



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117187180 B

(45) 授权公告日 2024.01.26

(21) 申请号 202311457241.4

(22) 申请日 2023.11.03

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 117187180 A

(43) 申请公布日 2023.12.08

(73) 专利权人 四川大学
地址 610000 四川省成都市武侯区一环路
南一段24号

(72) 发明人 张敦房 孙毓彤 张伟

(74) 专利代理机构 成都高远知识产权代理事务
所(普通合伙) 51222
专利代理师 李高峡 张娟

(51) Int. Cl.
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104436191 A, 2015.03.25
US 2012269765 A1, 2012.10.25
CN 114703134 A, 2022.07.05
CN 112345747 A, 2021.02.09
AU 2014200661 A1, 2014.03.13
CA 3147735 A1, 2021.02.04
CN 103328513 A, 2013.09.25
GB 0822345 D0, 2009.01.14
IN 202047053501 A, 2020.12.25
US 2020270344 A1, 2020.08.27
WO 2022056199 A1, 2022.03.17
WO 2022117773 A1, 2022.06.09
WO 2022256620 A1, 2022.12.08
葛彦 王勤 主编.《医学免疫学实验技术》.
苏州大学出版社, 2020, 第67-69页. (续)

审查员 李捷

权利要求书2页 说明书13页 附图2页

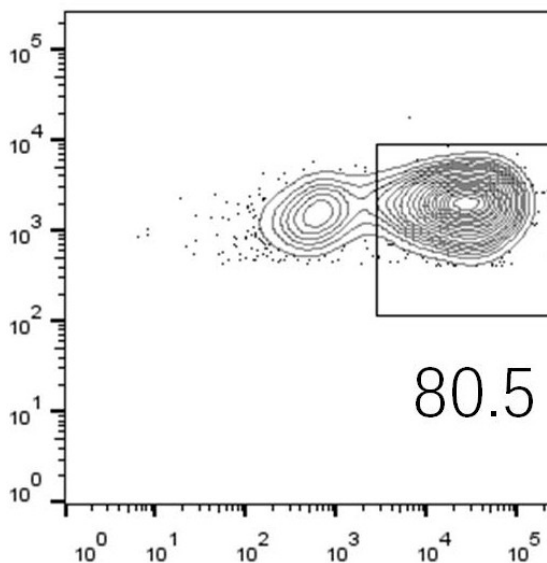
(54) 发明名称

一种Th17细胞及其培养方法和应用及其诱导液

(57) 摘要

本发明提供了一种Th17细胞及其培养方法和应用及其诱导液,属于医学技术领域。本发明的Th17细胞诱导液,它包括Kifunensine,以及如下组分中的任意一种或多种:TGF-β、IL-6、抗IL2抗体、抗IFN-γ抗体、抗IL4抗体、IL-23和IL-1β。本发明采用的体外培养方法简单,添加试剂种类少,培养时间短,容易操作。本发明将应用到体外培养促进Th17细胞中,且使用本发明TGF-β+IL-6+抗IL-2抗体+Kifunensine分化出来的Th17细胞不仅比例高,稳定性好,且本发明分化出来的Th17细胞的IL-17A基因表达量以及转录因子RORγt表达量最高。本发明在分化机制方面探索以及与Th17细胞在抗菌(抗感染)、抗肿瘤和

提升免疫力方面的作用以及Th17细胞与相关自身免疫疾病的研究有良好的应用前景。



CN 117187180 B

[接上页]

(56) 对比文件

施蕾;林洁平;廖淑珍;招春飞;刘华锋;潘庆军.从鼠源到全人源单克隆抗体制备技术及改造策略的研究进展.中国实验动物学报.2018,(第04期),全文.

Antonie Zwiers 等.A polymorphism in the coding region of IL12b promoters IL-12p70 and IL-23 heterodimer formation.《the Journal of Immunology》.2011,全文.

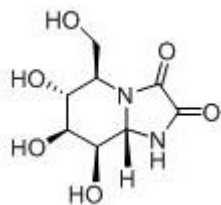
Christie-Lynn Mortales 等.N-glycan branching decouples B cell innate and adaptive immunity to control inflammatory demyelination.《iScience》.2020,全文.

施蕾;林洁平;廖淑珍;招春飞;刘华锋;潘庆军.从鼠源到全人源单克隆抗体制备技术及改造策略的研究进展.中国实验动物学报.2018,(04),全文.

1. 一种极化和扩增Th17细胞的诱导液,其特征在于,所述诱导液包括如下重量配比的组分:

化合物1	10 μ M;
TGF- β	2ng/mL;
IL-6	50ng/mL;
或,	
化合物1	1-100 μ M;
TGF- β	0.1-5ng/mL;
IL-6	10-100ng/mL;
抗IL2抗体	1-50 μ g/mL;
或,	
化合物1	10 μ M;
TGF- β	2ng/mL;
IL-6	50ng/mL;
抗IL2抗体	30 μ g/mL;
抗IFN- γ 抗体:	10 μ g/mL;
抗IL4抗体:	10 μ g/mL;
或,	
化合物1	10 μ M;
TGF- β	2ng/mL;
IL-6	50ng/mL;
抗IL2抗体	30 μ g/mL;
抗IFN- γ 抗体:	10 μ g/mL;
抗IL4抗体:	10 μ g/mL;
IL-23:	10ng/mL;
IL-1 β :	10ng/mL;
或,	
化合物1	1-100 μ M;
TGF- β	0.1-5ng/mL;
IL-6	10-100ng/mL;
抗IL2抗体	1-50 μ g/mL;
IL-1 β :	1-50ng/mL;

其中所述化合物1为Ki funensine;化合物1结构如式I所示:



式I。

2. 权利要求1所述的Th17细胞的诱导液,其特征在于,所述诱导液包括如下重量配比的组分:

化合物1	10 μ M;
TGF- β	2ng/mL;
IL-6	50ng/mL;
抗IL2抗体	30 μ g/mL;
或;	
化合物1	10 μ M;
TGF- β	2ng/mL;
IL-6	50ng/mL;
抗IL2抗体	30 μ g/mL;
IL-1 β :	1-50ng/mL。

3. 权利要求2所述的Th17细胞的诱导液,其特征在于,所述诱导液包括如下重量配比的组分:

化合物1	10 μ M;
TGF- β	2ng/mL;
IL-6	50ng/mL;
抗IL2抗体	30 μ g/mL;
IL-1 β :	1ng/mL。

4. 一种Th17细胞培养方法,其特征在于:步骤如下:取幼稚T细胞,培养,采用权利要求1-3任一项所述的诱导液诱导分化。

5. 根据权利要求4所述的培养方法,其特征在于:

所述培养采用的培养基包括基础培养基及添加物组成,其中,基础培养基为DMEM,添加物及在基础培养基中的添加量分别为:

胎牛血清,所述胎牛血清与DMEM基础培养基的体积比为(8~15):(92~85)、非必需氨基酸0.1mM、丙酮酸1mM、4-羟乙基哌嗪乙磺酸20mM、 β -巯基乙醇3.6 μ M、L-谷氨酰胺2mM、200 Units/mL青霉素、200 ug/mL链霉素、抗CD28抗体1.5 μ g/mL和1.5 μ g/mL 抗CD3抗体。

6. 根据权利要求5所述的培养方法,其特征在于:

所述培养的时间为 48-97 h;培养的环境为37 $^{\circ}$ C,5%CO₂。

7. 根据权利要求6所述的培养方法,其特征在于:所述胎牛血清与DMEM基础培养基的体积比为10:90;所述培养的时间为 72 h。

一种Th17细胞及其培养方法和应用及其诱导液

技术领域

[0001] 本发明属于医学技术领域,具体涉及一种Th17细胞及其培养方法和应用及其诱导液。

背景技术

[0002] 辅助性T 细胞17(T helper cell 17, Th17细胞)是一种新发现的能够分泌白细胞介素17(interleukin17, IL-17)的T 细胞亚群。Th17细胞在自身免疫性疾病和机体防御反应中具有重要的意义,Th17细胞还具有很强的促炎作用,在清除细胞外病原体特别是在黏膜和上皮屏障处也至关重要,还有研究证明Th17细胞在抗感染抗肿瘤方面具有重要作用。Th17细胞已经成为抗炎和免疫治疗的重要靶点,在体外诱导出大量Th17细胞至关重要。

[0003] 目前Th17细胞体外诱导分化主要以TGF- β 和IL-6作为主要的诱导因子共同促进Th17细胞分化,并且使用细胞因子IL-21促进或维持Th17细胞的分化。

[0004] β 转化生长因子(transforming growth factor b, TGF- β)、IL-6、IL-23 和IL-21 在Th17 细胞的分化形成过程中起着积极的促进作用,而 γ 干扰素(interferon γ , IFN- γ)、IL-4、细胞因子信号传送阻抑蛋白3(suppressor of cytokine signaling 3, Socs3)和IL-2则抑制它的分化。

[0005] 目前认为维甲酸相关孤儿核受体- γ t (ROR γ t)是Th17细胞的主要转录调节因子,驱使细胞因子IL-17A、IL-17F和IL-22等的表达。由于 ROR γ t 在 Th17 细胞中的关键作用,因此检测Th17 细胞中ROR γ t 基因表达对研究 Th17分化水平很重要。

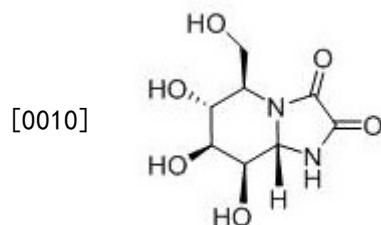
[0006] 目前,Th17细胞体外分化的方法并不能得到大量的IL-17A表达量高的Th17细胞,因此开发一种简单的IL-17A表达量高的Th17细胞体外培养方法至关重要。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种Th17细胞及其培养方法和应用与诱导液。

[0008] 本发明提供了一种极化和扩增Th17细胞的诱导液,它包括化合物1,以及如下组分中的任意一种或多种:TGF- β 、IL-6、抗IL2抗体、抗IFN- γ 抗体、抗IL4抗体、IL-23和IL-1 β ;

[0009] 化合物1结构式I如式所示:



[0011] 式I。

[0012] 进一步地,所述诱导液包括如下重量配比的组分:

[0013] 化合物1 1-100 μ M;

[0014] TGF- β 0.01-5ng/ml;

- [0015] IL-6 1-100ng/ml;
- [0016] 或,
- [0017] 化合物1 1-100 μ M;
- [0018] TGF- β 0.01-5ng/ml;
- [0019] IL-6 1-100ng/ml;
- [0020] 抗IL2抗体 1-50 μ g/ml;
- [0021] 或,
- [0022] 化合物1 1-100 μ M;
- [0023] TGF- β 0.01-5ng/ml;
- [0024] IL-6 1-100ng/ml;
- [0025] 抗IL2抗体 1-50 μ g/ml;
- [0026] 抗IFN- γ 抗体 1-50 μ g/ml;
- [0027] 抗IL4抗体 1-50 μ g/ml;
- [0028] 或,
- [0029] 化合物1 1-100 μ M;
- [0030] TGF- β 0.01-5ng/ml;
- [0031] IL-6 1-100ng/ml;
- [0032] 抗IL2抗体 1-50 μ g/ml;
- [0033] 抗IFN- γ 抗体 1-50 μ g/ml;
- [0034] 抗IL4抗体 1-50 μ g/ml;
- [0035] IL-23: 1-100ng/ml;
- [0036] IL-1 β : 1-100ng/ml;
- [0037] 或,
- [0038] 化合物1 1-100 μ M;
- [0039] TGF- β 0.01-5ng/ml;
- [0040] IL-6 1-100ng/ml;
- [0041] 抗IL2抗体 1-50 μ g/ml;
- [0042] IL-1 β : 1-100ng/ml。
- [0043] 进一步地,所述诱导液包括如下重量配比的组分:
- [0044] 化合物1 5-15 μ M;
- [0045] TGF- β 1-4ng/ml;
- [0046] IL-6 30-70ng/ml;
- [0047] 或,
- [0048] 化合物1 5-15 μ M;
- [0049] TGF- β 1-4ng/ml;
- [0050] IL-6 30-70ng/ml;
- [0051] 抗IL2抗体 20-40 μ g/ml;
- [0052] 或,
- [0053] 化合物1 5-15 μ M;

- [0054] TGF- β 1-4ng/ml;
- [0055] IL-6 30-70ng/ml ;
- [0056] 抗IL2抗体 20-40 μ g/ml;
- [0057] 抗IFN- γ 抗体 5-20 μ g/ml;
- [0058] 抗IL4抗体 5-20 μ g/ml;
- [0059] 或,
- [0060] 化合物1 5-15 μ M;
- [0061] TGF- β 1-4ng/ml;
- [0062] IL-6 30-70ng/ml;
- [0063] 抗IL2抗体 20-40 μ g/ml;
- [0064] 抗IFN- γ 抗体 5-20 μ g/ml;
- [0065] 抗IL4抗体 5-20 μ g/ml;
- [0066] IL-23: 5-20ng/ml;
- [0067] IL-1 β : 5-20ng/ml;
- [0068] 或,
- [0069] 化合物1 5-15 μ M;
- [0070] TGF- β 1-4ng/ml;
- [0071] IL-6 30-70ng/ml;
- [0072] 抗IL2抗体 20-40 μ g/ml;
- [0073] IL-1 β : 1-5ng/ml。
- [0074] 进一步地,所述诱导液包括如下重量配比的组分:
- [0075] 化合物1 10 μ M;
- [0076] TGF- β 2ng/mL;
- [0077] IL-6 50ng/mL;
- [0078] 或,
- [0079] 化合物1 10 μ M;
- [0080] TGF- β 2ng/mL;
- [0081] IL-6 50ng/mL;
- [0082] 抗IL2抗体 30 μ g/mL;
- [0083] 或,
- [0084] 化合物1 10 μ M;
- [0085] TGF- β 2ng/mL;
- [0086] IL-6 50ng/mL;
- [0087] 抗IL2抗体 30 μ g/mL;
- [0088] 抗IFN- γ 抗体: 10 μ g/mL;
- [0089] 抗IL4抗体: 10 μ g/mL;
- [0090] 或;
- [0091] 化合物1 10 μ M;
- [0092] TGF- β 2ng/mL;

- [0093] IL-6 50ng/mL;
[0094] 抗IL2抗体 30 μ g/mL;
[0095] 抗IFN- γ 抗体: 10 μ g/mL;
[0096] 抗IL4抗体: 10 μ g/mL;
[0097] IL-23: 10ng/mL;
[0098] IL-1 β : 10ng/mL;
[0099] 或,
[0100] 化合物1 10 μ M;
[0101] TGF- β 2ng/mL;
[0102] IL-6 50ng/mL;
[0103] 抗IL2抗体 30 μ g/mL;
[0104] IL-1 β : 1ng/mL。

[0105] 本发明还提供了一种Th17细胞培养方法,其步骤如下: 取幼稚T细胞,培养,采用上述诱导液诱导分化。

[0106] 进一步地,所述培养采用的培养基包括基础培养基及添加物组成,其中,基础培养基为DMEM,添加物及在基础培养基中的添加量分别为:

[0107] 胎牛血清,所述胎牛血清与DMEM基础培养基的体积比为(8~15):(92~85)、非必需氨基酸0.1mM、丙酮酸1mM、4-羟乙基哌嗪乙磺酸20mM、 β -巯基乙醇3.6 μ M、L-谷氨酰胺2mM、200 Units /mL青霉素、200 ug/mL链霉素、抗CD28抗体1.5 μ g/mL和1.5 μ g/mL 抗CD3抗体。

[0108] 进一步地,所述培养的时间为 48-97 h;培养的环境为37 $^{\circ}$ C,5%CO₂。

[0109] 进一步地,所述胎牛血清与DMEM基础培养基的体积比为为10:90;所述非必需氨基酸购买自赛默飞世尔科技公司,货号为Cat# 11140050;所述培养的时间为 72 h。

[0110] 本发明还提供了一种上述的培养液诱导幼稚T细胞分化的Th17细胞或由上述方法制备的Th17细胞。

[0111] 本发明还提供了一种上述的Th17细胞在制备自身免疫疾病治疗药物、抗菌剂、治疗和/或预防肿瘤药物、和/或提升免疫力药物中的应用。

[0112] 其中DMEM为高糖型DMEM(高于4500mg/L)。

[0113] 本发明有益效果为本发明提供了一种Th17细胞及其培养方法和应用及其诱导液。

[0114] Th17细胞是IL-17A的主要来源,同时也可以产生IL-17F,他们各自发挥着特定的生物学功能。IL-17A一方面可以通过招募中性粒细胞、产生抗菌肽和增强屏障的功能以增强对细菌和真菌感染的保护性作用,另一方面可以在自身免疫过程中驱动炎症反应。靶向IL-17A途径目前已经是治疗自身免疫性和慢性炎症性疾病的关键。

[0115] 综上,本发明提供了一种Th17细胞及其培养方法和应用与诱导液及化合物的用途,本发明将Kifunensine应用到体外培养促进Th17细胞分化中,发现当 Kifunensine与TGF- β 、IL-6,或TGF- β 、IL-6、抗IL-2抗体,或TGF- β 、IL-6、抗IL-2抗体、抗IFN- γ 抗体、抗IL-4抗体,或TGF- β 、IL-6、抗IL-2抗体、抗IFN- γ 抗体、抗IL-4抗体、IL-23、IL-1 β 共同作用时,能够促增并极化Th17细胞,幼稚T细胞分化出来的Th17细胞不仅比例高,且本发明分化出来的Th17细胞的IL-17A基因表达水平高,分泌IL-17F的细胞比例、和分泌IL-10的细胞比例显著降低,且分泌的其他细胞因子,如IL-17F 和IL-10比例低,IL-17F 和IL-10基因表达水平

也低,尤其是当Kifunensine与TGF- β 、IL-6、抗IL-2抗体共同作用时效果尤为显著。本发明采用的体外培养方法简单,培养时间短,容易操作。本发明在分化机制方面探索以及与Th17细胞在抗菌(抗感染)、抗肿瘤和提升免疫力方面的作用以及Th17细胞与相关自身免疫疾病的研究有良好的应用前景。

[0116] 显然,根据本发明的上述内容,按照本领域的普通技术知识和惯用手段,在不脱离本发明上述基本技术思想前提下,还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

[0117] 以下通过实施例形式的具体实施方式,对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

附图说明

[0118] 图1对照组5诱导条件下Th17细胞分化的流式图。

[0119] 图2实验组5诱导条件下Th17细胞分化的流式图。

具体实施方式

[0120] 本发明所用原料与设备均为已知产品,通过购买市售产品所得。

[0121] 本发明所用小鼠购于上海南方模式生物科技有限公司。

[0122] DMEM(Thermo Fisher Scientific,Cat# G6152)属于高糖型(高于4500mg/L)。

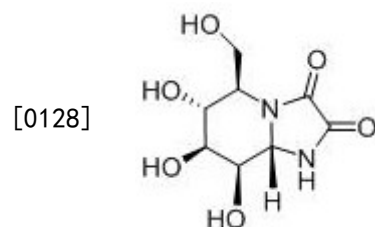
[0123] Th17细胞主要分泌IL-17A、IL-17F和IL-22。IL-17A是Th17细胞因子的原型,也是Th17细胞分泌的最重要的效应物。

[0124] 人TGF- β 1 2ng/mL(R&D Systems,Cat# 299-LT),小鼠IL-6 50ng/mL(R&D Systems,Cat# 406-ML)。

[0125] 抗体:小鼠抗IL-2抗体(抗IL2抗体) 30 μ g/mL(R&D Systems),小鼠抗IFN- γ 抗体(抗IFN- γ 抗体)10 μ g/mL(Bio X Cell),小鼠抗IL-4抗体(抗IL4抗体)10 μ g/mL(Bio X Cell),抗CD28抗体(Bio X Cell,Cat# BE0001-1),抗CD3抗体(Bio X Cell,Cat# BE0015-1)。

[0126] Kifunensine 10 μ M(Tocris Bioscience,Cat# 3207/1)。

[0127] Kifunensine:购买于Tocris Bioscience,货号3207/1,CAS号:109944-15-2,结构式如下:



[0129] 3] 实施例1、本发明Th17细胞体外培养

[0130] 一、实验方法

[0131] (一)naïve T细胞提取

[0132] 从C57BL/6J小鼠中取脾脏、外周淋巴结、肠系膜淋巴结,使用红细胞裂解液处理后利用磁珠分离技术富集CD4CD62L T细胞(CD4CD62L T cell Isolation Kit, mouse,

Miltenyi Biotec, Cat# 130-106-643), 即幼稚T细胞 (naïve T细胞)。

[0133] (二) 实验分组以及Th17细胞体外培养

[0134] 1、配置CDMEM细胞完全培养基

[0135] 在DMEM (Thermo Fisher Scientific, Cat# G6152) 中添加10%胎牛血清 (Viva Cell, Cat#2910-0500)、0.1mM非必需氨基酸 (Thermo Fisher Scientific, Cat#11140050)、1mM丙酮酸 (Thermo Fisher Scientific, Cat# 11360070)、20mM 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) (Thermo Fisher Scientific, Cat#118-089-721)、3.6 μ M β -巯基乙醇 (Millipore Sigma, Cat# M3148)、2mM L-谷氨酰胺 (Thermo Fisher Scientific, Cat# 25030081)、200Units/mL 青霉素 (Penicillin)、200 ug/mL链霉素 (Streptomycin) (Thermo Fisher Scientific, Cat#15140122); 前述浓度为培养基中各成分的终浓度。

[0136] 2、分化Th17细胞

[0137] 48孔板先经过1.5 μ g/mL 抗CD3抗体的包被液包被4 $^{\circ}$ C过夜备用, 使用前先需要将包被液吸出。

[0138] 将naïve T 细胞用前述CDMEM培养基重悬, 细胞密度为 0.5×10^6 /mL, 加入终浓度为1.5 μ g/mL抗CD28抗体, 将其每孔500 μ L体积加入到吸出包被液的48孔板中后, 按照对照组, 实验组对应的诱导剂加入到孔板中, 并置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂孵箱中培养72h后进行流式染色。

[0139] 设置2个大组:

[0140] 第一大组为对照组, 分别为:

[0141] 对照组1: 空白对照;

[0142] 对照组2: TGF- β ;

[0143] 对照组3: IL-6;

[0144] 对照组4: TGF- β 、IL-6;

[0145] 对照组5: TGF- β 、IL-6、抗IL-2抗体;

[0146] 对照组6: TGF- β 、IL-6、抗IL-2抗体、抗IFN- γ 抗体、抗IL-4抗体;

[0147] 对照组7: TGF- β 、IL-6、抗IL-2抗体、抗IFN- γ 抗体、抗IL-4抗体、IL-23、IL-1 β ;

[0148] 对照组8: IL-6、IL-23、IL-1 β 。

[0149] 第二大组为实验组, 为在对照组上分别添加Kifunensine:

[0150] 实验组1: 仅加入Kifunensine;

[0151] 实验组2: TGF- β 、Kifunensine;

[0152] 实验组3: IL-6、Kifunensine;

[0153] 实验组4: TGF- β 、IL-6、Kifunensine;

[0154] 实验组5: TGF- β 、IL-6、抗IL-2抗体、Kifunensine;

[0155] 实验组6: TGF- β 、IL-6、抗IL-2抗体、抗IFN- γ 抗体、抗IL-4抗体、Kifunensine;

[0156] 实验组7: TGF- β 、IL-6、抗IL-2抗体、抗IFN- γ 抗体、抗IL-4抗体、IL-23、IL-1 β 、Kifunensine;

[0157] 实验组8: IL-6、IL-23、IL-1 β 、Kifunensine。

[0158] 其中各诱导因子添加物组分最终浓度为:

[0159] TGF- β : 2ng/mL

[0160] IL-6:50ng/mL

[0161] 抗IL-2抗体:30 μ g/mL

[0162] Kifunensine:10 μ M

[0163] 抗IFN- γ 抗体:10 μ g/mL

[0164] 抗IL-4抗体:10 μ g/mL

[0165] IL-23:10ng/mL

[0166] IL-1 β :10ng/mL

[0167] (三)流式细胞术检测分析

[0168] 1、具体步骤:

[0169] 细胞因子染色:收集培养的细胞通过高尔基体阻断剂(Golgi-Plug)按原液1:1000稀释(BD Biosciences,Cat# 555029),佛波醇乙酯(PMA,5ng/ml,Millipore Sigma,Cat# P8139),离子霉素(Ionomycin,1 μ g/ml,Millipore Sigma,Cat# I3909)于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂再刺激3h。离心弃去上清后加入50 μ L含Zombie Yellow(biolgend,Cat#423103)的PBS,室温避光孵育10min。然后对表面抗原染色(Percp-Cy5.5标记的抗小鼠CD4单抗,Thermo Fisher Scientific,Cat# 45-0042-82、FITC标记的抗小鼠CD8 α 单抗,Thermo Fisher Scientific,Cat#11-0081-85、APC-Cy7标记的抗小鼠TCR β 单抗,Thermo Fisher Scientific,Cat# 47-5961-82)4 $^{\circ}$ C孵育20min,用FACS(0.2%BSA/500mLPBS)洗涤一次。将细胞固定,破膜(BD Biosciences,Cat#554714)4 $^{\circ}$ C孵育20min,进行胞内细胞因子染色(PE-Cy7标记的抗小鼠IL-17A单抗,Thermo Fisher Scientific,Cat# 25-7177-82、PE标记的抗小鼠IL-17F单抗,Thermo Fisher Scientific,Cat#12-7471-82、APC标记的抗小鼠IL-10单抗,Thermo Fisher Scientific,Cat#17-7101-82)4 $^{\circ}$ C孵育40min,FACS洗涤一次并重悬。用流式细胞仪进行检测。

[0170] 转录因子染色:收集培养的细胞入50 μ L含Zombie Yellow的PBS,室温避光孵育10min。然后对表面抗原染色(Percp-Cy5.5标记的抗小鼠CD4单抗、FITC标记的抗小鼠CD8 α 单抗、APC-Cy7标记的抗小鼠TCR β 单抗、PE-Cy7标记的抗小鼠CD25单抗,Thermo Fisher Scientific,Cat#25-0257-42)4 $^{\circ}$ C孵育20min,用FACS洗涤一次。将细胞固定,破膜(Thermo FisherScientific,Cat# 00-5523-00)4 $^{\circ}$ C孵育60min,进行胞内细胞因子染色(APC标记的抗小鼠ROR γ t单抗,Thermo Fisher Scientific,Cat# 17-6981-82)4 $^{\circ}$ C孵育60min,FACS洗涤一次并重悬。用流式细胞仪检测。

[0171] 荧光定量PCR:收集培养的细胞,使用总RNA提取试剂盒提取RNA(天漠生物,Cat# TR205-200)。再利用反转录试剂盒去除RNA中的DNA并进行反转录反应(PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser,Takara,Code No. RR047A),然后进行实时荧光定量检测(TBGreen[®] Premix Ex Taq[™] II,Takara,Code No.RR820A)。

[0172] 2、分析方法

[0173] 流式分析采用FlowJo 10 软件,统计学分析采用GraphPad Prism 9软件,数值变量以均数 \pm 标准差表示,每组之间采用2way ANOVA检验,* P < 0.05,*** P <0.001,**** P <0.0001。

[0174] 二、实验结果

[0175] (一)Th17细胞分化结果

[0176] 各组Th17细胞分化结果如表1所示。

[0177] 表1 Th17细胞分化率(%)

	1	2	3	4	5	6	7	8
[0178] 对照组	0.71	1.55	2.36	25.8	71.4	71.8	72.1	25.5
实验组	1.63	6.89	3.77	38.1	80.5	79.0	79.5	21.3
增长量	0.92	5.34	1.41	12.3	9.1	7.2	7.4	-4.2

[0179] 实验结果表明,与对照组4-7的诱导Th17细胞分化的条件相比,加入Kifunensine可以使得Th17细胞分化比例显著增加。实验组2,3和对照组2,3组Th17细胞分化率过低,后续实验检测了实验组2,3和对照组2,3的流式结果,没有检测实验组2,3和对照组2,3的相关mRNA结果。

[0180] 通过表1中可以看出,仅加入Kifunensine时,Th17细胞分化率相对对照组1增长量为0.92%,而实验组4-7相对对照组4-7的Th17细胞分化率增加了7.2%-12.3%,可以看出由于Kifunensine的加入,实验组4-7相对对照组4-7,Th17细胞分化率大幅度增加,尤其是实验组4和实验组5(如图2),相对对照组4和对照组5(如图1)的Th17细胞分化率增加量为12.3%和9.1%。

[0181] (二)细胞因子IL-17A检测结果

[0182] 通过实时荧光定量PCR对各组IL-17A mRNA表达水平检测,各组细胞因子IL-17A mRNA表达量检测结果如表2所示。

[0183] 表2 IL-17A mRNA表达水平

	1	2	3	4	5	6	7	8
[0184] 对照组	0.89	-	-	218.27	321.80	275.65	421.68	99.96
实验组	0.88	-	-	370.50	651.07	486.63	499.15	72.00
增长量	-0.01	-	-	152.23	329.27	210.98	77.47	-27.96
增长倍数	-0.01	-	-	0.70	1.02	0.77	0.18	-0.28

[0185] 实验结果表明,对照组4-7的诱导Th17细胞分化的条件相比,加入Kifunensine可以使得IL-17A mRNA表达显著增加。

[0186] 通过表2中可以看出,仅加入Kifunensine时,IL-17A mRNA表达相对对照组1没有明显变化,而实验组4-7相对对照组4-7 Th17细胞mRNA表达水平增加了(0.7-1.02)倍,可以看出由于Kifunensine的加入,实验组4-7相对对照组4-7,IL-17A mRNA表达水平大幅度增加,尤其是实验组5,相对对照组5的IL-17A mRNA表达增加了1.02倍。

[0187] (三)转录因子ROR γ t的检测结果

[0188] ROR γ t的平均荧光强度(Median Fluorescence Intensity ,MFI)结果如表3所示。

[0189] 表3 ROR γ t的平均荧光强度

	1	2	3	4	5	6	7	8
[0190] 对照组	6093	2023	1356	6194	9946	9591	7586	5709
实验组	6919	2743	1699	8030	11301	10865	9374	6270
增长	826	720	343	1836	1355	1274	1788	561

[0191] 通过实时荧光定量PCR对ROR γ t进行mRNA表达水平检测,检测结果如表4所示。

[0192] 表4 ROR γ t mRNA表达水平

	1	2	3	4	5	6	7	8
[0193] 对照组	1.00	-	-	8.61	11.13	10.10	8.26	4.88
实验组	1.60	-	-	15.00	19.80	15.63	11.13	9.69
增长	0.60	-	-	6.39	8.67	5.53	2.87	4.81

[0194] 实验结果表明,与对照组4-7的诱导Th17细胞分化的条件相比,加入Kifunensine可以使得ROR γ t 的平均荧光强度与 ROR γ t mRNA表达水平显著增加。

[0195] 由表3可见,实验组4-7的ROR γ t的平均荧光强度显著高于其他培养条件。并且本发明对ROR γ t进行mRNA水平检测,由表4可见,在TGF- β +IL-6+抗IL-2抗体+Kifunensine的条件下ROR γ t的基因表达量最高。

[0196] (四)分泌IL-17F的细胞比例以及细胞因子IL-17F mRNA表达水平检测结果

[0197] 通过流式细胞仪对分泌IL-17F的细胞数量进行检测,分泌IL-17F的细胞比例结果如表5所示。

[0198] 表5 分泌IL-17F的细胞比例

	1	2	3	4	5	6	7	8
[0199] 对照组%	0.71	0.51	0.5	19.9	17.2	16.6	21.3	11.9
实验组%	3.23	3.17	0.29	9.3	5.09	6.57	13.3	4.83
增长	2.52	2.66	-0.21	-10.6	-12.11	-10.03	-8	-7.07
增长倍数	3.55	5.22	-0.42	-0.53	-0.70	-0.60	-0.38	-0.59

[0200] 通过实时荧光定量PCR对细胞因子IL-17F mRNA表达水平检测,检测结果如表6所示。

[0201] 表6 IL-17F mRNA表达水平

	1	2	3	4	5	6	7	8
[0202] 对照组	0.97	-	-	3574.02	4715.95	5569.50	7451.59	1915.27
实验组	1.33	-	-	2882.96	3965.63	4162.79	5160.64	456.14
增长	0.36	-	-	-691.06	-759.32	-1406.71	-2290.95	-1459.08
增长倍数	0.37	-	-	-0.19	-0.16	-0.25	-0.31	-0.76

[0203] 实验结果表明,对照组4-8的诱导Th17细胞分化的条件相比,加入Kifunensine可以使得分泌IL-17F的细胞比例和IL-17F mRNA表达水平显著降低。

[0204] 通过表6中可以看出,仅加入Kifunensine时,分泌IL-17F的细胞比例和IL-17F mRNA表达水平相对对照组1增加了,而实验组4-8相对对照组4-8的分泌IL-17F的细胞比例和IL-17F mRNA表达水平分别降低了38%-70%和16%-76%,可以看出由于Kifunensine的加入,实验组4-8相对对照组4-8,分泌IL-17F的细胞比例和IL-17F mRNA表达水平都大幅度减少。

[0205] 尤其是实验组5,相对对照组5的 表达IL-17F的细胞比例降低了了70%。

[0206] (五)分泌IL-10的细胞比例以及细胞因子IL-10 mRNA表达水平检测结果

[0207] 通过流式细胞仪对分泌IL-10的细胞数量进行检测,通过实时荧光定量PCR对细胞因子对IL-10 mRNA表达水平检测,分泌IL-10的细胞比例与IL-10 mRNA表达水平检测结果,

分别如表7和表8和所示。

[0208] 表7 分泌IL-10的细胞比例

	1	2	3	4	5	6	7	8
[0209] 对照组	0.98	0.8	1.04	9.65	6.48	6.4	8.67	2.13
实验组	1.92	1.32	0.78	3.19	1.13	1.31	2.37	1.96
增长	0.94	0.52	-0.26	-6.46	-5.35	-5.09	-6.3	-0.17

[0210] 表8 IL-10 mRNA表达水平

	1	2	3	4	5	6	7	8
[0211] 对照组	1.16	-	-	157.59	97.01	98.36	199.47	4.96
实验组	2.85	-	-	62.69	24.26	32.68	71.51	0.89
增长	1.16	-	-	-94.9	-72.75	-65.68	-127.96	-4.07

[0212] 实验结果表明,对照组4-7的诱导Th17细胞分化的条件相比,加入Kifunensine可以使得分泌IL-10的细胞比例与IL-10 mRNA表达水平显著降低。

[0213] 通过表7中可以看出,仅加入Kifunensine时,IL-10 mRNA表达水平相对对照组1未下降,而实验组4-7相对对照组4-7的 IL-10 mRNA表达水平减少了65.68-127.96,可以看出由于Kifunensine的加入,实验组4-7相对对照组4-7,IL-10表达水平大幅度减少,尤其是实验组7,相对对照组7的IL-10mRNA表达水平减少了127.96。

[0214] 实验结果表明,对照组4-7的诱导Th17细胞分化的条件相比,加入Kifunensine可以使得Th17细胞分化比例、IL-17A mRNA表达水平、ROR γ t mRNA表达水平显著增加,同时分泌IL-17F的细胞比例、IL-17F mRNA表达水平、分泌IL-10的细胞比例与IL-10 mRNA表达水平显著降低。

[0215] 实验例1本发明各物质添加量探究

[0216] 一、实验方法

[0217] (一)naïve T细胞提取

[0218] 同实施例1。

[0219] (二)实验分组以及Th17细胞体外培养

[0220] 1、配置CDMEM细胞完全培养基

[0221] 同实施例1。

[0222] 2、分化Th17细胞

[0223] 48孔板先经过1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗CD3抗体的包被液包被4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜备用,使用前先需要将包被液吸出。

[0224] 将naïve T 细胞用前述CDMEM培养基重悬,细胞密度为 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$,加入终浓度为1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗CD28抗体,将其每孔500 μL 体积加入到吸出包被液的48孔板中后,将对应的诱导剂加入到孔板中,并置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂孵箱中培养72h后进行流式染色。

[0225] 1) 当诱导剂TGF- β 为2ng/mL、IL-6为50ng/mL、抗IL-2抗体为30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,Kifunensine添加量分别为0,1,10,100 μM 时,Th17细胞分化率结果如表9所示:

[0226] 表9 Th17细胞分化率(%)

	Kifunensine	0 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M
[0227]	TGF- β : 2ng/mL IL-6: 50ng/mL 抗 IL-2 抗体: 30 μ g/mL	71.4	78.6	80.5	79

[0228] 可以看出,在TGF- β 为2ng/mL、IL-6为50ng/mL、抗IL-2抗体为30 μ g/mL时,在一定范围内由于Kifunensine的加入, Th17细胞分化率增加,当到Kifunensine为10 μ M达到最高为80.5%,而Kifunensine为100 μ M相对10 μ M, Th17细胞分化率反而轻微下降。

[0229] 2) 当诱导剂TGF- β 为2ng/mL, IL-6为50ng/mL、Kifunensine 为10 μ M时,抗IL-2抗体为0, 1,6,30,50 μ g/mL时,Th17细胞分化率结果如表10所示:

[0230] 表10 Th17细胞分化率(%)

	抗 IL-2 抗体	0 μ g/mL	1 μ g/mL	6 μ g/mL	30 μ g/mL	50 μ g/mL
[0231]	TGF- β : 2ng/mL IL-6: 50ng/mL Kifunensine : 10 μ M	31.1	56.7	74.3	80.5	76.8

[0232] 可以看出,在TGF- β 为5 ng/mL, IL-6为50ng/mL、Kifunensine 为10 μ M时,在一定范围内由于抗IL-2抗体的加入, Th17细胞分化率增加,当抗IL-2抗体到30 μ g/mL 达到最高为80.5%, 抗IL-2抗体继续增加Th17细胞分化率反而轻微降低。

[0233] 3) 当诱导剂TGF- β 为2ng/mL,抗IL-2抗体为30 μ g/mL ,Kifunensine 为10 μ M时,IL-6为0, 1,10,50,100 ng/mL时,Th17细胞分化率结果如表11所示:

[0234] 表11 Th17细胞分化率(%)

	IL-6	0ng/mL	1ng/mL	10ng/mL	50ng/mL	100ng/mL
[0235]	TGF- β : 2ng/mL 抗 IL-2 抗体: 30 μ g/mL Kifunensine : 10 μ M	50.1	70.8	73.7	80.5	76.6

[0236] 可以看出,在TGF- β 为5 ng/mL,抗IL-2抗体为30 μ g/mL ,Kifunensine 为10 μ M时,在一定范围内由于IL-6的加入, Th17细胞分化率增加,当IL-6到50ng/mL 时,Th17细胞分化率最高为80.5%,而IL-6为100ng/mL相对50ng/mL, Th17细胞分化率反而轻微下降。

[0237] 4) 当诱导剂IL-6为50ng/mL、抗IL-2抗体为30 μ g/mL、Kifunensine 为10 μ M时,TGF- β 为0,0.01,0.1,2,5 ng/mL时,Th17细胞分化率结果如表12所示:

[0238] 表12 Th17细胞分化率(%)

	TGF- β	0ng/mL	0.01ng/mL	0.1ng/mL	2ng/mL	5ng/mL
[0239]	抗 IL-2 抗体: 30 μ g/mL IL-6: 50ng/mL Kifunensine : 10 μ M	13.3	16.1	56.5	80.5	79

[0240] 可以看出,在IL-6为50ng/mL、抗IL-2抗体为30 μ g/mL时,Kifunensine 为10 μ M时,在一定范围内由于TGF- β 的加入,Th17细胞分化率增加,当到2 ng/mL为80.5%,而TGF- β 为5 ng/mL相对2ng/mL,Th17细胞分化率反而轻微下降。

[0241] 5) 当诱导剂IL-6为50ng/mL、抗IL-2抗体为30 μ g/mL,Kifunensine 为10 μ M,TGF- β 为2ng/mL时,抗IL-4抗体为0,1,10,50 μ g/mL 时,Th17细胞分化率结果如表13所示:

[0242] 表13 Th17细胞分化率(%)

	抗 IL-4 抗体	0ng/mL	1ng/mL	10ng/mL	50ng/mL
[0243]	抗 IL-2 抗体: 30 μ g/mL IL-6: 50ng/mL Kifunensine : 10 μ M TGF- β 为 2ng/mL	80.5	77.9	74.5	74.2

[0244] 可以看出,由于抗IL-4抗体的加入,Th17细胞分化率并没有增加,反而呈现下降趋势。

[0245] 6) 当诱导剂IL-6为50ng/mL、抗IL-2抗体为30 μ g/mL,Kifunensine 为10 μ M,TGF- β 为2ng/mL时,抗IFN- γ 抗体为0,1,10,50 μ g/mL 时,Th17细胞分化率结果如表14所示,

[0246] 表14 Th17细胞分化率(%)

	抗 IFN- γ 抗体	0 μ g/mL	1 μ g/mL	10 μ g/mL	50 μ g/mL
[0247]	抗 IL-2 抗体: 30 μ g/mL IL-6: 50ng/mL Kifunensine : 10 μ M TGF- β 为 2ng/mL	80.5	78.6	76.4	73.3

[0248] 可以看出,由于抗IFN- γ 抗体的加入,Th17细胞分化率并没有明显增加,反而呈现下降趋势。

[0249] 7) 当诱导剂IL-6为50ng/mL、抗IL-2抗体为30 μ g/mL,Kifunensine 为10 μ M,TGF- β 为2ng/mL时,IL-1 β 为0,1,10,100 ng/mL时,Th17细胞分化率结果如表15所示,

[0250] 表15 Th17细胞分化率(%)

		IL-1 β	0 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	50 ng/mL
[0251]	抗 IL-2 抗体: 30 μ g/mL IL-6: 50ng/mL Kifunensine : 10 μ M TGF- β 为 2ng/mL		80.5	82.5	82.4	82.4

[0252] 可以看出,由于IL-1 β 的加入, Th17细胞分化率有小幅度提升后几乎持平,没有明显变化。

[0253] 8) 当诱导剂IL-6为50ng/mL、抗IL-2抗体为30 μ g/mL,Kifunensine 为10 μ M,TGF- β 为2ng/mL时,IL-23为0,1,10,100 ng/mL时,Th17细胞分化率结果如表16所示:

[0254] 表16 Th17细胞分化率(%)

		IL-23	0 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
[0255]	抗 IL-2 抗体: 30 μ g/mL IL-6: 50ng/mL Kifunensine : 10 μ M TGF- β 为 2ng/mL		80.5	78.4	77.0	74.6

[0256] 可以看出,由于IL-23的加入, Th17细胞分化率反而下降。

[0257] 实验结果表明,在本发明实施例1中实验组4-7的诱导剂,能大幅度增加Th17细胞分化率。在实验例5的基础上,分别单独添加抗IL-4抗体、或抗IFN- γ 抗体,或IL-23都会使Th17细胞分化率反而下降;而在实验例5基础上,单独添加IL-1 β ,Th17细胞分化率已经在较高的基础上,还有提升。

[0258] 综上,本发明提供了一种Th17细胞及其培养方法和应用与诱导液及化合物的用途,本发明将Kifunensine应用到体外培养促进Th17细胞分化中,发现当 Kifunensine与TGF- β 、IL-6,或TGF- β 、IL-6、抗IL-2抗体,或TGF- β 、IL-6、抗IL-2抗体、抗IFN- γ 抗体、抗IL-4抗体,或TGF- β 、IL-6、抗IL-2抗体、抗IFN- γ 抗体、抗IL-4抗体、IL-23、IL-1 β 共同作用时,能够促增并极化Th17细胞,本发明幼稚T细胞分化出来的Th17细胞不仅比例高,且本发明分化出来的Th17细胞的IL-17A基因表达水平高,分泌IL-17F的细胞比例、和分泌IL-10的细胞比例显著降低,且分泌的其他细胞因子,如IL-17F 和IL-10比例低,IL-17F 和IL-10基因表达水平也低,尤其是当Kifunensine与TGF- β 、IL-6、抗IL-2抗体共同作用时效果尤为显著。本发明采用的体外培养方法简单,培养时间短,容易操作。本发明在分化机制方面探索以及与Th17细胞在抗菌(抗感染)、抗肿瘤和提升免疫力方面的作用以及Th17细胞与相关自身免疫疾病的研究有良好的应用前景。

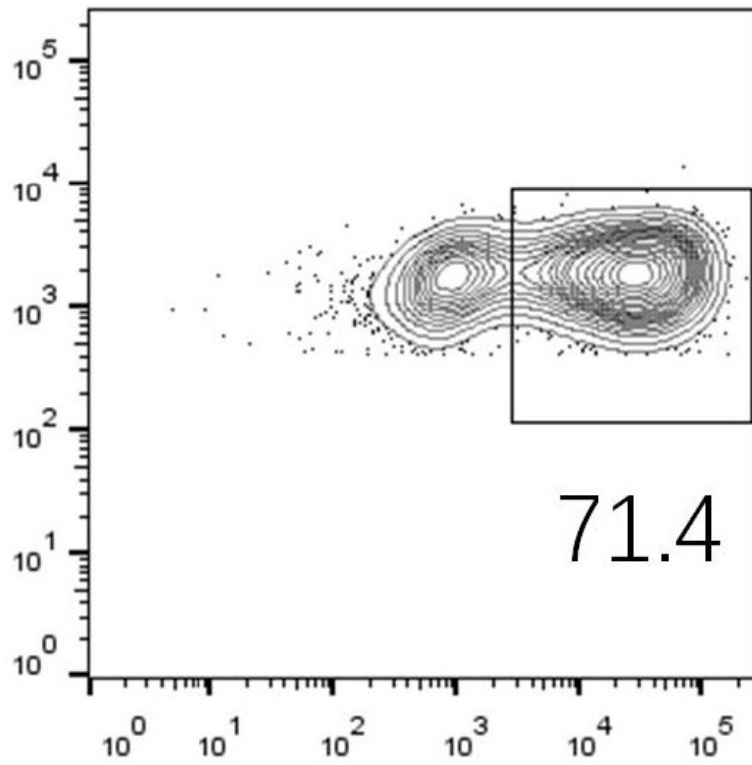


图1

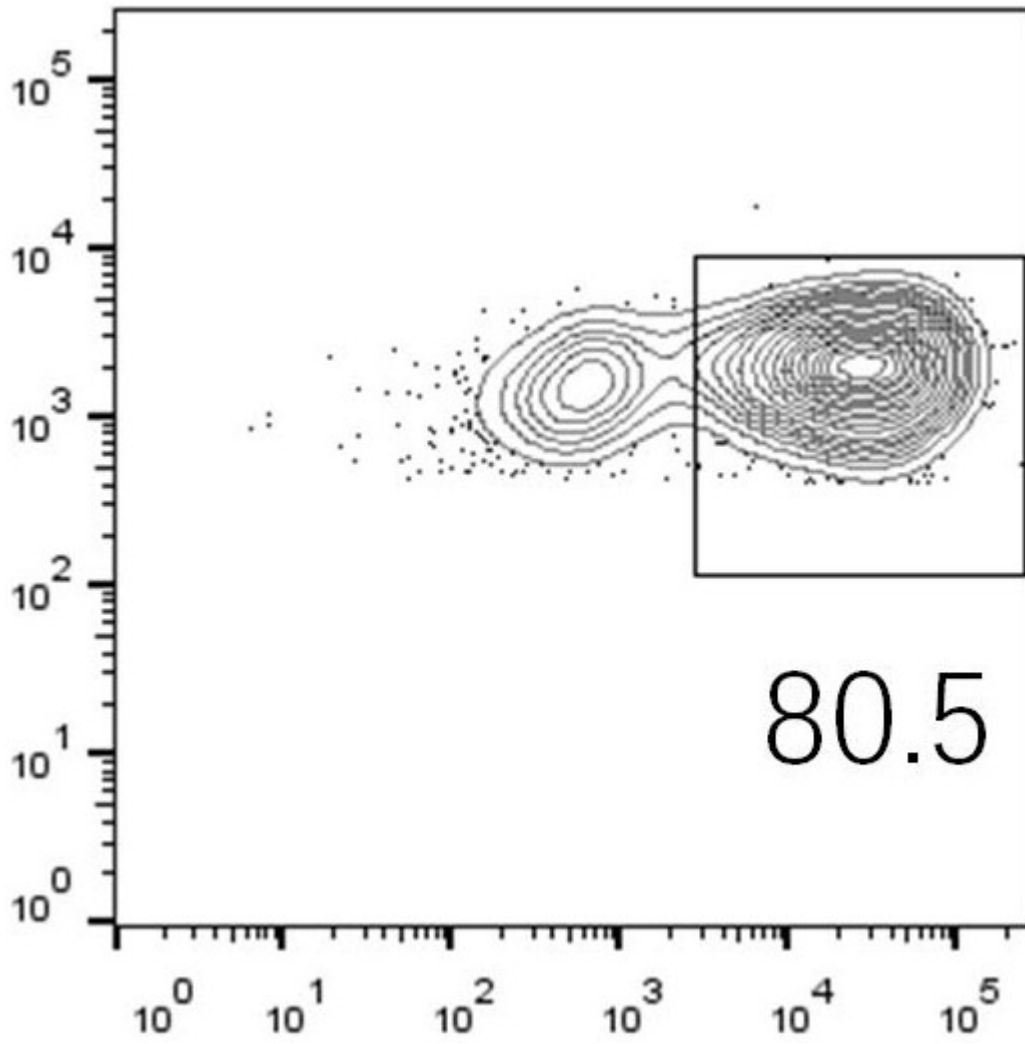


图2