

[文章编号] 1000-2200(2008)06-0743-04

· 基础医学 ·

NOD 小鼠 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞功能变化研究李卫鹏¹, 申 勇¹, 胡永全¹, 史桂英², 王福庆³

[摘要] 目的: 观察 NOD 小鼠 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的功能变化。方法: 流式细胞仪分析 NOD 小鼠胰腺引流淋巴结 (PLN) CD4⁺ CD25⁺ T 细胞频率, CD4⁺ CD25⁺ T 细胞中 FoxP3⁺ 细胞的比例, CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞的 FoxP3 平均荧光强度 (MFI); 检测 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的抑制功能。结果: 在不同的年龄阶段, CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞数量未发生明显变化, 而随着时间的推移, CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞中 FoxP3 表达水平降低, CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的功能也下降。结论: CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的抑制功能降低可能是 NOD 小鼠糖尿病发作的根本原因。

[关键词] 糖尿病, 实验性; 免疫, 细胞; 平均荧光强度; 转录因子 FoxP3; 小鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 392.12 [文献标识码] A

Changes of function of CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells in NOD miceLI Wei-peng¹, SHEN Yong¹, HU Yong-quan¹, SHI Gui-ying², WANG Fu-qing³

(1. Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;

2. Department of Cell Biology, 3. Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiaotong University of Medicine, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the function of CD4⁺ CD25⁺ T regulatory (CD4⁺ CD25⁺ Treg) cells in NOD mice. **Methods:** The frequency of CD4⁺ CD25⁺ T cells from pancreatic lymph node (PLN) was analysed, the percentages change over time in the proportion of NOD CD4⁺ CD25⁺ T cells expressing Foxp3 were observed, mean fluorescent intensity (MFI) of Foxp3 in CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T cells was assayed, and in vitro suppression assay was performed. **Results:** No percentages change over time in the proportion of NOD CD4⁺ CD25⁺ T cells expressing Foxp3 were observed. But the mean fluorescent intensity (MFI) of Foxp3 in CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T cells decreased with time. In vitro suppression assay, PLN CD4⁺ CD25⁺ T cells show decrease in their ability to suppress the proliferation of CD4⁺ CD25⁻ T cells. There exists some relationship between the impairment of in vitro suppression and the reduction at the protein expression levels of Foxp3 on a per-cell basis. **Conclusions:** It is the impairment of the function of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells that results in the development of diabetes mellitus in NOD mice.

[Key words] diabetes mellitus, experimental; immunity, cellular; mean fluorescent intensity; transcription factor FoxP3; mice

近年来研究发现, CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 是 CD4 细胞中具有调节作用的一个亚群。CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞与自身免疫性疾病、超敏反应、肿瘤、移植排斥、炎症的发生发展和转归有很大关系。而 1 型糖尿病作为一种自身免疫性疾病, 是个慢性发作的过程; 对 NOD 小鼠而言, 一般在 20 周之后才会发作糖尿病。为何小鼠出现血糖升高需要一个漫长的过程, 在其间 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞发生了哪些改变, 尚未见报道。本研究观察 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞在雌性 NOD 小鼠的糖尿病发生过程中是否存在动态变化, 探讨其与糖尿病的发作是否存在关联。

1 材料与方法

1.1 实验动物 NOD 雌性小鼠: 在上海交通大学医学院实验动物科学部无特定病原菌 (specific pathogen free, SPF) 条件下饲养。

1.2 主要材料、试剂 淋巴细胞分离液 Ficoll-Hypaque (上海试剂二厂); anti-mouse CD4-PE/Cy5, CD25-PE, FoxP3-FITC, CD3, CD28 (eBioscience, USA); 96 well U-bottom plate (costar, USA); 200 目滤网; MS column (Miltenyi Biotec); 15 ml 离心管 (BD Falcon); ³H-TdR (上海原子核研究所); 胎牛血清 (Hyclone Lab, Inc); RPMI 1640 培养液 (Invitrogen Corp); 氨苄西林、链霉素 (Hyclone Lab, Inc); 2-巯基乙醇 (2-ME)。

1.3 主要仪器 流式细胞仪 FACSscan (Becton Dickinson, USA); 低温高速离心机 (Beckman GS-15R, USA); CO₂ 培养箱 (GIBCO, German); 多头收集仪 (TOMTECHarvester96); β 液闪仪 (Perkin Elmer); 血糖检测仪 (OneTouch Horizon)。

1.4 小鼠血糖检测 75% 乙醇棉球消毒小鼠尾部,

[收稿日期] 2008-08-28

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第一附属医院 核医学科, 安徽 蚌埠 233004; 上海交通大学医学院 2. 细胞生物学教研室, 3. 上海市免疫学研究所, 上海 200025

[作者简介] 李卫鹏 (1973 -), 男, 博士, 研究方向: 自身免疫病的免疫调节机制

用无菌剪刀自尾巴远端剪去少许,弃去第1滴血,用测试条采集第2滴血。血糖检测仪测定血糖浓度。单次非禁食血糖高于16.7 mmol/L或者连续两次血糖检测浓度高于13.9 mmol/L,则可判定为NOD小鼠糖尿病发作。

1.5 胰腺引流淋巴结(PLN)中单个核细胞(MNCs)的分离 取不同周龄NOD雌性小鼠断颈处死。浸泡在75%乙醇中5 min,无菌术取胰腺引流淋巴结,置于含10% FCS、2 mmol/L EDTA的1640培养液的平皿中,经尼龙滤网碾碎后,再用200目筛网过滤除去组织块。细胞悬液沿着管壁轻轻加入含有Ficoll-Hypaque试管中,不要破坏液面。细胞悬液和分离液的比例为2:1。20℃ 2 000 r/min离心20 min。取中间层细胞,此即为MNCs。用1640培养液洗涤1次,调整至所需的细胞浓度。

1.6 淋巴细胞流式染色(CD4, CD25, FoxP3三标)

含有 1×10^6 个淋巴细胞的细胞悬液中加入PE/Cy5-anti-CD4、PE-anti-CD25各1 μ l,置于4℃,避光保存30 min,其间混匀1次。加入流式染色缓冲液(PBS, pH 7.2, 0.1% BSA, 0.05% NaN_3) 2 ml,于4℃ 300 r/min离心10 min,弃上清。用2 ml固定/破膜液重悬细胞,4℃避光放置0.5~18 h。加入2 ml固定/破膜缓冲液,于4℃ 500 r/min离心10 min,弃上清。重复洗涤1次。重悬细胞,加入封闭抗体(FcBlocking Ab)1 μ l,4℃避光孵育15 min。加入1 μ l FITC-anti-FoxP3,4℃避光孵育30 min。加入2 ml固定/破膜缓冲液,于4℃ 500 r/min离心10 min,弃上清。重复洗涤1次。500 μ l流式染色缓冲液重悬细胞。上机待测。

1.7 细胞分选

1.7.1 Dynal beads 阴性分选 CD4⁺T细胞 每 1×10^7 细胞中加入PBS/0.1% BSA 100 μ l 加入热灭活的FCS 20 μ l。加入混合抗体20 μ l。充分混匀,2~8℃孵育20 min。每 1×10^7 细胞中加入2 ml PBS/0.1% BSA,300 r/min,2~8℃离心8 min。弃上清。重悬细胞,每 1×10^7 细胞中加入PBS/0.1% BSA 800 μ l,再加入200 μ l预洗过的磁珠。充分混匀,18~25℃孵育15 min,双向振荡。用1 000 μ l吸头轻轻反复吹打磁珠5~6次,然后加入1 ml PBS/0.1% BSA。置于磁场中2 min。将上清转移至另一试管中。此上清中含有阴选得到的CD4⁺T细胞。

1.7.2 Anti-PE MicroBeads (Miltenyi Biotec Inc)进一步分选 CD4⁺CD25⁺T细胞和 CD4⁺CD25⁻T细胞 CD4⁺T细胞置于100 μ l缓冲液(PBS, pH 7.2,

含0.5% BSA, 2 mmol/L EDTA)中,每 1×10^7 CD4⁺T细胞加入10 μ l PE-anti-CD25。充分混匀,4~8℃避光孵育10 min。加入1~2 ml缓冲液,4~8℃ 300 r/min 10 min,弃上清。1~2 ml缓冲液重悬细胞,4~8℃ 300 r/min 10 min,弃上清。80 μ l缓冲液重悬细胞,每 1×10^7 CD4⁺T细胞加入20 μ l Anti-PE MicroBeads。充分混匀,4~8℃孵育15 min。加入1~2 ml缓冲液,4~8℃ 300 r/min离心10 min,弃上清。细胞重悬于500 μ l缓冲液中。将MS柱置于磁架上,用500 μ l缓冲液平衡柱子。重复3次。将细胞悬液加入柱子上,经过柱子流下来的细胞悬液即为CD4⁺CD25⁻T细胞,用500 μ l缓冲液洗柱子3次,洗脱下来的细胞悬液集中到一起。将磁柱拿离磁场,加入500 μ l缓冲液,用活塞轻轻加压,流出的细胞即为CD4⁺CD25⁺T细胞。

1.8 功能性抑制试验 用磁珠分离纯化的CD4⁺CD25⁺T细胞和CD4⁺CD25⁻T细胞按一定的比例混合:(1)CD4⁺CD25⁺T细胞和CD4⁺CD25⁻T细胞每孔50 000比例为1:1(每孔50 000);(2)CD4⁺CD25⁺T细胞每孔12 500和CD4⁺CD25⁻T细胞每孔50 000。加入照射(3 000 Rad)的脾脏单个核细胞(每孔100 000),用抗CD3(1 μ g/ml, eBioscience)和CD28(3 μ g/ml, eBioscience)刺激。在含有10% FBS的1640培养液中培养72 h,在反应结束18 h前每孔加入1 μ Ci [³H],最后在 β 闪烁仪上检测³H的掺入量,分析对CD25⁻细胞的增殖抑制率。增殖抑制率计算公式为:

$$\text{增殖抑制率} = \frac{1 - (\text{CD4}^+ \text{CD25}^- + \text{CD4}^+ \text{CD25}^+) \text{ cpm}}{\text{CD4}^+ \text{CD25}^- \text{ alone cpm}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 NOD小鼠的CD4⁺CD25⁺T细胞的变化 分别取6、12、18周以及新发糖尿病的NOD小鼠的PLN细胞,进行流式染色(anti-CD4-PE/Cy5, anti-CD25-PE),上机分析。结果发现,在6周开始直到糖尿病发作的这一时间过程中,CD4⁺CD25⁺T细胞在CD4⁺T细胞中的比值未发生明显变化,始终保持在12%左右(见图1)。

2.2 不同时间点的CD4⁺CD25⁺T细胞中转录因子FoxP3表达情况 取6、12、18周以及新发糖尿病的NOD小鼠,每组各6只。对其PLN细胞进行流式染色(anti-CD4-PE/Cy5, anti-CD25-PE, anti-Foxp3-FITC)。结果显示在不同阶段,CD4⁺CD25⁺T细胞中转录因子FoxP3表达率均在75%左右(见图2)。

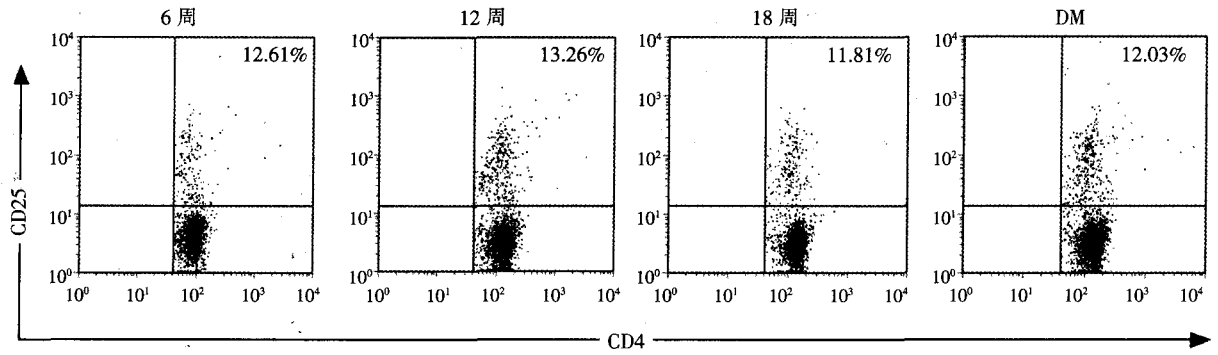


图 1 不同时间的 CD4、CD25 细胞数量

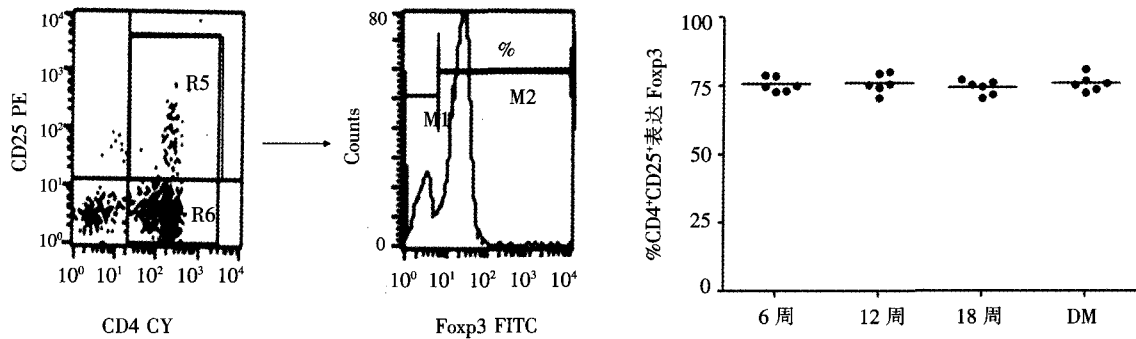


图 2 不同时间点的 CD4⁺CD25⁺ T 细胞中转录因子 FoxP3 表达情况

2.3 CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞中转录因子 FoxP3 表达水平 进一步分析不同时间(6、12、18周以及糖尿病发病)CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞中转录因子 FoxP3 的表达水平(MFI)发现, FoxP3 的表达水平呈现年龄依赖性降低(见图 3)。

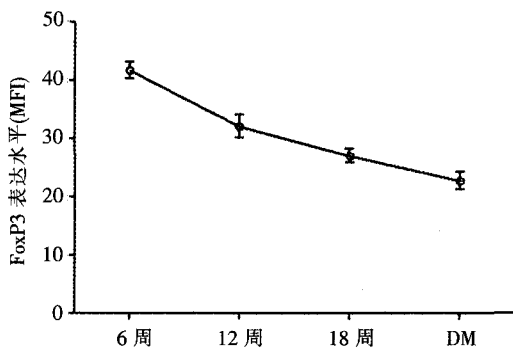


图 3 CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ T 细胞中转录因子 FoxP3 表达水平

2.4 CD4⁺CD25⁺ T 细胞抑制功能的变化 观察不同阶段(6、12、18周以及糖尿病发病)CD4⁺CD25⁺ T 细胞对 CD4⁺CD25⁻ T 细胞(CD4⁺CD25⁻ T 细胞与 CD4⁺CD25⁻ T 细胞分别按 1:1 以及 1:4 混合)的抑制功能,发现 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞功能呈现年龄依赖性降低(见图 4)。

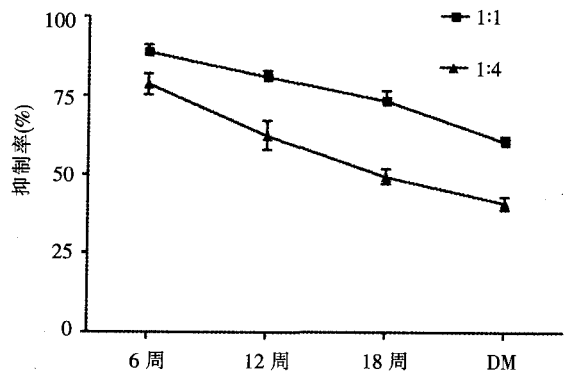


图 4 CD4⁺CD25⁺ T 细胞抑制功能的变化

3 讨论

1 型糖尿病是一种好发于青少年的自身免疫性疾病,是由于逃脱了胸腺阴性选择的自身反应性 T 细胞攻击胰岛 β 细胞。胰岛 β 细胞功能损伤,造成胰岛素分泌减少,不足以维持正常血糖浓度而导致血糖升高,并导致一系列并发症,不予以及时治疗将会危及生命。

任何自身免疫性疾病均是免疫耐受被打破的一种表现,即致病因素和抗病因素的平衡被打破所导致的结果。在 1 型糖尿病,则表现为免疫调节细胞不足以抑制自身反应性 T 细胞克隆增殖、活化,活

化的反应性 T 细胞攻击胰岛 β 细胞。常见的免疫调节细胞包括 Th1/Th2 细胞、Th3 细胞、NK 细胞、NKT 细胞、天然调节性 T 细胞 ($CD4^+ CD25^+ T$ 细胞), 以及 Tr1 细胞。1995 年, Sakaguchi 等^[1] 提出了 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞是具有免疫调节作用的细胞群, 使得人们重新认识调节性 T 细胞。 $CD4^+ CD25^+$ Treg 约占人和小鼠外周血 $CD4^+ T$ 细胞的 5% ~ 10%, 其表面分子包括 $CD127^{-}$ ^[2]、 $CD25^{high}$ 、 $CD45RB^{low}$ 、 $CD5^{high}$ 、 $CD44^{high}$ 、 $ICAM-1^{high}$ 、 $LFA-1^{high}$ 、部分 $CD62L^{high}$ 及 $neuropilin-1^+$ ^[3]。该群细胞持续高表达 CD25 分子 (IL-2R α 链), 是目前 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞特征性的标志物。

$CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞和其它 T 细胞一样, 主要在胸腺中分化、成熟的。 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞主要来源于 $CD4^+ CD8^-$ 胸腺细胞, 在 $CD4^+ T$ 细胞的自然选择过程中生成的。一系列研究发现, Foxp3 对 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞在胸腺内发育和功能维持是必需的。 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞具有免疫无能和免疫抑制两大特性。对于 $CD4^+ CD25^+$ Treg 的免疫调节作用机制, 目前还不明确。但普遍支持 $CD4^+ CD25^+$ Treg 通过与细胞接触发挥抑制作用这一观点, 细胞-细胞的接触是 $CD4^+ CD25^+$ Treg 发挥作用得先决条件。体外研究表明, 细胞因子 (IL-10, TGF- β) 和细胞相关分子 (CTLA-4, GITR) 在 $CD4^+ CD25^+$ Treg 功能的发挥中起了一定的作用。

本研究发现, NOD 小鼠的 $CD4^+ CD25^+$ T 细胞数量在从 6 周开始直至糖尿病发作的整个过程中未发生明显改变。然而 $CD4^+ CD25^+$ T 细胞未必全是 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞, 活化的 $CD4^+ T$ 细胞也表现为 $CD25^+$ ^[4]。如前所述, Foxp3 才是 $CD4^+ CD25^+$ Treg 特征性标志^[5~7]。本研究显示: 在不同阶段, $CD4^+ CD25^+$ T 细胞中转录因子 FoxP3 表达率均在 75% 左右, 无明显差异。说明 $CD4^+ CD25^+$ Treg 的数量未发生改变。

FoxP3 是核内转录因子, $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞发挥作用的关键蛋白分子^[8]。流式分析发现, $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞中 FoxP3 表达水平下降, 提示 $CD4^+ CD25^+$ Treg 功能降低。体外功能实验也观察到 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞对效应细胞的抑制功能减低, 两者结果相一致。Oh 等^[9] 也在 1 型人 T 细胞淋巴瘤病毒感染的患者身上发现这一现象。

$CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞可能通过 CTLA-4 (细胞

溶解性 T 淋巴细胞相关抗原 cDN) 发挥作用, CTLA-4 抗体可以阻断 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞的抑制作用^[10], 本文检测了不同时间段的 $CD4^+ CD25^+$ T 细胞表面 CTLA-4, 未见明显区别 (结果未显示)。说明 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞功能的变化与 CTLA-4 表达水平无相关性。

PLN 中的 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞能够特异性抑制胰岛自身反应性 T 细胞活化。然而由于 PLN 中的 $CD4^+ CD25^+$ Treg 细胞功能持续减低, 不能有效抑制自身反应性 T 细胞的克隆增殖、活化。造成了大量胰岛自身反应性 T 细胞攻击胰岛, 致使大量胰岛 β 细胞损伤, 最终导致糖尿病发作, 这可能是糖尿病发作的机制之一。

[参 考 文 献]

- [1] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [J]. *J Immunol*, 1995, 155(3): 1 151 - 1 564.
- [2] Banham AH. Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3 (+) regulatory T cells [J]. *Trends Immunol*, 2006, 27(12): 541 - 544.
- [3] Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(3): 623 - 630.
- [4] Fehérvari Z, Sakaguchi S. Development and function of $CD25^+ CD4^+$ regulatory T cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2004, 16(2): 203 - 208.
- [5] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of $CD4^+ CD25^+$ regulatory T cells [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(4): 330 - 336.
- [6] Khattri R, Cox T, Yasayko SA, et al. An essential role for Scurfin in $CD4^+ CD25^+$ T regulatory cells [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(4): 337 - 342.
- [7] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 [J]. *Science*, 2003, 14 299(5 609): 1 057 - 1 061.
- [8] Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, et al. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1 [J]. *Nature*, 2007, 446(7 136): 685 - 689.
- [9] Oh U, Grant C, Griffith C, et al. Reduced Foxp3 protein expression is associated with inflammatory disease during human t lymphotropic virus type 1 Infection [J]. *J Infect Dis*, 2006, 193(11): 1 557 - 1 566.
- [10] 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): 4 376 - 4 383.