

技术与方法

比较体外扩增调节性T细胞的两种方法

刘 钊 罗诗樵*

(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆 400016)

摘要 利用免疫磁珠法(immunomagnetic beads, MACS)从BALB/c小鼠脾脏中分别分离出CD4⁺CD25⁺Tregs(regulatory T cells)和CD4⁺T细胞, CD4⁺CD25⁺Tregs加入anti-CD3/CD28磁珠与1 000 U/mL IL-2体外扩增14 d; CD4⁺T细胞加入anti-CD3/CD28磁珠、100 U/mL IL-2和5 ng/mL重组人源性转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)体外扩增5 d。分析两种方法扩增后Tregs免疫抑制功能及数量。结果显示, 两种方法扩增的Tregs免疫抑制功能无明显差别($P>0.05$), 但是分别从大小相当的BALB/c小鼠脾脏所提取出的细胞中, 通过CD4⁺T细胞扩增5 d可以得到 $(4.9\pm 0.4)\times 10^7$ Tregs, 而通过CD4⁺CD25⁺Tregs扩增14 d只能得到 $(1.9\pm 0.1)\times 10^7$ Tregs($P<0.05$)。结果发现, 通过两种方法扩增得到的Tregs免疫抑制功能无明显差异, 但是通过CD4⁺T细胞扩增Tregs方法所需时间短, 而且得到的细胞数量多。

关键词 调节性T细胞; 扩增; 免疫抑制功能

A Comparison of Two Methods to Expand Regulatory T Cells (Tregs) *In Vitro*

Liu Zhao, Luo Shiqiao*

(Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract CD4⁺CD25⁺Tregs (regulatory T cells) and CD4⁺T cells were isolated from BALB/c spleens by MACS (immunomagnetic beads), respectively. CD4⁺CD25⁺Tregs were cultured for 14 d in 96-well plates coated with anti-CD3/CD28 microbeads in the presence of 1 000 U/mL of IL-2; then CD4⁺T cells were cultured in 24-well plates coated with anti-CD3/CD28 microbeads in the presence of 100 U/mL IL-2 and 5 ng/mL of recombinant human TGF-β (transforming growth factor-β) for 5 d. The immunosuppression and counts of Tregs expanded by the two methods were analyzed. The experiment results showed that there was no obvious difference in immunosuppression between the two methods of expanding Tregs *in vitro* ($P>0.05$), but when used the same size BALB/c mice, we can get $(4.9\pm 0.4)\times 10^7$ Tregs through CD4⁺T cells and only get $(1.9\pm 0.1)\times 10^7$ Tregs through CD4⁺CD25⁺Tregs ($P<0.05$). The result suggested that there was no obvious difference in immunosuppression between the two methods of expanding Tregs, but get more Tregs and take less time through CD4⁺T cells.

Keywords regulatory T cells (Tregs); expansion; immunosuppression

收稿日期: 2014-12-12 接受日期: 2015-02-28

重庆市自然科学基金计划项目(批准号: cstc2013jcyjA10105)和重庆市医学科技计划项目(批准号: 2008-2-02)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-89011016, E-mail: luoshiqiao@hotmail.com

Received: December 12, 2014 Accepted: February 28, 2014

This work was supported by the Chongqing Natural Science Foundation (Grant No.cstc2013jcyjA10105) and Chongqing Bureau of Health Foundation (Grant No.2008-2-02)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89011016, E-mail: luoshiqiao@hotmail.com

网络出版时间: 2015-05-04 17:42 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150504.1742.006.html>

20世纪50年代以来, 移植已经成为器官终末期疾病公认的有效治疗方法^[1]。然而, 移植后排斥反应的发生是导致移植失败的主要原因, 目前虽然已有多种治疗措施, 包括使用皮质类固醇或其他免疫抑制药物来延长移植物的存活时间, 但是移植后患者仍然面临许多问题, 例如慢性排斥反应以及药物相关的各种副作用^[2]。因此, 寻找一种新颖的治疗方法显得尤为重要。

到目前为止, 人们对于调节性T细胞(regulatory T cell, Tregs)的研究已有将近20年的历史。Tregs在免疫调节方面的生物学功能已逐渐被证实。Tregs是高表达CD25和Foxp3分子且依赖IL-2生存的CD4⁺T细胞亚群^[3], 它分为来源于胸腺的天然调节性T细胞(natural regulatory T cells, nTregs)和由传统CD4⁺T细胞经过多种诱导方法诱导或者是天然调节性T细胞体外扩增而来的获得性调节性T细胞(induced regulatory T cells, iTregs)。目前, 已有研究表明, Tregs通过分泌抗炎细胞因子[如转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、IL-10]或通过细胞之间接触[如Tregs表面CTLA-4与抗原呈呈细胞(antigen presenting cells, APCs)表面CD80/CD86], 负向调节免疫反应^[4]。因此, Tregs在维持自身免疫耐受中起着重要作用, 同时也在免疫性疾病、慢性炎症反应、器官移植、肿瘤免疫中扮演着关键角色。

鉴于Tregs在免疫调节方面的重要作用, 研究者们正在探讨将其作为细胞免疫治疗应用于临床的可能性。自2002年Taylor等^[5]发现在动物模型中, 过继输注体外扩增Tregs能够治疗GVHD(graft versus host disease)疾病, 到2009年临床上开始使用体外扩增Tregs治疗GVHD疾病^[6], Tregs作为细胞治疗在治疗移植后排斥反应有了较快的发展。有文献报道, 输注与CD4⁺T细胞数量相当的CD4⁺CD25⁺Tregs能够抑制GVHD疾病, 但是机体内CD4⁺CD25⁺Tregs仅占CD4⁺T细胞的5%~10%, 如此少量的CD4⁺CD25⁺Tregs不足以抑制器官移植后CD4⁺和CD8⁺介导的同种异体T细胞的反应^[7-8]。因此, 获得足量的Tregs是其应用于临床方面的前提。利用anti-CD3/CD28抗体和高浓度IL-2打破Tregs的无反应状态, 是目前主要的体外扩增Tregs的方法。近来也有报道应用新鲜CD4⁺T细胞在给予anti-CD3/CD28抗体和低浓度重组人源性TGF- β 、IL-2条件下, 体外扩增5 d能够得到足量的Tregs^[9]。目前, 尚未有关于这两种方法系统比较的报

道, 本文将比较这两种扩增方法的扩增效率和扩增后Tregs的免疫学特征。

1 材料与方法

1.1 动物

4~6周雄性BALB/c小鼠(购于重庆医科大学实验动物中心), 所有小鼠在SPF级条件下饲养。本研究所涉及的实验动物使用和实验流程均严格遵守重庆医科大学实验动物管理和保护的相关规定。

1.2 细胞培养

37 °C、5% CO₂条件下, 所有细胞培养在含10%胎牛血清(Gibco公司)和100 U/mL青链霉素(碧云天生物技术研究所)的RPMI1640(Gibco公司)完全培养基中。

1.3 CD4⁺CD25⁺Tregs分选及扩增

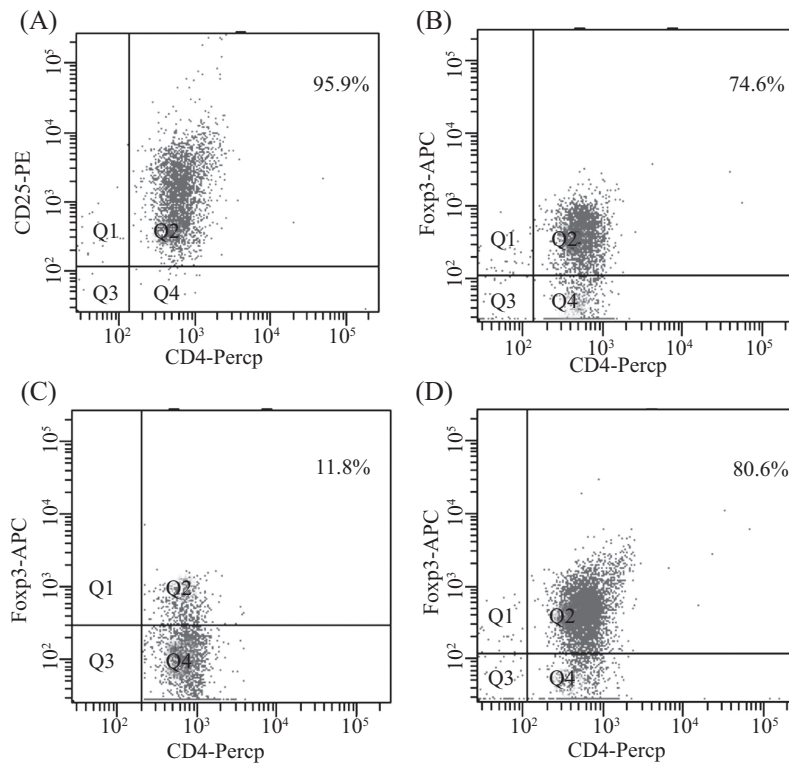
断颈法处死BALB/c小鼠, 取出脾脏, 制备成脾细胞悬液。在裂解红细胞后, 按照CD4⁺CD25⁺Tregs分选试剂盒(Miltenyi Biotec公司)说明书分选CD4⁺CD25⁺Tregs, 即首先通过阴性分选得到CD4⁺细胞, 然后利用阳性分选从已分选出来的CD4⁺细胞中分离出CD25⁺细胞(Miltenyi Biotec公司)。随后将新鲜分离出来的CD4⁺CD25⁺Tregs与anti-CD3/CD28磁珠(Miltenyi Biotec公司)以1:2混合并给予1 000 U/mL IL-2(Sigma公司)体外扩增14 d。14 d后, 流式细胞术检测细胞纯度及免疫抑制功能。

1.4 CD4⁺T细胞分选及体外扩增

按照上面的方法处死BALB/c小鼠, 取出脾脏, 制备成脾细胞悬液。在裂解红细胞后, 按照CD4⁺T细胞分选试剂盒(Miltenyi Biotec公司)说明书分选CD4⁺T细胞, 即阳性分选出CD4⁺T细胞。然后将CD4⁺T细胞与anti-CD3/CD28磁珠以1:2在含100 U/mL IL-2(Sigma公司)和5 ng/mL重组人源性TGF- β (RD) 24孔板内培养5 d。5 d后, 流式细胞仪(B&D公司)检测细胞纯度及免疫抑制功能。

1.5 体外抑制试验

利用CFSE(Sigma公司)标记通过CD4⁺CD25⁺Tregs分选试剂盒分选出来的CD4⁺CD25⁺T细胞检测Tregs的免疫抑制功能, 5×10⁵ CFSE标记CD4⁺CD25⁺T细胞与未被标记Tregs按1:1或者1:2的比例培养在24孔板内, 并加入1×10⁶ anti-CD3/CD28磁珠。3 d后, 收获细胞并用流式细胞仪检测, Modfit LT软件(Verity software House)分析数据。



A: 新鲜分离CD4⁺CD25⁺Tregs中CD4⁺CD25⁺的百分比; B: CD4⁺CD25⁺Tregs扩增后Tregs中CD4⁺Foxp3⁺的百分比; C: 新鲜分离的CD4⁺T细胞中CD4⁺Foxp3⁺的百分比; D: CD4⁺T细胞扩增后Tregs中CD4⁺Foxp3⁺的百分比。

A: the CD4⁺CD25⁺ percentage of fresh CD4⁺CD25⁺Tregs; B: the CD4⁺Foxp3⁺ percentage of Tregs expanded from CD4⁺CD25⁺T cells; C: the CD4⁺Foxp3⁺ percentage of fresh CD4⁺T cells; D: the CD4⁺Foxp3⁺ percentage of Tregs expanded from CD4⁺T cells.

图1 流式细胞术检测Tregs纯度

Fig.1 The purity of Tregs tested by flow cytometry

1.6 流式细胞术检测

单个细胞重悬在FACS缓冲液(PBS+1%胎牛血清+0.1%叠氮钠)中。首先标记表面抗原, 分别加入CD4-Percp(B&D公司)、CD4-APC(B&D公司)、CD3-FITC(B&D公司)、CD25-PE(B&D公司), 4 °C避光孵育45 min。下一步标记核内抗原, 将细胞清洗后加入Foxp3固定破膜穿透液, 4 °C避光孵育3 h, 清洗之后加入Anti-Mouse/Rat Foxp3 APC(eBioscience), 4 °C避光孵育45 min, 清洗细胞后准备上机。FACS Aria流式细胞仪(B&D公司)检测细胞, FACSDiva软件(B&D公司)处理数据。

1.7 统计学分析

采用SPSS17.0统计软件分析, 两组间比较采用t检验分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

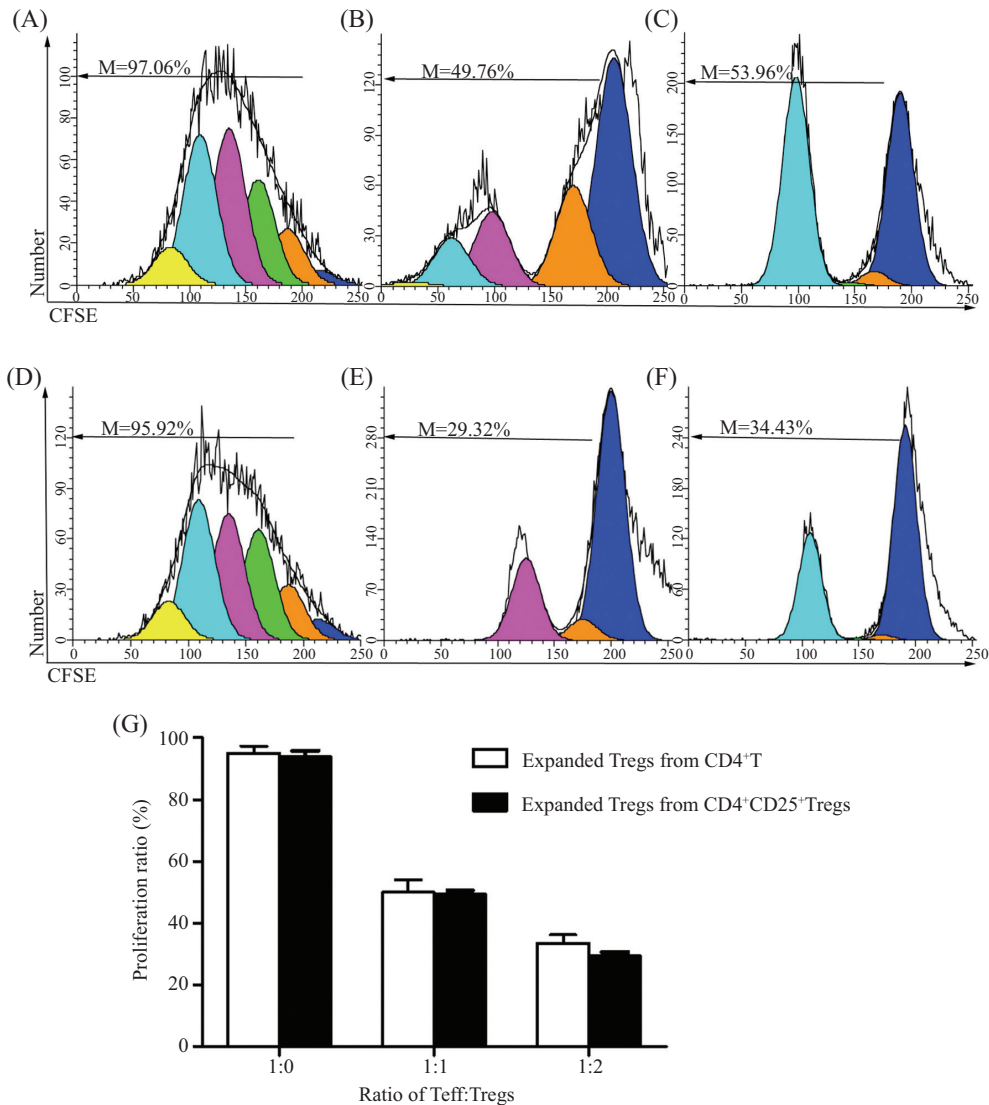
2.1 Tregs纯度检测

利用免疫磁珠法, 我们能够从正常BALB/c小

鼠脾脏得到纯度超过95%的CD4⁺CD25⁺Tregs, 体外给予anti-CD3/CD28磁珠和1 000 U/mL IL-2刺激细胞增殖, 连续扩增14 d后得到纯度超过74%的CD4⁺Foxp3⁺Tregs, 而新鲜分离的CD4⁺T细胞在给予anti-CD3/CD28磁珠、100 U/mL IL-2和5 ng/mL重组人源性TGF- β 培养5 d后能够得到纯度超过80%的CD4⁺Foxp3⁺Tregs(图1)。

2.2 体外扩增后Tregs免疫抑制功能检测

以CFSE(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)标记的CD4⁺CD25⁺T细胞作为效应T细胞(effector T cell, Teff), 采用混合淋巴细胞培养检测扩增后Tregs的免疫抑制功能, 在体外给予anti-CD3/CD28磁珠的刺激下, 分别把CD4⁺T细胞扩增后Tregs与CD4⁺CD25⁺Tregs扩增后Tregs按照1:1、2:1的比例与效应T细胞混合培养, 并设置对照组。Teff与Tregs比例为1:1、1:2时, 两组Tregs显示出相似的抑制作用, 差别无统计学意义(43.1% vs 47.3%, $P > 0.05$; 61.49% vs 66.6%, $P > 0.05$)(图2)。



A: 仅有磁珠刺激下, Teff增殖比例; B: 在给予磁珠刺激下, Teff:CD4⁺T扩增后Tregs=1:1时, Teff增殖比例; C: 在给予磁珠刺激下, Teff:CD4⁺T扩增后Tregs=1:2时, Teff增殖比例; D: 仅有磁珠刺激下, Teff增殖比例; E: 在给予磁珠刺激下, Teff:CD4⁺CD25⁺T扩增后Tregs=1:1时, Teff增殖比例; F: 在给予磁珠刺激下, Teff:CD4⁺CD25⁺T扩增后Tregs=1:2时, Teff增殖比例; G: 不同比例混合淋巴细胞培养细胞增殖百分比统计图。M: Teff增殖比例。

A: the proliferation of Teff when stimulated by anti-CD3/CD28 microbeads; B: the proliferation of Teff when coculturing Teff and Tregs expanded from CD4⁺T cells at the ratio of 1:1 in the presence of anti-CD3/CD28 microbeads; C: the proliferation of Teff when cocultured Teff and Tregs expanded from CD4⁺T cells at the ratio of 1:2 in the presence of anti-CD3/CD28 microbeads; D: the proliferation of Teff when stimulated by anti-CD3/CD28 microbeads; E: the proliferation of Teff when coculturing Teff and Tregs expanded from CD4⁺CD25⁺T cells at the ratio of 1:1 in the presence of anti-CD3/CD28 microbeads; F: the proliferation of Teff when coculturing Teff and Tregs expanded from CD4⁺CD25⁺T cells at the ratio of 1:2 in the presence of anti-CD3/CD28 microbeads; G: the histogram of Teff proliferation in different ratio. M: the proliferation ratio of Teff.

图2 扩增后Tregs免疫抑制功能的检测

Fig.2 Suppressive ability detection of expanded Tregs

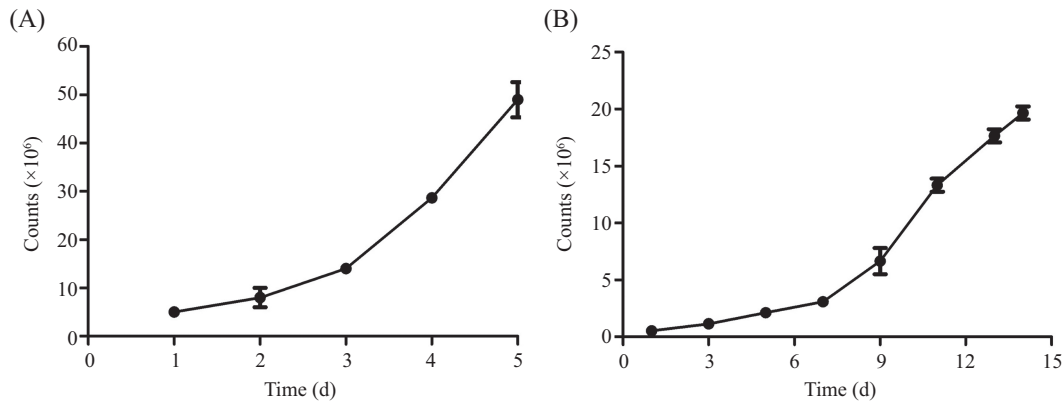
2.3 两种扩增方法的细胞生长曲线

利用CD4⁺CD25⁺Tregs分选试剂盒从一只正常BALB/c小鼠得到约 5×10^5 CD4⁺CD25⁺Tregs, 经过14 d体外扩增, 收集获得 $(1.9 \pm 0.1) \times 10^7$ Tregs。而使用CD4⁺T分选试剂盒从同样大小的BALB/c小鼠中分离出大约 5×10^6 CD4⁺T细胞, 经过5 d扩增, 得到

$(4.9 \pm 0.4) \times 10^7$ Tregs, 与第一种方法相比, 第二种方法得到的Tregs数量明显增多($P < 0.05$)(图3)。

2.4 比较两种扩增方法扩增后Tregs细胞活力

利用CD4⁺CD25⁺Tregs分选试剂盒分选出来的细胞经过体外扩增, 收集细胞, 检测其活力为 $66\% \pm 3\%$ 。而使用CD4⁺T分选试剂盒分选出来的

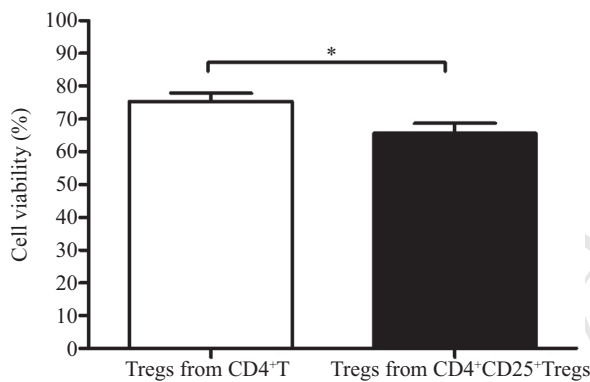


A: CD4⁺T扩增后Tregs生长曲线; B: CD4⁺CD25⁺Tregs扩增后Tregs生长曲线。

A: the cell growth curve of expanded Tregs from CD4⁺T cells; B: the cell growth curve of expanded Tregs from CD4⁺CD25⁺T cells.

图3 两种扩增方法的细胞生长曲线

Fig.3 Cells growth curve of two amplification methods



* $P < 0.05$.

图4 扩增后Tregs细胞活力的检测

Fig.4 Cells vitality detection of expanded Tregs

CD4⁺T细胞经过体外扩增, 得到的细胞活力为75%±3%。与第一种方法相比, 第二种方法得到的Tregs细胞活力较强(75%±3% vs 66%±3%, $n=3$, $P < 0.05$)(图4)。

3 讨论

Tregs在控制机体自身免疫性疾病及维持移植后免疫耐受发挥的重要作用, 引发了人们将其应用于临床治疗的设想。足量免疫学功能正常的Tregs是其在器官移植领域广泛应用的前提条件之一, 但是, Tregs在外周血及淋巴组织含量极低(仅占CD4⁺T细胞的5%~10%), 极大地限制了Tregs作为细胞免疫治疗的发展前景。因此, 体外扩增是解决这个矛盾的方法之一。本研究采用两种方法体外扩增Tregs, 第一种方法, 即使用CD4⁺CD25⁺Tregs分选试剂盒,

先阴性分选得到CD4⁺细胞, 然后利用阳性分选从已分选出来的CD4⁺细胞中分离出CD25⁺细胞, 将得到的CD4⁺CD25⁺细胞在anti-CD3/CD28和高浓度IL-2条件下体外扩增14 d; 第二种方法是利用CD4⁺T分选试剂盒, 一步直接阳性分选出CD4⁺T细胞, 在anti-CD3/CD28和低浓度的重组人源性TGF- β 、IL-2的条件下体外扩增5 d。通过比较两种扩增方法, 我们发现利用第一种方法我们得到约 $(1.9 \pm 0.1) \times 10^7$ Tregs, 利用第二种方法能够得到约 $(4.9 \pm 0.4) \times 10^7$ Tregs, 而且第二种方法分离细胞耗费时间(3 h vs 6 h)和扩增时间都明显要短(5 d vs 14 d), 收获的细胞活性也更高。同时, 第二种方法所用的IL-2仅为前者的1/10, 大大降低了扩增成本。因此, 我们认为, 采用第二种体外扩增Tregs的方法对于推广Tregs在临床上广泛应用具有重大意义。

综上所述, 相比于传统方法即体外给予anti-CD3/CD28抗体和高浓度IL-2扩增新鲜分选的CD4⁺CD25⁺Tregs, 采用anti-CD3/CD28抗体和低浓度的重组人源性TGF- β 、IL-2体外扩增CD4⁺T细胞的优点显而易见。这可能是TGF- β 在扩增Tregs时发挥着重大作用。TGF- β 是一种能够调节T细胞生长和发展的多功能细胞因子, 它能够抑制IL-2分泌, 上调抑制因子的相互接触, 阻碍CD4⁺T细胞的增殖^[10-11]。TGF- β 还能诱导Th3细胞和Tr1细胞的分化^[12-13]。目前已经有研究报道, TGF- β 在Tregs的产生和扩增中发挥着一定的作用^[14], 但是具体机制还不清楚。这些实验线索为我们的后续研究提供了理论基础, 我们将继续在以后的研究中努力寻找答案。

参考文献 (References)

- 1 Vanikar A. Transplantation tolerance; myth or reality? *J Nephro-pathol* 2014; 3(1): 18-21.
- 2 Tan X, Zeng H, Jie Y, Zhang Y, Xu Q, Pan Z. CD154 blockade modulates the ratio of Treg to Th1 cells and prolongs the survival of allogeneic corneal grafts in mice. *Exp Ther Med* 2014; 7(4): 827-34.
- 3 Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtis J, *et al.* Infusion of *ex vivo* expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: Safety profile and detection kinetics. *Blood* 2011; 117(3): 1061-70.
- 4 Cai SF, Cao X, Hassan A, Fehniger TA, Ley TJ. Granzyme B is not required for regulatory T cell-mediated suppression of graft-versus-host disease. *Blood* 2010; 115(9): 1669-77.
- 5 Pu LY, Wang XH, Zhang F, Li XC, Yao AH, Yu Y, *et al.* Adoptive transfusion of *ex vivo* donor alloantigen-stimulated CD4⁺CD25⁺regulatory T cells ameliorates rejection of DA-to-Lewis rat liver transplantation. *Surgery* 2007; 142(1): 67-73.
- 6 Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, Dobyszek A, Krzystyniak A, Marek N, *et al.* First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human *ex vivo* expanded CD4⁺CD25⁺CD127⁺T regulatory cells. *Clin Immunol* 2009; 133(1): 22-6.
- 7 Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of *ex vivo* activated and expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002; 99(10): 3493-9.
- 8 Nikouejad H, Amirzargar A, Sarrafnejad A, Einollahi B, Nafar M, Ahmadpour P, *et al.* Dynamic changes of regulatory T cell and dendritic cell subsets in stable kidney transplant patients: A prospective analysis. *Iran J Kidney Dis* 2014; 8(2): 130-8.
- 9 Pilat N, Farkas AM, Mahr B, Schwarz C, Unger L, Hock K, *et al.* T-regulatory cell treatment prevents chronic rejection of heart allografts in a murine mixed chimerism model. *J Heart Lung Transplant* 2014; 33(4): 429-37.
- 10 Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2004; 15(5): 2436-48.
- 11 Tiemessen MM, Kunzmann S, Schmidt-Weber CB, Garssen J, Bruijnzeel-Koomen CA, Knol EF, *et al.* Transforming growth factor-beta inhibits human antigen-specific CD4⁺ T cell proliferation without modulating the cytokine response. *Int Immunol* 2003; 15(12): 1495-504.
- 12 Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 207-14.
- 13 Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002; 129(4): 263-76.
- 14 Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4⁺ CD25⁺ and CD8⁺ regulatory T cell subsets. *J Leukoc Biol* 2004; 74(4): 471-8.