

## LFA-1 对小鼠 Treg 细胞功能可塑性的影响及其机制探讨

夏 菲,李 芳,张东波,于成功\*

(南京大学医学院附属鼓楼医院消化科,江苏 南京 210008)

**[摘要]** 目的:淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)对淋巴细胞的分化、迁移及功能有重要影响。体外探讨 LFA-1 对 iTreg 细胞可塑性的影响和作用机制。方法:体外诱导产生纯度较高的野生组(wild type, WT)小鼠 iTreg 细胞及 LFA-1 基因敲除组(LFA-1<sup>-/-</sup>组),将以上 2 种细胞置于含有 IL-6、IL-23、TGF- $\beta$  的完全培养基中,于第 8 天通过流式检测 IL-17、Foxp3 共表达的情况,PCR 检测 STAT3、ROR- $\gamma$ t 前后表达量的变化,ELISA 检测细胞因子 IL-10、IL-17 水平。结果:野生组(wild type, WT)及 LFA-1 基因敲除组(LFA-1<sup>-/-</sup>组)小鼠 Treg 细胞在炎性环境中均展现出可塑性,LFA-1<sup>-/-</sup>组小鼠 IL-17/Foxp3 共表达高于 WT 组小鼠。real-time PCR 显示与 WT 组相比,LFA-1<sup>-/-</sup>组小鼠 ROR- $\gamma$  t、STAT3 表达高于 WT 组( $P<0.001$ )。与空白对照组相比,炎性环境中 Treg 细胞分泌 IL-17 增加,分泌 IL-10 减少;且这种改变在 LFA-1<sup>-/-</sup>组小鼠 Treg 细胞中更为显著( $P<0.001$ )。结论:LFA-1 可能通过影响转录因子 ROR- $\gamma$ t、STAT3 表达水平影响 Treg 细胞的可塑性。

**[关键词]** 淋巴细胞功能相关抗原-1; Treg 细胞;可塑性;体外诱导

**[中图分类号]** R446.63

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)12-1543-05

doi:10.7655/NYDXBNS20171201

## Effects of LFA-1 on plasticity of Treg in inflammation conditions in vitro

Xia Fei, Li Fang, Zhang Dongbo, Yu Chenggong\*

(Department of Gastroenterology, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

**[Abstract]** **Objective:** It has been widely accepted that lymphatic helper T cells in the lymph system have plasticity. Treg cells, as one of the helper T cell phenotypes, can be induced in different cytokine environment and reveal the existence of plasticity. In addition, lymphocyte function associated antigen 1 (LFA-1) play an important role in the function and migration of lymphocyte differentiation. This study was aimed to investigate the effect of LFA-1 on Treg cells plasticity and the possibility mechanism in vitro. **Methods:** The high purity Treg cells in wild mice and LFA-1<sup>-/-</sup> mice pre in vitro, and then cultured in completely medium containing IL-6, IL-23, TGF- $\beta$ . On the eighth day, the co-expressing of Foxp3 and IL-17 was measured by flow cytometer, and the expression of STAT3 and ROR gamma t was detected by PCR. The levels of IL-10 and IL-17 in supernatant were measured by ELSIA. **Results:** Both of the wild mice Treg cells and LFA-1<sup>-/-</sup> mice Treg cells showed the plasticity in inflammatory conditions, but LFA-1<sup>-/-</sup> mice Treg cells revealed a higher percentage of Foxp3/IL-17 co-expressing, and the expression of STAT3 and ROR gamma t in LFA-1<sup>-/-</sup> mice Treg was also increased than that in the wild mice Treg cells ( $P<0.001$ ). Furthermore, both of the two types of cells supernatants showed that IL-17 is higher with IL-10 decreasing than that of treatment, and the change is obvious in LFA-1<sup>-/-</sup> mice Treg cells ( $P<0.001$ ). **Conclusion:** LFA-1 has the effect on the plasticity of Treg by regulating the expression of STAT3 and ROR gamma t.

**[Key words]** lymphocyte Function-associated Antigen-1; Treg cells; plasticity; induction in vitro

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(12): 1543-1547]

Th17 细胞是辅助性 T 细胞中发挥重要功能的谱系<sup>[1]</sup>,在感染性疾病的动物模型中发现,Th17 细胞能够通过清除细胞外抗原发挥免疫保护作用<sup>[2]</sup>,在免疫相关疾病中亦可发挥致病性<sup>[3]</sup>。有报道指出,在

IL-6 及 TGF- $\beta$  作用下,Th17 细胞的产生与 Treg 细胞存在一种交互作用,Treg 细胞促进了 Th17 细胞的产生,此现象的发生可能与活化状态下 Treg 细胞分泌 TGF- $\beta$  有关<sup>[4]</sup>。在自身免疫性脑脊髓炎(EAE)动物模型中,通过回输 Treg 细胞并没有达到预期的控制炎症的目的,相反增加了 IL-17 的表达,加重了疾病的程度<sup>[5]</sup>,指出 Treg 细胞与能产生 IL-17 的免疫

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81170359)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:chenggong\_yu@nju.edu.cn

细胞可能存在着转化关系,从此,跨越了 Treg 细胞免疫抑制功能的传统观点,面对免疫系统紊乱导致的过强炎症反应,打开了人们对于 Treg 细胞功能的重新认识。

在面对外界抗原导致的内环境紊乱,机体通过转录因子 STAT 家族的表达以分别激活适应性免疫反应产生免疫保护作用<sup>[6]</sup>。STAT3 作为 Th17 细胞的特征性转录因子,是一个具有多效性的转录因子,在免疫疾病的病理过程中起到关键作用。STAT3 激活依赖于外环境中细胞因子刺激受体,例如在 IL-6 及 TGF- $\beta$  的共同刺激下,能够促进 Th17 细胞相关的 ROR- $\gamma$ t 及 ROR $\alpha$  的表达,以 STAT3 表达失衡不适当激活 Th17 细胞的反应造成免疫损伤在炎症性肠病、多发性硬化及关节炎中均得到证实<sup>[7]</sup>。

淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)是黏附分子整合素 2 家族成员,其通过为淋巴细胞活化提供重要的协同刺激受体和信号,影响淋巴细胞激活、增殖、分化<sup>[8]</sup>。在 LFA-1<sup>-/-</sup> 组鼠的 EAE 模型中发现 LFA-1<sup>-/-</sup> 组与 WT 组相比病情有所加重,此外通过回输 Treg 细胞亦导致疾病的加重<sup>[9]</sup>。本实验团队前期研究成果显示,炎症性肠病患者外周血淋巴细胞存在 LFA-1 基因的低表达,LFA-1 小鼠在用 DSS 造模过程中发现炎症程度较野生型小鼠加重,及给 LFA-1<sup>-/-</sup> 组的炎症性肠病模型鼠回输 Treg 细胞并未减轻炎症<sup>[8]</sup>,根据炎症性肠病疾病状态下致炎性细胞因子的水平,本研究通过将 WT 组及 LFA-1<sup>-/-</sup> 组小鼠 Treg 细胞置于体外模拟的炎症环境中(即含有 IL-6、IL-23、TGF- $\beta$  完全培养基),检测 Treg 细胞可塑性的存在以及转录因子 STAT3 表达水平的变化情况,以探讨 LFA-1 对 Treg 细胞可塑性影响的可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

LFA-1 基因缺失小鼠(Strain Number:B6.129S7-Itgalm1BII,stock number:005257) 购买于美国 Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine),实验所用 LFA-1 基因缺失小鼠为南京大学模式动物研究所于 SPF 条件下繁殖的子代小鼠,通过基因鉴定筛选。相同遗传背景下的 C57BL/6J 小鼠,饲养于南京鼓楼医院动物实验中心。试验中所用小鼠均为 6~8 周龄,LFA-1<sup>-/-</sup> 组及 WT 组小鼠各 16 只,体质量 21~23 g,雌雄各半。

AIM-V 培养基、胎牛血清(Gibco 公司,美国),CD4<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup> Naive T 细胞磁珠分选试剂盒、分选柱

(Miltenyi Biotec 公司,美国),磁珠分选缓冲液(MACS buffer,美天旎公司,美国),红细胞裂解液(Miltenyi Biotec 公司,美国),CD3、CD28 单克隆抗体(eBioscience 公司,美国),重组人转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、重组小鼠 IL-6、IL-23、IL-2(R&D 公司,美国),逆转录及荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本),小鼠 IL-17、IL-10 细胞因子检测 CBA 试剂盒(BD 公司,美国)。流式细胞仪(BD Biosciences 公司,美国),FACS calibur system,酶联免疫检测仪(ELx800, Bio-Tek 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 磁珠分选 Naive T 细胞

在无菌屏障中处死 2 只小鼠摘取脾脏,置于超净台中,采用红细胞裂解液方法获得单个核细胞,从获得的单个核细胞中取  $1 \times 10^8$  个细胞用于磁珠分选。22 °C 300 g 10 min 离心后为避免细胞丢失,小心吸尽上清。400  $\mu$ L 磁珠分选缓冲液(MACS buffer)重悬,按照 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> Naive T 细胞磁珠分选试剂盒说明书步骤进行操作,将获得细胞悬液缓慢沿管壁加入磁珠分选 LD 柱(一定不要产生气泡),待柱内细胞悬液流空,用分选 buffer 3 mL 洗柱 3 次,流出的细胞悬液即为 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> Naive T 细胞,用含有 10% FBS 的完全培养基重悬细胞,调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/mL。

#### 1.2.2 检测所得 Naive T 细胞纯度

取磁珠分选所得的 Naive T 细胞于 2 个流式管中,1 个放  $5 \times 10^5$  个细胞,PBS 300 g 5 min 清洗后离心,弃上清使用流式缓冲液重悬至 100  $\mu$ L。使用 FITC-CD4 0.8  $\mu$ L,PE-CD62L 0.5  $\mu$ L,标记其中 1 管细胞,另 1 管作为对照。4 °C 避光孵育 40 min 后 2 mL 流式缓冲液清洗 300 g 离心 5 min,用 300  $\mu$ L PBS 重悬后流式检测。

#### 1.2.3 体外 Treg 细胞的诱导分化

培养细胞前,先用含有 1  $\mu$ g/mL CD28 单抗和 0.5  $\mu$ g/mL CD3 单抗的无菌 PBS 包被 96 孔 U 型底细胞培养板处理,置于 4 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中孵育 2 h,孵育完成后用 PBS 清洗 2 遍后待用。取磁珠分选所得的 Naive T 细胞用含有 10% FBS、10 ng/mL 的 IL-2、10 ng/mL 的 TGF- $\beta$  的完全培养基重悬调整密度至  $1 \times 10^6$  个/mL,以 200  $\mu$ L 每孔加入 96 孔培养板中。培养 5 d 后取部分细胞用于流式检测 Foxp3 比例,剩余细胞用于磁珠分选得到 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 细胞。

#### 1.2.4 磁珠分选 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 细胞

取  $1 \times 10^7$  个诱导培养后的 Naive T 细胞,在无菌

超净工作台中,按照 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 磁珠分选试剂盒进行分选,得到纯度较高的 Treg 细胞,取适当细胞进行流式细胞检测 Foxp3 阳性率。

### 1.2.5 炎性环境下诱导 Treg 细胞分化

于磁珠分选 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 前用含 anti-CD3 0.5 μg/mL、anti-CD28 1 μg/mL 的无菌 PBS 包被 U 型底 96 孔板,置于 4℃、含 5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中孵育 2 h,孵育完成后用 PBS 清洗 2 遍后待用。取 1×10<sup>6</sup> 个磁珠分选所得 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞用 AIM-V 完全培养基(含 10%FBS、TGF-β 3 ng/mL,IL-6 40 ng/mL,IL-23 30 ng/mL)重悬,以每孔 200 μL 细胞悬液接种于 U 型底 96 孔板。分别于第 3、5、7 天换液处理,并留取上清检测 IL-10、IL-17 水平;并吸取少量细胞做流式分析,观察 IL-17、Foxp3 共表达情况及 real-time PCR 检测 STAT3、ROR-γt mRNA 表达量。

### 1.2.6 流式检测 Treg 细胞表达 IL-17 情况

将诱导培养所得细胞取 5×10<sup>5</sup> 个于流式管中,加入淋巴细胞刺激剂 2 μL/mL,放入 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 4~6 h,离心清洗 1 次后加入流式抗体 PERCP-cy5.5-CD25 1.0 μL、FITC-CD4 0.6 μL,4℃避光孵育 40 min,300 g 5 min 离心清洗后轻度涡旋,使细胞完全重悬,加入 250 μL 固定/破膜剂,4℃避光孵育 40 min 后,加入 1 mL 固定/破膜缓冲液(以双蒸水稀释)1 mL,300 g 5 min 离心清洗,去上清后重复清洗 1 次,加入流式抗体 PE-IL-17 1 μL、Alexa Fluor647-Foxp3 2.5 μL,孵育 1 h,加入 1 mL 固定/破膜缓冲液离心清洗 1 次,以 200 μL PBS 重悬后上机检测。

### 1.2.7 荧光定量 PCR 检测细胞中 IL-17、ROR-γt、Foxp3 mRNA 表达量

收集以上在炎性环境中诱导培养的 Treg 细胞,TRIzol 裂解提取 RNA,按照逆转录试剂盒反转录成 cDNA。引物序列:内参 GAPDH:正义 5'-CATG GCCTTCCGTGTTCTCTA-3',反义 5'-TGTCATACTTG-GCAGGTTTCT-3';引物 ROR-γt:正义 5'-CACGGC-CCTGTTCTCAT-3',反义 5'-GCAGATGTTCCACTCTC-CTCTTCT-3';引物 STAT3:正义 5'-AGGAATCGGC-TATATTGCTGGT-3';反义 5'-CACCTTGGATTGA-GAGTCAAGAC-3'。根据 TaKaRa 逆转录试剂盒说明要求,最终定量用目的基因的光密度值/内参基因光密度值的比值(2<sup>-ΔΔCt</sup>)来表示,计算出各个目的基因相对表达量情况。

### 1.2.8 ELISA 检测细胞培养上清中 IL-10、IL-17 含量

于诱导培养第 8 天,分别取野生组(wild type,

WT)及 LFA-1 基因敲除组(LFA-1<sup>-/-</sup>组)Treg 细胞培养上清,并与各自空白对照组相比,比较诱导前后细胞培养上清中分泌的细胞因子 IL-10、IL-17 水平的变化,以及诱导后野生组与 LFA-1 基因敲除组细胞培养上清中 IL-10、IL-17 含量的差异。

### 1.3 统计学方法

应用 SPSS20.0 统计软件及 GraphPad Prism6.0 医学绘图软件分析处理数据。实验数据以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,符合正态分布的数据两组间比较采用成组 *t* 检验,不符合正态分布的数据组间比较采用非参数检验, $P\leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 体外诱导 Treg 细胞产生

分别获取 WT 组及 LFA-1<sup>-/-</sup> 鼠脾脏,经研磨获得单个核细胞悬液,使用 Naive T 细胞磁珠分选试剂盒获得幼稚 T 细胞,经流式检测 CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> 细胞阳性率>95%(图 1A、B)。在细胞因子 IL-2、TGF-β 诱导下,Naive T 细胞向 Treg 细胞分化,生成 Treg 细胞,流式检测 WT 组诱导产生的 Treg 比例在 75%左右,LFA-1<sup>-/-</sup> 组诱导产生的 Treg 细胞比例在 20%左右(图 1C、D)。经 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 磁珠分选试剂盒分选诱导的 Treg 细胞,流式检测分选纯度,结果提示 WT 组及 LFA-1<sup>-/-</sup> 组 Treg 细胞纯度高于 95%(图 1E、F),提示 Treg 细胞分选纯度较高,为后续试验奠定基础。

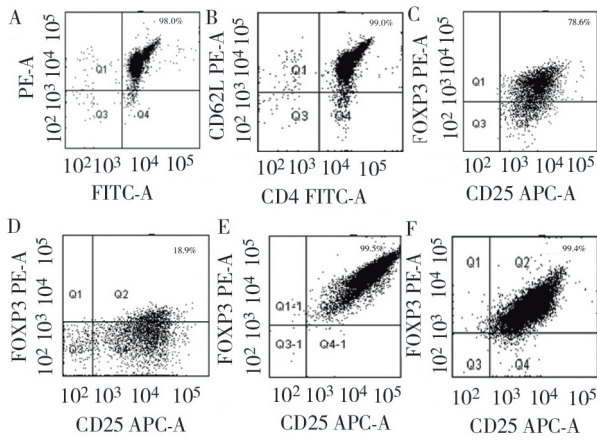
### 2.2 体外模拟炎症环境下 Treg 细胞可表达 IL-17

经体外诱导分化后磁珠分选,分别得到纯度较高的 WT 组 Treg 细胞及 LFA-1<sup>-/-</sup> 组 Treg 细胞,在细胞因子 IL-6、IL-23、TGF-β 的诱导下,于第 8 天在 PMA 刺激 4~6 h 后进行胞内及核内染色,实验结果组内分析提示:WT 组空白对照组表达 IL-17 比率为(2.85±1.04)%,炎症环境诱导处理组 Foxp3 及 IL-17 共表达率为(9.91±2.01)%(图 2A、B),两者差异具有统计学意义( $P<0.05$ );LFA-1<sup>-/-</sup> 组的空白对照为(3.01±0.69)%,炎症环境诱导组则为(21.33±3.57)%(图 2C、D),两者差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。组间分析提示,在相同炎性环境诱导条件下,LFA-1<sup>-/-</sup> 组小鼠的 Treg 细胞 Foxp3 及 IL-17 共表达细胞比率明显高于 WT 组,组间差异具有明显统计学意义( $P<0.001$ )。

### 2.3 荧光定量 PCR 检测炎症环境下 WT 组及 LFA-1<sup>-/-</sup> 组 Treg 细胞经诱导后与对照组 WT Treg 细胞相比 ROR-γt、STAT3 相对表达量

炎症环境诱导培养所得细胞 mRNA 相对表达





A:磁珠分选后 WT 组 Naive T 细胞比例;B:磁珠分选后 LFA-1<sup>+</sup> 组小鼠 Naive T 细胞比例;C:WT 组小鼠诱导产生的 Treg 比例;D: LFA-1<sup>+</sup> 组小鼠诱导产生的 iTreg 比例;E:CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 磁珠分选试剂盒分选后 WT 组 Treg 比例;F:CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 磁珠分选试剂盒分选后 LFA-1<sup>+</sup> 组 Treg 比例。

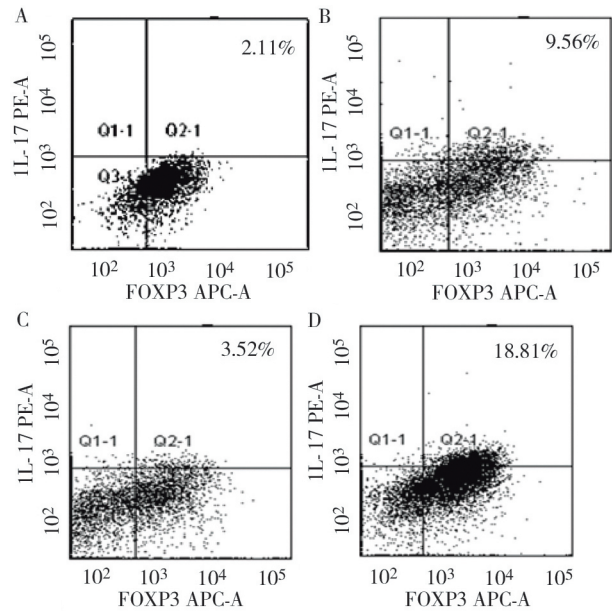
图 1 流式检测体外诱导 Treg 比例

Figure 1 Purity identification of induced Tregs

量, 所得结果以诱导细胞与 WT 对照组 Treg 细胞 mRNA 表达量的倍数变化表示, STAT3 mRNA 相对表达量各组分别为: LFA-1<sup>+</sup> Treg 组 1.70±0.33, WT Treg 诱导组 12.58±2.31, LFA-1<sup>+</sup> Treg 诱导组 33.61±5.14; ROR- $\gamma$ t mRNA 相对表达量各组分别为: LFA-1<sup>+</sup> Treg 组 11.64±3.07, WT Treg 诱导组 25.63±1.95, LFA-1<sup>+</sup> Treg 诱导组 79.91±3.02。结果提示炎症环境诱导下, LFA-1<sup>+</sup> 组 Treg 细胞表达 ROR- $\gamma$ t、STAT3 mRNA 量明显较 WT 组高 ( $P < 0.05$ )。

2.4 细胞培养上清中 IL-17、IL-10 变化情况

ELISA 结果显示, WT 组 Treg 细胞经 IL-6, IL-23, TGF- $\beta$  处理后, 上清液中 IL-17 的浓度为 (1 396.69±180.13) pg/mL, 明显高于空白对照组 (317.73±70.79) pg/mL ( $P < 0.05$ ); 同期, 处理组 Treg 上清液中 IL-10 为 (1 806.88±228.56) pg/mL, 空白对照组则为 (2 835.36±407.15) pg/mL。将 WT 处理组与空白对照组上清中的 IL-17 与 IL-10 分别比较, 得出 2 个细胞因子相关的组间差异明显 ( $P < 0.001$ )。LFA-1<sup>+</sup> 组 Treg 细胞经 IL-6, IL-23, TGF- $\beta$  处理组培养上清 IL-17 浓度为 (3 057.23±719.14) pg/mL, 空白对照组则为 (375.61±88.01) pg/mL, 两组相比具有明显统计学差异 ( $P < 0.001$ ); 同期 IL-10 处理组浓度为 (904.10±199.34) pg/mL, 空白对照组为 (2 424.45±378.26) pg/mL, 两组相比具有明显统计学差异 ( $P < 0.001$ )。同时, LFA-1<sup>+</sup> 组 Treg 经炎症相关细胞因子诱导后, 其产生致炎性细胞因子 IL-17 浓度明显高于 WT 组 Treg 细胞, 两者具有统计学差异 ( $P <$



A,B:WT 组及其处理组 Treg 细胞表达 IL-17 的比率;C,D:LFA-1<sup>+</sup> 组及其处理组 Treg 细胞 Foxp3/IL-17 共表达比率。

图 2 不同诱导环境中 Treg 细胞表达 IL-17 的比例

Figure 2 Proportion of Tregs co-expressing Foxp3/IL-17 in different induced environment

0.001); 然而 LFA-1<sup>+</sup> 组 Treg 细胞分泌 IL-10 量较 WT 组低, 两者具有统计学差异 ( $P < 0.001$ )。

3 讨论

近年来在淋巴细胞功能转化的研究中发现, Th17 细胞向 Th1 转化的标志是 Th17 细胞中出现了 IFN- $\gamma$ IL-17<sup>+</sup> 表达双阳性的细胞<sup>[10]</sup>, 其产生的标志是表明宿主免疫系统由抗细胞外抗原向抗细胞内抗原的转变, 这一转变的发生在动物及临床实验中均介导了严重的自身免疫性疾病的产生<sup>[11]</sup>。Globig 等<sup>[12]</sup>提出, IFN- $\gamma$ IL-17<sup>+</sup> 表达双阳性的细胞其实就是 Th17 细胞的一种亚型, 其可能在溃疡性结肠炎及克罗恩病中发挥致病性作用。此外, 在炎症性肠病的患者的外周血中发现了 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 双阳性细胞的存在, 在临床实验中, 通过回输具有抑制免疫作用的 Treg 细胞并未取得预期的效果, 反而导致了 IBD 患者症状的加重<sup>[10]</sup>, 这些研究结果均为 Treg 细胞在特定环境中向 Th17 细胞转化提供了良好的理论及探索基础。在动物实验中发现, 在细胞因子 IL-6, IL-23, TGF- $\beta$  作用下, 能够刺激 ROR- $\gamma$ t 表达, 促使 IL-17 的释放<sup>[13]</sup>, 即 Treg 细胞在前炎症因子诸如 IL-6, IL-23, TGF- $\beta$  的联合诱导作用, 能够促使 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 双阳性细胞的产生, 从而导致致病性。

LFA-1 是淋巴细胞功能相关分子, LFA-1 基因介导 2 种不同的淋巴细胞活动: 一种是识别细胞表

面配体细胞间黏附分子 1(ICAM1)并与之结合,介导淋巴细胞募集和迁移至感染或炎症损伤部位;另一种是与抗原提呈细胞接触,激活下游免疫突触<sup>[8]</sup>。然而在淋巴细胞功能相关实验中发现,LFA-1<sup>-/-</sup>组 Treg 细胞在体外增殖相关实验中丧失了对 T 细胞的激活抑制作用;LFA-1<sup>-/-</sup>组鼠脾脏及淋巴结中 Treg 细胞比例较野生组低,亦反映出 LFA-1 基因在 Treg 细胞的迁移活化中起到重要作用<sup>[9]</sup>。Treg 细胞因具有免疫抑制功能,其在免疫性疾病的发生发展中起到重要作用。然而在 LFA-1<sup>-/-</sup>组鼠 EAE 动物模型中,通过回输野生组 Treg 细胞并未能够控制免疫性炎症的发展,反而加重了疾病的程度<sup>[14]</sup>。通过以上相关实验研究结果,均表明 LFA-1 在 Treg 细胞的功能发挥上具有影响。

本研究在探讨模拟炎症环境下 Treg 细胞可塑性研究的基础上,进一步探讨了 LFA-1 在此过程中对其可塑性功能的影响。实验结果显示,体外诱导得到高纯度 Treg 细胞,将其置于富含 IL-6、IL-23、TGF- $\beta$  的模拟炎症环境中,Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞能够同时表达 Th17 的特征性分子 IL-17,其诱导比例为(9.91 $\pm$ 2.01)%;相同诱导条件下,LFA-1<sup>-/-</sup>组 Treg 细胞 Foxp3/IL-17 共表达比例为(21.33 $\pm$ 3.57)%,两者具有显著的统计学差异。在随后进行的基因水平及细胞因子水平检测发现,与 WT 组相比,LFA-1<sup>-/-</sup>组 Treg 细胞表达 Th17 细胞相关的 ROR- $\gamma$ t、STAT3 mRNA 明显上调,细胞因子 IL-17 较野生组明显升高;同时与 Treg 细胞发挥免疫抑制功能相关的细胞因子 IL-10 在炎症环境中分泌下降,此外 LFA-1<sup>-/-</sup>组 Treg 细胞分泌 IL-10 的量较野生组下降明显。上述研究结果表明,Treg 细胞在炎症环境下展现出了向 Th17 功能转化的可塑性,同时,LFA-1 基因促进了这种功能的转化。

本实验体外证实了炎症环境下 Treg 细胞可塑性的存在,以及 LFA-1 对 Treg 细胞功能可塑性的影响。可能会为临床中采用免疫方法治疗自身免疫性疾病的有效性及安全性提供新视角。

#### [参考文献]

[1] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J]. Nat Immunol,2005,6(11):1123-1132

[2] Martinez-Martinez S, Frandoloso R, Rodriguez-Ferri EF, et al. A vaccine based on a mutant transferrin binding protein B of Haemophilus parasuis induces a strong T-helper

2 response and bacterial clearance after experimental infection[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2016,179(1): 18-25

[3] Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation[J]. J Exp Med,2003,198(12): 1951-1957

[4] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the Generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells[J]. Nature,2006,441(790): 235-238

[5] Lohr J, Knoechel B, Wang JJ, et al. Role of IL-17 and regulatory T lymphocytes in a systemic autoimmune disease[J]. J Exp Med,2006,203(13):2785-2791

[6] Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, et al. CD4<sup>+</sup> regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner[J]. Science,2009,326(5955):986-991

[7] Ochs HD, Oukka M, Torgerson TR. TH17 cells and regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases[J]. J Allergy Clin Immunol,2009,123(5):977-983; quiz 984-5

[8] 费先艳,张新,于成功. 淋巴细胞功能相关抗原-1 调节 Treg 细胞对炎症性肠病的疗效观察 [J]. 胃肠病学, 2016,21(7):398-403

[9] Wohler J, Bullard D, Schoeb T, et al. LFA-1 is critical for regulatory T cell homeostasis and function [J]. Mol Immunol,2009,46(11/12):2424-2428

[10] Ueno A, Ghosh A, Hung D, et al. Th17 plasticity and its changes associated with inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol,2015,21(43):12283-12295

[11] Nistala K, Adams S, Cambrook H, et al. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2010,107(33):14751-14756

[12] Globig AM, Hennecke N, Martin B, et al. Comprehensive intestinal T helper cell profiling reveals specific accumulation of IFN- $\gamma$ /IL-17<sup>+</sup>coproducing CD4<sup>+</sup> T cells in active inflammatory bowel disease[J]. Inflamm Bowel Dis,2014,20(12):2321-2329

[13] Ivanov II, Mckenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR gamma t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17(+) T helper cells[J]. Cell, 2006,126(6):1121-1133

[14] Dugger KJ, Zinn KR, Weaver C, et al. Effector and suppressor roles for LFA-1 during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Neuroimmunol,2009,206(1/2):22-27

[收稿日期]2017-01-03