

耐受型 DC/TGF- β 联合诱导的 iTreg 细胞能有效抑制自身免疫性关节炎

杨洁¹ 孔宁² 杨懿铭¹ 谢如锋¹ 王志成³ 孙娟¹ 蒋雪玉¹

摘要 目的 初步探讨通过成熟耐受型 DC(mtDC)与转化生长因子- β (TGF- β)联合诱导的诱导型调节性 T 细胞(iTreg 细胞)对自身免疫性关节炎的抑制作用。方法 在体外,对 CD4⁺CD25⁻T 细胞进行 TGF- β 诱导和 mtDC 细胞扩增,获得 iTreg_{mtDC} 细胞。通过流式细胞术、细胞计数、CBA 等方法检测 iTreg_{mtDC} 细胞的表型、对 CD4⁺T 效应细胞增殖的抑制作用。在体内实验中, iTreg_{mtDC} 细胞以 1×10^6 个细胞/ml 的剂量过继性注入胶原诱导性关节炎(CIA)小鼠体内,并通过关节病变评分、病理组织病变评分、血清中细胞因子、总 anti-C II IgG 的分泌情况来评价 iTreg_{mtDC} 细胞对 CIA 的抑制作用。结果 在体外,通过 TGF- β 和 mtDC 细胞两轮诱导/扩增后,

Treg_{mtDC} 细胞得以大量扩增,并能持续表达高水平的 Foxp3。在体外,与 iTreg 细胞相比, iTreg_{mtDC} 细胞有更强的抑制效应 T 细胞增殖的能力。在体内,与 iTreg 细胞相比, iTreg_{mtDC} 细胞的过继性输注能更有效地减少发病关节处的炎性浸润,进一步改善 CIA 的症状;对 CIA 小鼠体内细胞因子的分泌有更强的调节能力,能更显著地减少炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、白介素-17(IL-17)的分泌,并促进大量 TGF- β 产生;更明显地降低总 anti-C II IgG 的分泌量;进而更有效地抑制 CIA 病程的发展。结论 与 iTreg 相比, iTreg_{mtDC} 细胞能通过调节体内细胞因子和抗 C II IgG 的分泌更有效地抑制 CIA 病程发展。

关键词 iTreg 细胞;耐受型树突状细胞;胶原诱导型关节炎
中图分类号 R 593.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0066-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.014

2016-09-09 接收

基金项目:上海市自然科学基金面上项目(编号:13ZR1438900);国家自然科学基金面上项目(编号:81270650)

作者单位:¹上海市血液中心血液工程学科,上海 200051

²复旦大学附属华山医院风湿职业病科,上海 200040

³复旦大学附属华山医院检验科,上海 200040

作者简介:杨洁,女,博士,助理研究员,责任作者,E-mail:yangjie@sbc.org.cn

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一类发病率高、致残率高的自身免疫性疾病,其病理机制不明,临床治疗效果欠佳。调节性 T 细胞(regula-

Influences of copper sulfate on related inflammatory markers of HepG2 cells

Zhang Liangliang¹, Dong Jianjian², Xu Chenchen¹, et al

(¹ Graduate Division of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038; ² Dept of Neurology, Affiliated Hospital of Neurology Institute, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061)

Abstract Objective To observe the influences of copper sulfate on related inflammatory markers such as nuclear factor- κ B(NF- κ B) of HepG2 cells, the cell lines of hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods** HepG2 cells were cultured by RPMI-1640 contained various concentrations of copper sulfate *in vitro*. MTT colorimetric assay was used to detect the growth inhibitory effect of copper sulfate on HepG2 cell. Western blot was used to estimate the effect of copper sulfate on changes of related inflammatory markers, for instance, NF- κ Bp65, interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-4(IL-4), interleukin-5(IL-5), interleukin-6(IL-6) and γ -interferon(IFN- γ). **Results** The growth of HepG2 cells was inhibited by copper sulfate in certain concentrations. The expression levels of NF- κ B, IFN- γ and IL-5 were reduced and IL-1 β , IL-4 and IL-6 were up-regulated in HepG2 cells by copper sulfate with a dose-dependent manner. **Conclusion** Copper sulfate may inhibit the proliferation of HepG2 cells. And the inflammatory reaction in HepG2 cells can be suppressed by copper sulfate through lowering the levels of NF- κ B, IFN- γ and IL-5 and increasing the levels of IL-1 β , IL-4 and IL-6.

Key words copper sulfate; HepG2 cells; hepatocellular carcinoma; inflammation; nuclear factor- κ B

tory T cells, Tregs) 在免疫调节和抑制自身免疫性疾病中起着关键作用。近来, 基于 Treg 的细胞疗法已被证明在多种自身免疫性疾病动物模型中有显著治疗效果^[1]。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 诱导的 Treg 细胞 (induced tregs, iTregs) 能高表达 Foxp3, 并通过抑制效应 T 细胞的增殖、抑制 Th17 细胞活化、阻止破骨细胞生成以及控制滑膜成纤维细胞的过度增生等途径, 有效抑制胶原诱导型关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 的病程发展^[2-4]。但 iTreg 细胞疗法在临床运用中仍存在阻碍。通过单纯 TGF- β 诱导这一经典方法培养的 iTreg 细胞 Foxp3 表达率仅为约 60%; 且在诱导过程中, 细胞出现大量死亡, 导致 iTreg 细胞的数量可能无法满足临床输注需求^[5]。因此, 有必要进一步优化 iTreg 细胞的体外诱导/扩增方法。该研究拟建立诱导/扩增 iTreg 细胞的新方法, 即在诱导/扩增体系中, 加入了成熟的耐受型 DC 细胞 (mature tolerogenic DCs, mtDCs) 作为刺激细胞, 并在此基础上, 进一步观察由 TGF- β /mtDC 细胞联合诱导的 iTreg 细胞是否对 CIA 具有有效的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 DBA1/J (D1) 小鼠, 淡褐色, 雄性, MHC 分子为 H-2q。胶原诱导型关节炎模型用 D1 小鼠 8~10 周龄, 20~22 g, SPF 级; 细胞来源用 D1 小鼠 6 周龄, 16~18 g, 清洁级。实验动物均购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 有实验动物质量合格证, 动物运输盒包装均符合相应动物的微生物级别要求。实验动物的饲料及饮用水均经灭菌处理, 饲养条件符合相应动物的微生物级别要求。

1.2 试剂与仪器 牛 II 型胶原 (CII)、完全弗氏佐剂 (CFA)、小鼠 II 型胶原总 IgG 抗体 ELISA 试剂盒购自美国 Chondrex 公司; 标准胎牛血清、RPMI 1640、PBS 均购自美国 Gibco 公司; 流式荧光抗体 CD80、CD86、CD40、IA-IE、CD11c、CD11b 以及 Anti-CD3/28 monoclonal antibody 等均购自美国 BD Biosciences 公司; CD4⁺CD25⁺ regulatory T Cell Isolation Kit、CD4⁺/CD8⁺ T Cell Isolation Kit 购自美国 Miltenyi 公司; 细胞固定破膜剂购自美国 eBioscience 公司; 白介素 2 (interleukin-2, IL-2)、白介素 10 (interleukin-10, IL-10)、TGF- β 、巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 等购自美国 PeproTech 公司; CFSE Cell Proliferation Kit 购自美国 Invitrogen 公司。

1.3 TGF- β 与耐受型 DC 联合诱导 iTreg 细胞 (iTreg_{mtDC}) 生成和体外功能检测

1.3.1 耐受型 DC 的体外诱导及特征鉴定 无菌取 6~8 周龄正常 D1 小鼠的胫骨与腓骨, 冲洗骨髓。将骨髓细胞悬液以 5×10^5 个细胞/ml 的浓度接种于培养皿中, 加入 GM-CSF 20 ng/ml, 37°C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养, 记为第 0 天; 第 4 天补充 GM-CSF, 添加 mL-10 15 ng/ml、TGF- β 15 ng/ml。第 10 天收获的细胞为耐受型 DC 细胞 (tDC)。若第 9 天加入 LPS 100 ng/ml 促成熟, 第 10 天收获的细胞即为成熟的耐受型 DC 细胞 (mtDC)。收集 DC 细胞, 加入流式荧光抗体 CD80-FITC、CD86-FITC、CD40-PE 和 IA-IE-PE mAb 等进行表型流式细胞术检测。

1.3.2 TGF- β 与耐受型 DC 联合诱导 iTreg 细胞 (iTreg_{mtDC}) 的生成和特征鉴定 无菌取 6~8 周龄正常 D1 小鼠的脾细胞, 通过 CD4⁺CD25⁺ regulatory T Cell Isolation Kit 分选获得 CD4⁺CD25⁻ T 细胞。第一轮诱导: TGF- β 诱导。将 CD4⁺CD25⁻ T 细胞悬于 RPMI 1640 完全培养液中, 以 2×10^6 细胞/ml 的浓度接种于 48 孔板中, 并加入 anti-CD3/28 mAb 50 ng/ml、IL-2 100 U/ml 和 TGF- β 15 ng/ml。共刺激 5 d 后, 收获细胞, 即为 iTreg 细胞。第二轮诱导: 成熟的耐受型 DC (mtDC) 诱导扩增。加入 mtDC 细胞 2×10^5 细胞/ml, iTreg:DC 的细胞数比为 5:1。共刺激 5 d 后, 收获细胞, 即 iTreg_{mtDC} 细胞。在第二轮诱导中, 若加入普通 DC 细胞 (mDC) 以相同的方式诱导扩增, 收获的细胞为 iTreg_{mDC} 细胞, 作为对照。

通过计数的方法, 计算 iTreg_{mtDC} 细胞的扩增率; 通过细胞固定/破膜后进行 Foxp3 荧光抗体染色, 流式细胞术检测 iTreg 的 Foxp3 阳性率。

1.3.3 iTreg_{mtDC} 的体外抑制作用检测 分选 CD4⁺ T 细胞并进行 CFSE 染色, CFSE + Tresp 细胞悬液接种 100 μ l 于 96 孔圆底板中, 加入 anti-CD3/28 mAb 50 ng/ml 和 IL-2 100 U/ml, 形成 Tresp 增殖体系。收集 iTreg、iTreg_{mtDC}、iTreg_{mDC} 细胞, iTreg:Tresp 的细胞数比例设定为 0:1、1:1、1:2、1:4、1:8。共培养 4 d 后, 流式细胞术检测 CFSE⁺Tresp 荧光衰减细胞的百分比。CFSE 荧光衰减细胞的百分率即 Tresp 细胞的扩增率。

1.4 iTreg_{mtDC} 细胞的过继性输注对 CIA 的体内抑制作用检测

1.4.1 关节炎小鼠模型的诱导和评估标准 牛 II 型胶原 (4 mg/ml) 和完全弗氏佐剂按照 1:1 的体积

比乳化 50 μl 乳化液在小鼠尾根部注射到皮下,记为第 0 天;第 21 天,再于尾根部皮下注射 50 μl C II-CFA 混合溶液;完成 CIA 模型的免疫。观察期于 C II 胶原首次免疫后第 50 天结束。疾病严重程度的评估按照如下标准隔天进行评分^[6] 0 分:正常小鼠关节;0.5 分:一个或多个关节的肿胀,每个关节计 0.5 分;1 分:踝关节的红斑和轻度肿胀;2 分:整个足部的红斑和轻度肿胀;3 分:整个足部的红斑和中度肿胀;4 分:整个足部的红斑和重度肿胀。按标准对每只小鼠的 4 个足部同时评分,分值为 4 个足部的总和,最大值为 16 分。

1.4.2 iTreg_{mtDC} 细胞的过继性输注 将体外诱导的 iTreg、iTreg_{mDC}、iTreg_{mtDC} 细胞输入 CIA 小鼠体内:输注剂量为 5×10^5 个细胞/只,输注时间为 CIA 小鼠 C II 胶原首次免疫后的第 25 天,输注方式为尾静脉注射;即为 CIA + iTreg 组、CIA + iTreg_{mDC} 组、CIA + iTreg_{mtDC} 组。未输注 Treg 细胞的 CIA 小鼠设为对照;即 CIA 组。每组设为 10 只小鼠。

1.4.3 iTreg_{mtDC} 细胞的过继性输注对 CIA 小鼠的体内抑制作用 CIA 关节病变评分:根据 CIA 评价体系对各组小鼠隔天进行评分;踝关节病理检测:C II 首次免疫 50 d 后,取各组小鼠的踝关节,固定、脱钙、石蜡包埋、切片后,进行 HE 染色;血清总 anti-C II IgG 和细胞因子水平的检测:C II 胶原首次免疫 50 天后,取各组小鼠血清,通过 ELISA 法检测血清中总 anti-C II IgG 水平;用 CBA 法检测血清中肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、白介素 17(interleukin-17, IL-17)、白介素 6(interleukin-6, IL-6)和 TGF-β 的水平。

1.5 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学处理。定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。本研究符合完全随机设计,有方差齐性。多组间差异采用 One-Way ANOVA 进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 耐受型 DC 细胞的表型特征 利用 GM-CSF、IL-10、TGF-β 在体外诱导正常小鼠骨髓细胞成为 tDCs,利用 GM-CSF 培养普通未成熟 DC 细胞(im-mature dendritic cells, iDCs)作为对照。经 9 d 诱导后,添加 LPS 促其成熟,分别为 mtDCs 和 mDCs。通过荧光抗体对诱导培养的各 DC 细胞 MHC 分子和共刺激分子进行标记,流式检测结果显示:4 组诱导细胞都高表达 DC 细胞的标志性分子 CD11c,

CD11c 阳性率均高于 90%,但各组细胞表达 MHC 分子 IA-IE 和共刺激分子 CD80、CD86 和 CD40 的阳性率和平均荧光强度明显不同($F = 5.162$)。与 iDC 细胞相比,经 IL-10、TGF-β 诱导后的 tDC 细胞表达低水平的 IA-IE、CD80、CD86 和 CD40 分子。即使在 LPS 促成熟后,mtDC 细胞表面的各类分子表达量也显著低于 mDC 细胞。见图 1。提示经 IL-10 和 TGF-β 诱导培养的 tDCs 在表型上处于未成熟状态,并能抵抗 LPS 的促成熟刺激,保持其耐受型表型。

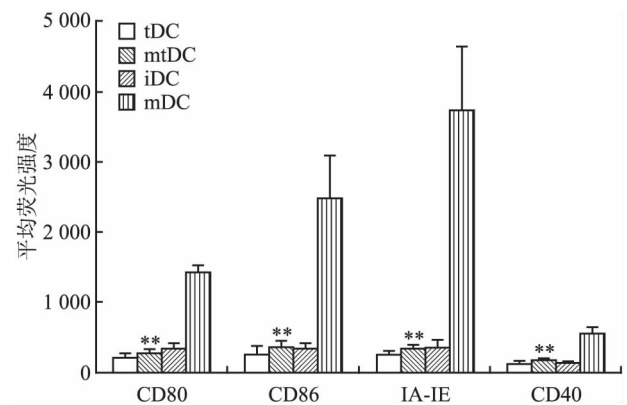


图 1 体外诱导的各 DC 细胞表面分子的平均荧光强度 (n = 10) 与 mDC 组比较: ** $P < 0.01$

2.2 促 mtDC 与 TGF-β 联合诱导扩增能获得大量 Foxp3⁺ iTreg 细胞 通过 TGF-β 和 mtDC 细胞的两轮诱导后,获得 iTreg_{mtDC} 细胞;仅 TGF-β 一轮诱导的 iTreg 细胞和第二轮由 mDC 参与诱导的 iTreg_{mDC} 细胞作为对照。通过细胞计数和流式细胞术的方法检测各组细胞的扩增率和 Foxp3 阳性率。细胞计数结果显示:与 iTreg 细胞相比, iTreg_{mDC} 细胞和 iTreg_{mtDC} 细胞经 DC 细胞刺激后均发生明显扩增,细胞数显著增加,其中 mDC 细胞扩增能力强于 mtDC 细胞($F = 0.046$, $P > 0.05$)。流式结果显示:单纯 TGF-β 诱导的 iTreg 细胞 Foxp3 阳性率仅为 $(59.14 \pm 3.97)\%$;与 iTreg 细胞相比,经 mtDC 细胞诱导扩增后, Foxp3⁺ 细胞的比例显著上升至 $(82.0 \pm 3.6)\%$;但经 mDC 细胞扩增后, Foxp3⁺ 细胞的比例反而降低至 40% 以下($F = 0.101$, $P > 0.05$)。

体外诱导接种 2×10^6 细胞/ml CD4⁺ CD25⁻ T 细胞,其中 Foxp3⁺ 细胞数 $< 0.04 \times 10^6$ 细胞/ml。经 TGF-β 一轮诱导后,可获得约 $0.63 \times 10^6 \sim 0.8 \times 10^6$ 细胞/ml Foxp3⁺ iTreg 细胞。经 mtDC 细胞第二轮诱导扩增后,可获得约 $3.52 \times 10^6 \sim 4.3 \times 10^6$ 细胞/ml Foxp3⁺ iTreg_{mtDC} 细胞;与接种时相比, Foxp3⁺ 细胞扩

增约 100 倍。但经 mDC 第二轮诱导扩增后,却只能获得约 $2.61 \times 10^6 \sim 2.73 \times 10^6$ 细胞/ml Foxp3^+ $\text{iTreg}_{\text{mDC}}$ 细胞;与接种时相比, Foxp3^+ 细胞诱导扩增率提高约 65 倍 ($F = 0.619, P < 0.05$)。提示 mDC 细胞虽然能有效地扩增细胞,但其在扩增 Foxp3^+ 细胞的同时,可能更倾向于扩增 Foxp3^- 的效应 T 细胞。见图 2。提示相对 mDC 细胞这一传统的刺激细胞,mtDC 细胞更能有效地扩增 TGF- β 诱导的 iTreg 混合细胞群中 Foxp3^+ 细胞,增加 Foxp3^+ 细胞的比例。

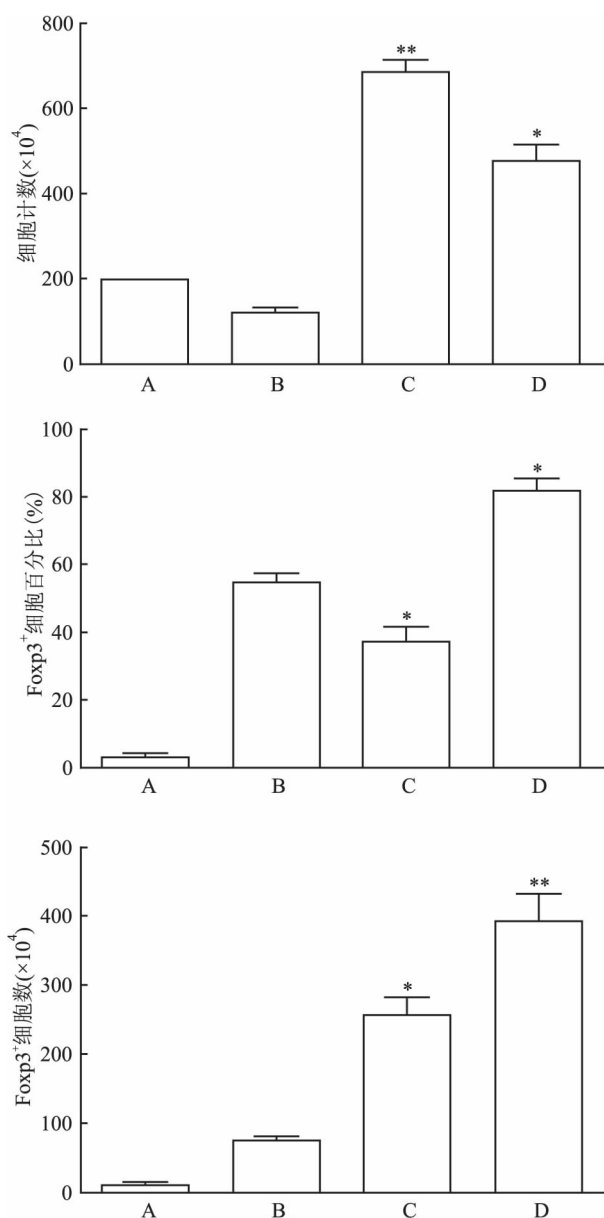


图 2 iTreg 细胞的 Foxp3 阳性率和扩增后细胞数 ($n = 5$)

A: $\text{CD4}^+ \text{CD25}^- \text{T}$; B: iTreg; C: iTreg_{mDC}; D: iTreg_{mtDC}; 与 iTreg 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 iTreg_{mtDC} 细胞能更有效地抑制效应 T 细胞的体外扩增 为了确定 iTreg_{mtDC} 细胞的体外抑制功能,在效应 T 细胞 (Tresp) 增殖体系中,加入 iTreg_{mtDC} 细胞, Treg:Tresp 的细胞数比分别为 0:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8; 共培养 4 d 后,流式细胞术检测效应细胞的扩增率。另外, iTreg 细胞和 iTreg_{mDC} 细胞的体外抑制作用以相同的方式进行检测,并进行比较。CFSE-流式检测结果显示:各组 Treg 细胞均能有效地抑制 Tresp 的增殖;而 iTreg_{mDC} 细胞在各个 Treg:Tresp 比例下,抑制能力都显示最强 ($F = 1.443, P < 0.05$)。当 Treg:Tresp 比为 1:1 时, iTreg_{mDC} 细胞和 iTreg_{mtDC} 细胞对 Tresp 增殖的抑制能力相当,抑制率均可达到 70% 左右,均显著强于 iTreg 细胞 ($P < 0.05$)。虽然 iTreg 细胞也能抑制 50% 以上的 T 细胞扩增。但当 Treg:Tresp 为 1:8 时, iTreg_{mtDC} 细胞仍显示较强的抑制作用,抑制率保持在约 50%, 但 iTreg_{mDC} 细胞的抑制能力已与 iTreg 细胞无显著性差异,仅为约 15%。提示相对于 iTreg 和 iTreg_{mDC} 细胞, iTreg_{mtDC} 细胞有更强的体外抑制 Tresp 的能力。见图 3。

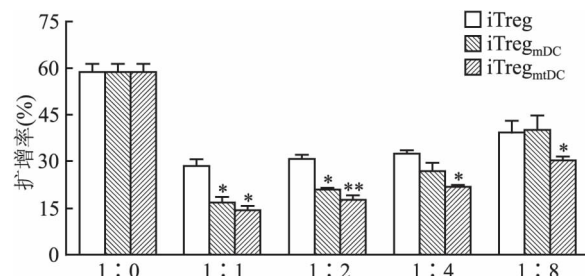


图 3 各组 iTreg 细胞对 Tresp 扩增的体外抑制作用 ($n = 4$) 与 iTreg 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 iTreg_{mtDC} 细胞能更有效地抑制 CIA 的发病进程 为了进一步确定 Treg_{mtDC} 细胞在 CIA 小鼠的体内抑制作用,本研究在 C II 胶原首次免疫后第 25 天将 Treg_{mtDC} 细胞过继性输入 CIA 小鼠体内,输注剂量为 1×10^6 细胞/只,为 CIA + Treg_{mtDC} 组。同时, iTreg 细胞和 iTreg_{mDC} 细胞也以相同的方式输注,分别为 CIA + iTreg 组和 CIA + Treg_{mDC} 组,并与 CIA + Treg_{mtDC} 组进行比较。未输注 Treg 细胞的 CIA 小鼠,设为对照组。根据 CIA 评价体系对各组小鼠隔天进行评分,评分结果显示: Treg_{mtDC} 细胞的过继性输注能显著降低关节评分 ($F = 14.39, P < 0.01$)。特别是在发病早期第 25 ~ 33 天,评分始终维持在约 1 分,第 33 天后虽评分有缓慢上升,但直至第 50 天观

察期结束,评分也仅到达4分,与CIA对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与CIA + Treg_{mtDC}组相比,虽然CIA + iTreg组和CIA + Treg_{mtDC}组也能在一定程度上抑制CIA的发病进程,在观察期结束时评分也与CIA组有显著性差异($P < 0.05$),但对CIA的抑制作用不如CIA + Treg_{mtDC}组明显。同时,单纯TGF- β 诱导的iTreg细胞与iTreg_{mtDC}对CIA发展的抑制作用无显著性差异。见图4。在观察期结束后,各组后踝关节样本进行HE染色,病理分析结果显示正常小鼠关节无炎症细胞浸润;CIA小鼠关节有大量炎症细胞浸润;与CIA组相比,CIA + Treg_{mtDC}组小鼠足部未见明显的炎症细胞浸润;而CIA + iTreg_{mtDC}组小鼠关节部位仍有中度炎症细胞浸润。CIA + iTreg组病理评分在炎症程度和骨质破坏程度上与CIA + Treg_{mtDC}组病理表现相似,无显著性差异。见图5。提示相对于iTreg和iTreg_{mtDC}细胞,Treg_{mtDC}的过继性输注对CIA发病进程的抑制作用最强,能显著减轻发病部位的炎症情况,改善CIA症状。

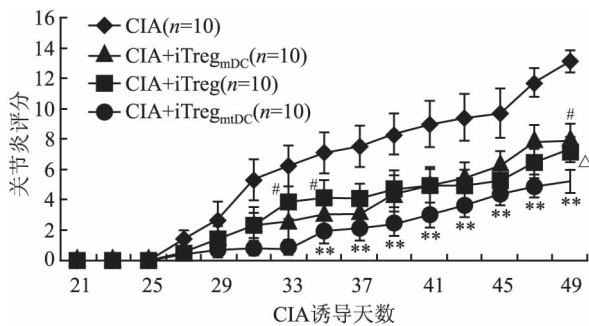


图4 各组分iReg细胞输注后CIA小鼠的关节炎评分

与CIA组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与CIA + iTreg_{mtDC}组比较: $\Delta P < 0.05$

2.5 Treg_{mtDC}细胞能更有效地调节CIA小鼠血清中细胞因子的分泌 观察期结束后,收集上述输注Treg细胞的各组小鼠血清,进一步检测血清中细胞因子TNF、IL-17、IL-6和TGF- β 的分泌情况。CBA和ELISA的结果显示:与CIA小鼠相比,过继性输

注iTreg、iTreg_{mtDC}和iTreg_{mtDC}后,血清中炎症细胞因子TNF、IL-6、IL-17的分泌量均有不同程度的降低;而TGF- β 的分泌量明显增多($F = 0.164, P < 0.05$)。其中,Treg_{mtDC}的过继性输注对细胞因子分泌的调节作用最大,特别是输注后血清中TGF- β 的分泌量甚至显著高于CIA + iTreg组($P < 0.05$)。提示相对于iTreg和iTreg_{mtDC}细胞,Treg_{mtDC}对CIA小鼠体内血清中各个细胞因子的分泌具有更强的调节作用,更有效抑制炎症细胞因子分泌,并促进TGF- β 的大量产生。见图6。

2.6 Treg_{mtDC}能更有效地抑制CIA小鼠血清中总anti-C II IgG的产生 ELISA法检测观察期结束时各组小鼠血清中总anti-C II IgG的分泌情况。过继性输注不同方法扩增诱导的iTregs均能在一定程度上减少总anti-C II IgG的水平($F = 1.349, P < 0.05$)。与CIA小鼠相比,iTreg_{mtDC}的过继性输注能显著降低血清中总anti-C II IgG的分泌量($P < 0.05$);而iTreg和iTreg_{mtDC}细胞输注后,虽对总anti-C II IgG的产生也有一定程度的抑制,但与CIA组相比差异无显著性。提示相对于iTreg和iTreg_{mtDC}细胞,iTreg_{mtDC}的过继性输注对CIA小鼠体内血清中总anti-C II IgG分泌的抑制作用更强。见图7。

3 讨论

在近十年的研究过程中,越来越多的动物实验证明,过继性输注iTreg细胞能稳定而有效地抑制多种自身免疫疾病^[1]。相对于炎症微环境下抑制功能不稳定的天然型Treg(natural Treg, nTreg)细胞而言,基于iTreg的细胞疗法有更大的临床运用潜力。但在经典的iTreg体外诱导培养过程中发现,单纯TGF- β 诱导的iTreg细胞存在着Foxp3表达率不高和细胞数量不足两大问题,这严重制约着iTreg细胞疗法的临床运用。因此,本研究目的在于寻求新的体外诱导/扩增iTreg细胞的方法,以求在维持/增强Treg免疫抑制功能的前提下,提高Foxp3的阳性表达率,并使细胞大量扩增,以满足临床输注需求,提

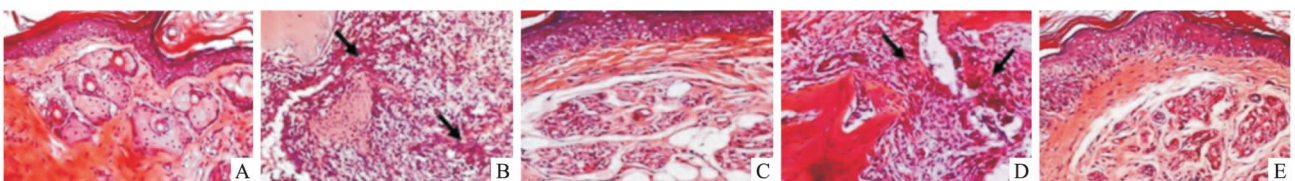


图5 iTreg细胞输注后CIA小鼠的踝关节处病理结果 HE ×200

A: WT; B: CIA; C: CIA + iTreg; D: CIA + iTreg_{mtDC}; E: CIA + iTreg_{mtDC}

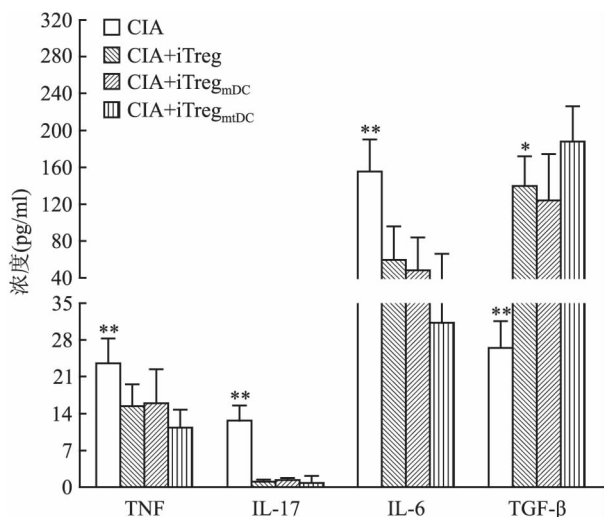


图6 各组 iTreg 细胞输注后 CIA 小鼠血清中细胞因子的分泌情况 (n=5) 与 CIA + iTreg_{mDC} 组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

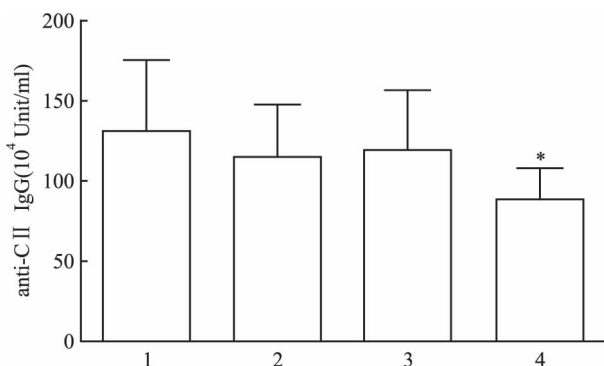


图7 iTreg 细胞输注后 CIA 小鼠血清中总 anti-C II IgG 的分泌情况 (n=5)

1: CIA; 2: CIA + iTreg; 3: CIA + iTreg_{mDC}; 4: CIA + iTreg_{mDC}; 与 CIA 组比较: * P < 0.05

高 Treg 细胞疗法运用于临床的可行性。

本研究表明,体外经 IL-10/TGF-β 诱导的耐受型 DC 细胞有稳定的耐受型表型,并能分泌大量的免疫抑制性细胞因子。更重要的是,与传统的刺激细胞 mDC 细胞不同,这一 tDC 细胞在 LPS 促成熟后,不仅能保持耐受特性,还有优先扩增 Foxp3⁺ T 细胞的能力,而非扩增 Tresp。可见,成熟的 tDC 细胞是 iTreg 混合细胞群理想的扩增细胞。因此,本研究创新性的设计了 TGF-β 联合 mtDC 两轮诱导的扩增方法,获得新的 iTreg 细胞,即 iTreg_{mDC} 细胞。与单纯 TGF-β 诱导的 iTreg 细胞相比, iTreg_{mDC} 细胞不仅在数量上得以大量增加,而且 Foxp3 阳性率也有明显的上调。

本研究大量的体内外实验结果表明,与 iTreg 细胞相比, iTreg_{mDC} 细胞具有更强的抑制作用。在体外实验中,即使少量的 iTreg_{mDC} 细胞 (iTreg : Tresp = 1 : 8) 也能有效地抑制效应细胞增殖,而同等数量的 iTreg 的抑制作用不明显。同时, iTreg_{mDC} 细胞在体外对 Tresp 增殖的抑制作用也略强于 iTreg 细胞。这可能与活化程度高的 Treg 细胞有更强地抑制能力有关^[7]。有报道^[3]称,输注 3 × 10⁶ 细胞/ml iTreg 细胞能有效缓解 CIA 小鼠的发病症状。鉴于 iTreg_{mDC} 细胞更强的体外抑制能力,本研究减少了 iTreg_{mDC} 细胞的体内输注量,即 1 × 10⁶ 个细胞/只。体内实验表明,低剂量的 iTreg_{mDC} 细胞依然能有效地抑制 CIA 病程发展;而同等剂量的 iTreg 细胞对 CIA 的抑制作用明显下降。可见,较之 iTreg 细胞而言, iTreg_{mDC} 细胞疗法有抑制作用强、输注剂量少等优点,更符合临床运用要求。

关节炎评分结果和病理结果显示, iTreg_{mDC} 细胞的过继性输注能显著降低关节评分,特别是在发病早期,能有效的控制 CIA 的发病进程,并在整个观察期内使关节炎的炎性情况维持在较低水平。提示在关节炎发病初期进行 Treg 细胞治疗将大大提高治疗的效果,有效地改善关节炎症状。在 CIA 小鼠体内,血清中炎性细胞因子 TNF、IL-6、IL-17 的分泌量处于较高水平,这些炎性因子分泌水平与 CIA 的发病及病程进展有着正相关关系。过继性输注 iTreg_{mDC} 后,血清中炎性因子显著降低,而抑炎因子 TGF-β 的分泌量则显著增多。由此推测, iTreg_{mDC} 的过继性输注能调节体内细胞因子的分泌,通过降低体内微环境的炎性程度从而改善 CIA 的炎症症状。同时,过继性输注 iTreg_{mDC} 后, CIA 小鼠体内的总 anti-C II IgG 的分泌量明显下降。因此,在体内 iTreg_{mDC} 也可能通过有效抑制总 anti-C II IgG 的分泌量达到控制 CIA 的发病进展。可见, iTreg_{mDC} 细胞这一显著的抑制作用具体体现为能更有效地调节体内细胞因子分泌,更强地抑制抗 C II-IgG 抗体的产生。

另外,虽然 iTreg_{mDC} 细胞的 Foxp3 阳性率高达 80% 以上,但整个细胞群中仍含有 10% 的 CD4⁺ Foxp3⁻ 细胞和约 5% 的 CD11c⁺ mtDC 细胞。Lan et al^[8] 发现在 TGF-β 诱导后,这些活化的 CD4⁺ Foxp3⁻ 细胞与一般的 Tresp 不同,不具有致病作用。同时,也有多篇文献报道,耐受型 DC 的过继性输注能有效抑制小鼠关节炎的发生发展^[9]。在后续的体内实验中,本研究并未去除 iTreg_{mDC} 细胞中混杂的

mtDC 细胞,因此,这些数量极其有限的 mtDC 细胞在体内对 CIA 也发挥了一定的抑制作用。

综上所述,本研究建立了新的体外诱导扩增 iTreg 的方法,通过耐受型 DC 与 TGF- β 的联合诱导, Foxp3⁺ iTreg 细胞不仅在细胞数上得以大量增加,而且能维持 Foxp3 的持续高表达。与单纯 TGF- β 诱导的 iTreg 细胞相比,在体外具有更强的抑制作用,并能更有效的通过调节细胞因子、anti-C II-IgG 的分泌来抑制 CIA 的发展。这一新的 Treg 细胞诱导扩增策略,将为 iTregs 治疗 RA 的临床应用提供有益的指导,从而推动 Treg 相关细胞治疗领域的发展。

参考文献

- [1] Bluestone J A, Trotta E, Xu D. The therapeutic potential of regulatory T cells for the treatment of autoimmune disease [J]. *Expert Opin Ther Targets* 2015, 19(8): 1091-103.
- [2] Miyara M, Ito Y, Sakaguchi S. TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases [J]. *Nat Rev Rheumatol* 2014, 10(9): 543-51.
- [3] Kong N, Lan Q, Chen M, et al. Antigen-specific transforming growth factor β -induced Treg cells, but not natural Treg cells, ameliorate autoimmune arthritis in mice by shifting the Th17/Treg cell balance from Th17 predominance to Treg cell predominance [J]. *Arthritis Rheum* 2012, 64: 2548-58.
- [4] Kong N, Lan Q, Chen M, et al. Induced T regulatory cells suppress osteoclastogenesis and bone erosion in collagen-induced arthritis better than natural T regulatory cells [J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(9): 1567-72.
- [5] Fantini M C, Dominitzki S, Rizzo A, et al. *In vitro* generation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory cells from murine naive T cells [J]. *Nat Protoc* 2007, 2(7): 1789-94.
- [6] Yang J, Yang Y, Ren Y, et al. A mouse model of adoptive immunotherapeutic targeting of autoimmune arthritis using Allo-tolerogenic dendritic cells [J]. *PLoS One* 2013, 8: e77729.
- [7] Lan R Y, Ansari A A, Lian Z X, et al. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity [J]. *Autoimmun Rev*, 2005, 4(6): 351-63.
- [8] Lan Q, Zhou X, Fan H, et al. Polyclonal CD4⁺ Foxp3⁺ Treg cells induce TGF β -dependent tolerogenic dendritic cells that suppress the murine lupus-like syndrome [J]. *J Mol Cell Biol* 2012, 4: 409-19.
- [9] Ahmed M S, Bae Y S. Dendritic cell-based immunotherapy for rheumatoid arthritis: from bench to bedside [J]. *Immune Netw*, 2016, 16(1): 44-51.

iTregs induced by tolerogenic DCs plus TGF- β could effectively suppress autoimmune arthritis

Yang Jie¹, Kong Ning², Yang Yiming¹, et al

¹Blood Engineering Laboratory, Shanghai Blood Center, Shanghai 200051;

²Division of Rheumatology, Huashan Hospital Affiliated Fudan University, Shanghai 200040

Abstract Objective To determine the properties of iTregs expanded by mature tolerogenic dendritic cells (mtDCs) plus TGF- β and explore their potential to ameliorate collagen-induced arthritis (CIA) in a mouse model.

Methods *In vitro*, CD4⁺ CD25⁻ T cells were purified from splenocytes of D1 mice; after induction by TGF- β and expansion by mtDCs, the phenotype, proliferation and the suppression of iTreg_{mtDCs} were assessed by flow cytometry. For *in vivo* experiments, 1×10^6 iTreg_{mtDC} cells were transferred into CIA mice when CIA onset. Clinical and histopathologic scores, cytokine and anti-C II-IgG antibody secretion in serum were analyzed. **Results** After induction of TGF- β and mtDCs *in vitro*, the iTreg_{mtDC} cells could be expanded effectively and continued to express higher level of Foxp3. Compared with iTregs, iTreg_{mtDC} cells showed stronger inhibitory effect. The more remarkable anti-arthritis activity, the improved clinical scores and histological end-points were found in the iTreg_{mtDC}-treated group than those in iTreg-treated group. Serological levels of TNF- α , IL-6, IL-17 and anti-C II antibodies were also significantly lower and TGF- β production was higher in CIA mice following adoptive transfer of iTreg_{mtDC} cells as compared with iTregs. **Conclusion** These results indicate that iTreg_{mtDC} reduced more markedly the severity and progression of CIA than iTregs, which was associated with modulating inflammatory cytokine and anti-C II-IgG secretions to lower levels.

Key words iTreg; tolerogenic dendritic cells; collagen-induced arthritis