论著

文章编号:1000-5404(2007)04-0290-03

IL-2和IL-10对Treg细胞体外扩增影响的差异研究

曾冬竹[1],王自强[1],郑峻松[2],吴 森[1],余佩武[1] (第三军医大学:[1]西南医院普通外科,[2]医学检验系临床检验学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 分析细胞因子IL-2和IL-10对Treg细胞体外扩增的促进作用,比较扩增的Treg细胞和自然分选Treg细胞对CTL功能活性的影响。**方法** 采用不同浓度细胞因子IL-2和IL-10作为诱导剂,分析2种细胞因子体外诱导Treg细胞增殖的有效性及最适浓度,同时以2种细胞因子诱导扩增的Treg细胞和自然分选的Treg细胞分别作用于CTL,分析采用体外扩增Treg细胞抑制CTL活性的可能性。**结果** 100 ng/ml IL-2能够诱导Treg细胞增殖明显增加,经48、96 h和144 h诱导后,其增殖比例分别达到10%、18%和20%,而IL-10的使用浓度需达到150 ng/ml才能获得同样的扩增比例;与自然分选的Treg细胞对比,采用细胞因子体外扩增的Treg细胞具有同等抑制CTL功能活性的效力,组间无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 采用添加IL-2培养体系是体外扩增Treg细胞的优选方法,其增殖效能强于IL-10;体外扩增Treg细胞与自然分选Treg细胞对CTL的功能抑制没有明显差异。

关键词:调节性T细胞;细胞因子;细胞扩增;CTL

中图法分类号:R329.28;R392.11;R392.12 **文献标识码**:A

Effects of IL-2 and IL-10 on T regulatory cell proliferation *in vitro*

ZENG Dong-zhu[1], WANG Zi-qiang[1], ZHENG Jun-song[2], WU Miao[1], YU Pei-wu[1] ([1]Department of General Surgery, Southwest Hospital, [2]Department of Clinical Laboratory Science, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the promoting effects of IL-2 and IL-10 on Treg proliferation *in vitro*, and to compare the inhibiting effects of the proliferated Treg on CTL with those of the enriched Treg. **Methods** After IL-2 or IL-10 was added into the culture system to stimulate Treg proliferation, the Treg cells were counted at 48, 96 and 144 h to determine the cytokines' efficacious doses *in vitro*. After collecting the proliferated Treg, we compared the inhibiting effects of the proliferated Treg on CTL with those of the enriched Treg. **Results** IL-2 and IL-10 induced Treg proliferation *in vitro* significantly. IL-2 (100 ng/ml) increased the number of Treg cells by 10%, 18% and 20% *in vitro* at 48, 96 and 144 h after stimulation. IL-10 (150 ng/ml) provided the same inducing effects as IL-2, proving less capable. The proliferated Treg had the same efficacy in inhibiting CTL functions as the enriched Treg ($P>0.05$). **Conclusion** IL-2 is superior to IL-10 for Treg proliferation *in vitro*. The proliferated Treg is as efficacious as MACS enriched Treg in inhibiting CTL function.

Key words: T regulatory cells; cytokines; cell proliferation; CTL

Treg细胞的主要功能是参与抑制正常机体中的自身反应性T细胞和自身反应性B细胞的活化,维持外周耐受[1,2]。但是,Treg细胞在参与维持外周耐受的过程中,是否抑制了CTL的功能,弱化机体抗肿瘤效应,加速肿瘤的形成,尚未完全阐明[3]。本研究通过富集小鼠Treg细胞并采用不同刺激方法行体外扩增,比较扩增后Treg细胞与自然分选的Treg细胞在对CTL作用方面的差异,为后期通过Treg细胞调控机体抗瘤活性的研究奠定基础。

基金项目:国家自然科学基金(30200264,30571863),国家自然科学基金重大项目(3993430-2)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200264,30571863) and the Major Program of the National Natural Science Foundation of China (3993430-2)

作者简介:曾冬竹(1965-),男,湖南省新化县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事胃肠道恶性肿瘤方面的研究。电话:(023)68765267,E-mail:zdz650121@medmail.com.cn

通讯作者:余佩武,电话:(023)68754161,E-mail:yupeiwu01@vip.sina.com.cn

收稿日期:2006-01-09;**修回日期**:2006-10-26

1　材料与方法

1.1　实验动物

SPF 级近交系 BALB/c 小鼠（H-2^d），8 ~ 10 周龄，雄雌各半，体质量 23 ~ 25 g。购自第三军医大学实验动物中心。

1.2　实验试剂

①小鼠白介素-2，Sigma，USA；②小鼠白介素-10，Sigma，USA；③小鼠 T 细胞富集柱，R&D，USA；④PE-标记的抗小鼠 CD8，Pharmingen，USA；⑤PE-标记的小鼠 CD25，Pharmingen，USA；⑥抗-PE 磁珠，Meltiny，USA；⑦免疫磁球选择柱，Meltiny，USA。

1.3　CD8$^+$ CTL 细胞和 CD4$^+$CD25$^+$ Treg 细胞的分离纯化

切取 BALB/c 小鼠脾脏制备脾细胞悬液，以 T 细胞纯化柱分离 SPF 级 BALB/c 小鼠脾脏 T 淋巴细胞[4]，加入 PE-标记的抗小鼠 CD8，4 ℃，30 min，取出后以 pH 7.2 PBS 离心洗涤 3 次，每次 2.0 ml，再加入 Anti-PE Microbeads 同样置 4 ℃，30 min，过 MACS selection column，洗涤柱内细胞即为 CD8$^+$ CTL 细胞。洗脱细胞悬液置 37 ℃，5%（体积分数）CO_2 培养箱 24 h 过夜培养（吸收氧化部分非特异性残留磁珠），取出后加入 PE-标记的抗小鼠 CD25，4 ℃，30 min，取出后以 pH 7.2 PBS 离心洗涤 3 次，每次 2.0 ml，再加入 Anti-PE Microbeads 同样置 4 ℃，30 min，过 MACS selection column，洗涤柱内细胞即为 CD4$^+$CD25$^+$ Treg 细胞。

1.4　分选 CD4$^+$CD25$^+$ Treg 细胞和 CD8$^+$ CTL 细胞纯度鉴定

将分选以 FACS 双标法（FITC-Anti-Mouse CD4 和 PE-Anti-Mouse CD25）检测分选获得 CD4$^+$CD25$^+$ Treg 细胞的纯度；以 FACS 单标法（FITC-Anti-Mouse CD8）检测分选获得 CD8$^+$ CTL 细胞的纯度[5]。

1.5　体外添加细胞因子诱导 CD4$^+$CD25$^+$ Treg 细胞增殖

取上述分离 CD4$^+$CD25$^+$ Treg 细胞，调细胞浓度至 2×10^5/ml。分别取 CD4$^+$CD25$^+$ Treg 细胞悬液 0.5 ml，加入 24 孔细胞培养板，使每孔细胞总数为 1×10^5 个。各孔同时加入 1.5 ml RPMI1640 完全培养基。分别以鼠源 IL-2 和 IL-10 作为诱导剂，二因子终浓度梯度设置：50、100、150、200、250 ng/ml。混匀，置 37 ℃，5%（体积分数）CO_2 培养箱，每 24 小时计数细胞总数。增殖评价：以细胞增殖绝对数量与原加入细胞总数之比评价增殖效能。

1.6　CD4$^+$CD25$^+$ Treg 细胞对 CD8$^+$ CTL 抑制作用分析

分别取采用 IL-2 和 IL-10 诱导扩增的 CD4$^+$CD25$^+$ Treg 细胞悬液 0.5 ml 加入 24 孔板，Treg 细胞浓度梯度设置：0.5×10^5/ml，1.0×10^5/ml，2.0×10^5/ml，5.0×10^5/ml 及 1.0×10^6/ml 5 组（体外扩增组），每组各孔分别加入调细胞浓度至 2×10^5/ml 的 CD8$^+$ CTL 0.5 ml。同时以自然分选的 0.5 ml CD4$^+$CD25$^+$ Treg 细胞与 2×10^5/ml 的 CD8$^+$ CTL 0.5 ml 为自然分选组对照（自然分选组），其浓度梯度设置体外扩增组相同。阳性对照组：2×10^5/ml 的 CD8$^+$ CTL 1.0 ml。阴性对照组：1.0 ml RPMI1640。上述各组反应孔分别加入 ConA 5×10^{-3} g/L 作为刺激原，以 MTT 法常规检测各组吸光度 OD 值[D(490)][3]。按公式计算抑制率（suppression rate，SR）：

$$SR=\frac{\text{阳性对照组 }\overline{D}(490)-\text{实验组 }\overline{D}(490)}{\text{阳性对照组 }\overline{D}(490)}\times100\%$$

各组 D(490) 值均减去阴性对照组 D(490)。

1.7　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件行方差分析。

2　结果

2.1　分选 CD4$^+$CD25$^+$ Treg 细胞和 CD8$^+$ CTL 细胞纯度分析

由于 Treg 细胞为 CD4CD25 双阳性细胞，同时由于 Treg 细胞本身尚无特异性表面标志发现，因此，其纯度鉴定我们仍采用检测分选细胞群中的 CD4$^+$CD25$^+$ 比例来进行。实验结果显示：分选 Treg 细胞的 CD4$^+$CD25$^+$ 比例达（93.0 ± 3.0）%。检测分选 CTL 细胞的 CD8$^+$ 比例发现：分选 CD8$^+$ T 细胞比例达（95.0 ± 4.5）%。上述结果显示：对 2 种细胞的分选纯度均达到细胞功能学研究的所需纯度。

2.2　不同细胞因子对诱导 Treg 细胞体外扩增效能分析

通过向分选获 CD4$^+$CD25$^+$ Treg 细胞培养体系中分别加入细胞因子 IL-2 和 IL-10 诱导 Treg 细胞体外扩增的实验研究显示：100 ng/ml IL-2 浓度能够明显诱导 Treg 细胞增殖，经 48、96、144 h 诱导后，其增殖比例分别达到 10%、18% 和 20%，而 IL-10 的使用浓度需达到 150 ng/ml。当 IL-2 的使用浓度大于 100 ng/ml、IL-10 的使用浓度大于 150 ng/ml 后，各组间扩增比例无明显差异；同时，当刺激扩增时间大于 96 h 后，各浓度组间差异不明显（$P>0.05$）。实验结果见表 1、2。

表 1　IL-2 体外诱导 Treg 细胞增殖的实验分析

IL-2 浓度	诱导时间（t/h）		
（ng/ml）	48	96	144
50	1.00×10^5	1.00×10^5	1.00×10^5
100	1.10×10^5	1.18×10^5	1.20×10^5
150	1.10×10^5	1.18×10^5	1.20×10^5
200	1.10×10^5	1.18×10^5	1.20×10^5
250	1.10×10^5	1.19×10^5	1.20×10^5

表 2　IL-10 体外诱导 Treg 细胞增殖的实验分析

IL-10 浓度	诱导时间（t/h）		
（ng/ml）	48	96	144
50	1.00×10^5	1.00×10^5	1.00×10^5
100	1.00×10^5	1.00×10^5	1.00×10^5
150	1.10×10^5	1.18×10^5	1.20×10^5
200	1.10×10^5	1.18×10^5	1.20×10^5
250	1.10×10^5	1.19×10^5	1.20×10^5

2.3 $CD4^+CD25^+$Treg 细胞对 $CD8^+$CTL 抑制作用分析

通过采用不同浓度梯度 $CD4^+CD25^+$Treg 细胞与 $CD8^+$CTL 细胞混合反应，以 MTT 法测定 $CD4^+CD25^+$Treg 细胞对 $CD8^+$CTL 细胞增殖活性的抑制，结果显示：当体外扩增组 Treg 细胞使用浓度达到 2.0×10^5/ml 时，Treg 细胞即可对 $CD8^+$CTL 细胞形成明显抑制[IL-2 扩增组 SR = (73.0 ± 4.5)%]；IL-10 扩增组[SR = (71.0 ± 4.0)%]，IL-2 扩增组与 IL-10 扩增组的抑制率无明显差异；当使用浓度大于 2.0×10^5/ml 后，各组间抑制率无显著增加；IL-2 扩增组、IL-10 扩增组分别与自然分选组比较，抑制率组间差异不显著。实验结果见表 3。

表 3 $CD4^+CD25^+$Treg 细胞对 $CD8^+$CTL 抑制作用分析($\bar{x}\pm s$, %)

组别		Treg 细胞浓度				
		0.5×10^5/ml	1.0×10^5/ml	2.0×10^5/ml	5.0×10^5/ml	1.0×10^6/ml
阳性对照组	100.0 ± 0.0					
体外扩增组(IL-2)		30.0 ± 3.0	40.0 ± 3.0	73.0 ± 4.5[a]	75.0 ± 5.0[a]	75.0 ± 4.5[a]
体外扩增组(IL-10)		30.0 ± 3.5	42.0 ± 2.8	71.0 ± 4.0[a]	75.5 ± 4.5[a]	75.5 ± 4.5[a]
自然分选组		32.0 ± 3.0	42.5 ± 2.0	75.0 ± 3.8[a]	74.0 ± 3.5[a]	76.0 ± 5.0[a]

a：$P<0.01$，与阳性对照组比较

3 讨论

$CD4^+CD25^+$Treg 细胞是体内的 1 种对效应性 T 细胞具有抑制作用的调节性 T 细胞。最初，人们发现它在自身免疫性疾病的发生、发展过程中发挥了重要的作用[6,7]。随着对 $CD4^+CD25^+$Treg 细胞研究的逐渐深入，其在肿瘤发生和肿瘤细胞免疫逃逸中的作用越来越受到关注[8]。有研究报道[9-11]，在致癌高危个体中，包括 $CD4^+CD25^+$Treg、Tr1 型细胞和其他具有免疫抑制功能细胞的比例明显增加。对抗 $CD4^+CD25^+$Treg 细胞可以引发机体抗肿瘤免疫反应。故此，探索如何反向阻抗致癌高危个体的 $CD4^+CD25^+$Treg 细胞活性，将为抗肿瘤的免疫治疗提供新的思路和治疗措施，这也是我们后期延续研究的重点和努力方向。

由于 $CD4^+CD25^+$Treg 细胞在体内增殖活性低下，且存在比例和绝对数量极低($CD4^+CD25^+$Treg 占正常机体外周血 T 细胞的 3% ~5%)，从而限制了人们对功能活性等方面的应用研究[12,13]。在本实验研究中，我们同时对采用 IL-2 和 IL-10 作为促分裂刺激物对 Treg 细胞的体外扩增效应进行实验研究，结果显示，100 ng/ml IL-2 能够诱导 Treg 细胞增殖明显增加，经 48、96 h 和 144 h 诱导后，其增殖比例分别达到 10%、18% 和 20%，而 IL-10 的使用浓度需达到 150 ng/ml 才能获得同样的扩增比例；与自然分选的 Treg 细胞对比，采用细胞因子体外扩增的 Treg 细胞具有同等抑制 CTL 功能活性的效力，组间差异不显著($P>0.05$)。这将对欲扩增低比例低增殖活性 $CD4^+CD25^+$Treg 细胞作为功能学和治疗靶细胞的研究起到十分重要的作用。

参考文献：

[1] William L G, Daniel A H. The EWS-WT1 gene fusion in desmoplastic small round cell tumor[J]. Seminars in Cancer Biology, 2005, 15(3): 197-205.

[2] Bach J F. Regulatory T cells under scrutiny[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(3): 189-198.

[3] Raghavan S, Holmgren J. $CD4^+CD25^+$ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2005, 44(2): 121-127.

[4] 郑峻松，吴 军，黄文华，等. 严重烫伤对小鼠脾脏 T 淋巴细胞经 $TCR_{\alpha/\beta}$、CD28 活化通路和 T 细胞功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(12): 1430-1432.

[5] 郑峻松，吴 军，易绍萱，等. 细胞因子及胸腺微环境影响 T_{reg} 细胞增殖机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(21): 1885-1887.

[6] Malarkannan S, Regunathan J, Timler A. Minor Histocompatibility Antigens: Molecular targets for immunomodulation in tissue transplantation and tumor therapy[J]. Clin Appl Immunol Rev, 2005, 5(2): 95-109.

[7] Seddon B, Mason D. The third function of the thymus. Immunol Today, 2000, 21(2): 95-99.

[8] Kawaida H, Kono K, Takahashi A, *et al*. Distribution of $CD4^+CD25^{high}$ regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer[J]. J Surgical Research, 2005, 124(1): 151-157.

[9] Janssens V, Goris J, Van Hoof C. PP2A: the expected tumor suppressor[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2005, 15(1): 34-41.

[10] Klebanoff C A, Khong H T, Antony P A, *et al*. Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy[J]. Trends Immunol, 2005, 26(2): 111-117.

[11] 崔自由，黄幼田，赵继敏，等. 应用流式细胞术动态观测小鼠树突状细胞诱导的 T 细胞增殖的变化[J]. 郑州大学学报：医学版, 2005, 40(5): 822-823.

[12] Blazar B R, Taylor P A. Regulatory T cells[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2005, 11(2 Suppl 2): 46-49.

[13] Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, *et al*. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating $CD4^+$ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells [J]. J Exp Med, 2000, 192(9): 1213-1222.

(编辑 龙 亮)