

褪黑素与免疫调节细胞的关系

周爱民, 范桂香, 王军阳, 任会勋, 孟兆俊, 袁育康

(西安交通大学医学院免疫学教研室, 西安 710061)

摘要:目的 探讨褪黑素与免疫调节细胞之间的关系。方法 采用流式细胞计数测定外周血T淋巴细胞亚群 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞的百分含量、比值。结果 褪黑素可提高外周血中 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞的百分含量, 调整 $CD4^+/CD8^+$ 比值。结论 褪黑素可通过调整免疫调节细胞 T_H/T_S 的比例发挥免疫调节作用。

关键词:褪黑素; $CD4^+$ T细胞; $CD8^+$ T细胞; 免疫调节细胞(T_H , T_S)

中图分类号: R392-6 文献标识码: A 文章编号: 0258-0659(2002)01-0008-02

Relationship between Melatonin and immunoregulatory cells // Zhou Aimin, Fan Guixiang, Wang Junyang, et al // department of Immunology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

ABSTRACT: **Objective** To investigate the relationship between melatonin and immunoregulatory cells. **Methods** We tested the percentage of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes and $CD4^+/CD8^+$ by flow cytometer. **Results** Melatonin could increase the percentage of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in the normal and the aged mouse, but did not change $CD4^+/CD8^+$. The difference was significant. In the group injected with cyclophosphamide, melatonin also could promote the percentage of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, consequently changing $CD4^+/CD8^+$. **Conclusion** One of the regulatory mechanisms of melatonin is that melatonin can be functional in organism by mediating T_H/T_S .

KEY WORDS: melatonin; $CD4^+$ T lymphocytes; $CD8^+$ T lymphocytes; immunoregulatory cells (T_H , T_S)

褪黑素(Melatonin, MLT)是一种吲哚类激素, 它的合成与分泌具有昼夜节律性, 其含量变化与环境中光照信号的周期性改变同步, 且有季节性变化规律。近年来研究发现, 褪黑素可增加免疫器官的重量, 提高外周血中淋巴细胞百分数, 促进抗体形成及T、B淋巴细胞增殖反应, 刺激细胞因子产生, 参与神经内分泌免疫网络的调控, 且褪黑素在介导免疫功能昼夜节律方面发挥重要作用^[1-5]。免疫调节细胞 T_H/T_S 在免疫调节中发挥重要作用, 其比值可用 $CD4^+/CD8^+$ 来表示。为探讨褪黑素的免疫调节机制, 本文观察了褪黑素对外周血中 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞的百分含量及比值的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 褪黑素由本校神经生物中心研

制, 用 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 羧甲基纤维素钠配制。PE标记兔抗鼠IgG2a单克隆抗体、PE标记兔抗鼠IgG2a $CD4^+$ 单克隆抗体、PE标记兔抗鼠IgG2a $CD8^+$ 单克隆抗体为法国库尔特公司产品。其余试剂皆为AR级。

1.2 动物 昆明种小鼠、雌性, 生理状况良好。小鼠3周龄, 平均体重20 g。老龄鼠9月龄, 平均体重30 g。随机分组, 放置于7:00AM~7:00PM 12 h明暗交迭的光照, 恒湿(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 恒湿50%及隔音的环境中。

1.3 免疫抑制模型的建立 在实验进行的第25天, 常规消毒腹部皮肤, 无菌腹腔注射环磷酰胺 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 5 d后免疫功能显著降低。

1.4 免疫方案 褪黑素(MLT)组、环磷酰胺(CY)+MLT组、老龄+MLT组用 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的MLT, 每日灌胃1次, 每次0.2 mL。

1.5 方法 采用流式细胞计数法。

1.6 数据处理 测定结果采用均数与标准差

($\bar{x} \pm s$)表示,Student's t 检验进行显著性检验。

2 结 果

褪黑素对外周血中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的百分含量及比值的影响见表 1。

表 1 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的百分含量和比值

组别	CD4 ⁺	<i>P</i> 值	CD8 ⁺	<i>P</i> 值	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常组	44.1 ± 2.52		22.3 ± 1.96		1.98 ± 0.013
MLT 组	53.5 ± 3.26 [*]	<0.001	26.8 ± 2.47 [*]	<0.001	1.99 ± 0.011
CY 组	28.1 ± 3.24 [△]	<0.001	28.6 ± 4.20 [△]	<0.001	0.98 ± 0.007
CY+MLT 组	40.8 ± 4.34 [▲]	<0.001	20.6 ± 5.24 [▲]	<0.001	1.98 ± 0.013
老龄组	31.4 ± 3.42		17.2 ± 3.43		1.83 ± 0.025
老龄+MLT 组	48.1 ± 3.51 [#]	<0.001	25.1 ± 3.62 [#]	<0.001	1.92 ± 0.018

注: *、△与正常组相比, ▲与△组相比, #与老龄组相比。

3 讨 论

本实验采用流式细胞技术,分离 T 淋巴细胞 CD4⁺ 和 CD8⁺ 两类亚群。

CD4⁺ T 细胞亚群,按其功能可分为辅助性 T 细胞(T_H)和迟发型超敏反应 T 细胞(T_{DTH})。前者为调节性 T 细胞,后者为效应性 T 细胞。CD4⁺ T 细胞能促进 B 细胞、T 细胞和其他免疫细胞增殖分化,协调免疫细胞间的相互作用。

CD8⁺ T 细胞亚群,按其功能可分为抑制性 T 细胞(T_S)和杀伤性 T 细胞(T_C)。前者为调节性 T 细胞,后者为效应性 T 细胞。T_C 效应细胞与抗病毒免疫、抗肿瘤免疫、以及对移植物的移植排斥反应有关。T_S 可抑制杀伤性 T 细胞(T_C)、辅助性 T 细胞(T_H)及 B 细胞功能,发挥免疫抑制作用。

在正常情况下, T 细胞在周围组织中的数目是相对恒定的, CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的比例在周围组织中也大致相同,其比值约为 2,如果其比值小于 1.0 或大于 2.0,可视为调节细胞(T_H/T_S)比例异常。因而检测 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的比例可间接地说明褪黑素与免疫调节细胞之间的关系。

从表中可以看出, MLT 组与正常组相比,其 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的百分含量均明显高于正常对照组,而 CD4⁺/CD8⁺ 却在正常值范围内。此结果提示:褪黑素能提高外周血中 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的百分含量,其原因可能为 T 淋巴细胞上含有褪黑素的受体,能够促进 T 淋巴细胞的成熟与分化,这与金伯泉等报道的胸腺上含有褪黑素特异性结合位点相近^[7]。褪黑素能提高细胞免疫功能,而 CD4⁺/CD8⁺ 却在正常值范围内,说明褪黑素是通过 T_H/T_S 细胞而发挥免疫调节作用。

应用免疫抑制剂环磷酰胺,能破坏 DNA 结构,阻断其复制,导致细胞死亡。T、B 细胞在增殖分

化阶段对环磷酰胺敏感,从而使免疫功能得到抑制。从表中可以看出, CY(环磷酰胺)组与正常组相比, CD4⁺/CD8⁺ 却在正常值范围内降低。但应用了褪黑素后, CD4⁺ T 细胞的百分含量有显著地提高,说明褪黑素使受抑制 T 淋巴细胞发生增殖分化。但与正常组相比, CD4⁺ 含量还是相对较低,而 CD8⁺ T 细胞的含量显著地降低, CD4⁺/CD8⁺ 比值明显提高,提示褪黑素通过改变 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的百分含量,提高 T_H/T_S 的比值,从而对免疫抑制发挥免疫增强作用。

老龄鼠的免疫功能是低下的,从表中也可以看出,老龄鼠的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的百分含量较低,但 CD4⁺/CD8⁺ 却在正常值范围内,说明老龄鼠的免疫功能仍处于平衡状态。当给予褪黑素后, CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的百分含量显著地增加, CD4⁺/CD8⁺ 仍在正常值范围内,此结果提示:褪黑素通过增加 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的百分含量,但不改变 T_H/T_S 的比值,而发挥免疫增强作用,维持机体免疫平衡。说明褪黑素是通过作用于 T_H、T_S 细胞而调节免疫功能的。

综上所述:褪黑素对正常小鼠能通过增加 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的百分含量,增加细胞免疫功能,保持 CD4⁺/CD8⁺ 比值正常,维持 T_H/T_S 比例,发挥免疫调节作用。褪黑素对免疫功能低下或缺陷者,则是通过提高 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的百分含量,改变 CD4⁺/CD8⁺ 比值,调整 T_H/T_S 比例,而发挥免疫增强作用。

参考文献:

[1] Pierpaoli W, Maestroni G J M. Melatonin: a principal neuro-immunoragulatory and anti-stress hormone[J]. Immunol Lett, 1987, 16(2): 355-362.

依赖性的反跳性抗纤溶现象。本实验测定了用 r-SK 治疗的心肌梗塞患者 30 例。由于 r-SK 的半衰期为 1.5 h,故本实验测定了在 5 个半衰期后(8 h)血浆内源性纤溶功能改变,以排除溶栓药物对实验结果影响。结果示溶栓后再通组血浆 t-PA 活性增高($P<0.01$),PAI 活性下降($P<0.05$),而未通组 t-PA、PAI 活性与溶栓前比较无明显差别。分析其原因可能为:①血栓溶解后,局部缺血状态改善,内皮细胞功能部分恢复,PAI 释放减少,t-PA 释放增多。②心肌缺血致血小板活化状态亦有所缓解。血小板释放 PAI 减少。③成功的血栓溶解,阻止了心肌细胞的进一步损伤、坏死,PAI 作为炎性介质引起的急性期反应蛋白也随之下降。故我们认为溶栓后血浆 t-PA 活性升高,PAI 活性下降可能提示梗塞的冠脉再通。

大多数学者认为溶栓后血浆 D-Dimer 明显增高^[3~5]。本实验结果与其一致。但升高的 D-Dimer 是否来源于梗塞冠脉的血栓?我们将溶栓治疗的心肌梗塞患者分为再通组和未通组,并比较了两组溶栓前后 D-Dimer 含量的变化,发现两组患者溶栓后 D-Dimer 含量均较溶栓前有明显升高。有作者^[6]发现健康人溶栓后血浆 D-Dimer 含量亦升高,与 AMI 患者溶栓后血浆 D-Dimer 升高程度无明显不同。故我们认为 AMI 患者溶栓后血浆 D-Dimer 上升可能小部分来自冠脉血栓,大部分来自循环血中的可溶性纤维蛋白多聚体,提示溶栓后可能有凝血功能激活,由于再通和未通组血浆 D-Dimer 含量均明显升高,故其变化不能成为溶栓效果的判定指标。

本实验发现,溶栓后血浆 Fg 含量无论在再通组还是未通组均明显下降,而 Brenner 等人^[7]测定了用 rt-PA 治疗后血浆 Fg 含量,发现其与溶栓治疗前无明显变化,考虑因为 rt-PA 激活纤溶酶原的作用依赖于纤维蛋白的存在,rt-PA 只有在纤维蛋白血凝块上才能高效地激活纤溶酶原生成纤溶酶,后者使

纤维蛋白降解。故 rt-PA 激活的纤溶只产生局部溶栓而不致使血浆 Fg 含量下降。本实验用的 r-SK 激活纤溶酶原生成纤溶酶,不仅降解纤维蛋白,也降解血浆 Fg,致血浆 Fg 水平明显下降。

参考文献:

- [1] Felicità A, Carla R, David H, *et al.* Early coronary reperfusion blunts the procoagulant response of plasminogen activator inhibitor-1 and von Willebrand factor in myocardial infarction[J]. JACC, 1990, 16(7):1553-1557.
- [2] Gonser N, Lechleitner P, Mainer J. Rebound increase of plasminogen activator inhibitor type I after cessation of thrombolytic treatment for acute myocardial infarction independent of plasminogen activator used[J]. Clin Chem, 1998, 44(2):209-215.
- [3] Lew A S, Berberian L, Cercek B, *et al.* Elevated serum D-Dimer: a degradation product of cross-linked fibrin (XOP) after intravenous streptokinase during acute myocardial infarction[J]. JACC, 1986, 7(6):1320-1324.
- [4] Fromcis C W, Connaghan D G, Marder V J. Assessment of fibrin degradation products during fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction[J]. Circulation, 1986, 74(5):1027-1036.
- [5] Brenner B, Francis C W, Fitzpatrick P G, *et al.* Relation of plasma D-Dimer concentration to coronary artery reperfusion before and after thrombolytic treatment in patients with acute myocardial infarction[J]. Am J Cardiol, 1989, 63(17):1179-1184.
- [6] Seifried E, Tansweup, Rijken D C, *et al.* Fibrin degradation products are not specific markers for thrombolysis in myocardial infarction[J]. Lancet, 1987, 8(2):333-334.
- [7] Rauber K, Heidinger K S, Kemkes M B. Coagulation alterations due to local fibrinolytic therapy with recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) in patients with peripheral arterial occlusive disease[J]. Cardiorasc-Intervent-Radiol, 1997, 20(3):169-173.

(编辑 邱 芬)

(上接第 9 页)

- [2] Maestroni G J M, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity: Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone[J]. Journal of Neuroimmunology, 1986, 13(1):19-30.
- [3] Maestroni G J M. The immunoneuroendocrine role of melatonin[J]. Pineal Res, 1993, 14(1):1.
- [4] Carioeo M, Frasca D, Nistio C. Melatonin as immuno-

modulator in immunodeficient mice[J]. Immunopharmacol, 1992, 23(2):81.

- [5] Maestroni G L M, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal in immunity: Melatonin enhance the antibody response via an opiaergic mechanism[J]. Clin Exp Immunol, 1987, 68(2):384-391.
- [6] 沈关心, 周汝麟. 现代实验免疫学技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 175-178.

(编辑 胡爱玲)