

· 论著 ·

不同细胞刺激剂对小鼠调节性 T 细胞功能活化的影响

张莹 姚咏明 常青 董宁

【摘要】 目的 研究体外实验中不同细胞刺激剂对小鼠调节性 T 细胞(Treg)表面 T 淋巴细胞毒性相关抗原-4(CTLA-4)及叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3)表达的影响,并对不同细胞刺激剂在 Treg 抑制活性发挥中的作用进行比较。**方法** 免疫磁珠法分离健康清洁级 BALB/c 小鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺Treg。采用植物凝集素(PHA, 20 mg/L)、刀豆蛋白 A(ConA, 5 g/L)及固相包被抗 CD3(1 mg/L)刺激 Treg,观察刺激后 24、48 和 72 h CTLA-4 及 Foxp3 表达的时间-效应关系。**结果** PHA 刺激对小鼠 Treg 细胞表面 CTLA-4 及 Foxp3 表达均无显著影响($P > 0.05$);而 ConA 表现出一过性的 Treg 活化作用,24 h CTLA-4 表达明显上调($P < 0.01$),但随刺激时间延长作用减弱,48 h 和 72 h 后其表达已接近未刺激前的范围,同时 ConA 未能明显诱导 Foxp3 表达($P > 0.05$);抗 CD3 可有效刺激 Treg 活化,在 24、48 和 72 h CTLA-4 及 Foxp3 表达均明显上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中以作用 24 h 和 48 h 表达上调尤为显著($P < 0.01$)。**结论** 抗 CD3 在体外实验中能明显刺激 Treg 活化并诱导其抑制性相关分子 CTLA-4 及 Foxp3 的表达,为进一步探讨 CD4⁺CD25⁺Treg 的免疫调节效应提供了可能。

【关键词】 调节性 T 细胞; T 淋巴细胞毒性相关抗原 4; 叉头翼状螺旋转录因子; 抗 CD3

Influence of different cyto-stimuli on immunological activity of splenic regulatory T cells in mice

ZHANG Ying*, YAO Yong-ming, CHANG Qing, DONG Ning.* Department of Gynaecology and Obstetrics, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: YAO Yong-ming (Email: c_ff@sina.com)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and intranuclear forkhead/winged helix transcription factor p3 (Foxp3) of splenic regulatory T cells (Tregs) in mice, and compare the effects of different stimuli on the immunological activity of Tregs. **Methods** CD4⁺CD25⁺Tregs isolated from the spleens of male BALB/c mice by magnetic beads were seeded on 96-well (1×10^5 cells/well) cell culture plates supplemented with phytohemagglutinin (PHA, 20 mg/L), concanavalin A (ConA, 5 g/L) or coated with anti-CD3 (1 mg/L). After being stimulated with different stimuli for various length of time, the expressions of CTLA-4 and Foxp3 molecules of Tregs were determined. The time-dependent responses between different stimuli and CTLA-4 as well as Foxp3 were analyzed by means of flow cytometry. **Results** After stimulation with PHA, the CTLA-4 expressions on surface of mice splenic Tregs and intranuclear Foxp3 molecules were unchanged (both $P > 0.05$). In ConA-treated group, the expression of CTLA-4 was significantly up-regulated at 24 hours ($P < 0.01$), while the CTLA-4 expression returned to the control range at 48 and 72 hours. The expression of Foxp3 was not markedly different between ConA-treated group and controls. When treated with plate-bound anti-CD3, both CTLA-4 and Foxp3 expressions were significantly up-regulated at 24, 48 and 72 hours ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), especially at 24 and 48 hours (all $P < 0.01$). **Conclusion** These data indicated that various stimuli can result in different modulatory responses of the CTLA-4 and Foxp3 expressions in mice splenic Tregs. Anti-CD3 appears to be an effective immunoregulatory signal that influences the activation of CD4⁺CD25⁺Tregs.

【Key words】 regulatory T cell; cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4; forkhead/winged helix transcription factor; anti-CD3

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(2005CB522602);
国家杰出青年科学基金资助项目(30125020);国家自然科学基金资助项目(30672178)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学附属西南医院妇产科(张莹,常青);100037 北京,解放军总医院第一附属医院(原解放军第三〇四医院)全军烧伤研究所(姚咏明,董宁)

通讯作者:姚咏明,教授,博士生导师(Email:c_ff@sina.com)

作者简介:张莹(1973-),女(汉族),河北省人,医学硕士,主治医师,主要从事创伤感染与免疫的研究。

CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Tregs)在自身免疫性疾病、移植耐受、肿瘤免疫、感染性疾病及脓毒症等方面的作用日益受到关注^[1]。Treg 具有免疫无能性和免疫抑制性两大特性^[2],其免疫反应的许多特征都不同于其他 T 细胞亚群。在体外实验中观察这群细胞的方法也有不同。T 淋巴细胞毒性相关抗原-4(CTLA-4, 又称 CD152)是 Treg 发挥细胞抑

制功能的重要膜表面分子,叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3)基因及其蛋白产物的表达更是 Treg 活性发挥的关键^[3]。就 Treg 而言,细胞活化后 CTLA-4 及 Foxp3 表达即明显上调^[4]。本研究观察体外实验中不同细胞刺激剂对小鼠 Treg 细胞表面 CTLA-4 及 Foxp3 表达的影响,并对不同细胞刺激剂在 Treg 抑制活性发挥中的作用进行比较。

1 材料与方法

1.1 实验材料:雄性健康清洁级 BALB/c 小鼠均购自中国医学科学院实验动物中心,体重(20±2)g。RPMI1640 培养基购自北京天润善达生物有限公司;胎牛血清(FCS)购自天海生物有限公司;植物凝集素(PHA)、刀豆蛋白 A(ConA)均购自 Sigma 公司;功能纯化级抗小鼠 CD3 购自 eBioscience 公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗小鼠 CTLA-4 试剂盒购自 Southern Biotech Associates;FITC 标记的抗小鼠 Foxp3 试剂盒购自 eBioscience 公司;Mini MACS 免疫磁性分离仪购自德国 Miltenyi Biotec 公司;流式细胞仪(FACS Calibur, 美国 BD 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠脾细胞分离及单个核细胞制备:小鼠断颈处死后取脾脏,置于平皿中,加入 3~5 ml 磷酸盐缓冲液(PBS),用 1 ml 注射器活塞研磨,400 目滤网滤过 2 次;收集细胞悬液,注入尖体离心管中;加入溶血素至 15 ml,混匀后静置 10 min,2 000 r/min (离心半径 8 cm)离心 10 min,弃上清液,再加 15 ml PBS,离心洗涤 2 次,弃上清液,取下层细胞。

1.2.2 磁珠孵育和磁性分选:采用 MiniMACS 免疫磁性分离系统进行两步分离,步骤:①每 10⁷ 细胞加入 10 μl 生物素(Biotin)抗体,4 ℃ 孵育 10 min,再加入 20 μl 抗-Biotin 磁珠,10 μl 藻红蛋白(PE)标记的抗 CD25 抗体,4 ℃ 孵育 15 min,离心洗涤。细胞定容至 0.5 ml,经 LD 柱阴性选择后收集流出细胞悬液,离心洗涤,弃上清液,获取 CD4⁺T 细胞。②每 10⁷ 细胞加入 10 μl 抗-PE 磁珠,4 ℃ 孵育 15 min,离心洗涤。经 MS 柱进行第二步分选,收集流出细胞悬液为 CD4⁺CD25⁻T 细胞。将分离柱移出磁场,加压洗脱,收集并计数细胞。用体积分数为 10% 的 FCS-RPMI1640 完全培养基重悬 Treg,调整细胞密度为 1×10⁹/L,接种于 96 孔细胞培养板。

1.2.3 Treg 细胞表面 CTLA-4 及核内 Foxp3 表达情况:收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤细胞,加入 100 μl PBS 重悬细胞,直接加入 FITC 标记的抗小鼠 CTLA-4。再次收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤细

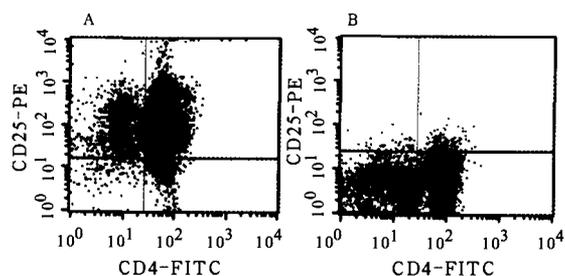
胞,加入 100 μl PBS 重悬细胞,按 Foxp3 试剂盒说明将细胞破膜剂稀释 4 倍,每 10⁶ 细胞加入 1 ml,破膜时间为 2 h,破膜缓冲液洗涤 2 次,加入 100 μl PBS 重悬细胞,加入 FITC 标记的抗小鼠 Foxp3,4 ℃ 孵育 30 min。PBS 洗涤 2 次后将细胞悬浮于 PBS 中,通过 FACS 检测。

1.2.4 PHA、ConA 和抗 CD3 对 Treg 细胞表面 CTLA-4、Foxp3 表达的时间-效应关系:48 孔细胞随机分为 3 组,分别给予 PHA(20 mg/L)、ConA(5 g/L)、96 孔板固相包被抗 CD3(1 mg/L)刺激;不同刺激组又分为 24、48 和 72 h 3 个亚组,每个亚组 4 孔,余各 4 孔设为正常对照组。采用 FACS 分析 CTLA-4 和 Foxp3 的表达情况。

1.3 统计学处理:采用 CELLQUEST 数据分析软件进行分析。各组标准化样本数值用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS12.0 统计软件包对数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠 CD4⁺CD25⁺和 CD4⁺CD25⁻的 Treg 纯度分析:多次细胞分选实验显示,正常小鼠脾脏单个核细胞经 MiniMACS 两次分选后,CD4⁺CD25⁺T 细胞纯度平均达到 96% 以上(图 1A),其中 CD25⁻细胞 < 1%;CD4⁺CD25⁻T 细胞纯度平均达到 92% 以上(图 1B),其中 CD25⁺细胞 < 3%。所获得 CD4⁺CD25⁺T 细胞经苔盼蓝检测活性 > 97%。



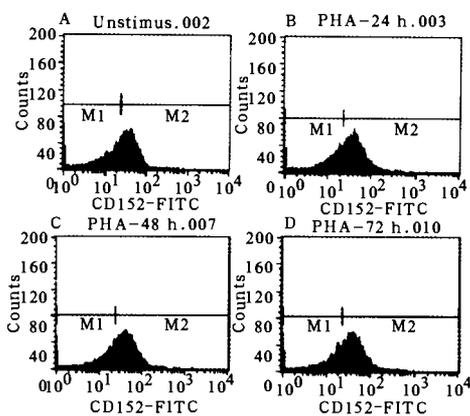
A: CD4⁺CD25⁺T 细胞; B: CD4⁺CD25⁻T 细胞

图 1 小鼠 CD4⁺CD25⁺和 CD4⁺CD25⁻的 Treg 纯度分析

Figure 1 Purification analysis of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ Tregs in mice

2.2 PHA、ConA 及抗 CD3 与 Treg 细胞表面 CTLA-4 表达的时间-效应关系(表 1, 图 2~4):与正常对照组(刺激前)比较,加入 PHA 刺激后 24、48 和 72 h CTLA-4 表达的平均荧光强度差异均无显著性。ConA 刺激后 24 h CTLA-4 表达明显上调($P < 0.01$),48 h 和 72 h CTLA-4 表达接近正常对照值范围,差异则均无显著性。96 孔板固相包被抗 CD3 刺激 24、48 和 72 h CTLA-4 表达均显著上

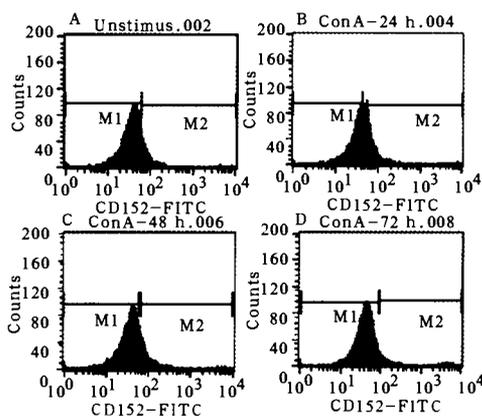
调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中 24 h 和 48 h CTLA-4 表达上调尤为明显(P 均 < 0.01)。



A: 刺激前; B: 刺激 24 h; C: 刺激 48 h; D: 刺激 72 h

图 2 PHA 刺激对小鼠 Treg 细胞表面 CTLA-4 表达的影响

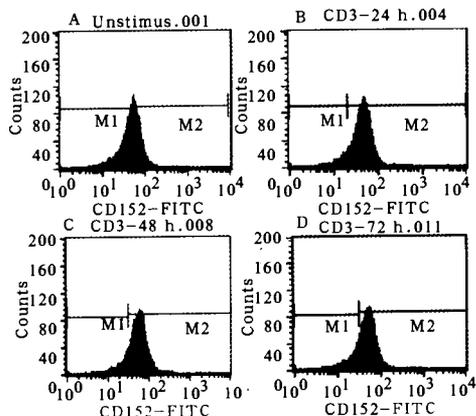
Figure 2 Effect of PHA on CTLA-4 expression of Tregs in mice



A: 刺激前; B: 刺激 24 h; C: 刺激 48 h; D: 刺激 72 h

图 3 ConA 刺激对 Treg 细胞表面 CTLA-4 表达的影响

Figure 3 Effect of ConA on CTLA-4 expression of Tregs in mice



A: 刺激前; B: 刺激 24 h; C: 刺激 48 h; D: 刺激 72 h

图 4 抗 CD3 刺激对 Treg 细胞表面 CTLA-4 表达的影响

Figure 4 Effect of anti-CD3 on CTLA-4

expression of Tregs in mice

2.3 PHA、ConA 及抗 CD3 与 Treg 细胞表面 Foxp3 表达的时间-效应关系(表 2, 图 5~7); 加入 PHA 及 ConA 刺激后 24、48 和 72 h Foxp3 表达

较正常对照组(刺激前)差异均无显著性(P 均 > 0.05)。96 孔板固相包被抗 CD3 刺激后 24、48 和 72 h Foxp3 表达均显著上调, 其中 24 h 和 48 h Foxp3 表达上调更为明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 不同刺激剂对小鼠 Treg 细胞表面 CTLA-4 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 1 Effect of different stimuli on CTLA-4 expression of Tregs in mice ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	刺激前	刺激 24 h	刺激 48 h	刺激 72 h
PHA 组	67.87±4.58	70.37±8.77	66.13±5.21	69.21±4.09
ConA 组	50.53±3.74	72.18±2.59*	55.59±4.32	45.74±1.98
抗 CD3 组	92.35±9.18	157.20±15.22**	134.84±17.06**	116.23±11.84*

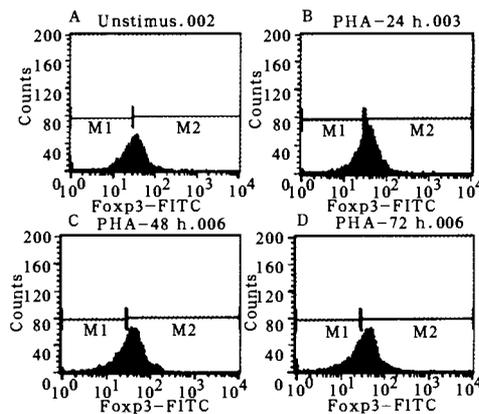
注: 与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 不同刺激剂对小鼠 Treg 细胞表面 Foxp3 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Effect of different stimuli on Foxp3 expression of Tregs in mice ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	刺激前	刺激 24 h	刺激 48 h	刺激 72 h
PHA 组	38.57±3.77	37.13±2.89	36.89±4.62	33.08±3.64
ConA 组	66.06±6.47	69.07±11.18	70.59±6.65	58.79±8.20
抗 CD3 组	78.75±8.12	118.26±10.48**	106.54±6.33**	92.17±7.29*

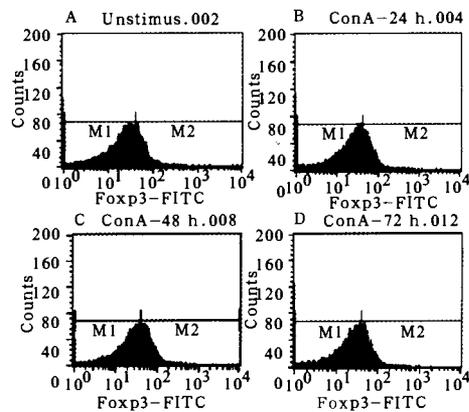
注: 与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$



A: 刺激前; B: 刺激 24 h; C: 刺激 48 h; D: 刺激 72 h

图 5 PHA 刺激对 Treg 细胞表面 Foxp3 表达的影响

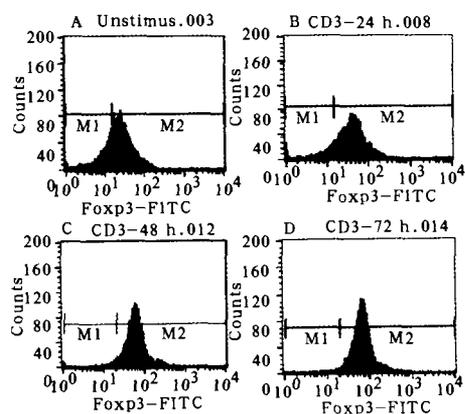
Figure 5 Effect of PHA on Foxp3 expression of Tregs in mice



A: 刺激前; B: 刺激 24 h; C: 刺激 48 h; D: 刺激 72 h

图 6 ConA 刺激对 Treg 细胞表面 Foxp3 表达的影响

Figure 6 Effect of ConA on Foxp3 expression of Tregs in mice



A: 刺激前; B: 刺激 24 h; C: 刺激 48 h; D: 刺激 72 h

图 7 抗 CD3 刺激对 Treg 细胞表面 Foxp3 表达的影响

Figure 7 Effect of anti-CD3 on Foxp3 expression of Tregs in mice

3 讨论

CD4⁺CD25⁺Treg 在正常人和小鼠外周血和脾组织 CD4⁺T 细胞中仅占 5%~10%，但由于其特殊的免疫无反应性及免疫抑制性，使得这群细胞得以从抑制性 T 细胞中分离出来，被认为是独立的 T 细胞亚群。在影响 CD4⁺CD25⁺Treg 存活及功能发挥的诸多细胞因子中，CTLA-4 被认为是 Treg 细胞表面介导接触抑制的重要膜分子，阻断 CTLA-4 或其 Fab 段分子能够逆转 CD4⁺CD25⁺Treg 的抑制效应^[5]。而 Foxp3 则因其直接影响 Treg 表型及功能活性的发挥，近年来更成为 Treg 研究中的焦点^[6]。当 Treg 活化后，CTLA-4 及 Foxp3 表达增强，因此本实验将二者作为反映 Treg 活性的指标，观察不同细胞刺激剂 (PHA、ConA 和抗 CD3) 在体外实验中对 Treg 细胞功能活化的影响，从而为进一步的体外实验奠定了基础。

本实验结果显示，PHA 对于 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞无明显活化作用，既未能诱导 CTLA-4 表达，亦未能上调 Foxp3 表达，与正常对照组比较平均荧光强度差异均无显著性。而 ConA 可以刺激 Treg 细胞表面 CTLA-4 的表达，但仅表现为一过性，作用持续时间不长，48 h 时已降至正常对照组水平，而 72 h 时甚至还略有下降。同时，ConA 刺激在不同时间点上对于 Foxp3 的表达也没有明显影响，由此说明 ConA 并不能有效地活化 Treg 细胞。由于 ConA 作用时间短，无法满足进一步实验的要求。而固相包被的抗 CD3 则能够较好地活化 Treg 细胞，表现为 CTLA-4 及 Foxp3 表达在 24~72 h 均明显增强，且在 24 h 和 48 h 时诱导表达上调更明显，并可延续至刺激后 72 h，说明抗 CD3 对 Treg 有较强的辅助活化作用，这为进一步的体外观察提供了可能。

对于 T 细胞而言，在体外实验中很多情况下需要用刺激剂辅助活化，如丝裂原 PHA、ConA 等，主要是诱导 T 淋巴细胞增殖，但近年来更趋向于使用抗 CD3。CD3 分子是 T 细胞表面众多 CD 分子中尤为重要的一种，它与 T 细胞表面的 T 细胞受体 (TCR) 组成 TCR-CD3 复合体，在抗原识别和免疫信号转导过程中具有重要作用。利用抗 CD3 抗体可以激发 T 细胞活化信号转导，诱导 Treg 细胞活化，该反应同抗原与 TCR 特异性结合后引起 T 细胞活化的过程很相似。通过体内实验研究发现，经抗 CD3 单克隆抗体诱导耐受的小鼠体内效应性致病 T 细胞显著减少，而 Treg 细胞明显增多^[7]。近年来，人们开始尝试应用 T 细胞 CD 抗原 (如 CD3、CD4、CD8 等) 单克隆抗体治疗相关性疾病，亦有临床试验证实，抗 CD3 具有明显诱导特异性免疫耐受的作用^[8]，而这种免疫耐受主要是由 Treg 细胞所介导^[9]。虽然本实验通过 Treg 细胞抑制功能相关性分子的检测证明了抗 CD3 可以在体外有效活化 CD4⁺CD25⁺Treg，但关于抗 CD3 抗体在体内外试验及临床治疗中如何诱导 Treg 细胞增加，如何介导免疫抑制的确切机制仍不清楚，有待于进一步探讨^[10]。

参考文献:

- 1 张莹, 姚咏明. 调节性 T 细胞与脓毒症关系的研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(11): 695-697.
- 2 Zheng S G, Meng L, Wang J H, et al. Transfer of regulatory T cells generated ex vivo modifies graft rejection through induction of tolerogenic CD4⁺CD25⁺ cells in the recipient [J]. Int Immunol, 2006, 18(2): 279-289.
- 3 Fehervari Z, Sakaguchi S. Development and function of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells [J]. Curr Opin Immunol, 2004, 16(2): 203-208.
- 4 Zheng S G, Wang J H, Stohl W, et al. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce Foxp3 and generate adaptive CD4⁺CD25⁺ regulatory cells [J]. J Immunol, 2006, 176(6): 3321-3329.
- 5 Read S, Greenwald R, Izcue A, et al. Blockade of CTLA-4 on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells abrogates their function in vivo [J]. J Immunol, 2006, 177(7): 4376-4383.
- 6 Fontenot J D, Rudensky A Y. A well adapted regulatory contrivance, regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3 [J]. Nat Immunol, 2005, 6(4): 331-337.
- 7 Chatenoud L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside [J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(2): 123-132.
- 8 Le Gall F, Reusch U, Moldenhauer G, et al. Immunosuppressive properties of anti-CD3 single chain Fv and diabody [J]. J Immunol Methods, 2004, 285(1): 111-127.
- 9 June C H, Blazar B R. Clinical application of expanded CD4⁺25⁺ cells [J]. Semin Immunol, 2006, 18(2): 78-88.
- 10 D'Ambrosio D. Regulatory T cells: how do they find their space in the immunological arena [J]? Semin Cancer Biol, 2006, 16(2): 91-97.

(收稿日期: 2007-01-29)

(本文编辑: 李银平)