

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.01.016

CD8⁺CD122⁺T细胞在脑缺血过程中作用的研究*刘婷婷^{1#} 张 玥^{1,2#} 王丹丹¹ 张彤帅¹ 张 瑶¹
王菁华¹ 孙 博¹ 尚小煜¹ 李呼伦¹ 王广友^{1△}

(1 哈尔滨医科大学神经生物学教研室 黑龙江省高校神经生物学重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150081;

2 牡丹江市第二人民医院耳鼻喉科 黑龙江 牡丹江 157005)

摘要 目的:探讨 CD8⁺CD122⁺T细胞在脑缺血过程中的作用及其机制。**方法:**线栓法建立小鼠大脑中动脉栓塞模型(MCAO);激光共聚焦显微镜检测小鼠脑缺血组织中 CD8⁺CD122⁺T细胞浸润情况;流式细胞仪检测脑缺血组织中 CD8⁺CD122⁺T细胞/CD3⁺T细胞的比例及脾和胸腺中 CD8⁺CD122⁺T细胞数量变化;RT-PCR 方法检测 CD8⁺CD122⁺T细胞对氧糖剥夺(Oxygen-glucose deprivation, OGD)条件下星形胶质细胞表达 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 的影响。**结果:**各时间点脑缺血组织中均有 CD8⁺CD122⁺T细胞浸润,且随脑缺血时间延长,缺血侧脑组织中 CD8⁺CD122⁺T细胞/CD3⁺T细胞比例逐渐增加,5 d 和 7 d 组差异显著,与非缺血侧相比, $P_{5d}<0.05$, $P_{7d}<0.05$;MCAO 小鼠脾及胸腺中 CD8⁺CD122⁺T细胞呈现先增高后降低的趋势。星形胶质细胞经 OGD 处理后,与对照组相比,IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 表达显著增高, $P_{IFN-\gamma}<0.01$, $P_{TNF-\alpha}<0.001$, $P_{IL-1\beta}<0.01$;CD122-blocked 组与 CD8⁺组相比,IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 表达明显增高, $P_{IFN-\gamma}<0.05$, $P_{TNF-\alpha}<0.05$, $P_{IL-1\beta}<0.01$;CD8⁺组与 HBSS 组相比,IFN- γ 表达降低, $P<0.05$;IL-1 β 表达有降低的趋势。**结论:**CD8⁺CD122⁺T细胞在脑缺血过程中发挥保护性作用,其保护作用通过 CD122 抑制星形胶质细胞 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 炎症因子表达实现的。

关键词:脑缺血;CD8⁺CD122⁺T细胞;氧糖剥夺;星形胶质细胞**中图分类号:**Q95-3, R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)01-77-05Effect of CD8⁺CD122⁺T Cells on Cerebral Ischemia Injury in Mouse*LIU Ting-ting^{1#}, ZHANG Yue^{1,2#}, WANG Dan-dan¹, ZHANG Tong-shuai¹, ZHANG Yao¹,WANG Jing-hua¹, SUN Bo¹, SHANG Xiao-yu¹, LI Hu-lun¹, WANG Guang-you^{1△}

(1 Department of Neurobiology, Harbin Medical University, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Neurobiology,

Harbin, Heilongjiang, 150081, China; 2 Department of Otorhinolaryngology, Mudanjiang 2nd People's Hospital,

Mudanjiang, Heilongjiang, 157005, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of the CD8⁺CD122⁺T cells on the experimental brain ischemia. **Methods:** The animal model of the brain ischemia was set up via the brain middle-artery occlusion by inserting nylon. Confocal microscopy analysis was applied to detect the CD8⁺CD122⁺T cells in the ischemic brain. Quantitative flow cytometric analysis was used to measure the inflammatory cells in ischemic brain, spleen and thymus. The relative amount of TNF- α , IL-1 β and IFN- γ mRNA in astrocytes after Oxygen-glucose-deprivation treatment was detected by RT-PCR. **Results:** There were CD8⁺CD122⁺T cells infiltrated in the ischemic brain at all the time points compared with the contralateral. There was significant difference at 5 d and 7 d ($P_{5d}<0.05$, $P_{7d}<0.05$). CD8⁺CD122⁺T cells displayed the amount variation in the spleen and thymus by initial increase then decrease. After the treatment of OGD, there was a significant increasing expression of IFN- γ , TNF- α , IL-1 β mRNA in astrocytes compared with that in the control group ($P_{IFN-\gamma}<0.01$, $P_{TNF-\alpha}<0.001$, $P_{IL-1\beta}<0.01$). The inhibition of IFN- γ , TNF- α , IL-1 β mRNA by CD8⁺T cells administration was reversed when CD122 was blocked ($P_{IFN-\gamma}<0.05$, $P_{TNF-\alpha}<0.05$, $P_{IL-1\beta}<0.01$). **Conclusions:** CD8⁺CD122⁺T cells take part in the process of brain ischemia and they display a significant neuroprotective effects by inhibiting the expression of TNF- α , IL-1 β and IFN- γ mRNA in astrocytes.

Key words: Cerebral ischemia; CD8⁺CD122⁺T cell; Oxygen-glucose deprivation; Astrocytes**Chinese Library Classification(CLC):** Q95-3, R743 **Document code:** A**Article ID:**1673-6273(2014)01-77-05

前言

脑血管疾病(Cerebrovascular disease, CVD)是目前致人类死亡的三大主要疾病之一,存活者中多数患者遗留有严重残

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81070943);黑龙江省教育厅面上项目(11541234)

作者简介:刘婷婷(1985-),女,硕士研究生,研究方向:神经免疫学;

张玥(1981-),女,硕士研究生,研究方向:神经生物学;

为共同第一作者

△通讯作者:王广友,男,电话:0451-86662943, E-mail: guangyouwang@163.com

(收稿日期:2013-03-14 接受日期:2013-04-12)

疾,给社会和家庭带来沉重的负担。CVD 中缺血性脑血管疾病约占 80%左右。研究表明,炎症机制在缺血性脑卒中的病理损伤过程中发挥了重要的作用,其中中枢与外周细胞因子网络的活化得到广泛证实^[1]。脑缺血发生之后,关于 T 淋巴细胞、中性粒细胞等炎症细胞参与脑缺血损伤病理过程已做了深入的研究:在脑缺血发生后的 30 min 就有白细胞的浸润,继而是单核细胞和 T 淋巴细胞^[2]。关于 T 细胞参与脑缺血的研究中,调节性 T 细胞的研究已经得到重视。有研究表明 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(CD4⁺CD25⁺Treg)通过抑制 TNF- α 及 IFN- γ 等促炎性因子在脑缺血发生后起到保护性作用^[3,4]。CD8⁺CD122⁺T 细胞是一群新近被确定的调节性 T 细胞亚群^[5],在实验性自身免疫性脑脊髓炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)的研究中该群细胞通过分泌细胞因子 IL-10 延缓 EAE 鼠的发病高峰时间并减轻发病症状。在维持 T 细胞的稳态中抑制 T 细胞 IFN- γ 的分泌及 CD8⁺细胞的增殖^[6,7]。脑缺血发生之后脑内发生了一系列免疫反应,CD8⁺CD122⁺T 细胞是否参与这个过程尚未见报道。本实验通过建立 MCAO 小鼠模型结合体外细胞培养旨在探讨 CD8⁺CD122⁺T 细胞是否参与了脑缺血的病理过程及其在脑缺血过程中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

纯系 C57BL/6 雄性小鼠(20-25 克)与 C57BL/6 孕鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 实验材料

试剂:Rat anti-mouse CD122, TTC 粉末购自 SIGMA 公司, RT-PCR Kit 及 100bp DNA marker 购自 Takara 公司,琼脂糖购自 Promega 公司, MagCollect mouse CD8⁺ T cell isolation kit 购自 R&D, Anti-CD3e APC, Purified NA/LE rat anti-mouse CD122 购自 BD 公司, goat-anti-rat FITC 购自中杉, PE rat-anti-mouse CD8a, FITC-anti-mouse CD122 购自 eBioscience 公司; 引物合成购自上海捷瑞生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 MCAO 模型的建立 健康成年雄性 C57BL/6 小鼠, 2% 戊巴比妥腹腔麻醉, 颈部备皮, 75 % 医用酒精消毒, 颈部正中 1 cm 开口, 钝性分离皮下组织, 暴露右侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉。颈总动脉、颈内动脉结扎活结, 颈外动脉远心端结扎, 近心端结扎活结, 颈外动脉两根结扎线之间用眼科剪刀剪口插入栓线, 松开颈外动脉近心端活结结扎线, 剪断颈外动脉远心端, 松开颈内动脉的活结结扎线将栓线送入颅内, 栓线进入的长度自颈总动脉分叉处约 1 cm, 固定栓线, 松开颈总动脉上的结扎线。用适量生理盐水冲洗创口, 缝合皮肤并消毒, 放回鼠笼, 给予自由食水饲养。

1.3.2 小鼠脑组织中 CD8⁺CD122⁺Treg 细胞的免疫荧光染色

将脑组织冰冻切片取出后室温晾干 30 min; 4 % 多聚甲醛室温固定 15 min, 预冷 0.01 M PBS 洗, 5 min, 2 次; 1 % BSA 室温封闭 30 min; 加入 1 % BSA 配制的 Rat-anti-mouse CD122 一抗, 4 °C 孵育过夜; 甩掉一抗, 预冷 PBS 洗, 15 min, 3 次; 加入 1 % BSA 配制的二抗, 室温孵育 1 h; 甩掉二抗, 预冷 PBS 洗, 15 min, 3 次; 1 % BSA 室温封闭 30 min; 加入 1 % BSA 配制的

Rat-anti-mouse CD8 一抗, 4 °C 孵育过夜; 甩掉一抗, 预冷 PBS 洗, 15 min, 3 次; 加入 1 % BSA 配制的二抗, 室温孵育 1 h; 甩掉二抗, 预冷 PBS 洗, 15 min, 3 次; DAPI 染核, 室温作用 2 min; 去离子水洗, 3 min, 2 次; 甘油封片激光共聚焦检测。

1.3.3 MCAO 模型鼠脑组织浸润淋巴细胞的提取 将 MCAO 小鼠, sham 组小鼠常规生理盐水心脏灌流; 取脑组织去除小脑中脑及延髓, 分为左右半球放入装有 10 mL 预冷 Ca²⁺Mg²⁺-free HBSS 平衡盐溶液中, 用 140 目滤布研磨, 注射器反复抽吸几次, 并用 200 目滤布过滤至离心管中离心, 1500 rpm, 10 min, 4 °C, 弃上清留取沉淀; 将沉淀用 30 % Percoll 溶液重悬, 旋涡振荡器混匀后, 缓慢加入 70 % Percoll 溶液之上, 离心, 900 g, 30 min, 4 °C; 划破最上层组织层, 取不同 Percoll 溶液界面间的细胞, 离心, 1500 rpm, 10 min, 4 °C; 弃上清, HBSS 重悬, 离心, 1500 rpm, 10 min, 4 °C; 1640 培养液重悬, 细胞计数。

1.3.4 流式细胞术 将上述准备好的脑淋巴细胞, 胸腺及脾淋巴细胞转移入 96 孔板内, wash buffer 洗两次, 离心, 2000 rpm, 2 min, 4 °C, 轻轻甩掉上清; 加入 FACS 配制的 PE-cy5.5 anti-mouseCD8; FITC anti-mouseCD122; APC anti-mouseCD3 抗体, 50 μ L/孔, 4 °C 避光孵育 30 min; 每孔加入 100 μ L wash buffer 洗两次, 离心, 2000 rpm, 2 min, 4 °C; 100 μ L wash buffer 重悬混匀, 每孔再加入 100 μ L 的 2 % 多聚甲醛固定, 4 °C, 15 min, 避光; 将样品转移至流式管上机检测并分析。

1.3.5 脾中淋巴细胞与星形胶质细胞共培养 取 2 d MCAO 小鼠脾淋巴细胞, CD8⁺ 磁珠分选后加入 anti-CD122 抗体孵育 6 h, 将淋巴细胞与星形胶质细胞按 10:1 比例进行共培养。正常培养的星形胶质细胞为对照组(Control), 加入 HBSS 星形胶质细胞厌氧组(HBSS), CD8⁺T 细胞与星形胶质细胞共培养厌氧组(CD8⁺T), anti-CD122 封闭抗体作用后与星形胶质细胞共培养组(CD122-blocked), 放入厌氧箱 OGD 处理 5 h, 星形胶质细胞提取 RNA, RT-PCR 检测星形胶质细胞中 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ mRNA 的相对表达量。

1.3.6 RT-PCR 引物序列及反应条件 序列 a. GAPDH: F: AAT GCA TCC TGC ACC ACC AA R: TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA; b. TNF- α : F: CCC TCT CAT CAG TTC TAT GG; R: TTG AAG AGA ACC TGG GAG TA; c. IL-1 β : F: AGC AAC GAC AAA ATA CCT GT; R: CCA CTT TGC TCT TGA CTT CT; d. IFN- γ : F: TGC TGA TGG GAG GAG ATG TCT; R: TGC TGT CTG GCC TGC TGT TA。总 RNA 抽提及 RT-PCR 反应: 采用 TRIZOL 方法抽提总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书要求进行逆转录与 PCR 反应。产物进行 2 % 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统拍照并分析数据。

1.3.7 统计方法 细胞术结果采用 Flowjo 7.6.1 Min 软件进行分析, 并进行 t-test 检验法比较缺血侧与非缺血侧脑组织之间阳性细胞数差异是否有统计学意义。RT-PCR 采用 Gel-Pro analyzer 4 分析, 以上数据都采用 GraphPad 统计软件进行统计学分析。

1.4 CD8⁺CD122⁺T 细胞在缺血脑组织中的浸润

为证实 CD8⁺CD122⁺T 细胞在缺血脑组织中的浸润我们用激光共聚焦扫描脑组织冰冻切片 CD8⁺CD122⁺T 细胞免疫荧光双染, CD8⁺CD122⁺T 细胞为细胞核外呈黄色的细胞, 图中各个

时间点中均有双阳性细胞的浸润,且有逐渐增多的趋势(图1)。

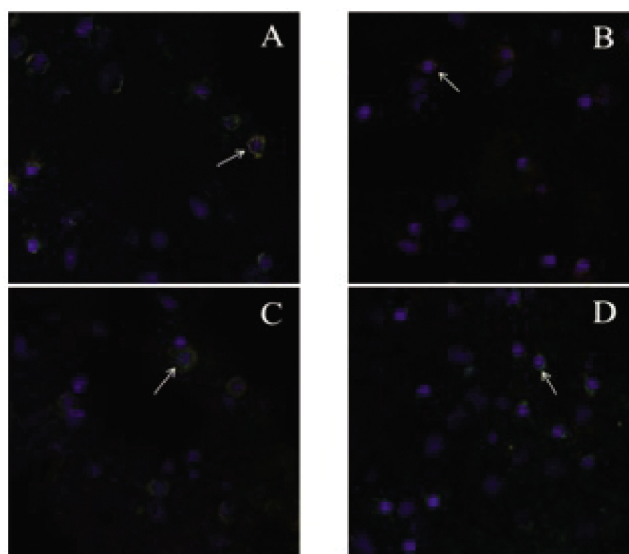


图1 CD8⁺CD122⁺T细胞在缺血脑组织中的浸润(激光共聚焦显微图像×400);A. MCAO 1d; B. MCAO 3d; C. MCAO 5d; D. MCAO 7d

Fig. 1 Double immunofluorescence of the CD8⁺CD122⁺T cells in the ischemia brain (laser scanning confocal microscopy×400); A. MCAO 1d; B. MCAO 3d; C. MCAO 5d; D. MCAO 7d

2 结果

2.1 CD8⁺CD122⁺T细胞在缺血脑组织中的浸润

为证实 CD8⁺CD122⁺T细胞在缺血脑组织中的浸润我们用激光共聚焦扫描脑组织冰冻切片 CD8⁺CD122⁺T细胞免疫荧光双染,CD8⁺CD122⁺T 细胞为细胞核外呈黄色的细胞,图中各个时间点中均有双阳性细胞的浸润,且有逐渐增多的趋势(图1)。

2.2 MCAO 脑组织中 CD8⁺CD122⁺T细胞 /CD3⁺T 细胞的比例

分别取假手术组 (sham)、1 d、3 d、5 d、7 d 的 MCAO 模型小鼠缺血侧与非缺血侧脑组织中浸润的淋巴细胞,流式细胞术检测 CD3⁺CD8⁺CD122⁺T细胞随缺血时间的变化趋势。由图可以看出,在脑缺血发生后缺血侧脑组织中 CD8⁺CD122⁺T细胞 /CD3⁺T 细胞的比例随缺血时间的延长,比例升高;缺血侧较非缺血相比,各时间点内 CD8⁺CD122⁺T细胞 /CD3⁺T 细胞的比例高,5 d、7 d 组差异显著, $P<0.05$ (图2)。

2.3 MCAO 小鼠脾及胸腺组织中 CD8⁺CD122⁺T细胞的数量变化趋势

分别取假手术组 (sham)、1 d、3 d、5 d、7 d 的 MCAO 模型小鼠脾及胸腺组织淋巴细胞,流式细胞术检测 CD3⁺CD8⁺CD122⁺T细胞随缺血时间的变化趋势。由图可以看出,在脑缺血发生后脾及胸腺组织中 CD8⁺CD122⁺T细胞 /CD3⁺T 细胞的比例随缺血时间的延长,比例下降(图3)。

2.4 CD8⁺CD122⁺T细胞对星形胶质细胞 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ mRNA 表达的影响

将星形胶质细胞分为对照组 (Control), HBSS 厌氧培养组 (HBSS), 与 CD8⁺T 细胞共培养厌氧组 (CD8⁺), 以及 CD8⁺T 细胞加入 anti-CD122 封闭 6 h 后的共培养厌氧组

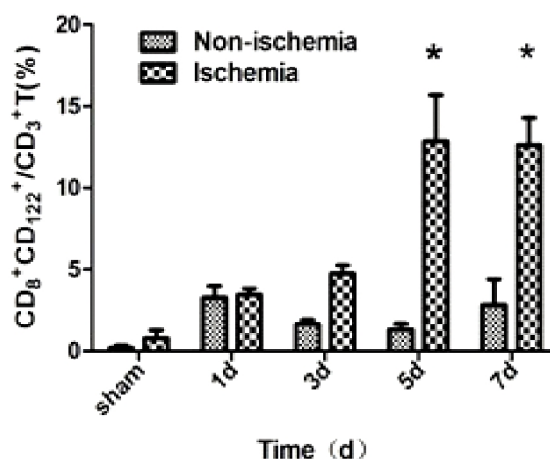


图2 小鼠缺血侧脑组织中 CD8⁺CD122⁺T细胞 /CD3⁺T 细胞的比例变化

* $P<0.05$

Fig. 2 The proportion of infiltrating CD8⁺CD122⁺T cells in CD3⁺T cells in mice experimental ischemic brain in mice * $P<0.05$

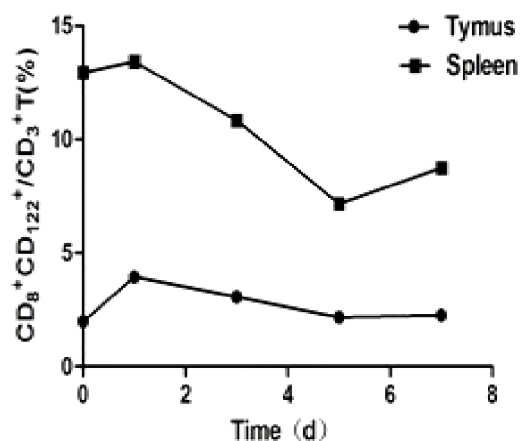


图3 脾及胸腺中 CD3⁺CD8⁺CD122⁺T细胞变化趋势

Fig. 3 The quantity of CD3⁺CD8⁺CD122⁺T cells in spleen and thymus after experimental stroke

(CD122-blocked), OGD 处理 5 h 之后星形胶质细胞提取 RNA 进行 RT-PCR 反应, 结果显示: IFN- γ 的表达在 HBSS 组与 Control 组相比明显增加, $P<0.01$, 说明在缺氧条件下, 星形胶质细胞表达的 IFN- γ 增加; CD8⁺ 组与 CD122-blocked 组相比 IFN- γ 的表达明显降低, $P<0.05$, 说明封闭了 CD122 使 CD8⁺CD122⁺T 细胞的功能得以封闭; CD8⁺ 组与 HBSS 组相比, IFN- γ 的表达明显降低, $P<0.05$, 说明 CD8⁺CD122⁺T 细胞可以抑制星形胶质细胞促炎因子 IFN- γ mRNA 的合成。在 TNF- α 与 IL-1 β 的 RT-PCR 结果中也有同样的变化。

3 讨论

CD8⁺CD122⁺T 细胞最近被确定属于调节性 T 细胞的一个亚群, CD8⁺CD122⁺T 细胞在小鼠体内有着年龄相关性的数量变化趋势, 其随着鼠龄的增大出现先降低后增高的趋势。CD8⁺CD122⁺T 在维持 T 细胞的内环境稳态方面起着重要作用, 通过分泌 IL-10 抑制 T 细胞 IFN- γ 的合成与分泌, 抑制 CD8⁺CD122⁺T 细胞成为异常活化的 T 细胞及抑制 T 细胞的增殖^[7]; CD8⁺CD122⁺T 细胞在实验性自身免疫性脑脊髓炎 (Exper-

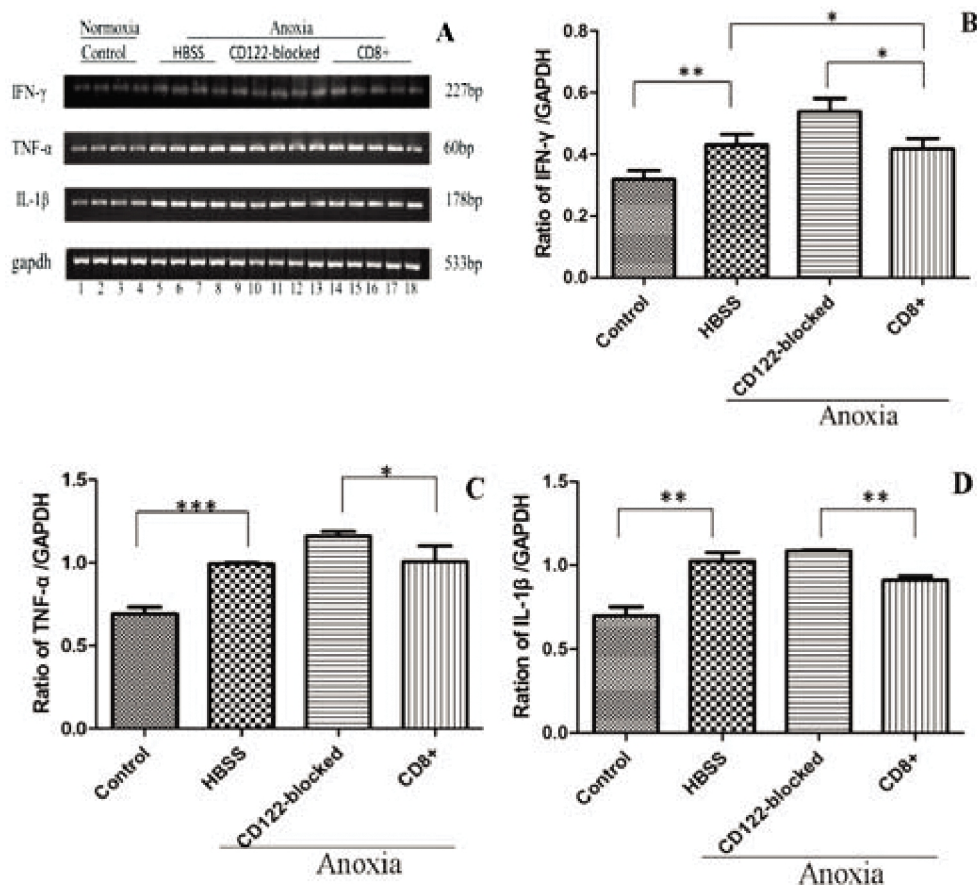


图4 正常培养 astrocyte 及 OGD 条件下 astrocyte TNF- α , IL-1 β , IFN- γ mRNA 的相对表达量

Fig.4 Relative amount of TNF- α , IL-1 β , IFN- γ mRNA in normal astrocytes and astrocytes under OGD condition * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

imental autoimmune encephalomyelitis, EAE)中可以显著的推迟发病高峰时间及缓解发病症状以及在 Graves' 病中的作用都已经得到证实^[6,8]。

脑缺血的病理过程中,炎症细胞的浸润及多种细胞因子发挥了关键作用。关于 T 细胞以及 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞在脑缺血过程中的作用机制已有文献报道, T 细胞在脑缺血过程中通过分泌多种促炎性细胞因子对脑缺血产生损伤作用^[1,2,9,10]; CD4⁺CD25⁺Treg 在脑缺血中通过抑制 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 等细胞因子的合成和分泌从而发挥了保护性作用^[4,11]。作为调节性 T 细胞的新成员 -CD8⁺CD122⁺T 细胞是否参与脑缺血的病理过程以及其作用机制, 尚未见报道。在本实验中, 小鼠 MCAO 模型及 OGD 共培养体系是研究的基础^[12], 建立了该体系我们用免疫荧光双染法检测到小鼠缺血脑组织中存在 CD8⁺CD122⁺T 细胞的浸润, 证实脑缺血发生后, 炎症细胞参与了脑缺血的病理过程。流式细胞术在检测脑内炎症细胞的浸润方面已经得到广泛的应用^[13,14], 本研究采用流式细胞仪检测脑缺血组织中 CD8⁺CD122⁺T 细胞数量, 发现脑缺血侧较非缺血侧相比, 各时间点内 CD8⁺CD122⁺T 细胞 / CD3⁺T 细胞的比例逐渐增高, 在 5 d、7 d 组差异显著, 说明 CD8⁺CD122⁺T 细胞在脑缺血后期发挥作用。流式细胞术检测脾和胸腺中 CD8⁺CD122⁺T 细胞数量, 发现 MCAO 小鼠脾和胸腺中 CD8⁺CD122⁺T 细胞随着缺血时间的延长呈现先增高后降低的变化趋势, 脑缺血引起中枢免疫器官的免疫应激, 调节性 T 细胞增殖和分化使数量增加, 随着对脑内趋化的迁移反应而数量逐渐减少, 同时在脑缺血时

脾及胸腺萎缩, 伴随着 B 细胞的大量丢失, CD8⁺T 细胞数量的减少及 CD4⁺CD25⁺T 细胞的增多^[15]; 在缺血脑组织各个时间点内缺血侧脑组织浸润的 CD8⁺CD122⁺T 细胞较非缺血侧高, 在 5 d 及 7 d 天时达到高峰; 在缺血侧脑组织随着缺血时间延长 CD8⁺CD122⁺T 细胞呈现逐渐增高的趋势。因此, 我们推测这些调节性 T 细胞都是由胸腺及脾中迁移来的, 并且与血脑屏障的开放程度有关, 我们认为 CD8⁺CD122⁺T 细胞是在脑缺血的后期发挥作用的。

脑缺血发生时其病理过程是非常复杂的, 这其中血脑屏障的破坏引起的中枢“免疫逃逸”状态被打破^[16], 星形胶质细胞的活化过程在脑缺血的病理损伤中起到了重要作用^[17]。星形胶质细胞属于脑内的固有免疫细胞, 可以活化并分泌多种细胞因子参与多种生理及病理过程^[17-19]。脑缺血区域内活化的星形胶质细胞的显著性特征是 GFAP 的表达量显著升高, 并且分泌了多种前炎症因子, 包括了肿瘤坏死因子(TNF), 白细胞介素(ILs), 干扰素(IFNs)和金属蛋白酶类(MMPs)等^[19-21]。本研究将星形胶质细胞与预先封闭 CD122 的 CD8⁺T 淋巴细胞共培养, 检测星形胶质细胞的 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ mRNA 的表达情况, 由 RT-PCR 的结果我们可以看出, OGD 条件下星形胶质细胞被活化, 细胞因子 mRNA 的合成产生了变化, 与 CD8⁺ 共培养组相比较, 加入了封闭抗体的淋巴细胞与星形胶质细胞共培养使前炎症因子的合成增加。前炎症因子的增多会加重星形胶质细胞的损伤, 在脑内则会加重神经元的死亡^[20], 可以推测是 CD8⁺CD122⁺T 细胞通过某种作用途径对星形胶质细胞的活动

产生了影响,并且通过 CD122 抑制星形胶质细胞 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 促炎性细胞因子 mRNA 的合成对脑缺血的病理过程起到一定的保护性作用。在 EAE 中,研究已经证实是 CD8⁺CD122⁺T 细胞分泌的 IL-10 对于发病的推迟及高峰期症状的缓解产生了保护性作用^[6],同时在 T 细胞稳态的研究中,研究证实了 IL-10 对其他 T 细胞亚群分泌 IFN- γ 产生一定的抑制作用^[7]。我们推测在 OGD 模型中,这种保护性作用也由通过 CD8⁺CD122⁺T 细胞分泌的细胞因子引起的,有待于以后实验的证实。

总之,本研究证实了脑缺血组织中有 CD8⁺CD122⁺T 细胞浸润,且随着缺血时间的延长,浸润细胞逐渐增多,在缺血后期增加显著;并且在中枢免疫器官中呈现先增加后降低的变化趋势;在体外 OGD 实验中,通过星形胶质细胞与不同处理的淋巴细胞共培养,我们看到前炎症因子 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ mRNA 在有 CD122⁺ 细胞存在的情况下其相对表达量降低,对缺氧损伤起到了一定的保护性作用,这为进一步研究 CD8⁺CD122⁺T 细胞在脑缺血中的作用机制奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Ferrarese C, Longoni M, Stanzani L. Cytokine network in acute stroke [J]. *Neurol Sci*, 2001, 22(4): 287-288
- [2] Arumugam TV, Granger DN, Mattson MP. Stroke and T-cells [J]. *Neuromolecular Med*, 2005, 7(3): 229-242
- [3] Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke[J]. *Nat Med*, 2009, 15(2): 192-199
- [4] Ren X, Akiyoshi K, Vandenbark AA, et al. CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T-cells in cerebral ischemic stroke [J]. *Metab Brain Dis*, 2011, 26(1): 87-90
- [5] Dai H, Wan N, Zhang S, et al. Cutting edge: programmed death-1 defines CD8⁺CD122⁺ T cells as regulatory versus memory T cells[J]. *J Immunol*, 2011, 185(2): 803-807
- [6] Lee YH, Ishida Y, Rifa'i M, et al. Essential role of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Immunol*, 2008, 180(2): 825-832
- [7] Endharti AT, Rifa IM, Shi Z, et al. Cutting edge: CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8⁺ T cells[J]. *J Immunol*, 2005, 175(11): 7093-7097
- [8] Saitoh O, Abiru N, Nakahara M, et al. CD8⁺CD122⁺ T cells, a newly identified regulatory T subset, negatively regulate Graves' hyperthyroidism in a murine model[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(12): 6040-6046
- [9] Schroeter M, Jander S. T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair[J]. *Neuromolecular Med*, 2005, 7(3): 183-195
- [10] Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, et al. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke[J]. *Circulation*, 2006, 113(17): 2105-2112
- [11] Pan W, Kastin AJ. Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier[J]. *Prog Neurobiol*, 2007, 83(6): 363-374
- [12] Woodruff TM, Thundiyil J, Tang SC, et al. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke[J]. *Mol Neurodegener*, 2011, 6(1): 11
- [13] Stevens SL, Bao J, Hollis J, et al. The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice[J]. *Brain Res*, 2002, 932(1-2): 110-119
- [14] Campanella M, Sciorati C, Tarozzo G, et al. Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain[J]. *Stroke*, 2002, 33(2): 586-592
- [15] Offner H, Subramanian S, Parker SM, et al. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages[J]. *J Immunol*, 2006, 176(11): 6523-6531
- [16] Offner H, Vandenbark AA, Hurn PD. Effect of experimental stroke on peripheral immunity: CNS ischemia induces profound immunosuppression[J]. *Neuroscience*, 2009, 158(3): 1098-1111
- [17] Koehler RC, Gebremedhin D, Harder DR. Role of astrocytes in cerebrovascular regulation[J]. *J Appl Physiol*, 2006, 100(1): 307-317
- [18] Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, et al. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function [J]. *Trends Neurosci*, 1997, 20(12): 570-577
- [19] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology [J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 119(1): 7-35
- [20] Barcia C, Sanderson NS, Barrett RJ, et al. T cells' immunological synapses induce polarization of brain astrocytes in vivo and in vitro: a novel astrocyte response mechanism to cellular injury [J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): 2977
- [21] Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. Astrocyte influences on ischemic neuronal death[J]. *Curr Mol Med*, 2004, 4(2): 193-205