

大鼠CD4⁺CD25⁻T细胞的Foxp3基因转染及其表达***◆

黄洋¹, 李永翔¹, 沈继龙², 罗庆礼², 陆威², 霍星星²

Transfection of rat CD4⁺CD25⁻T cells with lentiviral vector containing Foxp3 gene and its expression

Huang Yang¹, Li Yong-xiang¹, Shen Ji-long², Luo Qing-li², Lu Wei², Huo Xing-xing²

Abstract

BACKGROUND: Regulatory T cells play an important role in maintaining immune response homeostasis and immune tolerance, but the CD4⁺CD25⁻T cells are less in peripheral blood and with low proliferation ability *in vitro*.

OBJECTIVE: To observe the expression of transfected rat Foxp3 gene in rat CD4⁺CD25⁻T cells using lentiviral vector carrier EGFP⁺.

METHODS: Rat CD4⁺CD25⁻T cells were sorted by magnetic activated cell sorting, and transfected by lentiviral vector containing rat Foxp3 gene *in vitro*. The whole observation was divided into three groups. Transfected rat CD4⁺CD25⁻T cells as the experimental group, the blank plasmid EGFP⁺ and rat CD4⁺CD25⁻T cells as the negative control group, rat CD4⁺CD25⁻T cells as the positive control group. The expression of Foxp3 gene was assayed by fluorescence microscope and RT-PCR from the level of protein and mRNA respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: The high purity CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺T cells were obtained and the survival rate of cells was (94±2)%. Significantly high expression of rat Foxp3 gene was detected in lentiviral vector transfected CD4⁺CD25⁻T cells. The lentiviral vector system carrying rat Foxp3 gene can efficiently mediate the highly expression of rat Foxp3 gene in the rat CD4⁺CD25⁻T cells.

Huang Y, Li YX, Shen JL, Luo QL, Lu W, Huo XX. Transfection of rat CD4⁺CD25⁻T cells with lentiviral vector containing Foxp3 gene and its expression. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(18): 3337-3340. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 调节性T细胞在维持机体免疫应答稳态和免疫耐受方面具有非常重要的作用,但外周血中CD4⁺CD25⁺调节性T细胞含量极低,且增殖能力较差。

目的: 以携带Foxp3基因的慢病毒EGFP⁺载体转染大鼠CD4⁺CD25⁻T细胞,观察其在大鼠CD4⁺CD25⁻T细胞中的表达。

方法: 以免疫磁珠两步法分选大鼠CD4⁺CD25⁻T细胞,用携带大鼠Foxp3基因的慢病毒载体体外转染分选的细胞,以转染Foxp3基因的CD4⁺CD25⁻T细胞为实验组,EGFP⁺空白质粒组及CD4⁺CD25⁻T细胞为阴性对照组,CD4⁺CD25⁺T细胞为阳性对照组。荧光显微镜和RT-PCR分别从蛋白和mRNA水平检测Foxp3基因的表达。

结果与结论: 成功完成了免疫磁珠的分选,获得了纯度较高的CD4⁺CD25⁻T细胞和CD4⁺CD25⁺T细胞,细胞存活率为(94±2)%,慢病毒转染的CD4⁺CD25⁻T细胞高表达Foxp3基因。表明以携带Foxp3基因的慢病毒载体系统可有效介导Foxp3基因在大鼠CD4⁺CD25⁻T细胞中高表达。

关键词: 调节性T细胞; CD4⁺CD25⁻T细胞; 慢病毒; Foxp3; 磁珠分选

缩略语注释: Treg: regulatory T cell, 调节性T细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.18.024

黄洋, 李永翔, 沈继龙, 罗庆礼, 陆威, 霍星星. 大鼠CD4⁺CD25⁻T细胞的FOXP3基因转染及其表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(18): 3337-3340. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

随着器官移植技术的大量开展,移植后的排斥反应也越来越引起大家的关注,如何减少排斥反应诱发机体的免疫耐受一直是移植免疫学关注的热点和难题。CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)是目前研究最为广泛的具有免疫抑制作用的细胞亚群。自1995年日本学者Sakaguchi等^[1]首次报道以来,大量研究发现其具有免疫耐受和免疫抑制两大特征,通过主动方式抑制免疫系统对自身和外来抗原的应答,在维持机体免疫应答稳态和免疫耐受方面具有非常重要的作用。Foxp3是forkhead/

winged-helix转录因子家族的一个新成员,是调控CD4⁺CD25⁺Treg细胞的一种关键性转录因子,是CD4⁺CD25⁺Treg细胞的特异性标志^[2],在Treg细胞发育和功能维持中起着关键性的作用^[3]。有研究表明,Treg细胞的诱导和作用发挥需要Foxp3基因的持续和高水平表达^[4-5]。CD4⁺CD25⁺Treg体外增殖能力极低,且仅占外周血中CD4⁺T细胞的5%~10%,明显限制了其临床应用。慢病毒载体是一种以人免疫缺陷病毒I型病毒HIV-1为基础发展起来的基因治疗载体,本实验用携带Foxp3基因的慢病毒载体系统,体外转染大鼠CD4⁺CD25⁻T细胞,观察Foxp3基因蛋白和mRNA的表达,探索体外扩增具有调节功能的CD4⁺CD25⁻T细胞有效方法。

¹First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China; ²Key Laboratory of Microbiology and Parasitology (Anhui Medical University), the Key Laboratory of Zoonoses (Anhui Medical University), Hefei 230032, Anhui Province, China

Huang Yang★, Studying for master's degree, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China
yanghuang6699@yahoo.com.cn

Corresponding author: Li Yong-xiang, Doctor, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China
yongxiangli@yahoo.com.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No.30871207*; Key Scientific Research Projects of Anhui Science and Technology Agency, No.7020304101*; Key Scientific Research Projects of Anhui Education Department, No.KJ2008A154*

Received: 2011-12-31
Accepted: 2012-01-25

¹ 安徽医科大学第一附属医院, 安徽省合肥市 230032; ² 安徽病原生物学省级实验室(安徽医科大学), 人兽共患病安徽省重点实验室(安徽医科大学), 安徽省合肥市 230032

黄洋★, 男, 安徽省阜阳市人, 汉族, 安徽医科大学第一附属医院在读硕士, 主要从事 Foxp3 基因介导的胰岛干细胞移植研究。
yanghuang6699@yaho.com.cn

通讯作者: 李永翔, 教授, 主任医师, 博士, 博士生导师, 安徽医科大学第一附属医院, 安徽省合肥市 230032

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)18-03337-04

收稿日期: 2011-12-31
修回日期: 2012-01-25
(20111102011/GW C)

1 材料和方法

设计: 体外细胞观察实验。

时间及地点: 于2010-03/12在安徽病原生物学省级实验室(安徽医科大学), 人兽共患病安徽省重点实验室(安徽医科大学), 安徽医科大学科教大楼完成。

材料:

实验动物: 6~8周龄清洁级SD大鼠, 雌雄不拘, 体质量160~180 g, 购自安徽省动物研究中心, 饲养于安徽医科大学科教大楼动物房。

主要试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
免疫磁珠分选器(MidiMACS), 大鼠 CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg 细胞的磁珠分选试剂盒, LS 和 MS 柱	德国美天尼 (Miltenyi Biotec) 公司
FITC-anti rat CD4、PE-anti rat CD25	美国 eBioscience 公司
FACS Calibur 流式细胞仪	美国 BD 公司产品
大鼠淋巴细胞分离液、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、RPMI1640 培养基	索来宝公司
引物	Invitrogen 公司合成
Foxp3 基因的慢病毒 EGFP+载体	复旦大学惠赠 ^[6-7]

实验方法:

大鼠脾脏淋巴细胞悬液的制备: 乙醚麻醉大鼠, 无菌条件下分离大鼠脾脏, 加入预先加入适量PBS的培养皿中, 轻轻剥离脾脏表面筋膜, 置于200目无菌研磨钢网上, 反复研磨, 过滤2次, 1 000 r/min×10 min离心, 弃上清, 缓冲液重悬, 将缓冲液小心加入大鼠淋巴细胞分离液面上, 保证悬液在分离液的上层勿使其相混, 2 000 r/min×30 min离心, 小心吸取中间白膜层, PBS洗2次, 计数, 调整细胞浓度为 $2.5 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 。

阳性分选获得CD4⁺T细胞: 按试剂盒说明操作, 简述如下: 取上述细胞悬液按商家推荐的指标加入15 μL FITC-anti-CD4, 充分混匀4 °C避光孵育10 min, 300 g×10 min离心, 洗涤一二次, 加入15 μL anti-FITC Multisort microbeads, 充分混匀4 °C避光孵育15 min, 300 g×10 min离心, 弃上清, 加入缓冲液重悬, 置MS分离柱于MidiMACS分选器中, 0.5 mL缓冲液冲洗分离柱2次后, 将细胞悬液加入分离柱中, 收集留下细胞, 待细胞悬液流尽, 加0.5 mL缓冲液冲洗柱子3次, 加1 mL缓冲液于柱中后将

柱子移出磁场, 用活塞快速推出柱中细胞即为分选的CD4⁺T细胞。

阴性分选获得CD4⁺CD25⁺T细胞、阳性分选获得CD4⁺CD25⁺T细胞: 取分离的CD4⁺T细胞悬液加入10 μL PE-anti-CD25, 4 °C避光孵育10 min, 300 g×10 min离心, 弃上清, 重复洗1次, 加入20 μL anti-PE Microbeads充分混匀, 4 °C避光孵育15 min, 300 g×10 min离心, 弃上清重悬, 置MS柱于MidiMACS分选器中, 0.5 mL缓冲液冲洗分离柱2次后, 将细胞悬液加入到分离柱中收集留下的细胞即为CD4⁺CD25⁺Treg细胞, 将分离柱移出磁场将滞留在分离柱中的双阳性细胞CD4⁺CD25⁺缓慢冲出, 流式细胞仪检测分选到的细胞纯度, 以锥虫蓝染色, 以不被染色细胞数占总细胞数的比例计算细胞存活率(活细胞不被染色, 死细胞被染成蓝色)。

慢病毒感染CD4⁺CD25⁺T细胞: 将收集到的大鼠CD4⁺CD25⁺T细胞在含体积分数10%FBS的RPMI1640培养基中(含PHA 8 mg/L、白细胞介素2 100 U/mL), 37 °C、体积分数5%CO₂培养24 h后, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 将病毒加入到CD4⁺CD25⁺T细胞新鲜培养体系中, MOI=50:1。同时加入终浓度为8 mg/L的多聚季胺、Polybrene, 24 h后弃去培养液上清加入新鲜培养基, 继续培养7 d后收集转染的细胞即为Foxp3⁺细胞, 以EGFP空白质粒转染的细胞为空白对照组, 未转染的CD4⁺CD25⁺T细胞为阴性对照组; 分选的CD4⁺CD25⁺T细胞为阳性对照组。用流式细胞仪检测细胞转染率。

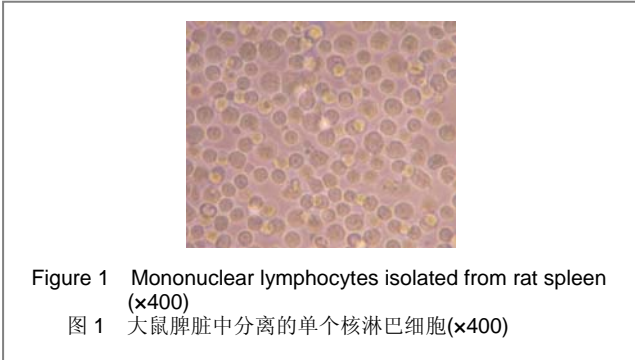
细胞Foxp3蛋白表达的检测: 取培养5 d后的细胞放在暗室荧光显微镜下观察, 可观察到转染后的细胞中存在明显的绿色荧光, 而未转染的细胞未见荧光。拍照并分析。

RT-PCR法检测细胞Foxp3 mRNA的表达: 收集细胞, Trizol方法提取总RNA, 反转录mRNA为cDNA, 均参照试剂盒说明书进行, Foxp3: 上游5'-CCC AAA CCC TAA AAC ACG AA-3', 下游5'-CTG GGG TTA GTG GCA AGT GA-3', 扩增片段为406 bp; GAPDH: 上游5'-ACT CCA GAA GAA AGA CCC AA-3', 下游5'-CAG AGA GGA GAT GTG GTT CG-3', 扩增片段为300 bp, PCR反应条件为94 °C 5 min, 94 °C 40 s, 61 °C 40 s, 72 °C 40 s, 共35个循环。PCR产物检测: 采用2%琼脂糖凝胶, 8 μL DL2000 Maker, 按1 μL Loading buffer+5 μL PCR产物进行电泳, 电压90 V, 电泳40 min, 于紫外投射仪下观察并拍照。

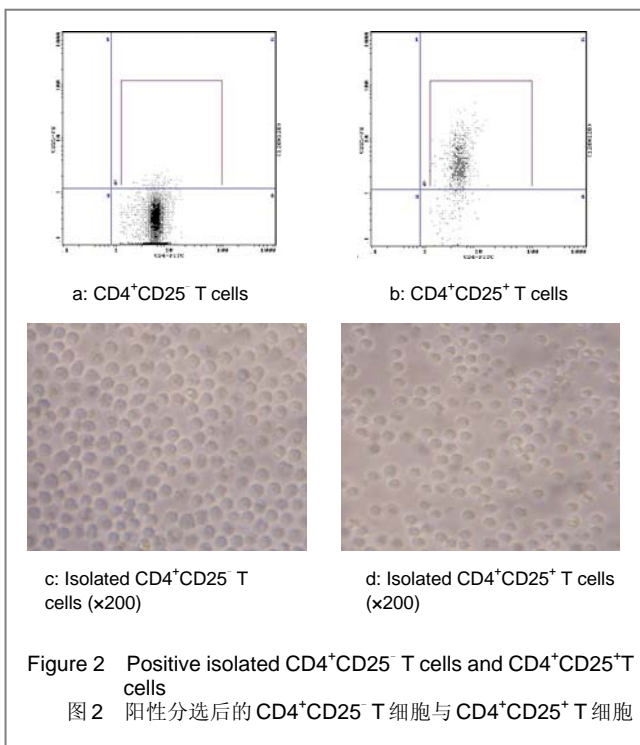
主要观察指标：慢病毒感染 CD4⁺CD25⁻ T 细胞 Foxp3 基因的表达。

2 结果

2.1 大鼠单个核淋巴细胞的分离及计数 将分离的单个核淋巴细胞置于显微镜下观察并拍照，见图1，另取细胞悬液加入冰醋酸后小心的置于细胞计数板上，5 min后计数。细胞浓度为 $2.5 \times 10^{10} L^{-1}$ 。

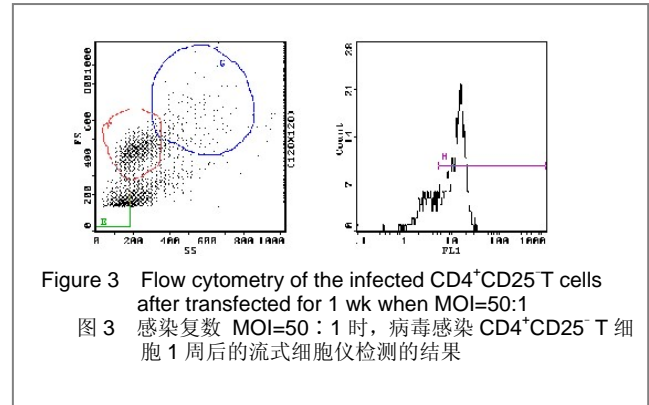


2.2 磁珠分选的 CD4⁺CD25⁻ T 细胞和 CD4⁺CD25⁺ T 细胞纯度及存活率 SD大鼠脾脏单个核细胞经MACS分选的 CD4⁺CD25⁻ T 细胞纯度为(97±1)%，阳性分选的 CD4⁺CD25⁺ T 细胞的纯度为(90±1)%。锥虫蓝染色结果显示细胞存活率为(94±2)%。图2a, b分别为MACS分选后 CD4⁺CD25⁻、CD4⁺CD25⁺ T 细胞的流式细胞仪鉴定结果，分选后的细胞用含体积分数20%FBS的1640培养，细胞增殖良好，见图2c, d。

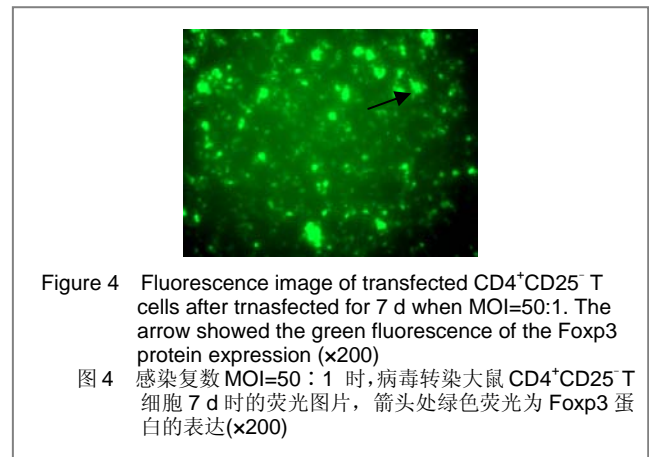


2.3 病毒转染率的测定 取感染后1周的细胞用流式

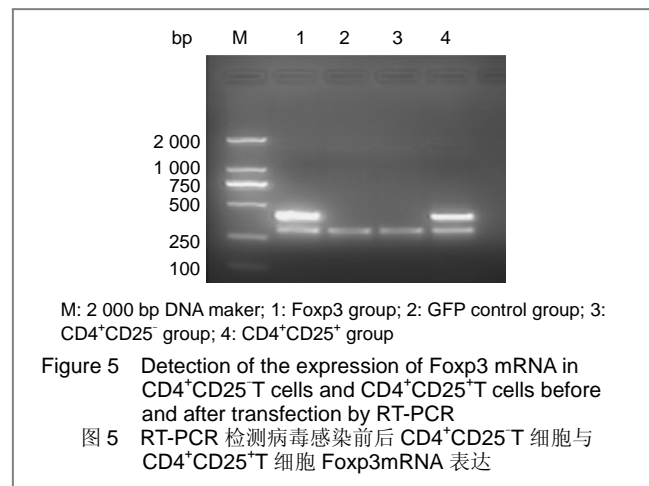
细胞仪检测病毒转染率，流式结果显示转染率达到了较高的75%，见图3。



2.4 CD4⁺CD25⁻ T 细胞 Foxp3 蛋白表达的检测 荧光显微镜下观察慢病毒感染后 7 d 的 CD4⁺CD25⁻ T 细胞，结果如下图所示，绿色荧光显示有 Foxp3 蛋白的表达，见图4。



2.5 CD4⁺CD25⁻ T 细胞 Foxp3 mRNA 表达的检测 RT-PCR结果显示 病毒感染后的 CD4⁺CD25⁻ T 细胞组和 CD4⁺CD25⁺ T 细胞均高表达 Foxp3 mRNA，而阴性对照组及分选的 CD4⁺CD25⁻ T 细胞均未见其表达，见图5，Foxp3 mRNA(406 bp)，内参GAPDH(300 bp)。



3 讨论

目前, 器官移植技术是现今挽救终末期器官功能衰竭患者生命的惟一有效途径, 然而移植后的免疫排斥反应及移植物抗宿主病仍然是影响移植患者预后及生存的主要因素, 虽然免疫抑制剂的使用使得移植患者的预后有了较大改善, 但却明显增加了感染和复发概率。因此如何诱导免疫耐受减少排斥反应, 控制移植物抗宿主病的发生已经成为学者关注的热点和难题。寻找能够抑制免疫排斥反应, 从而减少免疫抑制剂的应用是提高移植物存活时间并提高疗效的重要手段。近年来, Treg 细胞(CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞)是目前研究最为广泛的、功能最确切的抑制性 T 细胞的亚群之一, 在诱导负向免疫调控中的作用受到极大关注, 有望成为诱导器官移植受体免疫排斥的重要 T 细胞亚群。CD4⁺CD25⁺ Treg 不仅能够抑制急性排斥反应, 同时也具有抑制慢性排斥反应、延长移植物存活时间的作用, 并且具有明显减少减轻移植物抗宿主病发生的作用^[8-10]。但由于 Treg 细胞只占外周 CD4⁺T 淋巴细胞的 5%~10%, 且体外难以培养及增殖能力较差, 因而显著限制了其临床应用。

Foxp3 基因属于转录调节因子家族, 作为一种转录抑制因子在 Treg 细胞的发育过程中起着关键性的作用^[11-12]。有研究表明 Foxp3 基因敲除的动物模型, 尽管存在 CD4⁺CD25⁺T 细胞, 但却不具备 Treg 细胞的免疫无能性和免疫抑制的功能。因此 Treg 细胞功能的维持需要 Foxp3 基因的持续表达和高水平表达。Foxp3 基因缺失也会导致多种自身免疫性疾病最具代表性的为 IPEX 综合症。现已证实, 60% 的 IPEX 患者存在 Foxp3 编码区突变, 其中 10% 表现为 Foxp3 mRNA 的显著降低^[13]。肿瘤患者可通过阻断 Foxp3 的表达, 抑制 Treg 细胞的功能, 提高机体对肿瘤抗原的免疫应答。有研究结果表明 Foxp3 基因表达使 CD4⁺T 细胞获得了调节性表型, 具有了 Treg 细胞的表型和功能^[14]。因此, 本实验以慢病毒为载体, 重组大鼠的 Foxp3 基因, 将重组病毒转染大鼠 CD4⁺CD25⁺ T 细胞, 以期构建具有调节性功能的 CD4⁺CD25⁺ T 细胞, 为临床抗移植物排斥反应提供充足的细胞来源。

本实验通过磁珠分选技术获得了纯度较高的 CD4⁺CD25⁻ 和 CD4⁺CD25⁺ T 细胞, 分离效率较高, 适合体外研究应用。用化学合成的 Foxp3 基因成功构建了重组慢病毒载体, 经克隆鉴定及测序表明目的基因正确, 且病毒滴度较高, 转染 CD4⁺CD25⁺ T 细胞后, 75% 的细胞在 mRNA 水平和蛋白水平均显示 Foxp3 基因的高表达。本实验结果克服了 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞量少且体外难以培养扩增的缺点, 为体外生产大量的具有调节性细胞功能的 CD4⁺CD25⁺ T 细胞及其广泛应用奠定了基础。

致谢: 感谢安徽医科大学第一附属医院, 安徽病原生物学省级实验室(安徽医科大学)与人兽共患病安徽省重点实验室!

4 参考文献

- [1] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha chains(CD25). Breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmune disease J Immunol. 1995; 155(3):1151-1164.
- [2] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 Programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. Nat Immunol. 2003;4(4):330-336.
- [3] Khattri R, Cox T, Yasayko SA, et al. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. Nat Immunol. 2003;4(4):337-342.
- [4] Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3 dependent developmental Program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. Nat Immunol. 2007;8(3):277-284.
- [5] Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. Nature. 2007; 445(7129):766-770.
- [6] Xiao JW, Wang CS, Wei SJ, et al. Xiandai Yufang Yixue. 2010;37(9):1700. 肖江卫, 王崇树, 魏寿江, 等. 携带有 Foxp3 基因慢病毒载体的构建及其转染大鼠 T 细胞的实验研究[J]. 现代预防医学, 2010, 37(9):1700.
- [7] D'Costa J, Mansfield SG, Humeau LM. Lentiviral vectors in clinical trials: Current status. Curr Opin Mol Ther. 2009;11(5):554-564.
- [8] Trenado A, Sudres M, Tang Q, et al. Ex vivo-expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/ differentiation of pathogenic T cells. J Immunol. 2006;176(2):1266-1273.
- [9] Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, et al. Only the CD62L⁺ Subpopulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. Blood. 2005;105(5):2220-2226.
- [10] Cohen JL, Trenado A, Vasey D, et al. CD4⁺CD25⁺ Immunosuppressive T cells: New Therapeutics for Graft-Versus-Host Disease. J Exp Med. 2002;196(3):401-406.
- [11] Khattri R, Cox T, Yasayko SA, et al. An essential role for scurf in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. Nat Immunol. 2003;4(4): 337-342.
- [12] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science. 2003; 299(5609):1057-1061.
- [13] Ochs HD, Ziegler SF, Torgerson TR. Foxp3 acts as a rheostat of the immune response. Immunol Rev. 2003;203:156-164.
- [14] Fantini MC, Becker C, Monteleone G, et al. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. J Immunol. 2004; 172(9):5149-5153.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 国家自然科学基金面上项目(30871207); 安徽省科技厅重点科研项目(7020304101); 安徽省教育厅重点科研项目(KJ2008A154)。

作者贡献: 黄洋直接参与实验及实验的设计者, 李永翔、沈继龙、罗庆礼指导实验工作, 霍星星、陆威起助手作用。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验中对动物处置符合动物伦理学标准条例。

文章概要:

文章要点: 通过携带 Foxp3 基因的慢病毒载体转染 CD4⁺CD25⁺ T 细胞, 使其具有 CD4⁺CD25⁺ T 细胞的功能, 为体外获得大量基因工程调节性 T 细胞奠定了基础。

关键信息: 磁珠分选及慢病毒转染的成功与否。

研究的创新之处与不足: 尽管转染成功, 获得了部分调节性 T 细胞, 但是能否应用于器官移植方面仍有待于进一步研究。