

小鼠腹腔巨噬细胞对调节性 T 细胞体外诱导的影响

王坤鹏,古 鉴,倪绪皓,赵 洁,汪 瀚,吕 凌*

(南京医科大学第一附属医院肝脏外科,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨不同亚型的腹腔巨噬细胞对调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)体外诱导过程的影响及可能机制。**方法:**按 Treg 的不同诱导条件,分为不加巨噬细胞的正常 Treg 诱导组(noM 组)、原代巨噬细胞影响组(M0 组)、M1 型巨噬细胞影响组(M1 组)、M2 型巨噬细胞影响组(M2 组)。采用流式细胞术检测不同诱导条件下 Foxp3 表达以及效应性 T 细胞增殖情况,HE 染色检测不同条件诱导的 Treg 处理肝脏缺血再灌注模型小鼠的肝脏病理,全自动生化分析仪分析各组小鼠血清 ALT 水平。**结果:**与 noM 组相比,M0 组与 M2 组诱导 Foxp3 表达明显降低($P < 0.01$),而 M1 组对 Foxp3 诱导无明显影响。此外,M0 与 M2 组 Treg 体外抑制功能以及体内保护功能明显低于 noM 和 M1 组($P < 0.01$),而这种作用的实现依赖细胞之间的接触性作用($P < 0.05$)。**结论:**腹腔巨噬细胞能够影响 Treg 的体外诱导,不同亚型腹腔巨噬细胞对 Treg 影响不同,共同为机体免疫平衡发挥着关键性作用。

[关键词] 调节性 T 细胞;巨噬细胞;免疫平衡;缺血再灌注

[中图分类号] R392.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)09-1063-05

doi:10.7655/NYDXBNS20160908

Effect of peritoneal macrophages on regulating the induction of murine regulatory T cells

Wang Kunpeng, Gu Jian, Ni Xuhao, Zhao Jie, Wang Han, Lü Ling*

(Liver Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of different macrophage subtypes on the induction process of regulatory T cells(Tregs). **Methods:** The cells was divided into the normal group(noM group), the primary macrophages effect group (M0 group), the M1 effect group (M1 group) and the M2 effect group(M2 group) according to different induction conditions. Foxp3 expression of Tregs and proliferation of effector T cells in co-culture and Transwell experiments were tested by flow cytometry. Serum of ALT was analyzed by automatic biochemistry analyzer and the injury of liver in ischemia reperfusion(IR) was detected by H&E staining. **Results:** Compared with the noM group, the expression of Foxp3 was reduced in the M0 group and the M2 group (both $P < 0.01$), while no significant difference was observed in the M1 group. What's more, the suppressive ability of Tregs from the M0 and M2 group were less than those from the M0 and M2 group both *in vitro* and *in vivo*(both $P < 0.01$). Mechanism study proved that the regulatory effect of macrophage to Tregs was depended on cell-cell contact($P < 0.05$). **Conclusion:** Our study suggests that peritoneal macrophages play an important role in regulating the induction of Tregs *in vitro*, which present key therapeutic potential in maintaining immune balance.

[Key words] regulatory T cells; macrophage; immune balance; ischemia reperfusion

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(09): 1063-1067]

调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)作为一种重要的免疫细胞于上个世纪九十年代中期首先被

发现并被证实具有抑制性作用^[1]。Treg 根据来源不同分为胸腺衍生的 natural Treg (nTreg)以及体外诱导的 induced Treg(iTreg)。两种 Treg 虽然来源不同,但是在抑制效应性 T 细胞增殖以及在肝脏缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)、急性肝损伤等免疫性炎症疾病中都发挥了关键性作用^[2]。Foxp3 基因位于 Treg 的 X 染色体上的链接部位,是其重要的核内表型,该表型的表达对 Tregs 发育以及功能的发挥

[基金项目] 国家高科技研究发展计划(2015AA020932);国家自然科学基金(81100270,81571564);江苏省自然科学基金(BK20131024);江苏省六大人才高峰项目(2011-ws-106);江苏省优秀医学学术重点项目(RC2016)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:lvling@njmu.edu.cn

起着调节作用。Foxp3 的表达情况直接决定着 Treg 的免疫调节功能^[3]。

巨噬细胞是来源于单核细胞、具有吞噬功能以及免疫调节功能的细胞种群。研究表明,巨噬细胞能够通过 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)等模式识别受体识别病原体(和)危险信号,继而发挥先天和适应性免疫作用^[4]。巨噬细胞根据细胞因子表达的不同分为分泌 IL-6、IFN- γ 的 M1 型巨噬细胞,以及分泌 IL-10 等的 M2 型巨噬细胞^[5]。不同的巨噬细胞亚群表达不同的趋化因子、表面标志物以及各种代谢反应需要的酶,并且在抗炎以及促炎过程中发挥着不同的作用。

目前国内外还鲜见有关不同亚型的腹腔巨噬细胞对 Treg 体外诱导影响的报道,本研究通过将不同亚型腹腔巨噬细胞与 Treg 共培养,并在体内与体外实验中分析所得 Treg 的免疫调节功能,旨在阐述不同巨噬细胞在机体免疫平衡维持中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性 C57BL/6 以及 C57BL/6 Foxp3-GFP 基因嵌合小鼠,体重 20~25 g,6~8 周龄(美国 UCLA 大学 Talil Chatilla 教授实验室提供,于南京大学动物管理中心繁殖饲养)。

RPMI 1640 培养基、 β -巯基乙醇、丙酮酸钠、双抗(PBS、胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco 公司,美国),染色试剂 Perp/cyc5.5-CD4、PE-CD25、PE-CD4 (Biolegend 公司,美国);干扰素(interferon, INF- α)、白介素(interleukin, IL)-4、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β (Biolegend 公司,美国),CD4⁺CD62L⁺ T Cell 分选试剂盒、CD4⁺CD25⁺T 细胞分选试剂盒(美天旎生物技术有限公司,德国)。FACSCanto II 流式细胞仪(BD 公司,美国),autoMACS Pro 全自动磁性细胞分选仪(美天旎生物技术有限公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 naive CD4⁺T 细胞分选

取 C57BL/6 Foxp3-GFP 基因嵌合小鼠,脱颈处死,常规消毒。于超净台中取出脾脏置于 200 目研磨皿中,经过充分研磨、裂红、离心后得到脾脏细胞沉淀。按 CD4⁺CD62L⁺T Cell 分选试剂盒说明利用 autoMACS Pro 全自动磁性细胞分选仪分选得到 naive CD4⁺CD62L⁺T 细胞。检测所得细胞纯度>95%。

1.2.2 腹腔巨噬细胞提取及诱导

取 C57BL/6 正常小鼠,脱颈处死,经 75%酒精

常规消毒。向小鼠腹腔中注射无血清 RPMI 1640 培养基 5 mL,反复揉搓腹部 5 min,静置 3 min 后打开腹腔,抽取腹腔液体离心、检测细胞密度后种植于 6 孔板中培养 3 h,去除未贴壁细胞,重新加入培养基及细胞因子(M1 型巨噬细胞:IFN- γ 10 ng/mL、LPS 100 ng/mL;M2 型巨噬细胞:IL-4 10 ng/mL)刺激培养 24 h,流式检测诱导细胞纯度。

1.2.3 细胞共培养

将以上方法诱导所得的巨噬细胞分别与分选得到的 naive CD4⁺T 细胞按 1:10 比例种植于 96 孔板中。加入原代腹腔巨噬细胞共培养的为 M0 组,加入 M1 型巨噬细胞共培养的为 M1 组,加入 M2 型巨噬细胞共培养的为 M2 组,不加巨噬细胞共培养的为无巨噬细胞共培养的正常 Treg 诱导的 noM 组。Naive CD4⁺T 细胞 2×10^6 个/孔,加入含 20 ng/mL IL-2、5 ng/mL CD3 抗体、1 ng/mL CD28 抗体、有(无) 5 ng/mL TGF- β 的培养基 200 μ L,培养 3 d,流式检测 Foxp3 表达。

1.2.4 Transwell 分离培养

将 M0 以及诱导得到 M1、M2 分别种植于上室中,分选得到的 naive CD4⁺T 细胞以 1:10 比例培养于下室中,培养 3 d,流式检测 Foxp3 表达。

1.2.5 效应性 T 细胞分选及体外功能抑制实验

如上所述得到脾脏单细胞悬液,经过离心、裂红后,得到细胞沉淀。按照 CD4⁺CD25⁺T 细胞分选试剂盒利用 autoMACS Pro 全自动磁性细胞分选仪分选得到 CD4⁺CD25⁺T 细胞。用 CFSE 标记 CD4⁺CD25⁺T 细胞后,按照一定比例,与各组中诱导得到的 Treg 共培养 3 d,流式检测 CD4⁺CD25⁺效应性 T 细胞增殖情况。

1.2.6 肝脏缺血再灌注小鼠模型建立及体内实验

C57BL/6 小鼠用乙醚麻醉。常规打开腹腔,静脉夹夹在左门静脉、肝动脉、胆管处,此时肝脏缺血面积约为 70%。缺血 90 min 后放开静脉夹,关闭腹腔,建立肝脏缺血再灌注模型,将各组体外与巨噬细胞共培养得到的 Treg 以 1×10^6 个/只尾静脉注入缺血再灌注小鼠模型体内。手术后 6 h 处死小鼠,收集血清检测丙氨酸氨基转移酶(ALT),收集肝脏标本做 HE 染色。

1.3 统计学方法

采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析,计量数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 Turkey post-hoc 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 腹腔巨噬细胞诱导的纯度检测

巨噬细胞诱导成功后, M1 型巨噬细胞染色 F4/80/CD16/32、M2 型巨噬细胞染色 F4/80/CD206, 流式细胞仪检测其纯度, 结果为 M1 型 >90%、M2 型 >90%。

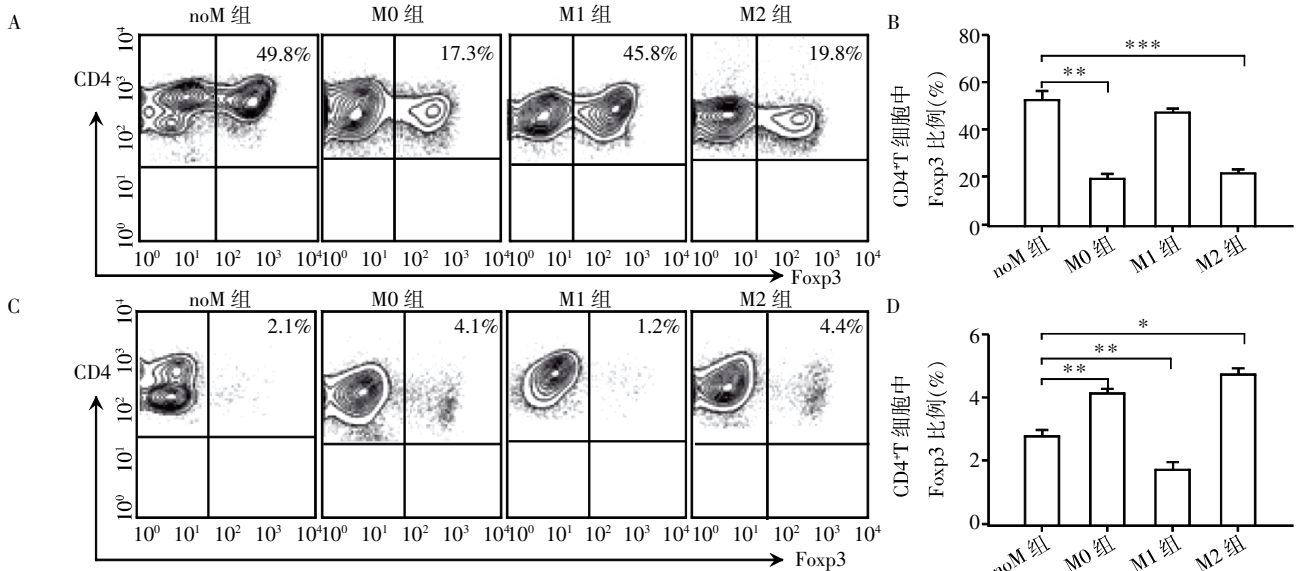
2.2 巨噬细胞影响 Treg 体外诱导及其抑制功能的发挥

在 TGF- β 存在条件下, 与 noM 组相比, M0 组以及 M2 组中 Foxp3 表达明显降低 ($P < 0.001$); 相反,

M1 型巨噬细胞不能够降低 Treg 中 Foxp3 表达(图 1)。而不加入 TGF- β 时, M0 和 M2 能够增加 iTreg 的产生。体外抑制效应性 T 细胞增殖是 Treg 的主要功能, 如图 2 所示, 与 noM 组比较, M1 组 Treg 抑制效应性 T 细胞增殖的能力未发生明显改变, 而 M0 与 M2 组中 Treg 抑制效应性 T 细胞增殖功能明显减弱, 低于 M1 组以及 noM 组 ($P < 0.01$)。

2.3 巨噬细胞对 Treg 体外诱导的影响依赖于细胞间接触作用

Transwell 分离培养后, 与混合共培养组相比, M1 组中 Foxp3 表达降低, 而 M0 与 M2 组中 Foxp3



A, B: 加入 TGF- β 时各组 CD4⁺ T 细胞中 Foxp3 的表达; C, D: 不加 TGF- β 时各组 CD4⁺ T 细胞中 Foxp3 的表达情况。与 noM 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=5$)。

图 1 不同亚型巨噬细胞对 CD4⁺ T 细胞 Foxp3 表达的影响

Figure 1 Effect of different subtypes macrophages on the expression of Foxp3 in CD4⁺ T cells

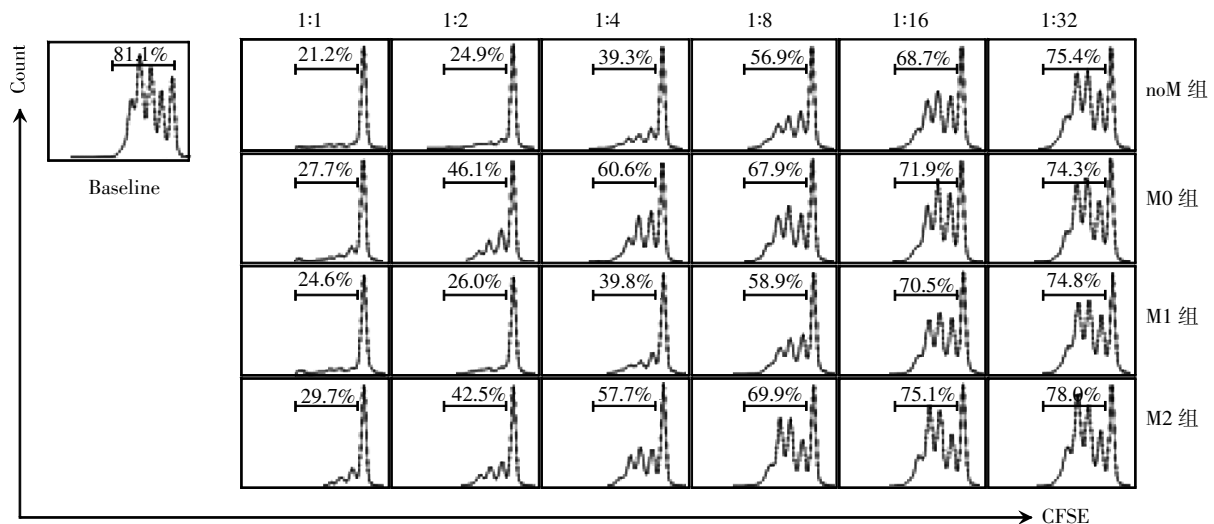


图 2 各组在巨噬细胞影响下诱导的 Treg 抑制效应性 T 细胞增殖情况

Figure 2 Ability of Treg affected by macrophages in inhibiting the proliferation of effector T cells

表达明显增高($P < 0.05$)。由此可以得出虽然细胞因子在 Treg 诱导过程中发挥着一定作用,但是巨噬细胞对于 Treg 诱导的影响主要依赖于细胞接触(图 3)。

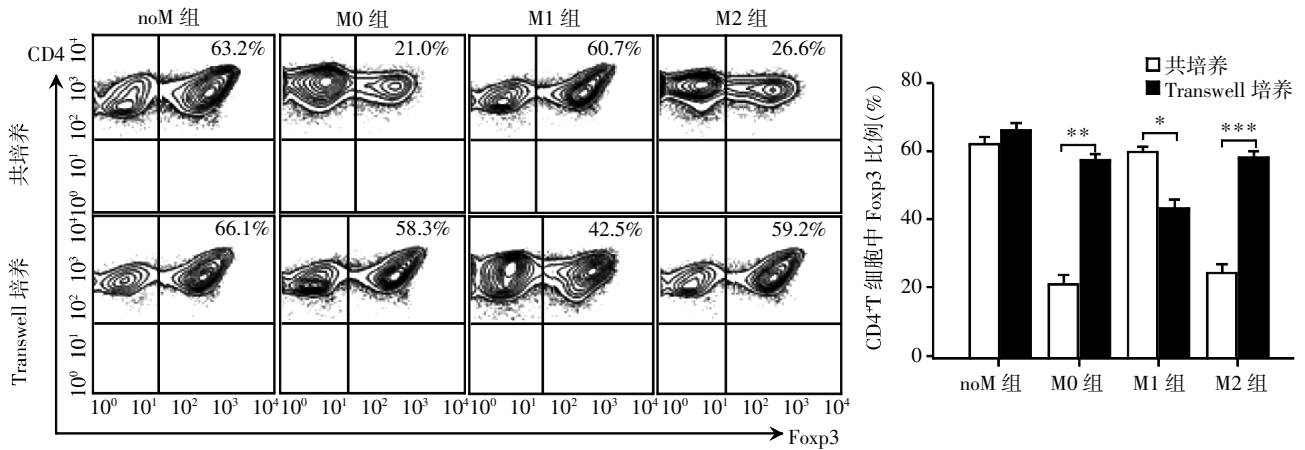
2.4 巨噬细胞影响 Treg 在肝脏缺血再灌注损伤中的保护作用

肝脏病理与 ALT 检测结果显示 M0、M2 组 Treg 的肝脏保护作用弱于 M1 组。该结果与体外 Treg Foxp3 表达以及其抑制功能趋势相似(图 4)。

3 讨论

巨噬细胞广泛存在于多种器官,并发挥着重要的抗原吞噬和免疫调节功能。肝脏中的巨噬细胞又称作 Kupffer 细胞,对于肝内的免疫稳态起着重要

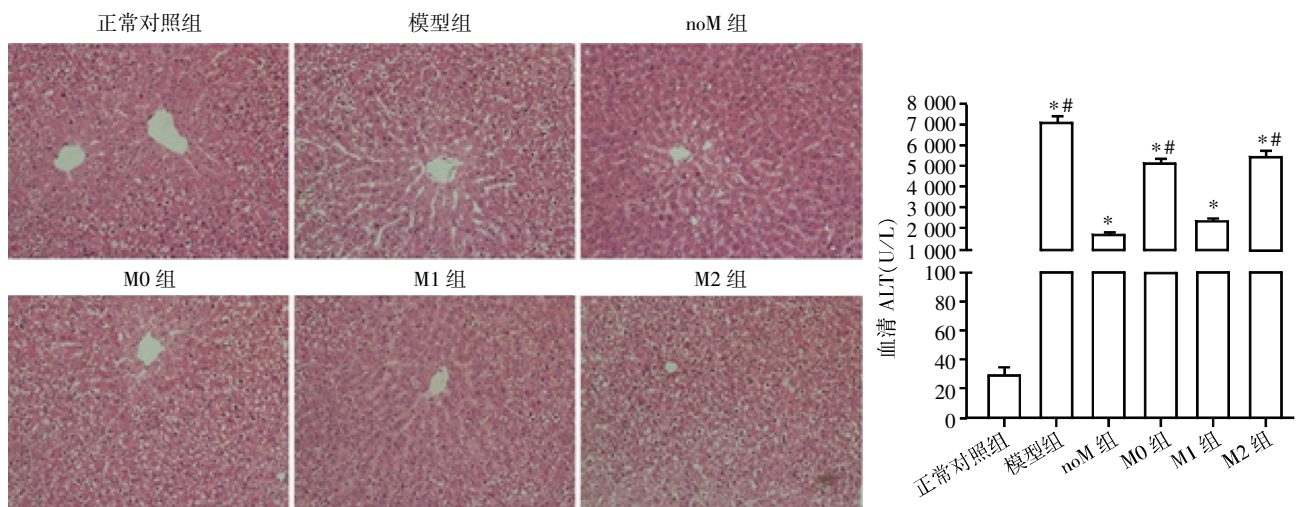
的维持作用。巨噬细胞分为 M1、M2 两种类型。M1 型巨噬细胞作为一种炎性细胞,能够通过分泌 IL-6、IFN- γ 加重组织炎症损伤,M2 型巨噬细胞作为一种抗炎型细胞,能够通过分泌 IL-10、TGF- β 降低组织炎症程度。Treg 作为重要的免疫调节细胞,在控制炎症反应、维持免疫耐受中发挥重要作用。Treg 在体外能够经 TGF- β 以及 IL-2 诱导,高表达特异性标志分子 Foxp3,然而在炎症因子例如 IL-6 存在的情况下,Foxp3 的产生受到明显抑制^[6]。本研究通过将炎性 M1 型巨噬细胞以及抗炎 M2 型巨噬细胞与 naive T 细胞共培养,观察 Treg 的诱导情况。本研究发现抗炎性 M2 型巨噬细胞在诱导 Treg 表达 Foxp3 上明显低于 noM 组,而炎性 M1 型巨噬细胞诱导 Treg 表达 Foxp3 与正常 Treg 诱导组无明显差异。相



两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 3 各组 Transwell 实验中 CD4⁺ T 细胞 Foxp3 表达

Figure 3 Expression of Foxp3 among CD4⁺ T cells in Transwell experiments



与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与 M1 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 各组巨噬细胞影响下诱导的 Treg 在肝脏缺血再灌注损伤中的保护作用

Figure 4 Ability of Treg affected by macrophages in protecting liver from ischemia reperfusion injury

关文献报道外源性 TGF- β 能够降低 IL-6 受体的表达从而抑制 IL-6 信号通路^[7], 并且 M2 型巨噬细胞能够通过分泌 TGF- β 诱导小剂量 Treg 的产生^[8]。研究表明, 低剂量的 IL-4 能够促进 Th2 细胞反应, 产生 IL-25 激活抗原特异性反应, M2 型巨噬细胞通过分泌 IL-4 抑制抗原特异性反应^[9], 降低 TCR 信号抑制 T 细胞活化, 最终降低 Foxp3 表达。Foxp3 表达对于 Treg 功能的发挥起着重要作用, 本研究通过体外抑制功能实验得出 M2 型巨噬细胞抑制效应性 T 细胞增殖的功能明显低于 M1 组及 noM 组。体内缺血再灌注损伤研究也发现 M0 及 M2 型巨噬细胞诱导的 Treg 肝脏保护效应较 M1 型弱。

机体作为一个复杂的整体, 在抗炎-促炎过程中维持动态平衡, 而这种稳态的破坏可诱发机体产生多种免疫性疾病, 因此作为重要的免疫细胞, 巨噬细胞以及 Treg 通过自身功能的发挥在维持机体稳态方面起到了重要作用。M1 以及 M2 型巨噬细胞作为重要的炎性以及抗炎细胞, 能够通过分泌细胞因子发挥其特有的功能。但是有研究报道 Treg 能够影响巨噬细胞的转化以及功能的发挥, 尤其是对于抗炎性 M2 型巨噬细胞的影响, 依赖于细胞之间的接触性作用^[3]。本研究同样发现, 不同亚型巨噬细胞对于 Treg 的影响不同, 主要依赖于细胞接触来维持机体稳态, 这为今后研究免疫平衡尤其是肝脏免疫提供了一个新方向。

[参考文献]

[1] Wang P, Zheng SG. Regulatory T cells and B cells: im-

- plication on autoimmune diseases[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(12): 2668-2674
- [2] Tosiek MJ, Fiette L, Daker S, et al. IL-15-dependent balance between Foxp3 and ROR γ expression impacts inflammatory bowel disease[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10888
- [3] Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, et al. CD4+CD25+ Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(49): 19446-19451
- [4] Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(12): 958-969
- [5] Liu ZM, Wang KP, Ma J, et al. The role of all-trans retinoic acid in the biology of Foxp3⁺ regulatory T cells [J]. *Cell Mol Immunol*, 2015, 12(5): 553-557
- [6] Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, et al. Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis[J]. *Nat Med*, 2014, 20(1): 62-68
- [7] Gu J, Lu L, Chen M, et al. TGF-beta-induced CD4⁺Foxp3⁺ T cells attenuate acute graft-versus-host disease by suppressing expansion and killing of effector CD8⁺ cells[J]. *J Immunol*, 2014, 193(7): 3388-3397
- [8] Cao Q, Wang Y, Zheng D, et al. IL-10/TGF-beta-modified macrophages induce regulatory T cells and protect against adriamycin nephrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(6): 933-942
- [9] Saenz SA, Siracusa MC, Perrigoue JG, et al. IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T(H)2 cytokine responses[J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1362-1366

[收稿日期] 2016-05-23