

• 临床研究 •

老年人外周血淋巴细胞的凋亡及 CD28 和 CD95 的表达

王晓莲 周苏明 周静 程蕴琳

【摘要】 目的 通过对健康老年人与健康成年人外周血淋巴细胞的凋亡率及 CD28 和 CD95 表达水平的比较性研究,观察衰老对淋巴细胞凋亡的影响,以及 CD28 和 CD95 与淋巴细胞凋亡的关系。方法 将实验对象分为 2 组:成年组(25~59 岁)与老年组(60~90 岁)各 20 例,采用免疫荧光标记流式细胞术检测外周血淋巴细胞 CD28 和 CD95 的水平;Annexin-V-FITC/PI 双染色流式细胞术测定地塞米松诱导的淋巴细胞凋亡。结果 老年组:淋巴细胞凋亡率[(14.90±4.12)%]显著高于成年组[(8.12±3.12)%];CD28⁺CD95⁻[(8.80±4.86)%]及 CD28⁺[(36.31±10.38)%]均明显低于成年组[(23.09±3.48)%、(52.29±4.90)%],而 CD28⁻CD95⁺[(53.23±8.28)%]、CD95⁺[(80.25±7.19)%]及 CD28⁻[(63.69±10.38)%]明显高于成年组[(33.58±4.72)%、(63.18±4.12)%、(47.71±4.90)%];CD28⁺CD95⁺在两组间差异无统计学意义。淋巴细胞凋亡率与 CD28(CD28⁺)呈负相关,与 CD95(CD95⁺)呈正相关。结论 老年人淋巴细胞凋亡率上升;CD28⁺表达下降,CD28⁻、CD95⁺表达上升;淋巴细胞的凋亡率与 CD28⁺、CD95⁺有相关性。提示老化导致老年人淋巴细胞凋亡增加,CD28 和 CD95 的变化与淋巴细胞凋亡密切相关。

【关键词】 抗原,CD28;抗原,CD95;细胞凋亡;淋巴细胞;免疫;衰老

Apoptosis of lymphocytes and expression of CD28 and CD95 on peripheral blood lymphocytes in the elderly

WANG Xiaolian, ZHOU Suming, ZHOU Jing, et al

Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

【Abstract】 Objective To observe the dexamethasone-induced apoptosis of lymphocytes in the elderly, and the relationship between lymphocyte apoptosis and the expression of CD28 and CD95. Methods The subjects were divided into two groups; 20 subjects each in healthy adult group with a mean age of (37.2±7.56) years (eight males and twelve females) and healthy elderly group with a mean age of (78.7±9.57) years (twelve males and eight females). The fluorescent flow cytometry was used to analyze the expression of CD28 and CD95 on peripheral blood lymphocytes and the apoptosis rate of lymphocytes induced by dexamethasone. Results The apoptosis rate was significantly higher in the elderly group[(14.90±4.12)%] than in the adult group[(8.12±3.12)%]. CD28⁺CD95⁻ and CD28⁺ cells of the peripheral blood lymphocytes in the elderly group[(8.80±4.86)%, (36.31±10.38)%, respectively] were significantly lower than those in the adult group[(23.09±3.48)%, (52.29±4.90)%, respectively]. CD28⁻CD95⁺, CD95⁺ and CD28⁻ cells in the elderly group[(53.23±8.28)%, (80.25±7.19)%, (63.69±10.38)%, respectively] were significantly higher than those in the adult group [(33.58±4.72)%, (63.18±4.12)%, (47.71±4.90)%, respectively]. There was no statistically significant difference in the CD28⁺CD95⁺ cells between the two groups. The apoptosis rate of lymphocyte was negatively correlated with CD28⁺ and positively correlated with CD95⁺. Conclusion The apoptosis rate and the expression of CD28⁺, CD28⁻ and CD95⁺ change significantly with aging. The apoptosis rate of lymphocyte is correlated with CD28 and CD95, suggesting that apoptosis of

收稿日期:2008-01-11

基金项目:江苏省卫生厅医学科研项目资助(H200606);江苏省自然科学基金项目资助(BK2006250)

作者单位:210029 南京市,南京医科大学第一附属医院老年医学科(王晓莲、程蕴琳),老年医学科 ICU(周苏明、周静)

作者简介:王晓莲,女,1966年3月生,河北省永年县人,医学硕士,副主任医师

通讯作者:周苏明, E-mail: zhousmco@yahoo.com.cn

lymphocyte plays an important role in the immunosenescence.

【Key words】 antigen, CD28; antigen, CD95; apoptosis; lymphocyte; immunization; senescence

衰老是机体随年龄增长而逐渐出现的退行性变化,是机体代谢过程的必然阶段。免疫学说认为,免疫系统功能随机体衰老而不断下降^[1]。而淋巴细胞的功能改变最明显,其细胞表面分子表达的改变对淋巴细胞功能的发挥起重要作用。本文通过观察老年组与成年组淋巴细胞凋亡的变化及淋巴细胞上CD28和CD95表达的变化,了解淋巴细胞凋亡及CD28和CD95与免疫衰老的关系,以及CD28和CD95对淋巴细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象 40名志愿者参加此项研究,分成两组:25~59岁为成年组,共20例,男8例,女12例,平均年龄(37.2±7.6)岁;60~90岁为老年组,共20例,男12例,女8例,平均年龄(78.7±9.6)岁。参与者无肿瘤、感染、糖尿病,无自身免疫性疾病、严重肝肾疾病及严重心脑血管疾病,也未使用任何影响免疫系统功能的药物。2组性别比差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 主要试剂 抗人CD28-FITC(异硫氰酸荧光素),抗人Fas(CD95)-PE(藻红蛋白),鼠抗人单克隆抗体IgG_{2a}-FITC, IgG_{2a}-PE,均由晶美生物工程有限公司生产,Annexin-V-FITC/PI由奥地利Bender公司生产,易得人淋巴细胞分离液由达科为生物技术有限公司生产,RPMI1640培养基由美国Gibco公司生产。

1.3 淋巴细胞的分离 取新鲜肝素钠抗凝血3ml,加入0.375ml易得人淋巴细胞分离液,混匀,800×g室温离心30min,取出白色绒毛状的淋巴细胞层,即外周血单个核细胞,用RPMI1640液洗涤,400×g离心10min,弃上清,用含10%胎牛血清的RPMI1640液重悬细胞,置入培养皿,调细胞密度 $5\times 10^8\sim 1\times 10^9/L$ 。利用单核细胞贴壁特性,取非贴壁细胞悬液少许,经瑞氏染色后油镜下检测形态,证实为淋巴细胞。

1.4 淋巴细胞荧光染色测CD28及CD95 取上述非贴壁细胞悬液100μl与抗人CD28-FITC及抗人Fas(CD95)-PE各10μl混匀,4℃避光孵育30min,PBS洗涤,离心,弃上清,加1ml PBS重悬后,2h内上流式细胞仪分析CD28及CD95。

1.5 淋巴细胞凋亡的诱导 取上述非贴壁细胞悬

液1ml,将其接种于6孔培养皿中,加入地塞米松磷酸钠液1μl,混匀,使其终浓度5mg/L,放入37℃、5%CO₂孵箱中培养2h。

1.6 Annexin V-FITC/PI双染流式细胞术检测细胞凋亡率 收集细胞,取上述细胞悬液200μl,用PBS洗涤,离心,用稀释的缓冲液重悬,调整细胞密度至 $2\times 10^8\sim 5\times 10^8/L$;室温下,取细胞悬液195μl加Annexin-V-FITC 5μl,避光孵育10min;用PBS洗涤,离心,用稀释的缓冲液重悬;待上流式细胞仪分析前10min,加入PI染料10μl,测定淋巴细胞的凋亡率(Annexin-V-FITC₊,PI₊)。

1.7 流式细胞仪分析 所有样品均用Becton Dickinson公司的流式细胞仪FACSCalibur,488nm激发波长,Cell Quest软件进行荧光参数获取及分析,每管至少获取10 000个细胞。

1.8 统计学处理 所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。统计分析采用Stata9.0软件,定量资料的组间比较采用Satterthwaite's检验,指标间的关系用Pearson相关分析。

2 结果

2.1 老年组与成年组淋巴细胞凋亡率的变化 老年组Annexin-V(14.90±4.12)%明显高于成年组(8.12±3.12)%(表1,图1)。

表1 成年组与老年组外周血淋巴细胞Annexin-V的比较($\bar{x}\pm s$, %)

组别	例数	Annexin-V/PI
成年组	20	8.12±3.12
老年组	20	14.90±4.12*

注:与成年组比较,* $P<0.001$

2.2 老年组与成年组淋巴细胞CD28及CD95表达的变化 老年组CD28⁻CD95⁺(53.23±8.28)%,CD28⁻(63.69±10.38)%及CD95⁺(80.25±7.19)%明显高于成年组,而CD28⁺CD95⁻(8.80±4.86)%及CD28⁺(36.31±10.38)%明显低于成年组,CD28⁺CD95⁺在两组间差异无统计学意义($P>0.05$,表2,图2)。

2.3 淋巴细胞凋亡与CD28和CD95的关系 应用Pearson相关分析,Annexin-V与CD95⁺呈正相关($r=0.63$, $P<0.001$),与CD28⁺呈负相关($r=-0.56$, $P<0.01$)。

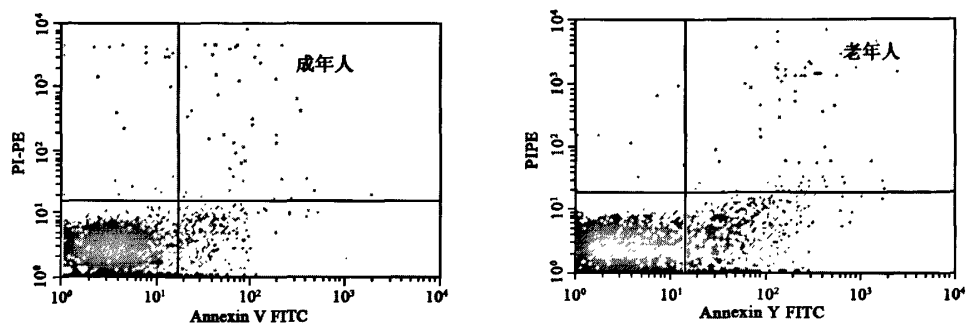


图 1 老年人与成年人外周血淋巴细胞凋亡率的比较(流式细胞术)

表 2 成年组与老年组外周血淋巴细胞上 CD28、CD95 表达的比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	例数	CD28 ⁻ CD95 ⁺	CD28 ⁺ CD95 ⁺	CD28 ⁺ CD95 ⁻	CD95 ⁺	CD28 ⁺	CD28
成年组	20	33.58±4.72	29.45±4.14	23.09±3.48	63.18±4.12	52.29±4.90	47.71±4.90
老年组	20	53.22±8.28*	27.52±8.42	8.80±4.86*	80.25±7.19*	36.31±10.38*	63.69±10.38*

注:与成年组比较,* $P<0.001$

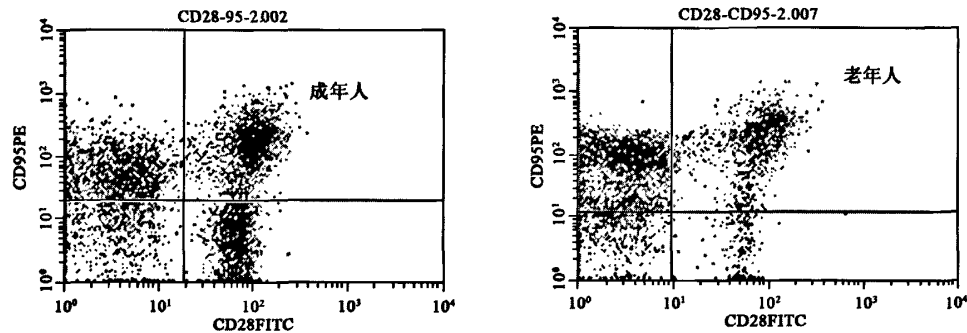


图 2 老年组与成年组淋巴细胞上 CD28 及 CD95 表达

3 讨论

细胞凋亡是机体在生长、发育及维持内部平衡过程中发生的正常细胞生理性死亡,是维持内环境稳定的重要机制^[2]。淋巴细胞凋亡的调节主要由 Fas/FasL 系统及 Bcl-2(B cell lymphoma/leukemia-2)家族等参与。正常人体免疫细胞的新生与凋亡处于平衡状态,使免疫细胞保持一定数量,维持正常免疫功能。衰老是机体代谢过程中的一个必然阶段,主要表现为机体对环境刺激的适应能力减弱以至丧失。机体衰老伴随着免疫系统功能不断下降。白细胞分化抗原 28(CD28)是 T 淋巴细胞主要共刺激分子受体,表达于 T 淋巴细胞上,属于免疫球蛋白超家族成员。它与抗原提呈细胞上 B7 分子结合,为 T 细胞活化提供第二信号,同时刺激包括白介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ -干扰素在内的多种细胞因子产生,在 T 细胞活化中发挥重要作用。同时,CD28 可产生抗凋亡蛋白 bcl-xl、bcl-xr 而抑制凋亡基因,延缓 T 细胞凋亡的启动,保证

免疫反应的起始扩大和持续。CD28⁻ T 细胞具有缩短端粒长度、增殖能力下降^[3]、寡克隆扩增和耐受凋亡^[4]特征。其中后两者最终导致 T 细胞受体多样性下降,T 细胞的抗原识别谱变窄^[5]。CD95(又称 Fas,Apo-1)是细胞表面膜蛋白受体分子,分子量 48ku,表达于大多数 T 细胞和 B 细胞上,属于肿瘤坏死因子受体(TNFRs)家族,是重要的凋亡诱导分子。CD95 与其天然配体(FasL)结合激发靶细胞的凋亡,与免疫应答有关。

本研究将地塞米松作为凋亡诱导剂。实验显示,老年组淋巴细胞凋亡率明显高于成年组。由于衰老机体合成分子能力降低、跨膜信号缺陷、控制细胞增殖的特殊基因表达缺陷,应对氧化应激能力下降,T 淋巴细胞对凋亡敏感性增高,易被激发凋亡,淋巴细胞凋亡增加^[6~11]。淋巴细胞对凋亡刺激易感性增高及过度凋亡造成免疫稳态失衡^[12],引起淋巴细胞数量的减少、增殖能力的下降及免疫效能的减低等。Potestio 等^[13]发现老年个体外周血中 T 细胞的自发凋亡及激活诱导的细胞死亡均增加,导

致低 T 细胞血症,对外来抗原免疫应答下降,对病原体识别能力下降,进而导致免疫功能衰退。由于淋巴细胞凋亡增加,导致老年人较成年人更易发生各种病毒和细菌感染而且感染后病程较长,死亡率高。此外,由于淋巴细胞凋亡增加,致使机体免疫监视与免疫清除功能下降,使突变细胞有机会逃避免疫监视,可能是老年人肿瘤发病率增高的原因。

本研究显示,老年组 $CD28^+CD95^-$ 、 $CD28^+$ 明显低于成年组, $CD28^-CD95^+$ 、 $CD95^+$ 明显高于成年组, $CD28^+CD95^+$ 在两组间无显著差异,提示与成年人相比,老年人淋巴细胞抗凋亡分子的表达下降,而促凋亡分子表达增加。 $CD28^+CD95^-$ 归属于童贞细胞, $CD28^-CD95^+$ 归属于效应记忆细胞, $CD28^+CD95^+$ 归属于中心记忆细胞^[14]。衰老时,在机体的内环境作用和逐渐积累的抗原刺激下,T 细胞亚群克隆扩增和成熟,造成童贞细胞显著下降,效应记忆细胞上升^[15~17],最终导致机体免疫应答随时间向记忆型转变,即对曾经遇见的抗原能够产生应答,而对初次抗原刺激的应答能力下降。老年个体 $CD28^+$ T 细胞表达减低, $CD28^-$ T 细胞增高,T 细胞受体多样性下降,造成 T 细胞的抗原识别谱变窄,对病原体及变异株的清除能力下降,均可造成 T 细胞功能随增龄下降。另研究表明,机体衰老时 $CD95^+$ 表达随增龄而上调,其介导 T 细胞凋亡增加,导致 T 细胞数目减少,引起老年人免疫功能下降^[18,19,21,22]。

本研究结果显示,(1)淋巴细胞凋亡率随 $CD28^+$ 表达下降而增加,呈负相关,其机制可能与 bcl-xl 下降引发线粒体途径凋亡增加有关。有研究表明,老年个体 T 淋巴细胞中 Bcl-2 基因低表达^[20],bcl-xl 下降,此可引起线粒体途径中细胞色素 C 漏出线粒体,从而启动半胱氨酸蛋白酶 3 (cysteine aspartic acid proteases,Caspase-3) 继而引发细胞凋亡^[21]。(2)淋巴细胞凋亡率随 $CD95^+$ 表达增加而增加,呈正相关,可能与死亡受体途径中 Fas 表达增高有关。Potestio^[13] 等研究认为老年人淋巴细胞更易于发生凋亡,其对凋亡易感性增高与 Fas 表达增高有关,凋亡与 Fas 有相关性。衰老的 T 淋巴细胞发生过度凋亡,与 FasL 与 Fas 的 mRNA 及蛋白表达增高、Caspase-8 和 Caspase-3 的基因表达及活性增高有关^[21,23,24]。

本研究提示, $CD28$ 及 $CD95$ 的老年性改变可能导致淋巴细胞凋亡敏感性在老年个体中增强。老年人 $CD28^+$ 低表达,细胞抗凋亡作用减弱,而 $CD95^+$ 高表达,促细胞凋亡作用增强,造成淋巴细胞凋亡增

加,进而淋巴细胞数目减少,同时细胞功能随增龄而降低,引起免疫功能变化。

由于淋巴细胞凋亡受 Fas/FasL 系统、bcl-2 家族及细胞因子等调控,且 Fas/FasL 系统具有使细胞凋亡和存活的双重功能^[25], $CD95$ 表达与淋巴细胞凋亡的关系可能受多因素影响,其促进淋巴细胞凋亡的机制及影响因素尚不十分明了,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Goberson A, Effros RB. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *J Immunol Today*, 2000, 2: 515-521.
- [2] Wajnt H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *J Science*, 2002, 296: 1635-1636.
- [3] Valenzuela HF, Effros RB. Divergent telomerase and CD28 expression patterns in human CD4 and CD8 T cells following repeated encounters with the same antigenic stimulus. *J Clin Immunol*, 2002, 105: 117-125.
- [4] Brzezinska A, Magalska A, Szybinska A, et al. Proliferation and apoptosis of human $CD8^+CD28^+$ and $CD8^+CD28^-$ lymphocytes during aging. *J Exp Gerontol*, 2004, 39: 539-544.
- [5] Messoudi I, Lemaoult J, Guevara-Patino JA, et al. Age-related CD8 T cell clonal expansions constrict CD8 T cell repertoire and have the potential to impair immune defense. *J Exp Med*, 2004, 200: 1347-1358.
- [6] Gupta S. Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in T cell subsets from aged humans. Receptor expression and downstream signaling events. *J Exp Gerontol*, 2002, 37: 293-299.
- [7] Gupta S, Chiplunkar S, Kim C, et al. Effect of age on molecular signaling of TNF- α -induced apoptosis in human lymphocytes. *J Mech Ageing Dev*, 2003, 124: 503-509.
- [8] Gupta S. Molecular and biochemical pathways of apoptosis in lymphocytes from aged humans. *J Vaccine*, 2000, 18: 1596-1601.
- [9] Gupta S. A road to ruins: an insight into immunosenescence. *J Adv Cell Aging Gerontol*, 2003, 13: 169-185.
- [10] Gupta S. Molecular mechanisms of apoptosis in the cells of the immune system in human aging. *J Immunol Rev*, 2005, 205: 114-129.
- [11] Dennett NS, Barcia RN, Mcleod JD. Age-associated decline in CD25 and CD28 expression correlate with an increased susceptibility to CD95 mediated apoptosis in T cells. *J Exp Gerontol*, 2000, 37: 271-283.
- [12] Schindowski K, Leutner G, Muller H, et al. Aged-

- related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes. *Neurobiol aging*, 2000, 21: 661-670.
- [13] Potestio M, Carusoc C, Gervasi F, et al. Apoptosis and ageing. *J Mech Ageing Dev*, 1998, 102: 221-237.
- [14] Fagnoni FF, Vescovini R, Passeri G, et al. Shortage of circulating naive CD8⁺ T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. *J Blood*, 2000, 95: 2860-2868.
- [15] Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance. *J Ann Rev Immunol*, 2004, 22: 745-763.
- [16] Gupta S, Bi R, Su K, et al. Characterization of naive, memory, and effector CD8⁺ T cells: effect of age. *J Exp Gerontol*, 2004, 39: 545-550.
- [17] Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, et al. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8⁺ T cells. *J Exp Med*, 2001, 194: 953-966.
- [18] 何贤辉, 徐丽慧, 刘毅, 等. 人外周血 T 淋巴细胞表型改变与衰老相关性研究. *中国病理生理杂志*, 2003, 19: 1025-1028.
- [19] Sawhney M, Mathew M, Alarmathi MT, et al. Age related changes in Fas and Fas ligand gene expression and cytokine profiles in healthy Indians. *J Asian Pac Allergy Immunol*, 2006, 24: 47-56.
- [20] 杨琳, 郭明秋, 陈立茵, 等. CD137 和 CD28 分子对衰老 T 细胞 bcl-2 表达的调控. *南方医科大学学报*, 2007, 27: 1427-1430.
- [21] Aggarwal S, Gupta S. Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas, Fas ligand, Bcl-2, and Bax. *J Immunol*, 1998, 140: 1627-1637.
- [22] Phelouzat MA, Arbogast A, Laforge T, et al. Excessive apoptosis of mature T lymphocyte is a characteristic feature of human immune senescence. *J Mech Ageing Dev*, 1996, 88: 25-38.
- [23] Aggarwal S, Gupta S. Increased activity of caspase-3 and caspase-8 in anti-Fas-induced apoptosis in lymphocytes from aging humans. *Clin Exp Immunol*, 1999, 117: 285-290.
- [24] Gupta S. Molecular and biochemical pathways of apoptosis in lymphocytes from aged humans. *Vaccine*, 2000, 18: 1596-1601.
- [25] 王曦, 曾耀英, 王子栋. CD95-CD95L 信号介导的细胞凋亡和抗凋亡. *中国病理生理杂志*, 2000, 16: 276-278.

• 致 谢 •

2008 年《中华老年多器官疾病杂志》审稿人名单

2008 年本刊审稿工作得到以下审稿人的大力支持, 在此表示衷心的感谢!

于晓玲	于慧玲	尹 广	毛节明	牛京育	王 文	王东信	王立清	王仲元	王宏宇
王希林	王质刚	王祖禄	王荣福	王振宇	王爱国	王鲁宁	王登科	王蔚虹	王默力
孙宝君	龙超良	卢喜烈	司艺玲	司良毅	田嘉禾	田增民	许兰萍	齐永芬	江 洪
汪寅章	吕树铮	吕 强	李一石	李龙芸	李玉秀	李玉峰	李伯君	李建平	李姗姗
李 保	李俊来	李 莉	李菊香	李 磊	刘长庭	刘延青	刘庆森	刘永雄	刘 芳
刘 进	刘秀琴	刘新民	刘新光	朱天刚	朱立平	朱国英	朱鼎良	邢小燕	沈向东
何权斌	谷涌泉	余振球	宋云龙	宋以信	宋光耀	吴庆华	吴永健	吴 恺	吴建国
吴 彦	邹阳春	孟新科	陈良龙	陈 捷	张力健	张玉宵	张幼怡	张存泰	张 洪
张宪生	张 健	张挽时	张维君	张维忠	张新超	杨云生	杨文英	杨 立	杨 波
杨春花	尚红生	范 利	林洪远	周玉杰	周宁新	周苏明	祝之明	钟玉绪	施仲伟
柳志红	项志敏	洪宝发	勇威本	贺建华	侯晓平	胡 予	胡桃红	胡 森	赵亚力
赵继宗	赵鸣武	姚克纯	姚 晨	浦介麟	袁发煊	唐佩福	卿思明	钱小顺	钱菊英
郭丹杰	郭 伟	郭 勇	郭静莹	郭冀珍	高 伟	高 炜	高连茹	高燕明	曹济民
常 谦	戚文航	戚 豫	黄一飞	黄丛春	黄 伟	黄次波	黄晓军	黄晓强	黄党生
黄 鹤	蒋文平	智 光	韩 芳	程 芮	董宝玮	谢院生	童新元	楼方定	简文豪
鲍云华	窦京涛	詹思延	漆 军	蔡 伟	裴雪涛	颜红兵	樊朝美	薛 桥	魏新川