

C57BL/6小鼠肺组织CD103⁺T细胞的免疫学特性

赵怡¹, 曲佳乐², 冯源发², 金晨曦², 黄俊², 谢红艳²

(1. 广州医科大学基础学院 广州霍夫曼免疫研究所, 广州 511436; 2. 广州医科大学基础学院, 广州 511436)

摘要:为了研究正常C57BL/6小鼠肺脏组织中CD103⁺T细胞的数量、表型和功能等免疫学特性,本研究选取C57BL/6小鼠肺脏组织,制备冰冻切片进行免疫荧光染色,可观察到小鼠肺脏组织中CD103的表达及其分布情况;制备单细胞悬液,使用FCM检测肺CD103⁺T细胞的表型特征;用佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)和离子霉素刺激后,检测细胞因子IL-4、IFN- γ 、IL-9的分泌情况。实验结果显示,小鼠肺脏组织中CD103主要在CD8⁺T淋巴细胞中表达,比例高达(51.28±10.37)%。在CD8⁺CD103⁺T细胞中,CD62L的表达率为(79.63±2.87)%,明显高于CD103⁻T细胞(47.83±9.55)%($P < 0.01$);但是CD103⁻T细胞比CD103⁺T细胞表达更高水平的IFN- γ ($P < 0.01$)和IL-9($P < 0.05$)。以上结果表明在C57BL/6小鼠肺脏组织中存在一群表型和功能独立的CD103⁺T细胞。

关键词:肺; T细胞; CD103

中图分类号:R392.9

文献标志码:A

文章编号:1001-2478(2019)02-0139-06

CD103属于整合素家族的一员,是整合素 $\alpha E\beta 7$ 的E链,主要表达于特定的免疫细胞表面,如Treg、上皮内淋巴细胞、DC、肥大细胞等,是屏障组织上皮细胞上表达的E钙黏蛋白的配体,主要参与调控细胞的增殖、分化和迁移,其广泛分布于肠道黏膜、肺、阴道、皮肤、肾脏、淋巴结等组织中^[1-4]。

近期的研究证实CD103也是组织定居记忆性T细胞(tissue-resident memory T cell, TRM)的一个重要标志,主要存在于CD8⁺的T细胞亚群中,不参与体循环,而是长期定居在特定组织中,在局部组织中发挥快速而关键的保护性免疫应答^[5-7]。本研究利用FCM检测小鼠肺组织中CD103⁺T淋巴细胞的数量、表型和功能等,为预防和治疗肺部感染和肿瘤提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 6至8周龄雌性SPF级C57BL/6小鼠,购自广东省中医药大学实验动物中心。

1.1.2 试剂 RPMI 1640培养液、Hank's液,购

自Gibco公司;FCS,购自杭州四季清公司;FITC标记抗小鼠CD3单克隆抗体、PE标记抗小鼠CD103单克隆抗体、Alexa Fluor 647标记抗小鼠CD103单克隆抗体、PerCP-Cy5.5标记抗小鼠CD4单克隆抗体、APC-Cy7标记抗小鼠CD8单克隆抗体、APC标记抗小鼠CD69单克隆抗体、APC标记抗小鼠CD62L单克隆抗体、APC标记抗小鼠IL-4单克隆抗体、APC标记抗小鼠IFN- γ 单克隆抗体、APC标记抗小鼠IL-9单克隆抗体,均购自BD公司。胶原酶IV、DNase I、佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)、离子霉素、布雷菲德菌素A(brefeldin A, BFA),均购自Sigma-Aldrich公司。

1.1.3 实验仪器 使用Leica公司荧光显微镜SP8进行免疫荧光观察;使用Beckman公司流式细胞仪Cytoflex进行流式检测。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 颈椎脱臼处死小鼠。75%酒精消毒腹部,剪开腹部皮肤,暴露腹腔,分离肺脏组织。

1.2.2 肺组织冰冻切片免疫荧光染色 (1)将冰冻组织切片,室温复温1h, PBS溶液洗涤3次,10 min/次。(2)用封闭液将切片封闭,4℃孵育过夜。(3)加CD103单抗(1:50稀释),4℃孵育过夜。(4)将切片浸泡在PBS溶液中洗涤3次,10 min/次。(5)加DAPI(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),室温避光孵育10 min。(6)将切片浸泡在PBS溶液中洗涤

收稿日期:2018-01-09

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81771696);广东省教育厅重大项目(2016KZDXM033)

作者简介:赵怡(1985-),女,硕士生,主要从事免疫研究

通信作者:谢红艳(E-mail: xhyhj1977020@sina.com)

3次, 10 min/次。(7)封片, 荧光显微镜于暗室中观察。

1.2.3 肺脏组织单细胞悬液制备 将分离出的肺脏组织剪碎, 置于5 mL消化液(含2 mg/mL IV型胶原酶和0.1 mg/mL DNase I的RPMI 1640培养液)中, 37 °C孵育30 min。将组织碎块置于200目的筛网中央, 加1 mL Hank's液, 注射器针芯研磨。细胞悬液收集至离心管, 4 °C、600 × g离心5 min。去上清, 10 mL Hank's液重悬细胞, 离心(4 °C、600 × g、5 min)洗涤(Hank's液)细胞2次, 1 mL RPMI 1640培养液重悬细胞, 0.4%锥虫蓝染色, 计数细胞。

1.2.4 细胞培养 取适量肺细胞, 用含5% FBS的RPMI 1640培养液重悬至2 mL, 加入PMA(20 ng/mL)和离子霉素(1 μg/mL)37 °C刺激1 h, 然后加入BFA(1 μg/mL)37 °C刺激4 h, 用于检测IL-4、IFN-γ、IL-9的表达。

1.2.5 FCM检测细胞亚群和细胞因子的表达 将细胞密度调整为1 × 10⁶个/mL, PBS溶液洗涤

2次, 100 μL PBS重悬细胞, 加入不同荧光素标记的抗CD3、CD4、CD8、CD69、CD103、CD62L单克隆抗体, 4 °C避光反应30 min后用PBS洗涤2次。多聚甲醛固定细胞及破膜后, 加入不同荧光素标记的IL-4、IFN-γ、IL-9单克隆抗体, 4 °C避光反应30 min后用PBS洗涤2次, 用200 μL PBS重悬细胞。使用FCM检测, 并用Cell Quest软件分析检测结果。

1.2.6 统计学处理 采用GraphPad Prism version 5.0软件进行统计分析及图表绘制, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 22.0统计学软件进行单因素t检验, 以P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肺脏组织中CD103的表达及分布 分离小鼠肺脏组织, 制备冰冻切片, 通过免疫荧光染色检测CD103在肺组织中的表达情况。免疫荧光结果显示正常小鼠肺脏组织中存在一群CD103⁺细胞(染成红色的部位), 广泛分布于肺脏组织中(图1)。

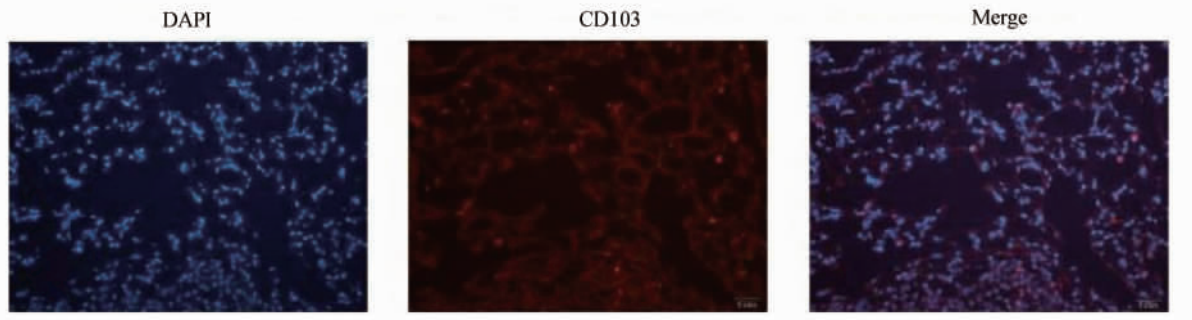


图1 小鼠肺组织CD103免疫荧光染色

2.2 小鼠肺脏组织中T淋巴细胞的比例组成 分离小鼠肺脏组织, 制备单细胞悬液。通过细胞表面染色, 检测CD103在T细胞中的表达情况。结果显示肺脏组织中, CD103的表达占淋巴细胞的比例为(14.63 ± 2.44)%, 占T淋巴细胞的比例为(27.00 ± 5.60)%。在CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞中, CD103的表达分别为(6.07 ± 1.25)%和(51.28 ± 10.37)%(图2)。肺组织中CD8⁺T淋巴细胞CD103的表达明显高于CD4⁺T细胞(P < 0.01)。

2.3 小鼠肺脏组织中CD103⁺T细胞的表型分析 使用细胞表面染色的方法, 检测小鼠肺脏单细胞

悬液中CD103⁺T细胞表面CD69、CD62L的表达情况。结果显示, 在CD4⁺T细胞中, CD103⁺细胞CD69的表达(12.5 ± 1.9)%明显高于CD103⁻细胞(3.57 ± 0.57)%(P < 0.01, 图3a); 而CD62L的表达(31.50 ± 8.39)%明显低于CD103⁻细胞(76.33 ± 4.27)%(P < 0.01, 图3b)。在CD8⁺T细胞中, CD103⁺细胞CD69表达为(3.97 ± 1.68)%, 与CD103⁻细胞(5.30 ± 2.00)%差别不明显(图3a); CD62L的表达为(79.63 ± 2.87)%, 明显高于CD103⁻细胞(47.83 ± 9.55)%(P < 0.01, 图3b)。

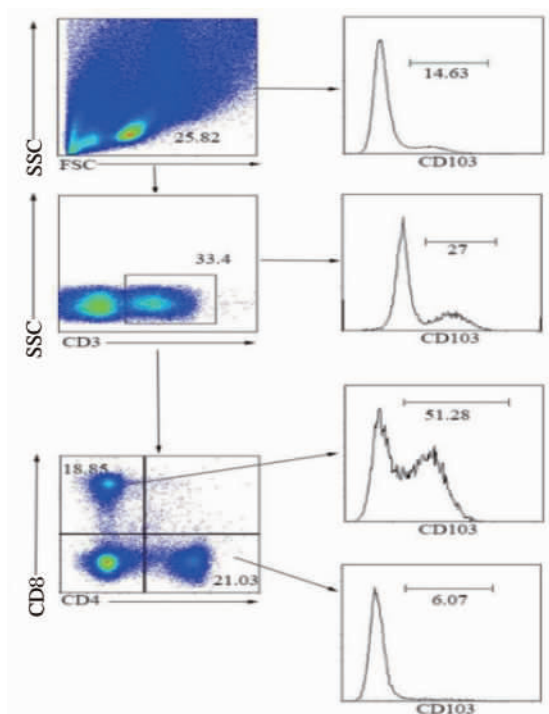


图2 小鼠肺组织T淋巴细胞CD103的表达

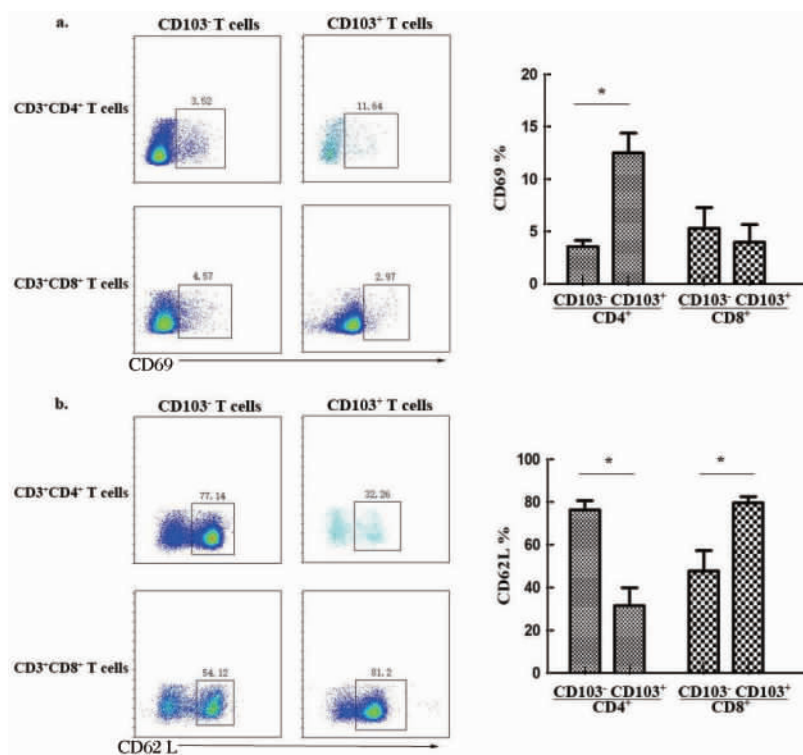


图3 小鼠肺组织CD103[±]T淋巴细胞中CD69和CD62L的表达

注: * P < 0.01

2.4 小鼠肺脏组织中CD103⁺T细胞表达细胞因子分析 使用细胞内细胞因子染色的方法,检测经PMA和离子霉素刺激的小鼠肺脏单细胞中

CD103⁺T细胞细胞因子的分泌情况。结果表明:在CD4⁺T细胞中,CD103⁺细胞IL-4的表达(5.10±2.27)%高于CD103⁻细胞(1.25±0.55)% (图

4a); IFN- γ 的表达(13.61 ± 3.77)% 高于 CD103⁻ 细胞(6.83 ± 0.76)%(图 4b); 而 IL-9 的表达(9.32 ± 0.96)% 明显高于 CD103⁻ 细胞(1.30 ± 0.22)%($P < 0.01$, 图 4c)。在 CD8⁺ T 细胞中, CD103⁺ 细胞 IL-4 表达为(1.11 ± 0.15)% 略低于

CD103⁻ 细胞(1.37 ± 0.33)%(图 4a); IFN- γ 的表达为(9.28 ± 2.33)%, 明显低于 CD103⁻ 细胞(38.47 ± 2.72)%($P < 0.01$, 图 4b); IL-9 的表达(2.08 ± 0.83)% 明显低于 CD103⁻ 细胞(4.74 ± 0.75)%($P < 0.05$, 图 4c)。

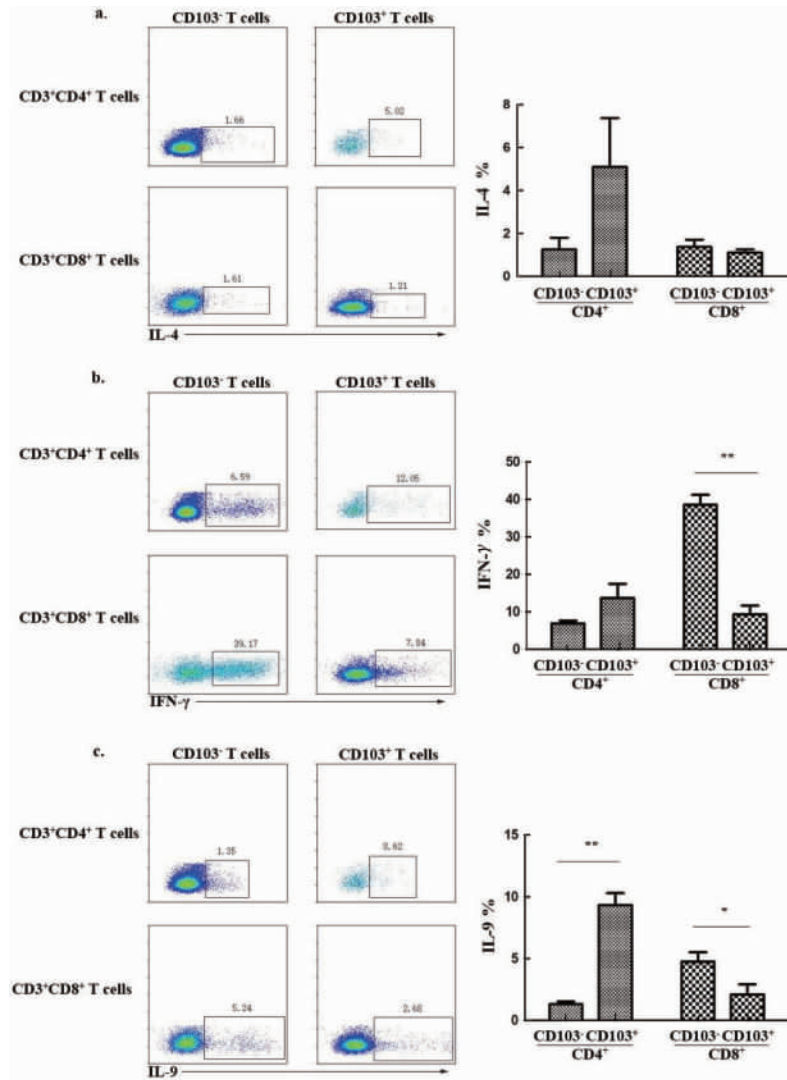


图 4 小鼠肺组织 CD103^{+/−} T 淋巴细胞中细胞因子的表达

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

肺脏是机体的呼吸器官, 含有大量的免疫细胞。T 淋巴细胞是一类重要的免疫细胞, 分为 CD4⁺ Th 和 CD8⁺ Tc, 在感染性疾病、肿瘤、自身免疫性疾病等多种类型疾病中发挥重要作用^[8]。近年来研究表明, CD103 是 TRM 的一个重要标志, 广泛分布在肺脏等组织中。本研究实验结果(图 1, 图 2)表明, 在正常 C57BL/6 小鼠肺脏中, 有

CD103⁺ T 细胞存在, 且 CD103 分子在 CD8⁺ T 细胞中表达的比例要明显高于 CD4⁺ T 细胞($P < 0.01$)。这与康双朋等^[7]发现的 CD103 分子在小鼠子宫和脾脏内 CD4⁺ T 细胞的表达比例高于 CD8⁺ T 细胞不同。与余思菲等^[4]的报道一致, 这可能是肺脏组织的特点, 提示 CD103 分子对正常小鼠肺脏 CD8⁺ T 细胞功能的影响要高于 CD4⁺ T 细胞。

CD62L(血管 L-选择素 CD62)是一个重要的黏附分子, 表达于静止初始 T 细胞、中心型记忆 T 细

胞和一些效应记忆 T 细胞表面,能够调控白细胞向炎症部位的迁移,调控淋巴细胞在血液与淋巴组织之间的循环^[9-10]。记忆性 T 细胞通过表达或不表达 CD62L 来实现在机体外周血和淋巴组织间的循环,分为中央型记忆性 T 细胞和效应型记忆性 T 细胞^[5, 11]。本研究分析了 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞表面 CD103⁺细胞 CD62L 的表达情况。结果(图 3)表明在 CD8⁺T 细胞中,CD103⁺细胞 CD62L 的表达为(79.63 ± 2.87)%,明显高于 CD103⁻细胞(47.83 ± 9.55)%($P < 0.01$),提示 CD62L 和 CD103 的表达密切相关。而在 CD4⁺T 细胞中,CD103⁺的表达要明显低于 CD62L 的表达,且大部分 CD62L⁺细胞不表达 CD103 分子。

过去认为 CD69 是淋巴细胞活化后最早表达的膜表面分子,它可以传递活化信号,反映细胞的活化状态和功能^[12]。目前研究认为 CD69 分子和 CD103 一样,也是 TRM 的一个标志物^[13-14]。本研究分析了 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞表面 CD103⁺细胞 CD69 的表达情况。结果(图 3)表明,正常小鼠肺脏组织中,CD4⁺Th 和 CD8⁺Tc 表面 CD69 的表达不高(< 5%),且在 CD103 分子明显表达的 CD8⁺T 细胞中,CD69 的表达率约为 1%。这也提示 CD69 和 CD103 分子可能表达于不同类型 CD8⁺T 细胞表面。IFN- γ 、IL-4 和 IL-9 是体内具有免疫调节作用的重要的细胞因子^[15]。根据 IFN- γ 、IL-4 和 IL-9 等细胞因子的表达情况,CD4⁺T 细胞可以分为 Th1, Th2, Th9, Treg 和 Th17 5 个亚群^[16-17]。本研究进一步比较了经 PMA 和离子霉素刺激后,在 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞中,CD103⁺细胞 IFN- γ 、IL-4 和 IL-9 的分泌能力。结果(图 4)显示在肺组织中 IFN- γ 、IL-4 和 IL-9 大多为 CD103⁻T 细胞分泌产生。一般认为,记忆性 T 细胞再次遇到抗原刺激以后能够迅速地活化,并通过分泌细胞因子,发挥生物学作用^[18]。而本结果中 CD103⁻细胞分泌细胞因子的能力更强,可能与研究者使用的非特异性刺激剂并不是通过 T 细胞受体激活 T 细胞有关,或者 CD103⁻细胞中含有一群细胞因子分泌能力更强的效应性细胞,其具体机制需要进一步的研究。

参考文献

[1] Berthelot JM, Le Goff B, Martin J, *et al.* Essential role for

- CD103⁺ cells in the pathogenesis of spondyloarthritides[J]. *Jt Bone Spine*, 2015, 82(1): 8-12.
- [2] 郝志敏, 栾超, 胡煜, 等. CD103⁺T 细胞在银屑病皮损中的表达[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2016, 32(2): 70-72.
- [3] Hadley GA, Higgins JM. Integrin $\alpha E\beta 7$: molecular features and functional significance in the immune system[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 819: 97-110.
- [4] 余思菲, 吴长有. 组织定居记忆性 T 细胞的免疫学特征研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(7): 1093-1100.
- [5] Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR, *et al.* Memory T cell subsets, migration patterns and tissue residence[J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 137-161.
- [6] Carbone FR, Mackay LK, Heath WR, *et al.* Distinct resident and recirculating memory T cell subsets in non-lymphoid tissue[J]. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25(3): 329-333.
- [7] 康双朋, 吴琼丽, 吴长有. 子宫组织定居记忆 T 细胞的免疫学特征[J]. *免疫学杂志*, 2017, 33(11): 937-942.
- [8] 李艳春, 赵丽娜, 张献宇, 等. 小鼠脾脏淋巴细胞体外培养前后细胞表面标记物 CD3、CD4、CD44、CD62L 的变化[J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(11): 1607-1609.
- [9] Spadaro M, Caldano M, Marnetto F, *et al.* Natalizumab treatment reduces L-selectin (CD62L) in CD4⁺T cells[J]. *J Neuroinflamm*, 2015, 12: 146.
- [10] Trinité B, Chan CN, Lee CS, *et al.* Suppression of foxo1 activity and down-modulation of CD62L (L-Selectin) in HIV-1 infected resting CD4 T cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110719.
- [11] 吴长有. 初始和记忆 T 细胞的研究进展[J]. *现代免疫学*, 2005, 25(5): 353-356.
- [12] 麦璟莹, 查贺飞, 曲佳乐, 等. 日本血吸虫感染的小鼠肠系膜淋巴结 $\gamma\delta$ T 细胞、NK 细胞和 NKT 细胞表型的变化[J]. *现代免疫学*, 2017, 37(1): 32-37.
- [13] Mueller SN, Mackay LK. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence[J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(2): 79-89.
- [14] Schenkel JM, Masopust D. Tissue-resident memory T cells[J]. *Immunity*, 2014, 41(6): 886-897.
- [15] 薛涛. Th1/Th2 型细胞因子及免疫状态在支气管哮喘患儿治疗前后的变化[J]. *中国医药导报*, 2013, 10(33): 81-83.
- [16] 牛磊, 蒋瑾瑾. Th1/Th2、Th17/Treg 平衡与幼年特发性关节炎[J]. *临床儿科杂志*, 2010, 28(11): 1095-1098.
- [17] 田洁, 王胜军, 许化溪. Th9 细胞: 一种新型效应性 CD4⁺T 细胞亚群[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(09): 853-855.
- [18] Cuddapah S, Barski A, Zhao K. Epigenomics of T cell activation, differentiation, and memory[J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(3): 341-347.

Immunological characteristics of CD103⁺ T cells in the lung tissues of C57BL/6 mice

ZHAO Yi¹, QU Jia-le², FENG Yuan-fa², JIN Chen-xi², HUANG Jun², XIE Hong-yan² (1. *Sino-French Hoffmann Institute, School of Basic Medical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511463, China*; 2. *School of Basic Medical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511463, China*)

Abstract: We aimed to explore the immunological characteristics including distribution, phenotype and function of CD103⁺ T cells in the lung tissues of C57BL/6 mice. C57BL/6 mice lung tissues were removed and frozen sections were prepared for immunofluorescence staining. The expression and distribution of CD103 were detected in lung tissues. Single cell suspension was prepared and flow cytometry was used to detect the phenotypic characteristics of CD103⁺ T cells and the expressions of cytokines IL-4, IFN- γ , IL-9 in the lung tissues after the stimulation with irritant. Data showed that CD103 in the lung tissues was mainly expressed in CD8⁺ T lymphocytes, the proportion was as high as (51.28 \pm 10.37)%. In CD8⁺ CD103⁺ T cells, the expression of CD62L was (79.63 \pm 2.87)%, which was significantly higher than in CD103⁻ cells [(47.83 \pm 9.55)%, $P < 0.01$]. However, CD103⁻ T cells expressed higher levels of IFN- γ and IL-9 than CD103⁺ T cells ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Our findings suggest that a population of phenotypically and functionally independent CD103⁺ T cells exist in the lung tissues of C57BL/6 mice.

Key words: lung; T cell; CD103

(上接第 114 页)

Expression of PD-1, CTLA-4 and MMP9 on exosomes in patients with breast cancer with or without lymph node metastasis

WANG Ai-hong¹, ZHAO Ju-mei¹, WANG Ming-quan² (1. *Medical School of Yan'an University, Yan'an 716000, China*; 2. *Department of Interrelation Radiology, Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an 716000, China*)

Abstract: To investigate the expression of PD-1, CTLA-4 and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) on exosomes of breast cancer patients with or without lymph node metastasis, hospitalized female breast cancer patients were collected and divided into control group (without lymph node metastasis) and metastasis group (with lymph node metastasis). And healthy women served as healthy controls. The expression of PD-1, CTLA-4 and MMP9 in the breast tissues was detected by immunohistochemistry. The exosomes in peripheral blood was separated and the expression of PD-1, CTLA-4 and MMP9 was detected by flow cytometry. The results showed that the optical densities of PD-1 and CTLA-4 in breast cancer tissues of the control group were 63.5 \pm 6.9 and 56.4 \pm 6.2 respectively, and those in the metastasis group were 79.2 \pm 12.8 and 71.1 \pm 12.1 respectively ($P > 0.05$). The optical density of MMP9 in the control group was 98.4 \pm 10.7 and that in the metastasis group was 153.1 \pm 16.8 ($P = 0.013$). The results of flow cytometry showed that the proportions of PD-1⁺ exosomes in the control group and the metastasis group were (0.782 \pm 0.090)% and (0.816 \pm 0.011)% respectively, which were significantly higher than that in the healthy group [(0.269 \pm 0.049)%, $P < 0.001$]. The proportions of CTLA-4⁺ exosomes in both control group and metastasis group were (3.995 \pm 0.233)% and (4.122 \pm 0.197)% respectively, which were significantly higher than that in the healthy group [(2.310 \pm 0.200)%, $P < 0.001$]. There was no significant difference between the control group and the metastasis group in PD-1⁺ and CTLA-4⁺ exosomes ($P > 0.05$). The proportion of MMP9⁺ exosomes in the healthy group was (0.515 \pm 0.083)%, whereas those in the control group and the metastasis group were (0.874 \pm 0.083)% and (1.290 \pm 0.108)% respectively. Compared with the healthy group, there were significant differences ($P < 0.05$). The proportion of MMP9⁺ exosomes in the metastasis group was significantly higher than that in the control group ($P = 0.006$). These results indicate that the expression of PD-1 and CTLA-4 on exosomes could be used for early diagnosis of breast cancer and the expression of MMP9 on exosomes could be used as an effective target for early warning and postoperative monitoring of breast cancer metastasis.

Key words: breast cancer; exosomes; metastasis; programmed death-1; cytotoxic T lymphocyte antigen 4; matrix metalloproteinase