

异基因骨髓间充质干细胞移植对小鼠胶原性关节炎 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞表达的影响^{*}

孙旭¹, 齐月², 牛广华², 高玉洁^{2△}, 王柏山², 王思微², 严峰² (1. 武警辽宁省总队医院检验科, 沈阳 110034; 2. 辽宁省中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

【摘要】目的 探讨异基因骨髓间充质干细胞(MSCs)移植对小鼠胶原性关节炎 CD4⁺、CD25⁺调节性 T 细胞表达的影响。**方法** 选取 40 只 C57BL/6(H-2b)小鼠, 随机分为正常对照组、Ⅱ型胶原性关节炎(CIA)模型组、MSCs 移植治疗组、甲氨蝶呤治疗阳性对照组, 每组 10 只小鼠。除正常对照组外, 其余各组弗氏完全佐剂+Ⅱ型胶原诱导小鼠建立 CIA 小鼠模型。分离骨髓单个核细胞后, 进行 MSCs 细胞分选及鉴定。美国 BD 公司 FACscaliburTM 型流式细胞分析仪对小鼠骨髓 MSCs 进行分选和鉴定。MSCs 移植采用尾静脉注射, 所含细胞数为 2×10⁶。移植后第 42 天全部处死动物观察不同分组小鼠的关节症状及肿胀度, 采用流式细胞术检测 CD4⁺CD25⁺浓度, 收集数据并做统计分析。**结果** MSCs 移植治疗组小鼠关节的肿胀度, 与正常对照组比较, 差异无统计学意义(P>0.05)。MSCs 移植组 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的表达, 与甲氨蝶呤治疗阳性对照组比较, 差异有统计学意义(P<0.05); 与正常对照组比较, 差异无统计学意义(P>0.05)。**结论** MSCs 移植治疗小鼠 CIA, 能显著改善关节的肿胀度, 并明显上调 CD4⁺CD25⁺表达, 故 MSCs 可作为一种新的替代细胞来源用于类风湿性关节炎的移植治疗。

【关键词】 小鼠胶原性关节炎; 骨髓间充质干细胞; CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.20.007 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)20-2815-03

The influence of allogeneic mesenchymal stem cells transplantation to collagen induced arthritis CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell expression in mice SUN Xu¹, QI Yue², Niu Guang-hua², GAO Yu-jie^{2△}, WANG Bai-shan², WANG Si-wei², YAN Feng² (1. Department of Clinical Laboratory, Liaoning General Hospital of People's Armed Police Forces, Shenyang 110034, China; 2. First Affiliated Hospital of Liaoning Triditional Chinese Medical University, Shenyang 110032, China)

【Abstract】Objective To study the influence of allogeneic mesenchymal stem cells(MSCs) transplantation on the expression of collagen induced arthritis CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell in mice. **Methods** A total of 40 C57BL/6(H-2b) mice were selected and randomly divided into normal control group, model group, MSCs transplant treatment group and methotrexate treatment of positive control group. Ten mice in each group. Except for mice in the normal control group, the others were treated with Freund's complete adjuvant+Collagen II to induce C57BL/6(H-2b) mice that to make mouse model. Bone marrow mononuclear cells were isolated, then the MSCs were identified and screened by FACscaliburTM flow cytometry analyzer. MSCs was transplanted by tail vein injection with the number of cells as 2×10⁶. All the mice in four groups were put to death after transplanting 42 days, and observed the symptoms and the degree of swelling of the joints. Using flow cytometry to detect the contents of CD4⁺CD25⁺, and collected data and made statistical analysis. **Results** There was no significant difference on the swelling degree of joints between the MSCs transplant treatment group and the normal control group (P>0.05). Compared with methotrexate treatment of positive control group, there was significant difference on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell expression in the MSCs transplant treatment group (P<0.05). But there was no significant difference compared with that of the normal control group (P>0.05). **Conclusion** MSCs transplantation could significantly improve the swelling degree of joints, and significantly increase the expression of CD4⁺CD25⁺. Therefore, MSCs could be used as a new source of replacement cells for transplantation therapy of rheumatoid arthritis.

【Key words】 collagen induced arthritis; mesenchymal stem cells; CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell

类风湿性关节炎(RA)是一种伴有滑膜增生及骨破坏的慢性、进行性自身免疫性疾病, 其免疫功能的紊乱可能是该病的关键。有研究表明引起 Th1 细胞因子分泌 CD4⁺T 细胞是诱发 RA 自身免疫的激发细胞, CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞能对自身反应性 T 细胞发挥免疫抑制作用, 可能在 RA 中起着重

要作用^[1-2], 有望成为治疗 RA 的新靶点。骨髓间充质干细胞(MSCs)是一种存在于骨髓中的非造血干细胞, 具有自我更新、高度增殖及多向分化的能力^[3]。已成为治疗自身免疫病的一种新趋势。而近年来 MSCs 移植对于调节性 T 细胞具有相当显著的影响, 所以用 MSCs 移植治疗 RA 也具备了足够的理论

* 基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目(20092033)。

作者简介: 孙旭, 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事细胞生物学、免疫学及自身免疫疾病的研究。 △ 通讯作者, E-mail: jie_54@sohu.com。

基础^[4-6]。本项目利用同种异基因 MSCs 移植治疗小鼠 II 型胶原性关节炎(CIA),进一步研究 MSCs 移植治疗对胶原鼠脾细胞 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞表达的影响,并初步探讨其作用机制。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 牛 II 型胶原(C9809, 5 mg, Sigma 公司); 弗氏完全佐剂(099K8834-CAS 9016-61-1, 10 mL, Sigma 公司); Fcoll 淋巴细胞分离液(上海试剂二厂)。美国 BD 公司 FAcscaliburTM 型流式细胞分析仪, 莱卡石蜡切片片机切片, 奥林巴斯 BS-51 显微镜观察、奥林巴斯分析软件进行分析; Motie Med6.0 数码医学图像分析系统。

1.2 实验动物 选择辽宁省中医药大学动物实验中心近交系 C57BL/6(H-2b)小鼠 40 只, 动物合格证号 POO102009。小鼠年龄 45~50 d, 体质量(18±3)g。

1.3 方 法

1.3.1 小鼠分组与处理 将 40 只近交系 C57BL/6(H-2b)小鼠随机分为正常对照组、CIA 模型组、甲氨蝶呤治疗组、MSCs 移植治疗组, 每组 10 只。除正常组用生理盐水外, 其余各组将 10 mg 牛 II 型胶原与 5 mL 完全福氏佐剂研磨后, 以每只 100 μL 于小鼠背部、踝部、尾根部进行皮内注射免疫, 第 14 天按上述方法再次腹腔注射, 以加强免疫。CIA 小鼠二次免疫接种后第 2 天, 将 MSCs 以 2×10⁶/kg 细胞数注入 MSCs 移植治疗组小鼠尾静脉内。甲氨蝶呤治疗组小鼠每次采用甲氨蝶呤 0.017 5 g/kg 对小鼠进行灌胃, 每 5 天 1 次, 直到实验倒数第 2 天。于第 42 天将各组小鼠处死, 取踝关节进行组织病理学检查, 并取脾脏, 做成脾细胞悬液, 以备流式细胞仪检测。

1.3.2 标本制备与指标检测 (1)单个核细胞的分离:采用颈椎脱臼法处死小鼠, 在无菌状态下取出双侧股骨和胫骨, 暴露骨髓腔, 用含 10% 胎牛血清的 L-DMEM 培养液注射器反复冲洗骨髓腔; 收集骨髓细胞悬液 3 份, 按 2:1 的比例加入淋巴细胞分离液, 以 600 r/min 离心 5 min, 分离单个核细胞, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3~4 遍, 用 1 mL 重悬。美国 BD 公司 FAcscaliburTM 型分选式细胞分析仪进行骨髓的 CD44⁺ 细胞分选。收集分选的 CD44⁺ 阳性细胞, PBS 充分洗涤后, 以生理盐水重悬, 将收集到的细胞调整成浓度为 2×10⁶ 个细胞数/mL 的细胞悬液, 低温冻存以备回输。(2)小鼠骨髓 MSCs 表型鉴定:分别取 10 μL 荧光标记的小鼠抗大鼠单抗 PE-CD44, FITC-CD45, 另设 1 管为空白对照, 室温避光 30 min, 用 PBS 洗 2~3 次, 用 2 mL PBS 混匀细胞, 30 min 后用流式细胞仪进行检测, 每个标本至少分析 10 000 个细胞。以明确所分离的 MSCs 纯度。(3)足爪关节肿胀程度观察:用游标卡尺对小鼠双侧后足关节进行测量, 从造模开始每 5 天 1 次, 直到取材前 1 天。(4)CD4⁺、CD25⁺ 检测:取脾细胞悬液, 用流式细胞双标法检测 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞表达水平, 具体操作按试剂说明书进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件对数据进行统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠骨髓 MSCs 表型鉴定结果 经流式细胞仪检测分离、分选出的小鼠 MSCs 表面 CD44 表达阳性率为 90%~96%, CD45 表达阴性, 而 CD44 为基质细胞和 MSCs 的特异表面抗原, CD45 是白细胞抗原。因此所获得的 MSCs 是较均一的 MSCs, 符合移植条件。见图 1, 图 2。

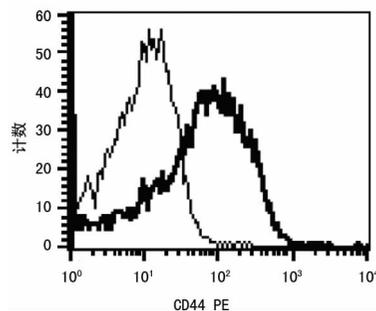


图 1 PE 标记的 CD44 阳性百分比

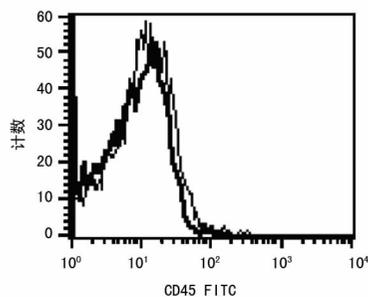


图 2 FITC 标记的 CD45 阳性流式细胞图

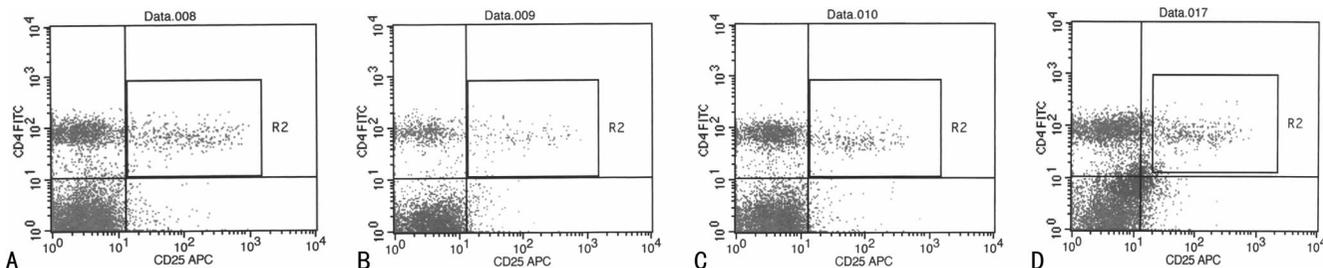
2.2 BM-MSCs 移植注射后各组关节炎指数及肿胀度程度 CIA 模型组小鼠中 II 型胶原免疫注射后的第 2 天, 小鼠注射足即有明显的肿胀, 出现急性免疫反应。第 14~21 天后, CIA 模型组小鼠对侧足出现红肿, 第 35~42 天后足的肿胀更为明显。关节炎指数及肿胀度程度与正常对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。甲氨蝶呤治疗组小鼠注射足即有轻度的肿胀减轻, 治疗后第 6 天开始, 能明显抑制关节局部肿胀, 治疗后第 35 天, 关节局部肿胀明显恢复, 与 CIA 模型组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。MSCs 移植治疗组治疗后第 3 天, 能明显抑制关节局部肿胀, 治疗后第 35 天, 关节局部肿胀明显恢复, 与 CIA 模型组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$), 与甲氨蝶呤治疗组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$), 与正常对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组 CIA 小鼠后肢足肿胀度程度与鼠 AI 比较

组别	足肿胀度(cm ³)	关节炎指数
正常对照组	1.09±0.06	0.00±0.00
CIA 模型组	2.19±0.03 ^a	4.20±0.50 ^a
甲氨蝶呤治疗组	1.18±0.07 ^{ab}	1.30±0.30 ^{ab}
MSCs 移植治疗组	1.12±0.06 ^{bc}	0.50±0.20 ^{bc}

注:与正常对照组比较, ^a $P<0.05$; 与 CIA 模型组比较, ^b $P<0.05$; 与甲氨蝶呤治疗组比较, ^c $P<0.05$ 。

2.4 各组 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞表达水平比较 CIA 模型组 CD4⁺CD25⁺ 表达水平为(2.33±0.36)%, 明显低于正常对照组的(3.69±0.26)%, 差异有统计学意义($P<0.05$); 甲氨蝶呤治疗组 CD4⁺CD25⁺ 表达水平为(2.81±0.35)%, 明显高于 CIA 模型组, 差异有统计学意义($P<0.05$); MSCs 移植治疗组 CD4⁺CD25⁺ 表达水平为(3.55±0.41)%, 与甲氨蝶呤治疗组比较, CD4⁺CD25⁺ 表达上调, 差异有统计学意义($P<0.05$); 但与正常对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3。



A: 正常对照组; B: CIA 模型组; C: 甲氨蝶呤治疗组; D: MSCs 移植治疗组

图 3 各组 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞表达水平比较

3 讨论

RA 是以多关节慢性滑膜炎为特征的一种常见自身免疫疾病,发病机制目前尚未完全阐明。研究表明自身反应性 T 细胞与疾病的发生、发展有密切关系,CD4⁺CD25⁺T 细胞可以调节机体损伤后的免疫反应,而机体内 CD4⁺CD25⁺T 细胞缺失会导致自身免疫性疾病的发生^[7-8]。越来越多的证据表明 RA 患者中 CD4⁺CD25⁺T 细胞存在异常。van Amelsfort 等^[5]发现,RA 患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞百分比明显高于健康对照组,而这些细胞的抑制活性却明显下降。Lawson 等^[6]检测活动期和稳定期 RA 患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞百分比,结果发现早期活动性 RA 患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞百分比明显少于健康对照组,而稳定期 RA 患者组与健康对照组比较差异则无统计学意义 ($P > 0.05$),表明 CD4⁺CD25⁺T 细胞在早期活动性 RA 患者中,其外周血数量是减少的。Cao 等^[7]发现 RA 患者靶器官中高表达 CD4⁺CD25⁺T 细胞,与外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞相比明显增高,认为与外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞转移至受累关节有关。由此看来,上调体内的 CD4⁺CD25⁺T 细胞百分比可以很好地控制 RA 病情。

本研究结果显示,MSCs 移植组 CD4⁺CD25⁺T 细胞与正常对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),说明 MSCs 治疗可以在炎症局部阻止骨和软骨的破坏,促进软骨修复。MSCs 移植治疗小鼠 CIA,能显著改善关节肿胀度,明显上调 CD4⁺CD25⁺T 细胞的表达,并且与甲氨蝶呤治疗组比较,差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明 MSCs 可以通过提高 CD4⁺CD25⁺T 细胞百分比,控制 RA 病情的发展。

综上所述,MSCs 移植治疗小鼠 CIA,能显著改善关节的肿胀度,明显上调 CD4⁺CD25⁺T 细胞表达,故 MSCs 可作为一种新的替代细胞来源用于 RA 的移植治疗。

参考文献

[1] Murphy TJ, Choileain NN, Zang Y, et al. CD4⁺CD25⁺

regulatory T cells control innate immune reactivity after injury [J]. J Immunol, 2005, 174(5): 2957-2963.

[2] 尹纪伟,赵福涛. 间充质干细胞在类风湿关节炎中的研究进展[J]. 医学综述, 2011, 3, 5(17): 644-646.

[3] 徐巍,沈波,陈葆国,等. 类风湿性关节炎患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的表达及与疾病活动性的关系[J]. 浙江检验医学, 2009, 1(7): 22-23

[4] Rizzello V, Liuzzo G, Brugaletta S, et al. Modulation of CD4⁺CD28null T lymphocytes by tumor necrosis factor alpha blockade in Patients with unstable angina[J]. Circulation, 2006, 113(19): 22-27.

[5] van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bililisma JW, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(9): 2775-2785.

[6] Lawson CA, Brown AK, Bejarano V, et al. Early rheumatoid arthritis associated with a deficit in the CD4⁺CD25⁺ high regulatory T cell population in peripheral blood[J]. Rheumatology (Oxford), 2006, 45(10): 1210-1217.

[7] Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, et al. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis[J]. Eur Immunol, 2003, 33(1): 215-223.

[8] Pittenger F, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(10): 143-147.

(收稿日期: 2014-02-12 修回日期: 2014-06-17)

(上接第 2814 页)

2013, 20(10): 1035-1041.

[10] 刘明春,刘耀川,赵敬翠,等. 奶牛子宫内膜炎化脓性杆菌 16S rRNA 基因的鉴定与分析[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(3): 343-345.

[11] 葛淑敏,钱爱东,王铁风. 10 株牛源非结核分枝杆菌 16S rRNA 基因序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32

(11): 895-897.

[12] 王艳萍. 16S rRNA 基因及 16S~23S rRNA 基因间区在微生物鉴定中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(8): 994-996.

(收稿日期: 2014-02-12 修回日期: 2014-05-17)