初始 CD4⁺ T 细胞体外诱导分化为 Th1, Th2, Th17 和 Treg 细胞

In vitro differentiation of naïve CD4⁺ T cells into Th1, Th2, Th17 and Treg cells

鲍温洁*

生命科学与技术学院，中国科学院生物化学与细胞生物学研究所，上海

*通讯作者邮箱: baowenjie2015@sibcb.ac.cn

引用格式: 鲍温洁. (2019). 初始 CD4⁺ T 细胞体外诱导分化为 Th1, Th2, Th17 和 Treg 细胞. *Bio-101* e1010309. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010309.

How to cite: Bao, W. J. (2019). *In vitro* differentiation of naïve CD4⁺ T cells into Th1, Th2, Th17 and Treg cells. *Bio-101* e1010309. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010309. (in Chinese)

摘要: 初始 CD4⁺ T 细胞具备增殖并且分化成 Th1, Th2, Th17 和 Treg 细胞的潜能。使用细胞因子体外刺激初始 CD4⁺T 细胞的方法，用于研究不同处理条件对于初始 CD4⁺ T 细胞分化能力的影响 (Cote-Sierra 等, 2004)。

关键词: 初始 CD4⁺ T 细胞, Th1 细胞, Th2 细胞, Th17 细胞, Treg 细胞

材料与试剂

1. 96 孔板
2. Dynabeads monostim activator CD3/CD28 (Gibco, catalog number: 11452D)
3. Purified NA/LE hamster anti mouse CD3e (BD, catalog number: 553057)
4. Purified NA/LE hamster anti mouse CD28 (BD, catalog number: 553294)
5. Anti-mouse IL-4 (BD, catalog number: 554434)
6. Murine IL-12 (Pepro Tech, catalog number: 2101210)
7. Murine IL-2 (Pepro Tech, catalog number: 2121220)
8. Murine IL-4 (Pepro Tech, catalog number: 214145)
9. Anti- mouse IFN-γ (BD, catalog number: 551216)
10. Anti- mouse IL-12 (BD, catalog number: 551219)
11. Murine IL-6 (Pepro Tech, catalog number: 21616)
12. Human TGF-β1 (Pepro Tech, catalog number: 10021C10)
13. Murine TNF-α (Pepro Tech, catalog number: 31501A5)
14. Murine IL-1β (Pepro Tech, catalog number: 21111B)

15. Easysep™ mouse naïve CD4⁺ T cells isolation kit (Stem cell, catalog number: 19725A)
16. β-Mercaptoethanol (Millipore, catalog number: ES007E)
17. PBS
18. 1640 培养基
19. IMDM 培养基
20. 谷氨酰胺
21. 双抗
22. 1640 完全培养基 (见溶液配方)
23. IMDM 完全培养液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific)
2. FACS LSR II 流式细胞仪 (Becton Dickinson)

实验步骤

一. 初始 CD4⁺ T 细胞分离

使用 Easysep™ mouse naïve CD4⁺ T cells isolation kit 阴选出脾脏中的初始 CD4⁺ T 细胞 (naïve CD4⁺ T cells)。如果在 96 孔板中刺激诱导, 每孔铺 1×10^5 naïve CD4⁺ T cells, 以下均以 1×10^5 细胞为例。

二. CD3 和 CD28 预先铺板

Th0, Th1 和 Treg 这 3 种细胞使用 purified NA/LE hamster anti mouse CD3e 和 purified NA/LE hamster anti mouse CD28 预先铺板, 两个的铺板工作浓度均为 $1 \mu\text{g/ml}$ (PBS 稀释), 96 孔板铺板体积为 $50 \mu\text{l}$ 。可在 4°C 预铺 12~16 小时或者 37°C 预铺 2 小时。

Th17 细胞铺板浓度不同, purified NA/LE hamster anti mouse CD3e 工作浓度 $2 \mu\text{g/ml}$, CD28 工作浓度 $5 \mu\text{g/ml}$ 。

预铺结束, 缓慢吸走上清, 开始洗板子, 即缓慢加入 1640 完全培养液室温静止 5 分钟, 吸走。洗三次, 注意最后一次在加入细胞前再吸走培养液。

三. 刺激分化

1. Th0 细胞培养: 每孔 200 μ l 1640 完全培养液悬起细胞, 其中加入细胞因子工作浓度为: anti-IL-4: 10 μ g/ml, anti-IFN- γ : 10 μ g/ml;
2. Th1 细胞培养: 每孔 200 μ l 1640 完全培养液悬起细胞, 其中加入细胞因子工作浓度为: IL-12: 10 ng/ml, IL-2: 10 ng/ml, anti-IL-4: 10 μ g/ml (图 1);

图 1. Th1 细胞流式结果示意图

3. Th2 细胞培养: 每孔 200 μ l 1640 完全培养液悬起细胞, 其中加入细胞因子工作浓度为: IL-4: 10 ng/ml, IL-2: 5 ng/ml, anti-IFN- γ : 10 μ g/ml, anti-IL-12 :10 μ g/ml, 加 CD3/CD28 beads: 2.5 μ l beads (2.5 μ l beads/ 10^5 cells) (Cote-Sierra 等, 2004, 图 2);

注: *Beads* 提前用 1640 完全培养液洗三遍,后加入培养液中。

图 2. Th2 细胞流式结果示意图

4. Th17 细胞培养: 每孔 200 μ l IMDM 完全培养液悬起细胞, 其中加入细胞因子工作浓度为: IL-6: 30 ng/ml, TGF- β : 3 ng/ml, TNF- α : 10 ng/ml, IL-1 β : 10 ng/ml, anti-IFN- γ : 5 μ g/ml, anti-IL-4: 5 μ g/ml (Kleinewietfeld 等, 2013, 图 3);

图 3. Th17 细胞流式结果示意图

5. Treg 细胞培养: 每孔 200 μ l 1640 完全培养液悬起细胞, 其中加入细胞因子工作浓度为: IL-2: 5 ng/ml, TGF β : 3 ng/ml (Freudenberg 等, 2018, 图 4);

图 4. Treg 细胞流式结果示意图

72 小时后轻轻吸走 100 μ l 培养液，再次加入细胞因子种类及浓度和之前一样的 100 μ l 培养液，再培养 24 小时后，PIreboost 3~4 小时后检测各细胞诱导比例。

注意事项

1. 用加入细胞因子的培养液悬起细胞后，尽量轻柔的将细胞加到板里，避免吹起之前铺好的 anti-CD3/CD28 抗体。
2. 当刺激细胞数量比较大时，48 小时开始每 12 小时观测细胞浓度，如果细胞密度很大，则立即铺加刺激，将培养液分到新的孔中，同样在最初刺激 96 小时后检测。96 孔板最多培养初始 3×10^5 细胞，更多细胞则需要按比例依次换更大的孔板。

溶液配方

1. 1640 完全培养基
1640 培养基加 10% FBS
加双抗 (100x)
加 50 μ M Mercaptoethanol
2. IMDM 完全培养液
IMDM 培养基加 10% FBS
加双抗 (100x)

加谷氨酰胺 (100x)

加 5 μ M Mercaptoethanol

致谢

此份实验操作方法是实验室多位师兄师姐查阅文献，并结合实际实验操作最终总结的实验方法，实验室后续多位同学验证可行。特此感谢实验室相关人员对此实验方法的贡献！

参考文献

1. Cote-Sierra, J., Foucras, G., Guo, L., Chiodetti, L., Young, H. A., Hu-Li, J., Zhu, J. and Paul, W. E. (2004). [Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation.](#) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(11): 3880-3885.
2. Freudenberg, K., Lindner, N., Dohnke, S., Garbe, A. I., Schallenberg, S. and Kretschmer, K. (2018). [Critical role of TGF- \$\beta\$ and IL-2 receptor signaling in Foxp3 induction by an inhibitor of DNA methylation.](#) *Front Immunol* 9: 125.
3. Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J., Kvakan, H., Yosef, N., Linker, R. A., Muller, D. N. and Hafler, D. A. (2013). [Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells.](#) *Nature* 496(7446): 518-522.