

· 论 著 ·

## $\gamma$ -氨基丁酸对人末梢血 $\gamma\delta$ T 细胞作用的实验研究

何晓华, 刘世育

(江苏省徐州市第一人民医院消化内科 221000)

**摘要:**目的 研究  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)对人外周血  $\gamma\delta$ T 细胞的增殖、细胞周期、凋亡的变化、杀伤活性的影响及其可能的作用机制。方法 在体外用不同浓度的 GABA 与人  $\gamma\delta$ T 细胞作用后,用 MTT 比色法和流式细胞仪(FCM)以及乳酸脱氢酶(LDH)法分别检测人  $\gamma\delta$ T 细胞的增殖能力、T 细胞周期、凋亡和杀伤活性的变化。结果 GABA 能显著抑制  $\gamma\delta$ T 细胞的生长( $P < 0.01$ ),并具有浓度依赖性;GABA 显著影响细胞周期比例的分布,促进细胞凋亡;GABA 抑制  $\gamma\delta$ T 细胞对人胰腺癌细胞株 SW-1990 的杀伤活性。结论 GABA 能显著抑制  $\gamma\delta$ T 细胞的增殖,抑制  $\gamma\delta$ T 细胞的杀伤活性。提示 GABA 可能是通过影响细胞周期及凋亡对  $\gamma\delta$ T 细胞发挥作用,进而影响其杀伤活性。

**关键词:**  $\gamma$ -氨基丁酸;  $\gamma\delta$ T 细胞; 凋亡; 杀伤活性

**中图分类号:** R741.02; R338

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2010)07-0804-03

### Effects of $\gamma$ -aminobutyric acid on human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells in vitro

HE Xiao-hua, LIU Shi-yu

(Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Xuzhou, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

**Abstract:** Objective To research the effects of GABA on proliferation, cell cycle, apoptosis, cytotoxicity and possible mechanism of action of human peripheral blood  $\gamma\delta$ T cells. **Methods** Used the isopentenyl pyrophosphate(IPP) method to amplify human peripheral blood  $\gamma\delta$ T cells in vitro. After different doses of GABA to treat with  $\gamma\delta$ T cells, MTT method was used to detect the proliferation of  $\gamma\delta$ T cells; And then investigated the cell cycle and apoptosis of  $\gamma\delta$ T cells by flow cytometry; Meanwhile, measured to cytotoxicity of  $\gamma\delta$ T cells by lactate dehydrogenase method. **Results** GABA could decrease the proliferation of  $\gamma\delta$ T cells in a dose-dependent manner( $P < 0.01$ ). The cell cycle of  $\gamma\delta$ T cells was greatly affected by treated with GABA, and the apoptosis was increased. GABA could restraint  $\gamma\delta$ T cells killing the SW-1990 cell line. **Conclusion** GABA may effect on  $\gamma\delta$ T cells through cell cycle and apoptosis, and then affect the cytotoxicity of  $\gamma\delta$ T cells.

**Key words:**  $\gamma$ -aminobutyric acid;  $\gamma\delta$ T cells; apoptosis; cytotoxicity

$\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)是中枢神经系统一种主要的抑制性神经递质,它不仅存在于中枢神经系统中,而且广泛存在于外周神经组织及非神经组织细胞中<sup>[1]</sup>。有研究发现,免疫系统的许多淋巴细胞表达神经活性分子的受体,调节免疫和神经系统之间的相互作用。最近研究证实,CD4<sup>+</sup>和(或)CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞上表达 GABA<sub>A</sub> 受体, GABA 与其 A 受体结合能够抑制抗原特异性 T 细胞活化,具有免疫抑制作用<sup>[2]</sup>。然而,对于 T 细胞的另一亚群  $\gamma\delta$ T 细胞与神经系统之间的相互作用的研究较少。 $\gamma\delta$ T 细胞是固有免疫的一个重要细胞群,它广泛分布于消化系统和呼吸系统上皮组织内,末梢血中也有一定的数量。自从 1990 年 Zocchi 等<sup>[3]</sup>首次从 2 例肺癌患者的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中分离出  $\gamma\delta$ T 细胞,并观察到对自体肿瘤细胞有较强的杀伤性之后,又有文献报道  $\gamma\delta$ T 细胞对许多肿瘤细胞系的杀伤作用<sup>[4-5]</sup>。本实验应用 GABA 作用于人  $\gamma\delta$ T 细胞,研究其对细胞增殖、细胞周期和对 SW-1990 人胰腺癌细胞的杀伤活性的影响及其可能的作用机制。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** RPMI1640 干粉为 Gibco 公司产品,人 AB 型血清购自徐州市血站,胎牛血清和淋巴细胞分离液购自中国科学院血液学研究所, Hepes(Amersham 公司产品)购于天来生物医学科技有限公司,异戊烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)、GABA、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二亚砷(DMSO)均购自 Sigma 公司, IL-2 购于厦门特宝生物工程股份有限公司,

SW-1990 人胰腺癌细胞株购于中国科学院上海细胞生物学研究所。流式细胞分析仪(TACS Calibur)为美国 BECTON DICKINSON 公司产品,恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱(Heraeus 公司)、倒置显微镜为德国 Wilovert 公司产品, SEAC 全自动酶免系列分析仪和配套的 LDH 试剂盒为北京希亚克技术有限公司产品。

### 1.2 实验方法

**1.2.1  $\gamma\delta$ T 细胞的培养及收集** 取健康献血者末梢抗凝血 10 mL,加入淋巴细胞分离液,以 2 000 r/min 离心 15 min,吸取单个核细胞层,用生理盐水洗涤 3 遍(1 500 r/min 离心,每次 10 min),加入 RPMI1640 培养液中(含 10% 小牛血清、5% 人 AB 血清), IPP 3 ng/mL 和 IL-2 100 IU/mL,调整细胞数为  $1 \times 10^8$  /L,置 75 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中,于 37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,根据细胞生长情况及时添加培养液。取细胞培养瓶以 1 500 r/min 离心 5~6 min,弃上清液,收集培养的  $\gamma\delta$ T 细胞加入新鲜的 RPMI1640 培养液配成所需浓度的细胞悬液备用。

**1.2.2 SW-1990 胰腺癌细胞培养** 将人 SW-1990 胰腺癌细胞株置含 10% 的小牛血清 RPMI-1640 培养液中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,细胞贴壁生长良好,每 2~3 天传代 1 次。

**1.2.3 MTT 法检测 GABA 和 PTX 对  $\gamma\delta$ T 细胞增值的影响** 实验分为不同浓度的 GABA 组和对照组。GABA 的浓度为 10、100、200、400、800、1 600、3 200  $\mu$ mol/L;对照组用等体积的 RPMI-1640 代替,取刚收集的  $\gamma\delta$ T 细胞配成  $1 \times 10^5$  /mL,分别

接种于 96 孔板中,每孔 0.2 mL,加入不同浓度的 GABA,每组设 3 个复空,于 37 ℃、50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,每 2 天半量换培养基及加入相对等的药物,继续孵育 10 d 后每孔加入 MTT 液 20 μL,37 ℃孵育 4 h 后弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,轻轻振荡 10 min 使甲瓚充分溶解,在 540 nm 波长酶标仪上测定各孔光密度(OD)值,求其平均值;同时计算细胞增殖抑制率。

**1.2.4 GABA 对 γδT 细胞凋亡和细胞周期影响的检测** 收集 γδT 细胞,1 500 r/min 离心 5 min,70%冷乙醇固定,离心后加入 PI 染液 1 mL(生理盐水 129.6 mL,PI 100μg,RNA 酶 2 mg,Triton-X-100 1 mL,枸橼酸钠 200 mg,加双蒸水至 200 mL)4 ℃避光染色 30 min,用流式细胞仪检测,每个样本分析 10 000 个细胞。

**1.2.5 LDH 法检测 GABA 对 γδT 细胞杀伤 SW-1990 胰腺癌细胞活性的影响** 将 SW-1990 胰腺癌细胞用 RPMI-1640 培养基培养至对数增殖期,收集细胞用 Hank's 液洗 2 次,配成 2×10<sup>5</sup>/mL;效应细胞(γδT)配成 2×10<sup>6</sup>/mL,将效、靶细胞数按 10:1 比例混合。无菌塑料管 3 支各加入胰腺癌细胞悬液 0.5 mL。测定管加入经 GABA 作用的 γδT 细胞悬液 0.5 mL。对照组用未经 GABA 作用的 γδT 细胞,设靶细胞自然释放管(SW-1990 细胞加 0.5%BSA-RPMI-1640 0.5 mL)及最大释放管(SW-1990 细胞加 1%NP<sub>40</sub> 0.5 mL),每组设 4 管。以 500 r/min 离心 5 min,置 37 ℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 5 h 后,轻轻混匀细胞,再以 1 500 r/min 离心 10 min。收集上清液,用 Encore 全自动生化分析仪,测定 LDH 的活性单位(u/L)。γδT 细胞杀伤活性=(测定管 LDH 单位-靶细胞自然释放 LDH 单位)/(最大释放管 LDH 单位-靶细胞自然释放管 LDH 单

位)×100%。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS13.0 统计软件,数值以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用两组均数 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 GABA 对 γδT 细胞增殖的影响** GABA 能显著地抑制 γδT 细胞的生长(*P*<0.01),呈剂量依赖性,见表 1。

表 1 GABA 对 γδT 细胞生长的影响(*n*=3)

| 组别                  | 光密度值( $\bar{x} \pm s$ , OD) | 生长抑制率(%)           |
|---------------------|-----------------------------|--------------------|
| 对照组(GABA 0 μmol/L)  | 0.093±0.003                 | 0.00               |
| GABA 100 μmol/L 组   | 0.065±0.002 <sup>#</sup>    | 30.11 <sup>#</sup> |
| GABA 200 μmol/L 组   | 0.067±0.008 <sup>#</sup>    | 27.96 <sup>#</sup> |
| GABA 400 μmol/L 组   | 0.069±0.001 <sup>#</sup>    | 25.81 <sup>#</sup> |
| GABA 800 μmol/L 组   | 0.068±0.006 <sup>#</sup>    | 26.88 <sup>#</sup> |
| GABA 1 600 μmol/L 组 | 0.068±0.004 <sup>#</sup>    | 26.88 <sup>#</sup> |
| GABA 3 200 μmol/L 组 | 0.068±0.006 <sup>#</sup>    | 26.88 <sup>#</sup> |

与对照组比较, <sup>#</sup>: *P*<0.01。

**2.2 GABA 对 γδT 细胞凋亡和细胞周期影响的检测** GABA 能显著促进 γδT 细胞的凋亡,细胞凋亡比例从 14.84%到 35.46%。随着药物浓度的增高,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例逐渐增加,G<sub>2</sub>/M、S 期细胞比例逐渐下降,呈剂量依赖性(*P*<0.05),见表 2。

**2.3 GABA 对 γδT 细胞杀伤活性的影响** GABA 可以抑制 γδT 细胞对 SW-1990 胰腺癌细胞株的杀伤活性,呈浓度依赖性(*P*<0.01),见图 1。

表 2 GABA 对 γδT 细胞周期及凋亡的影响( $\bar{x} \pm s$ , %, *n*=3)

| 组别                 | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> | G <sub>2</sub> /M       | S                       | 凋亡率                     |
|--------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组(GABA 0 μmol/L) | 38.87±1.38                     | 13.45±0.89              | 47.67±2.26              | 14.62±0.60              |
| GABA 200μM 组       | 39.43±3.40                     | 10.94±2.45 <sup>#</sup> | 49.28±3.77 <sup>#</sup> | 14.32±0.34              |
| GABA 800μM 组       | 34.75±3.51 <sup>#</sup>        | 9.63±0.49 <sup>#</sup>  | 55.62±3.91 <sup>#</sup> | 28.99±1.20 <sup>#</sup> |
| GABA 3 200μM 组     | 30.04±1.17 <sup>#</sup>        | 7.30±0.85 <sup>#</sup>  | 62.65±0.97 <sup>#</sup> | 35.39±0.90 <sup>#</sup> |

与对照组及各浓度组之间比较, <sup>#</sup>: *P*<0.01。

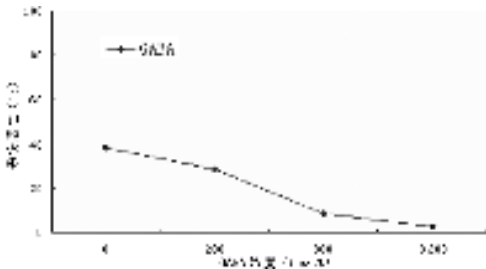


图 1 GABA 对 γδT 细胞杀伤活性的影响

**3 讨 论**

在人类外周淋巴器官及血液中的多数 T 细胞属于 αβT 细胞,这些 αβT 细胞来源于骨髓的多能造血干细胞,并且在胸腺中分化为 CD4<sup>+</sup> 和(或)D8<sup>+</sup> T 细胞,随后定居于外周淋巴器官发挥其生物学作用。1984 年 Saito 及其研究小组首次发现在正常外周血淋巴细胞中除了占绝大多数的 αβT 细胞群之外,

还有一群为数只占不到 T 细胞总数 5%的、由 γ 和 δ 链基因编码 T 细胞受体(TCRs)的 T 细胞,即 γδT 细胞。与 αβT 细胞不同,γδT 细胞主要分布于皮肤、肺、肠、生殖泌尿道等器官。多年来的研究发现,γδT 细胞在抗炎症、抗病原体、抗肿瘤等方面发挥了巨大的作用<sup>[6]</sup>。国内以往在体外培养扩增 γδT 细胞通常用 γδTCR 单克隆抗体固相包被、结核杆菌低分子多肽抗原诱导、HSP70 多肽诱导和磷脂配体诱导等方法<sup>[7]</sup>。作者应用 IPP 和 IL-2 共刺激法在体外培养 10 d 时 γδT 细胞的比率从培养前 4.21%升至 70.35%,γδT 细胞增殖倍数达 100 倍。此足量的高纯度的 γδT 细胞基本上满足了目前研究和临床应用的需

要<sup>[8]</sup>。自 20 世纪 90 年代以来,越来越多的证据显示神经递质受体在非神经组织的表达,就免疫系统而论,尽管巨噬细胞、树突状细胞(DC)、B 细胞和自然杀伤细胞(NK)也表达神经递质受体,但是研究者的兴趣大多集中在胸腺细胞和 T 细胞上。经

典神经递质受体如苯二氮草类受体、乙酰胆碱受体、谷氨酸受体、GABA 受体、甘氨酸受体等在 CD4<sup>+</sup> 和(或)CD8<sup>+</sup> T 细胞上的表达均有报道,其受体激动剂或拮抗剂对 T 细胞的分化、成熟及其分泌细胞因子(如 IL-2、IL-4、IL-10、INF- $\gamma$ 、TGF- $\alpha$ )等方面均有不可忽视的影响<sup>[9]</sup>,但是关于  $\gamma\delta$ T 细胞与神经递质的相互作用国内外报道较少。

GABA 主要有 A、B、C 3 种受体亚型,A 和 C 受体是配体门控离子通道超家族(ligand-gated ion channel superfamily)成员,A 受体是异聚体 Cl<sup>-</sup> 离子通道,可被生物碱、Picrotoxin 等阻断。B 受体是七跨膜偶联 G 蛋白受体家族,可激活第 2 信使系统及 Ca<sup>2+</sup> 和 K<sup>+</sup> 通道。Sabina 等<sup>[2]</sup>最近研究发现人类外周血 T 细胞上表达 GABA 受体,并且可以对 T 细胞发挥一定的调节作用。本实验用 GABA 对  $\gamma\delta$ T 细胞的影响研究表明,GABA 可抑制  $\gamma\delta$ T 细胞的生长,并且在第 1 天加入 GABA 时有作用,当培养 7 d 加入时却无此作用。此结果表明 GABA 对  $\gamma\delta$ T 细胞增殖的抑制作用是在 IPP 激活前发生的,对 IPP 激活后的  $\gamma\delta$ T 细胞无明显作用。

与 Tian 等<sup>[10]</sup>报道结果一致,本研究发现 GABA 对  $\gamma\delta$ T 细胞的细胞周期也有一定的影响。不同浓度 GABA 作用后,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例明显上升,G<sub>2</sub>/M 期、S 期细胞比例降低,结果提示 GABA 能够抑制  $\gamma\delta$ T 细胞生长,影响细胞周期进程,使  $\gamma\delta$ T 细胞停滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,并且显著地促进了  $\gamma\delta$ T 细胞凋亡。因此,GABA 是通过促进细胞的凋亡,影响细胞周期发挥作用的,但不排除通过 A、B、C 受体或其他途径实现,其具体机制尚有待于进一步研究。这些实验结果也从侧面反映了  $\gamma\delta$ T 与  $\alpha\beta$ T 细胞之间的相似之处。

$\gamma\delta$ -TCR 和 NKG2D 是  $\gamma\delta$ T 细胞上表达的主要与炎症、肿瘤等免疫相关的两类主要的受体,其杀伤活性与肿瘤细胞表达的配体如 MICA/MICB、ULBP1-4 等密切相关<sup>[11]</sup>。对杀伤活性的研究发现,GABA 可以抑制  $\gamma\delta$ T 细胞对 SW-1990 胰腺癌细胞株的杀伤,并呈剂量依赖性。此结果表明, $\gamma\delta$ T 细胞的杀伤活性可能主要是通过  $\gamma\delta$ -TCR 介导的,是否也通过 NKG2D 等其他途径目前尚不清楚。至于 GABA 通过何种途径影响  $\gamma\delta$ T 细胞表面受体的表达、如何对肿瘤细胞发挥作用尚须深入的研究。

上述实验资料表明,GABA 对  $\gamma\delta$ T 细胞的影响可能与多种途径有关,深入认识其作用和作用机制,对于解释  $\gamma\delta$ T 细胞的功能及其与神经递质间的相互作用具有重要的理论意义和临床应用价值,而且对于阐明  $\gamma\delta$ T 细胞对于肿瘤细胞的杀伤

活性的临床作用基础也具有重要的参考价值。另外还可以为神经、内分泌、免疫系统之间相互作用提供证据。

#### 参考文献:

- [1] Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, et al. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs[J]. Int Rev Cytol, 2002, 213:1.
- [2] Sabina A, David L, Laughton C, et al. Human peripheral blood mononuclear cells express GABA<sub>A</sub> receptor subunits[J]. Molecular Immunology, 2006, 43:1432.
- [3] Zocchi MR, Ferrarin M, Rugarli C. Selective lysis of thrautologous tumor by tumor infiltrating lymphocytes from human lung carcinomas[J]. Eur Immunol, 1990, 20:2685.
- [4] 陈复兴, 刘军权, 冯霞, 等. 人末梢血  $\gamma\delta$ T 细胞对消化系统肿瘤细胞的杀伤作用[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 25(5):111.
- [5] Kabelitz D, Wesch D, He W. Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology[J]. Cancer Res, 2007, 67:5.
- [6] Masanobu N, Tetsuo S, Hiroshi Y, et al.  $\gamma\delta$ T cells: fire-fighters or fire boosters in the front lines of inflammatory responses[J]. Immunological Reviews, 2007, 215:103.
- [7] 贺伟锋, 程文广, 胡婕, 等. 激活后  $\gamma\delta$ T 细胞迅速增殖分子机制的初步研究[J]. 重庆医学, 2006, 35(24):2224.
- [8] 陈复兴, 刘军权, 冯霞, 等. 一种体外扩增人  $\gamma\delta$ T 细胞的新方法[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(7):662.
- [9] Kerstin L, Philipp B. Neurotransmitter effects on tumor cells and leukocytes[J]. Prog Exp Tumor Res, 2007, 39:99.
- [10] Tian JD, Lu YX, Zhang HW, et al. Kaufman,  $\gamma$ -aminobutyric acid inhibits T cell autoimmunity and the development of inflammatory responses in a mouse type 1 diabetes model[J]. The Journal of Immunology, 2004, 173:5298.
- [11] Bauer S. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA [J]. Science, 1999, 285:727.

(收稿日期:2009-08-17 修回日期:2009-09-28)

## 重庆市卫生信息中心增挂重庆市药品集中采购服务中心牌子

今接到渝卫[2009]74 号文获悉,经重庆市卫生局党政联席会议审议,并经市编办批复(渝编办[2009]38 号),同意重庆市卫生信息中心增挂重庆市药品集中采购服务中心牌子,增加财政全额拨款事业编制 10 名,其中单位领导职数 1 名,专用于承担药品集中采购服务工作。

本刊编辑部