

论著·临床研究

地塞米松对儿童原发性系膜增生性肾炎 外周血淋巴细胞 CTLA-4 表达和凋亡的影响

王凤英¹, 卢思广², 罗荣华¹

(1. 泰安市中心医院儿科, 山东 泰安 271000; 2. 徐州医学院附属医院儿科, 江苏 徐州 221002)

[摘要] 目的 原发性系膜增生性肾炎(MsPGN)的发病机制和糖皮质激素(GC)耐药机制虽然部分已明确,但其确切机制仍未阐明。细胞毒性T淋巴细胞相关抗原(CTLA-4)是T细胞活化的重要抑制性分子。本研究探讨MsPGN患儿外周血淋巴细胞CTLA-4表达和淋巴细胞凋亡及地塞米松(Dex)对其影响。方法 分别采用直接免疫荧光、流式细胞仪及Annexin V-FITC/PI双染流式细胞仪检测Dex处理或非Dex处理的MsPGN组和对照组体外培养外周血淋巴细胞膜CTLA-4的表达和其凋亡。结果 体外培养MsPGN组淋巴细胞CTLA-4的自然表达和Dex诱导的表达均较对照组低($P < 0.05$);MsPGN组淋巴细胞自然凋亡和Dex诱导的凋亡亦较对照组低($P < 0.05$),且两者均呈正相关性($P < 0.05$)。结论 CTLA-4表达异常可能参与了MsPGN的发病机制及GC耐药机制。 [中国当代儿科杂志,2009,11(12):957-960]

[关键词] 系膜增生性肾炎;CTLA-4;地塞米松;凋亡;儿童

[中图分类号] R692.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)12-0957-04

Effects of dexamethasone on CTLA-4 expression and apoptosis in lymphocytes obtained from children with mesangial proliferative nephritis

WANG Feng-Ying, LU Si-Guang, LUO Rong-Hua. Department of Pediatrics, Tai'an City Central Hospital, Tai'an, Shandong 271000, China (Email:wfy6699@163.com)

Abstract: Objective The pathogenesis of mesangial proliferative glomerulonephritis (MsPGN) and mechanisms of glucocorticoid (GC) resistance have not been fully identified. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) is an important inhibitor of T-lymphocyte activation. The objective of the study is to investigate the CTLA-4 expression and apoptosis in lymphocytes of children with MsPGN and the effects of dexamethasone (Dex) on the CTLA-4 expression and apoptosis. **Methods** Blood samples were collected from 36 children with MsPGN and 30 healthy children. CTLA-4 expression in *in vitro* cultured lymphocytes with or without Dex treatment was measured by flow cytometry following direct immune fluorescence. The rate of apoptosis in the lymphocytes was evaluated by annexin V-FITC and propidium iodide staining. **Results** The CTLA-4 expression and apoptosis in lymphocytes from children with MsPGN were significantly lower than those in the healthy control children in the absence or presence of Dex treatment ($P < 0.05$). There was a positive correlation between CTLA-4 expression and apoptosis in lymphocytes ($P < 0.05$). **Conclusions** Abnormal CTLA-4 expression may participate in the pathogenesis of MsPGN and be one of mechanisms of GC resistance.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (12):957-960]

Key words: Mesangial proliferative glomerulonephritis; CTLA-4; Dexamethasone; Apoptosis; Child

儿童原发性肾病(INS)存在机体免疫功能紊乱已为共识,而淋巴细胞增殖和凋亡在免疫系统发育和免疫应答中起决定性作用。系膜增生性肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)是我国儿童INS常见的病理类型之一,同其他类型肾小球疾病一样,也是免疫介导性炎症。MsPGN大多表现为糖皮质激素(GC)不敏感或耐药,是难治性

NS中常见的一种病理类型。但MsPGN发病和GC耐药的确切机制尚不明确。细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4, CTLA-4, CD152)是一种共刺激分子,对T细胞的活化起负性调节作用,还可介导自身免疫耐受,诱导T细胞分化,从而维持机体细胞、体液免疫平衡^[1-4]。国内外鲜有CTLA-4在小儿INS的表达及

[收稿日期]2009-04-13; [修回日期]2009-06-15

[作者简介]王凤英,女,硕士,主治医师。主攻方向:小儿肾脏免疫性疾病。

在 GC 诱导淋巴细胞凋亡方面作用的研究。

1 对象与方法

1.1 一般资料

肾病组为2004年3月至2005年2月我院门诊随访和定期住院治疗的INS 36例,平均年龄10.5岁,男23例,女13例,临床均表现为GC耐药的难治性肾病,肾活检证实病理类型为MsPGN。诊断符合全国儿科肾脏病协作组2000年制定的诊断标准^[5]。对照组30例,平均年龄11.6岁,男18例,女12例,均为门诊健康体检的同龄儿童,采血前半年未患感染及免疫性疾病,未用糖皮质激素和免疫抑制剂。

1.2 方法

1.2.1 密度梯度离心法及玻璃板吸附法制备淋巴细胞 无菌条件下于上午8时空腹采取静脉血7 mL,以乙二胺四乙酸二钠盐抗凝,经淋巴细胞分离液分离获得单个核细胞,将分离的单个核细胞置于无菌玻璃平皿内,置37℃ 30~40 min,用毛细吸管轻轻吸取悬液,即为淋巴细胞。用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液及磷酸盐缓冲溶液调备 2×10^6 /mL细胞悬液分别用于细胞培养和刺激,以植物血凝素(PHA)作为刺激活化剂。0.4%台盼兰染色计数,活细胞数大于95%。

1.2.2 细胞培养和刺激 设培养对照组(无Dex)和Dex处理组,各组设24 h和48 h两个观察时间点。各组均加调备好的细胞悬液1 mL,PHA 100 μL;培养对照组另加完全培养液100 μL,Dex处理组另加 10^{-5} mol/L Dex 100 μL。按以上分组加入24孔培养板,使每组PHA终浓度均为10 μg/mL,

Dex终浓度分别为 10^{-6} mol/L,置于37℃、5% CO₂加湿孵箱中培养至预定时间。PHA和Dex均购自Sigma公司。

1.2.3 直接免疫荧光、流式细胞仪检测膜CTLA-4的表达 收集以上分组培养的细胞悬液,采用英国Serotec公司的CTLA-4抗体(鼠抗人CD152-IgG/PE)(MCA1724PE),参照其说明书,应用流式细胞仪检测两组膜CTLA-4的表达。同时以加同型对照抗体的一管作为阴性对照(同型对照抗体为鼠IgG2α/PE,购自晶美生物工程公司,目录号LMK902P-050)。

1.2.4 Annexin V-FITC/PI双染流式细胞仪检测淋巴细胞凋亡 采用北京宝赛生物技术有限公司的Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒,参照说明书检测淋巴细胞的凋亡。

1.3 统计学处理

测得数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 13.0统计软件进行分析,比较采用独立样本t检验,相关分析采用Pearson直线相关分析法, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 外周血淋巴细胞CTLA-4表达

肾病组和对照组体外培养下CTLA-4的自然表达48 h均较24 h增高,但各时间点肾病组的自然表达均低于对照组,差异有显著性;Dex干预下肾病组和对照组各时间点CTLA-4的表达均较自然表达增高,但肾病组的增高程度均低于同一时间点对照组的增高程度,差异有显著性(表1)。

表1 各组外周血淋巴细胞上CTLA-4分子的表达率结果

(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	无Dex干预				Dex干预			
		24 h	48 h	t值	P值	24 h	48 h	t值	P值
对照组	30	3.46 ± 0.71	10.04 ± 2.63	13.23	0.00	5.46 ± 1.12	16.12 ± 3.22	17.13	0.00
肾病组	36	2.51 ± 0.67	6.41 ± 1.73	12.61	0.00	3.48 ± 0.76	8.85 ± 2.95	10.58	0.00
t值		5.58	6.48			8.23	9.41		
P值		0.00	0.00			0.00	0.00		

2.2 外周血淋巴细胞凋亡

肾病组体外培养下淋巴细胞自然凋亡48 h与24 h相比,差异无显著性,而对照组48 h与24 h相比自然凋亡增高,差异有显著性;24 h肾病组与对照组淋巴细胞自然凋亡相比差异无显著性,48 h肾

病组与对照组相比差异有显著性(表2)。

肾病组和对照组体外培养Dex干预下,各时间点淋巴细胞凋亡率均较自然凋亡率增高,组内48 h的凋亡率亦高于24 h的凋亡率,但同一时间点肾病组的凋亡率仍低于对照组的凋亡率(表2)。

表2 两组外周血淋巴细胞凋亡百分比

(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	无 Dex 干预				Dex 干预			
		24 h	48 h	t 值	P 值	24 h	48 h	t 值	P 值
对照组	30	3.61 ± 1.46	4.29 ± 1.64	1.70	0.10	8.72 ± 2.75	13.18 ± 3.86	5.15	0.00
肾病组	36	3.42 ± 0.87	3.47 ± 0.91	0.24	0.81	5.39 ± 1.06	7.83 ± 2.13	6.15	0.00
t 值		0.62	2.44			6.26	6.78		
P 值		0.52	0.02			0.00	0.00		

2.3 CTLA-4 表达和凋亡的相关性分析

肾病组和对照组体外培养下各组同一时间点的 CTLA-4 表面表达率与淋巴细胞凋亡率均存在正相关关系。

3 讨论

GC 是具有抗炎和免疫抑制作用的甾体激素,其作用分基因组效应和非基因组效应。GC 可引起淋巴细胞凋亡,除主要由基因组效应引起外,亦可能与膜受体有关,即可能依赖于这两条途径的信号转导共同作用来完成。有关 GC 与 CTLA-4 等协同刺激分子间的相互作用及影响研究较少。Xia^[6] 等通过分离培养鼠脾单个核细胞,证实 GC 可通过与 GR 相互作用,使活化 T 细胞 CTLA-4 表达量增加 2 倍,其表达第 2 天达峰值,该效应可被 GR 拮抗剂 RU486 阻断。本实验以 Dex 作为糖皮质激素的代表,选择 Dex 的浓度为 10⁻⁶ mol/L,因其与口服足量强地松所达到的血浆浓度相似^[7]。

对 CTLA-4 的表达,本研究结果显示:Dex 可使肾病组和对照组 PHA 刺激活化的淋巴细胞 CTLA-4 的表达增加,与同一时间点不加 Dex 干预组的自然表达相比差异有显著性,与 Xia^[6] 等的研究结论相一致,说明 GC 同样可以诱导人外周血淋巴细胞 CTLA-4 的表达。比较肾病组和对照组可发现肾病组 CTLA-4 的自然表达和 Dex 诱导下的表达均较对照组低,差异有显著性。提示 MsPGN 患者存在 CTLA-4 表达异常,这种异常可能参与 MsPGN 的发病机制及 GC 不敏感或耐药机制。

淋巴细胞凋亡的研究表明:肾病组和对照组相比,体外培养 PHA 刺激 24 h 淋巴细胞的自然凋亡差异无显著性,但 48 h 的凋亡率肾病组低于对照组,差异有显著性;肾病组培养 48 h 和 24 h 凋亡率差异无显著性,但对照组培养 48 h 的凋亡率较 24 h 增高,差异有显著性,提示 MsPGN 患儿存在活化诱导的细胞凋亡(AICD)异常(凋亡缺陷),而正常儿童 AICD 正常。分析 Dex 诱导下的细胞凋亡,发现 Dex 虽然可使两组的凋亡较自然凋亡增高,但肾病

组 24 h 和 48 h 的凋亡增高程度均低于对照组,差异有显著性,提示 Dex 诱导 MsPGN 患儿的淋巴细胞凋亡率明显低于正常儿童,这差异可能是 MsPGN 患儿 GC 治疗不敏感或耐药的原因之一。

CTLA-4 在静息细胞无表达或少表达,淋巴细胞活化后诱导表达,一般活化 24 h 方可检测到,48 h 表达达高峰^[6,8]。CTLA-4 的负性调节作用与其抑制细胞周期蛋白,控制细胞周期发展,抑制 IL-2 基因表达和分泌及介导 T 细胞凋亡等有关^[9~11]。新近有研究证实 CTLA-4 可诱导白血病细胞及实体肿瘤细胞凋亡^[12,13]。CTLA-4 与配体结合可减少 TCR 介导的 NF-κB 的活化,抑制 NF-κB 活性是 CTLA-4 调节的重要事件之一^[14],CTLA-4 缺陷鼠 NF-κB 活化增高^[15]。这与 GC 免疫抑制作用的机制有许多共同之处,我们推测 GC 的免疫抑制作用部分是通过 CTLA-4 引起的,本实验的结果也证实了这一点:GC 可诱导人外周血淋巴细胞 CTLA-4 的表达增加,并且 CTLA-4 的表达同淋巴细胞凋亡呈正相关,提示 CTLA-4 表达水平的高低在一定程度上反映机体的免疫状态及对 GC 反应的敏感性。但有关 GC 与 CTLA-4 相互作用机制知之甚少,需进一步研究来证实我们的猜测。

[参 考 文 献]

- [1] Kato T, Nariuchi H. Polarization of naive CD4⁺ T cells toward the Th1 subset by CTLA-4 costimulation[J]. J Immunol, 2000, 164(7):3554-3562.
- [2] Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation[J]. J Clin Invest, 2002, 109(3):295-299.
- [3] Parrv RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobavashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(21):9543-9553.
- [4] Henson SM, Macaulav R, Kiani-Alikhan S, Akbar AN. The use of the inhibitory receptors for modulating the immune responses[J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(26):2643-2650.
- [5] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(12):746-749.
- [6] Xia M, Gasser J, Feige U. Dexamethasone enhances CTLA-4 ex-

- pression during T cell activation[J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55(12):1649-1656.
- [7] Koper JW, Stolk RP, Delange P, Huizenga NA, Molijn GJ, Pols HA, et al. Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance[J]. *Hum Genet*, 1997, 99(5):663-668.
- [8] Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement[J]. *Immunity*, 1996, 4(6):535-543.
- [9] Egen JG, Kuhns MS, Allison JP. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy[J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(7):611-618.
- [10] Martin M, Schneider H, Azouz A, Rudd CE. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function[J]. *J Exp Med*, 2001, 194(11):1675-1681.
- [11] Kubsch S, Graulich E, Knop J, Steinbrink K. Suppressor activity of anergic T cells induced by IL-10-treated human dendritic cells: association with IL-2- and CTLA-4-dependent G1 arrest of the cell cycle regulated by p27Kip1[J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(7):1988-1997.
- [12] Contardi E, Palmisano GL, Tazzari PL, Martelli AM, Falà F, Fabbi M, et al. CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction[J]. *Int J Cancer*, 2005, 117(4):538-550.
- [13] Laurent S, Palmisano GL, Martelli AM, Kato T, Tazzari PL, Pierri I, et al. CTLA-4 expressed by chemoresistant, as well as untreated, myeloid leukaemia cells can be targeted with ligands to induce apoptosis[J]. *Br J Haematol*, 2007, 136(4):597-608.
- [14] Harlin H, Hwang KW, Palucki DA, Kim O, Thompson CB, Boothby M, et al. CTLA-4 engagement regulates NF-kappaB activation in vivo[J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(8):2095-2104.
- [15] Bour-Jordan H, Grogan JL, Tang Q, Auqer JA, Lockslev RM, Bluestone JA. CTLA-4 regulates the requirement for cytokine-induced signals in T(H)2 lineage commitment[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(2):182-188.

(本文编辑:王庆红)

· 消息 ·

欢迎订阅 2010 年《中国当代儿科杂志》

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管,中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国科学引文数据库(CSCD)收录期刊,北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威检索机构美国 MEDLINE、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、美国《化学文摘》(CA)和荷兰《医学文摘》(EM)收录期刊。同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,并被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有英文论著、中文论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究)、临床经验、病例讨论、病例报告、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊2009年起已改为月刊,每月15日出版,向国内外公开发行人。中国标准刊号:ISSN 1008-8830, CN 43-1301/R。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价12元,全年144元。邮发代号:国内42-188;国外3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。向本刊投稿一律通过网上稿件远程处理系统,免收审稿费。审稿周期3~6周。欲浏览本刊或投稿,请登录本刊网站。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路87号《中国当代儿科杂志》编辑部 邮编:410008

电话:0731-84327402 传真:0731-84327922 Email:ddek7402@163.com

网址:[http:// www.cjcp.org](http://www.cjcp.org)