

## 不同刺激剂对人淋巴细胞活化的影响

闫 征, 薛妮娜, 季 鸣, 来芳芳, 陈晓光\*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室/  
创新药物非临床药物代谢及PK/PD研究北京市重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 本文研究不同刺激剂在体外对人淋巴细胞活化的影响。采用梯度离心法分离获得人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 血液样本由中国食品药品检定研究院提供, 并通过伦理委员会批准。用CD3/CD28抗体(anti-CD3/CD28 antibody)、植物血凝素(phytohaemagglutinin, PHA)、金黄色葡萄球菌B型肠毒素(*Staphylococcus aureus* enterotoxin B, SEB)、白介素27(interleukin 27, IL27)、佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)+离子霉素(ionomycin)在体外分别刺激24 h, 观察CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>和CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞亚群CD69表达。同时采用CellTiter-Glo发光法和ELISA法检测淋巴细胞增殖和IFN $\gamma$ 的分泌。CD3/CD28抗体、PMA+ionomycin、SEB和IL27作用PBMC 24 h不影响淋巴细胞增殖, 但可以很好地活化CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>和CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞, 表现为CD69的平均荧光强度显著右移, 并促进淋巴细胞IFN $\gamma$ 的分泌。CD3/CD28抗体、PMA+ionomycin、SEB和IL27是T细胞活化的有效刺激剂。

**关键词:** CD69; 干扰素 $\gamma$ ; 淋巴细胞增殖; 淋巴细胞活化

中图分类号: R967 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)10-1863-05

## The effects of different stimulators on the activation of human lymphocytes

YAN Zheng, XUE Ni-na, JI Ming, LAI Fang-fang, CHEN Xiao-guang\*

(State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines/Beijing Key Laboratory of Non-clinical Drug Metabolism and PK/PD Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** The research aims to study the effects of different stimulants on the activation of human lymphocytes. Human peripheral blood mononuclear cells were prepared by density centrifugation. The blood's sample was provided by National Institutes for Food and Drug Control and approved by its Ethics Committee. The expressions of CD69 in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> human T cells were detected by flow cytometry after administrated with CD3/CD28 antibody, phytohaemagglutinin (PHA), *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB), interleukin (IL27) and PMA plus ionomycin for 24 h. The proliferation of lymphocyte was detected by CellTiter-Glo kit. The secreted IFN $\gamma$  in supernatant of medium was examined by ELISA kit. The proliferation of lymphocytes had no change after exposed of CD3/CD28 antibody, SEB, IL27 and PMA plus ionomycin for 24 h. However, the CD69 expressions in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells and IFN $\gamma$  productions were significantly increased by CD3/CD28 antibody, SEB, IL27 and PMA plus ionomycin at 24 h, indicating that CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells were activated under above-mentioned stimulated condition. CD3/CD28 antibody, SEB, IL27 and PMA plus ionomycin were valid stimulants for T cell activation.

收稿日期: 2019-08-22; 修回日期: 2019-09-06.

基金项目: 重大新药创制专项 (2018ZX09711001-003).

\*通讯作者 Tel: 86-10-63165207, E-mail: chxg@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0670

**Key words:** CD69; interferon  $\gamma$ ; lymphocyte proliferation; lymphocyte activation

肿瘤免疫疗法已成为近年来肿瘤治疗的研究热点。该治疗手段主要是提高自身免疫系统肿瘤微环境 (tumours microenvironment, TME) 中肿瘤特异性 T 细胞 (tumour-specific T cell) 的免疫应答来杀伤或抑制肿瘤。其中 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 在 TME 中起着非常重要的作用, 它属于细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTLs), 可特异性识别肿瘤细胞表面抗原, 进而靶向杀伤肿瘤细胞<sup>[1,2]</sup>。而 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 归属于辅助性 T 细胞 (T helper cells, Th), 它通过胞溶机制直接清除肿瘤细胞或间接调节 TME 发挥抗肿瘤作用。此外, Th 辅助细胞可增加 CTLs 的克隆数量, 提高其分泌 IFN $\gamma$  的能力, 增强 CTLs 抑瘤活性<sup>[1,3,4]</sup>。因此, 评价 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞功能在肿瘤免疫治疗分子机制及其药物研发具有重要意义。本实验采用不同的刺激剂 CD3/CD28 抗体、金黄色葡萄球菌 B 型肠毒素 (*Staphylococcus aureus* enterotoxin B, SEB)、白介素 27 (interleukin 27, IL27)、植物血凝素 (phytohemagglutinin, PHA) 和佛波酯+离子霉素 (PMA+ionomycin) 作用于人外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 24 h, 观察 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 和 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞的活化标志物 CD69 的变化以及淋巴细胞增殖和 IFN $\gamma$  分泌能力。一方面综合评价这些生物学指标能否反映 T 功能变化; 另一方面对比这些刺激剂活化 T 细胞的强度, 从而为后续肿瘤免疫研究和药物筛选提供实验依据。

## 材料与方法

**血液样本** 新鲜健康人全血, 由中国食品药品检定研究院提供, 已取得志愿者的知情同意, 并得到中国食品药品检定研究院伦理委员会批准。

**试剂** 人外周血淋巴细胞分离液购于达科为生物技术有限公司。CellTiter-Glo 检测试剂盒购于 Promega 公司, IL27、PHA、SEB、PMA、ionomycin 购于 Sigma 公司。IFN $\gamma$  的 ELISA 试剂盒、CD3/CD28 抗体和 Pcy7 anti-human CD69 抗体购自 Biologend 公司。

**仪器** 美国 BD 公司的 FACSVerse 流式细胞仪, 日本三洋公司的 CO<sub>2</sub> 培养箱, 美国 Sigma 公司冷冻离心机, 美国 Bio-tec 酶标仪。

**人 PBMC 的制备** 取新鲜抗凝人全血至无菌的 50 mL 离心管, 再用等体积的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 稀释全血。在另一离心管中加入一定体积的分离液, 将稀释后的全血小心缓慢地平铺到

分离液面上方, 使两界面保持清晰。淋巴细胞分离液、未稀释全血、PBS 体积比为 1:1:1。于室温并置于水平转子离心机, 800  $\times$ g 离心 25 min。离心结束后, 小心吸取离心管中部致密白色细胞层 (PBMC 层) 移至新的无菌离心管中。用 PBS 稀释到一定体积, 颠倒混匀。于室温水平转子 250  $\times$ g 离心 10 min, 弃上清。重复洗涤 2 次, 进行细胞计数后调整细胞数至  $1 \times 10^6$  个/孔。

**流式细胞术检测不同刺激剂对淋巴细胞的活化作用** 将制备好的 PBMC 接种于 96 孔 U 型板中, 置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中平衡 2 h。加入不同刺激剂, 如抗人 CD3/CD28 抗体 (终质量浓度: 20 和 200 ng $\cdot$ mL<sup>-1</sup>)、SEB (终质量浓度 10 ng $\cdot$ mL<sup>-1</sup>)、PHA (终质量浓度 1  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>)、IL27 (终质量浓度 10 ng $\cdot$ mL<sup>-1</sup>)、PMA + ionomycin 联合刺激 (终质量浓度为 PMA: 10 ng $\cdot$ mL<sup>-1</sup>, ionomycin: 1  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>)。每个剂量组设 3 个平行孔, 置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中继续培养 24 h。离心, 收集细胞上清, 冻于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存。将细胞用预冷 PBS 洗涤 2 次, 加入 Pcy7 anti-human CD69 抗体孵育 30 min, 预冷的 PBS 洗涤 2 次后, 采用流式细胞检测仪 (BD FACS Verse) 检测淋巴细胞 CD69 的表达情况, 并采用 Flowjo 7.6 软件分析淋巴细胞 CD69 的平均荧光强度和 CD69 阳性淋巴细胞百分比。

**CellTiter-Glo 发光法检测淋巴细胞增殖** 将上述处理的细胞重悬, 移取 100  $\mu$ L 细胞悬液至新的 96 孔板中, 加入 100  $\mu$ L CellTiter-Glo 底物, 室温避光 5 min, 于 Bio-tec 酶标仪检测发光值。

**ELISA 试剂盒检测 IFN $\gamma$**  将试剂盒中 Capture antibody 加入 96 孔板中, 4  $^{\circ}$ C 过夜孵育。次日用清洗缓冲液清洗 5 次, 向每孔中加入待测样品及不同浓度的标准品于室温孵育 2 h, 用清洗缓冲液洗 5 次。加入检测抗体于室温孵育 1 h, 清洗缓冲液洗 5 次。加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗室温孵育 30 min。再加入底物 TMB 于室温避光孵育 15 min, 加入硫酸终止, 在酶标仪 450 nm 处检测。

**统计学方法** 采用 GraphPad Prism 统计软件处理, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。P $\leq$ 0.05 为具有统计学意义。

## 结果

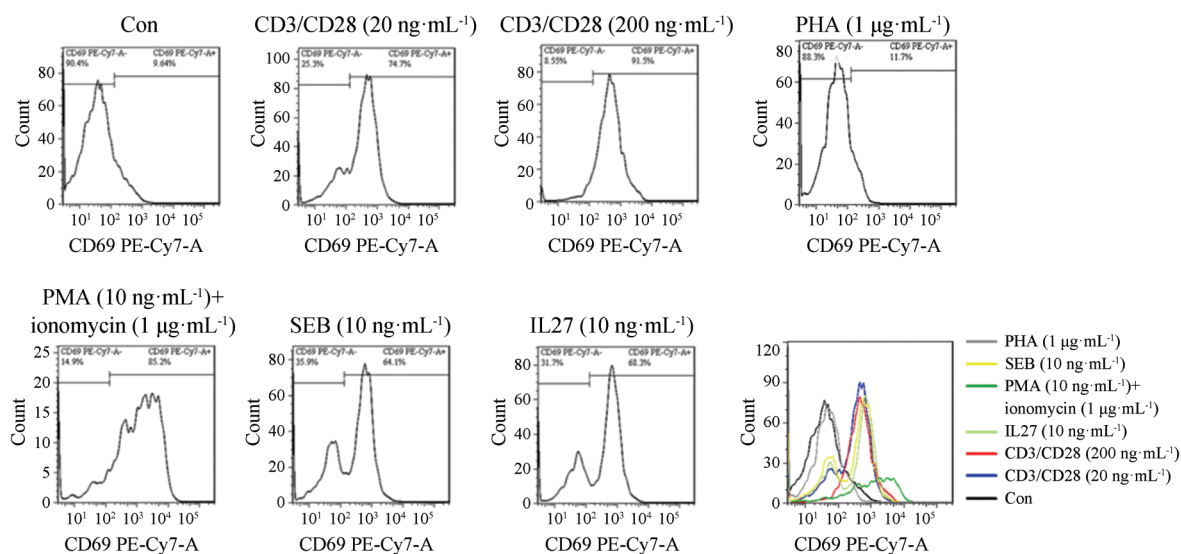
### 1 不同刺激剂对 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 细胞表面的 CD69 蛋白表达情况

采用流式细胞术, 对 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群中的

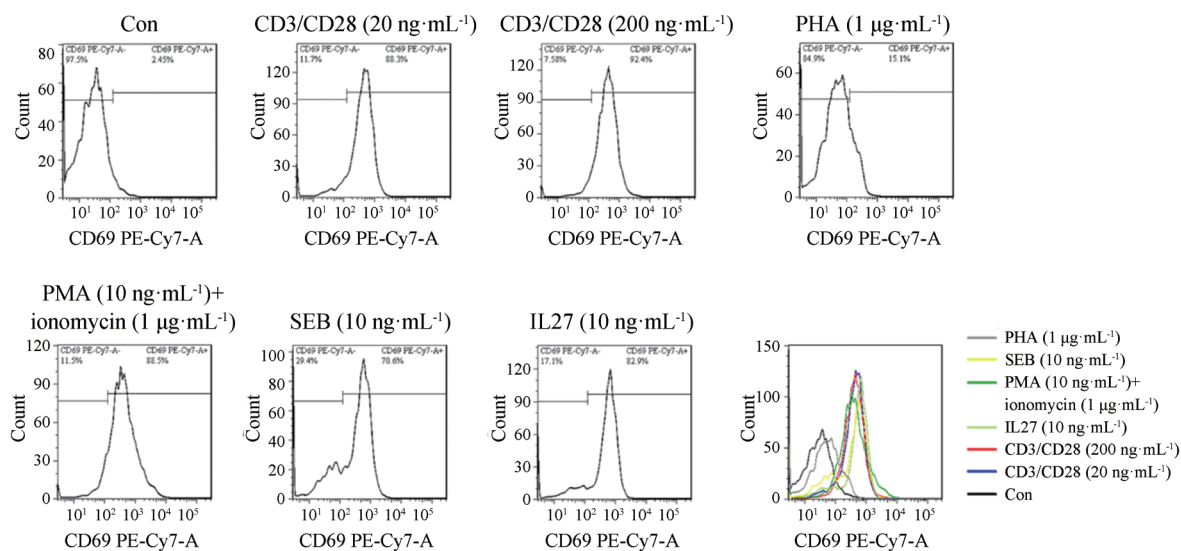
CD69 表达进行检测。如图 1 所示, 静息状态下 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 细胞表面上的 CD69 表达量较低。CD3/CD28 (20 和 200 ng·mL<sup>-1</sup>), PMA (10 ng·mL<sup>-1</sup>)+ionomycin (1 μg·mL<sup>-1</sup>), SEB (10 ng·mL<sup>-1</sup>) 和 IL27 (10 ng·mL<sup>-1</sup>) 均可以显著性促进 CD69 的表达, 表现为 PE-Cy7 通道的平均荧光强度右移。其中 PMA+ionomycin 诱导 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 细胞上 CD69 的表达能力最强, CD3/CD28、SEB 和 IL27 刺激因子诱导 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 细胞上 CD69 的表达能力基本一致。上述这些因子诱导 CD69 高表达的 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 细胞百分比分别为 74.7%、91.5%、85.2%、64.1%、68.3%。而 PHA (1 μg·mL<sup>-1</sup>) 对 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 细胞上 CD69 的表达无诱导作用, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T 细胞百分比基本无影响。

## 2 不同刺激剂对 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞表面的 CD69 蛋白表达情况

本研究也检测了不同刺激因子对 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群中的 CD69 表达的影响。如图 2 所示, 与 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 细胞一致, 在未刺激状态下 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞表面上的 CD69 表达量较低。CD3/CD28 (20 和 200 ng·mL<sup>-1</sup>), PMA (10 ng·mL<sup>-1</sup>)+ionomycin (1 μg·mL<sup>-1</sup>), SEB (10 ng·mL<sup>-1</sup>), IL27 (10 ng·mL<sup>-1</sup>) 和 PHA (1 μg·mL<sup>-1</sup>) 均可以促进 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞 CD69 的表达。其中 CD3/CD28、PMA+ionomycin、SEB 和 IL27 促进 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞 CD69 的表达能力基本一致, 都显著强于 PHA。上述这些因子诱导 CD69 高表达的 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞百分比分别为 88.3%、92.4%、88.5%、



**Figure 1** The effect of different stimulators on the CD69 expression of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T lymphocytes at 24 h by flow cytometry analysis. PHA: Phytohaemagglutinin; SEB: *Staphylococcus aureus* enterotoxin B; IL27: Interleukin 27; PMA: Phorbol myristate acetate



**Figure 2** The effect of different stimulators on the CD69 expression of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T lymphocytes at 24 h by flow cytometry analysis

70.6%、82.9%、15.1%。

### 3 不同刺激剂对淋巴细胞增殖的影响

T细胞增殖对机体的免疫应答起到了重要作用。本研究采用 CellTiter-Glo® 发光法检测了不同刺激剂对淋巴细胞增殖能力的检测。如图3所示, CD3/CD28、PMA+ionomycin、SEB、IL27 和 PHA 作用 24 h 均无明显促进人淋巴细胞增殖的作用。

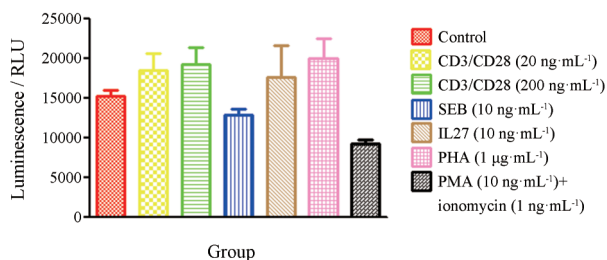


Figure 3 The proliferation of lymphocytes after exposed of different stimulators for 24 h

### 4 不同刺激剂对 T 淋巴细胞分泌 IFN $\gamma$ 的影响

IFN $\gamma$  是 T 淋巴细胞活化的重要标志。采用 ELISA 法检测了不同刺激剂对淋巴细胞分泌 IFN $\gamma$  含量的影响。如图4所示, CD3/CD28 (200 ng·mL<sup>-1</sup>)、PMA (10 ng·mL<sup>-1</sup>) +ionomycin (1 µg·mL<sup>-1</sup>)、SEB (10 ng·mL<sup>-1</sup>)、IL27 (10 ng·mL<sup>-1</sup>) 作用 24 h 显著诱导由淋巴细胞分泌的 IFN $\gamma$ 。其中, PMA+ionomycin 诱导 IFN $\gamma$  分泌的作用最强。

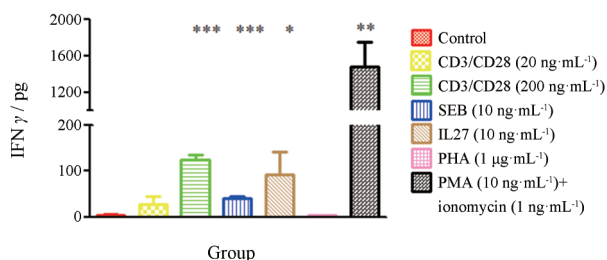


Figure 4 The IFN $\gamma$  levels were detected after exposed of different stimulators for 24 h

### 讨论

T细胞的功能, 主要从T细胞增殖、活化和分泌水平方面进行评价。增殖能力检测常用形态学观察、放射性核素掺入法和MTT法。镜下形态观察效率低且主观影响大; 同位素虽然精确, 但会对环境造成污染; MTT法灵敏度不够, 同时会受到化合物自身的颜色干扰。本研究采用 CellTiter-Glo 发光法检测淋巴细胞的增殖。该方法通过检测 ATP 含量, 可快速灵敏地反映活细胞数量, 成为目前免疫细胞增殖检测的一种常用方法<sup>[5,6]</sup>。活化能力评价的方法有 CFSE 标记检测细胞分

裂<sup>[7]</sup>, ELISA 法检测细胞因子分泌如 IFN $\gamma$ , 流式细胞术检测细胞表面标志物 CD69、CD25 和 HLA-DR 等<sup>[8-10]</sup>。本研究则检测不同功能刺激剂对 T 细胞亚群细胞表面标志物 CD69 表达和 IFN $\gamma$  分泌。其中, CD3/CD28 抗体为体外模拟特异性 T 淋巴细胞活化信号而诱导 T 细胞的增殖<sup>[11]</sup>; PMA 激活 PKC 信号从而使 T 细胞活化增殖<sup>[12]</sup>, ionomycin 为 Ca<sup>2+</sup> 载体并介导 Ca<sup>2+</sup> 的内流<sup>[13]</sup>, 与 PMA 联用进一步增强其激活淋巴细胞的能力; SEB 为超级抗原, 通过 T 细胞受体  $\beta$  (TCR- $\beta$ ) 大量激活 T 细胞<sup>[14]</sup>; PHA 是一种有丝分裂原从而激活淋巴细胞<sup>[7]</sup>; IL27 与其受体相互作用诱导早期 Th1 型反应<sup>[15]</sup>。在本实验所用浓度下的 CD3/CD28 抗体、PMA+ionomycin、SEB 和 IL27 作用刺激 24 h, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞 CD69 的表达显著增高。以上结果提示, CD69 是一个很好的 T 细胞早期活化的标志物, 可同时反映 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 的活化。与此同时, 淋巴细胞分泌的 IFN $\gamma$  含量也显著增高。IFN $\gamma$  是 T 淋巴细胞活化的重要指征之一<sup>[16]</sup>。IFN $\gamma$  最初由机体固有免疫中自然杀伤细胞 (NK) 和自然杀伤 T (NKT) 细胞分泌, 然后被特异性抗原免疫中 Th1 和 CTLs 细胞进一步分泌<sup>[17]</sup>。因此, 应该综合活化标志物 CD69 与 IFN $\gamma$  含量来评价 T 细胞的活化状态。而刺激剂作用 24 h 对淋巴细胞增殖几乎无影响, 提示淋巴细胞在接受刺激后短时间内以活化为主, 随着时间的延长才可能表现出增殖能力增强。

由于小分子化合物体外单独作用不能直接刺激淋巴细胞活化, 因此在体外评价小分子化合物对 T 细胞功能的影响时, 需要模拟肿瘤微环境的抗原呈递细胞 (APCs) 与 T 细胞的相互作用, 或者采用刺激因子先将 T 细胞活化<sup>[18]</sup>。本研究除了发现反映 T 细胞活化的标志物外, 更好地建立了体外活化 T 细胞的方法, 为进一步抗肿瘤免疫小分子药物发现奠定实验基础。

### References

- [1] Borst J, Ahrends T, Babala N, et al. CD4<sup>+</sup> T cell help in cancer immunology and immunotherapy [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18: 635-647.
- [2] Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro JM, et al. Classification of current anticancer immunotherapies [J]. Oncotarget, 2014, 5: 12472-12508.
- [3] Melssen M, Slingluff CL Jr. Vaccines targeting helper T cells for cancer immunotherapy [J]. Curr Opin Immunol, 2017, 47: 85-92.
- [4] Bevan MJ. Helping the CD8<sup>+</sup> T-cell response [J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4: 595-602.
- [5] Mollgard L, Tidefelt U, Sundman-Engberg B, et al. In vitro chemosensitivity testing in acute non lymphocytic leukemia

- using the bioluminescence ATP assay [J]. *Leuk Res*, 2000, 24: 445-452.
- [6] Ishizaka A, Tono-oka T, Matsumoto S. Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP [J]. *J Immunol Methods*, 1984, 72: 127-132.
- [7] Xue NN, Dong K, Lai FF, et al. CFSE-labeled proliferative assays for assessment of T cell function induced by different stimulants [J]. *J Harbin Univ Commerce (Nat Sci Ed)* (哈尔滨商业大学学报 (自然科学版)), 2017, 33: 129-134.
- [8] Rea IM, McNerlan SE, Alexander HD. CD69, CD25, and HLA-DR activation antigen expression on CD3<sup>+</sup> lymphocytes and relationship to serum TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and sIL-2R levels in aging [J]. *Exp Gerontol*, 1999, 34: 79-93.
- [9] Theze J, Alzari PM, Bertoglio J. Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions [J]. *Immunol Today*, 1996, 17: 481-486.
- [10] Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69 [J]. *Stem Cells*, 1994, 12: 456-465.
- [11] Trickett A, Kwan YL. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads [J]. *J Immunol Methods*, 2003, 275: 251-255.
- [12] Seo HH, Lee CY, Lee J, et al. The role of nuclear factor of activated T cells during phorbol myristate acetate-induced cardiac differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7: 90.
- [13] Nakamura S, Nakanishi A, Takazawa M, et al. Ionomycin-induced calcium influx induces neurite degeneration in mouse neuroblastoma cells: analysis of a time-lapse live cell imaging system [J]. *Free Radic Res*, 2016, 50: 1214-1225.
- [14] Xu SX, Kasper KJ, Zeppa JJ, et al. Superantigens modulate bacterial density during *Staphylococcus aureus* nasal colonization [J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7: 1821-1836.
- [15] Carl JW, Bai XF. IL27: its roles in the induction and inhibition of inflammation [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2008, 1: 117-123.
- [16] McNamara MJ, Hilgart-Martiszus I, Barragan Echenique DM, et al. Interferon- $\gamma$  production by peripheral lymphocytes predicts survival of tumor-bearing mice receiving dual PD-1/CTLA-4 blockade [J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4: 650-657.
- [17] Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon- $\gamma$  during innate and adaptive immune responses [J]. *Adv Immunol*, 2007, 96: 41-101.
- [18] Li L, Lai FF, Du TT, et al. Effect of different stimulators on PD-1 and TIM3 expression in lymphocytes [J]. *Chin Med Biotechnol* (中国医药生物技术), 2019, 14: 127-135.