

网络出版时间: 2020-3-30 17:08 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200330.0845.006.html>

含转导域重组神经肽对 D-半乳糖致 免疫衰老小鼠胸腺功能的影响

刘贞银¹ 梁 阳¹ 欧阳军¹ 郑丹丹² 余榕捷³ 张华华¹

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.006

摘要 目的 探讨垂体腺苷酸环化酶激活肽(PACAP)及含蛋白转导域的重组 PACAP(PACAP-PTD)对 D-半乳糖(D-Gal)致免疫衰老小鼠胸腺功能的影响,明确其延缓免疫衰老的作用。方法 将 30 只雄性 BALB/c 小鼠随机分组:对照组 5 只,每天颈部皮下注射生理盐水(500 mg/kg);模型组 25 只,注射等量 D-Gal 溶液,连续注射 42 d。再从模型组中随机选取 18 只均分为 PACAP 组、PACAP-PTD 组、D-Gal 组。PACAP 组和 PACAP-PTD 组分别每天注射 PACAP 和 PACAP-PTD 溶液(12.5 ml/kg),D-Gal 组注射等量的生理盐水、采用 Real-time PCR 法检测胸腺和脾脏初始 T 淋巴细胞标志物(sjTREGs)的含量以及胸腺相关基因 T 淋巴细胞易位蛋白(LMO2)、白细胞介素-7(IL-7)和叉头蛋白 N1(Foxn1)的表达;流式细胞术检测全血中 T 细胞 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 的表型变化。结果 小鼠胸腺和脾脏的初始 T 细胞中 sjTREGs 的含量:D-Gal 组 < PACAP 组 < PACAP-PTD 组($P < 0.01$);与 D-Gal 组比较,PACAP 和 PACAP-PTD 均能够上调免疫衰老小鼠显示胸腺功能和状态相关基因 Foxn1、IL-7 的表达水平($P < 0.01$),下调 LMO2 的表达水平($P < 0.01$),且 PACAP-PTD 比 PACAP 上调基因 Foxn1、IL-7 的表达水平更显著($P < 0.01$);小鼠全血 T 淋巴细胞亚群的 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 比值:D-Gal 组 < PACAP 组 < PACAP-PTD 组($P < 0.01$)。结论 PACAP 和 PACAP-PTD 显著增强小鼠胸腺初始 T 淋巴细胞生成和输出功能,维持外周 T 淋巴细胞受体库多样性;上调胸腺功能和状态相关基因的表达,扩展胸腺微环境;增强细胞免疫功能,恢复了退化的胸腺功能,具有延缓衰老和免疫保护作用。

关键词 PACAP;PACAP-PTD;免疫衰老;胸腺

中图分类号 Q 419

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)03-0349-07

2020-01-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31200679);广东省自然科学基金(编号:2018A0303130291)

作者单位:¹ 广东医科大学基础医学院生物学教研室,东莞 523808

² 泉州医学高等专科学校基础医学部生理教研室,泉州 362100

³ 暨南大学生命科学技术学院生物工程研究所,广州 510632

作者简介:刘贞银,女,硕士研究生;

张华华,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: hua-huazhang@126.com

免疫衰老是指生物体的免疫系统随年龄增加而产生的一系列退化、代偿和重建。免疫衰老的主要历程包括初始 T 细胞的耗竭、胸腺的退化、T 细胞受体的基因多态性消减、记忆/效应 T 细胞累积及衰老的慢性炎症状态。且胸腺的退化和萎缩是免疫衰老过程中最主要的免疫学表现,胸腺退化会直接导致胸腺内初始 T 细胞的发育障碍以及向外周 T 淋巴细胞输出减少,从而导致 T 淋巴细胞介导的免疫能力减弱,使机体免疫自稳功能紊乱并加快衰老^[1]。胸腺的状态和功能直接影响机体的免疫功能,胸腺的萎缩是机体免疫衰老的直接原因^[2]。垂体腺苷酸环化酶激活肽(pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP)是一种多功能性神经多肽,与其衍生物均具有修复神经损伤、调节神经递质/调质、保护神经细胞作用;参与 T 淋巴细胞分化、增殖以及调节相关免疫功能和维持机体免疫自稳等作用,而这些作用都基于活化的受体刺激细胞内第二信使 cAMP 的产生^[3]。已有研究^[4]表明, PACAP 通过与免疫细胞上特定受体结合,在细胞免疫系统中发挥关键作用。为了使其有更好的稳定性及穿膜能力,利用基因重组制备技术重组神经肽:含蛋白转导域(protein transduction domain, PTD)的重组 PACAP(PACAP-PTD)。它是一种介导大分子跨膜的运载工具,能够穿透生物膜,介导各种分子在细胞之间自由传递,而且对机体细胞没有明显不良反应^[5]。该研究从初始 T 细胞耗竭、胸腺退化的角度展开系统研究,探讨 PACAP 和 PACAP-PTD 对免疫衰老模型小鼠胸腺功能的影响,初步明确其延缓免疫衰老的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 半乳糖(北京 Solarbio 公司);血液/细胞/组织全基因组 DNA 抽提试剂盒(北京天根公司);丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(南京建成生

物工程研究所); SYBR Green qPCR SuperMix-UDG 试剂盒、TRIzol (美国 Invitrogen 公司); Prime Script™ RT reagent 试剂盒、TAKARA Taq™ PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); Anti-mouse CD3-PerCP™ Cy5.5、CD4-FITC、CD8-PE (美国 BD 公司); ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystem 公司); 雄性 BALB/c 小鼠 SPF 级, 许可证号: SCXK (粤) 2011-0015, SPF 级动物房饲养 (南方医科大学实验动物中心); Real-time PCR 测定的引物见表 1, 由上海生工生物合成。

表 1 引物序列

基因名	引物序列 (5'-3')
sjTRECs	F: CATTGCCT TTGAACCAAGCTG R: TTATGCACAGGGTGCAGGTG
RAG2	F: TGACGTGGTGTATAGTCGA R: TCCTGAAGTTCTGGGAGA
GAPDH	F: CAAAGTTGTCATGGATGACC R: CCATGGAGAAGGCTGGGG
LMO2	F: CTGAGGAACCCGTGGATGAG R: CGACACCCACAGAGGTCACA
Foxn1	F: GACCTTGGGACTGACCTGGAT R: TGCCTGTTTCTGCCAGACAA
IL-7	F: TCTGCTGCCTGTGCATCATC R: GGACATTGAATTCTTCACTGATATCA

1.2 方法

1.2.1 D-半乳糖 (D-Gal) 致衰老模型小鼠的建立及生物学鉴定 6~8 周龄 BALB/c 雄鼠 30 只 (18~22 g) 随机分成对照组和模型组, 对照组 5 只小鼠, 每天皮下注射生理盐水 (500 mg/kg); 模型组 25 只小鼠, 注射等量 D-Gal 溶液, 连续 42 d。整个实验中小鼠自由饮水进食。最后一次注射后称量小鼠体重, 摘眼球取血, 处死小鼠并取脾脏和胸腺重量。胸腺、脾脏指数 (mg/10 g) = 脏器重量 (mg) / [体重 (g) × 10]。分别采用黄嘌呤氧化酶法、TBA 比色法测定血清中 SOD 活性和 MDA 含量。

1.2.2 Real-time PCR 测定衰老小鼠 T 细胞中 sjTREC 含量 D-Gal 致衰老小鼠模型 18 只, 随机分为 D-Gal 组、PACAP 组、PACAP-PTD 组, 每组 6 只; PACAP 组和 PACAP-PTD 组分别每天腹腔注射 10 nmol/ml PACAP 和 PACAP-PTD 溶液 (12.5 ml/kg), D-Gal 组腹腔注射等量的生理盐水, 连续注射 14 d。

获取胸腺和脾脏淋巴细胞, 抽提基因组 DNA, 进行 Real-time PCR 反应, 建立标准曲线, 体系反应的条件: 95 °C 2 min 去 UDG, 95 °C 3 min 预变性, 95 °C 30 s, 62 °C 15 s, 进行 50 个循环。制备标准以及

阳性重组质粒。在同 1 次反应中, 稀释标准重组质粒反应组: 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³ 拷贝/μl, 设置标准质粒阴性对照组、TREC 片段 PCR 组、TREC 阳性对照组、TREC 阴性对照组、RAG2 阳性对照组、RAG2 片段 PCR 组, 每组均设置两个平行重复。由 Real-time PCR 反应 Ct 值和标准曲线得出样本中 RAG2 和 TREC 的拷贝数 (copies), 根据公式: [(TREC copies1 + TREC copies2) / (RAG2 copies1 + RAG2 copies2)] × 2 × 10⁶ 计算出 10⁶ 个细胞中信号结合 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 重排删除环 (signal joint T cell receptor rearrangement excision circles, sjTREC) 的拷贝数。

1.2.3 real-time PCR 检测衰老小鼠胸腺功能和状态相关基因表达 获取胸腺和脾脏细胞, 抽提淋巴细胞 RNA, 设计并合成引物, 设置 42 °C 除去基因组 DNA, RNA 反转录成互补 DNA (cDNA), 进行逆转录 real-time PCR 反应, 建立扩增曲线, 体系反应: 95 °C 30 s 预变性 1 次, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环。在同 1 次反应中, 设置样品 T 淋巴细胞易位蛋白 (LIM domain only 2, LMO2)、白细胞介素-7 (interleukin-7, IL-7)、叉头蛋白 N1 (forkhead box protein N1, Foxn1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 片段 PCR 组和阴性对照组, 每组均设置两个平行重复; PCR 反应完成后设定阈值, 利用软件输出 Ct 值; 根据比较 Ct 值法得到不同基因表达比率, 公式为: 2^{-ΔΔCt}, 其中 ΔΔCt = (Ct 目的基因 - Ct 管家基因) 实验组 - (Ct 目的基因 - Ct 管家基因) 对照组。

1.2.4 流式细胞术检测小鼠全血中 CD3、CD4、CD8 加入 100 μl EDTA 抗凝血于离心管中, 用红细胞裂解液 2 ml, 室温、裂解 15 min (1 000 r/min 离心 5 min), 弃上清液; 加入 1 ml PBS 缓冲液洗涤 2 次 (1 000 r/min 离心 5 min); 用 50 μl PBS 缓冲液重悬细胞, 细胞悬液移入流式管; 每管分别加入 2.5 μl Anti-mouse CD3-PerCP™ Cy5.5、CD8-PE、CD4-FITC 混匀, 4 °C 避光孵育 30 min; PBS 洗涤 1 次, 用 4% 多聚甲醛 400 μl 混匀固定样品后, 进行 FACS Canto II 流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理 实验数据采用 SPSS 20.0 和 Graphpad prism 5 软件进行统计分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 两两比较采用 *t* 检验, 两个变量之间比较采用回归分析, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 D-Gal 致衰老小鼠动物模型建立成功

2.1.1 小鼠的生物学行为和一般状态 小鼠注射 D-Gal 溶液建立衰老模型,连续注射 42 d 后小鼠无死亡。与对照组相比,模型组小鼠呈现明显衰老体征,脊椎渐现隆起,皮肤松弛,体型瘦削,毛发蓬松直竖且稀疏失去光泽,行动迟缓少动且喜蜷缩,对照组小鼠则无相应形态状况。见图 1。

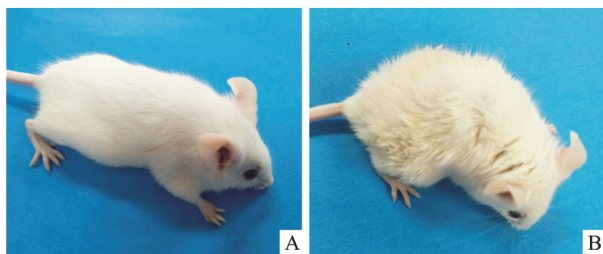


图1 对照组与模型组小鼠外观
A:对照组;B:模型组

2.1.2 小鼠体质量及脾脏和胸腺指数变化 建立模型期间每周称取小鼠体质量,与对照组小鼠比较,模型组小鼠体质量增长较慢。根据主效应和交互效应方差分析的结果显示,不同时间之间体质量有差异($F = 30.06$, $P < 0.01$);时间与组别之间不存在交互效应($F = 1.98$, $P > 0.05$);模型组与对照组间体质量无差异($F = 10.14$, $P > 0.05$)。单独效应分析模型组与对照组做两两比较,从 35 d 起模型组小鼠与对照组相比体质量有差异(35 d: $t = 5.02$, $P < 0.01$; 42 d: $t = 6.40$, $P < 0.01$)。见图 2。建模完成

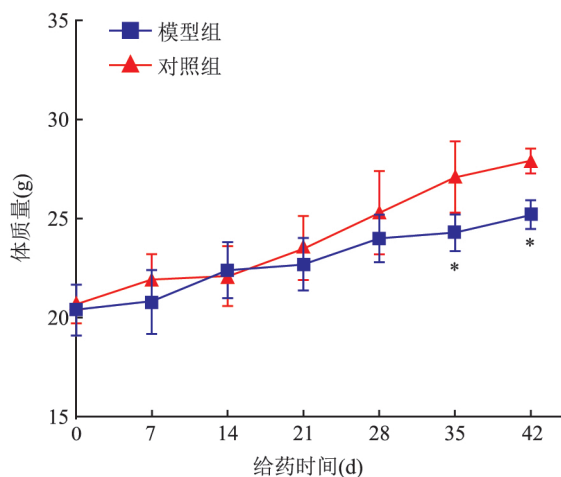


图2 模型组与对照组小鼠体质量变化($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)
与对照组比较: * $P < 0.01$

后,模型组小鼠的胸腺及脾脏指数均低于对照组($P < 0.01$)。见表 2。

表2 模型组与对照组小鼠胸腺和脾脏重量及指数的比较($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	胸腺重量 (mg)	脾脏重量 (mg)	胸腺指数 (mg/10 g)	脾脏指数 (mg/10 g)
对照	58.32 ± 4.73	125.43 ± 5.34	0.21 ± 0.02	0.45 ± 0.02
模型	17.58 ± 3.67	73.57 ± 4.56	0.07 ± 0.01*	0.30 ± 0.04*
<i>t</i> 值	15.22	16.51	12.28	7.16

与对照组比较: * $P < 0.01$

2.1.3 小鼠血清中 SOD 活力和 MDA 含量变化 与对照组比较,模型组小鼠血清中 SOD 活力下降,MDA 含量升高,确定建模成功。见表 3。

表3 D-Gal 致衰老小鼠血清中 SOD 活力和 MDA 含量变化($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	SOD 活力(U/ml)	MDA 含量(nmol/ml)
对照	257.43 ± 16.35	7.54 ± 1.23
模型	192.32 ± 17.58*	10.38 ± 1.38*
<i>t</i> 值	6.06	-3.43

与对照组比较: * $P < 0.01$

2.2 衰老模型小鼠 T 细胞中 sjTREC 含量结果

2.2.1 Real-time PCR 反应 Real-time PCR 反应后核酸扩增过程中的动力学曲线呈 S 型,熔解曲线为单一峰,证明了产物的特异性。见图 3。

2.2.2 标准曲线 用梯度稀释标准质粒的 Ct 值为纵坐标(Y),标准质粒浓度自然对数为横坐标(X),得到一条直线型标准曲线,并获得一元回归方程: $Y = -3.33X + 43.05$,斜率为 -3.33, $R^2 = 0.999$ 。保证了此方法的准确性。见图 4。

2.2.3 Real-time PCR 测定 sjTREC 含量的结果 经公式可以计算出各个样本相同细胞数目中的 TREC copies,从而进行样本间的比较。Real-time PCR 检测显示,与 D-Gal 组比较, PACAP 组和 PAC-AP-PTD 组胸腺($F = 27.24$, $P < 0.01$)和脾脏($F = 59.90$, $P < 0.01$)T 淋巴细胞中 sjTREC 含量上升($P < 0.01$)。PACAP 组和 PACAP-PTD 组比较,胸腺($P < 0.01$)和脾脏($P < 0.05$)中 sjTREC 含量上升,差异有统计学意义。见图 5。

2.3 衰老小鼠胸腺功能和状态相关基因表达结果

2.3.1 Real-time PCR 扩增 Real-time PCR 反应最后可得到反应核酸扩增过程的 S 型动力学曲线和熔解曲线。扩增曲线呈 S 型,不同基因表达的熔解曲线为单一峰,证实了产物的特异性。见图 6。

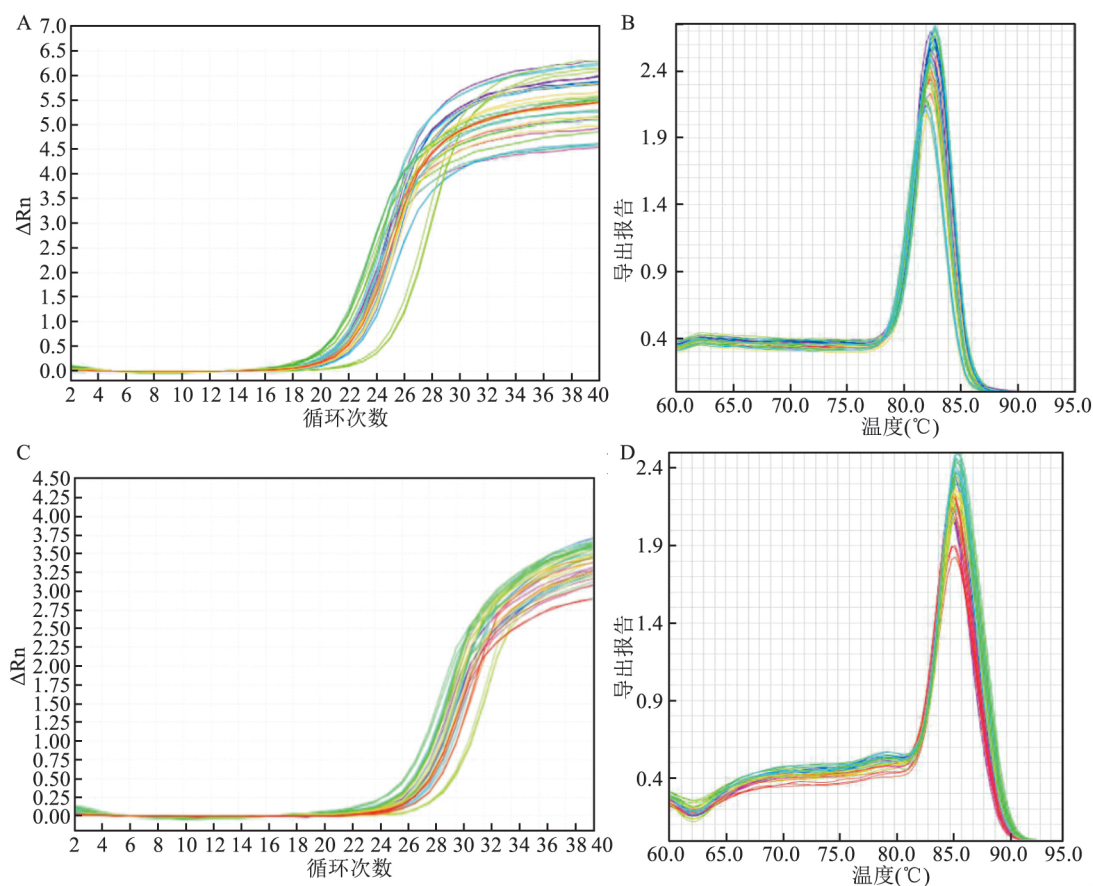


图3 Real-time PCR 结果

A: RAG2 扩增曲线; B: RAG2 熔解曲线; C: TREC 扩增曲线; D: TREC 熔解曲线。

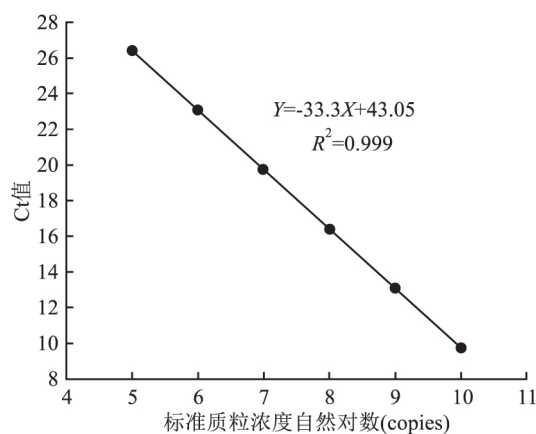
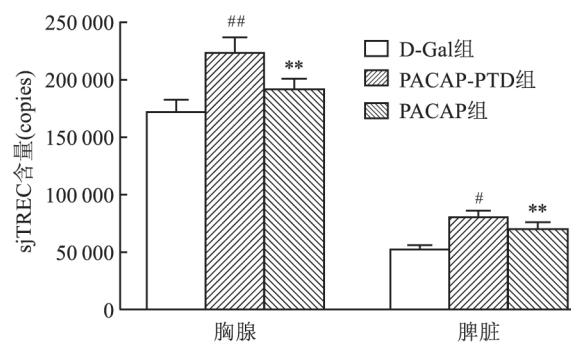


图4 标准曲线

2.3.2 LMO2、Foxn1 及 IL-7 基因表达 Real-time PCR 检测发现与 D-Gal 组比较, PACAP 组和 PACAP-PTD 组胸腺 LMO2 基因表达下调 ($F = 82.962$, $P < 0.01$), IL-7 和 Foxn1 基因表达均上调 ($F = 348.86$, $P < 0.01$; $F = 219.11$, $P < 0.01$)。PACAP-PTD 组较 PACAP 组 IL-7 和 Foxn1 基因表达上调差异大 ($P < 0.01$), LMO2 基因的表达下调差异有统计

图5 Real-time PCR 测定胸腺和脾脏淋巴细胞中 sjTREC 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)与 D-Gal 组比较: ** $P < 0.01$; 与 PACAP 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 学意义 ($P < 0.05$)。见图 7。

2.4 小鼠全血中 CD3、CD4、CD8 变化

2.4.1 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 检测 利用 Per-cp™ Cy5.5、FITC、PE 分别标记 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 细胞, 流式分析结果表明 PACAP 组和 PACAP-PTD 组小鼠全血中 CD3⁺CD4⁺ T 细胞比例均高于

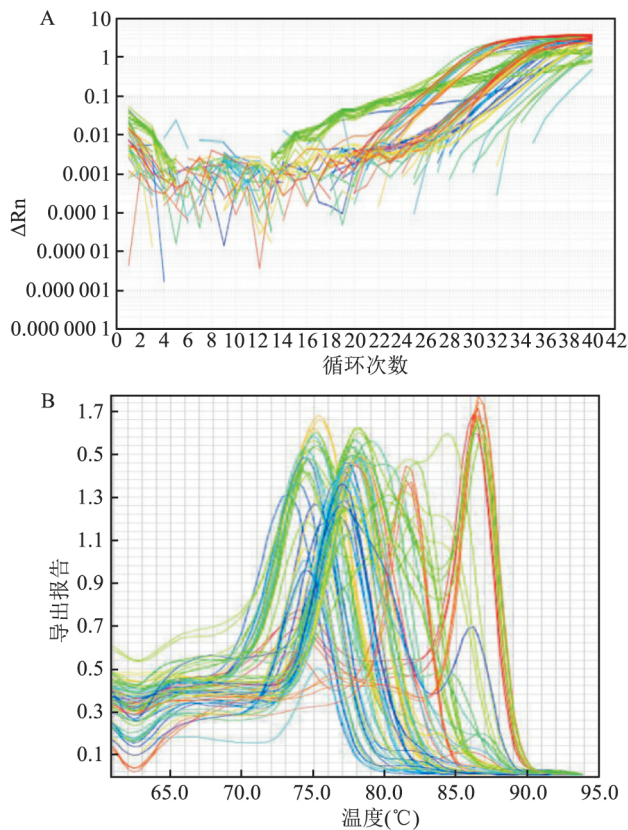


图6 Real-time PCR 扩增结果

A: 样品的扩增曲线; B: 不同基因表达扩增的熔解曲线

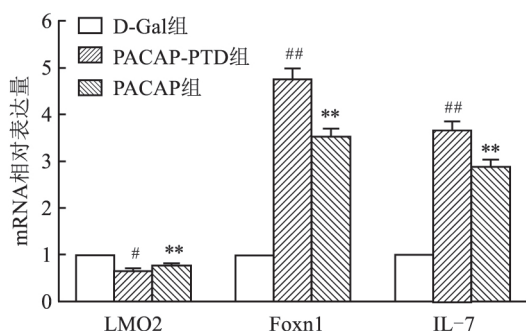


图7 Real-time PCR 检测基因 LMO2、Foxn1

及 IL-7 的表达结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

与 D-Gal 组比较: ** $P < 0.01$; 与 PACAP 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

D-Gal 组; PACAP 组 $CD3^+ CD8^+$ T 细胞比例低于 D-Gal 组; PACAP-PTD 组 $CD3^+ CD8^+$ T 细胞比例高于 D-Gal 组。见图 8。

2.4.2 流式细胞仪检测全血中 $CD3^+ CD4^+ / CD3^+ CD8^+$ 比值结果 与 D-Gal 组比较, PACAP 组和 PACAP-PTD 组 $CD3^+ CD4^+ / CD3^+ CD8^+$ 比值均上调 ($F = 13.88, P < 0.01$)。而 PACAP 组和 PACAP-PTD 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 9。

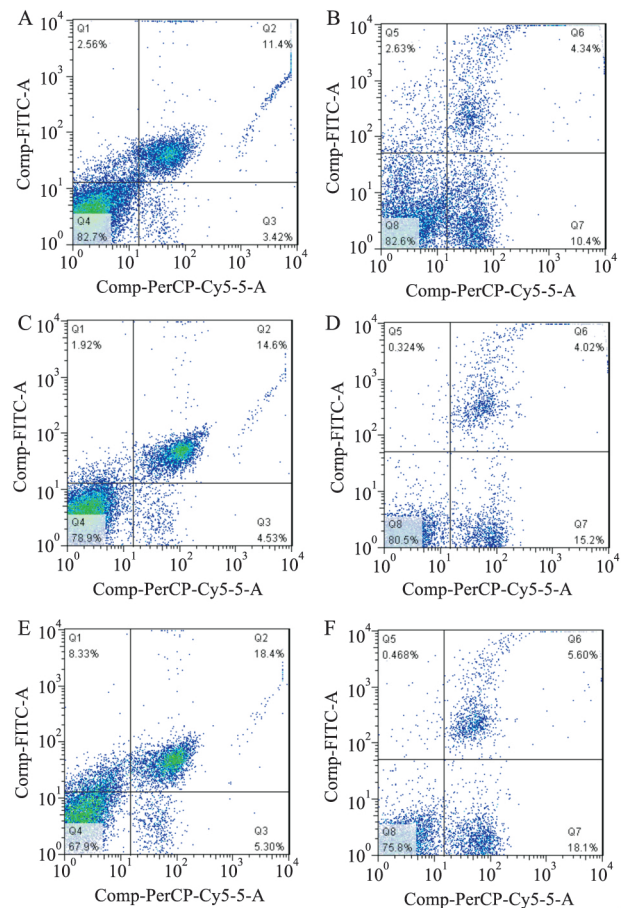


图8 CD3、CD4、CD8 T 细胞表型变化

A: D-Gal 组 $CD3^+ CD4^+$ T 细胞含量; B: D-Gal 组 $CD3^+ CD8^+$ T 细胞含量; C: PACAP 组 $CD3^+ CD4^+$ T 细胞含量; D: PACAP 组 $CD3^+ CD8^+$ T 细胞含量; E: PACAP-PTD 组 $CD3^+ CD4^+$ T 细胞含量; F: PACAP-PTD 组 $CD3^+ CD8^+$ T 细胞含量

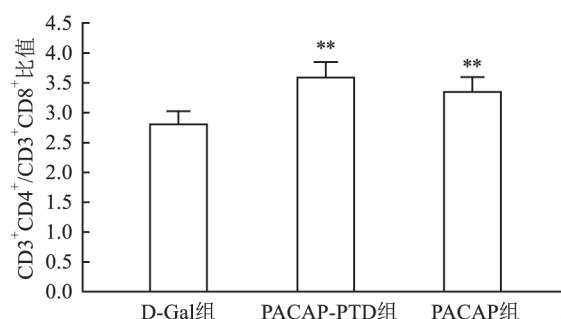


图9 流式细胞仪检测全血中 $CD3^+ CD4^+ / CD3^+ CD8^+$ 比值 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

与 D-Gal 组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

胸腺作为机体重要的中枢免疫器官, 是 T 淋巴细胞分化、发育、成熟和输出至外周 T 淋巴细胞库的场所, 因此初始 T 细胞的数目可以评价胸腺 T 淋

巴细胞生成和输出功能。而 sjTREC 是在 TCR α 基因重组过程中,在 TCR δ 基因两侧的删除片段 δ Rec 和 ψ J α 之间重组形成一个环状 DNA 分子而被删除,其含量在胸腺组织近期产生的 T 淋巴细胞群体中最高,在细胞中稳定存在且不随细胞分裂而复制,能够代表形成功能性 TCR 时初始 T 细胞的数量。因此,检测 sjTRECs 的含量能真实的评价胸腺的输出功能状态,现已成为基础和临床研究中重要的胸腺功能免疫学指标^[6]。D-Gal 诱导的衰老模型是目前较经典的衰老动物模型,接近于自然衰老规律^[7]。本研究成功建立 D-Gal 致免疫衰老小鼠模型,胸腺功能发生破坏性降低。本研究中,PACAP 组和 PACAP-PTD 组小鼠胸腺和脾脏的初始 T 细胞的数量较 D-Gal 组均增加,表明胸腺的生成和输出功能均提高,向外周 T 淋巴细胞输出增多,维持外周 T 细胞受体库多样性。证实 PACAP 和 PACAP-PTD 可以保护胸腺器官的功能性,恢复退化的胸腺功能,延缓胸腺相关的免疫衰老。同时,PACAP-PTD 较 PACAP 对胸腺初始 T 细胞生成和输出能力更有效。

胸腺退化是机体衰老的重要生物学标志,过程涉及复杂的基因表达变化。胸腺的各种功能主要是由胸腺微环境调节和显现的。胸腺微环境主要由胸腺细胞和胸腺上皮细胞组成,并为细胞发育提供关键的细胞因子同时还可能对胸腺选择有着调控与支持的作用。LMO2 是一种 T 细胞原癌基因,蛋白质的过度高水平表达会导致 T 淋巴细胞过度增殖^[8]。IL-7 是胸腺早期维持 T 细胞的生长因子,确保胸腺 T 细胞增加输出到外周库,延缓胸腺萎缩和增强免疫反应^[9]。Foxn1 转录因子是调节胸腺上皮细胞发育的主要因子,其低表达会促进胸腺萎缩和免疫缺陷^[10]。因此选择以上几个胸腺微环境相关的基因进行分析,进而有效的评价小鼠胸腺的状态和功能。本研究中,PACAP 组和 PACAP-PTD 组小鼠 Foxn1 基因上调,表明小鼠胸腺微环境中的胸腺上皮细胞活性和功能增强,胸腺微环境受到保护;IL-7 基因上调可维持胸腺功能性和稳定状态,保护胸腺微环境,增加外周 T 细胞的输出;而其负调控因子基因 LMO2 表达下调,表示胸腺细胞在发育过程当中受负调控影响下降,胸腺细胞可正常发育。证实 PACAP 和 PACAP-PTD 可以使退化的胸腺功能得以恢复,扭转胸腺萎缩,延长细胞免疫功能。

胸腺经过对 T 细胞的驯化、选择建立机体自身免疫耐受和维持免疫自稳。而 T 细胞亚群首要有 CD3⁺CD4⁺ 的辅助性 T 细胞和 CD3⁺CD8⁺ 的细胞毒

性 T 细胞等,CD4⁺ T 细胞是协调 B 细胞产生抗体;CD8⁺ T 细胞则是抑制抗体合成、分泌及 T 淋巴细胞的增殖,它们的稳态维持机体日常的免疫应答。T 细胞亚群可反映机体细胞免疫的水平,是目前临床上较常用的反映免疫功能状态的指标^[11]。本研究中 PACAP 组和 PACAP-PTD 组小鼠全血中 CD3⁺CD4⁺ T 细胞比例升高,表明调控免疫反应最重要的枢纽细胞增多;CD3⁺CD8⁺ T 细胞比例降低,表明免疫反应中直接杀伤性细胞减少;CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 比值反映机体 T 细胞亚群的状态,比值升高表明机体 T 淋巴细胞免疫功能增加。证实 PACAP 和 PACAP-PTD 具有调节机体免疫功能,维持免疫平衡的作用。

总之,本研究以 D-Gal 致免疫衰老小鼠为模型,探讨 PACAP 和 PACAP-PTD 通过延缓模型小鼠胸腺的萎缩,调节机体细胞免疫功能而发挥延缓衰老和免疫保护的作用。其中,PACAP 和 PACAP-PTD 改变了退化的胸腺功能状态与微环境,从多个指标的检测中体现了其延缓衰老和调节细胞免疫功能作用。因此,阐明 PACAP 和 PACAP-PTD 延缓衰老小鼠胸腺萎缩的作用机制可望成为相关免疫衰老疾病的治疗或辅助治疗药物。

参考文献

- [1] Fulop T, Larbi A, Dupuis G, et al. Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: friends or foes [J]. *Front Immunol*, 2018, 8: 1960.
- [2] 魏群,周萍.六味地黄丸对老年人细胞免疫衰老的影响[J]. *实用临床医学* 2017, 18(12): 20-1.
- [3] Dong D, Xie J, Wang J. Neuroprotective effects of brain-gut peptides: a potential therapy for parkinson's disease [J]. *Neurosci Bull* 2019, 10:407.
- [4] Semple S L, Rodríguez-Ramos T, Carpio Y, et al. PACAP is lethal to *flavobacterium psychrophilum* through either direct membrane permeabilization or indirectly, by priming the immune response in rainbow trout macrophages [J]. *Front Immunol* 2019, 10:926.
- [5] Wang F, Wang Y, Zhang X, et al. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery [J]. *J Control Release*, 2014, 174:126-36.
- [6] De Voeght A, Martens H, Renard C, et al. Exploring the link between innate immune activation and thymic function by measuring sCD14 and TRECs in HIV patients living in Belgium [J]. *PLoS One* 2017, 12(10): e0185761.
- [7] Wang X K, Liu J H, Wu T S, et al. Bergapten attenuates D-galactose-induced immunosenescence in BALB/c mice [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* 2018, 32(4): 309.
- [8] 迟昨非,吴斌,杨威. T 细胞性急性淋巴细胞白血病的特

- 异性免疫治疗及靶向基因治疗研究进展[J]. 中国全科医学, 2015, 18(35): 4393–400.
- [9] Xu H, Lauer F T, Liu K J, et al. Environmentally relevant concentrations of arsenite and monomethylarsonous acid inhibit IL-7/STAT5 cytokine signaling pathways in mouse CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺ double negative thymus cells[J]. *Toxicol Lett*, 2016, 247: 62–8.
- [10] Rode I, Martins V C, Küblbeck G, et al. Foxn1 protein expression in the developing, aging, and regenerating thymus[J]. *J Immunol*. 2015, 195(12): 5678–87.
- [11] 吴姗姗, 严峰, 邓玉玲, 等. 小细胞和非小细胞肺癌晚期患者 CD3⁺、CD4⁺ 及 CD3⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞亚群的差异[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(1): 114–21.

Effect of restructured PACAP-PTD containing transduction domain's on thymus function of D-galactose E-induced immunosenescence mice

Liu Zhenyin, Liang Yang, Ouyang Jun, et al

(Laboratory of Medical Genetic of Guangdong Medical College, Dongguan 523808)

Abstract Objective To explore the effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and recombinant PACAP (PACAP-PTD) containing protein transduction domain on thymus function in D-galactose (D-Gal)-induced immunosenescence mice, and to clarify its role in delaying immune aging. **Methods** Thirty male BALB/c mice were randomly divided into control group and model group, and 5 rats in the control group were injected subcutaneously with 500 mg/kg normal saline per day. The model group was injected with the same amount of D-Gal solution. After continuous injection for 42 days, 18 rats in the model group were randomly selected as PACAP-PTD group, PACAP group and D-Gal group, 6 for each group. The PACAP group and the PACAP-PTD group were intraperitoneally injected with 12.5 ml/kg PACAP and PACAP-PTD solution, and the D-Gal group was injected with the same amount of normal saline. Real-time PCR was used to detect initial T cell markers (sjTREC) in the thymus and spleen, the expression of the thymus-associated genes LIM domain only 2 (LMO2), interleukin-7 (IL-7) and forkhead box protein N1 (Foxn1). Flow cytometry was used to detect the phenotypic changes of T lymphocytes CD3, CD4 and CD8 in whole blood of mice. **Results** The content of sjTRECs in T lymphocytes of mouse thymus and spleen: D-Gal group < PACAP group < PACAP-PTD group ($P < 0.01$). Compared with the D-Gal group, PACAP and PACAP-PTD could up-regulate the expression of IL-7 and Foxn1 ($P < 0.01$), and down-regulate the expression of LMO2 ($P < 0.01$); moreover, PACAP-PTD up-regulated the expression of Foxn1 and IL-7 more significantly than PACAP ($P < 0.01$). Ratio of CD3⁺ CD4⁺ / CD3⁺ CD8⁺ in mouse whole blood T lymphocyte subsets: D-Gal group < PACAP group < PACAP-PTD group ($P < 0.01$). **Conclusion** PACAP and PACAP-PTD significantly enhance the initial T cell production and export function of mouse thymus, keep the diversity of peripheral T lymphocyte bank, up-regulate the expression of thymus function and state-related genes, expand the thymus microenvironment, enhance cellular immune function and restore degraded thymic function, which have the effect of delaying aging and immune protection.

Key words PACAP; PACAP-PTD; immunosenescence; thymus