

体外高效扩增人外周血调节性T细胞技术的建立

王星,吴倩,王悦舒,张玲玉,秦瑶,许馨予,张梅*

南京医科大学第一附属医院内分泌科,江苏 南京 210029

[摘要] 目的:建立一种调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)体外高效扩增技术。方法:流式细胞仪分选健康人外周血CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T细胞,CD3/CD28磁珠刺激联合高浓度白介素-2(interleukin 2, IL-2)培养14 d。通过细胞计数评估Tregs体外扩增能力,采用流式细胞仪鉴定扩增Tregs的表型,采用混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR)实验检测Tregs的抑制功能。结果:CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T细胞培养14 d后增殖(755.5 ± 213.5)倍。流式细胞鉴定扩增后的细胞:CD4分子表达为(98.3 ± 1.04)%, CD19分子表达为(0.039 ± 0.021)%, CD8分子表达为(0.443 ± 0.239)%, CD25分子表达为(97.6 ± 1.35)%。FOXP3分子表达为(87.7 ± 5.5)%, Helios分子表达为(73.3 ± 2.9)%。MLR实验显示:Tregs以不同比例与外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)共培养,当Tregs:PBMC为1:1时, PBMC增殖抑制率最高,为(84.39 ± 1.98)%。结论:成功建立一种体外高效扩增Tregs技术。扩增后细胞保留原有的细胞表型,并具备免疫抑制功能,为临床运用Tregs治疗自身免疫性疾病、抑制移植排斥反应提供了广阔的应用前景。

[关键词] 调节性T细胞;体外扩增;表型;功能;

[中图分类号] R329.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)08-1034-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180804

Establishing a method for expansion of human regulatory T cells with high efficiency *in vitro*

Wang Xing, Wu Qian, Wang Yueshu, Zhang Lingyu, Qin Yao, Xu Xinyu, Zhang Mei*

Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To establish a method to isolate and culture regulatory T cells *in vitro* with high efficiency. **Methods:** CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T cells were isolated by fluorescence-activated cells sorting and cultured *in vitro* with anti-CD3-anti-CD28-coated microbeads and IL-2 in 2 weeks. Count cells numbers to evaluate the expansion ability, phenotype of expanded cells were identified with flow cytometry and the suppressive function was examined by mixed lymphocyte reaction. **Results:** A mean expansion of (755.5 ± 213.5) fold was obtained after cultured for 2 weeks. In addition, the expression of CD4, CD19, CD8, and CD25 in the expanded cells are (98.3 ± 1.04)%, (0.039 ± 0.021)%, (0.443 ± 0.239)% and (97.6 ± 1.35)% respectively. FOXP3⁺ cells accounts for (87.7 ± 5.5)% and Helios⁺ cells accounts for (73.3 ± 2.9)% of expanded cells. Cultured cells shows highest suppressive capacity with (84.39 ± 1.98)% suppression of activated PBMC at responder:Treg ratio of 1:1. **Conclusion:** The research provides a method to obtain large quantity of Tregs with high efficiency *in vitro*. The expanded cells remain their original phenotype and have ability of immune suppression which has great significance in cell therapy for treating autoimmune diseases and transplant rejections.

[Key words] regulatory T cells; expansion *in vitro*; phenotype; function

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(08): 1034-1038]

调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)是具有免疫负调控作用的CD4⁺T细胞亚群。其中最常见的是胸腺产生的tTregs(thymus-derived Tregs, tTregs)

[基金项目] 国家自然科学基金(81070622, 81370939, 81670756, 81530026);江苏省“333高层次人才培养工程”(2016-7)

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

即天然Tregs(natural Tregs, nTregs)以连续性表达CD25和FOXP3为特征^[1]。Tregs通过分泌细胞因子、降低抗原提呈细胞能力等方式抑制体内的免疫反应^[2],维持机体的自身免疫耐受^[3]。在动物研究中已证实回输Tregs能够治疗或延缓自身免疫疾病、降低造血干细胞移植和实体器官移植后的免疫排斥反应^[4-5]。因此,Tregs可作为一种具有应用前景

的细胞治疗方法。然而,制约Tregs进行临床应用的局限性在于:①Tregs数量少。体重70 kg成年人体内Tregs总数大约为 0.2×10^9 个,而治疗移植后的免疫排斥反应所需要的Tregs总剂量为 $(49 \sim 79) \times 10^9$ 个^[6]。体内天然Tregs数量不足以满足临床治疗所需。②目前国内已有的体外扩增人Tregs的研究存在培养周期长,增殖效率低等问题^[7]。③有研究报道体外刺激Tregs增殖后,其稳定性和功能可能会下降^[8]。因此,急需建立一种体外高效扩增Tregs的技术,以获得足够数量和功能稳定的Tregs。

本研究采用流式细胞仪从外周血中分选Tregs,成功建立体外高效扩增Tregs的方案,并对扩增后Tregs进行表型和功能鉴定,为进行Tregs临床研究奠定了重要的实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

健康人外周血由江苏省血液中心提供,淋巴细胞分离液(Stem Cell公司,美国),CD4-PerCP抗体、CD127-PE抗体、CD19-APC抗体、流式细胞仪FACS Aria、FACSCalibur、抗CD3、抗CD28抗体(BD公司,美国),CD25-APC抗体、CD3-PE抗体、CD8-FITC抗体、FOXP3-Alexa Fluor 488抗体、Helios-PE抗体(Bio Legend公司,美国),RPMI1640溶液、人CD3/CD28磁珠(Gibco公司,美国),人AB血清(Gemini公司,美国),人重组白介素-2(interleukin, IL-2, 江阴四环生物制药公司)。

1.2 方法

1.2.1 体外分离CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T细胞

用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),无菌PBS溶液重悬(浓度为 1×10^8 个/mL),加入CD4-PerCP抗体($1 \mu\text{L}/10^6$ 个细胞)、CD25-APC抗体($2.5 \mu\text{L}/10^6$ 个细胞)、CD127-PE抗体($1 \mu\text{L}/10^6$ 个细胞),4℃避光孵育30 min。加入2 mL无菌PBS溶液,离心(1 500 r/min, 5 min),弃上清。用含有10%人AB血清的PBS溶液重悬细胞(浓度为 3.5×10^7 个/mL),流式细胞仪进行分选,收集CD4⁺CD25⁺CD127^{low}的T细胞,即为Tregs。

1.2.2 体外高效扩增CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T细胞

含10%人AB血清、1%青链霉素的X-vivo完全培养基重悬Tregs(2×10^5 个/mL),按细胞数:磁珠数为1:1的比例加入人CD3/CD28磁珠,将细胞接种于48孔培养板中,每孔加入500 μL 。48 h后补500 μL 培养基,并加入人重组IL-2终浓度为300 U/mL。显

微镜下观察细胞状态,根据细胞培养状态分别在培养第2、5、7、9、12天根据进行离心换液或半量换液后重新进行细胞接种铺板,确保人重组IL-2的终浓度为300 U/mL。培养第9天进行细胞计数后再次按1:1比例加入人CD3/CD28磁珠,继续培养,共培养14 d。

1.2.3 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T细胞扩增后表型鉴定

收集高效扩增后细胞,离心(1 500 r/min, 5 min),弃上清。计数后用无菌PBS溶液重悬细胞(10^6 个细胞/100 μL)。1号管加入CD3-PE、CD8-FITC、CD4-PerCP、CD19-APC抗体,4℃避光孵育30 min,加入2 mL无菌PBS溶液,离心(1 500 r/min, 5 min),弃上清用300 μL PBS重悬,流式细胞仪检测。2号管加入CD4-PerCP、CD25-APC抗体,4℃避光孵育30 min后破膜固定,加入FOXP3-Alexa Fluor 488、Helios-PE抗体进行胞内染色,4℃避光孵育30 min,加入2 mL无菌PBS溶液,离心(1 500 r/min, 5 min),弃上清用300 μL PBS重悬,流式细胞仪检测。

1.2.4 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T细胞扩增后免疫抑制功能检测

靶细胞:分离PBMC,用含2.5%人AB血清、1%青链霉素、抗CD3抗体和抗CD28抗体($2 \mu\text{g}/\text{mL}$)的RPMI1640重悬,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL;效应细胞:收集体外高效扩增的细胞,同样用RPMI1640培养基重悬细胞。将效应细胞和靶细胞按1:0、1:1、1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、0:1共培养,每个浓度设3个复孔,加入U型96孔板中。37℃含5%CO₂培养箱共培养4 d。在检测前16 h,每孔加入³H-TdR 20 μL ,继续培养16 h,吸取每孔培养基于玻璃纤维纸上,抽气过滤,并用蒸馏水充分洗涤,抽吸,加无水乙醇适量,抽吸脱水,将滤纸片烘干后浸入闪烁液中,置液体闪烁计数器上测定每个样品的每分钟脉冲值(counts per minute, CPM)。增殖水平用CPM值表示。抑制率=100%×(不含Tregs的PBMC孔CPM值-Tregs与PBMC共培养孔CPM值)/不含Tregs的PBMC孔CPM值。

1.3 统计学方法

运用SPSS23.0统计软件,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用t检验进行两组间比较。采用FlowJo 10.0制作流式图。使用GraphPad Prism7.0绘制增殖曲线及抑制效应图。实验均独立重复3次。

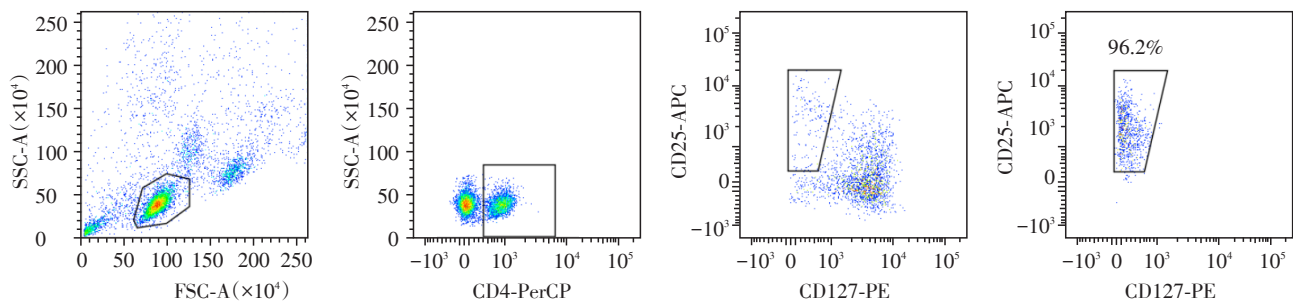
2 结果

2.1 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T细胞在体外可高效扩增
分离PBMC用抗体标记后用流式细胞仪分选,

圈出淋巴细胞群,以CD4⁺T细胞设门,分选出CD25⁺CD127^{low}细胞。流式鉴定Tregs分选纯度,均在95%以上(图1)。显微镜下观察细胞接种时,细胞数量较少,零落分布,形状为圆形透亮。扩增后出现分裂状细胞,低倍显微镜下观察出现以磁珠为中心的细胞集落。细胞培养14 d后,增殖(755.5 ± 213.5)倍(图2)。

2.2 扩增后的CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T细胞高保留原细胞表型

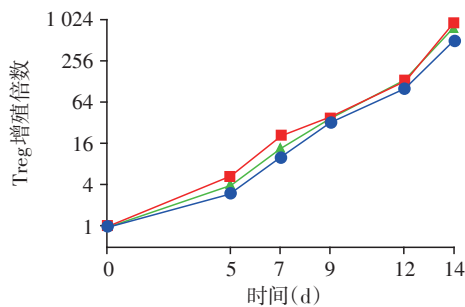
标记抗体后用流式细胞仪检测扩增后细胞,结果显示扩增后的细胞表达CD3CD4分子百分比为(98.3 ± 1.04)%,CD19分子表达率为(0.039 ± 0.021)%,CD8分子表达率为(0.443 ± 0.239)%,高表达对维持自身免疫耐受和抑制自身免疫性疾病的



分离人外周血PBMC后,分别用CD4、CD25和CD127抗体标记。A:根据细胞形态分选出淋巴细胞群;B:以CD4阳性细胞设门;C:分选CD25⁺CD127^{low}细胞为Tregs;D:回测分选纯度大于95%(n=3)。

图1 流式分选CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T细胞及纯度鉴定

Figure 1 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} cells were selected and their purities were detected by FACS Aria flow cytometer



用人CD3/CD28磁珠联合IL-2(300 U/mL)培养Tregs,14 d后增殖(755.5 ± 213.5)倍(n=3)。

图2 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T细胞在体外高效扩增

Figure 2 Proliferation rate of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T cells in 14 days culture

关键分子CD25(97.6 ± 1.35)%,同时表达Tregs特异性FOXP3转录因子(87.7 ± 5.5)%和Helios分子(73.3 ± 2.9)%(图3)。

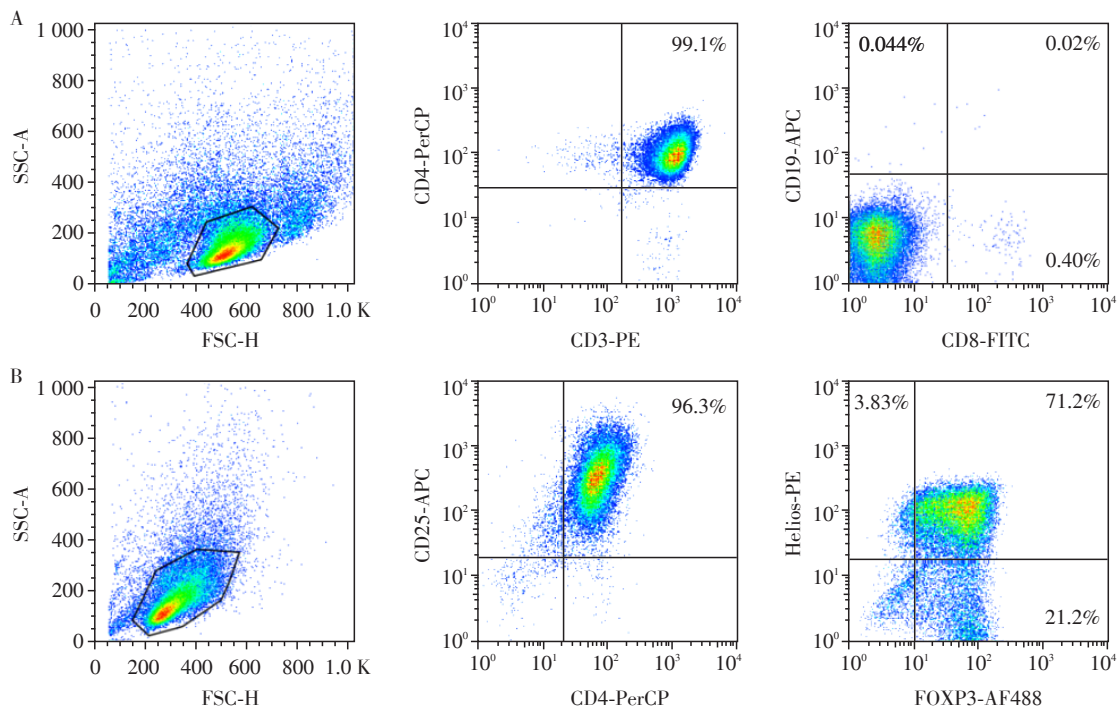
2.3 扩增后的CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T细胞具有免疫抑制功能

将扩增后细胞与PBMC进行混合淋巴细胞培养实验,观察Tregs对PBMC增殖的抑制能力。将Tregs与PBMC以1:32比例混合培养时CPM值(14 296 ± 564),与不加Tregs(19 341 ± 1 055)时比较CPM值降低(P < 0.01),PBMC增殖的抑制率为

(29.74 ± 10.74)%。随着Tregs比例上升,当Tregs与PBMC共培养比例为1:1时,Tregs对PBMC的抑制作用明显增强,CPM值为(3 184 ± 96),PBMC增殖的抑制率可达到(84.39 ± 1.98)%(P < 0.01,图4)。

3 讨论

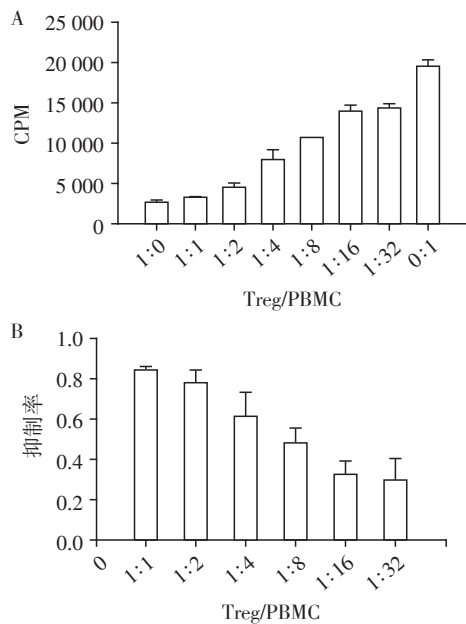
调节性T细胞是一类具有免疫负调节功能的细胞,其通过一系列免疫调节机制维持机体免疫耐受。首先,它连续性表达CD25,对IL-2有高亲和力。在免疫活化阶段产生低剂量的IL-2首先被Tregs消耗,促进Tregs活化并阻止效应性T细胞进一步免疫活化。在主动免疫反应中,抗原激活Tregs表面的TCR后,通过活化Tregs和产生IL-10、IL-35、TGF-β和cAMP等抑制因子,增强Tregs的免疫抑制能力。因此,Tregs能够抑制免疫应答,延缓或阻止免疫反应发生^[9]。在动物模型中已证明Tregs能够治疗多种自身免疫疾病、抑制移植植物抗宿主反应^[10-11]。然而,临床中使用Tregs进行细胞治疗仍面临困难和挑战。Tregs在人外周血中的比例很低,仅占CD4⁺T细胞的5%~7%。为了获得足够治疗数量的Tregs,需要在体外进行培养及扩增。然而Tregs在体外缺乏抗原刺激,增殖能力较低^[1]。国内现有的体外扩增Tregs的研究显示:Tregs在体外培养6周后可增殖



A: 体外培养 14 d, 扩增后细胞表型为 CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD19⁻ (n=3); B: 体外培养 14 d, 扩增后的细胞为 CD4⁺CD25⁺T 细胞, 并且高表达 FOXP3 (87.7 ± 5.5)%, Helios (73.3 ± 2.9)%(n=3)。

图3 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T 细胞扩增后表型鉴定

Figure 3 Phenotype of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T cells after expansion



A: 不同比例 Tregs 抑制 PBMC 增殖能力, 细胞共培养后检测 ³H 渗入率, 细胞增殖能力以 CPM 值显示。比较不加 Tregs 时将 Tregs 与 PBMC 以 1:1 比例混合培养 CPM 值(19341 ± 1055) vs (3184 ± 96), P < 0.01; B: 不同比例 Tregs 抑制 PBMC 增殖的抑制率。Tregs 与 PBMC 共培养比例为 1:1 时, PBMC 增殖的抑制率可达到 (84.39 ± 1.98)%(n=3)。

图4 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T 细胞扩增后功能鉴定

Figure 4 Suppression capacity of expanded CD4⁺CD25⁺CD127^{low} T cells

1 000 倍。但培养周期较长, 扩增效率较低, 仍不能满足临床治疗需求。本研究通过 CD3/CD28 磁珠联合 IL-2 刺激, 体外扩增 Tregs, 结果显示培养 2 周后细胞能够增殖(755.5 ± 213.5)倍, 显著提高了 Tregs 扩增的效率^[7]。

Tregs 中 FOXP3 的表达对于维持 Tregs 的稳定和功能具有重要意义。有研究显示在体外长时间刺激 Tregs 增殖后, 其 FOXP3 的表达降低, Tregs 稳定性下降^[8]。本研究 Tregs 的培养周期为 2 周, 扩增后 Tregs 的 FOXP3 表达水平为(87.7 ± 5.5)%, 确保了扩增后细胞的稳定性。另外, 本文中扩增后的这群细胞在体外能够显著抑制活化后 PBMC 的增殖, 显示扩增后的细胞仍具有免疫抑制能力。

Tregs 的种类包括胸腺中产生的 tTregs (thymus-derived Tregs, tTregs)、在外周组织由 FOXP3⁺ 细胞转化产生的 pTregs (peripherally-derived Tregs, pTregs) 以及体外通过 TGF-β 刺激 CD4⁺CD25⁺ T 细胞产生的 iTregs (in vitro-induced, iTregs)^[12]。尽管体外诱导产生的 iTregs 与 tTregs 表型均为 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ 且具有抑制能力, 有研究表明 iTregs 与 tTregs 相比抑制能力不完全且稳定性较差^[13]。本研究分选的是胸腺来源的天然 Tregs。Helios 被认为是优先表达于胸腺

来源的tTregs,能够作为区分tTregs与iTregs及pTregs的标志,它的表达不需要FOXP3活化^[14]。在本研究中,扩增后的Tregs仍高表达Helios,进一步证实体外刺激扩增后,Tregs维持其原有的细胞表型。

在同种异体活体移植中,体内存在大量活化的效应T细胞,而具有负调控作用的Tregs数量较少,导致移植排斥反应发生和移植物破坏。因此,增加Tregs的数量有助于诱导机体免疫耐受。Tregs数量的增加可通过直接输注Tregs或通过促进内源性Tregs扩增来获得。与诱导内源性Tregs相比,输注外源性Tregs细胞提供了可控的Tregs剂量和特异性,同时能够把握准确的治疗时机。国外一系列临床研究也证实了Tregs进行细胞治疗的可行性和有效性。Di等^[15]给进行造血干细胞移植患者输注供者外周血新鲜分选的Tregs和效应性T细胞,证明在促进免疫系统重建的同时,Tregs能够抑制移植物抗宿主反应。有学者在5例患者体内分选CD4⁺CD25⁺的Tregs,体外扩增后回输到体内,观察到患者体内的Tregs数量增多,外周血CD4⁺和CD8⁺T细胞活化信号CD69表达下降,2例患者的移植物抗宿主症状缓解。Tregs治疗1型糖尿病患者的I期临床研究结果也显示良好的安全性,部分接受治疗患者的C肽水平有显著上升^[16-17]。这些临床研究显示Tregs在移植排斥反应及自身免疫性疾病中具有广阔的应用前景。

本研究建立了人外周血Tregs体外高效扩增的技术,该技术具有细胞培养周期短、扩增效率高、细胞表型及功能稳定的特点。该研究为Tregs应用于移植排斥反应和自身免疫性疾病的临床治疗奠定了实验基础。

[参考文献]

- [1] Vaikunthanathan T, Safinia N, Boardman D, et al. Regulatory T cells: tolerance induction in solid organ transplantation[J]. Clin Exp Immunol, 2017, 189(2): 197-210
- [2] Hou TZ, Verma N, Wanders J, et al. Identifying functional defects in patients with immune dysregulation due to LRBA and CTLA-4 mutations[J]. Blood, 2017, 129(11): 1458-1468
- [3] Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, et al. Human FoxP3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases[J]. Autoimmun Rev, 2011, 10(12): 744-755
- [4] Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, et al. *In vitro*-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes[J]. J Exp Med, 2004, 199(11): 1455-1465
- [5] Li W, Carper K, Zheng XX, et al. The role of Foxp3⁺ regulatory T cells in liver transplant tolerance[J]. Transplant Proc, 2006, 38(10): 3205-3206
- [6] Tang Q, Lee K. Regulatory T-cell therapy for transplantation: how many cells do we need?[J]. Curr Opin Organ Transplant, 2012, 17(4): 349-354
- [7] 周 剑, 罗邦伟. 人外周血单个核细胞来源CD4⁻CD25⁻调节性T细胞的体外扩增培养及功能研究[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(6): 504-507
- [8] Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, et al. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells upon repetitive *in vitro* stimulation[J]. Eur J Immunol, 2009, 39(4): 1088-1097
- [9] Tang Q, Vincenti F. Transplant trials with Tregs: perils and promises[J]. J Clin Invest, 2017, 127(7): 2505-2512
- [10] 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[J]. Blood, 2002, 99(10): 3493-3499
- [11] Mukherjee R, Chaturvedi P, Qin HY, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells generated in response to insulin B:9-23 peptide prevent adoptive transfer of diabetes by diabetogenic T cells[J]. J Autoimmun, 2003, 21(3): 221-237
- [12] Shevach EM, Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences[J]. Immunol Rev, 2014, 259(1): 88-102
- [13] Feuerer M, Hill JA, Kretschmer K, et al. Genomic definition of multiple *ex vivo* regulatory T cell subphenotypes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(13): 5919-5924
- [14] Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells[J]. J Immunol, 2010, 184(7): 3433-3441
- [15] Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation[J]. Blood, 2011, 117(14): 3921-3928
- [16] Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszuk A, et al. Administration of CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ regulatory T cells preserves beta-cell function in type 1 diabetes in children[J]. Diabetes Care, 2012, 35(9): 1817-1820
- [17] Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells[J]. Sci Transl Med, 2015, 7(315): 315ra189

[收稿日期] 2018-03-13