

· 基础实验研究论著 ·

异种双份脐血干细胞移植对胶原诱导性关节炎小鼠 IL-4 及 TNF- α mRNA 表达的影响*

牛广华,高玉洁[△],孙旭,高明利,郭鹤,吕丹,都静

(辽宁中医药大学附属医院检验科,沈阳 110032)

摘要:目的 观察异种、异基因双份人脐血间充质干细胞(MSCs)移植对Ⅱ型胶原诱导性关节炎(CIA)小鼠白细胞介素(IL)-4 及肿瘤坏死因子(TNF)- α mRNA 表达的影响。方法 先进行脐血 CD34⁺ 细胞分选,然后采用弗氏完全佐剂和Ⅱ型胶原诱导 C57BL/6(H-2^b)小鼠,建立 CIA 小鼠模型,并随机分为正常对照组、模型组、单份 MSCs 移植治疗组、双份 MSCs 移植治疗组、甲氨蝶呤阳性治疗对照组,每组 10 只小鼠。采用尾静脉注射,除模型组、正常对照组用生理盐水,两个 MSCs 移植治疗组给予的脐血所含的 CD34⁺ 细胞数均为 2×10^5 。移植后第 42 天处死动物、取脾组织,采用反转录 PCR(RT-PCR)法检测 IL-4、TNF- α mRNA 的表达,收集数据并做统计分析。结果 双份 MSCs 移植治疗组 IL-4、TNF- α mRNA 的表达,与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 双份 MSCs 移植治疗 CIA 小鼠能显著抑制 TNF- α mRNA 的表达,上调 IL-4 mRNA 表达,具有免疫调节作用,可能有助于类风湿关节炎的治疗。

关键词:关节炎,类风湿; 胶原诱导性关节炎; 干细胞移植; 白细胞介素 4; 肿瘤坏死因子 α ; 小鼠

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.12.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)12-1409-03

Effects of double stem cells on the expression of IL-4 and TNF- α mRNA in mice with collagen-induced arthritis*

Niu Guanghua, Gao Yujie[△], Sun Xu, Gao Mingli, Guo He, Lv Dan, Du Jing

(Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Liaoning Traditional Chinese Medical University, Shenyang, Liaoning 110032, China)

Abstract: Objective To observe the effects of double mesenchymal stem cells(MSCs) on the expression of interleukin-4 (IL-4) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA in mice with type II collagen-induced arthritis(CIA). **Methods** CD34⁺ cord blood stem cells were selected and identified. C57BL/6(H-2^b) mice were induced by Freund's complete adjuvant and type II collagen to establish CIA mice model. All 50 mice were divided into 5 groups, including normal group, model group, mono-MSCs group, double-MSCs group and MTX group(10 mice for each). Mice in mono- and double-MSCs groups were injected with MSCs, with the count of CD34⁺ cells for 2×10^5 , through caudal vein, and mice in normal and model group were injected with 0.9% normal saline(NS). On the 42nd day after transplantation, mice of all groups were executed and splenic tissues were collected and detected for the expression levels of IL-4 and TNF- α mRNA by RT-PCR. All data were collected and statistically analyzed. **Results** There was no statistical difference of the expression levels of IL-4 and TNF- α mRNA between double-MSCs group and normal group($P > 0.05$). **Conclusion** Double-MSCs transplantation, which could significantly inhibit the expression of TNF- α mRNA and up-regulate the expression of IL-4 mRNA in CIA mice model, might have immune regulation effects. Double-MSCs could have the potential for the treatment of rheumatoid arthritis.

Key words:arthritis, rheumatoid; collagen induced arthritis; stem cell transplantation; interleukin-4; tumor necrosis factor- α ; mice

类风湿关节炎(RA)是一种以关节滑膜炎为特征的,慢性、系统性的炎性自身免疫病,其特征与胶原诱导性关节炎(CIA)相似。尽管 RA 的治疗在抑制系统性炎症方面已有了很大进展,但在炎症因素众多的关节局部如何有效地修复受损的软骨组织,目前还少见报道^[1]。

脐血间充质干细胞(MSCs)移植作为一种安全、可靠和有效的移植方式已经得到了广泛的认可和应用,但脐血中含有核细胞数低的问题严重制约了其在临床上的应用^[2-3]。目前,只有大约 25% 需行脐血移植的成人患者可找到符合细胞数的脐血供者^[4]。为克服这种不足,笔者尝试异基因双份 MSCs 移植治疗 CIA 小鼠,并观察异基因双份 MSCs 治疗对 CIA 小鼠组织中白细胞介素(IL)-4 及肿瘤坏死因子(TNF)- α mRNA 表达的影响,为异基因双份 MSCs 治疗人类 RA 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 牛Ⅱ型胶原(C7809,5 mg,Sigma 公司);弗氏完全佐剂(098K8729-CAS9007-81-2,10 mL,Sigma 公司);流式细胞仪抗体 PE-CD34、FITC 标记的小鼠抗体(Pharmingen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 脐血的采集 无菌取自健康足月妊娠产妇、自然分娩或剖宫产的胎儿脐血,要求母亲无遗传病家族史、输血史,无急、慢性传染病,无妊娠合并症和妊娠期间服药史,婴儿无先天性畸形,所有标本均在 8 h 内进行处理。

1.2.2 MSCs 的分离 采用密度梯度离心法沉降、分离得单个核细胞。将所得有核细胞(MNC)液按 1:1 比例加入氯化铵破红细胞液 5 mL,混匀,800 r/min 离心 10 min,弃去上清液,将所得下层细胞以 PBS 反复洗涤 3 次,调整其体积至 1 000

* 基金项目:辽宁省自然基金资助项目(20092033)。 △ 通讯作者,E-mail:jie_54@sohu.com。

μL 备用。并用显微镜计数法检测 MNCs 数,用台盼蓝拒染试验测定 MNCs 活力。

1.2.2 干细胞分选及鉴定 应用美国 BD 公司 FACS Calibur 型分选式细胞分析仪,进行脐血 CD34⁺ 细胞分选。收集分选的 CD34⁺ 阳性细胞,PBS 充分洗涤后,以生理盐水重悬,并调整成浓度为 $3 \times 10^8/\text{mL}$ 的细胞悬液。吸取 50 μL 生理盐水混悬液用流式细胞仪检测人源性 CD34⁺ 细胞的含量。经处理完毕的采集物低温冻存以备回输。

1.2.3 实验分组 近交系 C57BL/6(H-2^b) 小鼠 50 只,动物年龄 45~50 d,体质量(17±3)g,随机分为正常对照组、模型组、单份 MSCs 移植治疗组、双份 MSCs 移植治疗组、甲氨蝶呤阳性治疗对照组。每组 10 只小鼠。

1.2.4 建立 CIA 动物模型 除正常对照组外,其余 4 组寒冷刺激 10 d 后,将 10 mg 牛 II 型胶原与 5 mL 完全弗氏佐剂研磨后,以每只 100 μL 于小鼠背部、踝部、尾根部皮内注射免疫,免疫注射 14 d 后按上述方法少量再次腹腔内注射,作为激发注射免疫。之后对各组小鼠的发病情况进行观察。主要为关节水肿、皮肤红斑及关节活动情况等。第 15 天开始移植治疗,于 42 d 各组小鼠的膝及肘以下关节进行组织病理学分析及小鼠脾组织检测。

1.2.5 MSCs 输入途径及剂量 均采用尾静脉注射途径,CIA 小鼠二次免疫接种后第 2 天,除模型组、正常对照组用生理盐水,其余以 $2 \times 10^6/50\text{ g}$ 的剂量将 MSCs 注入小鼠尾静脉内。

1.2.6 IL-4、TNF- α mRNA 检测 停药后处死小鼠,取脾组织 1 cm×0.15 cm,放入冻存管,迅速投入液氮罐。采用 Trizol 一步法 RNA 提取试剂盒提取脾组织总 RNA,用分光光度计测定光密度(OD)值,并用电泳法鉴定分子完整性。采用反转录 PCR(RT-PCR)方法进行检测。PCR 扩增体系:10×Buffer 5 μL 、25 mmol/L MgCl₂ 3 μL 、2.5 mmol/L dNTP 4 μL ,引物 1 μL 、cDNA 10 μL ,Taq 酶 0.15 μL ,加双蒸水后总体积达 50 μL ,振荡混匀。循环条件:94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 7 min。扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳,以凝胶成像系统进行半定量分析,用 IL-4 mRNA、TNF- α mRNA 与 β 肌动蛋白比值表示其相对表达。IL-4 mRNA 引物序列:上游引物 5'-CAC GGA TGC GAC AAA AAT CAC-3',下游引物 5'-CGA AAA GCC CGA AAG AGT CTC T-3',扩增长度为 251 bp。TNF- α mRNA 引物序列:上游引物 5'-TGA GGT CAA TCT GCC CAA GTA-3';下游引物 5'-CAG GGA AGA GTC TGG AAA GGT-3',扩增长度为 462 bp。 β 肌动蛋白引物序列:上游引物 5'-ACC ACC ATG GAG AAG GCT GG-3';下游引物 5'-CTC AGT GTA GCC CAG GAT GC-3',扩增产物长度 528 bp。

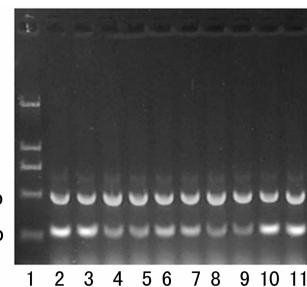
1.3 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件进行 *t* 检验。

2 结 果

2.1 RNA 质量鉴定 所提细胞总 RNA 经紫外分光光度计测定,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.0~2.0,经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,获得了 2 条较清晰的电泳带,即 18S 和 28S,其中 28S 的量约为 18S 的 2 倍,证实 RNA 的完整性。

2.2 各组 IL-4 mRNA 表达水平比较 IL-4 mRNA 的 RT-PCR 分析凝胶电泳结果显示,在 251 bp 处呈现出一特异性条带,见图 1。以 528 bp β 肌动蛋白扩增产物作为内参照进行半定量分析,CIA 小鼠模型组脾组织表达的 IL-4 mRNA 明显低于正常对照组、甲氨蝶呤阳性治疗对照组、单份 MSCs 移植治

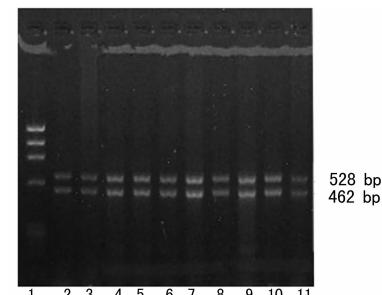
疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而双份 MSCs 移植治疗组接近于正常对照组($P > 0.05$),双份 MSCs 移植治疗组与单份 MSCs 移植治疗组、甲氨蝶呤阳性治疗对照组差异有统计学意义($P < 0.05$)。



1:DNA 标记物;2~3:双份 MSCs 移植治疗组;4~5:单份 MSCs 移植治疗组;6~7:甲氨蝶呤阳性治疗对照组;8~9:CIA 模型组;10~11:正常对照组。

图 1 各组组织中 IL-4 mRNA 的表达

2.3 各组 TNF- α mRNA 表达水平比较 TNF- α mRNA 的 RT-PCR 分析凝胶电泳结果显示,在 462 bp 处呈现出一特异性条带,见图 2。以 528 bp β 肌动蛋白扩增产物作为内参照进行半定量分析,可见 CIA 小鼠模型组脾组织表达的 TNF- α mRNA 明显高于正常对照组;甲氨蝶呤阳性治疗对照组、单份 MSCs 移植治疗组明显低于 CIA 小鼠模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而双份 MSCs 移植治疗组接近正常对照组($P > 0.05$),双份 MSCs 移植治疗组与单份 MSCs 移植治疗组、甲氨蝶呤阳性治疗对照组差异有统计学意义($P < 0.05$)。



1:DNA 标记物;2~3:双份 MSCs 移植治疗组;4~5:单份 MSCs 移植治疗组;6~7:甲氨蝶呤阳性治疗对照组;8~9:CIA 模型组;10~11:正常对照组。

图 2 各组组织中 TNF- α mRNA 的表达

2.4 各组灰度值的比较 见表 1。

表 1 各组 IL-4、TNF- α mRNA 灰度值与 β 肌动蛋白灰度值比值比较

组别	IL-4 mRNA	TNF- α mRNA
正常对照组	0.64±0.02	0.28±0.04
CIA 模型组	0.24±0.04▲	0.52±0.02▲
甲氨蝶呤阳性治疗对照组	0.42±0.03#	0.39±0.04#
单份 MSCs 移植治疗组	0.38±0.05#	0.30±0.04#
双份 MSCs 移植治疗组	0.63±0.03□	0.24±0.02□

▲: $P < 0.05$, 与正常对照组比较;#: $P < 0.05$, 与 CIA 模型组比较;□: $P < 0.05$, 与单份 MSCs 移植治疗组比较。

3 讨 论

细胞因子是一类由机体免疫细胞和非免疫细胞产生,并分

泌到细胞外的糖蛋白分子,它们能调节多种细胞生理功能,具有多种生物学功能^[5-9]。细胞因子包括淋巴细胞产生的淋巴因子和单核巨噬细胞产生的单核因子等。

健康人的 Th1/Th2 型细胞因子处于平衡状态,而 RA 患者则发生偏移。有研究者认为促炎性 Th1 细胞及其分泌的 TNF- α 和抗炎性 Th2 细胞及其分泌的 IL-4 的失衡在 RA 的发病机制中具有重要作用。TNF- α 是 RA 滑膜炎性反应的关键性细胞因子,具有多种炎性和免疫反应活性,几乎参与 RA 炎性反应的所有环节。Billiau 等^[10]研究发现,RA 患者滑膜液单个核细胞(SFMC)中 Th1 细胞数明显高于健康人外用血单个核细胞(PBMC)中的 Th1 细胞数,Th1/Th2 的比值明显升高,说明在 RA 患者的关节中,Th1 细胞及其分泌的细胞因子占显著优势。在滑膜湿润的 Th1 细胞可选择性地向炎症滑膜迁移,使关节内 TNF- α 生成增多、IL-4 水平下降、炎性反应加剧,导致滑膜下层内皮细胞肿胀、内皮小静脉形成等早期病变。

脐血 MSCs 是近几年来发现的一类具有与骨髓 MSCs 相同的多向分化潜能的原始祖细胞^[11],具备自我更新和增殖的能力,并能在特定因素的影响或诱导下,向各种细胞或组织分化。脐血具有来源丰富、采集方便且无伦理学问题等优点。大量实验已证实脐血 MSCs 比骨髓和外周血来源的造血干细胞更原始、更具有自我更新、增殖分化和体外扩增潜能。脐血 MSCs 的保存及脐血移植等临床应用均取得了显著的进展,但也面临许多问题,其所含有核细胞数低等问题严重制约了其在临床上的应用^[12]。

本实验结果表明,正常对照组小鼠组织中 Th1/Th2 型细胞因子处于平衡状态,而模型组小鼠的细胞因子发生偏移,Th1 细胞分泌的细胞因子 TNF- α 含量明显高于正常对照组,Th2 细胞分泌的细胞因子 IL-4 含量明显低于正常对照组,与沈燕和苏天水^[13]报道一致。经双份 MSCs 移植治疗后,TNF- α 含量明显下降,IL-4 含量明显增高。本实验结果提示,MSCs 有显著的抗炎、调节免疫功能及修复关节滑膜组织的作用^[14]。

近年来部分学者认为,RA 慢性炎症常伴有免疫功能的障碍,炎症与免疫无论在组织细胞水平还是分子水平都是紧密相连不可分割的^[15]。抗炎与调整免疫是治疗 RA 的两个重要方面,而本实验中双份 MSCs 移植治疗的特点之一就是在抗炎的同时又调整机体的免疫功能。MSCs 对免疫功能有调整作用表现在能恢复和促进 IL-4 含量增高,Th2 升高,降低 TNF- α 的量使 Th1 降低,使失衡的 Th1/Th2 趋向平衡,进而使机体的抵抗力增强,有免疫调节作用。以减轻 CIA 小鼠的炎性反应,加速炎性细胞因子的清除,从而显示出对 CIA 小鼠抗炎作用,进一步显示出生物治疗的科学性。

综上所述,CIA 小鼠脾组织中 TNF- α 水平明显升高、IL-4 水平明显降低说明 Th1/Th2 比例的不平衡是 CIA 模型的一个特点;通过双份 MSCs 移植对 Th1/Th2 比例的调节作用比较,说明双份 MSCs 生物治疗取得了很好的效果;MSCs 可下调炎性细胞因子 TNF- α 的水平,上调 IL-4 的水平,从而使失衡的 Th1/Th2 趋向平衡;调整细胞免疫是 MSCs 整体作用的机制之一;异基因双份 MSCs 移植有可能用于 RA 的治疗。今后,尚需从基础实验和临床实验上做更为深入的研究和总结。

参考文献

- [1] Barker JN,Wesdorff DJ,DeFor TE,et al. Transplantation of partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy[J]. Blood,2005,105(3):1343-1347.
- [2] Kang HJ,Kho SH,Jang MK,et al. Early engraftment kinetics of two units cord blood transplantation[J]. Bone Marrow Transplant,2006,38(3):197-201.
- [3] Kim DW,Chung YJ,Kim TG,et al. Cotransplantation of third-party mesenchymal stromal cells can alleviate single-donor predominance and increase engraftment from double cord transplantation[J]. Blood,2005,105(3):1941-1948.
- [4] Brunstein CG,Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation and banking[J]. Annu Rev Med,2006,57:403-417.
- [5] Kotani M,Hirata K,Ogawa S,et al. CD28-dependent differentiation into the effector/memory phenotype is essential for induction of arthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice[J]. Arthritis Rheum,2006,54(2):473-481.
- [6] Van Roon JA,Verhoef CM,van Roy JL,et al. Decrease in peripheral type 1 over type 2 T cell cytokine production in patients with rheumatoid arthritis correlates with an increase in severity of disease[J]. Ann Rheum Dis,1997,56(11):656-660.
- [7] Rosloniec EF,Latham K,Guedez YB. Paradoxical roles of IFN gamma in models of Th1-mediated autoimmunity[J]. Arthritis Res,2002,4(6):333-336.
- [8] Fossiez F,Djossou O,Chomarat P,et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines[J]. J Exp Med,1996,183(6):2593-2603.
- [9] 柏干萍,方勇飞.细胞因子与类风湿性关节炎[J].临床内科杂志,2001,18(4):257-258.
- [10] Billiau A,Leclercq G,Matthys P. Defective CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis is an important factor in pathogenesis,counter-regulated by endogenous IFN-gamma[J]. Arthritis Res Ther,2005,7(2):402-405.
- [11] 金晋,单根法,钟竑.脐血干细胞的研究进展[J].上海第二医科大学学报,2004,24(5):389-391.
- [12] 孟强,赵树铭.提高脐血造血干细胞移植归巢的研究进展[J].国际检验医学杂志,2011,32(3):366-368.
- [13] 沈燕,苏天水.酶免疫测定法对外周血单个核细胞内 IL-4 的检测[J].河南医科大学学报,2001,36(5):555-556.
- [14] Maldonado A,Mueller YM,Thomas P,et al. Decreased effector memory CD45RA $^{+}$ CD62L $^{-}$ CD8 $^{+}$ T cells and increased central memory CD45RA $^{-}$ CD62L $^{+}$ CD8 $^{+}$ T cells in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients[J]. Arthritis Res Ther,2003,5(2):91-96.
- [15] 宗明,范列英,杨蔺,等.荧光定量 RT-PCR 检测类风湿关节炎患者葡萄糖-6-磷酸异构酶 mRNA 表达水平的研究[J].国际检验医学杂志,2010,31(1):16-21.

(收稿日期:2011-09-13)