sup>[3,11]</sup>。任何因素使 CD28 受体的表达受到影响, 就会引起 T 细胞无反应或凋亡, 甚至死亡。文献[1,4]发现, 电离辐射、竞争性 Fas 抗体、病毒感染等均可影响 T 细胞受体的表达, 促进 T 细胞凋亡, 而加入 CD28McAb 等可阻止活化的细胞凋亡。本研究结果显示, 不同剂量的  $\gamma$  射线可影响 CD28 受体的表达, 促进 T 细胞凋亡。同时, 还可使 Fas 受体表达、T 细胞 DNA 断裂程度增加。国外曾报道<sup>[4,9]</sup>, CD28 对 T 细胞凋亡有影响, 但 CD28McAb 和 IL-18 对辐射所致 T 细胞凋亡的作用未曾见报道。

T 细胞凋亡代表了一个重要的免疫性调节机制, 而其中的表面蛋白 Fas 受体及其配体系统起着重要作用。已发现, T 细胞的激活可引起 Fas 和 Fas 配体表达的上调, 因而使 T 细胞易于凋亡。但是, 细胞受抗原刺激后, 绝大多数反应是增殖, 为防止绝大多数活化的 T 细胞发生 Fas 介导的凋亡, 其中一个保护性的机制就是加入 CD28McAb 后, 使 T 细胞 Fas 受体表达下降, 细胞凋亡减少。由此认为, 经 CD28 介导的存活信号和经 Fas 介导的凋亡信号之间的平衡可能是决定抗原反应时 T 细胞命运的关键。Belka 等<sup>[9]</sup>的研究发现, 电离辐射诱导“死亡受体”CD95L 的合成, 上调 CD95 的表达, 促使 CD95L 与 CD95 受体的结合, 触发凋亡的信号通道, 包括 FLICE/caspase 的蛋白水解活化。用中和抗体可减少辐射诱导的凋亡。本研究进行的实验发现, 加入 CD28McAb 可减少辐射所致的 T 细胞凋亡, 而且这种凋亡的减少与 Fas 受体表达的减少、T 细胞 DNA 断裂程度的降低相一致。

细胞因子是由机体免疫细胞与免疫相关细胞分泌的一群小分子蛋白, 可作为细胞间信号, 调节局部或全身的免疫应答, 从而增强机体非特异性与特异性免疫功能。IL-18 是近年发现的、与 IL-12 具有相似生物学活性的新型多功能细胞因子<sup>[12]</sup>, 可诱导 IFN  $\gamma$  的产生, 增强 NK 活性。但 IL-18 诱导的 T 细胞增殖是依赖性的, 它是 TH<sub>1</sub> 的共刺激分子。本研究结果表明, 采用一些拮抗因子或细胞因子可保证 T 细胞信号传递通路的通畅, 减少 T 细胞 DNA 断裂和凋亡可能成为抗辐射、抗肿瘤的有效措施, 对此尚待进一步研究。

在接触抗原时, T 细胞 CD28 表达水平的保持对防止 Fas 介导的凋亡起关键作用。Walker 等<sup>[4]</sup>对活化的外周血 T 细胞的研究发现, 正常 T 细胞中低 CD28 表达使细胞易于发生 Fas 介导的凋亡, 而 CD28 结合可保护其免于凋亡。CD28 的高表达与 Fas 介导的凋亡产生抗性有关, Fas 结合后产生的凋亡反应是受 CD28 配体的有效性调控。因而认为, CD28 表达水平的调节对于 T 细胞反应的调节很重要。本研究结果也发现, 射引起 T 细胞 CD28 低表达与 Fas 受体的高表达及 DNA 断裂程度增加是一致的。这就提示我们在对肿瘤病人进行放射治疗时, 不仅要考虑使用多大剂量可迅速彻底使肿瘤细胞凋亡而死亡, 也要考虑辐射的遗传毒性, 并采取适当的措施保护正常的免疫细胞不受或少受辐射所致凋亡的影响, 从而保持机体的免疫功能, 协同消灭肿瘤细胞。

在多数实体肿瘤,辐射诱导的细胞死亡并不完全依靠CD95介导的凋亡,而在放射敏感的免疫细胞,保持CD28受体表达在一定水平,中止CD95与CD95L之间的相互作用,可有效地保护这些组织细胞对抗辐射的作用。因此,本研究对减少放疗副作用、发展放疗保护措施具有实际意义。

## 参 考 文 献

- 1 Daniel P T, Kroidl A, Cayenx S *et al.* Immunol, 1997, **159**:3808—3815
- 2 Bluestone J. Immunity, 1995, **2**:555—561
- 3 Guinan E J, Griccen V, Boussiotis G *et al.* Blood, 1994, **84**:3261—3269
- 4 Walker L S K, Maleod J D, Boulougouris G *et al.* J Immunol, 1998, **94**:41—47
- 5 Lu L, Qian S, Hershberger P A *et al.* J Immunol, 1997, **158**:5676—5681
- 6 Linsley P S, Brady W, Grosmaire L *et al.* J Exp, 1991, **173**:721—729
- 7 Boise L H, Minn A J, Noel P J *et al.* Immunity, 1995, **3**:87—96
- 8 Booker J K, Reap E A, Cohen P L. J Immunol, 1998, **161**(9):4536—4541
- 9 Belka C, Marini P, Budach W *et al.* Radiat Res, 1998, **149**:588—595
- 10 周建华,苏燎原,童建. 辐射研究与辐射工艺学报,2000, **18**(2):129—132  
ZHOU J H, SU L Y, TONG J *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2000, **18**(2):129—132
- 11 Matzinger P. J Immunol Meth, 1991, **145**:185—192
- 12 Micallef M J, Yoshida K, Kawai S *et al.* Nature, 1995, **378**(6552):88—91

## STUDY ON EFFECT OF CD28 AND Fas IN CELL APPOPTOSIS OF IONIZING RADIATION INDUCED

ZHOU Jianhua SU Liaoyuan TONG Jian WANG Chunlei WANG Aiqing  
(College Nuclear Medicine Suzhou University, Shzhou 215007)

**ABSTRACT** After irradiation with 0.5, 2, 4 and 8Gy  $\gamma$  rays, CD28 and Fas (CD95) molecule expression in human T lymphocytes were measured by flow cytometry (FCM) with direct immunofluorescence technique. Before and after treatment of T cells with CD28McAb and IL-18, the T cells apoptosis was determined by JAM test and FCM technique. Results showed that with the increasing radiation dosage, the CD28 molecule expression decreased and the CD95 molecule expression increased in CD3<sup>+</sup>T cells, which could affect signal transduction and increase cell apoptosis. However, after using CD28 McAb and IL-18 to treat the cells irradiated, Fas expression and T cell apoptosis decreased.

**KEYWORDS** CD28, Fas, Ionizing radiation, Cell apoptosis  
**CLC** R811.5