

· 实验研究 ·

小鼠骨髓间充质干细胞对植物血凝素诱导 小鼠脾细胞增殖后趋化因子受体表达的影响

刘元春,冯晓勤,何岳林,吴学东,张玉明,李春富

(南方医科大学南方医院儿科,广东 广州 510515)

[摘要] **目的** 观察小鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在体外对小鼠脾细胞表达趋化因子受体的影响。**方法** 用密度梯度离心法从小鼠骨髓中分离出小鼠骨髓间充质干细胞,经低糖 DMEM 培养基培养扩增。C57BL/6 小鼠脾细胞以 1×10^6 /孔的密度接种于 24 孔板,加入植物血凝素(PHA),培养 72 h。实验分 3 组:A 组按 10% 比例加入 MSC;B 组按 1% 比例加入 MSC;对照组不加 MSC。3 d 后收集悬浮的脾细胞进行流式细胞术检测小鼠脾细胞趋化因子受体 CXCR3,CCR5,CCR7 表达的变化。**结果** $CD3^+CCR5^+$ 、 $CD3^+CCR7^+$ 在 A、B 组及对照组中表达的差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);以 A 组表达率最高,B 组次之,对照组最低; $CD3^+CXCR3^+$ 细胞在 A 组中表达较 B 组、对照组高($P < 0.05$),B 组和对对照组之间的表达差异无统计学意义。**结论** 骨髓间充质干细胞在一定浓度下对小鼠脾细胞增殖后趋化因子受体 CXCR3,CCR5,CCR7 表达有上调作用。

[中国当代儿科杂志,2007,9(6):571-573]

[关键词] 骨髓间充质干细胞;T 淋巴细胞;趋化因子受体;小鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)06-0571-03

Effects of mouse bone marrow mesenchymal stem cells on the expression of chemokine receptors of spleenocytes after phytohemagglutinin stimulation

LIU Yuan-Chun, FENG Xiao-Qin, HE Yue-Lin, WU Xue-Dong, ZHANG Yu-Ming, LI Chun-Fu. Department of Pediatrics, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China (Li C-F, Email: chunfu@fimmu.com)

Abstract: Objective To explore the effect of mouse bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) on the expression of chemokine receptors in T lymphocytes *in vitro*. **Methods** Mouse bone marrow MSCs were separated with Percoll, cultured and expanded in low glucose DMEM. C57BL/6 mouse spleenocytes were cultured in the 24-hole flasks by the density of 1×10^6 /hole. Phytohemagglutinin (PHA) was then added to the holes and cultured for 72 hrs. This study consisted of three groups. Groups A and B were co-cultured by adding MSCs as the ratio of 0.1 and 0.01 to spleenocytes respectively. The control group was cultured without MSCs. Three days later the suspended spleenocytes were harvested for detecting the expression of three chemokine receptors CXCR3, CCR5 and CCR7 in T lymphocytes by the flow cytometry. **Results** The expression of $CD3^+CCR5^+$ and $CD3^+CCR7^+$ were statistically different among the three groups. Group A had the strongest expression, followed by group B and the control group. The expression of $CD3^+CXCR3^+$ in group A was statistically higher than that in group B and the control group. **Conclusions** MSCs could up-regulate the expression of chemokine receptors CXCR3, CCR5 and CCR7 in T lymphocytes stimulated by PHA.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(6):571-573]

Key words: Mesenchymal stem cell; T lymphocyte; Chemokine receptor; Mice

近年来对骨髓间充质干细胞的研究初步显示其能促进骨髓移植后的供者细胞植入及抑制移植植物抗宿主病(GVHD)的发生。但骨髓间充质干细胞上述作用的机制尚不清楚。其中一个研究热点是趋化因子及其受体。Sallusto 等^[1]根据趋化因子受体 CCR7 的表达有无将记忆性 T 细胞分成 CCR7⁺ 和 CCR7⁻ 记忆性 T 细胞两类。CCR7⁺ 记忆性 T 细胞即中央型 T 细胞,是淋巴结定居的 T 细胞,它缺乏炎性和细胞毒性功能。在这些 CCR7⁺ 记忆性 T 细胞中还表达 CXCR3、CCR5 等趋化因子受体。淋巴细胞在归巢的过程中通过细胞膜表面高表达的 CD62L 粘附于高内皮微静脉(HEV),随后 CCR7 与内皮细胞

[收稿日期]2007-01-25;[修回日期]2007-02-14
[作者简介]刘元春,女,硕士,医师。主攻方向:小儿血液系统疾病。
[通讯作者]李春富,教授,南方医科大学附属南方医院儿科,邮编:510515。

表达的刺激淋巴组织趋化因子 (SLC) 相结合^[2]。CCR7-SLC 的相互作用促进了 T 细胞归巢到淋巴结^[3]。由于天然 T 细胞表达 CCR7 和 CXCR4, 效应 T 细胞和记忆 T 细胞表达 CCR5 等, 本研究选择 CXCR3, CCR5, CCR7 为检测指标, 拟了解 MSC 对小鼠 T 细胞增殖后趋化因子受体表达的影响, 来进一步探索 MSC 的免疫调控机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 C57BL/6 小鼠, 8~10 周龄, 体质量 180~220 g, 清洁级。由南方医科大学实验动物中心引进, 饲养在动物中心层流仓, 饲料、饮水及垫料均经消毒处理。

1.1.2 主要试剂及仪器设备 LG-DMEM(美国, Gibco), PBS(美国, Gibco), 胎牛血清(中国, 四季青), 0.25% 胰蛋白酶 EDTA(美国, Gibco), 植物血凝素 PHA(美国, Sigma), FITC 标记的抗小鼠 CD3 单抗(美国, ebioscience), PE 标记的抗小鼠 CCR7 单抗(美国, ebioscience), PE 标记的抗小鼠 CCR5 单抗(美国, ebiolegend), 流式细胞仪(美国, FACScan, BD)。

1.2 主要方法

1.2.1 小鼠骨髓间充质干细胞的分离和培养 8~10周龄 C57BL/6 小鼠颈椎脱臼处死后置 75% 酒精中浸泡 10 min, 无菌条件下取股、胫骨干骺端剪开, 用注射器吸取含 50 μL/mL 庆大霉素 LG-DMEM 培养基冲洗出骨髓, 依次用 4, 7 号针头吹打细胞, 制成单细胞悬液, 用 PBS 洗涤 2 次, 用含 10% 胎牛血清的 LG-DMEM 悬浮细胞, 以 2 × 10⁵/cm² 密度接种于 25 cm² 培养瓶中。37℃, 5% CO₂, 饱和湿度孵育, 24~36 h 后去除悬浮细胞, 全量换液, 以后每 3~4 d 换液 1 次。待细胞 70%~80% 融合后, 用 0.25% 胰蛋白酶 EDTA 消化, 收获的细胞按 5 × 10³/cm² 密度接种传代, 取 3~8 代细胞用于实验。

1.2.2 淋巴细胞增殖实验及实验分组 8~10 周龄 C57BL/6 小鼠颈椎脱臼处死后置 75% 酒精中浸泡 10 min, 取脾脏置于盛有 5 mL PBS 的无菌平皿上, 200 目钢筛过滤制成单细胞悬液, 加入红细胞裂解液 2 mL 裂解红细胞, 离心洗涤, 以 1 × 10⁶/孔加入 24 孔板, 每孔加入植物血凝素 (PHA) 20 μg/mL, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 72 h。实验分 3 组: A 组按 0.1 比例加入 MSC; B 组按 0.01 比例加入 MSC; 对照组不加 MSC, 于 37℃, 5% CO₂ 孵育 3 d

后, 收集脾细胞行流式细胞术检测。

1.2.3 流式细胞术检测趋化因子受体表达 每个培养孔的细胞各取 2 × 10⁵ 个细胞, 采用双色标记法分别标记 CD3CCR5, CD3CCR7 及 CD3CXCR3 单抗。在流式细胞仪上经 CellQuest 软件获取细胞并分析 CD3⁺CCR5⁺, CD3⁺CCR7⁺ 及 CD3⁺CXCR3⁺ 细胞的百分率。

1.3 统计处理 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 全部资料用 SPSS10.0 软件包及 Excel 7.0 分析统计软件处理。多组之间均数比较用方差分析, 多组均数间的多重比较用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSC 培养

原代培养 5 d 的 MSC 镜下可见少量短梭性细胞(图 1A), 9 d 左右细胞呈长梭型, 并达 80% 融合(图 1B)。

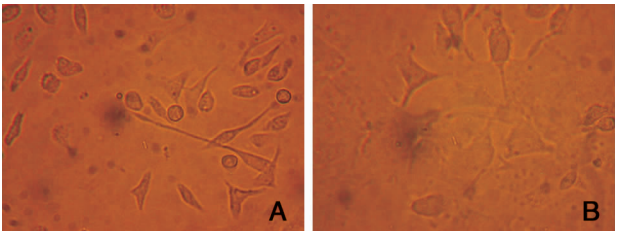


图 1 原代小鼠骨髓间充质干细胞图。A: 第 5 天少量短梭性细胞; B: 第 9 天细胞呈长梭型。

2.2 MSC 对小鼠脾细胞增殖反应趋化因子受体 CXCR3、CCR5 及 CCR7 表达的影响

脾细胞经 PHA 刺激后均表达 CCR5, CCR7 及 CXCR3 三种趋化因子受体, 在 MSC 共培养体系中, 趋化因子受体表达受 MSC 的影响且表达水平的变化与 MSC 浓度有关(表 1)。CD3⁺CCR5⁺、CD3⁺CCR7⁺ 细胞在 A, B 组及对照组中表达的差异均有

表 1 MSC 对小鼠脾细胞增殖反应趋化因子受体 CXCR3, CCR5, CCR7 表达的影响

分组	CD3 ⁺ CXCR3 ⁺	CD3 ⁺ CCR5 ⁺	CD3 ⁺ CR7 ⁺
对照组	53.85 ± 3.43	4.97 ± 1.14	3.91 ± 1.08
A 组	65.91 ± 8.24	20.30 ± 4.04	23.13 ± 4.73
B 组	50.90 ± 1.60	12.61 ± 5.00	10.60 ± 2.55
F	6.92	12.44	28.50
P	<0.05	<0.05	<0.05

统计学意义($P<0.05$);以A组表达率最高,B组次之,对照组最低;CD3⁺CXCR3⁺细胞在A组中的表达较B组、对照组高(均 $P<0.05$),B组和对照组的表达差异无统计学意义。

3 讨论

骨髓间充质干细胞是存在于骨髓中不同于造血干细胞的一类骨髓干细胞,它除了具有多种分化潜能外,其细胞表面还因为表达多种黏附、趋化相关的抗原分子和多种细胞因子,对造血系统进行调控^[4]。临床研究显示,骨髓间充质干细胞和造血干细胞的联合移植可以明显提高植入的比例。Poloni等^[5]在26例骨髓干细胞移植的患者中应用了骨髓间充质干细胞的联合输注,结果显示移植后60 d所有患者的嵌合体检测造血细胞全部为供者来源。骨髓间充质干细胞介导这些免疫调控的具体机制尚需进一步探索。其中一个研究热点是趋化因子及其受体。基础研究显示:对于造血前体细胞的趋化有一种SIP分子,其受体的持续激活可以扩大SDF-1与CXCR4介导的信号转导,对造血前体细胞发挥趋化作用,吸引外周血CD34⁺细胞归巢^[6]。这提示趋化因子及其受体对造血干细胞的归巢和植入起到了重要的调节的作用。趋化因子受体是一种由7个亚单位组成的跨膜蛋白,属于G蛋白偶联受体超家族,主要表达于白细胞,参与细胞的增殖、生长和迁移等生理功能,在趋化因子的趋化作用下,激活选择素/整合素等粘附分子,介导白细胞的粘附、穿透血管内皮及向特定部位的迁徙^[7,8]。

为了解骨髓间充质干细胞对脾细胞表面趋化因子受体表达的影响,我们把这两种细胞按不同比例进行混合培养后检测脾细胞趋化因子受体表达的变化。实验结果表明,骨髓间充质干细胞在与脾细胞呈一定的细胞比例共培养时能上调T细胞趋化因子受体CCR5,CCR7,CXCR3的表达,对前二者还呈剂量依赖性。这提示骨髓间充质干细胞可能提高T细胞的趋化能力。有研究对造血干细胞输注后进行追踪,发现输注后的2 h后,只有3%的移植细胞留在循环血液中,骨髓、肝脏以及脾脏中可以找到数目

相当的移植细胞,这里约有35%;随后血液、肝脏和脾脏的移植细胞快速下降,而骨髓中的移植细胞缓慢上升到17%^[9]。因此,骨髓间充质干细胞提高脾细胞趋化因子受体表达有利于骨髓移植后促使淋巴细胞在趋化因子的作用下移行和归巢到骨髓及淋巴器官,从而有利于促进造血细胞植入。这可能是骨髓间充质干细胞促进异基因造血干细胞植入的可能机制。

我们的研究对MSC免疫调控淋巴细胞的机制进行了初步的探索,鉴于MSC体外增殖力旺盛及较强的免疫活性,其有着良好的临床应用前景。

[参 考 文 献]

[1] Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions[J]. *Nature*, 1999, 401(6574): 708-712.

[2] Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(1): 258-263.

[3] Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions [J]. *Science*, 1998, 279(5349): 381-384.

[4] Hideshima T, Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Cytokines and signal transduction [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2005, 18(4): 509-524.

[5] Poloni A, Leoni P, Buscemi L, Balducci F, Pasquini R, Masia MC, et al. Engraftment capacity of mesenchymal cells following hematopoietic stem cell transplantation in patients receiving reduced-intensity conditioning regimen [J]. *Leukemia*, 2006, 20(2): 329-335.

[6] Seitz G, Boehmler AM, Kanz L, Mohle R. The role of sphingosine 1-phosphate receptors in the trafficking of hematopoietic progenitor cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1004(7): 84-89.

[7] Lo CG, Lu TT, Cyster JG. Integrin-dependence of lymphocyte entry into the splenic white pulp [J]. *J Exp Med*, 2003, 197(3): 353-361.

[8] Nelson PJ, Krensky AM. Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection[J]. *Immunity*, 2001, 14(4): 377-386.

[9] Oostendorp RA, Ghaffari S, Eaves CJ. Kinetics of in vivo homing and recruitment into cycle of hematopoietic cells are organ-specific but CD44-independent[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2000, 26(5): 559-566.

(本文编辑:吉耕中)