



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108753714 B

(45)授权公告日 2019.07.30

(21)申请号 201810464290.3

(22)申请日 2018.05.15

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108753714 A

(43)申请公布日 2018.11.06

(73)专利权人 夏永祥  
地址 210000 江苏省南京市广州路300号江  
苏省人民医院肝胆中心

(72)发明人 夏永祥 陆云杰 吕凌 高骥  
周浩明 饶建华

(74)专利代理机构 南京科知维创知识产权代理  
有限责任公司 32270  
代理人 杜依民

(51)Int.Cl.  
C12N 5/0781(2010.01)

(56)对比文件  
CN 102978158 A,2013.03.20,  
CN 103566357 A,2014.02.12,  
CN 105899229 A,2016.08.24,

Yohei Iwata et al..Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells.《BLOOD》.2011,第117卷(第2期),  
Jay A. Graham et al..Suppressive Regulatory T Cell Activity Is Potentiated by Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Inhibition.《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.2010,第285卷(第43期),  
褚帅.GSK-3 $\beta$ 对小鼠骨髓树突状细胞成熟和功能的作用及机制研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2016,(第3期),  
马孔阳等.调节性B细胞的功能及其调控机制研究进展.《中国免疫学杂志》.2016,第32卷(第7期), (续)

审查员 梁韶

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

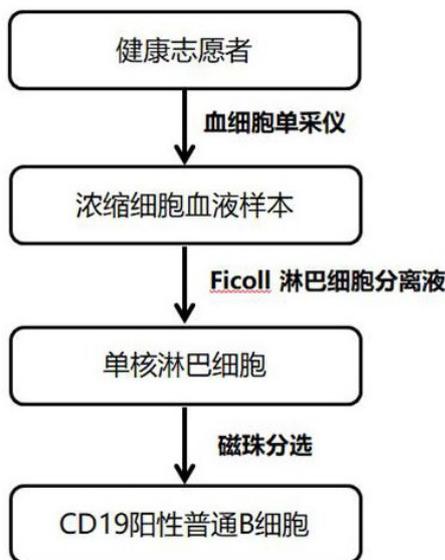
(54)发明名称

GSK-3 $\beta$ 抑制剂在体外诱导人体Breg细胞的用途及分离和诱导Breg细胞的方法

(57)摘要

一种GSK-3 $\beta$ 抑制剂在体外诱导人体Breg细胞的用途,以及利用GSK-3 $\beta$ 抑制剂体外诱导人体Breg细胞的方法,采用GSK-3 $\beta$ 抑制剂在体外诱导人体Breg细胞,以及GSK-3 $\beta$ 抑制剂诱导普通B细胞向Breg细胞转化的效果中,采用GSK-3 $\beta$ 抑制剂诱导Breg细胞诱导纯度高,诱导后Breg炎症性细胞因子分泌减少,诱导后Breg抑制功能增强。采用本发明利用GSK-3 $\beta$ 抑制剂体外诱导人体Breg细胞的方法,操作简单,耗时短,纯度高、细胞活性损伤小,转化效率高,细胞活性高,来源广,污染可能性小,能够弥补目前Breg基础和临床研究上数量不足,为Breg细胞的进一步功能研究提供了一种新的实验方法。

CN 108753714 B



[接上页]

(56)对比文件

Michael Martin et al..Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen

synthase kinase 3.《nature immunology》.2005,第6卷(第8期),

邢陈等.调节性B细胞的研究进展.《国际药学研究杂志》.2015,第42卷(第3期),

1. GSK-3 $\beta$ 抑制剂在体外诱导普通B细胞向CD19<sup>+</sup>CD24<sup>++</sup>CD27<sup>+</sup>Breg细胞亚群转化的用途。
2. 根据权利要求1所述的GSK-3 $\beta$ 抑制剂在体外诱导普通B细胞向CD19<sup>+</sup>CD24<sup>++</sup>CD27<sup>+</sup>Breg细胞亚群转化的用途,其特征在于:采用免疫磁珠分选技术分选出CD19<sup>+</sup>CD24<sup>++</sup>CD27<sup>+</sup> Breg细胞亚群。

## GSK-3 $\beta$ 抑制剂在体外诱导人体Breg细胞的用途及分离和诱导Breg细胞的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及分离和诱导细胞领域,具体的说是GSK-3 $\beta$ 抑制剂在体外诱导人体Breg细胞的用途以及分离和诱导Breg细胞的方法。

### 背景技术

[0002] 目前在动物模型和临床患者中均证实Breg与肾移植急、慢性排斥均密切相关,Breg不但可以预测术后患者发生急、慢性排斥的风险,动物实验中还发现过继性输注Breg可以治疗排斥反应。同时,Breg还能通过分泌相关细胞因子调节其他免疫细胞,实现体内免疫反应的交互影响,维持机体免疫平衡。但是Breg因为在人体内数量极少且无法有效由普通B细胞诱导,目前实验多局限于动物模型,尚无法有效开展人Breg细胞相关研究。对Breg细胞的进一步深入的研究,首先必须建立一种高效的细胞分离和诱导方法。

[0003] Breg的主要特征是产生白细胞介素IL-10和(或)转化生长因子TGF- $\beta$ 等细胞因子,进而起到负向调节作用,但是其缺乏特定的细胞表型,其中CD19<sup>+</sup>CD24<sup>++</sup>CD27<sup>+</sup>是目前研究最为广泛的Breg,并且这群细胞在肾移植患者发生急慢性排斥时均有显著变化,甚至可以预测术后排斥的发生。目前世界上诱导Breg的方式主要通过BAFF(B-cell activating factor)对普通B细胞进行诱导,而该技术诱导纯度仅20~30%左右,无法满足进一步科研和临床研究的需要。

[0004] 细胞治疗是目前有望救治多种疑难疾病的一种新型方案,最近Breg的过继性输注成为细胞治疗的新分支,但是一直困扰Breg过继治疗的是Breg细胞来源比较少,目前的体外诱导效率低并且其活性也低。

### 发明内容

[0005] 针对上述技术问题,本发明提出一种GSK-3 $\beta$ 抑制剂在体外诱导人体Breg细胞的用途。GSK-3 $\beta$ 信号通路是体内免疫细胞的重要通路,在免疫稳态中起着重要作用,发明人在试验中偶然发现可以利用GSK-3 $\beta$ 抑制剂诱导普通B细胞向Breg细胞转化,从而为基础和临床人体Breg相关研究提供新的方法。

[0006] 由此,申请人提出了一种GSK-3 $\beta$ 抑制剂在体外诱导人体Breg细胞的用途,以及利用GSK-3 $\beta$ 抑制剂体外诱导人体Breg细胞的方法。

[0007] 进一步的本发明选择诱导CD19<sup>+</sup>CD24<sup>++</sup>CD27<sup>+</sup> B细胞作为Breg。

[0008] 本发明的目的是针对现有Breg诱导和分离技术的不足,提出GSK-3 $\beta$ 抑制剂在体外诱导人体Breg细胞的用途。以及一种新的分离和诱导Breg细胞的方法,满足实验条件,操作简单,耗时短,转化效率高,能够弥补目前Breg基础和临床研究上数量不足的难题。

[0009] 进一步的,本发明还提出GSK-3 $\beta$ 抑制剂诱导普通B细胞向Breg细胞转化的用途。

[0010] 进一步的,诱导普通B细胞为CD19<sup>+</sup>CD24<sup>++</sup>CD27<sup>+</sup>Breg细胞亚群。

[0011] GSK-3 $\beta$ 抑制剂在体外诱导人体Breg细胞,以及GSK-3 $\beta$ 抑制剂诱导普通B细胞向

Breg细胞转化的效果中,采用GSK-3 $\beta$ 抑制剂诱导Breg细胞诱导纯度高,诱导后Breg炎症细胞因子分泌减少,诱导后Breg抑制功能增强。

[0012] 本发明还提出一种分离和诱导Breg细胞的方法,包括以下步骤:

[0013] 第一步:获取单核淋巴细胞,利用血细胞单采仪获取浓缩人外周血单核淋巴细胞50~80ml,与生理盐水以1:1比例混合,每30ml一份缓慢沿试管壁加入15ml Ficoll单核淋巴细胞分离液上;20℃、2300rpm离心20分钟,取上细胞悬液中间云雾层,即得单核淋巴细胞悬液;

[0014] 第二步:获取CD19<sup>+</sup> B细胞,第一步获得的单核淋巴细胞悬液,20℃、1500rpm离心5分钟加入洗涤两次,弃上清,以25u1 /10<sup>7</sup> 加入生理盐水重悬细胞;加入5u1/10<sup>7</sup>的CD19 Microbeads,室温孵育30分钟,生理盐水洗涤一次后用4mlAUTOMACS BUFFER重悬,启动AUTOMACS机器,设置阳选程序,分选获得CD19阳性细胞;

[0015] 第三步:诱导调节性B细胞Breg的步骤;第二步获得的CD19阳性细胞Breg,20℃、1500rpm离心5分钟加入洗涤两次,弃上清,以0.5\*10<sup>6</sup>/ml 的细胞浓度利用培养基重悬,加入B细胞活化因子BAFF或GSK-3 $\beta$ 抑制剂SB216763进行培养;

[0016] 第四步:纯度和功能检测,3天后10<sup>6</sup>个细胞重悬于100微升PBS中,加入CD19 FITC、CD24 PE、CD27 APC流式抗体,4℃避光孵育30-45分钟,PBS洗涤两次,流式细胞仪检测细胞纯度。

[0017] 进一步优选的,采用免疫磁珠分选技术分选出CD19<sup>+</sup>CD24<sup>++</sup>CD27<sup>+</sup> Breg细胞亚群。

[0018] 进一步优选的,获取所述单核淋巴细胞的步骤包括:

[0019] 筛选健康志愿者,从健康志愿者体内获取血液的步骤;

[0020] 采用血细胞单采仪将获取的血液浓缩细胞血液样本的步骤;

[0021] 采用Ficoll11淋巴细胞分离液,获取单核淋巴细胞的步骤;

[0022] 磁珠分选分离CD19阳性普通B细胞的步骤。

[0023] 进一步优选的,采用Ficoll11淋巴细胞分离液,获取单核淋巴细胞的步骤包括,取血液、PBS和Ficoll11淋巴细胞分离液,血液、PBS和Ficoll11淋巴细胞分离液配比为1:1:1,将血液与PBS充分混合后缓慢沿试管壁加至Ficoll液面之上。37℃、2300rpm离心20分钟,取中间云雾细胞层,获得单核淋巴细胞。

[0024] 按照本发明的方法所分选和诱导出的CD19<sup>+</sup>CD24<sup>++</sup>CD27<sup>+</sup> Breg细胞亚群,更为符合机体处于免疫稳态时Breg细胞的功能状态,而这是传统BAFF诱导方法无法完成的。利用本发明的方法分离和诱导Breg细胞,其优势如下:

[0025] 1、来源广。利用磁珠分选分离普通B细胞并加入GSK-3 $\beta$ 抑制剂体外诱导,其基数大,获得的Breg细胞相比直接从人体内分选CD19<sup>+</sup>CD24<sup>++</sup>CD27<sup>+</sup> Breg细胞亚群,其绝对数量有明显优势;

[0026] 2、细胞活性高。免疫磁珠分选过程段,效率高,能够最大限度保持细胞活性;

[0027] 3、污染可能性小;

[0028] 4、在纯度和功能上明显优于目前的BAFF诱导方法。该细胞分离和诱导技术的成功建立,为Breg细胞的进一步功能研究提供了一种新的实验方法。

[0029] 本发明采用免疫磁珠分选,免疫磁珠分选是一种新型细胞分选技术。磁珠结合细胞表面抗原的特异性标记后通过阴选或阳选获得目标细胞,该方法获得的目的细胞具有操

作简易、耗时短、纯度高、细胞活性损伤小等优点。为了获得更好的诱导人体Breg细胞效果，本发明申请人提出了一种利用磁珠分选仪(AUTOMACS)分离和诱导人体Breg细胞的方法，能够弥补目前Breg基础和临床研究上数量不足的缺点。按照本发明的方法所分选和诱导出的CD19<sup>+</sup>CD24<sup>++</sup>CD27<sup>+</sup> Breg细胞亚群，更为符合机体处于免疫稳态时Breg细胞的功能状态，而这是传统BAFF诱导方法无法完成的。利用本发明的方法分离和诱导Breg细胞，其优势如下：

[0030] 1、来源广。利用磁珠分选分离普通B细胞并诱导，其基数大，获得的Breg细胞相比直接从人体内分选CD19<sup>+</sup>CD24<sup>++</sup>CD27<sup>+</sup> Breg细胞亚群，其绝对数量有明显优势；

[0031] 2、细胞活性高。免疫磁珠分选过程段，效率高，能够最大限度保持细胞活性；

[0032] 3、污染可能性小；

[0033] 4、在纯度和功能上明显优于目前的BAFF诱导方法。该细胞分离和诱导技术的成功建立，为Breg细胞的进一步功能研究提供了一种新的实验方法。

### 附图说明

[0034] 图1普通B细胞获取示意图；

[0035] 图2诱导前CD24<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>细胞比例示意图；

[0036] 图3 普通B细胞诱导纯度图；

[0037] 图4诱导后Breg炎性细胞因子分泌减少显示图；

[0038] 图5诱导后Breg抑制功能增强显示图；

[0039] 图6本发明的流程示意图。

### 具体实施方式

[0040] 实施例1：

[0041] GSK-3 $\beta$ 抑制剂在体外诱导人体Breg细胞的用途。

[0042] 进一步的，GSK-3 $\beta$ 抑制剂诱导普通B细胞向Breg细胞转化的用途。

[0043] 进一步的，诱导普通B细胞为CD19<sup>+</sup>CD24<sup>++</sup>CD27<sup>+</sup>Breg细胞亚群。

[0044] GSK-3 $\beta$ 抑制剂在体外诱导人体Breg细胞，以及GSK-3 $\beta$ 抑制剂诱导普通B细胞向Breg细胞转化的效果中，采用GSK-3 $\beta$ 抑制剂诱导Breg细胞诱导纯度高见图3，诱导后Breg炎性细胞因子分泌减少见图4，诱导后Breg抑制功能增强见图5。

[0045] 如图6所示，一种分离和诱导Breg细胞的方法，包括以下步骤：

[0046] 第一步：获取单核淋巴细胞，利用血细胞单采仪获取浓缩人外周血单核淋巴细胞50~80ml，与生理盐水以1:1比例混合，每30ml一份缓慢沿试管壁加入15ml单核淋巴细胞分离液(Ficoll)上；20℃、2300rpm离心20分钟，取上细胞悬液中间云雾层，即得单核淋巴细胞悬液；

[0047] 第二步：获取CD19<sup>+</sup> B细胞，第一步获得的单核淋巴细胞悬液，20℃、1500rpm离心5分钟加入洗涤两次，弃上清，以25u1 /10<sup>7</sup>细胞加入生理盐水重悬细胞；加入5u1/10<sup>7</sup>的CD19 Microbeads，室温孵育30分钟，生理盐水洗涤一次后用4mlAUTOMACS BUFFER重悬，启动AUTOMACS机器，设置阳选程序，分选获得CD19阳性细胞；

[0048] 第三步：诱导调节性B细胞(Breg)的步骤；第二步获得的CD19阳性细胞Breg，20℃、1500rpm离心5分钟加入洗涤两次，弃上清，以0.5\*10<sup>6</sup>/ml 的细胞浓度利用培养基重悬，加

入B细胞活化因子(BAFF)或GSK-3 $\beta$ 抑制剂SB216763进行培养;

[0049] 第四步:纯度和功能检测,3天后 $10^6$ 个细胞重悬于100微升PBS中,加入CD19 FITC、CD24 PE、CD27 APC流式抗体,4 $^{\circ}$ C避光孵育30-45分钟,PBS洗涤两次,流式细胞仪检测细胞纯度。

[0050] 进一步优选的,采用免疫磁珠分选技术分选出CD19 $^+$ CD24 $^{++}$ CD27 $^+$  Breg细胞亚群。

[0051] 如图1所示,进一步优选的,获取所述单核淋巴细胞的步骤包括:

[0052] 筛选健康志愿者,从健康志愿者体内获取血液的步骤;

[0053] 采用血细胞单采仪将获取的血液浓缩细胞血液样本的步骤;

[0054] 采用Ficoll淋巴细胞分离液,获取单核淋巴细胞的步骤;

[0055] 磁珠分选分离CD19阳性普通B细胞的步骤。

[0056] 进一步优选的,采用Ficoll淋巴细胞分离液,获取单核淋巴细胞的步骤包括,取血液、PBS和Ficoll淋巴细胞分离液(1:1:1),将血液与PBS充分混合后缓慢沿试管壁加至Ficoll液面之上。37 $^{\circ}$ C、2300rpm离心20分钟,取中间云雾细胞层,获得单核淋巴细胞。

[0057] 用流式细胞仪检测诱导前健康志愿者外周血中CD19+CD24 $^{++}$ CD27 $^+$  Breg细胞占B细胞的比例为 $3.8 \pm 0.7\%$ (图2为其中一例志愿者外周血中CD19 $^+$ CD24 $^{++}$ CD27 $^+$  Breg细胞比例)。

[0058] 实施例2:

[0059] 1实验材料

[0060] 1.1 样本获取

[0061] 从南京医科大学志愿者获取血液样本。

[0062] 1.2 所需试剂和实验器材

[0063] CD19 FITC,CD24 PE, CD27 APC流式抗体(Miltenyi Biotec);

[0064] 培养基(RPMI 1640, 10% FBS, 100mg/ml streptomycin, 10000U/ml penicilin, Gibco);

[0065] AUTOMACS(MACS);

[0066] Flow cytometer流式细胞仪(BD);

[0067] 细胞培养箱(Thermo);

[0068] 显微镜(Zeiss Axiovert)。

[0069] 2 方法

[0070] 2.1 外周血单核淋巴细胞的获取

[0071] 如图1所示,首先,招募志愿者(6名),签署知情同意后,由血液科专业医师利用血细胞单采仪采集志愿者的外周血单个核细胞标本。获得标本后,利用淋巴细胞分离液进行离心分离,提取出其中的淋巴细胞和单核细胞。

[0072] 具体的,利用血细胞单采仪(血细胞单采机)分离人体(6例健康志愿者)内单核淋巴细胞约 $2 \times 10^9$ 个(约80ml血液)。取血液、PBS和Ficoll淋巴细胞分离液(1:1:1),将血液与PBS充分混合后缓慢沿试管壁加至Ficoll液面之上。37 $^{\circ}$ C、2300rpm离心20分钟,取中间云雾细胞层,即单核淋巴细胞。

[0073] 然后,将细胞表面染上CD19磁珠,再通过autoMACS免疫磁珠细胞分选仪,将CD19阳性的普通B细胞分选提纯,并利用流式细胞仪进行检测。

[0074] 具体的,利用流式细胞仪对autoMACS磁珠细胞分选仪分选出的CD19+B细胞进行检

测。在细胞表面染上CD19、CD24、CD27的流式抗体。通过流式细胞仪分析检测,圈出CD19+B细胞,再进一步分析这群细胞中CD24、CD27双阳的细胞比例,如图2所示约占3.26%左右。

[0075] 2.2磁珠分选分离CD19阳性普通B细胞。

[0076] 根据细胞计数结果,加入相应剂量CD19 Microbeads,室温 30分钟。经AUTOMACS磁珠分选仪阳选获得CD19阳性普通B细胞,PBS洗涤一次。

[0077] 2.3诱导调节性B细胞。

[0078] 以 $0.5 \times 10^6$ /ml 的细胞浓度利用培养基重悬,加入B细胞活化因子(BAFF)或者GSK-3 $\beta$ 抑制剂SB216763进行培养3天。

[0079] 具体的,将autoMACS分选出的CD19+B细胞在体外进行人工诱导,诱导其向CD24+CD27+细胞分化。分别设置未处理组、B细胞激活因子(BAFF)组、GSK-3 $\beta$ 抑制剂(SB216763)组。

[0080] 2.4 纯度检测。

[0081] 加入相应的试剂3天后,用流式细胞仪分别检测每组样本的CD19+B细胞中CD24+CD27+细胞的比例。

[0082] 具体的,3天后 $10^6$ 个细胞重悬于100微升PBS中,加入CD19 FITC、CD24 PE、CD27 APC流式抗体,4℃避光孵育30-45分钟,PBS洗涤两次,流式细胞仪检测细胞纯度,结果表明GSK-3 $\beta$ 抑制剂组能够显著提升CD24+CD27+细胞的比例(对照组;BAFF组;抑制剂组分别为5.7%;24.1%;42.6%)。GSK-3 $\beta$ 抑制剂诱导组纯度明显增高(见图3)。

[0083] 2.5细胞因子和抑制能力检测

[0084] 将按上述方法分得的细胞在3天后检测炎性细胞因子(IFN- $\alpha$ 1,IFN- $\beta$ 1),其分泌水平明显下降(见图4)。与效应T细胞已一定比例共培养(1:2,1:4,1:8,Breg:T cell),4天后检测T细胞增殖水平,发现通过磁珠分选和抑制剂诱导的方法获得Breg细胞具有较强的抑制功能(见图5)。

[0085] 图4为诱导后Breg炎性细胞因子分泌减少显示图(h为培养小时数,none为对照组,BAFF为B细胞激活因子组,SB为GSK-3 $\beta$ 抑制剂组),将不同处理组的Breg细胞在处理8小时、72小时,分别进行检测炎性因子的表达情况。IFN- $\alpha$ 1和IFN- $\beta$ 1都是干扰素(interferon,IFN)家族的两种类型,都参与了炎性环境的发生发展。通过流式检测发现,在处理后的早期(8h),三组的IFN分泌无差异。但在处理后期(72h),SB组的IFN分泌量明显少于对照组和BAFF组。

[0086] 图5为诱导后Breg抑制功能增强显示图:将分离提纯的CD19+B细胞在体外进行人工诱导,分别应用B细胞激活因子(BAFF)、GSK-3 $\beta$ 抑制剂(SB216763)处理。在处理3天后,将每组的B细胞与效应T细胞分别以Breg:T cell=1:2,1:4,1:8的比例进行混合共培养。共培养4天后,利用流式进行CFSE检测,检测效应T细胞的增殖情况。结果发现,经SB处理过的Breg抑制能力得到增强。在1:2,1:4,1:8比例下,SB组的抑制效率分别为60%,45%,30%。而对对照组和BAFF组分别为42%,35%,15%和52%,39%,17%。

[0087] 除上述实施外,本发明还可以有其他实施方式。凡采用等同替换或等效变换形成的技术方案,均落在本发明要求的保护范围。

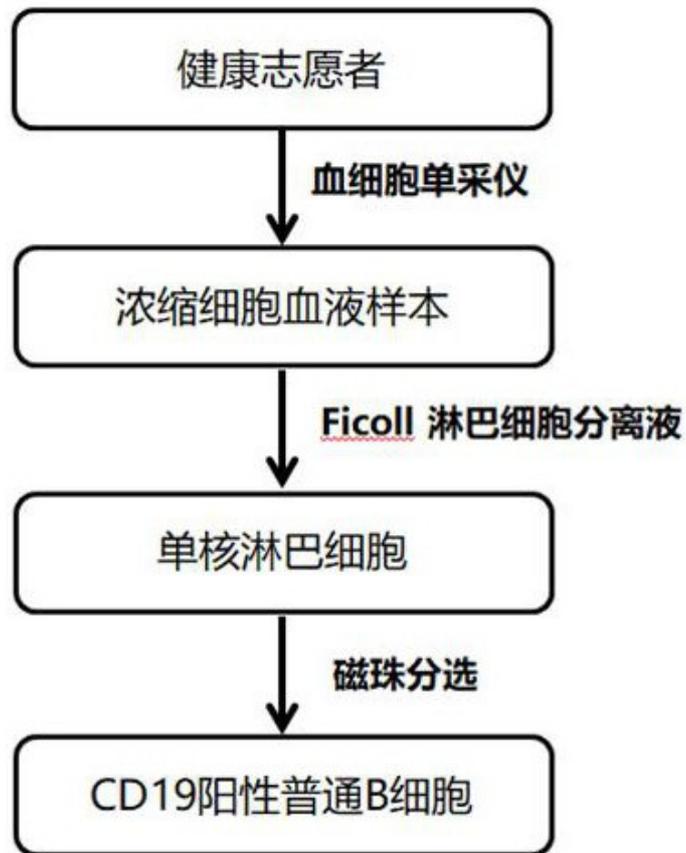


图 1

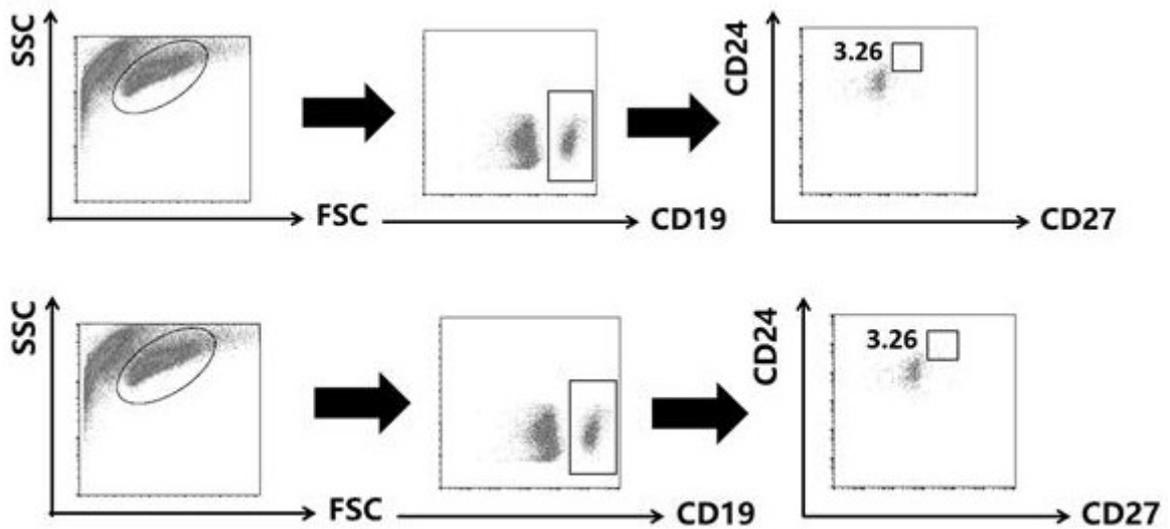


图 2

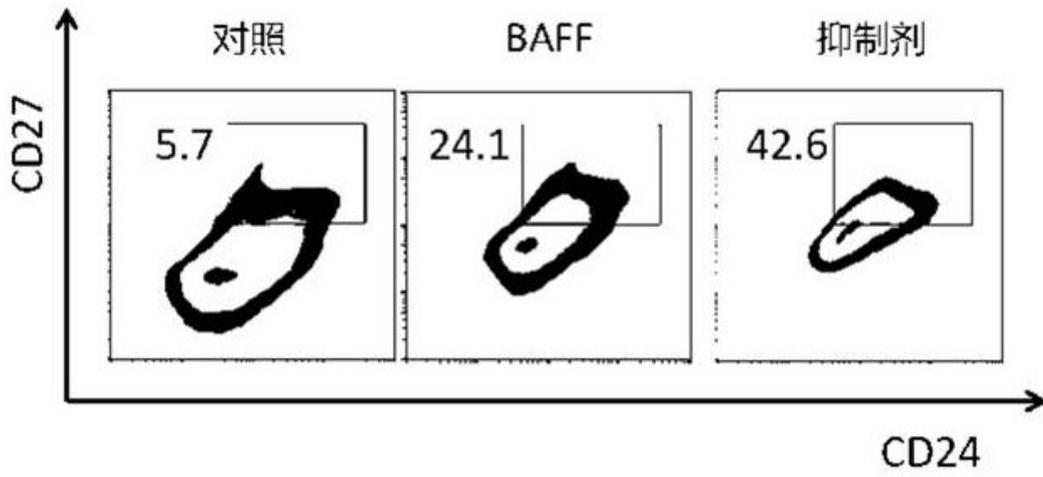


图 3

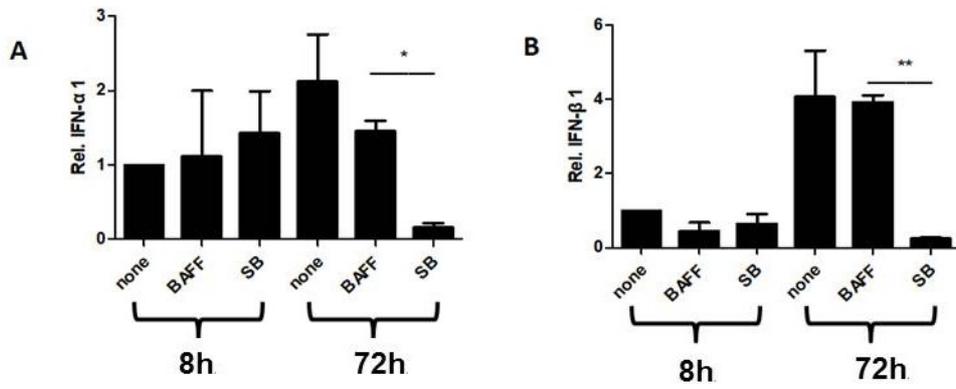


图 4

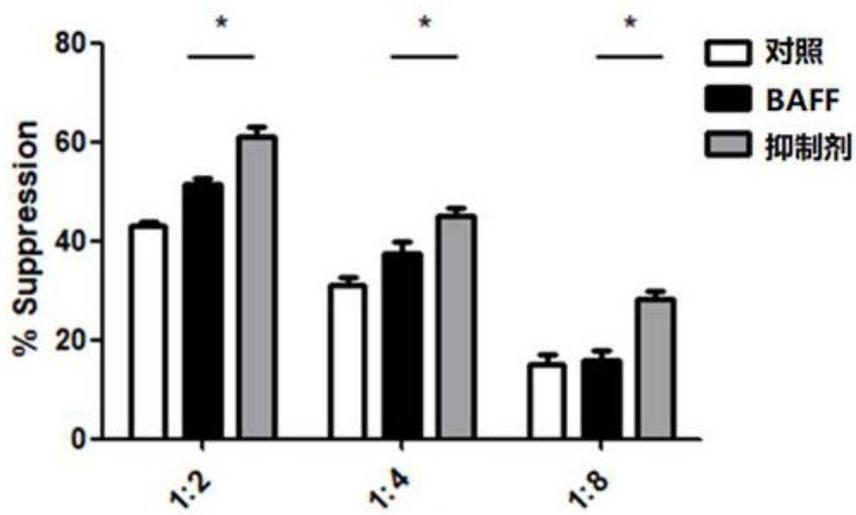


图 5

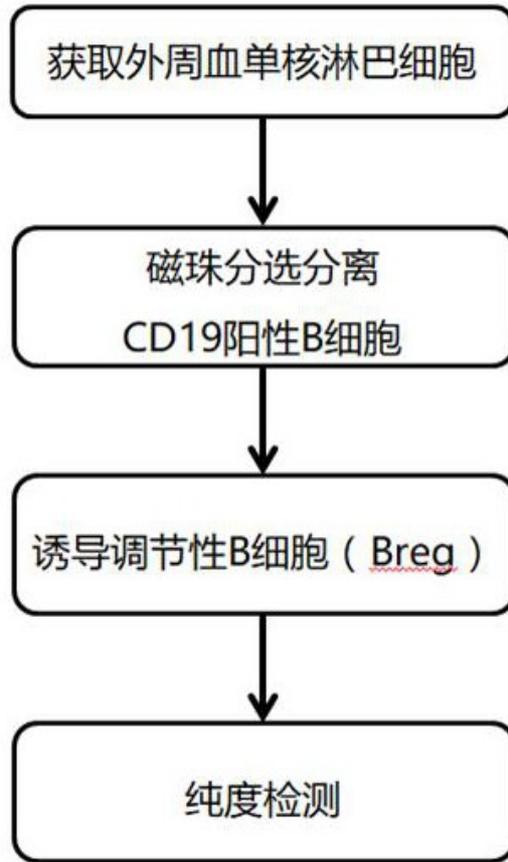


图 6