PI3K/Akt 信号传递途径与 CD3 ϵ 介导 T 淋巴细胞激活和凋亡的调控

张 静 刘彦信 刘士廉 郑德先*

(中国医学科学院基础医学研究所, 中国协和医科大学基础医学院, 北京 100005. *联系人, Email: zheng@public3.bta.net.cn)

摘要 利用 Western 印迹免疫沉淀及激酶活性测定方法, 研究表达 CD8 α 胞外区-跨膜区和 CD3 ϵ 胞浆区的融合分子(CD8 ϵ)的 Jurkat T 淋巴细胞激活与凋亡过程中磷酸肌醇 3-激酶(PI3K)和蛋白激酶 B(PKB 或 Akt)表达及酶活性的变化. 结果表明, 在抗 CD8 单抗诱导的 CD8 ϵ^+ Jurkat T 淋巴细胞(TJK)激活与凋亡过程中, PI3K 及 Akt 的表达均明显增加, Akt 的激酶活性也增加. 而将 CD8 ϵ -ITAM 中的一个酪氨酸(Y170)突变为苯丙氨酸(Y170F)并在 CD8 ϵ 细胞中表达(T1JK)后, 经 CD8 单抗刺激未发生细胞凋亡, 而且 PI3K 和 Akt 的表达水平及 Akt 的激酶活性也无明显变化, 表明 PI3K 及 Akt 参与了抗体诱导的 T 淋巴细胞激活与凋亡过程.

关键词 细胞凋亡 CD8 ϵ 融合分子 T 淋巴细胞 PI3K Akt

磷酸肌醇 3-激酶(PI3K)和蛋白激酶 B(PKB 或 Akt)是近年发现的信号传递分子. 研究表明, PI3K 和 Akt 激酶活性的调节与细胞的生命活动密切相关, 如参与某些生长因子或淋巴因子诱导的靶细胞应答, 影响细胞内糖类的转运、糖原的合成及蛋白质的合成^[1, 2], 参与免疫细胞的激活^[3]以及抑制细胞凋亡^[4, 5]等. Akt 也是机体维持正常生命活动的重要调节因子. PI3K 和 Akt 参与了 T 淋巴细胞抗原受体复合物(TCR/CD3)介导的激活过程. TCR/CD3 复合物的刺激信号是通过 CD3 胞浆区的受体酪氨酸激活基序(ITAM)来传递的. 在 CD3 ζ 的胞浆区中包含有 3 个 ITAM, 而在 CD3 ϵ , CD3 γ 和 CD3 δ 胞浆区中仅含有 1 个 ITAM^[6]. 抗原的短暂刺激诱导 T 淋巴细胞激活时, CD3 ϵ 胞内区的 ITAM 中的两个酪氨酸被磷酸化, 然后激发一系列蛋白激酶的级联反应^[7]; 而抗原的持续刺激会诱导 T 淋巴细胞的凋亡. 本实验室以往的研究结果表明, 将 CD8 α 胞外区、跨膜区和 CD3 ϵ 胞浆区(含 ITAM)的融合基因(CD8 ϵ)转染 CD8 ϵ^- Jurkat T 淋巴细胞并获得稳定表达(此细胞株称为 TJK)后, 抗 CD8 单克隆抗体的刺激能诱导 TJK 细胞凋亡. CD8 ϵ -ITAM 中的两个酪氨酸(Y)分别或同时突变为苯丙氨酸(F)并在 CD8 ϵ^- Jurkat T 淋巴细胞中稳定表达(分别称为 T1JK, T2JK 和 T3JK 细胞)后, 在同样刺激条件下, 则不发生凋亡, 表明 CD8 ϵ -ITAM 中的两个酪氨酸在介导细胞凋亡的信号传递中起着必不可少的作用^[8, 9]. 但 PI3K 和 Akt 是否参与了 CD3 ϵ 介导的 T 细胞凋亡信号传递, 尚不清楚. 本文以上述细胞为模型, 研究了 CD3 ϵ 介导 Jurkat T 淋巴细胞激活与凋亡过程中 PI3K 和 Akt 激酶的动态变化.

1 材料与方法

(i) 细胞培养及细胞激活与凋亡的诱导. 本室建立的 TJK, T1JK 细胞培养于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中. 将适量的细胞在低血清 RPMI 1640 培养基(0.1%胎牛血清, 10 mmol/L HEPES)中培养 12 h, 调整细胞浓度为 10^6 个/mL. 诱导细胞激活时, 细胞先用磷酸缓冲液(PBS)洗 1 遍, 离心弃上清, 再悬浮于 100 μ L 含 20 μ g/mL 抗 CD8 单抗并已预热至 37 $^{\circ}$ C 的 PBS 中, 刺激 30 s 到 6 h 后, 加入 1 mL 冰预冷的 PBS 终止刺激, 同时设不经抗体刺激同样条件培养 30 min 的阴性对照. 在 60 mm 细胞培养平皿中加入 1 mL 抗 CD8 单抗溶液(100 μ g/mL),

于 37℃ 包被 1.5 h, 然后吸去抗体, 用 RPMI 1640 无血清培养基洗两遍, 将细胞悬浮于上述低血清 RPMI 1640 培养基中, 使浓度为 10^6 个/mL. 在平皿中加入细胞悬液 5 mL, 于 37℃, 含 5% CO_2 的孵箱中培养 6~48 h. 同时以在未包被抗体的培养皿中培养 30 h 的细胞作为阴性对照.

(ii) 细胞凋亡的测定. 细胞经抗体刺激不同时间后, 离心收集. 用 PBS 洗 1 遍, 离心吸去上清液. 将细胞用 Annexin-V-FLUOS 细胞凋亡检测荧光染色试剂盒(Boehringer Mannheim)进行染色, 然后在荧光显微镜下观察并计数每 400 个细胞中的凋亡细胞数. 两种细胞的凋亡率差异比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$.

(iii) Western 印迹. 离心收集细胞, 按常规方法裂解细胞, 总蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离, 电转至 PVDF 膜, 用抗 PI3K 单抗(Transduction Laboratories)和抗 Akt1 多克隆抗体(Santa Cruz)作 Western 蛋白印迹, 用 ECL 系统显色(Amersham/ Pharmacia).

(iv) Akt 激酶活性测定. 离心收集细胞, 用细胞裂解液(1% NP-40, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH=8.0, 1 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白酶抑制剂混合物, 1 mmol/L PMSF, 10 mmol/L NaF, 1 mmol/L NaVO_3) 裂解, 于 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清. 将裂解上清液与预先结合了上述抗 Akt1 多抗的 10 μL protein-A Sepharose(Pharmacia)进行免疫沉淀.

免疫沉淀物用细胞裂解液洗两次, 再用洗涤缓冲液(500 mmol/L LiCl_2 , 100 mmol/L Tris-HCl, pH=7.5, 1 mmol/L EDTA) 洗两次, Akt 激酶缓冲液(500 mmol/L Tris-HCl, pH=7.5, 10 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L DTT)洗 1 次, 然后, 加入 15 μL 激酶反应液(含 2.5 μg 组蛋白 H2B, 50 $\mu\text{mol/L}$ ATP, 1.11×10^{11} μBq $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP(北京市亚晖生物医学工程公司)), 混匀, 于 37℃ 温育 20 min, 加等体积 $2 \times$ 上样缓冲液, 于沸水浴中加热 5 min 后, 上样, 按常规进行 15% SDS-PAGE 和放射自显影.

2 结果

2.1 抗 CD8 单抗诱导的 TJK, T1JK 细胞凋亡的动态变化

TJK, T1JK 细胞分别刺激 1, 6, 12, 18, 24, 30, 36 和 48 h 后, 细胞凋亡的百分率如图 1 所示, 抗 CD8 单抗刺激 1~6 h 内, TJK 和 T1JK 的细胞自发凋亡率均在 4% 左右, 从 12 h 起两者凋亡率分别从 4.6% 和 3.4% 增加到 11.6% 和 9.4%, 此后 T1JK 的凋亡率一直保持在 10%~15%, 而 TJK 的凋亡率则呈缓慢上升的趋势, 并从 30 h 后迅速增加, 到 48 h 达到 37.9%. 表明抗 CD8 单抗的刺激可显著诱导 TJK 细胞凋亡, 但不能显著诱导 T1JK 细胞凋亡.

图 1 抗 CD8 单抗诱导的 TJK 和 T1JK 细胞的凋亡

* 示 $P < 0.05$

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2000-45-20-2201>

2.2 抗 CD8 单抗诱导 TJK, T1JK 细胞激活和凋亡过程中 PI3K 和 Akt 表达的动态变化

如图 2 所示, 在正常培养的 TJK 和 T1JK 细胞中均有 PI3K 和 Akt 的表达(即图中正常样品), 经过低血清 1640 培养基培养过夜后, PI3K 和 Akt 的表达量降得很低(对照 1). 经抗 CD8 单抗刺激 30 s 后, PI3K 在 TJK 中的表达量迅速增加, 而且这种高表达状态一直维持到刺激 6 h; 到刺激 12 h 后逐渐降低, 并一直可维持到 48 h, 但降低幅度不明显; 未经抗 CD8 单抗刺激的 TJK 细胞中的 PI3K 的表达量在低血清培养基中培养 30 h 后, 仍保持非常低的水平(对照 2). 在 TJK 的激活及凋亡过程中, Akt 的表达变化与 PI3K 的情况类似. 但在整个刺激过程中, T1JK 细胞中的 PI3K 和 Akt 的表达除在刺激 1 h 时略有增加外, 在刺激 12 h 后又降到基础水平. 表明在 TJK 细胞激活过程中, PI3K 和 Akt 的表达迅速增加; 在细胞凋亡过程中, 二者表达虽然有所下降, 但仍然维持较高的表达水平. 而在 T1JK 细胞中, PI3K 和 Akt 的表达则没有变化, 提示 PI3K 和 Akt 信号传递途径参与了 T 淋巴细胞凋亡的调控与信号传递.

图 2 在抗 CD8 单抗诱导的 TJK 和 T1JK 细胞激活及凋亡过程中 PI3K 和 Akt 的表达变化
对照 1 为未经抗 CD8 单抗刺激培养 30 min 的阴性对照; 对照 2 为未经抗 CD8 单抗刺激培养 30 h 的阴性对照. 正常为含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养的 TJK 及 T1JK 细胞

2.3 抗 CD8 单抗诱导的 TJK, T1JK 细胞激活和凋亡过程中 Akt 激酶活性的变化

如图 3 所示, 在抗 CD8 单抗刺激 TJK 细胞 30 s 后, Akt 激酶活性明显增加, 在刺激 36 h 后仍保持较高的活性, 未经刺激的细胞培养 30 min (对照 1) 和 30 h (对照 2) 后, Akt 激酶活性仍保持较低的水平. 而 T1JK 细胞在整个刺激过程中 Akt 的激酶活性却没有明显的变化.

3 讨论

本实验室以前的研究表明, CD8 α 胞外区-跨膜区与 CD3 ϵ 胞内区形成的融合基因 CD8 ϵ 在 Jurakt T 淋巴细胞中稳定和过量表达(称为 TJK 细胞)后, 抗 CD8 单抗可引起该细胞的凋亡^[8]. 而用抗体短期刺激 TJK 细胞, CD3 ϵ -ITAM 中的第 170 和 181 位酪氨酸残基被迅速磷酸化, 磷酸化的酪氨酸能募集 PI3K 的 p85 α 亚基并与其结合, 从而激活 PI3K. 如果 CD3 ϵ -ITAM 中的两个酪氨酸残基分别突变为苯丙氨酸并在 Jurkat T 细胞中稳定表达后, 抗 CD8 单抗的刺激则不能激活 PI3K^[10], 表明 CD3 ϵ 分子胞内区的两个酪氨酸在 T 淋巴细胞的激活与凋亡中起关键作用, 其中一个氨基酸的突变即可阻断细胞激活与凋亡的信号传递.

图 3 在抗 CD8 单抗诱导的 TJK 和 T1JK 细胞激活及凋亡过程中 Akt 激酶的活性变化
对照 1 为未经抗 CD8 单抗刺激的 30 min 的阴性对照; 对照 2 为未经抗 CD8 单抗刺激的 30 h 的阴性对照

本项研究进一步发现, 抗 CD8 单抗刺激 TJK 细胞 36 h 后, 细胞发生凋亡, 而在同样条件下, 表达 Y170F 突变 CD8 ϵ 融合分子的 T1JK 细胞几乎不凋亡, 这与以往的研究结果一致. 对细胞激活与凋亡的信号传递途径的研究发现, 抗体诱导的 TJK 细胞激活和凋亡过程中均有 PI3K 和 Akt 蛋白的高水平表达, Akt 的激酶活性也相应增加; 而同样处理的 T1JK 细胞激活过程中, PI3K 和 Akt 蛋白表达量略有增加, 之后两者表达量又逐渐减低. 表明在抗体刺激 TJK 细胞的过程中, CD8 ϵ 将信号传递到下游的 PI3K 和 Akt 分子, 并引起两者基因表达增加和酶蛋白的激活; 而在 T1JK 细胞中, 由于 CD8 ϵ -ITAM 的 170 位酪氨酸残基为苯丙氨酸代替, 使 CD8 ϵ 的刺激信号无法传递到下游分子, 因此 PI3K 和 Akt 的表达量和激酶活性没有明显变化, 提示 CD8 ϵ -ITAM 中一个酪氨酸的突变可阻断细胞凋亡信号的传递, PI3K/Akt 途径可能参与了 T 淋巴细胞凋亡的信号传递.

Ward 等人^[11]报道, PI3K 和 Akt 的活化只与细胞的激活或抗凋亡的功能相关. 如活化的 PI3K 可抑制 CD95(Fas)介导的 COS7 细胞的凋亡, PI3K 的特异抑制剂 wortmannin 和 LY294002 则促进其凋亡^[12]. 大鼠嗜铬细胞瘤细胞系 PC12 经神经生长因子刺激后, 细胞凋亡受到抑制, 在该过程中也需要 PI3K 的活化^[13]. 本实验中观察到在 TJK 淋巴细胞凋亡过程中, PI3K 和 Akt 的表达虽比细胞激活时有所下降, 但仍维持在较高的水平上. 而用 wortmannin 处理 TJK 细胞时, 与未处理的相比, TJK 细胞凋亡明显增高(结果未显示), 推测细胞接受刺激后, 同时存在促进和抵抗凋亡两种机制的整合, 细胞激活与凋亡的命运取决于两者相互作用的动态平衡.

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 398707277)和国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号: G1999053905).

参 考 文 献

- 1 Alessi D R, Andjelkovic M, Caudwell B, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*, 1996, 15: 6541~6551
- 2 Cross D A, Alessi D R, Cohen P, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated protein kinase B. *Nature*, 1995, 378: 785~789
- 3 Tilton B, Andjelkovic M, Didichenko S A, et al. G-protein-coupled receptors and Fc γ -receptors mediate activation of Akt/protein kinase B in human phagocytes. *J Biol Chem*, 1997, 272(44): 28096~28101
- 4 Ahmed N N, Grimes H L, Didichenko S A, et al. Transduction of interleukin-2 anti-apoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *PNAS USA*, 1997, 94: 3627~3632
- 5 Kennedy S G, Wagner A J, Conzen S D, et al. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Gene Develop*, 1997, 11: 701~713
- 6 Wang B P, Levelt C, Salio M, et al. Overexpression of CD3 ϵ transgenes blocks T lymphocyte development. *Int Immunol*, 1995, 7(3): 435~448
- 7 Cambier J C, Daeran M, Fridman W, et al. New nomenclature for the Reth motif (or ARHI/TAM/ARAM/YXXL). *Immunol Today*, 1995, 16(2): 110
- 8 郑德先, 郑 勇, Terhorst C. CD8 α 和 CD3 ϵ 的融合分子介导 T 淋巴细胞凋亡. *科学通报*, 1996, 42(1): 84~89
- 9 何亦平, 刘彦信, 郑 勇, 等. CD3 ϵ 胞浆区 2 个酪氨酸共同介导 T 淋巴细胞凋亡. *科学通报*, 1998, 43(12): 1299~1304
- 10 De Aoz I, Metzger M H, Exley M, et al. Tyrosine phosphorylation of the CD3 ϵ subunit of the T cell antigen receptor mediates enhanced association with phosphatidylinositol 3 kinase in Jurkat T cells. *J Biol Chem*, 1997, 272(40): 25310
- 11 Ward S G, June C H, Olive D. PI3-kinase: a pivotal pathway in T-cell activation. *Immunol Today*, 1996, 17(4): 186~197
- 12 Datta S R, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 1997, 91: 231~239
- 13 Yao R, Cooper G M. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by the nerve growth factor. *Science*, 1995, 267: 2003~2006

(2000-02-25 收稿, 2000-07-07 收修改稿)

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2000-45-20-2201>