

# 人天然型和诱导型CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>Treg细胞表型多样性的比较

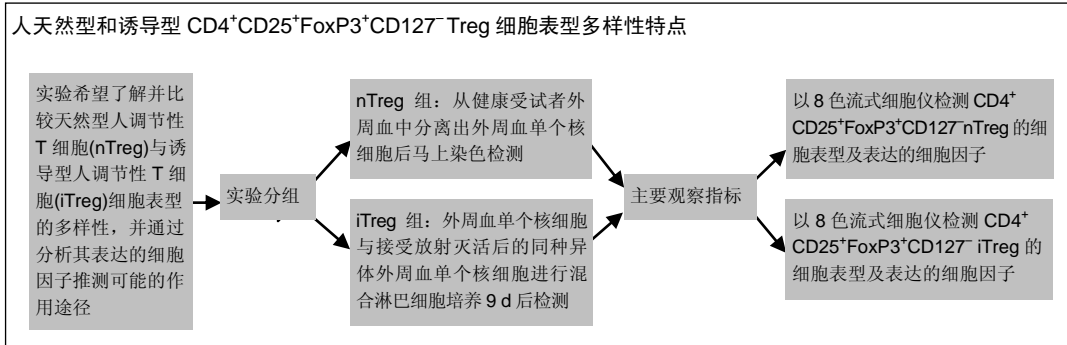
王海灏<sup>1</sup>, 朱莉<sup>2</sup>, 仰需雯<sup>3</sup>, 郭倩男<sup>1</sup>(华中科技大学同济医学院附属同济医院, <sup>1</sup>心脏大血管外科、同济医院心肺移植研究所; <sup>2</sup>血液内科, 湖北省武汉市 430030, <sup>3</sup>华中科技大学同济医学院, 湖北省武汉市 430030)

引用本文: 王海灏, 朱莉, 仰需雯, 郭倩男. 人天然型和诱导型 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>Treg 细胞表型多样性的比较[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(2):236-241.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2016.02.015

ORCID: 0000-0002-9717-6461(王海灏)

文章快速阅读:



王海灏, 男, 1979 年生, 上海市人, 汉族, 1999 年毕业于德国海德堡大学, 博士, 主治医师, 主要从事器官移植、移植免疫、调节性 T 细胞相关研究。

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)02-00236-06

稿件接受: 2015-11-15

http://www.crter.org

文题释义:

**调节性 T 细胞:** 调节性 T 细胞是一类控制体内自身免疫反应性的 T 细胞亚群, 分为天然产生的自然调节性 T 细胞和诱导产生的适应性调节性 T 细胞, 如 Th3、Tr1, CD8 Treg、NKT 细胞等, 与自身免疫性疾病的发生关系密切, 其异常表达可导致自身免疫性疾病。

**细胞表型:** 细胞表型是细胞的表现形式。遗传后染色体自有重组会产生新的“基因型”, 但不同的基因型不一定都有不同的表现, 而生物体外在表现出来的就是所谓“表型”。比如隐形是 a, 显性是 A, 基因型 Aa 和 AA 表现出来的样子可以是一样的(完全显性状况下), 即为他们的表型相同。

摘要

**背景:** 人调节性 T 细胞(Treg)分为天然型 Treg(nTreg)和诱导型 Treg(iTreg)。虽然 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>是目前最公认的 Treg 细胞表型, 但是 nTreg 与 iTreg 的细胞表型多样性, 尤其是其共表达细胞因子的情况仍不清楚。

**目的:** 了解并比较 nTreg 与 iTreg 的细胞表型多样性, 并通过分析其表达细胞因子的情况以推测可能的作用途径。

**方法:** 从 5 例健康受试者的外周血中分离得到外周血单个核细胞, 以 8 色流式细胞仪检测(FACSCanto II)并分析 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>nTreg 的细胞表型和其共表达细胞因子的情况; 将外周血单个核细胞在体外接受同种异体抗原刺激, 进行混合淋巴细胞培养, 9 d 后以 8 色流式细胞仪检测并分析 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>iTreg 的细胞表型和其共表达细胞因子的情况。

**结果与结论:** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>nTreg 占全部 CD4<sup>+</sup> T 细胞的比例为(1.5±0.70)%, 且几乎所有的 nTreg 细胞均表达 IFN-γ<sup>-</sup>、IL-2<sup>-</sup>或 TGF-β<sup>+</sup>, 部分表达 IL-10<sup>+</sup>和 IL-10<sup>-</sup>; 同种异体抗原刺激诱导产生表达 IFN-γ<sup>+</sup>、IL-2<sup>-</sup>、IL-2<sup>+</sup>、IL-10<sup>+</sup>或 TGF-β<sup>+</sup>的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>iTreg; 人 nTreg 的细胞表型主要是 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN-γ<sup>-</sup>IL-2<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>TGF-β<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN-γ<sup>-</sup>IL-2<sup>-</sup>IL-10<sup>-</sup>TGF-β<sup>+</sup>, 其占全部 CD4<sup>+</sup> T 细胞的比例分别为(1.1±0.59)%和(0.39±0.16)%; iTreg 的主要细胞表型为 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN-γ<sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>TGF-β<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN-γ<sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>TGF-β<sup>+</sup>。结果说明, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>nTreg 的特征是 IFN-γ<sup>-</sup>IL-2<sup>-</sup>, 同时产生白细胞介素 10 和转化生长因子 β, 或者只产生转化生长因子 β 而不产生白细胞介素 10, 且 nTreg 在体外通过混合淋巴细胞培养是不会被增殖的。混合淋巴细胞培养刺激后, IFN-γ<sup>+</sup>iTreg 增殖明显, 其中约 1/3 的 IFN-γ<sup>+</sup>iTreg 表达 IL-2<sup>+</sup>, 而 2/3 的 IFN-γ<sup>+</sup>iTreg 表达 IL-2<sup>-</sup>, 且这两组 IFN-γ<sup>+</sup>iTreg 均同时分泌白细胞介素 10 和转化生长因子 TGF-β。产生细胞因子转化生长因子 β 和白细胞介素 10 可能是 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>Treg 具有免疫抑制功能的原因。

**关键词:**

组织构建; 组织工程; 调节性 T 细胞; 细胞表型; 多样性; 细胞因子; 多色流式细胞仪

Wang Hai-hao<sup>1</sup>, Zhu Li<sup>2</sup>, Yang Pei-wen<sup>3</sup>, Guo Qian-nan<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Cardiopulmonary Transplantation Institute of Tongji Hospital, Department of Cardiovascular Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China; <sup>2</sup>Department of Hematology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China; <sup>3</sup>Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China)

Wang Hai-hao, M.D.,  
Attending physician,  
Cardiopulmonary  
Transplantation Institute of  
Tongji Hospital, Department  
of Cardiovascular Surgery,  
Tongji Hospital, Tongji  
Medical College, Huazhong  
University of Science and  
Technology, Wuhan 430030,  
Hubei Province, China

#### Subject headings:

T-Lymphocytes: Phenotype;  
Cytokines

#### Funding:

the Scientific  
Research Foundation for the  
Returned Overseas Chinese  
Scholars, State Education  
Ministry of China, No.  
(2014)1685; the Independent  
Innovation Research Fund of  
Huazhong University of  
Science and Technology, No.  
2013QN203

#### 关键词:

T 淋巴细胞; 表型; 细胞因子类

#### 基金资助:

教育部留学回国人员科研启动基金课题(教外司留(2014)1685 号); 华中科技大学自主创新研究基金课题(2013QN203)

## Phenotypic diversity of human nature and induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 regulatory T cells

### Abstract

**BACKGROUND:** Regulatory T cells (Treg) are classified into two subsets, nature Treg (nTreg) and induced Treg (iTreg). Although there is consensus that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 is the widely accepted phenotype of Treg, it remains unclear what is the difference in phenotypes including cytokine patterns of nTreg and iTreg.

**OBJECTIVE:** To understand and compare the plasticity of nTreg and iTreg and to search the exact mechanism of cytokine secretion in Tregs.

**METHODS:** We investigated the frequency and cytokine pattern of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 nTreg in freshly separated peripheral blood mononuclear cells of five healthy individuals using 8-color fluorescence flow cytometry (FACSCanto II). Subsequently, after 9 days of allostimulation in mixed lymphocytes, the frequency and cytokine pattern of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 iTreg were determined and analyzed.

**RESULTS AND CONCLUSION:** In fresh cells, (1.5±0.70)% of CD4<sup>+</sup> T cells were CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 nTregs. Almost all these cells expressed interferon (IFN)-γ, interleukin (IL)-2 or transforming growth factor-β, and partial cells expressed IL-10<sup>+</sup> or IL-10<sup>-</sup>. After 9-day allostimulation, the number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 iTreg expressing IFN-γ, IL-2, IL-2<sup>-</sup>, IL-10<sup>+</sup> or TGF-β<sup>+</sup> increased strongly. The main subsets of human nTregs were CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 IFN-γ IL-2 IL-10<sup>-</sup>TGF-β<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 IFN-γ IL-2 IL-10<sup>-</sup> TGF-β<sup>+</sup> T cells. The proportion of each subset in CD4<sup>+</sup> T cells was (1.1±0.59)% and (0.39±0.16)%, respectively. Whereas the main subsets of human iTregs were CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 IFN-γ<sup>+</sup>IL-2 IL-10<sup>-</sup>TGF-β<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 IFN-γ<sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup>IL-10<sup>-</sup>TGF-β<sup>+</sup>. Human nTregs were characterized as IFN-γ IL-2<sup>-</sup> double negative, producing IL-10 and TGF-β or only TGF-β without IL-10, and not proliferating *in vitro*. During the allostimulation in mixed lymphocytes, IFN-γ<sup>+</sup> iTregs proliferated remarkably. One-third of IFN-γ<sup>+</sup> iTreg expressed IL-2<sup>+</sup>, and two-thirds of IFN-γ<sup>+</sup> iTregs expressed IL-2, both of which produce IL-2 and TGF-β. Our results imply that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 Treg are potentially immunosuppressive probably because of their mandatory TGF-β and optional IL-10 production.

**Cite this article:** Wang HH, Zhu L, Yang PW, Guo QN. Phenotypic diversity of human nature and induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 regulatory T cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(2):236-241.

## 0 引言 Introduction

近半个世纪以来, 伴随着临床器官移植学的进步, 免疫学也取得了长足的发展, 其中对于调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)的认识和研究更是为免疫学开拓了一片广阔的新领域。这类具有免疫抑制功能作用的特殊的T细胞亚群在诱导移植免疫耐受、自身免疫性疾病以及抗肿瘤治疗等方面均有多项报道<sup>[1-5]</sup>。目前已知, Treg分为天然型Treg(natural Treg, nTreg)和诱导型Treg(induced Treg, iTreg)。nTreg来源于胸腺, 经过阴性选择和阳性选择后产生, 对维持人体自身免疫稳态发挥重要作用; 而iTreg来自于外周血和外周淋巴组织, 由原始T细胞经自体或异体抗原刺激而产生, 在诱导移植免疫耐受中发挥着重要作用<sup>[6-8]</sup>。然而, 由于nTreg和iTreg是根据其细胞来源、细胞功能特性而定义的, 其细胞表型却始终存有争议。

1995年, Sakaguchi研究组率先报道了表达CD25的CD4<sup>+</sup>T细胞亚群具有免疫抑制功能<sup>[9]</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>在很长一段时间内被认为是Treg的细胞表型。但是后继研究发现, 部分活化的T细胞也表达CD25, 而只有那些高表达CD25(CD25<sup>high</sup>)的CD4<sup>+</sup>T细胞才能在体外发挥免疫抑制功能<sup>[10]</sup>。2003年, Sakaguchi研究组发现并报道叉头状转录因子(forkhead transcription factor, FoxP3)与Treg的发

育和功能密切相关<sup>[8, 11]</sup>。以小鼠为实验对象的动物实验表明, FoxP3只表达于Treg, 而不在静息的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>细胞或Th1、Th2细胞内表达<sup>[11-12]</sup>。FoxP3基因的突变或缺失可以引起严重的自身免疫性疾病, 在小鼠可以观察到皮肤病, 在人类则会发生IPEX综合征(immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked)<sup>[13-15]</sup>。在多数文献报道中, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>被视为经典的Treg细胞表型。近年来, Treg的另一个细胞标志物CD127被发现和报道, CD127的表达与FoxP3呈明显的负相关, Treg不表达或弱表达CD127<sup>[16]</sup>。所以, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>是目前最公认的Treg细胞表型。

nTreg和iTreg都具有免疫抑制功能, 而且它们的作用机制都是依赖细胞-细胞直接接触和分泌细胞因子两种途径, 细胞-细胞直接接触途径中也有细胞因子的作用<sup>[17-18]</sup>; 因此, 表达白细胞介素10(Interleukin-10, IL-10)和转化生长因子β(transforming growth factor-β, TGF-β)以及不表达白细胞介素2(Interleukin-2, IL-2)也被多次用作非特异性Treg细胞标志物<sup>[1, 18-19]</sup>。近年来, 表达干扰素γ(interferon-γ, IFN-γ)的Treg被发现与肾移植术后患者移植肾功能长期存活密切相关<sup>[20]</sup>; 研究表明, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup> iTreg的免疫抑制功能是IFN-γ依赖性的<sup>[21]</sup>, 这

种表达白细胞介素 $\gamma$ 的iTreg被称为类Th1的Treg(Th1-like Treg)。虽然有很多的研究已经表明了分泌细胞因子在Treg中的重要作用,但是这些细胞因子在nTreg和iTreg中是否有着同样的表达、这些细胞因子的表达是在同一个细胞内还是各自有不同的细胞进行表达,这些问题却始终存在争议。本研究利用多色流式细胞仪,从健康受试者的外周血中分离得到外周血单个核细胞后进行检测,以获得人nTreg的细胞表型;对外周血单个核细胞进行混合淋巴培养以诱导产生人iTreg,检测获得iTreg的细胞表型,并比较其与nTreg的异同及其多样性变化。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 分组对比观察。

1.2 时间及地点 实验于2014年4至12月在武汉完成。

1.3 材料 外周血单个核细胞取自5名健康受试者。实验实施前已经获得本单位伦理委员会批准,并遵循《赫尔辛基宣言》的精神。所有健康受试者均被详细告知本实验的过程和目的,并签署知情同意书。

试剂及仪器: APC-Cy7-mouse-IgG1、PerCP-Cy5.5-mouse-IgG1、PE-Cy-mouse-IgG1、Perm2溶液(BD公司); DPBS(Invitrogen Gibco公司); 多色流式细胞仪(BD公司)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 实验分组 实验分为2组: ①nTreg组: 分离出外周血单个核细胞后马上染色检测。②iTreg组: 外周血单个核细胞与接受放射灭活后的同种异体外周血单个核细胞培养9 d后检测。

1.4.2 细胞制备和培养 用Ficoll梯度离心法从外周血(50 mL)中提取外周血单个核细胞。用含体积分数10%胎牛血清(FCS-500)的RPMI-1640将试管中外周血单个核细胞的浓度调整为 $1 \times 10^9 L^{-1}$ 。nTreg组的外周血单个核细胞马上染色并上机检测。取分离得的外周血单个核细胞作为反应细胞,选择另一个HLA抗原相异的健康受试者,分离其外周血单个核细胞作为刺激细胞,以放射线照射的方式(30 Gy放射量照射20 min)破坏其免疫原性,保留抗原性。以1:1的比例,将反应细胞的外周血单个核细胞与刺激细胞的外周血单个核细胞进行混合淋巴细胞培养,置于CO<sub>2</sub>培养箱中培养9 d。

1.4.3 流式细胞计数检测前准备 每组均备有Isotype control和Treg两支试管。将外周血单个核细胞移入准备好的试管,1 300 r/min转速离心8 min,弃上清。在Isotype control试管中加入5  $\mu$ L APC-Cy7-mouse-IgG1、5  $\mu$ L PerCP-Cy5.5-mouse-IgG1和5  $\mu$ L PE-Cy-mouse-IgG1作为细胞表面标志物的Isotype control; 依实验计划,在Treg试管中加入细胞表面抗体CD4(APC-Cy, 5  $\mu$ L, BD)、CD25(PerCP-Cy5.5, 5  $\mu$ L, BD)和CD127(PE-Cy7, 5  $\mu$ L, BD),振荡后室温下避光培养15 min,加入2 mL缓冲液(DPBS),洗细胞(1 300 r/min转速离心8 min,弃上清)。加入500  $\mu$ L

Perm2溶液作细胞透膜处理,振荡后室温下避光培养10 min。再加入2 mL DPBS洗细胞。加入胞内抗体,在Isotype control管中加入5  $\mu$ L V450-mouse-IgG1(BD)、5  $\mu$ L V500-mouse-IgG1(BD)、20  $\mu$ L FITC-mouse-IgG1(BD)、10  $\mu$ L PE-mouse-IgG1(R&D)和10  $\mu$ L APC-mouse-IgG1(R&D); 在Treg试管中加入FoxP3(V450, 5  $\mu$ L, BD)、干扰素 $\gamma$ (V500, 5  $\mu$ L, BD)、白细胞介素2(FITC, 20  $\mu$ L, BD)、白细胞介素10(PE, 10  $\mu$ L, R&D)和转化生长因子 $\beta$ (APC, 10  $\mu$ L, R&D)。振荡后室温下避光培养30 min,加入2 mL DPBS洗细胞;再加入2 mL DPBS,继续培养30 min,洗细胞。以多色流式细胞仪检测。

1.4.4 流式检测的设门策略 每支试管有至少100, 000信号被记录和分析。首先根据前向散射(FSC)和侧向散射(SSC)设门选择淋巴细胞群,然后再根据不同的实验目的进行再次设门,如选择CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>PBL等。阳性细胞选择标准为其在Isotype control中的比例<1%。

1.5 主要观察指标 ①以8色流式细胞仪检测CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 nTreg的细胞表型和其共表达细胞因子的情况。②以8色流式细胞仪检测并分析CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 iTreg的细胞表型和其共表达细胞因子的情况。

1.6 统计学分析 所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表达,用PASW Statistics 18.0 (IBM, Chicago, Illinois, USA)统计软件进行方差分析,以 $P < 0.01$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 人nTreg细胞表型多样性分析 从外周血中分离得到外周血单个核细胞后,检测发现,细胞表型为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127的nTreg占全部CD4<sup>+</sup>T细胞的比例为(1.50 $\pm$ 0.70)%,且几乎所有的细胞均表达IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>、IL-2<sup>-</sup>或TGF- $\beta$ <sup>+</sup>,而不表达IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>、IL-2<sup>+</sup>或TGF- $\beta$ <sup>-</sup>;在这些nTreg中,74%的nTreg细胞表型为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 IL-10<sup>+</sup>[(占全部CD4<sup>+</sup>T细胞的(1.1 $\pm$ 0.63)%],26%的为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 IL-10<sup>-</sup>[(占全部CD4<sup>+</sup>T细胞的(0.39 $\pm$ 0.16)%],图1]。

2.2 同种异体抗原刺激后,人iTreg细胞表型多样性分析 同种异体抗原刺激9 d后,检测混合淋巴细胞培养中iTreg的细胞表型,与未接受抗原刺激的nTreg相比较,可以发现,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>iTreg细胞数量明显升高( $P < 0.01$ );同样的升高趋势在表达IL-2<sup>-</sup>、IL-2<sup>+</sup>、IL-10<sup>+</sup>或TGF- $\beta$ <sup>+</sup>的iTreg上同样可以观察到(均 $P < 0.01$ ),表明同种异体抗原可以诱导这些细胞表型的iTreg产生。同时,细胞表型为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 IL-10<sup>-</sup>或CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127 TGF- $\beta$ <sup>-</sup>的iTreg细胞数量并无明显变化(vsnTreg: 均 $p = n.s.$ ,图2),表明这些Treg细胞亚群在经过同种异体抗原刺激后不能诱导产生。

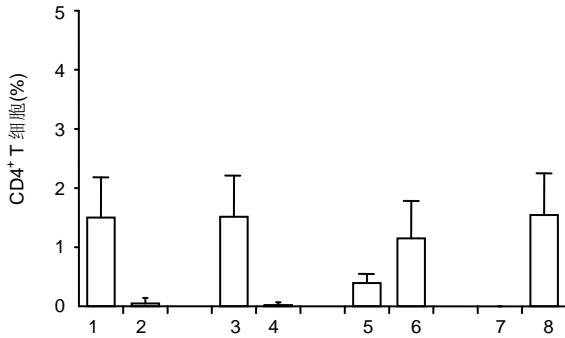


图 1 人 nTreg 细胞表型多样性分析

Figure 1 Plasticity of human nature regulatory T cells

图注: 1: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN $\gamma$ <sup>-</sup> PBL; 2: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> PBL; 3: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IL2<sup>-</sup>PBL; 4: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IL2<sup>+</sup>PBL; 5: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IL10<sup>-</sup>PBL; 6: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IL10<sup>+</sup>PBL; 7: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>TGF $\beta$ <sup>-</sup>PBL; 8: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>TGF $\beta$ <sup>+</sup>PBL。人 nTreg 表达 IFN- $\gamma$ 、IL-2 或 TGF- $\beta$ , 部分表达 IL-10 和 IL-10<sup>+</sup>。

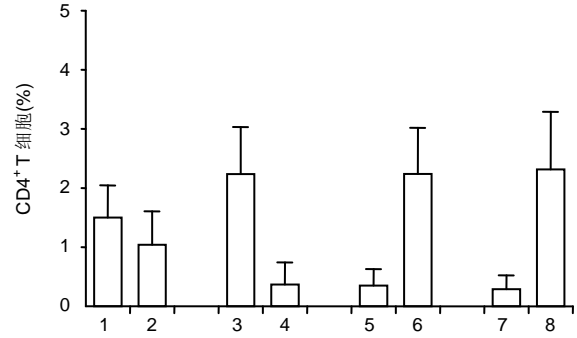


图 2 同种异体抗原刺激 9 d 后, 人 iTreg 细胞表型多样性分析

Figure 2 Plasticity of human induced regulatory T cells after 9-day alloantigen stimulation

图注: 1: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN $\gamma$ <sup>-</sup> PBL; 2: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> PBL; 3: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IL2<sup>-</sup>PBL; 4: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IL2<sup>+</sup>PBL; 5: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IL10<sup>-</sup>PBL; 6: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IL10<sup>+</sup>PBL; 7: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>TGF $\beta$ <sup>-</sup>PBL; 8: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>TGF $\beta$ <sup>+</sup>PBL。同种异体抗原刺激诱导产生表达 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>、IL-2<sup>+</sup>、IL-10<sup>+</sup>或 TGF- $\beta$ <sup>+</sup>的 iTreg。

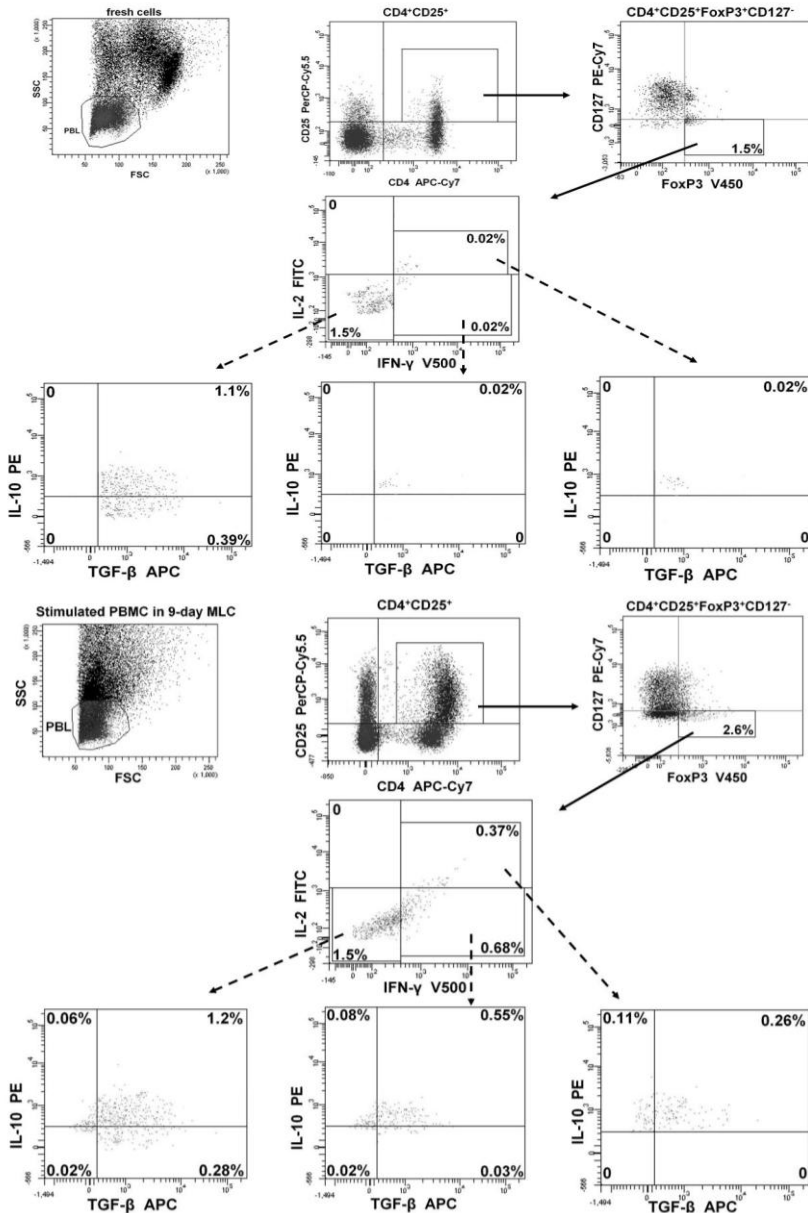


图 3 多色流式细胞仪分析人 nTreg 细胞表型及设门策略

Figure 3 Gating strategy and cytokine patterns of human nature regulatory T cells

图注: 人 nTreg 的细胞表型主要是 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> IL-2<sup>-</sup> IL-10<sup>-</sup> TGF- $\beta$ <sup>-</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> IL-2<sup>-</sup> IL-10<sup>-</sup> TGF- $\beta$ <sup>-</sup>。

图 4 同种异体抗原刺激 9 d 后人 iTreg 的细胞表型

Figure 4 Cytokine patterns of human induced regulatory T cells after 9-day alloantigen stimulation

图注: 同种异体抗原刺激后, iTreg 的主要细胞表型为 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup> IL-10<sup>+</sup>TGF- $\beta$ <sup>-</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>TGF- $\beta$ <sup>-</sup>。

2.3 多色流式细胞仪分析人nTreg细胞表型 多色流式细胞仪结果发现, 几乎所有的nTreg细胞, 在同一个细胞上既不表达干扰素 $\gamma$ , 也不表达白细胞介素2, 但表达转化生长因子 $\beta$ , 部分表达白细胞介素10。仅有(0.02±0.05)%CD4<sup>+</sup>细胞细胞表型为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL-2<sup>-</sup>和CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL-2<sup>-</sup>, 且这两个nTreg亚群全都同时表达IL-10和TGF- $\beta$ 。同时, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL-2<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>TGF- $\beta$ <sup>+</sup>nTreg 和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL-2<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>TGF- $\beta$ <sup>+</sup>nTreg占全部CD4<sup>+</sup>T细胞的比例分别为(1.10±0.59)%和(0.39±0.16)%, 表明nTreg的细胞表型主要是这二者(图3)。

2.4 同种异体抗原刺激9 d后人iTreg的细胞表型 同种异体抗原刺激后, 可以观察到细胞表型为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>的iTreg占全部CD4<sup>+</sup>T细胞的比例从受刺激前(1.50±0.70)%上升到(2.6±1.2)% (与nTreg比 $P < 0.01$ )。有意思的是, 和nTreg相比, 增加的部分全部为IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>的细胞, 而细胞表型为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup>的Treg细胞比例并不增加, 而且CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup>Treg细胞无论是否表达白细胞介素10和/或转化生长因子 $\beta$ , 与nTreg相比均无明显变化(图4)。在nTreg和iTreg中, 均没有任何细胞的细胞表型为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>, 表明外周血中并不存在这种细胞, 且这种细胞表型不会被同种异体抗原所诱导产生。在刺激后, 细胞表型为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>TGF- $\beta$ <sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>TGF- $\beta$ <sup>+</sup>的iTreg增加最为明显(与nTreg比, 均 $P < 0.01$ ), 说明iTreg的主要细胞表型就是这二者; 而除了共表达IL-10<sup>+</sup>TGF- $\beta$ <sup>+</sup>之外的其他IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup>或IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>iTreg亚群均无明显变化(均 $p = n.s.$ )。

### 3 讨论 Discussion

Treg被发现之后, 关于Treg细胞表型多样性的研究一直方兴未艾, 在各种文献报道中, 不同的细胞表型被用来代表Treg, 尤其是对nTreg和iTreg, 由于目前研究的局限, 往往认为, 二者具有相似的作用机制, 所以也具有相同的细胞表型。这在一定程度上混淆了对于nTreg和iTreg的认识。在以前的研究中, 作者曾经利用多克隆刺激诱导产生人iTreg, 并利用四色流式细胞仪对人nTreg和iTreg的细胞表型进行研究。研究发现, 多克隆刺激后, 表达IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>、IL-2<sup>-</sup>、IL-10<sup>+</sup>或TGF- $\beta$ <sup>+</sup>的人CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>iTreg数量明显升高<sup>[22]</sup>; 然而, 由于受到流式细胞仪FACSCalibur仅有4种荧光色的限制, 无法验证这些产生细胞因子的iTreg是否在同一个细胞内表达, 其共表达对于iTreg的细胞表型和作用机制又有何意义。

本实验利用多色流式细胞仪FACSCanto II的优势, 对人nTreg细胞表型进行分析的同时, 研究在同一个细胞内共表达这些细胞因子的情况; 同时, 实验利用同种异体抗原

刺激诱导产生iTreg, 研究其与nTreg的异同。与多克隆刺激相比, 同种异体抗原刺激更接近于人体内(in-vivo)的实际免疫状态, 实验结果也更值得关注。BD公司的新型流式细胞仪FACSCanto II拥有3种固态激光, 即波长为405 nm的紫色激光、波长为488 nm的蓝色激光和波长为640 nm的红色激光, 可以同时检测8种荧光参数, 检测结果比仅有一两种激光的流式细胞仪敏感性和精确度更高<sup>[23]</sup>, 是目前最新的流式细胞仪之一。

实验结果显示, 虽然CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>被公认为nTreg和iTreg的细胞表型及其特异性细胞标志物, 但nTreg和iTreg的非特异性细胞标志物却明显不同。nTreg的主要细胞表型为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL-2<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>TGF- $\beta$ <sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL-2<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>TGF- $\beta$ <sup>+</sup>, 而有意思的是, 这两个Treg亚群的细胞数量在经过同种异体抗原刺激后, 并没有明显变化, 这也可以证明iTreg的来源并不是由nTreg受刺激而诱导产生; 经过同种异体抗原刺激后iTreg的主要细胞表型CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>TGF- $\beta$ <sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>TGF- $\beta$ <sup>+</sup>, 这一方面说明IFN- $\gamma$ 在iTreg诱导过程中发挥了重要作用, 同时从nTreg几乎不表达白细胞介素2到iTreg部分表达白细胞介素2的变化中也可说明, 在iTreg诱导产生过程中可能存在有白细胞介素2的自分泌现象。而类似的结果, 在多克隆刺激中也同样观察到, 这也是Treg细胞表型多样性变化的一个表现。

近年来, 对IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>iTreg的研究和报道日趋增多。在iTreg所产生的细胞因子或分子中, 干扰素 $\gamma$ 是一类比较特殊的细胞因子。虽然几乎所有的淋巴细胞都可以产生干扰素 $\alpha$ 或者干扰素 $\beta$ , 但是只有活化的T细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)和自然杀伤T细胞(NKT细胞)才能产生干扰素 $\gamma$ <sup>[24]</sup>。以前, 干扰素 $\gamma$ 被认为是1型辅助性T细胞(Th1细胞)的标志性细胞因子, 但是后来又发现Treg和CD8<sup>+</sup>T细胞同样可以产生干扰素 $\gamma$ , 且干扰素 $\gamma$ 在抗炎症、抗肿瘤和免疫调节方面发挥着重要的作用<sup>[22]</sup>, 这也是IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>iTreg被称作Th1-like iTreg的原因。德国Daniel研究组(作者作为主要研究者参与其中)陆续报道, 表达干扰素 $\gamma$ 的CD4<sup>+</sup>iTreg和肾移植后患者移植肾功能长期存活密切相关。在对肾移植术后患者的长期随访监测中发现, 与移植肾功能受损的患者相比, 移植物功能良好的患者体内表达干扰素 $\gamma$ 的CD4<sup>+</sup>Treg(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>)数量明显升高, 提示干扰素 $\gamma$ 也许在诱导人移植物免疫耐受中发挥着重要的作用<sup>[20]</sup>, 同时研究认为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>iTreg的免疫抑制功能是干扰素 $\gamma$ 依赖性的, 是抗原非特异性的免疫抑制<sup>[21, 25]</sup>。本实验中发现, 虽然同种异体抗原刺激后可以诱导产生IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>iTreg, 但是并不所有的IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>iTreg数量都会增加, 作者发现, 只有同时表达IL-10<sup>+</sup>和TGF- $\beta$ <sup>+</sup>的IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>iTreg数量才会增加, 而这些都是以前用四色流式细胞仪所观察不到的。前期的实验报道中, 作者通过在混合淋

巴细胞培养中添加单克隆抗体已经证实, CD178、CD152、CD279、CD95和CD28对于IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>iTreg的诱导产生和功能有重要作用<sup>[20]</sup>, 本实验则进一步表明了, 分泌细胞因子干扰素10和转化生长因子 $\beta$ 对于诱导IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>iTreg也发挥着重要作用。另一个有趣的结果是关于干扰素 $\gamma$ 和白细胞介素2的关系, 在对nTreg和iTreg的比较中, 作者发现, 虽然IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL-2<sup>-</sup>PBL在nTreg和iTreg都有表达, 但并没有明显差别, 另一方面, IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL-2<sup>+</sup>PBL在nTreg和iTreg都没有检测到, 说明并不存在IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL-2<sup>+</sup>Treg, 这也许表明白细胞介素2的产生需要依赖干扰素 $\gamma$ 。

**作者贡献:** 王海瀛负责实验的设计、数据总结分析和最后撰写论文, 朱莉负责实验中样本检测, 仰需雯和郭倩男参与了实验, 并参与了后期论文的修改等工作。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 实验方案已经患者知情同意。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

#### 4 参考文献 References

- [1] Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, et al. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490-500.
- [2] Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science.* 2007;317(5838):627-629.
- [3] Sakaguchi S, Wing K, Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur J Immunol.* 2009; 39(9):2331-2336.
- [4] Jones E, Dahm-Vicker M, Golgher D, et al. CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and tumor immunity. *Immunol Lett.* 2003;85(2):141-143.
- [5] Adeegbe D, Bayer AL, Levy RB, et al. Cutting edge: allogeneic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells suppress autoimmunity while establishing transplantation tolerance. *J Immunol.* 2006;176(12):7149-7153.
- [6] Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(3):253-257.
- [7] Cassis L, Aiello S, Noris M. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Contrib Nephrol.* 2005;146:121-131.
- [8] Sakaguchi S. The origin of FOXP3-expressing CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: thymus or periphery. *J Clin Invest.* 2003; 112(9):1310-1312.
- [9] 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 diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-1164.
- [10] Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001;167(3):1245-1253.
- [11] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057-1061.
- [12] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330-336.
- [13] Khattry R, Cox T, Yasayko SA, et al. An essential role for Scurfin in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003; 4(4):337-342.
- [14] Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003; 15(4):430-435.
- [15] Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001;27(1):20-21.
- [16] Liu W1, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med.* 2006;203(7):1701-1711.
- [17] Sanchez-Lockhart M, Marin E, Graf B, et al. Cutting edge: CD28-mediated transcriptional and posttranscriptional regulation of IL-2 expression are controlled through different signaling pathways. *J Immunol.* 2004; 173(12):7120-7124.
- [18] Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, et al. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell suppressor function. *J Immunol.* 2004;172(11):6519-6523.
- [19] Wu H, Li P, Shao N, et al. Aberrant expression of Treg-associated cytokine IL-35 along with IL-10 and TGF-beta in acute myeloid leukemia. *Oncol Lett.* 2012;3(5):1119-1123.
- [20] Daniel V, Naujokat C, Sadeghi M, et al. Observational support for an immunoregulatory role of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> blood lymphocytes in kidney transplant recipients with good long-term graft outcome. *Transpl Int.* 2008;21(7):646-660.
- [21] Daniel V, Sadeghi M, Wang H, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> IFN-gamma<sup>+</sup> human induced T regulatory cells are induced by interferon-gamma and suppress alloresponses nonspecifically. *Hum Immunol.* 2011; 72(9):699-707.
- [22] 王海瀛, 仰需雯, 雷家慧. 两种多克隆刺激条件下人诱导性Treg表型的多样性变化[J]. *中国免疫学杂志*, 2012, 28(9):769-774.
- [23] Roussel M, Davis BH, Fest T, et al. Toward a reference method for leukocyte differential counts in blood: Comparison of three flow cytometric candidate methods. *Cytometry A.* 2012;81(11): 973-982.
- [24] Gill N, Chenoweth MJ, Verdu EF, et al. NK cells require type I IFN receptor for antiviral responses during genital HSV-2 infection. *Cell Immunol.* 2011;269(1):29-37.
- [25] Daniel V, Sadeghi M, Wang H, et al. CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup>Foxp3<sup>(+)</sup> IFN $\gamma$ <sup>(+)</sup> Treg are immunosuppressive in vitro and increase with intensity of the alloresponse in pretransplant MLC. *Transpl Immunol.* 2012;27(2-3):114-121.
- [26] Daniel V, sadeghi M, Wang H, et al. In-vitro inhibition of IFN $\gamma$ <sup>+</sup> iTreg mediated by monoclonal antibodies against cell surface determinants essential for iTreg function. *BMC Immunol.* 2012;13(1):47.