

文章编号 1006-8147(2015)05-0393-04

论 著

调节性 T 细胞获得及其免疫抑制作用的实验研究

王 清¹, 车绪春²

(1. 天津医科大学总医院检验科, 天津 300052; 2. 天津医科大学免疫学系, 天津 300070)

摘要 目的: 制备诱导性调节性 T 淋巴细胞(iTreg), 探讨 iTreg 的免疫抑制功能及其作用机制。方法: 免疫磁珠分选获取 CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞, TGF- β 诱导法获取 iTreg, 流式细胞术和实时定量 PCR 方法检测 iTreg 的得率及其叉头状/翅膀状螺旋转录因子(Foxp3)mRNA 水平, 活性染料羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)染色和流式细胞术方法观察 Treg 细胞对 CD4⁺T 淋巴细胞体外增殖能力的影响。利用 ELISA 和流式细胞术方法分别检测 iTreg 的 IL-10、TGF- β 分泌以及胞内因子 IL-2、IL-4、IL-17、干扰素- γ (IFN- γ)水平。结果: TGF- β 诱导法 iTreg 得率可达 42.10%, TGF- β 诱导后获得的 iTreg Foxp3 mRNA 水平明显升高。获得的 iTreg 可以抑制自体 CD4⁺T 淋巴细胞增殖, IL-10 和 TGF- β 分泌水平较原始 CD4⁺T 细胞上升($P < 0.05$), 但几乎不分泌 IL-2、IL-4、IL-17、IFN- γ 。结论: 利用 TGF- β 诱导法制备获得的 iTreg 具有明显的免疫抑制功能, 其发挥免疫抑制功能过程可能均有 IL-10 和 TGF- β 的参与。

关键词 诱导性调节性 T 细胞; Foxp3; TGF- β ; 免疫抑制

中图分类号 R392.12

文献标志码 A

Study on obtaining method of iTreg cells obtaining method and its immunosuppression function

WANG Qing¹, CHE Xu-chun²

(1. Department of Clinical Laboratory, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Department of Immunology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:** To establish TGF- β induced method to obtain induced regulatory T cells (iTreg), and to study the immunosuppression function and mechanism of iTreg. **Methods:** CD4⁺CD25⁺T were obtained by MACS, after which the iTreg cells were obtained by TGF- β induced method. Flow cytometry and PCR were used to detect iTreg yield and Foxp3 mRNA level, CFSE staining and Flow cytometry were applied to investigate the effect of iTreg on proliferation activity of CD4⁺T. ELISA and Flow cytometry were adopted to detect iTreg IL-10 and TGF- β secretion levels and intracellular cytokine levels of IL-2, IL-4, IL-17 and IFN- γ . **Results:** The yield rate of iTreg cells was increased to 42.10% using by TGF- β induced method. The Foxp3 mRNA of the induced iTreg were higher than that of CD4⁺T ($P < 0.05$). CD4⁺T cell proliferation and IL-10, TGF- β secretion were significantly inhibited by iTreg cells versus non-Treg cells ($P < 0.05$). IL-2, IL-4, IL-17 and IFN- γ were hardly secreted by iTreg cells. **Conclusion:** TGF- β induction can be successfully used to obtain iTreg. IL-10 and TGF- β may be both involved in iTreg immunosuppression function.

Key words induced regulatory T cells; Foxp3; TGF- β ; immunosuppression

调节性 T 细胞(Treg)介导的免疫调节是机体保持对自身抗原特异性免疫耐受,维持 T 细胞稳态的一个重要机制。1995 年, Sakaguchi 等^[1]首次报道了 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞。Treg 细胞过继疗法已经在某些疾病的实验研究中取得重要进展^[2], 而外周血中无法分离出大量 Treg 细胞, 要将 Treg 细胞真正应用于治疗, 首先需要获得足够数量的有治疗意义的 Treg 细胞^[3]。Hjerrild 等首次报道发现叉头状/翅膀状螺旋转录因子(Forkhead/winged helix transcription factor, Foxp3)参与 Treg 细胞的发育及其作用发挥的过程。Wildin 等和 Bennett 等报道人类 Foxp3 基因和 Scurfy 小鼠的 Foxp3 基因存在同源

性(小鼠 Foxp3 基因编码的蛋白质也称 Scurfy), Foxp3 基因敲除的小鼠产生的 CD4⁺CD25⁺T 细胞不具备调节功能, 即无 Treg 细胞, 从而引起自身免疫性疾病的发生^[4]。体外通过转基因技术将 CD4⁺T 淋巴细胞表达 Foxp3, 获得的 Treg 细胞可具有与 nTreg(native Treg, 天然型 Treg)相同的表型和功能^[5]。另外, TGF- β 能够诱导外周 CD4⁺T 表达 Foxp3, 并成为与 nTreg 相似的 iTreg(inducible Treg, 诱导型 Treg)^[6]。本文通过研究体外获取 Treg 细胞的方法——利用 TGF- β 诱导初始 CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞来制备 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞, 观察获得 Treg 样细胞的得率, 对方法学进行优化、鉴定, 研究 Treg 对免疫的调控功能及其抑制作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 尼龙毛柱(Wako chemical 公司); 流式

作者简介 王清(1978-), 女, 主管技师, 硕士, 研究方向: 免疫调节及抗肿瘤免疫; 通信作者: 车绪春, E-mail: chexuchun@tmu.edu.cn。

细胞仪(BD公司);淋巴细胞分离液(中国医学科学院生物工程研究所);CFSE(invitrogen公司);human IL-2(PEPROTECH公司);anti-CD3(R&D公司);anti-CD28(R&D公司);CD4⁺CD25⁺ Regulatory T cell isolation kit (Miltenyi公司);IL-10和TGF- β ELISA试剂盒(R&D公司)。

1.2 方法

1.2.1 CD4⁺CD25⁺淋巴细胞及 CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞的获得 采用免疫磁珠法(Magnetic activated cell sorting, MACS)。将正常人富含血小板白膜与PBS混合,加入淋巴细胞分离液,离心吸取单个核细胞。以抗CD8⁺T细胞抗体和磁珠结合方法,分离CD4⁺T细胞,加入抗CD25抗体,先收集的未标记细胞即为CD4⁺CD25⁻淋巴细胞,磁珠自动分选仪的磁场阳性选择CD4⁺CD25⁺淋巴细胞,检测细胞活性。流式细胞仪检测CD4⁺CD25⁺Treg细胞纯度。

1.2.2 TGF- β 诱导 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞

人外周血单个核细胞分离法获得B细胞,即刺激细胞。将 5×10^5 CD4⁺CD25⁺T淋巴细胞和刺激细胞1:1培养,培养基中加入IL-2(200 U/mL)、anti-CD3(10 μ g/mL)和anti-CD28(10 μ g/mL),并分别加入不同浓度TGF- β (0、1、5和10 ng/mL)。分别在第2、4、6、8、10天,流式细胞仪分析细胞表型标记(Foxp3),计数iTreg细胞,并计算获得率。

1.2.3 TGF- β 诱导 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞 Foxp3 基因的表达 实验分组如下,TGF- β 诱导组:CD4⁺CD25⁺T淋巴细胞和相同数量的刺激细胞加入到96孔板中,并加入IL-2(200 U/mL)、anti-CD3(10 μ g/mL)和anti-CD28(10 μ g/mL),加入5 ng/mL TGF- β 诱导获得iTreg细胞;CD4⁺T淋巴细胞活化组:将CD4⁺CD25⁺T淋巴细胞和相同数量的刺激细胞混合培养,并加入IL-2(200 U/mL)、anti-CD3(10 μ g/mL)和anti-CD28(10 μ g/mL);CD4⁺T淋巴细胞未活化组:CD4⁺CD25⁺T淋巴细胞单纯培养基培养。收集3组培养细胞,细胞总RNA提取采用Trizol法,real-time PCR方法检测Foxp3 mRNA。

1.2.4 TGF- β 诱导 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞对 CD4⁺T 淋巴细胞体外增殖影响 实验分组如下:(1)TGF- β 诱导iTreg细胞组;(2)nTreg组;(3)对照组为活化的CD4⁺T淋巴细胞即non-Treg(非Treg),未经CFSE染色。3组均以经CFSE染色的CD4⁺CD25⁺T淋巴细胞为作用细胞。具体步骤如下:CD4⁺CD25⁺T淋巴细胞计数后,加入CFSE稀释液混匀,之后中止染色,DMEM完全培养基洗涤,收集细胞,并加入IL-2、anti-CD3、anti-CD28,使其终浓度分别

为200 U/mL、10 μ g/mL、10 μ g/mL。将培养板中的TGF- β 诱导iTreg细胞、nTreg细胞、non-Treg细胞,调整浓度为 2×10^6 个/mL,分别同时加入CFSE染色CD4⁺CD25⁺T淋巴细胞,混匀。将上述细胞分别用96孔板培养于10%胎牛血清的DMEM培养基中。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下培养72 h,流式细胞术分别检测第1、2、3代CD4⁺T增殖细胞的比例。

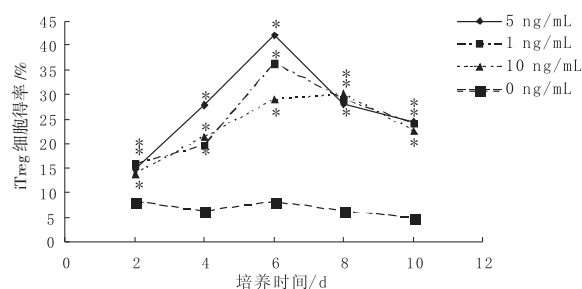
1.2.5 TGF- β 诱导 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞 IL-10、TGF- β 分泌水平的比较 收集TGF- β 诱导组iTreg细胞和non-Treg细胞悬液(获得步骤同前)。细胞计数并调整细胞浓度为 2×10^6 /mL,接种于96孔培养板中,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、72 h后,收集每孔上清液。IL-10和TGF- β 浓度检测采用ELISA试剂盒,具体检测步骤参照说明书,450 nm波长下检测OD值。

1.2.6 TGF- β 诱导 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞胞内细胞因子检测 收集TGF- β 诱导组iTreg细胞和non-Treg细胞悬液(获得步骤同前)。加入等体积的胞内因子刺激液,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下培养4 h。离心收集细胞,加入细胞固定液,再加入破膜液。离心弃上清。分别加入PE标记的IL-2、IL-4、IL-17、IFN- γ 抗体,孵育后离心弃上清,流式细胞仪检测。

1.3 数据分析 SPSS 19.0 统计软件进行处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数间比较采用one-way ANOVA(单因素方差分析),组间多重比较应用Student-Newman-Keuls法;两组比较应用t检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 TGF- β 诱导法获得 iTreg 细胞 与对照组(0 ng/mL)比较,应用TGF- β (1、5、10 ng/mL)在第2、4、6、8、10天均能使细胞Foxp3蛋白表达升高(均 $P < 0.05$,图1)。当加入5 ng/mL TGF- β ,诱导6 d后,iTreg细胞得率最高,为42.10%,为最佳诱导条件。

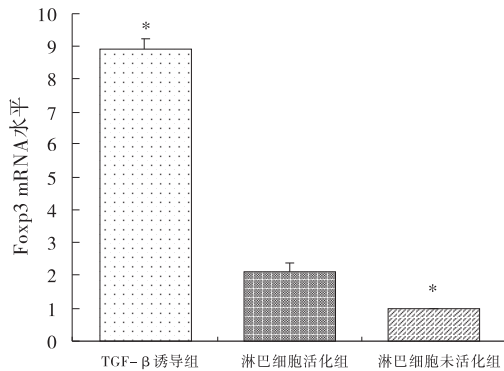


*:与对照组相比, $P < 0.05$ ($n=3$)

图1 不同浓度TGF- β 及不同作用时间诱导获得iTreg细胞

Fig 1 iTreg acquired by different concentrations of TGF- β and induction time

2.2 iTreg 细胞 Foxp3 mRNA 表达检测 Real-time PCR 结果显示,与 CD4⁺T 淋巴细胞活化组比较,TGF- β 诱导后获得的 iTreg Foxp3 mRNA 水平明显升高,具有统计学差异($P<0.01$)(图 2)。

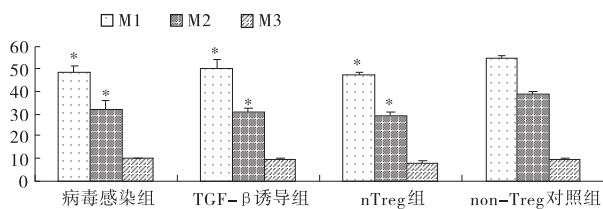


与淋巴细胞活化对照组相比 * $P<0.01$ ($n=3$)

图2 iTreg 细胞 Foxp3 mRNA 水平

Fig 2 Foxp3 mRNA level of iTreg

2.3 iTreg 细胞对 CD4⁺T 淋巴细胞体外增殖的影响比较 与对照组比较,TGF- β 诱导获得的 iTreg 细胞组以及 nTreg 细胞组的第一代 M1 和第二代 M2 CD4⁺T 淋巴细胞的体外增殖均显著被抑制,具有统计学差异($P<0.05$)(图 3)。



与 non-Treg 对照组相比 * $P<0.05$ ($n=3$)

图3 iTreg 细胞对自体 CD4⁺T 淋巴细胞增殖的影响

Fig 3 Effect of iTreg on the proliferation of autos CD4⁺ T lymphocytes

2.4 两种 iTreg 细胞 IL-10 和 TGF- β 分泌水平比较 TGF- β 诱导 iTreg 细胞的 IL-10 和 TGF- β 水平均明显上升,与 non-Treg 对照组比较具有统计学差异($P<0.05$)(表 1)。

表1 iTreg 的 IL-10、TGF- β 水平检测

Tab 1 The IL-10 and TGF- β levels of iTreg

组别	n	IL-10/(ng/mL)	TGF- β /(ng/mL)
TGF- β 诱导组(1)	3	9.463 \pm 0.839**	464.667 \pm 64.532*
non-Treg 对照组(2)	3	3.653 \pm 0.740	298.333 \pm 92.511

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.5 两种 iTreg 细胞胞内细胞因子 IL-2、IL-4、IL-17、IFN- γ 水平比较 经流式细胞仪法检测表明,TGF- β 诱导的 iTreg 细胞均几乎不分泌 IL-2、IL-4、IL-17、IFN- γ , 检测值分别为 (0.32 \pm 0.24)、(3.59 \pm 2.72)、(0.39 \pm 0.22)、(1.00 \pm 0.30)ng/mL。

3 讨论

Treg 细胞是目前免疫学领域研究的热点,对于维持机体免疫耐受和免疫应答稳态具有重要的作用。近年来,越来越多研究表明,Treg 细胞在免疫相关性疾病的发生、发展过程中有着重要的临床意义^[8-9],如多发性硬化、红斑狼疮等自身免疫病以及与移植免疫、肿瘤和感染免疫有关^[10-12]。由于 Treg 细胞具有强大的免疫调节特性,将其作为治疗靶点,利用其在细胞和分子水平机制上发挥作用,达到自身免疫的平衡,从而达到治疗的目的。但由于 Treg 细胞只占正常人外周血 CD4⁺T 淋巴细胞的 5%~10%,及其免疫无能特性,在体外难以培养且增殖能力较差,因而限制了其研究进展。Treg 细胞的来源成为 Treg 细胞临床研究及其应用的首要挑战,因为大量的与受体 MHC 匹配 Treg 细胞是 Treg 过继疗法所必需的,从体外获得足够数量的有治疗意义的 Treg 细胞成为当务之急。

Foxp3 属于叉头样转录因子家族,它主要在 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞中表达,是调控 Treg 分化和行使免疫调节功能的主控基因,可作为 CD4⁺CD25⁺调节性细胞的特异性标志物以及筛选标志。重要的是,Foxp3 高表达转基因小鼠的 Treg 细胞数目显著增加,Foxp3 基因敲除的小鼠则无独立的 Treg 细胞,具有整体免疫失调表现,类似于将具有下调免疫应答作用的共刺激分子 CTLA-4 基因敲除的小鼠体征^[13]。许多研究均证明 Foxp3 在 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞发育、分化上的作用,并且其在 CD4⁺CD25⁺Treg 免疫抑制功能上也起着举足轻重的作用。TGF- β 是一种诱导机体耐受、调节免疫反应的重要的抑制性细胞因子,它诱导初始 T 细胞分化为 Treg 细胞,并能抑制 T 细胞的增殖和作用,是调节性 T 细胞分化、功能维持的关键因子。TGF- β 可诱导初始 CD4⁺CD25⁺T 细胞转化为 CD4⁺CD25⁺T 细胞并表达 Foxp3^[14]。最早的相关研究报道,是利用 mRFP(红色荧光蛋白)标记 Foxp3,转染小鼠后,发现表达 Foxp3 的细胞表达 mRFP。胰岛瞬时表达 TGF- β 转基因的非肥胖性糖尿病(non-obese diabetic, NOD)小鼠,高表达 Foxp3 的 CD4⁺CD25⁺T 细胞的数目增多,糖尿病发生率低。并且,iTreg 细胞过继输入非肥胖性糖尿病小鼠,糖尿病发病也可被抑制。TGF- β 诱导初始 T 细胞分化为 Treg 细胞的过程中,IL-2 可通过 STAT-5 促进 Treg 细胞的分化。IL-2 联合 TGF- β 诱导天然 CD25⁺T 细胞成为 Treg 细胞,在没有 IL-2 情况下,TGF- β 诱导小鼠 T 细胞 Foxp3 的表达与 nTreg 相比明显减少。另外,通过混

合淋巴细胞培养,还发现 IL-2 是 TGF- β 诱导的 Treg 细胞具有抑制功能活性所必需的,中和 IL-2 后会消除 TGF- β 诱导的 Treg 细胞的抑制功能。

因此,本研究采用 TGF- β 诱导的方法获得 iTreg 细胞。加入 IL-2、抗 CD3 单克隆抗体、抗 CD28 单克隆抗体和 B 细胞使 CD4⁺CD25⁻T 淋巴细胞活化,观察了不同浓度 TGF- β 、不同诱导时间条件下,对 Foxp3 表达的影响及 iTreg 细胞的得率。结果显示,应用 TGF- β 在第 2、4、6、8、10 天均能使细胞 Foxp3 蛋白表达升高,最高为 42.10%。iTreg 细胞得率到达高峰后随时间延长而降低。这可能是由于伴随着培养时间的过度,细胞开始出现凋亡^[15]。此外,CD4⁺T 淋巴细胞的增殖可被细胞因子 TGF- β 所抑制,从而 CD4⁺T 淋巴细胞分化为 Treg 细胞过程被抑制。

最佳实验条件下,TGF- β 诱导后得到 iTreg,得率均达 40%以上。Treg 细胞的抑制作用涉及 CD4⁺、CD8⁺T 细胞、B 细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞和单核/巨噬细胞,以及免疫细胞之间的相互联系。本文研究了 iTreg 细胞对 CD4⁺T 淋巴细胞的增殖抑制作用,并对其免疫调节能力进行分析。结果发现,TGF- β 诱导获得的 iTreg 细胞组以及 nTreg 细胞组的 CD4⁺T 淋巴细胞的体外增殖均显著被抑制,说明获得的 Treg 细胞具有免疫抑制功能,其与天然的 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞的表型和功能一致。

已证实 IL-10 的分泌是 iTreg 发挥免疫抑制功能重要细胞因子,而如前述 TGF- β 是调节性 T 细胞分化、功能维持的关键因子。本研究表明,iTreg 细胞 IL-10 和 TGF- β 分泌水平较原始 CD4⁺细胞均显著上升,说明调节性 T 细胞的作用模式,即分泌 IL-10 和 TGF- β 作用于靶细胞,并通过细胞间接触使膜表面分子 CTLA-4 发挥抑制作用。另外,Treg 细胞与 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞之间的区别在于 Treg 细胞不分泌 IL-2、IL-4、IL-17 和 IFN- γ 等细胞因子。通过流式细胞仪检测,iTreg 细胞几乎不分泌上述各种细胞因子。

综上所述,本研究成功建立了 TGF- β 诱导法来获取 iTreg 的方法,优化了实验条件,为研究体外诱导 Treg 提供了有力的方法学证据;进一步研究了 iTreg 细胞的免疫抑制功能及发挥调节作用的初步机制,检测了 iTreg 的细胞因子分泌,为其在临床上应用发展提供坚实的理论基础。

参考文献:

[1] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor

alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol,1995, 155(3):1151

- [2] Canavan J B, Afzali B, Scotti C, et al. A rapid diagnostic test for human regulatory T-cell function to enable regulatory T-cell therapy[J]. Blood, 2012,119(8):e57
- [3] Cao C, Ma T, Chai Y F, et al. The role of regulatory T cells in immune dysfunction during sepsis[J]. World J Emerg Med, 2015,6 (1):5
- [4] Brunkow M E, Jeffery E W, Hjerrild K A, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse[J]. Nat Genet, 2001, 27(1):68
- [5] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3[J]. Science, 2003,299 (569):1057
- [6] Lan Q, Zhou X, Fan H, et al. Polyclonal CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells induce TGF β -dependent tolerogenic dendritic cells that suppress the murine lupus-like syndrome[J]. J Mol Cell Biol, 2012,4(6):409
- [7] Okamura T, Sumitomo S, Morita K, et al. TGF- β 3-expressing CD4⁺ CD25⁻LAG3⁺ regulatory T cells control humoral immune responses[J]. Nat Commun, 2015,6(6):6329
- [8] Alahgholi-Hajibehzad M, Oflazer P, Aysal F, et al. Regulatory function of CD4⁺CD25⁺⁺ T cells in patients with myasthenia gravis is associated with phenotypic changes and STAT5 signaling: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates the suppressor activity[J]. J Neuroimmunol, 2015,281(281):51
- [9] Talaat R M, Mohamed S F, Bassyouni I H, et al. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity[J]. Cytokine, 2015,72(2):146
- [10] Prinz I, Koenecke C. Therapeutic potential of induced and natural FoxP3⁺ regulatory T cells for the treatment of Graft-versus-host disease[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2012,60(3):183
- [11] Burrell B E, Nakayama Y, Xu J, et al. Regulatory T cell induction, migration, and function in transplantation[J]. J Immunol, 2012, 189 (10):4705
- [12] Gonçalves R M, Salmazi K C, Santos B A, et al. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses[J]. Infect Immun, 2010,78(11):4763
- [13] Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self[J]. Nat Immunol, 2005,6(4):345
- [14] Lu L, Ma J, Li Z, et al. All-trans retinoic acid promotes TGF- β -induced Tregs via histone modification but not DNA demethylation on Foxp3 gene locus[J]. PLoS One, 2011,6(9):e24590
- [15] Fantini M C, Becker C, Monteleone G, et al. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7[J]. J Immunol, 2004,172 (9):5149

(2015-03-25 收稿)