

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01136

雷帕霉素体外促进小鼠调节性 T 细胞的分化和增殖

谢江平, 丁国善, 倪之嘉, 傅宏*, 傅志仁

第二军医大学长征医院器官移植科, 全军器官移植研究所, 上海 200003

[摘要] **目的:** 观察雷帕霉素体外对小鼠调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)分化和增殖的影响, 为进一步探讨其可能的免疫耐受诱导机制奠定基础。**方法:** 无菌条件下取 C57BL/6 小鼠脾脏, 分离单个核细胞, 免疫磁珠阴性分选获得 CD4⁺ T 细胞, 分别与 0.1 μmol/L 雷帕霉素(RAPA 组)、0.5 μmol/L 环孢素(CsA 组)进行共培养 7 d, 并以正常培养细胞作为空白对照。流式细胞仪检测各组 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞比例; RT-PCR 检测各组 T 细胞 Foxp3 mRNA 表达水平。**结果:** 与空白对照 [7.42±0.82]% 相比, CsA 组 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞 [3.72±0.74]% 所占比例明显降低 ($P<0.01$); RAPA 组 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞 [11.47±1.08]% 所占比例明显升高 ($P<0.01$)。RAPA 组 T 细胞 Foxp3 mRNA 表达明显高于 CsA 组和空白对照 ($P<0.01$); CsA 组 Foxp3 mRNA 表达低于空白对照 ($P<0.05$)。**结论:** 雷帕霉素体外可促进 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的分化和增殖, 有利于免疫耐受的形成, 其免疫抑制机制不同于 CsA。

[关键词] 调节性 T 淋巴细胞; 雷帕霉素; 环孢素 A; Foxp3; 体外; 细胞分化; 细胞增殖

[中图分类号] R 979.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)10-1136-04

Rapamycin promotes differentiation and proliferation of mouse CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells *in vitro*

XIE Jiang-ping, DING Guo-shan, NI Zhi-jia, FU Hong*, FU Zhi-ren

Department of Organ Transplantation, Organ Transplantation Institute of PLA, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the influence of rapamycin on the differentiation and proliferation of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells, so as to lay a foundation for further studying its role in inducing immune tolerance. **Methods:** The spleens were taken from C57BL/6 mice under sterile condition and the mononuclear cells were isolated. CD4⁺ T cells were isolated by immunomagnetic beads (negative) and were divide into normal control group, rapamycin (0.1 μmol/L, for 7 days) group and cyclosporine (0.5 μmol/L, for 7 days) group. Flow cytometry was used to determine the proportions of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells, and RT-PCR was used to examine the expression of Foxp3 mRNA. **Results:** Compared with the control group, the proportion of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in the CD4⁺ T cells was significantly decreased ([7.42±0.82]% vs [3.72±0.74]%, $P<0.01$) in the cyclosporine group and was significantly increased ([7.42±0.82]% vs [11.47±1.08]%, $P<0.01$) in the rapamycin group. Expression of Foxp3 mRNA in rapamycin group was significantly higher than that in the other 2 groups ($P<0.01$); expression of Foxp3 mRNA in the cyclosporine group was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). **Conclusion:** Rapamycin can promote the proliferation and growth of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg cells *in vitro*, and facilitate the development of immune tolerance. It has a different immune suppression mechanism with cyclosporine A.

[KEY WORDS] regulatory T lymphocytes; rapamycin; cyclosporine A; Foxp3; *in vitro*; cell differentiation; cell proliferation
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(10):1136-1139]

移植物免疫耐受是指在不进行免疫抑制的条件下, 机体免疫系统对供者抗原产生特异性无应答, 而不影响机体其他免疫功能, 移植物功能正常并长期存活^[1-2]。CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)可以抑制效应 T 细胞的反应, 促进自身

耐受的形成^[3-4]。目前常用的免疫抑制药物, 包括环孢素 A(CsA)、他克莫司(FK506)等, 主要是通过抑制效应 T 细胞的活化、增殖而达到抑制排斥反应的目的, 在抑制移植物免疫排斥的同时对机体整个免疫系统也产生抑制作用, 存在感染、长期用药等诸多

[收稿日期] 2009-05-01 **[接受日期]** 2009-05-25

[作者简介] 谢江平, 博士生. E-mail: shiejp@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81886999-73302, E-mail: fuhong@medmail.com.cn

不良反应^[5-6], 不利于移植术后患者的长期存活。免疫耐受是解决上述问题的较好方法, 是目前移植免疫研究新的热点。

雷帕霉素 (rapamycin, RAPA) 具有促进 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞体外扩增的作用^[7-8], 具有诱导机体免疫耐受的潜能, 有利于移植物的长期存活, 提高患者长期的生存率, 值得深入研究。因此, 本研究将体外分离的 CD4⁺T 细胞与 RAPA 共培养, 观察其对 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞分化和增殖及 T 细胞 Foxp3 mRNA 表达的影响, 并与环孢素 A (cyclosporine A, CsA) 的作用进行对照, 探讨 RAPA 可能的免疫耐受作用及机制, 为临床移植术后 RAPA 的进一步推广应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 鸡尾酒抗体 (Biotin-Antibody Cocktail)、抗生物素标记的磁珠 (anti-Biotin MicroBeads)、MidiMACS 分选器、LD 分离柱为德国 Miltenyi Biotec 公司产品; anti-CD4 FITC (IgG2a)、anti-CD25 PE (IgG1)、抗 CD3 单抗、抗 CD28 单抗、IL-2 为 BD Pharmingen 公司产品; RAPA (1 mg/ml) 购自美国惠氏制药有限公司; 环孢素 A (cyclosporine A, CsA; 50 mg/5 ml) 购自瑞士诺华公司; TRIzol 试剂为美国 Invitrogen 公司产品; 氯仿为中国医药集团上海化学试剂公司产品; 异丙醇为江苏锡山市东风化工厂产品; 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理水为 BioBasic 公司产品; RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0 试剂盒购自 TaKaRa 公司; DNA Marker 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; Agarose 琼脂糖购自华美生物工程公司; Tris-NH₄Cl 缓冲液自行配制。

1.2 CD4⁺T 细胞的分离 断颈处死 C57BL/6 小鼠, 无菌条件下取脾脏, 加入 RPMI 1640 液 (含 10% 胎牛血清) 20 ml, 置于 100 目无菌碾磨钢网上, 反复碾磨, 过滤 2 次, 300×g 离心 10 min, 弃上清, 加入 Tris-NH₄Cl 缓冲液破红, 静置 5 min, 300×g 离心 5 min, PBS 缓冲液重悬, 300×g 离心 5 min, 弃上清。取 1×10⁷ 个细胞用含 5 g/L BSA、2 mol/L EDTA 的分选缓冲液重悬, 加入适量生物素标记鸡尾酒抗体, 混匀, 4℃ 孵育 10 min, 再加入抗生物素标记的磁珠, 混匀, 4℃ 孵育 15 min, 分选缓冲液洗涤后 300×g 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀用 500 μl 缓冲液重悬, 置 LD 分离柱于 MidiMACS 分选器中, 1 ml 缓

冲液冲洗 LD 分离柱 2 次后, 将细胞悬液加入分离柱中, 收获从分离柱中流出的细胞即为 CD4⁺T 细胞。

1.3 CD4⁺T 细胞的培养 取上述细胞悬液, 加入到 12 孔平底细胞培养板中, 每孔 2×10⁵, 设 3 个复孔, 每孔定容 1 ml。细胞设空白对照组、雷帕霉素组 (RAPA, 0.1 μmol/L)、环孢素 A 组 (CsA, 0.5 μmol/L), 各组均加入抗小鼠 α CD3 单抗 (10 μg/ml) 和抗小鼠 α CD28 单抗 (1 μg/ml) 激活, 加 IL-2 (1 000 U/L) 后, 37℃、5% CO₂ 培养 7 d。

1.4 流式细胞仪检测 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞 收集培养的 CD4⁺T 细胞, 300×g 离心 5 min, 弃上清, PBS 液洗涤 1 次, 加入 anti-CD25 PE 10 μg, 4℃ 孵育 30 min, 300×g 离 10 min, 弃上清, 重复洗涤 1 次, 上流式细胞仪检测。

1.5 半定量 RT-PCR 检测培养细胞 Foxp3 mRNA 表达 Foxp3 引物序列 P1: 5'-TCC GAT TAC CGG CGC ATC ACG-3', P2: 5'-CTC CAG CAG CTC GAA AAG GCA-3', 由上海生工生物工程技术有限公司合成。TRIzol 一步法提取总 RNA, RT-PCR 按试剂盒说明书进行。Foxp3 PCR 反应条件: 94℃ 变性 5 min 后开始循环, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。β-actin PCR 反应条件: 94℃ 变性 5 min 后开始循环, 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 反应产物电泳后, 紫外透射仪下查看, 再用 Gel-Pro Imager 60-2517 型成像分析系统进行分析, 测定各条光密度 (D) 值, 计算 Foxp3/β-actin, 即目的 RNA 的相对表达量。相对表达量 = 产物条带 D 值/β-actin 条带 D 值。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 12.0 软件进行统计处理, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 One-Way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RAPA 体外对 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞分化的影响 结果 (图 1) 表明: CsA 组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的 (3.72±0.74)%, 明显低于空白对照组 (7.42±0.82)%, 具有统计学差异 ($P < 0.01$); RAPA 组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的 (11.47±1.08)%, 明显高于空白对照组和 CsA 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果提

示 RAPA 体外对 CD4⁺CD25⁺ Treg 亚群有促增殖 效应,而 CsA 则具有抑制效应。

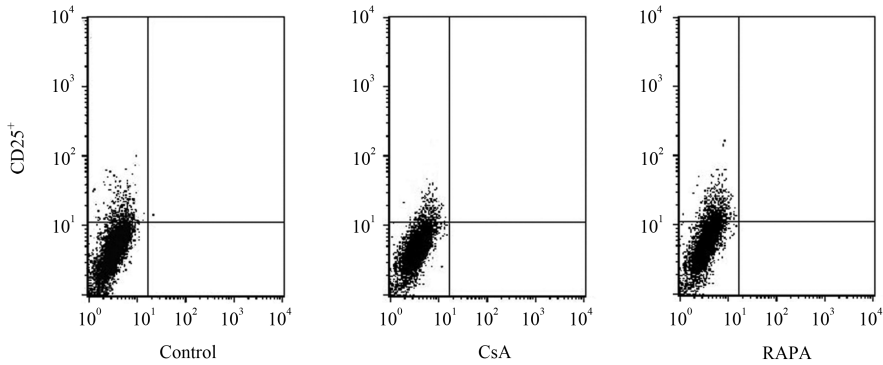


图 1 各组 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞的分布

Fig 1 Distribution of CD4⁺CD25⁺ T cells in each group

2.2 RAPA 对 Foxp3 mRNA 表达的影响 结果 (图 2)表明:各组 β-actin 均稳定表达,各组培养细胞均发现有约 273 bp 的扩增产物片段;进一步半定量结果显示,RAPA 组 (0.75 ± 0.09) T 细胞 Foxp3 mRNA 表达明显高于 CsA 组 (0.29 ± 0.04) 和空白对照组 (0.46 ± 0.07),差异具有统计学意义 (P < 0.01);CsA 组低于空白对照组 (P < 0.05)。

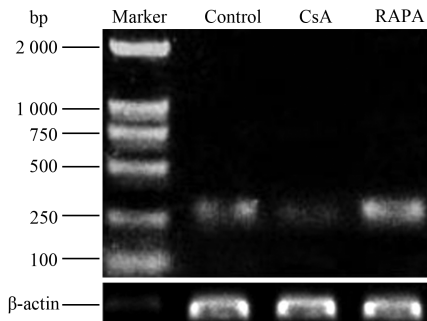


图 2 各组细胞 Foxp3 mRNA 的表达

Fig 2 Expression of Foxp3 mRNA in each group

3 讨论

CsA 和 RAPA 都是临床器官移植患者的常用药,可以减少免疫细胞的增殖和活化,进而抑制移植排异反应。CsA 主要通过与其与环孢蛋白(cyclophilin)形成复合物,抑制钙调磷酸酶(calcineurin)的活化,阻碍活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells,NFAT)的去磷酸化与核转位,从而阻断IL-2 的转录和 T 细胞活化;RAPA 则通过与 FKBP12 结合形成 RAPA-FKBP12 复合物,作用于哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin,

mTOR),抑制 mTOR 的作用,阻断 T 淋巴细胞从 G₁期到 S 期的进程^[9]。但其对免疫耐受的作用不很清楚。因此,本研究以 CsA 或 RAPA 与 CD4⁺T 细胞共培养,探讨各自对免疫耐受的影响。研究结果表明:CsA 抑制 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的分化与增殖,可能不利于免疫耐受的形成;而 RAPA 促进 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞的分化与增殖,可能有利于免疫耐受的形成。

Foxp3 是叉头/翼状螺旋转录因子(forkhead/winged helix transcription factor)家族的成员,其主要功能区是 C 末端的叉头状结构域。Foxp3 在 Treg 细胞中的表达具有一定的特异性,对 Treg 的发育、功能以及维持机体免疫平衡具有重要意义^[10],是目前 Treg 最特异的标志物。本研究结果表明,Foxp3 与 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞密切相关,与 Fontenot 等^[11]的 Foxp3 相关疾病模型结果类似。Khattari 等^[12]研究亦证实缺少叉头样结构域的 Scurfy 小鼠体内 CD4⁺CD25⁺ T 细胞数量很少,且不具有免疫抑制活性,属于慢性活化 T 细胞。Foxp3 还可诱导初始 T 细胞向调节表型分化,诱导 CD4⁺CD25⁺ Treg 表达血红素加氧酶-1(HO-1),增强其对细胞的免疫抑制作用^[13-14]。

Foxp3 表达受多种因素影响,如过度表达活化 TGF-β₁ 的小鼠可上调外周 Treg Foxp3 的表达水平,而 TGF-β₁ 信号缺乏或破坏的小鼠 Foxp3 表达水平下降,Treg 功能也随之降低^[15]。Foxp3 缺乏导致 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞缺失,Foxp3⁻小鼠 Treg 细胞会离开胸腺在外周成为致病性的自身反应性 T 细胞,表现出显著的自身免疫效应。这提示 Foxp3

可能是控制免疫系统的一种细胞外阴性选择的支配因素^[16]。

综上所述, RAPA 体外可促进 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的分化和增殖, 有利于免疫耐受的形成, 其可能通过诱导 Foxp3 表达促进 Treg 细胞增殖, 免疫抑制机制不同于 CsA。因此, RAPA 可能比 CsA 更有优势, 为临床移植术后的用药提供了新的思路与依据, 值得进一步深入研究。

(志谢 本研究得到第二军医大学基础部免疫学教研室王全兴教授的指导和帮助, 在此表示衷心感谢!)

[参考文献]

- [1] Ramos H C, Reyes J, Abu-Elmagd K, Zeevi A, Reinsmoen N, Tzakis A, et al. Weaning of immunosuppression in long-term liver transplant recipients[J]. *Transplantation*, 1995, 59: 212-217.
- [2] Brent L. The 50th anniversary of the discovery of immunologic tolerance[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349: 1381-1383.
- [3] Gassel H J, Kauczok J, Martens N, Steger U, Timmermann W, Ulrichs K, et al. Tolerance induction following orthotopic rat liver transplantation: cytokine production by CD4⁺ T cells determines the immunological response[J]. *Transplant Proc*, 2002, 34: 1429-1430.
- [4] Waldmann H, Graca L, Cobbold S, Adams E, Tone M, Tone Y. Regulatory T cells and organ transplantation[J]. *Semin Immunol*, 2004, 16: 119-126.
- [5] Wood K J, Sawitzki B. Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells *in vivo* [J]. *Trends Immunol*, 2006, 27: 183-187.
- [6] Sharland A, Yan Y, Wang C, Bowen D G, Sun J, Sheil A G, et al. Evidence that apoptosis of activated T cells occurs in spontaneous tolerance of liver allografts and is blocked by manipulations which break tolerance [J]. *Transplantation*, 1999, 68: 1736-1745.
- [7] Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo M G. Rapamycin selectively expands CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells [J]. *Blood*, 2005, 105: 4743-4748.
- [8] Strauss L, Whiteside T L, Knights A, Bergmann C, Knuth A, Zippelius A. Selective survival of naturally occurring human CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells cultured with rapamycin [J]. *J Immunol*, 2007, 178: 320-329.
- [9] Cardenas M E, Zhu D, Heitman J. Molecular mechanisms of immunosuppression by cyclosporine, FK506, and rapamycin [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1995, 4: 472-477.
- [10] Kim J M, Rudensky A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells [J]. *Immunol Rev*, 2006, 212: 86-98.
- [11] Fontenot J D, Gavin M A, Rudensky A Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4: 330-336.
- [12] Khattri R, Cox T, Yasayko S A, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4: 337-342.
- [13] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 [J]. *Science*, 2003, 299: 1057-1061.
- [14] Choi B M, Pae H O, Jeong Y R, Kim Y M, Chung H T. Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 327: 1066-1071.
- [15] Marie J C, Letterio J J, Gavin M, Rudensky A Y. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [J]. *J Exp Med*, 2005, 201: 1061-1067.
- [16] van Santen H M, Benoist C, Mathis D. Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells [J]. *J Exp Med*, 2004, 200: 1221-1230.

[本文编辑] 贾泽军

欢迎订阅

《第二军医大学学报》

ISSN 0258-879X
CN 31-1001/R

上海市翔殷路 800 号(邮编: 200433) 邮发代号: 4-373

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA

ISSN 1000-1948
CN 31-1002/R

上海市翔殷路 800 号(邮编: 200433) 邮发代号: 4-725