

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)07-0744-04

子痫前期患者外周血树突状细胞对 Th1/Th17 细胞分化的影响

王 婧, 苏良香*, 朱天峰 (南通市妇幼保健院, 江苏 南通 226006)

[摘要] 目的 观察正常妊娠妇女和子痫前期患者外周血单个核细胞(PBMC)来源的树突状细胞(DC)对 Th1、Th17 细胞分化的影响。方法 实验组为子痫前期疾病患者 32 例;对照组为正常妊娠妇女 20 例。分离正常妊娠组和子痫前期组 PBMC, 经贴壁获得单核细胞, 加 GM-CSF, IL-4 和 LPS 培养诱导为成熟 DC, 流式细胞术检测表面分子标志 CD14, CD80, CD83, CD86 的表达, ELISA 检测培养上清液中 IL-23 的含量。磁珠分选出 CD4⁺T 淋巴细胞, 与正常妊娠孕妇外周血单核细胞来源的树突状细胞(N-DC)共同培养, 同时添加细胞因子 IL-2, 或与子痫前期患者外周血单核细胞来源的树突状细胞(P-DC)、IL-2 共同培养;或与 N-DC 共同培养, 同时添加细胞因子 IL-1 β 、IL-6; 或与 P-DC 共同培养, 并添加细胞因子 IL-1 β 、IL-6。以上各组培养到第 6 天用流式细胞术检测 CD4⁺IFN- γ ⁺Th1、CD4⁺IL-17⁺Th17 细胞比例。结果 P-DC 中 CD83、CD80、CD86 的表达高于 N-DC, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。P-DC 与不同的细胞因子共同作用, 促使 CD4⁺T 细胞分化为 Th1、Th17 细胞的能力高于 N-DC, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 子痫前期患者外周血 DC 表型和功能的改变可能与患者免疫失衡有一定关系。

[关键词] 流式细胞术; 子痫前期; 树突状细胞; Th1 细胞; Th17 细胞

[中图分类号] R392.9 **[文献标志码]** A

Effect of dendritic cells on the differentiation of Th1/Th17 in peripheral blood from preeclampsia patients

WANG Jing, SU Liangxiang*, ZHU Tianfeng

Nantong Maternal and Child Health Hospital, Nantong 226006, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of dendritic cells (DCs) derived from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) on the differentiation of Th1 and Th17 in normal pregnancy women and preeclampsia patients. **Methods** PBMCs were obtained from 32 preeclampsia patients and 20 normal pregnancy controls, respectively. Then DCs were sorted from peripheral blood monocytes cultured in the presence of cytokines (GM-CSF, IL-4) and LPS for 8 d. The phenotypes of DCs (CD14, CD80, CD83, CD86) were detected by flow cytometry (FCM). The content of IL-23 in the supernatant was detected by ELISA. CD4⁺T lymphocytes were separated using the magnetic BD IMag Cell Separation System according to the manufacturer's instructions. Purified CD4⁺T lymphocytes were cultured with mature DCs derived from normal pregnancy women (N-DC) and IL-2, or with mature DCs derived from preeclampsia patients (P-DC) and IL-2, or with N-DC and IL-1 β , IL-6, or with P-DC and IL-1 β , IL-6. At 6 days after culture, CD4⁺IFN- γ ⁺T (Th1) and CD4⁺IL-17⁺T (Th17) subsets were determined by FCM. **Results** Compared with N-DC, P-DC expressed the higher levels of CD83, CD80, CD86 and manifested the stronger ability of promoting the differentiation of CD4⁺T into Th1/Th17 when cultured with different cytokines ($P < 0.01$). **Conclusion** The changes in phenotype and function of DCs might be related to immune imbalance and be an important reason for preeclampsia.

[Key words] flow cytometry; preeclampsia; dendritic cell; Th1 cell; Th17 cell

子痫前期(preeclampsia, PE)是一种严重影响妊娠期妇女和胎儿健康的妊娠并发症,是导致孕产妇死亡的主要原因之一,然而其发病原因至今不明,所以临床对该病也缺乏有效的预防手段。随着免疫学

和分子生物学的发展,专家们提出了一些新的学说,如免疫学说,胎盘缺血学说,血管调节物质的异常和遗传学说。生殖免疫学说认为,妊娠是一种成功的自然同种异体移植,而这种平衡一旦失调,就有可能

收稿日期: 2013-01-10; 接收日期: 2013-02-28

基金项目: 江苏省南通市社会发展基金(S2010053)

作者简介: 王 婧(1981-),女,安徽安庆人,硕士

Tel: 15851216497; E-mail: wangjin2413@sina.com

* Corresponding author, 苏良香, E-mail: ntsulx@sina.com

引起免疫排斥反应,导致病理妊娠的发生。树突状细胞(dendritic cell, DC)是体内功能最强大的抗原提呈细胞,是唯一能活化初始 T 细胞成为效应细胞的抗原提呈细胞,DC、数量、成熟状态及表面协同刺激分子的表达直接影响机体的免疫应答类型^[1-2]。本研究采用正常妊娠妇女和子痫前期患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)分化的 DC 与 CD4⁺T 淋巴细胞在不同细胞因子的作用下共同培养,观察它们对 CD4⁺T 淋巴细胞产生细胞因子的影响,初步了解 DC 在子痫前期疾病发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 对象 参照乐杰主编的《妇产科学》(第6版)中子痫前期诊断标准,选取2011-06/2011-12期间在南通市妇幼保健院产科治疗的患者32例,平均年龄(26.7±2.5)岁,平均孕周(34.3±1.8)周;正常妊娠妇女20例,平均年龄(27.6±3.6)岁,平均孕周(33.9±1.3)周,与子痫前期组相比均无显著性差异,无自身免疫病史,无产科并发症及内科合并症。经医院医学伦理会批准,在取样本前告知患者标本用途,并取得患者同意。

1.1.2 主要试剂和仪器 rhGM-CSF 购自北京邦定生物医学公司;rhIL-4、LPS、RPMI1640 培养液购自 Gibco 公司;FITC 标记的抗人 CD14 抗体、FITC 标记的抗人 CD83 抗体、FITC 标记的抗人 IL-17 抗体购自 Caltag 公司;FITC 标记的抗人 CD80 抗体、FITC 标记的抗人 CD86 抗体、PerCP 标记的抗人 CD8 抗体和 PE 标记的抗人 IFN- γ 抗体购自 eBioscience 公司;重组人白细胞介素 2(rhIL-2)购自长春长生基因药业公司;抗人 CD4 分选磁珠和 FACS Calibur 流式细胞仪为 BD 公司产品;IL-23 检测试剂盒购自 R&D 公司。

1.2 方法

1.2.1 单个核细胞来源的树突状细胞的培养 取肝素抗凝血 10 mL,实验室常规方法分离出人外周血 PBMC, RPMI1640 完全培养液洗涤 3 次后加入 6 孔板中,细胞密度为 $5 \times 10^9/L$, 37 $^{\circ}C$, 50 mL/L CO₂ 中培养 2 h。吸去悬浮细胞,并用 25 $^{\circ}C$ 预热的 RPMI1640 轻洗培养孔,以去除残留悬浮细胞,获得贴壁细胞。在贴壁细胞中加入培养液,按 rhGM-CSF 100 $\mu g/L$, rhIL-4 100 $\mu g/L$ 加入细胞因子,第 3 天半量换液,并再次添加相同剂量的细胞因子,第 6 天半量换液的同时再加入 LPS 1 mg/L,促使 DC 成熟,第 8 天收获悬浮细胞。

1.2.2 CD4⁺T 细胞分选 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC,贴壁培养 3 h 后吸取悬浮细胞,计数,按每 1×10^7 细胞加入抗人 CD4 分选磁珠 50 μL ,充分混匀,室温孵育 30 min,用 BD IMag 缓冲液重悬至 1 mL,混匀后置磁珠架上静置 10 min,吸尽上清,再用缓冲液重悬至 1 mL 后置磁珠架上静置 4 min,去除上清,获取纯化的 CD4⁺T 细胞用于后续

实验。

1.2.3 不同培养方法体外诱导细胞扩增 调整细胞密度为 $1 \times 10^9/L$,加入 24 孔板培养,每孔 1 mL,并按以下 4 种不同方法培养:(1)纯化的 CD4⁺T 淋巴细胞中加入正常妊娠孕妇外周血单核细胞来源的 DC(DC from normal pregnancy woman, N-DC) (N-DC:CD4⁺T 为 1:100),同时加入 IL-2 (50 万 U/L);(2)纯化的 CD4⁺T 细胞中加入子痫前期患者外周血单核细胞来源的 DC(DC from preeclampsia patients, P-DC) (P-DC:CD4⁺T 为 1:100)同时加入 IL-2 (50 万 U/L);(3)纯化的 CD4⁺T 淋巴细胞中加入 N-DC(N-DC:CD4⁺T 为 1:100),同时加入细胞因子 IL-1 β (15 $\mu g/L$), IL-6(20 $\mu g/L$);(4)纯化的 CD4⁺T 淋巴细胞中加入 P-DC(P-DC:CD4⁺T 为 1:100),同时加入细胞因子 IL-1 β (15 $\mu g/L$), IL-6(20 $\mu g/L$)。上述 4 组细胞培养在第 3 天时加入 IL-2 (50 万 U/L),扩增细胞,隔天半量换液并添加等量的 IL-2 以维持细胞生长,第 6 天收获细胞。

1.2.4 树突状细胞表型的检测 收集培养的单核细胞来源的树突状细胞,用 RPMI1640 调整细胞密度为 $1 \times 10^9/L$,在不同的试管中分别加入 FITC 标记的抗人 CD14 抗体、FITC 标记的抗人 CD83 抗体、FITC 标记的抗人 CD80 抗体、FITC 标记的抗人 CD86 以及同型对照 FITC 标记的 IgG1,避光染色 30 min 后, PBS 洗涤 3 次,加入 300 μL 20 g/L 多聚甲醛运用流式细胞术检测树突状细胞成熟表型, Cellsquest 软件获取并分析数据。

1.2.5 ELISA 法检测 IL-23 收集培养到第 8 天树突状细胞的培养上清,离心 20 min(2 000-3 000 g/min),按试剂盒说明进行检测。

1.2.6 胞内细胞因子的检测 将 PBMC 以 $2 \times 10^6/mL$ 培养在 96 孔培养板中,每孔 200 μL 。加入 PMA 和离子霉素,置于 37 $^{\circ}C$, 50 mL/L CO₂ 孵箱内培养 3 h 后加入莫能菌素进行阻滞,继续培养 2 h 后离心弃上清,留 50 $\mu L/$ 管。加入细胞因子抗体;4 组细胞分别加入 CD8-PerCP, 4 $^{\circ}C$ 避光 30 min 进行表面分子染色,加染色缓冲液 1 mL/管,洗 2 次;500 $\mu L/$ 管 40 g/L 多聚甲醛 4 $^{\circ}C$ 固定 30 min;然后用染色缓冲液 1 mL/管,洗 2 次;加透膜缓冲液(1 g/L saponin-PBS)500 $\mu L/$ 管,4 $^{\circ}C$ 透膜 15 min,离心弃上清;100 mL/L 牛血清白蛋白 20 $\mu L/$ 管封闭 30 min;在 4 组中细胞分别加入 IFN- γ -PE、IL-17-FITC,同时设立同型对照管,进行胞内细胞因子染色;PBS 洗涤后,加入 300 μL 40 g/L 多聚甲醛,流式细胞仪进行检测。Cellsquest 软件获取并分析数据。

1.2.7 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对 t 检验,数据处理采用 SPSS16.0 统计软件进行, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常妊娠组和子痫前期组单核细胞来源的树突状细胞表型的比较 经过 GM-CSF、IL-4 和 LPS 联合刺激,二组细胞都高表达树突状细胞成熟标志 CD83,协同刺激分子 CD80、CD86,低表达新鲜单核

表型 CD14(表 1)。子痫前期组单核细胞来源的树突状细胞 CD83 的表达高于正常妊娠组 (89.92 ± 4.39 vs 80.20 ± 3.41) 二者之间有显著差异 ($P < 0.01$), CD14 的表达低于正常妊娠组 (6.01 ± 1.63 vs 6.24 ± 1.53), 但二者差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 子痫前期组 CD80 和 CD86 的百分比分别为 (91.88 ± 3.30)% 和 (89.87 ± 4.57)%, 高于正常妊娠组, 二者之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 正常妊娠组和子痫前期组单核细胞来源的 DC 表型的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD14(%)	CD83(%)	CD80(%)	CD86(%)
正常妊娠组	20	6.24 ± 1.53	80.20 ± 3.41	83.21 ± 2.29	82.39 ± 4.18
子痫前期组	32	6.01 ± 1.63	89.92 ± 4.39 ^b	91.88 ± 3.30 ^a	89.87 ± 4.57 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常妊娠组。

2.2 ELISA 试剂盒检测细胞因子 IL-23 的含量 子痫患者组来源的 DC 分泌的 IL-23 为 (135.2 ± 27.6) ng/L, 与正常妊娠组 (96.26 ± 32.17) ng/L 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 免疫磁珠分选 CD4⁺T 细胞 免疫磁珠分选前 CD4⁺T 细胞纯度为 (47.63 ± 10.26)%, 纯化后 CD4⁺T 细胞纯度为 (95.62 ± 3.73)%, 纯化前后有明显差异 (图 1, $P < 0.01$)。

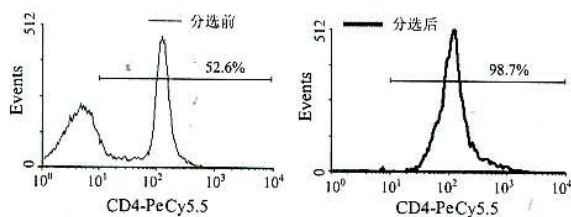


图 1 磁珠分选前后流式细胞仪检测 CD4⁺T 细胞的比例

2.4 流式细胞术检测 CD4⁺IFN- γ ⁺Th1、CD4⁺IL-17⁺Th17 细胞比例 首先在前向散射光 (FSC) 和侧向散射光 (SSC) 点阵图上设定淋巴细胞区域 R1, 然后在 FL-3 和 SSC 点阵图上以 CD8-PerCP 阴性区域设定区域 R2。设门 G2 = R1 * R2, 选择 CD4⁺T 细胞区, 分析 CD4⁺T 细胞中 IFN- γ 、IL-17 细胞百分率 (图 2), 分泌 IFN- γ 的阳性细胞在加入 N-DC、IL-2 时为 (20.72 ± 4.34)%, 加入 P-DC 和 IL-2 时为 (33.95 ± 4.05)%, 显著高于加入 N-DC、IL-1 β 、IL-6 的细胞 (11.09 ± 2.85)%, 也高于加入 P-DC、IL-1 β 、IL-6 的细胞和 (11.23 ± 2.65)%, 且前二组数据有统计学意义 ($P < 0.01$); 后二组分泌 IL-17 的阳性细胞分别为 (11.95 ± 2.7)% 和 (25.74 ± 6.43)%, 明显高于前二组的 (2.14 ± 0.74)% 和 (2.94 ± 0.93)%, 且分泌 IL-17 的阳性细胞在后二组有显著差异 (图 3, $P < 0.01$)。

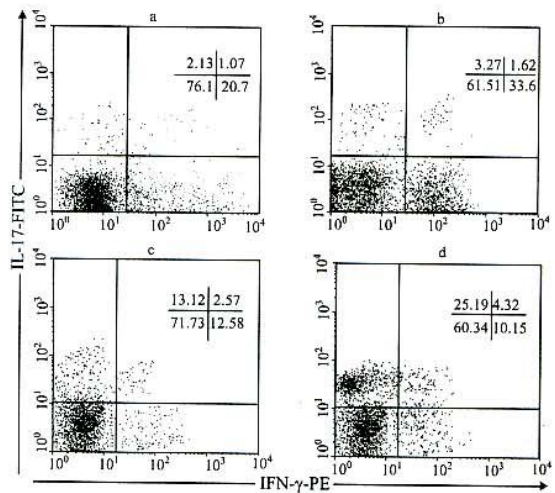
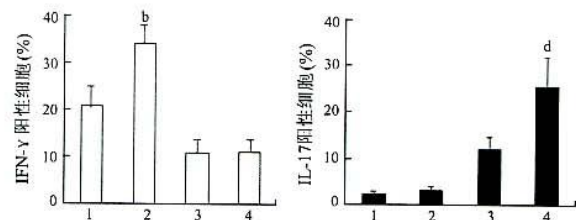


图 2 流式细胞术检测 CD4⁺IFN- γ ⁺Th1、CD4⁺IL-17⁺Th17 细胞



1: 纯化的 CD4⁺T + N-DC + IL-2; 2: 纯化的 CD4⁺T + P-DC + IL-2; 3: 纯化的 CD4⁺T + N-DC + IL-1 β + IL-6; 4: 纯化的 CD4⁺T + P-DC + IL-1 β + IL-6. ^b $P < 0.01$ vs 1; ^d $P < 0.01$ vs 3.

图 3 四种不同培养方法中 CD4⁺IFN- γ ⁺Th1、CD4⁺IL-17⁺Th17 细胞比例

3 讨论

研究证明, DC 的成熟状态与诱导的免疫反应类型有密切关系, 成熟的 DC 具有很强的抗原提呈能力。未成熟的 DC 具有抗原摄取和加工的能力, 而抗原提呈功能却很弱, 未成熟 DC 可能在免疫耐受中发挥了重要作用^[3]。目前, DC 的培养多以骨髓 CD34⁺细胞和外周血 CD14⁺细胞为来源, 本实验利用 GM-CSF、IL-4 和 LPS 联合诱导人外周血单个核细胞得到的 DC, 高表达成熟标志 CD83 和协同刺激分子 CD80、CD86, 低表达新鲜单核细胞标志 CD14, 有效地获得了成熟 DC。张晓洁等^[4]通过比较不同妊娠阶段胎盘源性 DC 刺激 T 细胞活化增殖特点的差异, 发现足月妊娠胎盘与中期妊娠胎盘单核-巨噬细胞来源的 DC 相比, 高表达 CD80、CD86、HLA-DR, 可能与免疫发动有关。本实验结果显示子痫前期组外周血单核细胞来源的 DC, 其表面与免疫激活有关的细胞表面标志物 CD80、CD86 和成熟标志 CD83 较正常妊娠组要高, 在不同细胞因子的作用下刺激同种异体淋巴细胞增殖, 产生炎性细胞因子的能力也要高于

来自正常妊娠组的 DC。

IL-23 是一种新型的细胞因子^[5-6], 主要由活化的巨噬细胞、DC 和 B 细胞产生, 它具有多种生物学功能, 对 DC 的共刺激功能起调节作用, 与自身免疫和炎症反应疾病密切相关。研究发现 IL-23 能作用于记忆 CD4⁺T 细胞^[7-8], 诱导 Th1 型细胞的分化和 IFN- γ 的产生, 还可作用于记忆 Th17 细胞亚群诱导产生 IL-17。检测二组 DC 培养上清, 发现子痫前期组 DC 分泌 IL-23 的水平明显高于正常妊娠组, 且二组间差异有显著统计学意义。为了解二组 DC 在不同细胞因子作用下刺激同种异体淋巴细胞产生炎症细胞因子的能力, 采用了 4 种不同的培养方法发现 DC 和 IL-2 共同作用诱导 CD4⁺T 细胞主要产生的是 IFN- γ , 只产生少量 IL-17, 这部分 IL-17 可能是由记忆 Th17 细胞产生。而 DC 与促使初始 T 细胞向 Th17 细胞分化的 IL-6 和 IL-1 β 共同作用于 CD4⁺T 细胞时, 引起分泌 IL-17 细胞数量的显著增加, 说明仅有 IL-23 不能发动初始 T 淋巴细胞向 Th17 细胞进行分化, 但在 Th17 细胞的扩增和功能维持中起到重要作用。这与 Eva 等^[9]的研究结果一致。而在同样的培养条件下, 来自于子痫前期组的 DC 刺激同种异体淋巴细胞分化为 Th1 和 Th17 细胞, 产生炎症细胞因子的能力均高于来自正常妊娠组的 DC。越来越多的研究证实, CD4⁺T 细胞亚群的变化与妊娠结局有显著相关性^[10-11], T 细胞亚群在妊娠的进行中保持动态平衡, 以维持妊娠的正常进行, 子痫前期患者体内则出现失衡现象, 产生炎症细胞因子的 Th1、Th17 型细胞增多, 最终导致病理妊娠的发生。因此了解 DC 在子痫前期疾病中的生物学变化, 利用 DC 的生物学特性调整患者体内的免疫失调, 可能是治疗疾病的一条途径。

参考文献:

- [1] Panda B, Panda A, Ueda I, et al. Dendritic cells in the circulation of women with preeclampsia demonstrate a pro-inflammatory bias secondary to dysregulation of TLR receptors[J]. *J Reprod Immunol*, 2012, 94(2): 210-215.
- [2] Li X, Yang A, Huang H, et al. Induction of type 2 T helper cell allergen tolerance by IL-10-differentiated regulatory dendritic cells[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 42(2): 190-199.
- [3] Kubach J, Becker C, Schmitt E. Dendritic cells: sentinels of immunity and tolerance[J]. *Int J Hematol*, 2005, 81(3): 197-203.
- [4] 张晓洁, 季晓辉, 何敏, 等. 妊娠不同时期胎盘单核-巨噬细胞来源的树突样细胞刺激 T 细胞作用的比较[J]. *南京医科大学学报*, 2009, 9(9): 1208-1214.
- [5] Zelante T, De Luca A, Bonifazi P, et al. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(10): 2695-2706.
- [6] Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, et al. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity[J]. *Immunity*, 2009, 31(2): 331-341.
- [7] Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(7): 479-489.
- [8] Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J, et al. Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients[J]. *Am J Transplant*, 2003, 3(6): 689-696.
- [9] Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, et al. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells[J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(9): 942-949.
- [10] Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, et al. Systemic increase in the ratio between Foxp3⁺ and IL-17-producing CD4⁺T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia[J]. *J Immunol*, 2009, 183(11): 7023-7030.
- [11] Saito S, Nakashima A, Shima T, et al. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2010, 63(6): 601-610.

《细胞与分子免疫学杂志》2013 年征订启事

《细胞与分子免疫学杂志》为北大图书馆《中文核心期刊要目总览》医药卫生类核心期刊、中国科技信息研究所“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”、中国科学院文献情报中心“中国科学引文数据库核心库来源期刊”, 清华大学“中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)”统计源期刊、武汉大学“中国学术期刊评价研究报告中国核心学术期刊”, 多种国内数据库收录期刊。同时也是 MEDLINE/PubMed, Scopus, EMBASE, SCIRUS 等国外著名数据库收录期刊。本刊为月刊, 国内外公开发行。国际标准 A4 开本 110 页, 精装双面铜版纸彩色印刷, 每月 18 日出版, 每期订价 28 元, 全年 336.00 元。优惠价 300 元, 本刊今年自办发行, 欢迎各单位直接联系本刊编辑部购买, 量大从优, 国际邮发代号 BM4882。

地址: 陕西省西安市长乐西路 169 号第四军医大学《细胞与分子免疫学杂志》编辑部; 邮编: 710032 网站: <http://cmi.guifeng.cc/>
电话: 029-84774550(兼传真); E-mail: immuedit@fmmu.edu.cn

联系人: 韩老师

《细胞与分子免疫学杂志》编辑部

2012-12-18