

技术前沿

DOI: 10.11699/cyxb20131203

人外周血滤泡辅助 T 细胞的分选鉴定与功能检测

刘 頔, 宋小飞, 胡婷婷, 雷 宇, 胡怀东, 胡 鹏, 任 红

(重庆医科大学附属第二医院感染科、重庆医科大学病毒性肝炎研究所, 重庆 400010)

【摘要】目的:探索分选、鉴定和检测人外周血滤泡辅助 T 细胞(T follicular helper cells, Tfh)功能的方法。**方法:**使用密度梯度离心(density gradient centrifugation, DGC)、免疫磁珠分选(magnetic-activated cell sorting, MACS)和流式细胞仪(flow cytometry, FCM)分选法来分选人外周血 Tfh 细胞,分选后使用 FCM 检测细胞纯度和活性,实时荧光定量 PCR 检测细胞群的特异性转录因子 B 细胞淋巴瘤因子(B-cell lymphoma, Bcl)-6 mRNA 的表达,激光共聚焦显微镜观察细胞形态和表面分子 CD4、CXCR5 的表达及定位,鉴定后使用 FCM 进行功能检测。**结果:**①FCM 检测经分选后 Tfh 细胞纯度达 $(87.69 \pm 5.01)\%$,活性达 $(98.21 \pm 0.85)\%$,纯度和分选前有显著提高($P < 0.05$)。②实时定量 PCR 检测分选后的 Tfh 细胞群的 Bcl-6 mRNA 相对表达量显著高于分选前($P < 0.05$),分选后的 Tfh 细胞群具有高纯度。③激光共聚焦显微镜观察到分选后的 Tfh 细胞形态完整,CD4 及 CXCR5 的荧光表达于细胞膜并可以融合。④FCM 可检测分选鉴定后 Tfh 细胞功能相关的表面分子 PD-1、ICOS、CD40L 的表达。**结论:**采用 DGC+MACS+FCM,经鉴定可以得到纯度高、活性好的 Tfh 细胞,并可以开展其功能检测。

【关键词】滤泡辅助 T 细胞;细胞分选;细胞鉴定;细胞功能检测

【中国图书分类号】R331

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-11-22

Isolation and detection of T follicular helper cells in human peripheral blood

LIU Di, SONG Xiaofei, HU Tingting, LEI Yu, HU Huaidong, HU Peng, REN Hong

(Department of Infectious Disease, the Second Affiliated Hospital, Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore a method to isolate and detect T follicular helper (Tfh) cells. **Methods:** Tfh cell in human peripheral blood was isolated by density gradient centrifugation (DGC) plus magnetic-activated cell sorting (MACS) plus flow cytometric sorting (FCS). Cell purity and cell activity were detected by flow cytometry (FCM); relative expressions of Bcl6 mRNA by real-time PCR; expressions, location and morphology of cell surface molecules CD4 and CXCR5 by confocal laser scanning microscopy, function by FCM. **Results:** ①After sorting, purity of Tfh cell ($87.69 \pm 5.01\%$), was significantly enhanced before sorting ($P < 0.05$) and cell activity was ($98.21 \pm 0.85\%$). ②Expressions of special transcription factor of Tfh cells-Bcl6 were significantly increased after sorting compared with those before sorting ($P < 0.05$); after sorting, the purity of the cell was high. ③Morphology of Tfh cell was complete; green fluorescence of CD4 and CXCR5 was expressed in cell membrane and can be fused. ④Expressions of Tfh cell function related cell surface molecules PD-1, ICOS and CD40L can be detected by FCM. **Conclusions:** Tfh cell with high purity and activity can be sorted through ways of density gradient centrifugation plus MACS plus FCM, then the function of them can be tested by FCM.

【Key words】 T follicular helper cells; cell sorting; cell identification; cell function test

滤泡辅助 T 细胞(T follicular helper cells, Tfh)是目前基础免疫学的研究热点,最初由 Schaerli 等^[1]在 2000 年报道,这群细胞在其特异性转录因子 B 细

胞淋巴瘤因子(B-cell lymphoma, Bcl)-6 的作用下^[2],从原始 Th 细胞分化而成,并且持续高表达表面分子 CXCR5,与 B 细胞在淋巴滤泡相遇并相互作用,促进 B 细胞的大量增殖分化和产生记忆 B 细胞及浆细胞,并且进一步辅助免疫球蛋白的型别转换。对于 Tfh 细胞的功能检测及其与 B 细胞之间相互作用的验证,是研究体液免疫的重要突破口。如何获取高纯度和高活性的 Tfh 细胞是实验所需解决的第 1 步。目前尚未有文献系统报道过分离、纯化与

作者介绍:刘 頔, Email: drugstore1987414@sina.cn,

研究方向:慢性乙型肝炎临床与基础。

通信作者:任 红, Email: renhong0531@vip.sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:0318,30930082);国家科技重大专项资助项目(编号:2008ZX10002-006、2012ZX10002007);重庆市科委资助项目(编号:CSTC2012gg-yyjsB10007)。

鉴定 Tfh 细胞的方法,本实验旨在利用目前常用的细胞分离和鉴定的方法来得到所需的 Tfh 细胞,再进行功能检测。经实践证明,采用密度梯度离心法(density gradient centrifugation, DGC)分离外周血中的单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),再经免疫磁珠法和流式细胞仪分选法来进行细胞亚群的进一步纯化,可以得到高纯度和高活性的 Tfh 细胞。分选后的细胞经流式细胞仪(flow cytometry, FCM)可测其细胞纯度和细胞活性,共聚焦显微镜可测其特异性表面分子的荧光表达及定位,实时定量 PCR 可测其细胞的特异性转录因子 Bcl-6 mRNA 的表达情况,并且可测得其功能相关的细胞表面分子 PD-1、ICOS、CD40L 的表达情况。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

标本采集自本实验室健康志愿者[男性 6 人,女性 10 人,平均年龄(27.60 ± 4.31)岁],分别抽取外周静脉血 15 ml,肝素抗凝混匀后待用。淋巴细胞分离液购自 TBD 公司, FITC-mouse anti human-CD4、ALEX647-mouse anti human-CXCR5、PE-mouse anti human-PD1、PE-mouse anti human-ICOS、PE-mouse anti human-CD40L、FITC-mouse IgG1, κ isotype control、ALEX647-mouse IgG1, κ isotype control、PE-mouse IgG1, κ isotype control、CXCR5-biotin、FACS buffer 均购自 BD 公司, CD4⁺T Cell Isolation Kit、Anti-Biotin Microbeads、MACS buffer、磁力架、磁铁块、分选柱均购自美天旎公司, FACS Aria 购自 BD 公司, D-hank's 液、PBS、1%PFA、50%甘油为本实验室自配。

1.2 实验方法

1.2.1 DGC 分离 PBMC 取外周静脉抗凝血 15 ml,加入等量 D-hank's 液稀释混匀;将稀释液缓慢加入 15 ml 淋巴细胞分离液中, 2 000 r/min 离心 20 min 后,吸取中间白膜层;加入 5 ml D-hank's 液洗涤, 1 500 r/min 离心 5 min 后弃上清,所得细胞为 PBMC。采用细胞计数板进行计数,留取部分样品待 FCM 检测 Tfh 细胞的表达,实时定量 PCR 检测 Bcl-6 mRNA 的表达。

1.2.2 免疫磁珠分选(magnetic-activated cell sorting, MACS)分选 CD4⁺T 细胞 取 DGC 所制得的 PBMC,用 40 μ l MACS 缓冲液重悬每 10^7 个细胞,加入 10 μ l CD4⁺T cell Biotin-Antibody Cocktail 每 10^7 个细胞,避光孵育 5 min(2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C),加入 1 ml MACS 缓冲液洗涤, 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清; 30 μ l MACS 缓冲液重悬每 10^7 个细胞,加入 20 μ l CD4⁺T cell Microbead Cocktail 每 10^7 个细胞,避光孵育 10 min(2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C),加入 1 ml MACS 缓冲液洗涤, 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清;将分选柱、磁铁块和磁力架置好,用 500 μ l MACS 缓冲液润柱, 500 μ l MACS 缓冲液重悬细胞;按照细胞数来选择分选柱(本实验中选用 MS 柱);将细胞悬液过柱,收集流

出液;用 500 μ l MACS 缓冲液洗柱 3 次,收集流出液;收集 4 次所得的细胞悬液, 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,所得细胞为 CD4⁺T 细胞。留取部分样品待 FCM 检测 CD4⁺T 细胞的分选纯度,real-time PCR 检测其中 Bcl-6 mRNA 的表达。

1.2.3 FCM 分选 Tfh 细胞 收集分选柱流出的液体, 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清;加入 FITC-mouse anti human-CD4、ALEX647-mouse anti human-CXCR5,避光孵育 30 min(2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C);加入 1 ml FACS 缓冲液洗涤, 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清;用 200 μ l FACS 缓冲液重悬细胞,转移到无菌的 FCM 上样管中;开启流式细胞仪 FACS Aria,调校到最佳工作条件,以 CD4 和 CXCR5 双阳性设门进行分选;收集液为含 30%FCS 的 PBS;20 min 左右收集完 10^6 个细胞,留取部分收集液检测 Tfh 细胞分选纯度,以及实时定量 PCR 检测其中 Bcl-6 mRNA 的表达。

1.2.4 FCM 检测 Tfh 细胞纯度与活性 在上述步骤中所留取检测的细胞悬液中,加入 FITC-mouse anti-human CD4、ALEX647-mouse anti-human CXCR5 各 3 μ l, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 0.5 h 后,用 FACS 缓冲液洗去未结合的抗体,离心 1 500 r/min 后弃去上清, 200 μ l PBS 重悬细胞后转移至流式上样管待测。

1.2.5 Real-time PCR 检测 取上述步骤中所留取检测的细胞悬液,调整细胞浓度到 10^5 个/ml。采取 Trizol 抽提每组细胞总 RNA,并且在 PCR 仪上进行反转录。根据 Primer 6.0 软件设计人 Bcl-6 和内参照 GAPDH,由上海生工生物工程股份有限公司合成,序列如下:人 Bcl-6 引物:上游引物为 5'-TGTTGGCTTTGAGGGCTTTTGTT-3',下游引物为 5'-TC-AAAACCTGGTGTCCGGCCTT;人 GAPDH 引物:上游引物为 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGA-3';下游引物为 5'-CC-TGGAAGATGGTGATGGGAT-3'。每组 cDNA 分别加入 real-time PCR 反应液进行扩增,按照反应结束后确认 real-time PCR 的扩增曲线和融解曲线。因目的基因与内参基因引物扩增效率相同,大于 95%。实验数据分析可以采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法。

1.2.6 激光共聚焦显微镜检测 收集 FCM 所分选出的 Tfh 细胞,离心后弃去上清。加入 FITC-mouse anti-human CD4、ALEX647-mouse anti-human CXCR5 各 20 μ l, 4 $^{\circ}$ C 避光过夜孵育,用 FACS 缓冲液洗去未结合的抗体,用 1%PFA 固定细胞 20 min,洗涤后将细胞悬液滴在载玻片上, 50%甘油封片。然后置于激光共聚焦显微镜下检测。

1.2.7 FCM 检测所得 Tfh 细胞的功能相关表面分子 将上述方法分离和鉴定得到 16 例正常 Tfh 细胞各分为 3 管,每管分别加入 5 μ l PE-mouse anti human-PD1、PE-mouse anti human-ICOS、PE-mouse anti human-CD40L,并设置同型对照管加入 5 μ l PE-mouse IgG1, κ isotype control 以及空白管。4 $^{\circ}$ C 避光孵育 40 min 后,用 FACS 缓冲液洗去未结合的抗体,离心 1 500 r/min 后弃去上清, 200 μ l PBS 重悬细胞后转移至流式上样管待测。

1.3 数据处理及统计分析

所有数据均采用 SPSS 18.0 统计软件进行整理和分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,组内处理前后的比较采用配对 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 FCM 检测细胞纯度和鉴定细胞活力

用 FCM 来检测 Tfh 细胞在全血中的比例以及富集和分选后的纯度。用荧光染料 PI-Pecy5 染死细胞来检测细胞的活性。未经分选的细胞群(PBMC 细胞群)中 Tfh 细胞的比例约为 $(8.83 \pm 3.72)\%$ 。首先使用磁珠富集 $CD4^+T$ 细胞,经磁珠富集后的细胞群($CD4^+T$ 细胞群)中 Tfh 细胞纯度可达到约 $(25.83 \pm 5.63)\%$, 纯度相比未处理前有显著提高 ($t=10.602, P=0.000$);再使用 FCM 进行 $CD4^+CXCR5^+T$ 细胞的分选,经分选完成后的细胞群(Tfh 细胞群)中纯度可达 $(87.69 \pm 5.01)\%$ 左右,与仅富集后的细胞群相比,Tfh 细胞的纯度有显著的提高($t=32.269, P=0.000$)。通过以上 2 步得到了高纯度的 Tfh 细胞。并且通过 PI 检测细胞活性发现,MACS 和 FCM 对细胞活性的影响小,经分选后的细胞活性可达到 $(98.21 \pm 0.85)\%$, 仍可进行后续功能实验。见图 1。

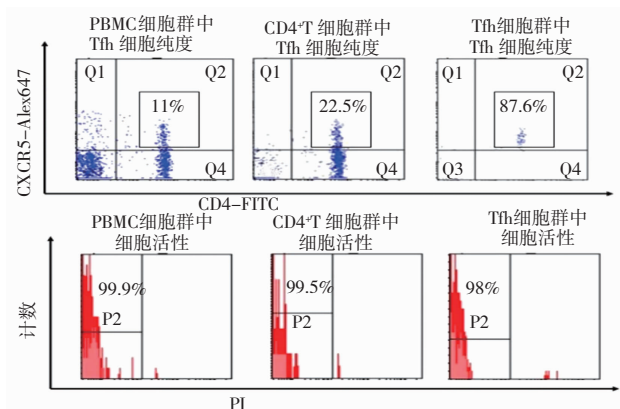


图 1 FCM 检测的细胞分选后纯度和分选后的活性

Fig.1 Cell purity and cell viability detected by FCM after cell sorting

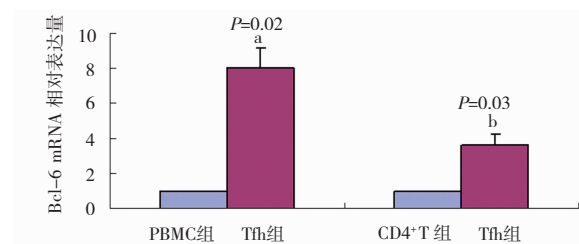
2.2 Real-time PCR 检测单个核细胞群、 $CD4^+T$ 细胞群、Tfh 细胞群的 Bcl-6 mRNA 的表达

使用 real-time PCR 检测未经分选的细胞群(PBMC 群)、经磁珠富集后的细胞群($CD4^+T$ 细胞群)、经分选完成的细胞群(Tfh 细胞群)中的 Bcl-6 mRNA 的相对表达量,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行分析比较。发现 Tfh 细胞群的 Bcl-6 mRNA 相对表达量显著高于 PBMC 细胞群($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值为 8:1, $P<0.05$);同时,Tfh 细胞群的 Bcl-6 mRNA 相对表达量也明显高于 $CD4^+T$ 细胞群($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值为 3.6:1, $P<0.05$)。由于 Bcl-6 是 Tfh 细胞特异性的转录因子,能间接反映 Tfh 细胞的表达水平,所以可知经分选完成后的细胞群中 Tfh 纯度较高。见图 2。

2.3 激光共聚焦显微镜检测细胞形态和特异性表面分子的荧光表达和定位

在分选得到 Tfh 细胞后,用 FITC-mouse anti-human CD4、ALEX647-mouse anti-human CXCR5 分别标记的 Tfh 细胞表面的 CD4 分子和 CXCR5 分子,利用激光共聚焦显微镜来观察它们在细胞上的表达和定位情况。将分选后的细胞置于 488 nm 和 647 nm 的激发光下,可观测到显微镜视野下绝大多数的细胞表面可同时表达绿色荧光和红色荧光,并且 2 种

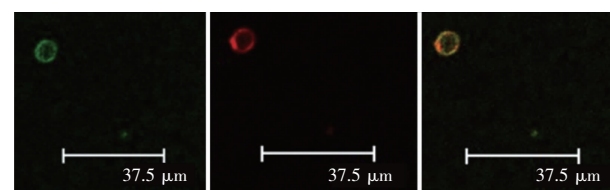
荧光可以融合。这种同时表达 2 种荧光的细胞便是分选所得的 Tfh 细胞。见图 3。



a: Tfh 组 Bcl-6 mRNA 的相对表达量明显高于 PBMC 组, 差异有统计学意义;
b: Tfh 组的 Bcl-6 mRNA 的相对表达量明显高于 $CD4^+T$ 组, 差异有统计学意义

图 2 Bcl-6 mRNA 在 PBMC 细胞群、 $CD4^+T$ 细胞群和 Tfh 细胞群中的相对表达量

Fig.2 Relative expressions of Bcl-6 mRNA among PBMC group, $CD4^+T$ group and Tfh group



A. 在 488 nm 的激发光下细胞膜表达绿色荧光
B. 在 647 nm 的激发光下细胞膜表面表达红色荧光
C. A 图与 B 图融合后的照片

图 3 激光共聚焦检测 Tfh 细胞形态和特异性表面分子的荧光表达和定位 (800 ×)

Fig.3 Location and morphology of cell surface molecules by confocal laser scanning microscopy (800 ×)

2.4 FCM 检测所得 Tfh 细胞的功能相关表面分子

通过测定 Tfh 细胞的表面分子 PD-1、ICOS、CD40L 的表达来检测其功能。检测 16 例正常人的外周血中的 Tfh 细胞,发现上 PD-1 的表达频数约为 $(15.52 \pm 7.45)\%$, ICOS 表达频数约为 $(14.47 \pm 3.06)\%$, CD40L 表达频数约为 $(15.28 \pm 4.46)\%$ 。这些表面分子的表达频数反映出了 Tfh 细胞的功能状态。见图 4。

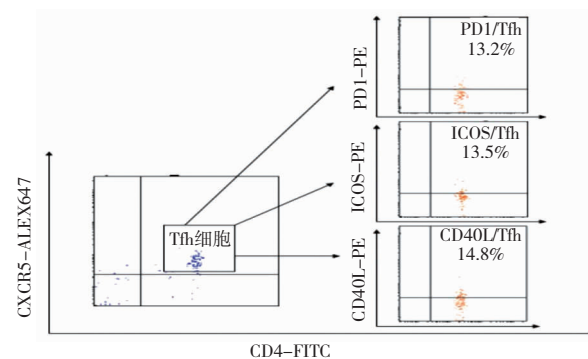


图 4 FCM 检测所得的 Tfh 细胞的表面分子 PD-1、ICOS、CD40L 的表达

Fig.4 Expressions of Tfh cell surface molecule PD-1, ICOS and CD40L detected by FCM

3 讨 论

Tfh 细胞作为一种新近发现的免疫细胞,引起了广泛的关注。传统认知中的 Th2 细胞不再是参与辅助体液免疫的唯一细胞,越来越多的研究证明,Tfh 细胞才是辅助 B 细胞产生对 T 细胞依赖抗原应答中的主要承担者。在滤泡基质细胞分泌的 CXCL13 的募集下,持续表达 CXCR5 的 Tfh 细胞迁徙到淋巴滤泡中。同时,由于原始 B 细胞表面也高表达 CXCR5 分子,同样在 CXCL13 的募集作用下,迁徙到淋巴滤泡中,与 Tfh 细胞在此共同定位,并且相互作用,产生生发中心^[3]。在生发中心中,Tfh 细胞与 B 细胞表面共刺激分子对 PD1/PDL1、ICOS/ICOSL、CD40L/CD40 的结合,大量分泌细胞因子 IL-21,促进 B 细胞的增殖、分化,产生大量的记忆 B 细胞和浆细胞,并且进一步辅助免疫球蛋白类别的转换^[4-5]。最初发现的 Tfh 细胞存在于淋巴滤泡中,后来研究发现外周循环血中高表达 CXCR5 分子的 Th 细胞也有相同的功能,被认为是循环 Tfh 细胞^[6-7]。在许多实验中,由于淋巴结的标本采集困难,可以通过检测外周血中的循环 Tfh 细胞的功能来反映淋巴滤泡 Tfh 细胞的状态,这也是本实验选择分离、纯化和鉴定外周血中的 Tfh 细胞来代替淋巴滤泡 Tfh 细胞的依据。

在不断的研究中,人们发现 Tfh 细胞的分化和发展的异常,都可能导致体液免疫的紊乱,从而引起自身免疫性疾病、免疫缺陷疾病及肿瘤的发生^[8]。Simpson 等^[9]曾发现在系统性红斑狼疮患者的外周血中 Tfh 细胞比例显著高于正常人,推测系统性红斑狼疮的发病与 Tfh 细胞的过度生成引起自身反应性 B 细胞功能活跃有关。而 Ogehang 等^[10]发现在类风湿关节炎患者中,血管内皮细胞和关节滑膜细胞产生的 CXCL13 增高,募集大量的 Tfh 细胞和 B 细胞,在关节滑膜处形成病理性的生发中心,从而引起炎症损伤。另外,研究也发现 X 连锁高 IgM 血症^[11]、X-连锁淋巴组织增生^[12]、血管免疫母细胞性 T 细胞淋巴瘤^[13]等疾病也和体内 Tfh 细胞功能异常关系密切。Tfh 细胞的表面分子和其功能密切相关。PD-1 是存在于 Tfh 细胞表面的负性调节分子,起着介导细胞凋亡的作用;ICOS 是 Tfh 细胞表面的可诱导协同刺激分子,可以为 Tfh 细胞的活化提供第 2 信号分子,ICOS-ICOSL 受体配体反应信号对 Tfh 的发育和功能至关重要;CD40L 在 T-B 细胞接触中起着重要作用,通过 CD40L-CD40 分子对的结合,才能产生 B 细胞增殖、分化和维持生发中心的信号。这些表面分子的异常,会造成 Tfh 细胞生存和发育的异常,从

而引起免疫相关的疾病。而对于这些表面分子的检查与监测,不仅可以反映出机体内 Tfh 细胞的功能,而且还对疾病的发生与发展起着极大的预警作用。可以通过检测这些功能分子来预估患者的病情,相信在不久的将来,以这些功能分子作为靶点来攻克免疫相关性疾病的方法都会应运而生。

本实验所得的 Tfh 细胞不仅可进行表面分子的功能检测,也可以广泛的运用于细胞培养之中。目前关于 Tfh 细胞的许多热点假说的验证,都有赖于得到高纯度活性好的 Tfh 细胞。目前认为 Th 细胞亚群之间有相互转换的潜能,Oestreich 等^[14]提出在高 IL-2 信号的情况下会抑制 Th1 向 Tfh 极化的潜能,可以通过改变 Th1 细胞或 Tfh 细胞培养基中 IL-2 的水平后细胞的生长变化来进行验证,从而进一步探索 Th 细胞亚群间的免疫平衡。Tfh 细胞与 CTL 细胞各自的特异性转录因子 Bcl-6 和 T-bet 有着相互竞争作用^[15],而 Tfh 细胞和 CTL 细胞之间的关系尚未被完全揭示,Tfh 与 CTL 细胞之间的共培养有助于揭示两者的相互作用,为 CTL 所介导的细胞免疫开启新的视角。Tfh 细胞与 B 细胞之间的相互作用是体液免疫领域的重大发现,可是目前对于 Tfh 细胞是如何辅助 B 细胞尚未完全清楚,通过建立 Tfh 细胞与 B 细胞的共培养体系,在体外模拟体液免疫的过程,将会给体液免疫的研究发展带来重大突破。这些体外实验的进行有赖于得到高纯度活性好的 Tfh 细胞,在本实验所建立的分选和鉴定方法的指导下,可以得到后续实验所需的高纯度活性细胞。对于 Tfh 细胞功能的检测主要体现在其核心的表面功能分子的检测,PD-1、ICOS、CD40L 分子的表达频数反映出 Tfh 细胞的功能状态,作者期待对于 Tfh 细胞的研究能够解决体液免疫中的许多困惑,为 Tfh 细胞的相关实验提供完整方法体系。

参 考 文 献

- [1] Schaerli P,Willmann K,Lang A B,et al.CXC chemokine receptor expression defines follicular homing T cells with b cell helper function[J].J Exp Med,2000,192(11):1553-1562.
- [2] Liu X,Yan X,Zhong B,et al.Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo[J].J Exp Med,2012,209(10):1841-1852.
- [3] Sweet R A, Lee S K, Vinuesa C G. Developing connections amongst key cytokines and dysregulated germinal centers in autoimmunity[J]. Curr Opin Immunol, 2012, 24(6): 658-664.
- [4] Deenick E K, Ma C S. The regulation and role of T follicular helper cells in immunity[J]. Immunology, 2011, 134(4): 361-367.
- [5] Okada T, Moriyama S, Kitano M, et al. Differentiation of germinal center B cells and follicular helper T cells as viewed by tracking Bcl6

技术前沿

DOI: 10.11699/cyxb20131204

pri-mir-302/367 重组慢病毒载体的构建 及其下游调节基因的鉴定

张耀林¹, 马海滨², 陈冬梅², 范恒², 李玉奎²

(1. 宁夏医科大学检验学院, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学总医院宁夏人类干细胞研究所, 银川 750004)

【摘要】目的:构建可诱导表达 pri-mir-302/367 的慢病毒载体,并研究 miR-302/367 家族基因 miR-302a/b/c/d 和 miR-367 及其下游调节基因 OCT4, SOX2 和 NANOG 在 HeLa 细胞中的诱导性表达。**方法:**以正常人基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 pri-mir-302/367 基因。经双酶切后连接入 pLV-TRE 质粒,构建 pLV-TRE-302 慢病毒重组体,酶切及测序予以鉴定。将重组质粒和辅助质粒共同转染 293 FT 细胞,并测定病毒滴度。用病毒转染 HeLa 细胞,强力霉素(doxycycline, DOX)诱导后,通过 real-time PCR 测定 miR-302/367 家族基因及其下游调节基因的表达。实验分为诱导组(DOX+)、非诱导组(DOX-)和空白组(blank)。**结果:**酶切及测序证实重组慢病毒载体 pri-mir-302/367 构建成功,病毒滴度为 5×10^6 TU/ml;DOX 诱导 72 h 后,real-time PCR 结果显示诱导组高于非诱导组和空白组($P < 0.05$,其中 miR-302a: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.032$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.048$; miR-302b: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.001$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.001$; miR-302c: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.000$; miR-302d: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.002$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.047$; miR-367: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.001$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.001$; OCT4: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.001$; SOX2: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.000$; NANOG: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.000$),而非诱导组与空白组相比差异无统计学意义($P > 0.05$,其中 miR-302a: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.057$; miR-302b: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.832$; miR-302c: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.445$; miR-302d: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.979$; miR-367: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.161$; OCT4: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.051$; SOX2: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.060$; NANOG: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.078$)。**结论:**成功构建了携带人 miR-302/367 可控性慢病毒载体,为后续的重编程研究奠定了实验基础。

【关键词】pri-mir-302/367; Tet-on 系统; 可诱导性慢病毒载体; HeLa 细胞

【中国图书分类法分类号】R34

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-01-14

作者介绍:张耀林, Email: yaolinzhang@163.com,

研究方向:干细胞生物学。

通信作者:李玉奎, Email: yukuili@hotmail.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81160098)。

expression dynamics[J]. Immunol Rev, 2012, 247(1): 120-132.

[6] Morita R, Schmitt N, Bentebibel S E, et al. Human blood CXCR5+ CD4+T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion[J]. Immunity, 2011, 34(1): 108-121.

[7] Kassiotis G, O'Garra A. Establishing the follicular helper identity[J]. Immunity, 2009, 31(3): 450-452.

[8] Patakas A, Platt A M, Butcher J P, et al. Putative existence of reciprocal dialogue between Tfh and B cells and its impact on infectious and autoimmune disease[J]. Immunol Lett, 2011, 138(1): 38-46.

[9] Simpson N, Gatenby P A, Wilson A, et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular Helper T cell is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(1): 234-244.

[10] Ogehang A, McGuire H M, Yu D, et al. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells[J]. Immunity, 2008, 29(1): 127-137.

[11] Korthauer U, Graf D, Mages H W, et al. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM

[J]. Nature, 1993, 361(6412): 539-541.

[12] Ma C S, Hare N J, Nichols K E, et al. Impaired humoral immunity in X-linked lymphoproliferative disease is associated with defective IL-10 production by CD4+T cells[J]. J Clin Invest, 2005, 115(4): 1049-1059.

[13] de Leval L, Rickman D S, Thielen C, et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells[J]. Blood, 2007, 109(11): 4952-4963.

[14] Oestreich K J, Mohn S E, Weinmann A S, et al. Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile[J]. Nat Immunol, 2012, 13(4): 405-411.

[15] Pipkin M E, Sacks J A, Cruz-Guilloty F, et al. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells[J]. Immunity, 2010, 32(1): 79-90.

(责任编辑:冉明会)