

5 Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, et al. Regulatory T cells selectively express Toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 2003, 197: 403-411.

6 沈小雁. Toll 样受体与宿主免疫. 国外医学皮肤病学分册, 2003, 2: 106-109.

7 Homma T, Kato A, Hashimoto N, et al. Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31(4): 463-469.

8 Hemoso MA, Matsuguchi T, Smoak K, et al. Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha cooperatively regulate Toll-like receptor 2 gene expression. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(11): 4743-4756.

9 Eicher SD, McMunn KA, Hammon HM, et al. Toll-like receptors 2 and 4, and acute phase cytokine gene expression in dexamethasone and growth hormone treated dairy calves. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 98(3-4): 115-125.

10 Dabbagh K, Dahl ME, Stepick-Biek P, et al. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells. *J Immunol*, 2002, 168: 4524-4530.

(收稿日期:2005-03-10)

·基础免疫学·

抗人 CD134 单抗对外周血单个核细胞穿孔素 mRNA 表达的影响

李鸣 张源潮

CD134(OX40)是一种相对分子质量 (M_r) 为 $48 \sim 50 \times 10^3$ 的 I 型跨膜单链糖蛋白,属于 TNFR 超家族成员,与该家族成员 CD30、4-1BB、TNFR II 和 DR3 具有部分相似的功能。有报道 CD30 下调细胞毒效应分子穿孔素的表达从而抑制凋亡。最近发现 CD134 可以上调表达 Bcl-2 家族抗凋亡基因来延长 T 细胞存活,但是否具有与 CD30 相似的功能通过下调穿孔素凋亡基因的表达来延长 T 细胞存活国内外未见报道,为探索这一可能机制,我们应用 RT-PCR 技术对抗人 CD134 单抗影响下的外周血单个核细胞穿孔素 mRNA 的表达水平进行了定量分析。

清晨抽取健康成人空腹外周静脉血 100 ml,用 0.2% 乙二胺四乙酸二钾 (EDTA- K_2) 抗凝。Arnold V 法分离鉴定单个核细胞,用 RPMI 1640 培养液 (Gibco) 稀释成 10^6 /L,取细胞悬液置 24 孔板中,每孔各 1 ml,设 3 个组:①未加 PHA 和 CD134 单抗对照组;②PHA 刺激组;③ PHA、CD134 单抗共刺激组。①、②组

设 1 个孔,③组设 3 个孔,在第①组中分别加入 60 μ l 培养液;②组中分别加入 10 μ l 培养液;②、③组中分别加入 50 μ l PHA(终浓度为 50 μ g/ml);③组中分别加入按 1:9、1:1 稀释及不稀释的 10 μ l CD134 单抗(终浓度分别为 1 μ g/ml、5 μ g/ml、10 μ g/ml)在 37 $^\circ$ C、5% CO_2 培养箱中培养。CD134 单抗(美国 BD 公司)在 PHA(美国 Sigma 公司)作用 48 h 后加入。在上述分组设孔的基础上,每个孔再设 4 个孔,以 CD134 单抗加入为零点,分别在作用 6 h、12 h、24 h、48 h 收获细胞用于穿孔素 mRNA 的检测。以上各孔均设 5 个复孔。

在各组淋巴细胞中分别加 1 ml 的 Trizol(上海 Sangon 生物工程公司)分离 RNA,按试剂说明书用 OneStep RT-PCR Kit(QIAGEN)一步完成逆转录和扩增过程。每组均能扩增出 176 bp 穿孔素基因目的条带和 350 bp β -actin 基因内参照条带,电泳后以计算机凝胶图像分析系统 (alphaimage2200)拍照、扫描定量(密度 = 亮度/面积),将穿孔素密度扫描数值分别除以标准对照物 β -actin 的数值,所得的比值 $\times 10^3$ 作为评价 mRNA 表达量的相对指标进行分析。

结果显示:不同浓度的 CD134 单抗作用不同时间后,人外周血单个核细胞穿孔素 mRNA 的表达明显降低,在 24 h

达最低值。与对照组比较,CD134 单抗作用 24 h 后 3 个试验组的抑制率分别为 65.08%、74.23%、74.29%,为每组不同时间点最高值。不同浓度的 CD134 单抗作用相同的时间后,当 CD134 单抗 ≤ 5 μ g/ml 时,随着单抗浓度的增加,人外周血单个核细胞穿孔素 mRNA 表达逐渐降低(1 μ g/ml CD134 单抗组与 5 μ g/ml CD134 单抗组比较, $P < 0.01$),当 CD134 单抗 > 5 μ g/ml 时,人外周血单个核细胞穿孔素 mRNA 表达不再降低(10 μ g/ml CD134 单抗组与 5 μ g/ml CD134 单抗组比较, $P > 0.05$)。同一浓度的 CD134 单抗作用不同时间后,随着时间的延长,对人外周血单个核细胞穿孔素 mRNA 表达越来越少,在 24 h 达最低值后开始恢复。以 5 μ g/ml CD134 单抗组为例,作用 6 h、12 h、24 h、48 h 后穿孔素 mRNA 表达的抑制率分别为 16.16%、28.59%、74.23%、43.85%。

研究表明:不同浓度的 CD134 单抗作用不同时间后对人外周血单个核细胞穿孔素 mRNA 的表达均有不同程度的抑制作用,且在 24 h 该作用达到高峰。证实 CD134 单抗可能通过在转录水平上抑制穿孔素的表达来延长 T 细胞的存活期,通过这种抑制作用来达到治疗某些自身免疫性疾病的可能。

(收稿日期:2005-05-23)

基金项目:山东省科技发展计划项目(项目编号:200328)

作者单位:250021 济南,山东大学山东省立医院风湿免疫科

通讯作者:张源潮, Email: simlas@163.com, 电话:0531-85186544