

李国萃,陆佳涵,卢秋翰,等. 诱导刺激猴外周血单核淋巴细胞亚群活化增殖研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 1-6.
Li GC, Lu JH, Lu QH, et al. Inducing and stimulating the activation and proliferation of peripheral blood mononuclear lymphocyte subsets from rhesus macaque [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(5): 1-6.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.05.001

诱导刺激猴外周血单核淋巴细胞亚群活化增殖研究

李国萃,陆佳涵,卢秋翰,杨晨波,丛喆*,魏强*

(北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 比较不同诱导刺激剂对 T 细胞活化标志物 CD69、CD38、HLA-DR 和核内增殖标记 Ki67 的表达量的影响,为研究 T 细胞激活功能和作用研究提供依据。**方法** 采集健康恒河猴外周血,分离 PBMC,分别加入常规剂量的 PMA+ Ionomycin、 α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 和 PHA-P+IL-2,在不同的时间点检测 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞表面标志物 CD69、CD38、HLA-DR 和核内增殖标记 Ki67 表达情况。**结果** 流式细胞术结果表明,在刺激剂作用 72 h 时,与其它两种刺激剂相比, α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 刺激后的 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞上的 CD69 和 Ki67 表达量更高,HLA-DR⁺CD4⁺T 细胞和 HLA-DR⁺CD8⁺T 细胞的比例与另外两组组间比对无差异,同时 CD38⁺CD4⁺T 细胞和 CD38⁺CD8⁺T 细胞的比例在 α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 与 PHA-P+IL-2 组间比较无统计学差异 ($P>0.05$);在 PMA+Ionomycin 刺激下,检测到上述四种分子的表达量都很低。**结论** CD2/ α -CD3/ α -CD28 活化 T 细胞效果最佳,PHA-P+IL-2 次之,PMA+Ionomycin 作用弱。在选择 T 细胞活化作用程度方面,可进行针对性选择。

【关键词】 PBMC;活化;PMA+Ionomycin; α -CD2/ α -CD3/ α -CD28;PHA-P+IL-2;CD69;CD38;HLA-DR;Ki67

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 05-0001-06

Inducing and stimulating the activation and proliferation of peripheral blood mononuclear lymphocyte subsets from rhesus macaque

LI Guocui, LU Jiahuan, LU Qiuhan, YANG Chenbo, CONG Zhe*, WEI Qiang*

(Comparative Medicine Center, Peking Union College (PUMC) & Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Remerging Infectious Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of stimulants on the expression of T cell activation markers (CD69, CD38, HLA-DR) and a nuclear proliferation marker (Ki67), and provide the basis for the study of T cell function after activation. **Methods** Peripheral blood was collected from healthy rhesus monkeys, then peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated and regular doses of PMA + Ionomycin, α -CD2/ α -CD3/ α -CD28, and

【基金项目】 国家自然科学基金(81971944);中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目(2017-I2M-1-014);十三五传染病科技重大专项(2017ZX10304402,2018ZX10101001,2018ZX10301103);基础医学学科建设项目——病原生物学。

【作者简介】 李国萃(1994—),女,硕士研究生,从事实验动物病毒学研究工作。E-mail: 18194306320@163.com

【通信作者】 丛喆(1972—),女,硕士,副主任技师,从事实验动物病毒学和模型研究工作。E-mail: congz@cnilas.org

魏强(1964—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:实验动物病毒学。E-mail: weiqiang0430@cnilas.org

* 共同通信作者

phytohemagglutinin-P (PHA-P)+interleukin-2 (IL-2) were added. Expression of CD4⁺T cells and CD8⁺T cell surface markers, CD69, CD38, HLA-DR, and Ki67, were detected at different time points. **Results** Flow cytometry showed that when the stimulant, α -CD2/ α -CD3/ α -CD28, acted for 72 hours, expression of CD69 and Ki67 on CD4⁺T cells and CD8⁺T cells was higher compared with the other two stimulants, while the percentage of HLA-DR⁺CD4⁺T cells and HLA-DR⁺CD8⁺T cells and CD38⁺CD8⁺T cells was not different. Meanwhile, the percentage of CD38⁺CD4⁺T cells was not different between α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 and PHA-P+IL-2 groups ($P > 0.05$). Expression of all four molecules was very low under PMA+Ionomycin stimulation. **Conclusions** CD2/ α -CD3/ α -CD28 had the best effect in activating T cells, followed by PHA-P+IL-2, and then PMA+Ionomycin. This provides the experimental basis for selecting appropriate stimulants on the basis of different experimental purposes.

【Keywords】 PBMC; activation; PMA+Ionomycin; α -CD2/ α -CD3/ α -CD28; PHA-P+IL-2; CD69; CD38; HLA-DR; Ki67

在许多免疫系统疾病的研究中,T 细胞激活和增殖程度可以反应疾病的进展状况。通常将 PBMC (外周血单个核细胞)作为靶细胞来研究细胞因子的分泌和表面活化标志物及增殖标志物的表达等。常用的 T 细胞刺激剂为 PMA+Ionomycin、 α -CD2/ α -CD3/ α -CD28、PHA-P+IL-2 等。T 细胞接受活化信号后,检测活化分子的表达是一种常规手段。CD69 分子是自然杀伤细胞受体家族的 C 型凝集素,T 淋巴细胞被活化后,CD69 迅速被诱导表达,而且在短时间内很快便能达到高峰,因此 CD69 被用作淋巴细胞活化的早期标志物^[1-2]。CD38 分子常作为一种用于诊断临床疾病的指标,同时也是 T 细胞晚期活化标记物^[3-4]。HLA-DR 分子是 MHC-II 类分子,主要起着抗原呈递的作用,也是 T 细胞活化的常用标志物。Ki67 常作为 T 细胞增殖标记。本研究拟通过流式细胞术检测 T 细胞活化分子来比较几种不同 T 细胞刺激剂的活化效果,以期 T 细胞激活相关研究选择合适的刺激剂奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

3 只 SPF 级中国恒河猴,1 只雌性,2 只雄性,年龄为 3~6 岁,体重约 7~8 kg,均购自北京协尔鑫生物资源研究所[SCXK(京)2015-0011]。实验前通过免疫荧光法筛查,排除猴疱疹病毒,猴逆转录 D 型病毒,猴免疫缺陷病毒及猴 T 淋巴细胞性 I 型病毒。实验动物的饲养及实验操作在中国医学科学院医学实验动物研究所生物安全三级实验室进行[SYXK(京)2017-0027]。实验进程遵循 3R 原则。本实验使用的实验动物程序通过了中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员

会(IACUC)的批准(XJ19003)。

1.1.2 实验细胞

外周血单核细胞来源于健康恒河猴。

1.2 主要试剂与仪器

T 细胞刺激剂:Cell Stimulation Cocktail (Cat.No: 00-4975-73) 购自 eBioscience 公司; T Cell Activation/Expansion Kit non-human primate (Cat. No: 130-092-919)购自 Miltenyi biotec 公司;PHA-P (Cat.No: L1668) 购自 SIGMA 公司; IL-2 (Cat. No: 202-IL) 购自 R&D 公司^[5-8];流式实验所用试剂为 fixation/permeabilization concentrate (Cat. No: 00-5123-43)、fixation/permeabilization diluent (Cat. No: 00-5223-56)和 permeabilization Buffer 10 $\times$ (Cat.No: 00-8333-56) 购自 ebioscience 公司。流式染色方案见表 1。

流式仪:检测 T 细胞表面活化标志物所用流式仪:型号为 BD FACS Aria II,产地为美国;检测 T 细胞核内 Ki67 抗原所用流式仪:型号为 BD Accuri C6,产地为美国;显微镜:型号为 Nikon ECLIPSE Ti-u,产地为日本。

表 1 抗体一览表

Table 1 List of antibodies

抗体 Antibody	克隆号 Clone	公司 Company
BV605 Mouse Anti-Human CD3	SP34-2	BD
Brilliant Violet 785 TM Anti-human CD4 Antibody	OKT-4	Biolegend
PE Mouse Anti-Human CD8	RPA-T8	BD
Brilliant Violet 421 TM Anti-human CD69 Antibody	FN50	Biolegend
FITC Anti-Human CD38 Antibody	AT-1	Stemcell
BV510 Mouse Anti-Human HLA-DR	G46-6	BD
PerCP Mouse Anti-Human CD3	SP34-2	BD
APC anti-human CD4 Antibody	OKT-4	Biolegend
FITC Mouse Anti-Ki-67	B56	BD

1.3 实验方法

1.3.1 PBMC 的分离

采集健康恒河猴的外周血^[9],离心后弃去上层血浆,加入与全血相等体积的 1640 培养基进行稀释,吹打混匀,将稀释后的全血加入装有 Ficoll 液体的离心管中,离心后吸取中间 PBMC 细胞层至新的离心管中,加入 1640 培养基进行洗涤,离心后弃去上清液体,轻轻弹起管底细胞团块,用 1640 培养基重悬至所需要的浓度,进行后续的实验。

1.3.2 T 细胞刺激剂刺激 PBMC

(1) 用 PMA + Ionomycin/PHA-P + IL-2 刺激 PBMC

分离好 PBMC 后^[10],用含有 10% FBS 和 2% 双抗的完全培养基重悬细胞,分装到 48 孔板中,细胞浓度为每孔 1×10^6 mL,每孔加入 2 μ L Cell Stimulation Cocktail/4 μ g/mL 的 PHA-P 和 20 ng/mL 的 IL-2,用枪头吹打混匀,放入 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 孵箱中进行培养。在不同时间点收取细胞,进行后续的流式实验。

(2) 用 T Cell Activation/Expansion Kit non-human primate 刺激 PBMC

取出装载好抗体的磁珠(抗体终浓度为 10 μ g/mL),加入含 10% FBS 的 X-VIVO 15TM 培养基,离心后重悬备用。同时将 PBMC 用上述培养基重悬,并与重悬备用的磁珠混合均匀。加入 48 孔板中,细胞浓度为每孔 1×10^6 mL,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱孵育,在不同时间点收集细胞,进行后续实验。

1.3.3 流式方法检测 T 细胞表面活化标志物。

将孔板中的细胞悬液加入流式管中,同时加入 CD3-BV605、CD8-PE、CD4-BV785、CD69-BV421、CD38-FITC 和 HLA-DR-BV510,4 $^{\circ}$ C 下放置 30 min,1%多聚甲醛溶液固定,最后上机检测染色情况^[11]。

1.3.4 流式方法检测 T 细胞核内 Ki67 抗原

将孔板中的细胞悬液加入流式管中^[12],并加入 CD3-PerCP、CD4-APC 和 CD8-PE,4 $^{\circ}$ C 放置 30 min。随即加入配制好的固定/破膜液作用 30 min。加入 Ki67-FITC 抗体,室温避光 30 min,1%多聚甲醛溶液固定,上机检测分析结果。

1.4 统计学方法

流式数据用 FlowJo V10 软件进行分析,用 GraphPad prism8 绘制图形,进行统计学分析时用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示实验结果,对不同 T 细胞刺激剂的实验数据组间进行差异分析,“ns”表示 $P > 0.05$,没有统计学意义, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义,用“*”表示。

2 结果

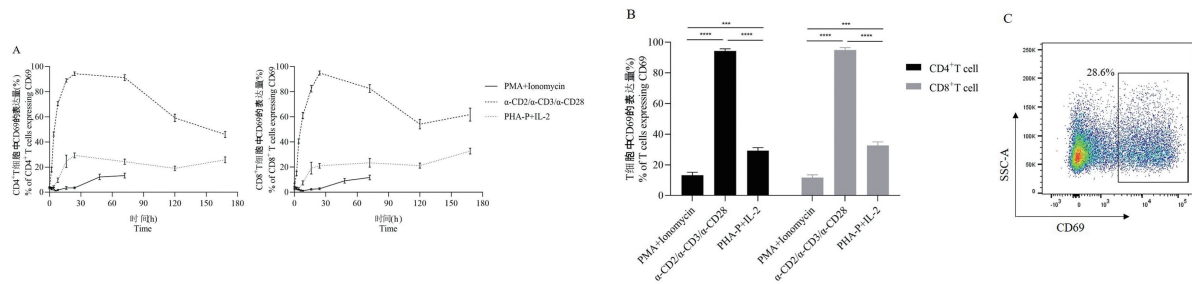
2.1 不同 T 细胞刺激剂刺激 PBMC 时,早期活化标志物 CD69 分子的表达情况

PBMC 经 α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 刺激后,2 h 时在 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞上就可以检测到 CD69 的表达,其中 CD69⁺CD4⁺T 细胞的比例为 $(18.000 \pm 1.908)\%$,CD69⁺CD8⁺T 细胞的比例为 $(14.867 \pm 1.762)\%$,2 h 后 CD69 在两种主要的 T 细胞亚群上的表达呈直线上升趋势。24 h 时达到高峰,该时间点 CD69 在 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞上所占比例分别为 $(94.333 \pm 1.365)\%$ 和 $(94.867 \pm 1.607)\%$,随即呈下降趋势(图 1A);虽然 PHA-P + IL-2 刺激下的 CD69 在两种 T 细胞亚群上的表达趋势与 α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 作用后的趋势大致相似,但前者刺激下的 CD69 的表达量远低于后者;在 PMA+Ionomycin 刺激后,CD69 的表达均呈低水平缓慢增加,在 72 h 的占比分别为 $(13.233 \pm 1.986)\%$ (CD69⁺CD4⁺T 细胞)和 $(11.667 \pm 1.850)\%$ (CD69⁺CD8⁺T 细胞)。

将三种刺激剂作用 72 h 后的 CD69 的表达量分别进行两组间的比较分析,结果表明均具有显著性差异,且 α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 刺激后的结果显著高于其他两种刺激剂($P < 0.0005$,图 1B)。从中可以看出, α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 激活 T 细胞效率最高,PHA-P + IL-2 次之,PMA + Ionomycin 激活效率最低。

2.2 不同 T 细胞刺激剂刺激 PBMC 时,晚期活化标志物 CD38 分子和 HLA-DR 分子的表达情况

α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 作用于 PBMC 后,CD38⁺CD4⁺T 细胞和 CD38⁺CD8⁺T 细胞所占比例均在 120 h 时达高峰,比例分别为 $(90.533 \pm 1.986)\%$ 和 $(87.133 \pm 2.511)\%$;而 PHA-P + IL-2 作用于 PBMC 后,CD38 的表达呈缓慢上升趋势,CD38⁺CD4⁺T 细胞和 CD38⁺CD8⁺T 细胞在 168 h 的占比分别为 $(89.300 \pm 2.524)\%$ 和 $(89.900 \pm 2.252)\%$;PMA + Ionomycin 刺激后,CD38⁺CD4⁺T 细胞和 CD38⁺CD8⁺T 细胞所占比例在 6 h 到达高峰,之后呈下降趋势(图 2A)。和 CD38 不一样,三种刺激剂作用后的 HLA-DR 的表达量均很低。 α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 刺激下,HLA-DR⁺CD4⁺T 细胞在所有时间点中的最大比例为 $(4.150 \pm 1.570)\%$,HLA-DR⁺CD8⁺T 细胞在所有时间点中的最大比例为 $(2.390 \pm 0.875)\%$;PHA-P + IL-2 刺激后,HLA-DR 在 CD4⁺T



注:A:不同刺激剂作用不同时间后,CD69 在 T 细胞上的表达量的变化;B:不同刺激剂作用 72 h 后,CD69⁺CD4⁺T 细胞和 CD69⁺CD8⁺T 细胞的占比;C:流式画门中,CD69 分子的阳性群位置。与 α-CD2/α-CD3/α-CD28 刺激组相比,**** $P < 0.0001$;与 PMA + Ionomycin 刺激组相比,**** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$;与 PHA+IL-2 刺激组相比,**** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 不同刺激剂作用后,CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞上 CD69 的表达量变化

Note. A, Expression of CD69 on T cells stimulated by different stimulants. B, Percentage of CD69⁺CD4⁺T cells and CD69⁺CD8⁺T cells stimulated for 72 h by different stimulants. C, Representative dot plots showing gating strategy for CD69 molecular. Compared with the group stimulated by α-CD2/α-CD3/α-CD28, **** $P < 0.0001$. Compared with the group stimulated by PMA + Ionomycin, **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$. Compared with the group stimulated by PHA+IL-2, **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$.

Figure 1 Expression of CD69 on CD4⁺T cells and CD8⁺T cells stimulated by different stimulants

细胞和 CD8⁺T 细胞上的最大表达量分别为 $(1.923 \pm 0.194)\%$ 和 $(1.430 \pm 0.166)\%$; PMA + Ionomycin 刺激 72 h 后,HLA-DR⁺CD4⁺T 细胞和 HLA-DR⁺CD8⁺T 细胞的占比分别为 $(4.010 \pm 0.783)\%$ 和 $(4.413 \pm 1.090)\%$ (图 2B),将三种刺激剂作用 72 h 后的 CD38 在两种主要 T 细胞亚群上的表达量进行组间比对,其中 PMA+Ionomycin 与其他两种刺激剂组间比对均有统计学差异 ($P < 0.01$,图 2C),而 α-CD2/α-CD3/α-CD28 与 PHA-P+IL-2 组间比对表明 PMA + Ionomycin 刺激效果最差(无差异,图 2C)。

将三种刺激剂作用 72 h 后的 HLA-DR 的表达量进行组间比对,只有 PMA+Ionomycin 与 PHA-P + IL-2 组间有差异 ($P < 0.01$,图 2C)。

2.3 不同 T 细胞刺激剂刺激 PBMC 时,增殖标记 Ki67 分子的表达情况

α-CD2/α-CD3/α-CD28 作用于 PBMC 后,Ki67⁺CD4⁺T 细胞和 Ki67⁺CD8⁺T 细胞的比例在 72 h 内快速上升,之后缓慢上升,120 h 后快速下降,所有时间点中最大比例分别为 $(87.067 \pm 2.113)\%$ 和 $(95.167 \pm 2.550)\%$; PHA-P+IL-2 刺激后,Ki67 在两种 T 细胞亚群中的比例在 168 h 内缓慢上升,168 h 时 Ki67⁺CD4⁺T 细胞的所占比例为 $(35.633 \pm 3.951)\%$,Ki67⁺CD8⁺T 细胞的所占比例为 $(22.933 \pm 2.804)\%$; PMA+Ionomycin 刺激后,Ki67⁺CD4⁺T 细胞和 Ki67⁺CD8⁺T 细胞的比例在 72 h 内缓慢下降(图 3A)。将三种刺激剂作用 72 h 后的 Ki67 的表达量进行组间比较,其中 α-CD2/α-CD3/α-CD28 与其他两种刺激剂组间比对均有统计学差异 ($P <$

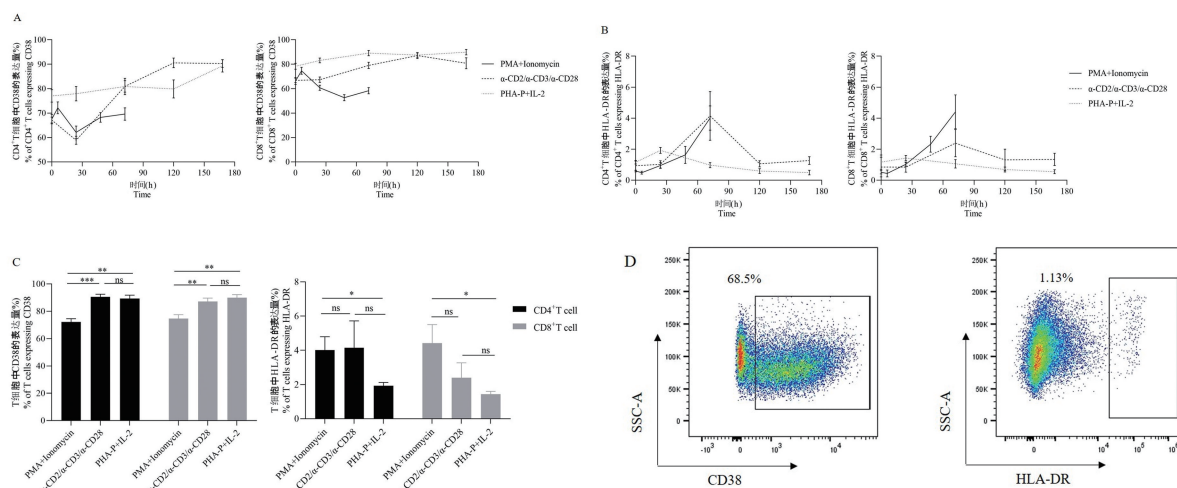
0.0001,图 3B)。该结果与细胞图片结果趋于一致,细胞图片显示,相比正常 PBMC,α-CD2/α-CD3/α-CD28 刺激 PBMC 72 h 后,细胞形状变大,数量变多,呈梭状或圆形; PHA-P + IL-2 刺激 PBMC 72 h 后,细胞黏附成团;PMA+Ionomycin 刺激 PBMC 72 h 后,细胞几乎全部死亡(图 3C、3D)。

3 讨论

外周血单个核细胞因其重要的作用常被作为许多疾病中研究 T 细胞激活的靶细胞。由于不同刺激剂活化 T 细胞所涉及的信号通路不一样,因此理论上 T 细胞被激活的效率和规律也不一样^[13-14]。为确定不同刺激剂诱导活化 T 淋巴细胞的基本规律,本研究选用了 α-CD2/α-CD3/α-CD28、PHA-P + IL-2 和 PMA+Ionomycin 三种常用的刺激剂组合,运用流式细胞术检测活化分子在两种主要 T 细胞亚群上的表达量来确定 T 细胞活化效率。

CD69 分子是 T 细胞早期活化标志物。T 细胞接受活化信号后,在 2 h 就可以检测到 CD69 的表达,在 24 h 左右达到高峰,3 d 内在 T 细胞表面平稳表达,之后开始下降^[1-2]。本研究中,经 α-CD2/α-CD3/α-CD28 和 PHA-P + IL-2 刺激后,T 细胞上 CD69 的表达趋势与文献中基本相符。三种刺激剂中,经 α-CD2/α-CD3/α-CD28 刺激后,T 细胞上 CD69 的表达量显著高于其他两种刺激剂。而 PMA + Ionomycin 刺激后的 CD69 的表达远远低于另外两种刺激剂,表明 PMA+Ionomycin 刺激效率低下。

CD38 分子是一种常用的活化标志物,在 T 淋

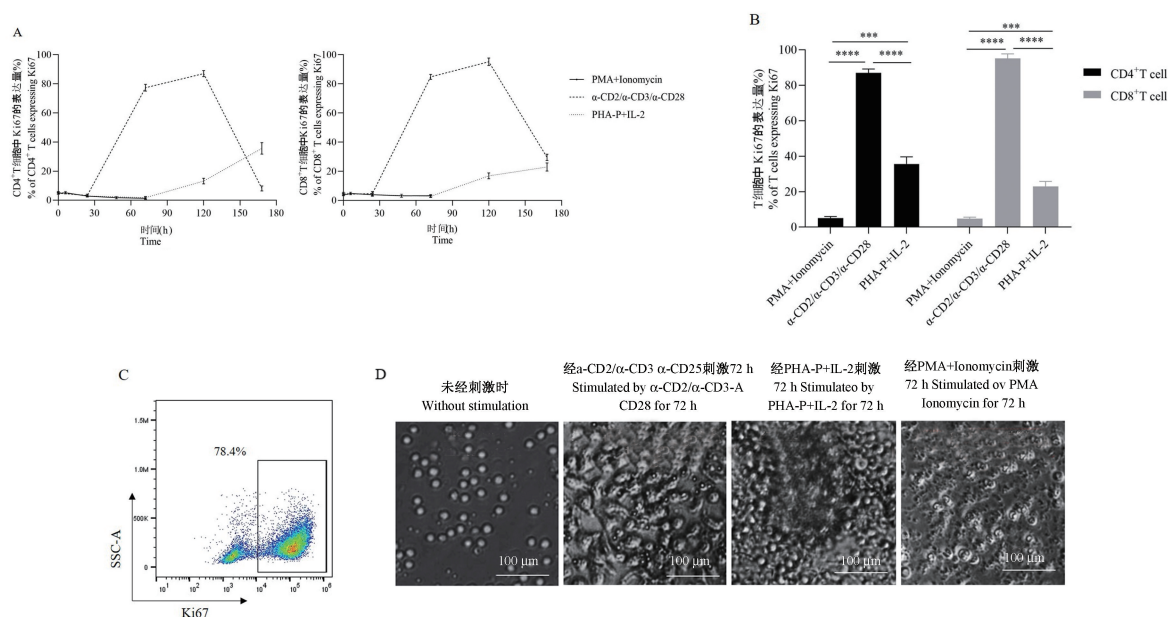


注:A:不同刺激剂作用不同时间后,CD38在T细胞上的表达量的变化;B:不同刺激剂作用不同时间后,HLA-DR在T细胞上的表达量的变化;C:不同刺激剂作用72h后,CD38⁺CD4⁺T细胞和CD38⁺CD8⁺T细胞与HLA-DR⁺CD4⁺T细胞和HLA-DR⁺CD8⁺T细胞的占比;D:流式画门中,CD38分子和HLA-DR分子的阳性群位置。

图2 不同刺激剂作用后,CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞上CD38、HLA-DR的表达量变化

Note. A, Expression of CD38 on T cells stimulated by different stimulants. B, Expression of HLA-DR on T cells stimulated by different stimulants. C, Percentage of CD38 and HLA-DR on CD4⁺T cells and CD8⁺T cells stimulated for 72 h by different stimulants. D, Representative dot plots showing gating strategy for CD38 molecular and HLA-DR molecular.

Figure 2 Expression of CD38 and HLA-DR on CD4⁺T cells and CD8⁺T cells stimulated by different stimulants



注:A:不同刺激剂作用不同时间后,Ki67在T细胞上的表达量的变化;B:不同刺激剂作用72h后,Ki67⁺CD4⁺T细胞和Ki67⁺CD8⁺T细胞的占比;C:流式画门中,Ki67分子的阳性群位置;D:正常PBMC和三种刺激剂作用72h后PBMC的细胞状态。

图3 不同刺激剂作用后,CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞上Ki67的表达量

Note. A, Expression of Ki67 on T cells stimulated by different stimulants. B, Percentage of Ki67⁺CD4⁺T cells and Ki67⁺CD8⁺T cells stimulated for 72 h by different stimulants. C, Representative dot plots showing gating strategy for Ki67. D, The PBMC before and 72 h after stimulation.

Figure 3 Expression of Ki67 on CD4⁺T cells and CD8⁺T cells stimulated by different stimulants

巴细胞活化晚期表达^[4],常与同为T细胞晚期活化标志物的HLA-DR分子联合使用^[15-16]。本研究中,经三种刺激剂作用72h后,CD38⁺CD4⁺T细胞和

CD38⁺CD8⁺T细胞的占比在α-CD2/α-CD3/α-CD28与PHA-P+IL-2组间无差异,且高于PMA+Ionomycin刺激后的结果。T细胞上HLA-DR的表

达量在三种刺激剂刺激后均很低,经 α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 刺激后的 HLA-DR⁺CD4⁺T 细胞和 HLA-DR⁺CD8⁺T 细胞的比例与另外两种刺激剂组间比对无差异,而 PMA+Ionomycin 刺激后的 HLA-DR 在两种主要 T 细胞亚群上的表达量高于 PHA-P+IL-2。

Ki67 是一种 T 细胞增殖标记,在细胞周期的各阶段中除了 G0 期外都会高度表达^[17-18]。本文中,经 PMA+Ionomycin 刺激后,T 细胞上 Ki67 的表达量低下, α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 刺激后的 Ki67 表达量显著优于其他两种刺激剂。且将三种刺激剂作用 72 h 后的 T 细胞上 Ki67 的表达量进行组间比对,均显示有显著性差异($P<0.0001$)。细胞图片显示,在不同刺激剂作用 PBMC 72 h 后,细胞或增大呈梭状圆形且数量增多(α -CD2/ α -CD3/ α -CD28),或黏附成团(PHA+IL-2),或基本全部死亡(PMA+Ionomycin),这与不同刺激剂刺激后的 Ki67 的表达相符: α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 刺激后 72 h 时,Ki67⁺CD4⁺T 细胞和 Ki67⁺CD8⁺T 细胞的比例基本达峰值,PMA+Ionomycin 刺激后 72 h 时,Ki67⁺CD4⁺T 细胞和 Ki67⁺CD8⁺T 细胞的比例在检测的所有时间点中最低。PHA-P+IL-2 作用于细胞后,造成细胞黏附,在流式仪上样时可能会堵塞进样针,从而可能会造成实验结果的误差。

综上所述, α -CD2/ α -CD3/ α -CD28、PHA-P+IL-2 和 PMA+Ionomycin 三种刺激剂中, α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 活化 T 细胞的效率最优,PHA-P+IL-2 次之,PMA+Ionomycin 效率最差。在 α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 刺激下,CD69 和 Ki67 在两种 T 细胞亚群上的表达量显著高于其他两种 T 细胞刺激剂。同一种活化分子在不同 T 细胞亚群上的表达量不一样,可能与 T 细胞亚群的增殖速率不同有关,也可能与不同 T 细胞亚群上表达的活化分子在疾病中所起的作用不同有关。PMA+Ionomycin 的刺激效率最低,可能是由于其活化 T 细胞涉及的信号通路不像 α -CD2/ α -CD3/ α -CD28 能引起强烈的下游信号传导,也可能是因为 PMA+Ionomycin 作用于细胞后,随着时间的延长,细胞死亡率增大,因此该刺激剂更适合作为短期刺激剂来使用。

参考文献:

- [1] Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper [J]. Eur J Immunol, 2017, 47(6): 946-953.
- [2] Simms PE, Ellis TM. Utility of flow cytometric detection of CD69

expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1996, 3(3): 301-304.

- [3] Quarona V, Zaccarello G, Chillemi A, et al. CD38 and CD157: A long journey from activation markers to multifunctional molecules [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2013, 84(4): 207-217.
- [4] Hercend T, Ritz J, Schlossman SF, et al. Comparative expression of T9, T10, and Ia antigens on activated human T cell subsets [J]. Hum Immunol, 1981, 3(3): 247-259.
- [5] 彭卓颖,丛喆,李想,等.不同方法诱导 THP-1 细胞分化效果比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(9): 1-6.
- [6] 彭卓颖,李想,丛喆,等.流式细胞术分析 PMA 诱导 THP-1 分化为巨噬细胞的表型特征 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(10): 10-15, 22.
- [7] 李凌,来芳芳,杜婷婷,等.不同刺激剂对淋巴细胞中 PD-1 与 TIM3 蛋白表达的影响 [J]. 中国医药生物技术, 2019, 14(2): 127-135.
- [8] 杨学琴,陈钰婷,李丽梅,等.不同刺激剂对外周血淋巴细胞亚群增殖的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26(6): 1765-1771.
- [9] 李想,薛婧,陈霆,等. SIV 感染猴外周血 CD14⁺单核细胞 CD169 分子表达的变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(5): 75-80.
- [10] 杨学琴,陈钰婷,李丽梅,等.不同刺激剂对外周血淋巴细胞亚群增殖的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26(6): 1765-1771.
- [11] 张远芬,徐培平,熊思艺,等.中国恒河猴感染 SIV 后 T 淋巴细胞免疫活化及其肠粘膜归巢受体的表达 [J]. 中国热带医学, 2018, 18(1): 11-16.
- [12] 肖健,刘显,郁晓磊,等. HIV-1 感染过程中 CD8⁺T 细胞 PD-1 水平增高与其活化状态正相关 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(10): 1372-1377.
- [13] Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, et al. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells [J]. Immunol Today, 1994, 15(10): 479-483.
- [14] Li Y, Kurlander RJ. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation [J]. J Transl Med, 2010, 8(1): 104.
- [15] Hua S, Lécureux C, Sáez-Cirión A, et al. Potential role for HIV-specific CD38⁺/HLA-DR⁺CD8⁺T cells in viral suppression and cytotoxicity in HIV controllers [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101920.
- [16] Vickers MA, Darboe F, Muefong CN, et al. Monitoring anti-tuberculosis treatment response using analysis of whole blood *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell activation and functional markers [J]. Front Immunol, 2020, 11: 572620.
- [17] Chattopadhyay PK, Roederer M. Good cell, bad cell: flow cytometry reveals T-cell subsets important in HIV disease [J]. Cytometry A, 2010, 77(7): 614-622.
- [18] Simonetti S, Natalini A, Peruzzi G, et al. A DNA/Ki67-based flow cytometry assay for cell cycle analysis of antigen-specific CD8 T cells in vaccinated mice [J]. J Vis Exp, 2021, (167): 10.3791/61867.

[收稿日期] 2020-12-29