

[文章编号] 1000-2200(2004)06-0479-03

成人外周血细胞中 Th2 功能亚群分化的体外实验研究

朱安友, 陈礼文, 李柏青

[摘要] 目的: 研究中性条件和 Th2 极化条件下 CD3 单克隆抗体(CD3mAb)激活的人外周血 $\alpha\beta$ T 细胞 Th1/Th2 型细胞因子的表达。方法: 用 CD3mAb、IL-2 刺激人外周血单个核细胞(PBMC), 作为 CD3mAb 激活的 T 淋巴细胞(CD3AT)的中性条件培养; 用 CD3mAb、IL-2、rhIL-4 和抗人 IL-12 抗体, 作为 Th2 极化条件。分别收集 PBMC 和培养后第 7、14 和 21 天细胞, 加 PMA、ionomycin 和 monensin 作用 6 h 后, 用多色荧光抗体标记, 在流式细胞仪上检测 $\alpha\beta$ T 细胞中胞内 IFN- γ 或 IL-4 产生细胞的比例。结果: PBMC 中 IFN- γ^+ 或 IL-4 $^+$ $\alpha\beta$ T 细胞分别为 23.6%、2.4%。与中性条件相比, Th2 极化条件下培养 3 周, $\alpha\beta$ T 细胞中 IFN- γ 产生细胞明显减少($P < 0.001$), IL-4 $^+$ 产生细胞显著增加($P < 0.001$); 同时产生 IFN- γ^+ IL-4 $^+$ 细胞从 3.6% 增加至 6.1%。结论: 体外 Th2 极化条件可以使人外周血 $\alpha\beta$ T 细胞分化为 Th2 功能亚群。

[关键词] 细胞分化; Th2 极化; $\alpha\beta$ T 细胞; Th1/Th2 细胞因子; 流式细胞术

[中国图书资料分类法分类号] R 329.21 [文献标识码] A

Studies on differentiation of Th2 functional subset among adult peripheral blood cells *in vitro*

ZHU An-you, CHEN Li-wen, LI Bai-qing

(Department of Immunology, Bengbu Medical College, Anhui 233003, China)

[Abstract] **Objective:** To study expression of Th1/Th2 type cytokines in human peripheral $\alpha\beta$ T cells activated with CD3 monoclonal antibody(CD3mAb), cultured in neutral and Th2 type polarizing condition. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) were stimulated with CD3mAb to generate CD3mAb activated T cells(CD3AT); CD3AT cells were cultured in medium with IL-2 as neutral culturing condition, or with IL-4 plus anti-IL-12 neutralizing Ab as Th2 type polarizing condition for three weeks. Fresh isolation PBMC and cultured CD3AT for 7 to 21 days in neutral and Th2 type polarizing condition were stimulated with Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), ionomycin and monensin. Intracellular cytokines of cell were stained with multicolor fluorescence mAb. The percentage of Th1 and Th2 expressing cell among fresh PBMC or CD3AT were measured by flow cytometry. **Results:** The percentages of IFN- γ and IL-4 producing T cells among fresh isolation PBMC were 23.6% and 2.4%, respectively. Compared to the neutral condition, in the culture of Th2 polarizing condition for 3 weeks the percentages of IFN- γ^+ producing cells among CD3AT sharply decreased($P < 0.001$) and that of IL-4 producing T cells had significant increase($P < 0.001$), and that of IFN- γ^+ IL-4 $^+$ $\alpha\beta$ T cells modestly increased(3.6% to 6.1%). **Conclusions:** $\alpha\beta$ T cells in human peripheral blood could be developed as type-2 functional subset in Th2 polarizing condition *in vitro*.

[Key words] cell differentiation; Th2 polarizing; $\alpha\beta$ T lymphocyte; Th1/Th2 type cytokine; flow cytometry

人体 CD4 $^+$ $\alpha\beta$ T 细胞主要通过多种细胞因子的分泌参与对病原体的免疫应答, 就产生细胞因子的类型和生物学功能而言, CD4 $^+$ $\alpha\beta$ T 细胞至少可以分为 Th1、Th2 和 Th0 三类亚型。Th1 细胞产生 IL-2、IFN- γ 、TNF- β 等细胞因子, 主要参与细胞介导的免疫应答; Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-10 等细胞因子, 主要促进体液免疫反应; Th0 细胞则为 Th1/Th2 的前体细胞, 同时分泌 Th1/Th2 型细胞因子。

Th 细胞的功能性极化对机体抗细菌、病毒感染、超敏反应、自身免疫性疾病的发生、转归有密切关系。有研究资料^[1]显示, 细胞因子微环境对 CD4 $^+$ $\alpha\beta$ T 细胞 Th1/Th2 分化起到关键的作用, 目前对这方面的研究国内尚未见报道。本文旨在通过添加 IL-4、抗 IL-12 作为 Th2 极化条件, 采用多色荧光抗体标记, 流式细胞术检测 $\alpha\beta$ T 细胞 Th1/Th2 型细胞因子来分析其 Th1/Th2 分化特点。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 本实验所用的人外周血细胞均来自本校健康教职工和学生, 共 5 名, 其中男 3 名, 女 2 名; 年龄 24~50 岁。

1.2 主要仪器 流式细胞仪, FACSCalibur, BD 公司; CO₂ 培养箱, Harris hw0301, 美国产; 低温离心

[收稿日期] 2004-08-03

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号: 30070721)

[作者单位] 蚌埠医学院免疫学教研室, 安徽蚌埠 233003(现工作单位: 蚌埠医学院附属医院 检验科)

[作者简介] 朱安友(1968—), 男, 安徽蚌埠人, 硕士, 主要从事细胞免疫研究。

[通讯作者] 李柏青, 教授, 硕士生导师, E-mail: bb_bqli@yahoo.com

机, Eppendor 5810R 型, 德国产; 倒置显微镜, 梧光 WJ12-50, XSB-14 型。

1.3 主要单抗 抗人 TCR $\alpha\beta$ -FITC、抗人 IL-4-Biotin、抗人 IFN- γ -PE、鼠 IgG1-FITC、鼠 IgG2a-PE 等购自 Ancell 公司; CD3mAb, 美国宾夕法尼亚大学医学院微生物系 Carding 博士惠赠; Streptavidin PE-Cy5 购自 Bioscienc 公司。

1.4 其它试剂 PMA、Ionomycin、PFA、Saponin、monesion 等为 Sigma 公司产品; RPMI 1640 细胞培养基购自 GIBCO 公司; rhIL-4 为 PeproTech 公司产品; anti-humanIL-12 (clone: B-T21) 购自 Bender Medsystem; 淋巴细胞分离液购自 TBD 生物技术的发展中心; 小牛血清 (NBS) 购自杭州四季青公司; rhIL-2 购自长春生物制品研究所。

1.5 细胞培养 常规分离健康成人外周血单个核细胞 (PBMC), 用含 5% 小牛血清-5% 人自体血浆的 RPMI 1640 培养液, 调整细胞浓度为 2×10^6 /ml。将 PBMC 悬液放入 48 孔培养板, 每孔 0.5 ml; 加入刺激剂 CD3mAb 每孔 5 μ g、rhIL-2 每孔 25 u, 作为 CD3AT 中性条件培养; 加入刺激剂 CD3mAb 每孔 5 μ g、rhIL-2 每孔 25 u、rhIL-4 每孔 10ng 和抗人 IL-12 每孔 0.5 μ g, 为 Th2 极化条件培养。每隔 3 天左右观察增殖细胞并进行分孔扩增培养, 同时补充上述同样剂量 rhIL-2、rhIL-4 和抗人 IL-12。分别于培养的第 7、14 和 21 天时收集细胞用于检测胞内细胞因子。

1.6 T 细胞的胞内细胞因子检测

1.6.1 细胞激活方法 新鲜 PBMC 用上述方法制备细胞悬液 (1×10^6 /ml), 放入 24 孔培养板, 每孔 1 ml, 加入 PMA 50 ng/ml 和 Ionomycin 1 μ g/ml, 于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养 2 h, 加入 monesion 2.5 μ mol/L, 继续培养 4 h 后收集细胞用于检测; 另外设有不加刺激剂的未激活组细胞。而上述不同条件培养的 CD3AT, 用培养液洗一次后, 重悬于培养液, 调整细胞浓度 1×10^6 /ml, 放入 24 孔培养板, 每孔 1 ml, 用 PMA 10 ng/ml, Ionomycin 500 ng/ml, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 2 h, 加 monesion 2.5 μ mol/L, 继续培养 2 h 后, 收集细胞用于检测胞内细胞因子。

1.6.2 荧光抗体染色方法 收集待染细胞, 用染色缓冲液 (5% NBS-0.1% NaN₃-PBS) 每管 1 ml, 1 600 r/min, 5 min 洗一次, 离心后弃上清。加入抗人 TCR $\alpha\beta$ -FITC 表染, 4 $^{\circ}$ C 30 min, 加染色缓冲液每管 1 ml, 洗两次; 用 2% PFA 每管 500 μ l, 于 4 $^{\circ}$ C 固定 30 min, 然后用染色缓冲液每管 1 ml, 洗两次; 加透膜液 (0.1% Saponin-10% NBS-0.1% NaN₃-PBS) 每管

500 μ l, 透膜 4 $^{\circ}$ C 10 min, 离心后弃上清; 同时加入抗人 IFN- γ -PE 和抗人 IL-4-Biotin 作胞内染色, 4 $^{\circ}$ C 30 min; 透膜缓冲液洗两次; 然后加 Streptavidin-PE-Cy5, 4 $^{\circ}$ C 30 min, 透膜缓冲液洗一次, 染色缓冲液洗一次; 加 1% PFA 400 μ l, 流式细胞仪检测。每种不同条件培养和刺激的细胞组均分别设未加荧光标记抗体对照管; 未加刺激剂, 只加 monesion 阻断剂, 同样处理的阴性对照管和用小鼠 IgG1-FITC 作表面染色, 小鼠 IgG2a-PE 作胞内染色同样处理的同种型对照管。

1.7 流式细胞术检测胞内细胞因子数据获取及分析 用流式细胞仪 Cellquest 软件检测待检样品, 利用调节仪器染色管设置 PMT 电压和补偿, 利用同种型对照组区分是否有非特异性染色, 利用未染色组和阻断对照设置阴阳性界限。然后对待测样品进行检测。Cellquest 软件分析结果, 首先在前向散射光 (FSC) 和侧向散射光 (SSC) 点阵图上设定淋巴细胞区域 R1, 然后在 FL-1 和 FL-2 点阵图上 TCR $\alpha\beta$ 阳性区设定 $\alpha\beta$ T 细胞区域 R2, 通过设门 G2 = R1 \times R2 选择 $\alpha\beta$ T 细胞, 来分析 IL-4 或 IFN- γ 的表达细胞百分率情况。

1.8 统计学方法 采用 *t* 检验。

2 结果

PBMC 和不同条件下培养 7、14、21 天, $\alpha\beta$ T 细胞中 IFN- γ /IL-4 产生细胞的比例检测结果见表 1。结果显示: PBMC 中的 $\alpha\beta$ T 细胞, 25.0% 表达 IFN- γ , 2.6% 表达 IL-4, 其中共表达 IFN- γ 和 IL-4 的细胞为 1.2%; 说明这一细胞群体大部分处于初始状态。在中性条件下从第 7 天到 21 天, 一直有 60% 以上的 $\alpha\beta$ T 细胞表达 IFN- γ , 而 IL-4 产生细胞仅从 2.6% 上升至 6.6%, 其中共表达 IFN- γ 和 IL-4 的细胞为 3.6%。与中性条件相比, 在 Th2 极化条件下培养 21 天, $\alpha\beta$ T 细胞中 IFN- γ ⁺IL-4⁻ 产生细胞被显著下调 (从 70.6% 下降到 17.6%; *t* = 8.91, *P* < 0.001), 相反, IL-4 产生细胞增加非常显著 (从 6.0% 上升至 31.7%), 且主要表现为 IFN- γ ⁻IL-4⁺ 细胞 (从 2.4% 上升至 25.6%; *t* = 9.86, *P* < 0.001), 说明有相当部分的 $\alpha\beta$ T 细胞分化为 Th2 功能亚群。同时结果还显示在 Th2 极化条件下 IL-4⁺ 细胞的产生, 一般均在 14 天后才显著增加, 提示 Th2 型因子的表达是较为缓慢的。PBMC 和不同条件下培养 7 和 21 天, $\alpha\beta$ T 细胞中 IFN- γ /IL-4 表达的一次典型流式分析结果见图 1。

表1 CD3-AT 在中性和 Th2 极化条件下培养 $\alpha\beta$ T 细胞中 IFN- γ 和(或)IL-4 产生细胞的比例($n_i=5; \bar{x}\pm s$)

时间 (天)	培养 条件	$\alpha\beta$ T 细胞因子表达百分率(%)		
		IFN- γ^+ IL-4 $^-$	IFN- γ^- IL-4 $^+$	IFN- γ^+ IL-4 $^+$
	Δ	23.6 \pm 5.7	1.4 \pm 0.8	1.2 \pm 0.4
7	Neutral	67.9 \pm 8.3	1.7 \pm 1.3	1.9 \pm 0.6
	Th2	44.5 \pm 6.2	2.0 \pm 1.0	2.6 \pm 1.4
14	Neutral	66.2 \pm 7.3	1.8 \pm 0.9	2.2 \pm 1.3
	Th2	31.4 \pm 8.9**	3.9 \pm 1.1	3.7 \pm 0.6
21	Neutral	70.6 \pm 9.3	2.4 \pm 1.8	3.6 \pm 2.1
	Th2	17.6 \pm 9.5**	25.6 \pm 4.8**	6.1 \pm 2.2

Δ 新鲜分离PBMC; t 检验:与中性条件相同培养时间比较 ** $P<0.001$

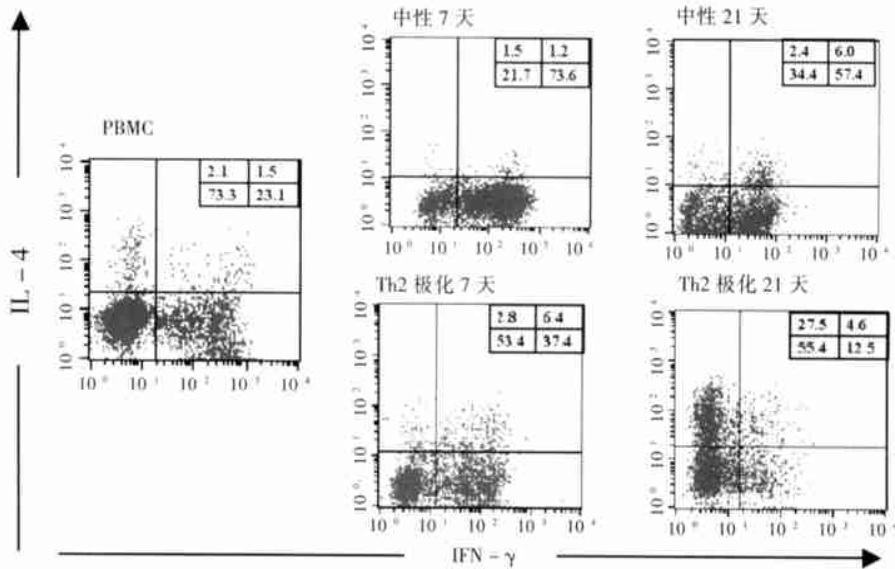


图1 PBMC 和不同条件培养 7 和 21 天时 $\alpha\beta$ T 细胞中 IFN- γ /IL-4 细胞的表达流式细胞术分析结果

IL-4 作为 Th2 极化条件, 抗 IL-12 抗体可中和单核细胞产生的 IL-12, 阻断 IL-12 受体途径的作用; IL-4 可通过 JAK-Stat 6 途径诱导 Th2 型细胞因子的产生, 并可下调 IL-12R β_2 的产生, 二者的协同作用共同促进 Th2 型细胞因子的产生。

结果表明相当部分的 $\alpha\beta$ T 细胞(CD4 $^+$ 和 CD8 $^+$ T 细胞)能明显分化为产生 IL-4 的 Th2 型细胞, 而产生 IFN- γ 的 Th1 细胞明显减少, 这与其他研究者的结果相一致^[1,4]。同时本研究结果还显示 Th2 细胞的分化较慢, 这可能与 Th2 型因子 IL-4 的转录基因如 GATA-3、c-maf 表达规律^[5]有关, 也有学者认为, 细胞须经过若干周期的增殖后, 才可能表达 IL-4^[6]。

本研究从一方面证实了细胞因子微环境可以影响 Th 细胞的功能性极化, 目前对 Th2 功能亚群的划分就产生细胞因子而言, 其细胞因子谱包括 IL-4、IL-5、IL-10 等, 但在本实验的时间点, 均未检测到 IL-10 产生细胞(资料没有显示), 这方面的可能原因有待于进一步研究。

3 讨论

处于初始状态的 Th 细胞(也称为 naive Th cell), 在抗原刺激后分化为中间状态的 Th0 细胞。细胞因子、抗原、抗原递呈细胞(APC)、共刺激信号及一些基因调控因子等因素均可促使 Th0 选择性地往 Th1 或 Th2 方向分化, 而细胞因子微环境起了最关键的作用^[2,3]。

本实验结果显示 PBMC 中的大部分 $\alpha\beta$ T 细胞处于初始状态, 在诱导 Th2 型细胞分化的实验中, 用 CD3mAb 激活 $\alpha\beta$ T 细胞, 同时添加抗人 IL-12 和

[参 考 文 献]

[1] Abehsira-Amar O, Gibert M, Joly M, et al. IL-4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells [J] . *J Immunol*, 1992, 148(12): 3 820~3 829.

[2] Ruedl C, Bachmann MF, Kopf M. The antigen dose determines T helper subset development by regulation of CD40 ligand [J] . *Eur J Immunol*, 2000, 30(7): 2 056~2 064.

[3] De Becker G, Moulin V, Tielemans F, et al. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by soluble and membrane proteins provided by antigen-presenting cells [J] . *Eur J Immunol*, 1998, 28(10): 3 161~3 171.

[4] Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more [J] . *Immunol Today*, 1996, 17(3): 138~146.

[5] Ray A, Cohn L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: New insights into the regulation of airway inflammation [J] . *J Clin Invest*, 1999, 104(8): 985~993.

[6] Cousins DJ, Lee TH, Staynov DZ. Cytokine coexpression during human Th1/Th2 cell differentiation: Direct evidence for coordinated expression of Th2 cytokine [J] . *J Immunol*, 2002, 169(5): 2 498~2 506.