

人Tfh细胞体外诱导分化条件的研究

陈语聪, 郭薇, 雷雯, 葛瑶瑶, 薛文瑶, 李倩文, 高向东*

(中国药科大学生命科学与技术学院分子生物学教研室, 南京 210009)

摘要 为深入研究滤泡辅助性T细胞(Tfh)的分化调控机制, 比较并建立了人Tfh细胞体外诱导分化的模型: 分别采用外周血淋巴细胞直接分离以及磁珠分选后的细胞诱导分化, 比较不同来源Naïve T细胞的分化结果, 同时探究了TCR刺激信号anti-hCD3e的固相包被与可溶性刺激对分化效率的影响, 并考察极化因子IL-12不同浓度诱导Tfh细胞分化效果, 利用流式细胞术检测Tfh分化效率($CD4^+ CXCR5^+ ICOS^+ PD-1^+$), 结合ELISA法检测Tfh标志细胞因子IL-21的表达水平, 最终确定了5 μ g/mL anti-hCD3e抗体预包被4℃过夜, 磁珠分选后的T细胞在IL-12终浓度为1 ng/mL时与其他极化因子诱导分化6 d后, 分化水平可达20.4%, 初步建立了人Tfh细胞体外诱导分化最佳条件, 为探讨人Tfh细胞分化机制及相关的靶向Tfh的分子药效、毒性与细胞水平的代谢实验提供了有效的检测平台。

关键词 Tfh细胞; TCR信号; 体外分化

中图分类号 R392 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)06-0733-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170616

引用本文 陈语聪, 郭薇, 雷雯, 等. 人Tfh细胞体外诱导分化条件的研究[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(6):733-737.

Cite this article as: CHEN Yucong, GUO Wei, LEI Wen, et al. Optimization of *in vitro* human follicular helper T cell differentiation condition[J]. *J China Pharm Univ*, 2017, 48(6):733-737.

Optimization of *in vitro* human follicular helper T cell differentiation condition

CHEN Yucong, GUO Wei, LEI Wen, GE Yaoyao, XUE Wenyao, LI Qianwen, GAO Xiangdong*

Department of Molecular Biology, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract In order to explore the regulation mechanisms of follicular helper T cell (Tfh Cell) differentiation, optimized conditions of *in vitro* induction from both peripheral blood mononuclear cells and MAC sorted Naïve CD4⁺ T cells to human Tfh cells were developed. Induction efficiency difference of TCR signal anti-hCD3e stimulation between coated on solid phase and in soluble phase was also determined. Differentiation efficiency of CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ PD-1⁺ Tfh cell was determined by FACS while the expression level of IL-21 in cell supernatant was determined by ELISA tests. An ultimate induction condition that 5 μ g/mL coated overnight anti-hCD3e stimulated naïve CD4⁺ T cells to differentiate into Tfh at an up to 20.4% percentage was finally determined. The optimization of *in vitro* induction protocol of human Tfh provided an effective examine platform for the studies on Tfh differentiation mechanisms and related pharmacology, toxicity and metabolic experiments.

Key words follicular helper T cell; TCR signal; *in vitro* differentiation

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81573444)

滤泡辅助性T细胞(Tfh)是确证于2009年的新类型CD4⁺ T细胞亚群^[1], 在人体内主要分布于扁桃体等次级淋巴器官, 其表面存在高表达的CXCR5、PD-1、ICOS等黏附分子或趋化因子, 通过

分泌IL-21与提供CD40/CD40L、PD-1/PDL-1、CD84/CD84等接触性信号参与滤泡生发中心的形成并激活B细胞的增殖分化与抗体亲和力筛选循环^[2]。人体内的Tfh细胞主要集中于扁桃体, 在健

康人的外周血中 Tfh 细胞所占淋巴细胞比例低于 1% 且多数为无法直接辅助 B 细胞激活的静息状态^[3-4], 因此直接从外周血富集 Tfh 细胞效率较低, 所得细胞其体内分化条件无法控制, 不利于 Tfh 增殖分化调控机制的研究。因此本研究需要建立人 Tfh 细胞的稳定有效的体外分化平台。

Tfh 的体内分化过程曾被认为依赖 IL-6、IL-21 与 STAT3 而不依赖其他 Th1、Th17 亚群分化依赖的信号, 而后续的研究发现, Tfh 的关键转录因子 Bcl-6 的激活或过表达均可显著提高 Tfh 标志性趋化因子 CXCR5 与 PD-1 的表达^[5-6], 而 Bcl-6 的表达上调可受多种细胞因子调控, 包括一部分 Th1、Th17 亚群的依赖分子如 IL-12、IL-23 与 TGF-β 等。

因此, 本研究比较了 Tfh 体外分化的初始细胞群状态、TCR 激活信号溶解性与 IL-12 诱导浓度对 Tfh 体外分化效率的影响, 结合流式细胞术与 ELISA 实验进行 Tfh 体外分化水平评价, 为研究 Tfh 分化调控机制及以其为靶点的新型药物开发提供了有效的检测平台。

1 材 料

人 IL-21 ELISA 试剂盒(杭州联科生物技术有限公司);人 CD4 免疫磁珠阳性分选试剂盒、人外周血单核细胞(PBMC)分离液(美国 Miltenyi Biotech 公司);BB515 小鼠抗人 CD4 抗体、PE 小鼠抗人 CD278 抗体、PerCP-Cy5.5 小鼠抗人 CXCR5 抗体、APC 小鼠抗人 CD279 抗体、FACS 染色缓冲液与流式管(美国 BD 公司);anti-hCD3e, anti-hCD28 单抗(美国 Abcam 公司);hIL-6, hIL-12, hIL-23, hTGF-β(美国 R&D 公司)。健康人外周血样品取自江苏省中大医院门诊部。

2 方 法

2.1 从人外周血单核细胞(PBMC)诱导 Tfh 分化

将总细胞分为预包板与非预包板 2 个大组, 大组内分为 IL-12 的 4 个浓度梯度组。预包板组提前一天以终浓度 5 μg/mL anti-hCD3e 铺板并 4 ℃ 孵育过夜, 细胞铺板前以 PBS 将包被液洗去。将人外周血小心置于 PBMC 分离液上层, 避免扰动, 于 1 700 r/min 离心 30 min 后吸取 PBMC 层, 以 RPMI 1640 培养基稀释并计数, 于 24 孔板中以每孔 1×10^6 个细胞的密度, 500 μL 体系铺板并加入

细胞因子诱导分化, 可溶 anti-hCD3e 组加入终浓度为 5 μg/mL 的 anti-hCD3e, 其余细胞因子两组相同, 剂量均为终浓度: anti-hCD28 1 μg/mL, IL-12 (0.1, 0.5, 1) ng/mL, IL-6 10 ng/mL, IL-23 10 ng/mL, TGF-β 5 ng/mL。在 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 3 d 后半量换液, 继续培养 3 d, 分别收取细胞进行流式检测, 细胞上清液通过 ELISA 检测 IL-21 表达水平。

2.2 从人 Naïve CD4⁺ T 细胞诱导 Tfh 分化

PBMC 的分离同“2.1”项, 分离后将 PBMC 重悬计数, 每 1×10^7 个细胞加入磁珠分选缓冲液 40 μL 与人 Naïve CD4⁺ 生物素标记抗体 10 μL, 4 ℃ 孵育 5 min, 再加入缓冲液 30 μL 与 Naïve CD4⁺ T Cell 分选微珠 20 μL, 混匀后于 4 ℃ 孵育 10 min, 经磁柱分选收集流穿即为 Naïve CD4⁺ T 细胞。诱导培养条件与“2.1”项相同。

2.3 流式细胞术检测诱导后 T 细胞分化比例

诱导分化的细胞经 2 000 r/min 离心 5 min 后收集细胞, 染色缓冲液洗涤细胞一次, 体积比 1:1 000 加入 BB515 小鼠抗人 CD4, PE 小鼠抗人 ICOS, PerCP-Cy5.5 小鼠抗人 CXCR5, APC 小鼠抗人 PD-1 抗体, 冰上暗处孵育 1 h, 以染色缓冲液洗涤 2 次后重悬上机。在流式检测过程中, 先设淋巴细胞门, 再以 CD4⁺ CXCR5⁺ 设门, 框选 PD-1⁺ ICOS⁺ 双标细胞群并收集 1×10^4 个细胞, 以 Flowjo 软件处理流式细胞术结果。

2.4 ELISA 检测细胞上清液中细胞因子浓度

诱导分化 6 d 后离心收集细胞上清液, 将上清液 20 μL 加入预包人 IL-21 捕获抗体的酶标板中, 同时加入稀释的人 IL-21 检测抗体 50 μL, 37 ℃ 孵育 1.5 h。加入 PBST 300 μL 洗板 6 次, 后加入酶标二抗, 37 ℃ 孵育 30 min。重复洗涤步骤, 每孔加入显色底物 TMB 100 μL, 避光室温孵育 20 min 后以终止液停止反应, 30 min 内以酶标仪进行 450 nm 与 630 nm 双波长检测, 得到校准的吸收度。

2.5 统计学方法

应用 Graphpad 5.01 软件进行统计分析, 计量结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。组间的显著性检验采用配对 t 检验, 组内显著性检验采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结 果

3.1 外周血单核细胞诱导的Tfh分化水平

在不同TCR信号刺激相条件下以不同浓度的IL-12诱导6 d后,ELISA检测细胞上清液中IL-21水平如图1所示,可见IL-21分泌水平与IL-12诱导浓度呈正相关,证明分化平台有效,且需提高IL-12诱导浓度。在固相包被anti-hCD3e组的IL-21水平显著高于可溶型anti-hCD3e组。

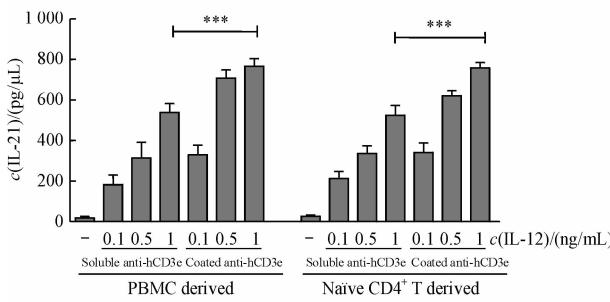


Figure 1 ELISA tests of IL-21 level in PBMC derived and Naïve CD4⁺ T cells culture supernatant with both pre-coated and soluble anti-hCD3e ($\bar{x} \pm s, n=3$)

*** $P < 0.005$

3.2 Naïve CD4⁺ T细胞诱导的Tfh分化水平

经磁珠分选后得到Naïve CD4⁺ T细胞,以“2.1”项下相同方法诱导分化6 d后,ELISA检测IL-21水平如图1,得到IL-21分泌水平与IL-12诱导浓度的正相关,证明Naïve CD4⁺ T细胞的诱导分化平台有效。

3.3 流式细胞术检测Tfh细胞分化效率

以流式细胞仪检测诱导分化的各组与对照组中CD4⁺ CXCR5⁺ PD-1⁺ ICOS⁺ T细胞分化效率,可以发现,对比预包被诱导组最高达20.4%的分化效率,未诱导组仅为1.3%,证明体外诱导Tfh分化平台有效(图2)。同时可见分化效率与IL-12诱导浓度呈正相关,由此得到最优分化条件为:anti-hCD3e 5 μ g/ml预包板,anti-hCD28 1 μ g/ml,IL-12 (0.1, 0.5, 1) ng/ml,IL-6 10 ng/ml,IL-23 10 ng/ml,TGF- β 5 ng/ml诱导Naïve CD4⁺ T细胞分化6 d。

4 讨 论

Tfh细胞在滤泡中接受B细胞呈递的抗原信号后促使邻接B细胞生存与增殖,B细胞表面的IL-21受体能介导B细胞内Bcl-6表达与B细胞增

殖^[5],上调浆细胞分化水平^[6]。

多种自身免疫性疾病中均有自身抗体的参与,包括类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、重症肌无力等,而患有这些自身免疫性疾病的患者往往出现增强的生发中心反应与升高的血液Tfh细胞数量^[7]。研究发现,在系统性红斑狼疮患者体内出现异常升高的CXCR5⁺ ICOS⁺ Tfh样细胞^[8],在这些患者中,系统性红斑狼疮的临床评分与血清自身抗体水平和循环Tfh频率间存在显著正相关。体外加入抗CD40L抗体可显著减少IgG分泌水平说明CD40L-CD40相互作用可能在发病过程中起到重要作用^[8]。OX40信号异常升高也可能通过提高Tfh水平对系统性红斑狼疮发病做出贡献^[9]。

目前已知的Tfh分化所需的关键信号包括IL-6、IL-12、IL-21、IL-23、TGF- β 等,这些细胞因子在多篇文献中均被报道能有效诱导高效分泌IL-21的CD4⁺ T细胞^[10]。其中,IL-6、IL-21与IL-23均已被证明可通过激活STAT3信号通路上调关键转录因子Bcl-6的表达水平并抑制与其拮抗表达的Blimp-1。相较于Th17细胞在体外的诱导分化条件,IL-12在Tfh诱导分化中的作用更为显著^[11]。IL-12被发现在诱导高表达IL-21的CD4⁺ T细胞与诱导Tfh细胞关键转录因子Bcl-6表达的过程中有显著作用,在体外单独以IL-12诱导Naïve CD4⁺ T细胞表现出促B细胞分泌IgA、IgM与IgG的能力^[12]。IL-12与IL-23共用的Th细胞表面受体IL-12R β 1受体缺陷患者表现出显著的Tfh分化水平降低与生发中心形成减少。这都说明了IL-12在Tfh体外诱导过程中的独特作用。本实验的目的并不在于证明IL-12对Tfh细胞的诱导分化作用,而在于摸索其诱导作用的最佳浓度。因此,本实验探究了在Tfh其他诱导因子存在的条件下,IL-12的剂量对Tfh诱导分化效率的影响,结论为IL-12的诱导浓度与Tfh分化效率呈正相关,1 ng/ml IL-12诱导时,Tfh分化效率峰值可达CD4⁺ CXCR5⁺细胞的20%。诱导分化的Tfh细胞体现出高表达的ICOS水平,而ICOS的高表达证明此类Tfh处于激活状态,可以通过ICOS信号辅助B细胞增殖分化,进一步证明了本实验诱导条件的优势。

T细胞的增殖分化均需要TCR信号激活,而作为强TCR信号的anti-hCD3e单抗处于可溶相或处于固体基质连接相时激活TCR信号的强度可以

有很大差别。在体内环境中, TCR 信号在 APC 表面高表达, 内源性 CD4⁺ T 细胞的激活所需的 TCR 信号均来自 APC。因此内源性 TCR 信号均为连接固相(APC)的状态。因此本实验中探索了 anti-

hCD3e 单抗过夜包被于细胞培养板底与可溶状态的相态差异对 Tfh 体外分化效率的影响, 发现固相包被的 anti-hCD3e 单抗在相同浓度下激活 T 细胞分化的能力显著高于可溶相态。

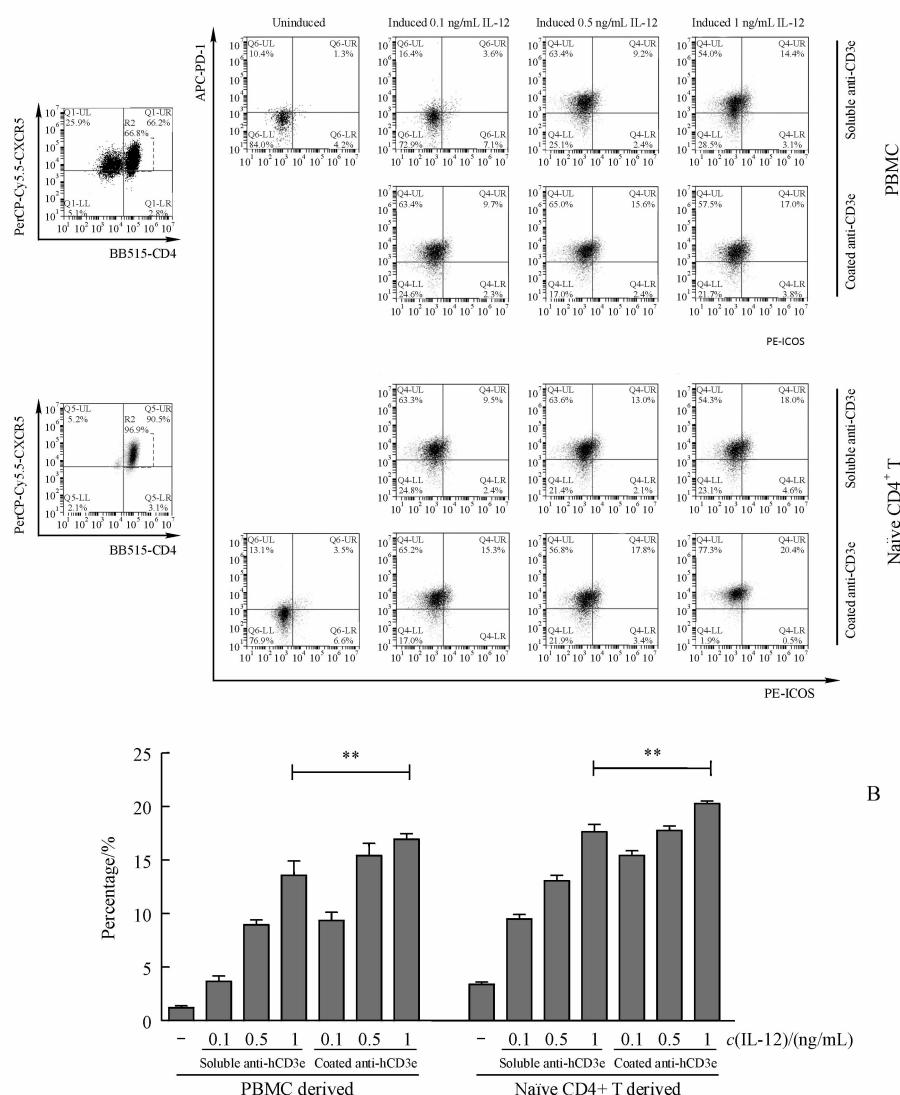


Figure 2 FACS analysis of *in vitro* induced cells gated by CD4⁺ CXCR5⁺ ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: Differentiation efficiency of Tfh cells (CD4⁺ CXCR5⁺ PD-1⁺ ICOS⁺) analyzed by FACS; B: Differentiation efficiency of Tfh by FACS, pre-coated anti-hCD3e induced significantly higher differentiation level than soluble anti-hCD3e

* * $P < 0.01$

抗原提呈细胞(APC)包含树突状细胞、B 细胞等, 其表面的多种共刺激因子对于 T 细胞的活化有着重要的辅助作用。T 细胞激活增殖所需的共刺激因子在生理条件下大部分由 APC 提供, 而文献报道体外环境下加入 CD28 单抗作为共刺激因子可以大为减少抗原提呈细胞(APC)的辅助作用, IL-6 与 IL-23 均已被证明可通过激活 STAT3 信号

通路上调 Tfh 细胞分化的关键转录因子 Bcl-6 的表达水平并抑制与其拮抗表达的 Blimp-1, IL-12 也被发现在诱导 Bcl-6 表达的过程中有显著作用, 从而建立了人 Tfh 细胞体外诱导分化的初步模型。本实验首先探索了从人 PBMC 中直接诱导与先经过 anti-hCD3 磁珠阴性筛选得到的 Naive CD4⁺ T 细胞开始诱导所得的 Tfh 分化效率差异, 在体外存在

anti-CD28共刺激因子的条件下,Naïve CD4⁺ T细胞开始的诱导分化相较于从PBMC开始可以得到更高的分化效率。

影响Tfh体外分化的因素尚有许多未曾探索,例如诱导的最佳时长、细胞因子环境的再优化、在体外无共刺激因子条件下的APC辅助效率,均有待进一步实验验证。本实验最终确定的Tfh体外诱导分化条件为预包板anti-CD3e与anti-CD28活化,IL-6,IL-12,IL-23,TGF-β诱导Naïve CD4⁺ T细胞分化6 d,流式检测Tfh细胞分化效率在18%~20%,此方案具有诱导效率高、诱导时间短、诱导方法简单等优点,为Tfh细胞的分化调控机制研究提供了可靠的体外平台。

参 考 文 献

- [1] Ueno H, Banchereau J, Vinuesa CG. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice [J]. *Nat Immunol*, 2015, **16**(2): 142~152.
- [2] Qi H. T follicular helper cells in space-time [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, **16**(10): 612~625.
- [3] Förster R, Mattis AE, Kremmer E, et al. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen [J]. *Cell*, 1996, **87**(6): 1037~1047.
- [4] Vinuesa CG, Cyster JG. How T cells earn the follicular rite of passage [J]. *Immunity*, 2011, **35**(5): 671~680.
- [5] Linterman MA, Beaton L, Yu D, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses [J]. *J Exp Med*, 2010, **207**(2): 353~363.
- [6] Bolduc A, Long E, Stapler D, et al. Constitutive CD40L expression on B cells prematurely terminates germinal center response and leads to augmented plasma cell production in T cell areas [J]. *J Immunol*, 2010, **185**(1): 220~230.
- [7] Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease [J]. *Immunity*, 2014, **41**(4): 529~542.
- [8] Xu H, Liu J, Cui X, et al. Increased frequency of circulating follicular helper T cells in lupus patients is associated with autoantibody production in a CD40L-dependent manner [J]. *Cell Immunol*, 2015, **295**(1): 46~51.
- [9] Jacquemin C, Schmitt N, Contin-Bordes C, et al. OX40 ligand contributes to human lupus pathogenesis by promoting T follicular helper response [J]. *Immunity*, 2015, **42**(6): 1159~1170.
- [10] Schmitt N, Liu Y, Bentebibel SE, et al. The cytokine TGF-β co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells [J]. *Nat Immunol*, 2014, **15**(9): 856~865.
- [11] Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire [J]. *Nat Immunol*, 2009, **10**(4): 385~393.
- [12] Schmitt N, Liu Y, Bentebibel SE, et al. The cytokine TGF-β co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells [J]. *Nat Immunol*, 2014, **15**(9): 856~865.

· 校园信息 ·

本刊编辑部被评为“2017年中国高校科技期刊优秀团队”

由中国高校科技期刊研究会组织的“2017年中国高校科技期刊优秀团队”评选结果于2017年11月8日公布。活动共评选出高校科技期刊优秀团队98个,《中国药科大学学报》编辑部榜上有名。

本次评选旨在鼓励高校科技期刊编辑出版单位,不断提高期刊编辑出版质量和学术影响力,充分肯定高校科技期刊的创新精神、辛勤努力和突出贡献,稳定并壮大编辑队伍、进一步提升高校科技期刊工作,鼓励团队合作、促进学风建设。

此次获奖,得益于《中国药科大学学报》编辑部长期以来严谨求实的工作作风,编辑部始终重视刊物学术质量、认真做好编辑出版工作,是编辑部全体人员齐心努力、为药学学术成果传播兢兢业业工作的结果。

(本刊编辑部)