

鞘碱性蛋白活化的 SD 大鼠 T 细胞培养与鉴定

赵 皓^{1,2}, 余 暲², 张敬星³, 陈月娟³, 吕合作^{2,3}, 王保龙¹

摘要 目的 培养针对髓鞘碱性蛋白(MBP)特异的SD大鼠T淋巴细胞,对其表型和细胞因子分泌特征进行鉴定。方法 将MBP免疫SD大鼠,收集回流淋巴结,制备成单细胞悬液,在RMPI 1640培养液中用MBP反复刺激获得MBP特异性T细胞(MBP-T)。然后用³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)掺入法测定其对MBP刺激的反应性,用流式细胞术鉴定其表型和细胞因子的产生。结果 当MBP抗原存在的情况下,MBP-T的³H-TdR掺入量明显增加。流式细胞术检测表明MBP-T主要为CD3⁺CD4⁺的T淋巴细胞(98%),并可以产生干扰素 γ (IFN- γ)和白细胞介素10(IL-10)等细胞因子。结论 MBP免疫SD大鼠的回流淋巴结细胞,经过体外扩增可以获得MBP特异性的T细胞,其表型主要为CD3⁺CD4⁺,并可以产生Th1和Tr1型细胞因子。

关键词 髓鞘碱性蛋白;淋巴细胞;免疫;流式细胞术

中图分类号 R 392.12

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)01-0004-05

2014-09-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81071268,81271363)

作者单位: ¹安徽医科大学附属省立医院检验科,合肥 230001

²蚌埠医学院第一附属医院中心实验室,蚌埠 233004

³组织移植安徽省重点实验室,蚌埠 233030

作者简介: 赵 皓,男,主管检验师,硕士研究生;

王保龙,男,教授,主任检验师,博士生导师,责任作者,

E-mail: wbl196555@163.com

传统观点认为中枢神经系统(central nervous system, CNS)是一个免疫豁免区, CNS抗原如髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)与免疫系统在解剖学上处于隔离状态,被称为隐蔽抗原^[1-2]。因而,长期以来一直认为CNS损伤后的自身免疫反应会加重继发性损害,不利于神经保护和神经再生^[3-4]。然而,以色列Schwartz et al^[5]研究小组却提出CNS“保护性自身免疫”学说。该学说认为CNS损伤后的自身免疫反应除具有加重继发性损伤的负面作用外,也具有神经保护和促进神经再生的积极作用,只是在自然状态下,这种作用过于微弱,被其负面作用压制而难以表现。采用一些免疫干预的手段,如用体外扩增的MBP特异性T细胞(myelin basic protein specific T cells, MBP-T)进行过继免疫则可以激发这种神经保护作用^[6]。因此,该研究拟采用MBP免疫SD大鼠,获取回流淋巴结,再通过反复刺激的方法体外扩增MBP特异的T细胞,然后采用流式细胞术检测其表型和细胞因子分泌特征。

1 材料与方法

1.1 实验动物 5只健康成年清洁级SD大鼠, 220~250 g, 由蚌埠医学院实验动物中心提供。动物实

The agonist of TLR7 Gardiquimod up-regulates the expression of interleukin-15 in BxPC-3 cells

Wang Fang, Jin Rui, Li Lei, et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression of Toll-like receptor 7 (TLR7) in pancreatic cancer BxPC-3 cells, and to explore the effect of TLR7 activation on the expression of interleukin-15 (IL-15). **Methods** BxPC-3 cells were used to analyze the expression of TLR7 by Western blot and Real-time PCR. The cells were treated with Gardiquimod (3 μ g/ml) at different times, the expression of IL-15 at mRNA level by Real-time PCR. Western blot was performed to analyze the phosphorylation level changes of phosphatidylinositol kinase serine/threonine kinase (PI3K-AKT) protein in BxPC-3 cells stimulated by TLR7 ligand Gardiquimod. **Results** Western blot and Real-time PCR results showed that compared with peripheral blood mononuclear cells (PBMC), TLR7 presented weak expression in BxPC-3 cells. Gardiquimod could increase the expression of IL-15 in BxPC-3 cells. TLR7 agonist could activate the PI3K-AKT signaling pathway. **Conclusion** Gardiquimod can up-regulate the expression of IL-15 and this effect can be associated with PI3K-AKT signaling pathway.

Key words TLR7; Gardiquimod; interleukin-15; PI3K-AKT; BxPC-3

验和护理均按照美国国家研究委员会 1996 年制定的《实验动物护理和使用指南》及蚌埠医学院动物保护和利用委员会制定的《啮齿动物生存手术的方针政策》执行。

1.2 主要试剂与仪器 完全福氏佐剂(complete freund's adjuvant, CFA) (美国 BBI 公司); MBP、刀豆蛋白 A(concanavalin A, conA)、丝裂霉素 C、多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)、Monesion(美国 Sigma 公司); RPMI 1640(美国 Gibco 公司); 谷氨酰胺、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、二巯基乙醇、丙酮酸钠(中国华美公司); 庆大霉素(上海中西制药有限公司); Ficoll 淋巴细胞分离液(上海试剂二厂); 复方泛影葡胺(上海淮海制药厂); 重组人 IL-2(recombinant human interleukin-2, rhIL-2) (长春长生基因药业公司); 100 × Glutamine、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、汉克斯平衡盐溶液(hank's balanced salt solution, HBSS) (Ca^{2+} , Mg^{2+} free) (美国 Invitrogen 公司); ^3H -胸腺嘧啶(^3H -thymidine, ^3H -TdR) (北京原子能股份有限公司); 戊巴比妥钠(上海化学试剂采供站进口分装); FITC 标记的 CD3 单克隆抗体(FITC conjugated anti-CD3 mAb, CD3-FITC)、PE 标记的 CD4 单克隆抗体(PE conjugated anti-CD4 mAb, CD4-PE)、APC 标记的 CD8 单克隆抗体(APC conjugated anti-CD8 mAb, CD8-APC) (美国 Caltag laboratories); FITC 标记的 IFN- γ 抗体(FITC conjugated anti-IFN- γ , IFN- γ -FITC) (美国 Harlan 公司); PE 标记的 IL-4 抗体(PE conjugated anti-IL-4, IL-4-PE)、FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司); eFluor[®] 660 标记的 IL-4 抗体(eFluor[®] 660 conjugated anti-IL-4, IL-4-eFluor[®] 660) (美国 eBioscience 公司)。

1.3 MBP-T 的培养与扩增 将 MBP 溶于磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS) 配成 1 mg/ml 的浓度, 与等量的 CFA(4 mg/ml 热灭活的结核杆菌) 混合, 置 2 只注射器中来回抽推制成 MBP/CFA 油包水乳剂, 4 °C 保存备用。将 0.2 ml MBP/CFA 乳剂注射于 SD 大鼠双侧后足跖真皮内进行免疫。免疫 9 d 后, 无菌取大鼠腹股沟淋巴结, 制备成单细胞悬液, 用 RPMI 1640 洗 2 次后, 用刺激培养基(RPMI 1640 添加 L-谷氨酰胺 2 mmol/L、二巯基乙醇 50 $\mu\text{mol/L}$ 、丙酮酸钠 1 mmol/L、Hepes 10 mmol/L、庆大霉素 50 000 IU 和体积分数为 2% 的同基因 SD 大鼠血清) 调细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$, 加 MBP(25 mg/L) 于 37 °C 5% CO_2 培养箱中培养 3 d, 刺激

MBP 特异的 T 细胞, 使之活化。培养 3 d 后, 收集细胞, 室温离心(1 000 r/min, 10 min) 取沉淀, 用 2 ml RPMI 1640 液重悬细胞。用 3 ml Ficoll 淋巴细胞分离液(用泛影葡胺调密度至 1.088) 于 1 500 r/min 离心 30 min 后分离活化的 T 细胞母细胞。用增殖培养基(RPMI 1640 添加 2 mmol/L L-谷氨酰胺、50 $\mu\text{mol/L}$ 二巯基乙醇、1 mmol/L 丙酮酸钠、10 mmol/L Hepes、50 000 IU 庆大霉素、2% 的同基因 SD 大鼠血清、8% FBS 和 50 U/ml rhIL-2) 调细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 置 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养。5 ~ 7 d 后, 用增殖培养基调 T 细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 与 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 同基因 SD 大鼠丝裂霉素 C(50 $\mu\text{g/ml}$, 37 °C 孵育 30 min) 处理的脾细胞悬液(作为抗原递呈细胞) 及 MBP(25 mg/L) 在 37 °C、5% CO_2 培养箱中共同培养。2 ~ 3 d 后, 用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离活化的 T 细胞, 再以增殖培养基培养扩增 5 ~ 7 d。在 T 细胞生长培养基中, 当 T 细胞开始变小, 并不再增殖时, 则用 MBP 再次刺激 T 细胞活化、培养扩增。如此反复, 经过 3 个活化、扩增循环后, 便可得到足够数量的 MBP-T 细胞。

1.4 淋巴细胞增殖分析 将 MBP-T 细胞用不含 rhIL-2 的增殖培养基调整为 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 浓度, 按实验设计分组, 每组设 3 个复孔, 分别取 100 μl 加入到 96 孔培养板中, 细胞密度为 2×10^5 个细胞/孔, 同时在每孔中均加入 2×10^6 个丝裂霉素 C 处理的脾细胞作为抗原递呈细胞。然后在每孔中加入 25 $\mu\text{g/ml}$ MBP(MBP 刺激组) 或 25 $\mu\text{g/ml}$ BSA(BSA 对照组), 以及只加培养基(阴性对照组)。最后, 各组添加不含 rhIL-2 增殖培养基至终体积为 200 μl , 置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中孵育 48 h, 加入 3.7×10^{-5} GBq/well 的 ^3H -TdR, 再进一步培养 18 h, 用多头收集仪将细胞收集到玻璃纤维膜上, 并用 β 液体闪烁计数仪测定细胞掺入的放射性强度。

1.5 流式细胞术 细胞表面标志染色: 将待测细胞用冰冷 PBS 洗涤后, 用染色缓冲液(含 5% FBS、0.1% NaN_3 的 PBS) 配制成 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液。在离心管中预先加入荧光素标记抗体: CD3-FITC(1 $\mu\text{g}/10^6$ 细胞)、CD4-PE(0.25 $\mu\text{g}/10^6$ 细胞) 和 CD8-APC(0.2 $\mu\text{g}/10^6$ 细胞); 同时设立不加抗体的空白对照管。每管加细胞悬液 50 μl 置室温 20 min, 然后用 PBS 离心洗涤 2 次, 最后加含 1% PFA 的 PBS 0.4 ml 固定。胞内细胞因子染色: 将 1×10^6 MBP-T 细胞培养于不含 rhIL-2 的增殖培养基中, 分别添加 25 $\mu\text{g/ml}$ MBP(MBP 刺激组)、25 $\mu\text{g/ml}$ BSA(BSA

对照组),同时设立只加培养基的阴性对照组。于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h,加入 monesin 至终浓度 2 μmol/L,用于阻滞细胞因子蛋白分泌,继续培养 4 h 后收集细胞用于检测。用 PBS 洗涤细胞后,加 2% PFA 400 μl,4 ℃ 避光 30 min 以上以固定细胞。然后,用染色缓冲液(1 ml/管)4 ℃ 1 000 r/min 离心 5 min 洗细胞 1 次,加 400 μl 透膜缓冲液(含 0.1% Saponin-5% FBS 的 PBS)4 ℃ 避光透膜 15 min,离心弃上清液,同时加入细胞因子抗体: IFN-γ-FITC(1 μg/10⁶ 细胞)、IL-10-PE(1 μg/10⁶ 细胞)和 IL-4-eFluor® 660(1 μg/10⁶ 细胞),4 ℃ 避免孵育 30 min。每管加透膜缓冲液 1 ml,4 ℃、1 000 r/min 离心 5 min,洗 2 次,加 1% PFA 400 μl 固定。用 FACS Calibur 流式细胞仪 Cellquest 软件检测待检样品,所得数据文件用 Cellquest 或 WinMDI 2.9 软件分析。

1.6 统计学处理 两组数据之间的比较采用 *t* 检验,3 组数据之间的比较采用方差分析和 *q* 检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 Excel 进行统计分析。

2 结果

2.1 MBP-T 细胞的表型特征 MBP 免疫 9 d 后,在新鲜分离的淋巴结细胞(lymph node cells,LNC)中,CD3⁺ 细胞占细胞总数的百分比为(59.98 ± 7.16)%,在 CD3⁺ 细胞中 CD3⁺ CD4⁺ 的细胞为(74.78 ± 8.77)%,CD3⁺ CD8⁺ 的细胞为(20.21 ± 2.78)%。经过体外 3 个循环的刺激、扩增后,MBP 活化扩增的细胞主要为 CD3⁺ 的 T 淋巴细胞(98.62 ± 0.71)%,在 CD3⁺ 细胞中 CD3⁺ CD4⁺ 的细胞占绝大多数,为(97.29 ± 1.44)%,而 CD3⁺ CD8⁺ 的细胞

则非常少,其比例仅为(1.70 ± 1.23)%。MBP 活化扩增的细胞与新鲜分离的 LNC 比较,其 CD3⁺ 细胞占细胞总数的比例和 CD3⁺ 细胞中 CD4⁺ 细胞的比例均明显升高,而其 CD8⁺ 细胞的比例则明显降低,各指标比较差异有统计学意义($P < 0.01$, $t = 12.01$ 、5.66、13.62)。见图 1。

2.2 MBP 抗原特异性淋巴细胞增殖分析 在阴性对照组和 BSA 对照组,所有的细胞均没有明显的增殖反应,其³H-TdR 掺入量分别为(655.40 ± 171.86) cpm 和(677.20 ± 220.97) cpm,两者之间差异无统计学意义。当存在 25 μg/ml MBP 的情况下,MBP-T 细胞的³H-TdR 掺入量明显增高,达(14 094.80 ± 3 300.75) cpm,与阴性对照组和 BSA 对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$, $F = 82.16$)。

2.3 MBP-T 细胞分泌细胞因子的特征 流式细胞术胞内细胞因子检测表明:在阴性对照组和 BSA 对照组,MBP-T 细胞中均几乎检测不到 IFN-γ、IL-10 和 IL-4 的表达。在阴性对照组中,三者表达的阳性细胞仅分别为(1.13 ± 0.63)%、(0.76 ± 0.24)%和(0.59 ± 0.16)%;在 BSA 对照组中,三者表达的阳性细胞也仅分别为(1.30 ± 0.55)%、(0.95 ± 0.47)%和(0.64 ± 0.19)%。3 种因子的表达率在两组之间差异均无统计学意义。用 MBP 刺激后,IFN-γ 和 IL-10 表达的阳性细胞则明显增加,分别为(28.08 ± 6.85)%和(14.67 ± 5.52)%,与阴性对照组和 BSA 对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。但是,仍几乎检测不到 IL-4 的表达,其比例仅为(0.69 ± 0.36)%,与阴性对照组和 BSA 对照组比较差异无统计学意义($F = 75.86$ 、31.02、0.159)。见图 2。

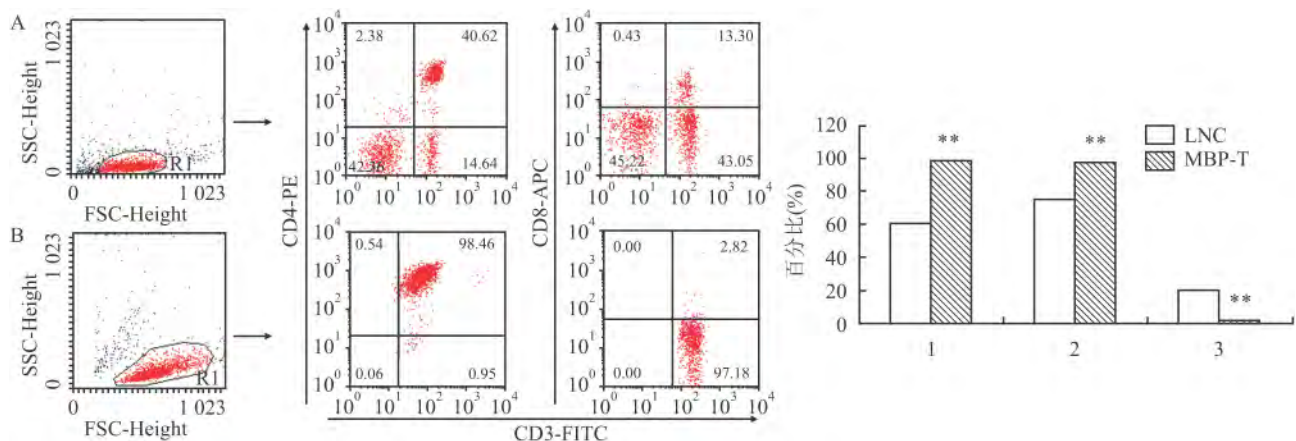


图1 流式细胞术分析 LNC 和 MBP-T 细胞的表型特征

A: LNC; B: MBP-T; 1: CD3⁺ 细胞占细胞总数的百分比; 2: 在 CD3⁺ 细胞中 CD3⁺ CD4⁺ 细胞的百分比; 3: 在 CD3⁺ 细胞中 CD3⁺ CD8⁺ 细胞的百分比; 与 LNC 比较: ** $P < 0.01$

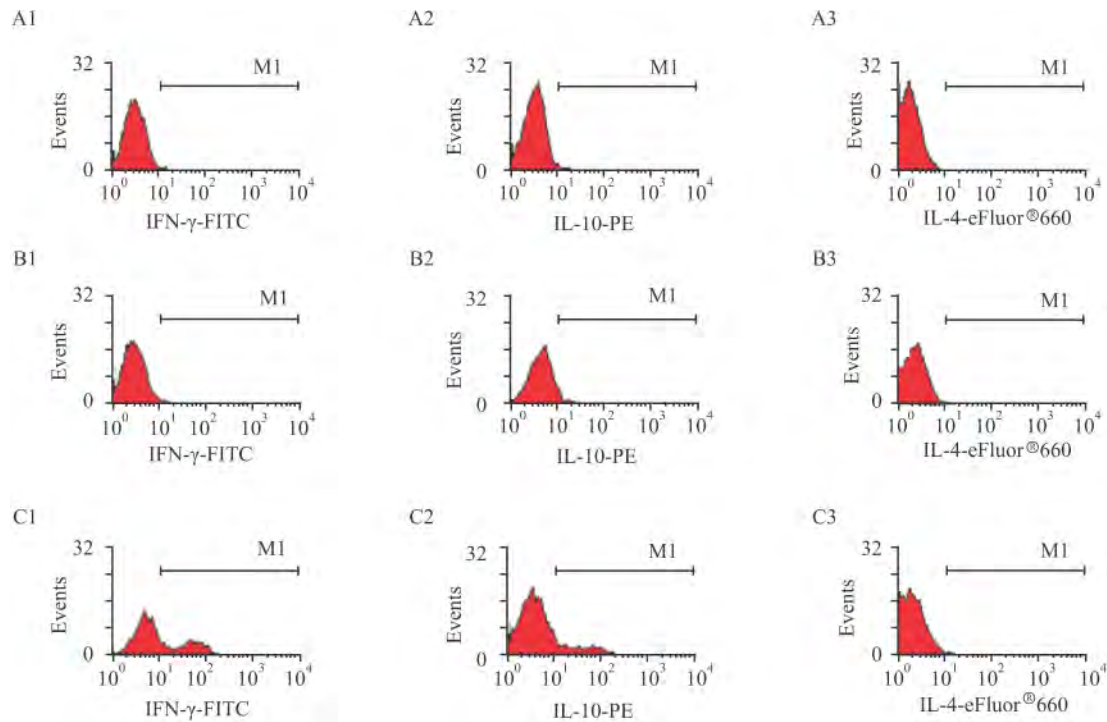


图2 流式细胞术分析细胞分泌细胞因子的特征

A: 阴性对照组; B: BSA 对照组; C: MBP 刺激组; 1: IFN- γ ; 2: IL-10; 3: IL-4

3 讨论

CNS 损伤后,由于损伤部位组织细胞的坏死和凋亡,CNS 抗原能够释放出来,激活免疫系统产生一系列免疫反应,包括损伤局部小胶质细胞的活化,外周单核巨噬细胞、淋巴细胞等的浸润。随后,CNS 抗原可以被活化的小胶质细胞或单核巨噬细胞加工递呈给相应的 T 淋巴细胞,使之活化,从而产生针对自身 CNS 抗原反应的 T 细胞群体^[7]。虽然目前对自身反应性 T 细胞对在 CNS 损害后的作用仍存在争议,但是其参与 CNS 损伤与修复的过程是毋庸置疑的^[8]。在这些 CNS 自身反应性 T 细胞中,MBP 活化的 T 细胞倍受研究者关注,因此对于该细胞在 CNS 损伤修复中的争议也很多^[9-11]。

在实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)的研究^[12]中,通过 MBP 免疫 EAE 敏感的动物(如 Lewis 大鼠)是建立 EAE 模型的经典方法。采用 MBP 主动免疫这些动物品系能够诱导典型的 EAE 表现,也可以通过体外扩增的方法获得 MBP 特异的 T 细胞。但是,这些细胞在随后的过继免疫治疗研究^[13]中常常会出现中枢神经损害性的结果。为了尽量减少过继免疫诱发的 EAE 症状对评价自身免疫保护效应的干扰,

本研究在前期的实验中采用 SD 大鼠^[8]。与 EAE-敏感的 Lewis rat 大鼠不同,SD 大鼠是 EAE-抵抗种系,结果表明 MBP-T 细胞过继免疫同种系的 SD 大鼠可以激发中枢神经保护作用^[8]。本研究采用流式细胞术鉴定这类细胞的表型和细胞因子分泌特征,以期为目前存在的争议提供可能的解释。

研究显示,在新鲜分离的 LNC 中,CD3⁺ 细胞占细胞总数约 60%,其中 CD3⁺ CD4⁺ 的细胞约为 75%,而 CD3⁺ CD8⁺ 的细胞约为 20%。经过体外 3 个循环的刺激、扩增后,MBP 活化扩增的细胞主要为 CD3⁺ 的 T 淋巴细胞,且 CD3⁺ CD4⁺ 的细胞占绝大多数(98%),与文献^[9,13]报道一致。³H-TdR 掺入实验表明这种细胞是 MBP 特异性的。根据分泌细胞因子种类的不同,分化的 CD4⁺ Th 细胞可分为 Th1、Th2、Th3 和 Tr1 等细胞亚群。Th1 细胞主要分泌 IL-2 和 IFN- γ ,主要介导细胞免疫应答;Th2 主要分泌 IL-4 和 IL-5,主要介导体液免疫;Tr1/Th3 主要分泌 IL-10/TGF- β ,对免疫系统的功能具有抑制性调节作用^[14-15]。本研究显示 MBP-T 细胞表达 IFN- γ 和 IL-10,却没有检测到 IL-4,这说明在 MBP-T 细胞中除了 Th1 细胞存在外,还有一定比例的具有免疫抑制调节作用的 Tr1 细胞亚型,这类细胞在 CNS 免疫反应过程中可能具有特有的调节功能(如调节

损伤局部巨噬细胞或小胶质细胞的活化), 从而影响 CNS 损伤的最终结局。

综上所述, 用 MBP 免疫 SD 大鼠, 经过体外扩增可以获得 MBP 特异性的 T 细胞, 其表型主要为 CD3⁺ CD4⁺, 并可以按照细胞因子的产生区分为 Th1 和 Tr1 亚型。

参考文献

- [1] Wucherpfennig K W. Autoimmunity in the central nervous system: mechanisms of antigen presentation and recognition [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994, 72(3): 293–306.
- [2] Heeger P S, Forsthuber T, Shive C, et al. Revisiting tolerance induced by autoantigen in incomplete Freund's adjuvant [J]. *J Immunol*, 2000, 164(11): 5771–81.
- [3] Jones T B, McDaniel E E, Popovich P G. Inflammatory-mediated injury and repair in the traumatically injured spinal cord [J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(10): 1223–36.
- [4] Donnelly D J, Popovich P G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury [J]. *Exp Neurol*, 2008, 209(2): 378–88.
- [5] Schwartz M, Raposo C. Protective autoimmunity: A unifying model for the immune network involved in CNS repair [J]. *Neuroscientist*, 2014, 20(4): 343–58.
- [6] Yoles E, Hauben E, Palgi O, et al. Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(11): 3740–8.
- [7] Goldmann T, Prinz M. Role of microglia in CNS autoimmunity [J]. *Clin Dev Immunol*, 2013, 2013: 2080–93.
- [8] Clausen F, Lörant T, Lewén A, et al. T lymphocyte trafficking: a novel target for neuroprotection in traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2007, 24(8): 1295–307.
- [9] Lü H Z, Xu L, Zou J, et al. Effects of autoimmunity on recovery of function in adult rats following spinal cord injury [J]. *Brain Behav Immun*, 2008, 22(8): 1217–30.
- [10] Jones T B, Ankeny D P, Guan Z, et al. Passive or active immunization with myelin basic protein impairs neurological function and exacerbates neuropathology after spinal cord injury in rats [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(15): 3752–61.
- [11] Wang H J, Hu J G, Shen L, et al. Passive immunization with myelin basic protein activated T cells suppresses axonal dieback but does not promote axonal regeneration following spinal cord hemisection in adult rats [J]. *Int J Neurosci*, 2012, 122(8): 458–65.
- [12] Zheng M M, Zhang X H. Cross-reactivity between human cytomegalovirus peptide 981-1003 and myelin oligodendroglia glycoprotein peptide 35-55 in experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(3): 1118–23.
- [13] Kipnis J, Mizrahi T, Yoles E, et al. Myelin specific Th1 cells are necessary for post-traumatic protective autoimmunity [J]. *J Neuroimmunol*, 2002, 130(1–2): 78–85.
- [14] Kikodze N, Pantsulaia I, Rekhviashvili Kh, et al. Cytokines and regulatory cells in the pathogenesis of type 1 diabetes [J]. *Georgian Med News*, 2013(222): 29–35.
- [15] Hendrix S, Nitsch R. The role of T helper cells in neuroprotection and regeneration [J]. *J Neuroimmunol*, 2007, 184(1–2): 100–12.

Culture and identification of myelin basic protein activated T cells in SD rats

Zhao Hao^{1,2}, Yu Liang², Zhang Jingxing³, et al

(¹Dept of Medical Laboratory, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Central Laboratory, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004;

³Anhui Provincial Key Laboratory of Tissue Transplantation, Bengbu 233030)

Abstract Objective To culture the myelin basic protein (MBP) specific T lymphocytes in SD rats, and identify their characterization of phenotype and cytokine profiles. **Methods** The SD rats were immunized with MBP; the draining lymph nodes were collected and made into single cell suspension. The cells were cultured in RPMI 1640 medium and stimulated repeatedly with MBP to produce MBP specific T (MBP-T) cells. Then, their reactivity to MBP stimulation was measured using ³H-thymidine (³H-TdR) incorporation, the phenotype and cytokine profiles were determined using flow cytometry. **Results** When the MBP antigen exists, ³H-TdR incorporation of MBP-T cells increased obviously. Flow cytometry showed that MBP-T cells were mainly CD3⁺ CD4⁺ T lymphocytes (98%), and could produce interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-10 (IL-10). **Conclusion** The cells collected from the draining lymph nodes of MBP immunized SD rats could be amplified into MBP-T cells *in vitro*. The phenotypes of these cells are mainly CD3⁺ CD4⁺, and show the Th1 and Tr1 cytokine profiles.

Key words myelin basic protein; lymphocytes; immunity; flow cytometry