

· 临床研究 ·

人外周血单核细胞人白细胞抗原-DR 表达和细胞因子水平的增龄性改变

吴 军^{1*}, 刘 泽¹, 王鲁妮¹, 刘 凌¹, 张源源¹, 冯德光¹, 彭 艳¹, 李 薇²(广州军区广州总医院: ¹干部病房五科, ²检验科, 广州 510010)

【摘要】 目的 研究人外周血单核细胞(PBMC)人白细胞抗原 DR 的表达和单核细胞体外分泌细胞因子水平的增龄性改变。方法 352 例不同年龄的体检者按年龄分为 A 组 120 例(20~69 岁)、B 组 85 例(70~79 岁)、C 组 98 例(80~89 岁)、D 组 49 例(90~102 岁)。用流式细胞仪检测 PBMC 表面人白细胞抗原(HLA)-DR 的表达; 每组随机抽取 10 人, 用 ELISA 方法检测经内毒素(LPS)刺激前后 PBMC 分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-10 等细胞因子的水平, 并比较各年龄组 PBMC 表面 HLA-DR 表达的变化以及分泌 TNF- α 、IL-6、IL-10 等细胞因子水平的变化。结果 A、B、C、D 各组之间 PBMC 表面 HLA-DR 的表达有显著性差异($F=159.712, P=0.000$), 且不同年龄组人群 PBMC 表面 HLA-DR 的表达呈随龄性增加($r=0.744, P=0.000$); LPS 刺激前各年龄组人群 PBMC 分泌 TNF- α 、IL-6、IL-10 细胞因子的水平无显著性差异($P>0.05$); LPS 刺激后各年龄组人群 PBMC 分泌 TNF- α 、IL-6、IL-10 细胞因子的水平较 LPS 刺激前均有明显增高($P<0.05$); 将 LPS 刺激后各组 PBMC 分泌细胞因子的水平进一步行组内比较发现, 与 A 组相比, B、C、D 各组分泌 TNF- α 、IL-6 的水平明显减低($P<0.05$), 分泌 IL-10 的水平明显增高($P<0.05$)。结论 人 PBMC 细胞免疫功能呈随龄性改变, 其表面 HLA-DR 的表达呈随龄性增加; LPS 刺激前各年龄组人群 PBMC 分泌 TNF- α 、IL-6、IL-10 细胞因子的水平无显著性差异; 而 LPS 刺激后, 70 岁以上老年人 PBMC 分泌 TNF- α 和 IL-6 的水平明显减低, 分泌 IL-10 的水平明显增高。

【关键词】 人; 外周血单核细胞; HLA 抗原; 细胞因子类**【中图分类号】** R446.6**【文献标识码】** A**【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2011.00007

Age-related changes in expression of human leukocyte antigen-DR and levels of cytokines in peripheral blood mononuclear cells

WU Jun^{1*}, LIU Ze¹, WANG Lu'ni¹, LIU Ling¹, ZhANG Yuanyuan¹, FENG Deguang¹, PENG Yan¹, LI Wei²(¹Fifth Section, Cadre's Ward, ²Clinical Laboratory, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

【Abstract】 Objective To investigate age-related changes in the expression of human *leukocyte antigen-DR* (HLA-DR) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and levels of cytokines secreted by PBMCs. **Methods** A total of 352 individuals who underwent physical examinations in our hospital were stratified into four groups based on age: group A, $n=120$, age 20-69 years; group B, $n=85$, age 70-79 years; group C, $n=98$, age 80-89 years; group D, $n=49$, age 90-102 years. Expression of HLA-DR in PBMCs was detected with flow cytometry. In addition, 10 individuals from each group were randomly selected, and their PBMCs were isolated and subsequently used for determining the levels of TNF- α , IL-6 and IL-10 by ELISA before and after LPS stimulation. HLA-DR expression and cytokine levels were compared between the different age groups. **Results** HLA-DR expression was significantly different between A, B, C, and D groups($F=159.712, P=0.000$), and it increased in an age dependent manner($r=0.744, P=0.000$). No significant difference was found in TNF- α , IL-6 and IL-10 levels in PBMCs before LPS stimulation between group A, B, C and D ($P>0.05$), while, their levels increased significantly after LPS stimulation($P<0.05$). Compared with group A, TNF- α and IL-6 levels decreased, and the IL-10 level increased significantly($P<0.05$) in group B, C and D after LPS stimulation. **Conclusion** Expression of HLA-DR increases in an age-dependent manner in human PBMCs, indicating an age-related change of immunological function. There is no significant difference in the levels of TNF- α , IL-6 and IL-10 secreted by PBMCs before LPS stimulation, while after LPS stimulation, the TNF- α and IL-6 levels decrease and IL-10 level increases significantly in individuals more than 70 years old.

【Key words】 human; peripheral blood mononuclear cell; HLA antigens; cytokines*This work was supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (8151001002000022)*

外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)是由骨髓造血干细胞分化为单核细胞

成熟后进入外周血所得, PBMC 穿过血管内皮细胞间隙进入组织进一步可发育分化为巨噬细胞;

收稿日期: 2010-12-31; 修回日期: 2011-01-30

基金项目: 广东省自然科学基金(8151001002000022)

通讯作者: 吴 军, Tel: 020-36653488, E-mail: gzlnbkwwujun@hotmail.com

PBMC 及其进一步发育分化的巨噬细胞几乎存在于全身所有表皮和黏膜下组织, 具有迁移性, 能以吞噬、吞饮和受体介导的方式将抗原性颗粒或液体摄入胞内, 发挥杀伤作用或对抗原进行加工处理, 与主要组织相容性抗原复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 表达在细胞表面, 诱导获得性免疫, 在防御感染、自身稳定和免疫监视中起着重要作用^[1]。因此研究 PBMC 细胞免疫功能的增龄性变化具有重要意义。

1 对象与方法

1.1 病例选择

参与研究者 352 人: 其中男 238 例, 女 114 例, 按年龄分为 A 组 120 例[20~69 岁, 平均 (47.2±15.0) 岁]、B 组 85 例[70~79 岁, 平均 (76.7±2.3) 岁]、C 组 98 例[80~89 岁, 平均 (84.3±2.7) 岁]、D 组 49 例[90~102 岁, 平均 (93.2±3.2) 岁]。20~69 岁健康体检者来自广州军区广州总医院体检中心, 70 岁以上体检者来自广州军区广州总医院所管辖干休所。排除标准: 肿瘤及免疫缺陷性疾病、近期病毒与细菌感染、脏器功能衰竭、接触化学毒物以及使用对免疫系统有影响的药物, 特别强调需排除近期接受手术、创伤、高强度运动训练等应激性因素。

1.2 PBMC 表面人白细胞抗原-DR 的检测^[2]

PBMC 表面人白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) -DR 的检测由广州军区广州总医院检验科完成, 取所有参与研究者 352 人的晨起静脉全血 3 ml 送该院检验科, 结果用表达 HLA-DR 的 PBMC 百分数来表示; 流式细胞仪 (FACS-Calibur) 及检测所需抗体均为美国 BD 公司产品。

1.3 PBMC 的分离^[3]

在各组人群中随机抽取 10 人, 取晨起静脉全血 10 ml, EDTA 抗凝混匀后, 缓慢铺在 Ficoll 液 (Sigma 公司) 上, 2000 r/min 离心 20 min, 吸出淡黄色层, PBS 洗 3 遍, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液 (Gibco 公司) 置 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养 2 h, 再用 PBS 洗 2 遍去除未贴壁细胞, 台盼蓝拒染实验证实 95% 以上为活细胞; CD14 证实 90% 以上为单核细胞, 调整细胞浓度为 5×10⁸/L, 用于检测其细胞因子的分泌功能。

1.4 PBMC 分泌细胞因子的水平检测

调整好浓度的 PBMC 用内毒素 (Escherichia coli Serotype, LPS; 0111:B4, 购自 Sigma 公司) 1 μg/L 刺激 12 h, 然后离心, 收集上清, 放置 -70℃ 保存, 待测细胞因子。培养上清中的细胞因子肿瘤坏死因子 (tumor

necrosis factor, TNF) -α、白细胞介素 (interleukin, IL) -6、IL-10 均采用 ELISA (晶美公司) 方法测定。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用单向方差分析 (one-way ANOVA), 多重比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; 双变量相关分析选择 Pearson 相关系数; LPS 刺激前后各组 PBMC 分泌细胞因子水平的比较采用配对样本 t 检验。

2 结果

2.1 不同年龄组 PBMC 表面 HLA-DR 的表达及随年龄性变化

经检验不同年龄组 PBMC 表面 HLA-DR 的百分数显示方差齐性 ($P = 0.095$); 不同年龄组 PBMC 表面 HLA-DR 的表达有显著性差异 ($F = 159.712$, $P = 0.000$); 进一步行多重比较 (SNK 法), 提示 A, B, C, D 各比较组之间差异均有统计学意义 ($P = 0.000$)。由双变量相关分析可知, 各年龄组人群 PBMC 表面 HLA-DR 的表达呈随龄性增加 (Pearson 相关系数 $r = 0.744$, $P = 0.000$); 其中 20~69 岁人群 PBMC 表面 HLA-DR 的百分数为 (64±9)%, 而 >90 岁人群 PBMC 表面 HLA-DR 的百分数可高达 (91±7)% (表 1)。

表 1 外周血单核细胞 HLA-DR 表达的检测结果

组别	年龄(岁)	n	HLA-DR(%, $\bar{x} \pm s$)
A	20~69	120	64±9
B	70~79	85	78±9*
C	80~89	98	84±8*
D	90~102	49	91±7*

注: 组间比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 经内毒素刺激前后不同年龄组 PBMC 分泌细胞因子能力的变化

表 2 结果表明, 经检验 A, B, C, D 各组 PBMC 经 LPS 刺激前后所分泌 TNF-α, IL-6, IL-10 的水平均显示方差齐性; LPS 刺激前, A, B, C, D 各组 PBMC 分泌 TNF-α, IL-6, IL-10 的水平无显著性差别 ($P > 0.05$); 经 LPS 刺激后, A, B, C, D 各组 PBMC 分泌 TNF-α, IL-6, IL-10 三种细胞因子的水平均较 LPS 刺激前显著增高 ($P < 0.05$); 将 LPS 刺激后 PBMC 分泌细胞因子的水平进一步行组内多重比较发现, 与 A 组相比, LPS 刺激后 B, C, D 三组 PBMC 分泌 TNF-α 和 IL-6 两种细胞因子的水平明显减低 ($P < 0.05$), 而分泌 IL-10 的水平明显增高 ($P < 0.05$)。

表 2 LPS 刺激后单核细胞分泌细胞因子的检测结果

(n=10, ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α		IL-6		IL-10	
	刺激前	刺激后	刺激前	刺激后	刺激前	刺激后
A	345 $\pm$ 112	891 $\pm$ 199*	2126 $\pm$ 401	2924 $\pm$ 446*	292 $\pm$ 44	389 $\pm$ 57*
B	332 $\pm$ 84	558 $\pm$ 200*#	2155 $\pm$ 424	2244 $\pm$ 497*#	316 $\pm$ 50	453 $\pm$ 41*#
C	342 $\pm$ 87	630 $\pm$ 160*#	1993 $\pm$ 415	2352 $\pm$ 372*#	306 $\pm$ 36	474 $\pm$ 81*#
D	331 $\pm$ 115	571 $\pm$ 179*#	2084 $\pm$ 313	2433 $\pm$ 388*#	313 $\pm$ 45	459 $\pm$ 45*#

注: 与 LPS 刺激前比较, * $P < 0.05$; 与 A 组比较, # $P < 0.05$

3 讨论

PBMC 表面人 HLA-DR 是细胞重要的 MHC-II 抗原, 是参与抗原的加工、处理和提呈的关键分子; 活化的 PBMC 细胞可分泌大量细胞因子, 包括促炎细胞因子 (TNF- α , IL-1, IL-6)、趋化性细胞因子 (IL-8、单核细胞趋化蛋白-1、巨噬细胞炎症蛋白-1 α 和巨噬细胞炎症蛋白-1 β) 以及调节性细胞因子 (IL-10、IL-12、IL-18、巨噬细胞集落刺激因子), 而所分泌的多种细胞因子对机体的先天性免疫和获得性免疫又具有调节作用^[4]。本文通过流式细胞仪检测不同年龄段人群 PBMC 表面 HLA-DR 的表达, 发现不同年龄组 PBMC 表面 HLA-DR 的表达有显著性差异, 且呈随龄性增加; 其中 20~69 岁人群表达 HLA-DR 分子的单核细胞占 CD14⁺单核细胞总数的 (64 $\pm$ 9)%, 而 >90 岁人群表达 HLA-DR 分子的单核细胞占 CD14⁺单核细胞总数的 (91 $\pm$ 7)%, 提示 CD14⁺单核细胞表面 HLA-DR 的表达与长寿高度呈正相关。有研究显示, 人类 HLA 基因不但调控寿命, 还影响免疫功能衰退的速率^[5]。

正常炎症反应可以防止组织损伤扩大、促进组织修复, 它属于集体完整防御系统的一部分, 是机体修复和生存所必需的。本研究发现, 与 20~69 岁个体相比, >70 岁老年人 PBMC 在体外受到 LPS 刺激后分泌炎症介质 (TNF- α , IL-6) 的水平明显减低, 说明老年个体在遭遇感染性因素时, 机体的防御系统相对年轻个体而言是薄弱的。但在严重创伤和感染时, 机体产生的多种炎症介质 (TNF- α , IL-6) 所形成的瀑布效应, 可使炎症反应扩大甚至失控, 当机体内炎性细胞被过度激活而造成抗炎因子与促炎因子的平衡失调, 即可能出现以全身炎症反应及器官损害为特征的病理性改变^[6]。机体炎症反应失控所致脓毒症不仅与促炎介质过度表达、分泌有关, 也与机体内源性抑制物产生不足有关, 如细胞因子自身的内源性抑制剂 (IL-10) 能明显抑制单核细胞的致炎效应, 抑制 TNF- α 和 IL-6 等介质的合成, 从而形成一个自身产物的负反馈循环。有研究发现老年人分离的 PBMC 体外用 LPS 刺激后所产生 TNF- α 的拮抗物高于年轻人, 证明老年人确实存在着 PBMC 细胞功能调节的失调^[7,8]。本研究发现, 与 20~69 岁个体相比, >70 岁老年人 PBMC 在体外受到 LPS 刺激后分泌炎症

细胞因子 (IL-10) 明显升高, 提示老年人对败血症有较高抗性, 至少与 IL-10 这种保护性的细胞因子水平增高有一定的关系。另外, 老年人血清中炎症因子的变化具有临床意义, 有研究发现 IL-6 水平随龄性增高与一些老年性疾病有关, 如多发性骨髓瘤、良性单克隆丙种球蛋白病、阿尔茨海默病、骨质疏松及抑郁症等^[9-11]。但本研究发现在健康体检者中, >70 岁人群与 20~69 岁人群的单核细胞产生同等水平的 TNF- α , IL-6, IL-10, 也证明机体除 PBMC 之外的其他细胞亦可合成和分泌上述细胞因子。

【参考文献】

- [1] Paul WE. 基础免疫学[M]. 吴玉章, 译. 北京: 科学出版社, 2003: 585-586.
- [2] 吴 军, 刘 泽, 王鲁妮, 等. 老年脓毒症患者单核细胞人白细胞-DR 抗原变化及胸腺肽 α_1 的治疗意义[J]. 中华老年医学杂志, 2010, 29(10): 845-846.
- [3] 吴 军, 张源源, 冯德光, 等. 老年重症脓毒症患者树突状细胞的功能变化[J]. 中华急诊医学杂志, 2009, 18(11): 1155-1158.
- [4] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 125-149.
- [5] Li AA, Bourgeois J, Potter M, et al. Isolation of human foetal myoblasts and its application for microencapsulation[J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(1): 271-280.
- [6] 姚咏明, 盛志勇. 脓毒症防治学[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2008: 612-613.
- [7] Sikora E, Scapagnini G, Barbagallo M. Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases[J]. Immun Ageing, 2010, 7(1): 1.
- [8] Gerli R, Monti D, Bistoni O, et al. Chemokines, sTNF-Rs and sCD30 serum levels in healthy aged people and centenarians[J]. Mech Ageing Dev. 2000, 121(1-3): 37-46.
- [9] Kale S, Yende S, Kong L, et al. The effects of age on inflammatory and coagulation-fibrinolysis response in patients hospitalized for pneumonia[J]. PLoS One, 2010, 5(11): e13852.
- [10] Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, et al. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders[J]. Mol Cell Biochem. 2010, 345(1-2): 91-104.
- [11] Mocchegiani E, Basso A, Giacconi R, et al. Diet (zinc)-gene interaction related to inflammatory/immune response in ageing: possible link with frailty syndrome[J]? Biogerontology. 2010, 11(5): 589-595.

(编辑: 周宇红)