文章编号:1000-5404(2009)21-2143-03

论著

活化T细胞及IFN-γ对间充质干细胞中血红素加氧酶-1抗凋亡作用的影响

张 玲,白 海,王存邦,欧剑锋,杨国嵘 (兰州军区兰州总医院血液科,兰州 730050)

摘 要:目的 探讨免疫活性细胞和免疫调节因子对骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)中血红素加氧酶-1(HO-1)的影响。**方法** 体外培养人骨髓间充质干细胞,在IFN-γ及PHA活化的T细胞刺激下,应用RT-PCR方法检测HO-1 mRNA的表达情况。应用流式细胞术分析细胞凋亡情况。**结果** 正常骨髓间充质干细胞中HO-1 mRNA在IFN-γ及活化的T细胞刺激后表达下调。流式细胞术结果显示,在IFN-γ、锌原卟啉-Ⅸ(Znpp-Ⅸ)、IFN-γ+Znpp-Ⅸ的刺激下,间充质干细胞出现明显的凋亡,凋亡率分别为(56.50±0.16)%、(56.85±2.27)%、(82.53±2.65)%,较正常MSCs组显著增高[(7.56±1.43)%,$P<0.05$]。**结论** 免疫活性细胞及免疫调节因子使骨髓间充质干细胞中HO-1 mRNA表达下调,进而促进MSCs凋亡。

关键词: 间充质干细胞;血红素加氧酶-1;细胞凋亡;IFN-γ
中图法分类号: R329.28; R392.12; R392.2 **文献标识码:** A

Immunocompetent cells and immune regulator improve apopotosis of mesenchymal stem cells by down-regulating heme oxygenase-1

ZHANG Ling, BAI Hai, WANG Cun-bang, OU Jian-feng, YANG Guo-rong (Department of Hematology, General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of immunocompetent cells and immune regulator on the apoptosis of human mesenchymal stem cells (MSCs) and on mRNA expression of heme oxygenase-1. Methods MSCs were cultured by density gradient centrifugation and then identified by flow cytometry. RT-PCR was used to detect HO-1 mRNA expression and flow cytometry was used to analyze cell apoptosis after the stimulation of IFN-γ and PHA-activated T cells. Results The mRNA expression of Heme oxygenase-1 was observed in MSCs and decreased after the stimulation of IFN-γ and activated T cells. IFN-γ, znpp-Ⅸ and combined these two caused obvious cell apoptosis in MSCs, with an apoptotic rate of (56.50±0.16)%, (56.85±2.27)%, and (82.53±2.65)% respectively. All of them had a significant difference compared with the normal MSCs [(7.56±1.43)%, $P<0.05$]. Conclusion Immunocompetent cells and immune regulator down-regulates the expression of HO-1 mRNA in MSCs, and then improves cell apoptosis.

Key words: mesenchymal stem cells;apoptosis;heme oxygenase-1

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)是一类来源于中胚层的未分化间质干细胞,是骨髓基质细胞的重要组成部分,参与骨髓造血微环境对造血的调控作用[1]。MSCs具有抑制免疫的功能,已有研究表明血红素加氧酶-1(heme oxygenase,HO-1)在MSCs免疫抑制效应中发挥了重要作用[2]。然而免疫细胞、免疫调节因子是如何影响MSCs的,HO-1是否在其中也扮演了重要角色,尚需进一步明确。

再生障碍性贫血(aplastic anemia)是血液系统常见的疾病,发病原因极为复杂,目前认为与造血干细胞内在增殖缺陷、造血微环境功能缺陷及机体免疫功能紊乱相关[3]。造血微环境主要由骨髓基质细胞组成,以往对造血微环境的研究大多停留在基质成分的基础上[4]。近年来研究发现MSCs是构成骨髓基质的重要组成部分,但迄今为止MSCs与再生障碍性贫血发病机理的相关研究甚少。本实验在免疫效应细胞及免疫活化因子存在条件下对MSCs中HO-1进行研究,期望为再生障碍性贫血发病机制的进一步研究提供理论基础,并为临床应用MSCs提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

DMEM培养基购自Gibco公司,锌原卟啉-Ⅸ、PHA、碘化丙啶(PI)购自美国Sigma公司,Trizol reagent购自Invitrogen公

作者简介:张 玲,女,甘肃省张掖市人,硕士研究生,主要从事造血干细胞移植方面的研究。E-mail:zhangling1209@126.com
通信作者:白 海,电话:(0931)8994171,E-mail:baihai98@tom.com
收稿日期:2009-03-21;修回日期:2009-04-15

司,HO-1 基因扩增引物由上海生工合成,反转录试剂盒与 Annexin Ⅴ-FITC/PI 凋亡试剂盒购自杭州联科生物公司。流式细胞仪(FACSCalibur)购自美国 BD 公司。

1.2 间充质干细胞的培养、鉴定

间充质干细胞的培养采用密度梯度离心法联合贴壁细胞培养法。流式细胞术检测 MSCs 表面抗原。详细步骤参见文献[5]。

1.3 T 细胞的分离培养、鉴定及活化

T 细胞的分离培养采用密度梯度离心法联合尼龙棉柱法,流式细胞术检测 MSCs 表面抗原。详细步骤参见文献[3]。

1.4 活化 T 细胞及 IFN-γ 对 MSCs 中 HO-1 mRNA 的表达的影响

1.4.1 实验分组 MSCs 组;MSCs + 活化 T 细胞(对照)组;MSCs + 活化 T 细胞(实验)组;MSCs + IFN-γ(对照组);MSCs + IFN-γ(实验组)。

1.4.2 引物设计 由 Primer 引物设计软件设计,由上海生工合成。HO-1:上游 5′-TGACACCAAGGACCAGAG-3′,下游 5′-GTAAGGAAGCCAGCCAAG-3′。GAPDH:上游 5′-CACCAGGGCTGCTTTTAACT-3′,下游 5′-ATGATGACCCTTTTGGCTCC-3′。

1.4.3 定性 RT-PCR ①总 RNA 的提取:按试剂盒说明书操作。②细胞反转录产物制备:反应总体系为 60 μl,取总 RNA 水溶液约 30 μl,3 μl $Oligo^{(dt)}$,6 μl dNTP,65 ℃ 5 min,12 μl 5 × First strand Buffer,3 μl 0.1 mol/L DTT,3 μl RNase Out,3 μl 反转录酶,混匀后 52 ℃ 90 min,85 ℃ 5 min。③PCR:分别以各组细胞 cDNA 为模板用于 PCR,循环参数采用 94 ℃ 45 s,52.6 ℃ 40 s,72 ℃ 40 s,30 个循环。④PCR 扩增产物进行电泳,在紫外线透射反射检测分析仪下观察,数码相机图像采集,结果分析。

1.5 流式细胞术 Annexin Ⅴ-FITC/PI 检测 MSC 凋亡

实验分组 MSCs 组;MSCs + 0.5 μg/ml IFN-γ 组;MSCs + 25 μmol/L Znpp-Ⅸ组;MSCs + 25 μmol/L Znpp-Ⅸ + 0.5 μg/ml IFN-γ 组。将处理后的各组细胞用胰酶消化,吹打脱落,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清;各样本中加 1 × Buffer 400 μl 混匀,然后加入 FITC 标记的 Annexin Ⅴ 5 μl 和碘化丙啶(propidium iodide, PI) 5 μl 后,流式细胞仪检测,数据分析采用 Cell Quest 软件。Annexin Ⅴ 阳性的细胞为凋亡细胞;Annexin Ⅴ 阳性且 PI 阴性的细胞为早期凋亡细胞,Annexin Ⅴ 阳性且 PI 阳性的细胞为晚期凋亡细胞,两者合并计算细胞凋亡率。而 PI 阳性且 Annexin Ⅴ 阴性细胞认为是死亡细胞。细胞凋亡率(%) = [(Annexin $Ⅴ^+/PI^-$ 细胞数 + Annexin $Ⅴ^+/PI^+$ 细胞数)/10 000] × 100%

1.6 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件处理实验数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 检验。

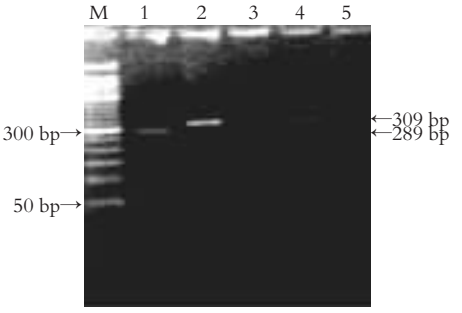
2 结果

2.1 MSCs 与 T 淋巴细胞纯度鉴定

MSCs 形态均匀一致,呈长梭形外观。流式细胞仪结果显示:MSCs 高表达 CD44 和 CD71。尼龙棉柱法分离的外周血淋巴细胞,纯化后的淋巴细胞 CD3 分子表达在 80% 以上[5]。

2.2 活化 T 细胞及 IFN-γ 对 MSCs 中 HO-1 mRNA 的影响

RT-PCR 显示:以 GAPDH 为内对照(309 bp),正常人骨髓间充质干细胞经活化 T 细胞及 IFN-γ 刺激后没有 HO-1 mRNA 的表达,在 289 bp 处未出现 HO-1 mRNA 的表达。而与其作对照 GAPDH 均有表达。说明正常人骨髓间充质干细胞在 IFN-γ 及活化 T 细胞刺激下 HO-1 mRNA 的表达下调(图 1)。

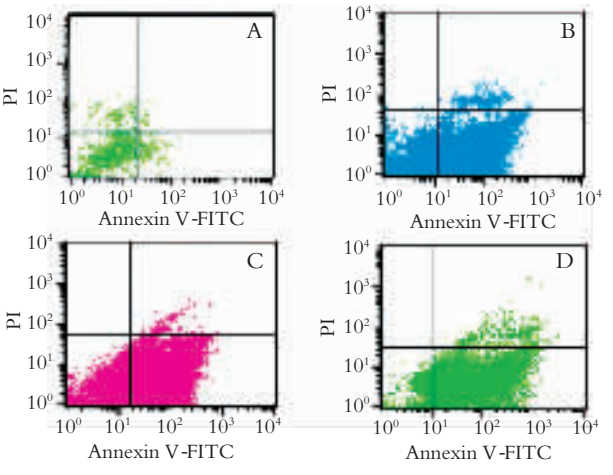


M:DNA 标准;1:正常骨髓间充质干细胞中 HO-1 mRNA 表达;2:经活化 T 细胞刺激后骨髓间充质干细胞中 GAPDH 的表达;3:经活化 T 细胞刺激后骨髓间充质干细胞中 HO-1 mRNA 表达;4:经 IFN-γ 刺激后骨髓间充质干细胞中 GAPDH 的表达;5:经 IFN-γ 刺激后骨髓间充质干细胞中 HO-1 mRNA 的表达

图 1 活化 T 细胞及 IFN-γ 使 MSCs 中 HO-1 mRNA 表达下调

2.3 流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 检测 MSCs 凋亡

流式结果显示,各组细胞经刺激后,均发生不同程度凋亡,MSCs + Znpp-Ⅸ + IFN-γ 组细胞的凋亡率最高[(82.53 ± 2.65)%],加入血红素加氧酶特异性抑制剂 Znpp-Ⅸ 组凋亡率为(56.85 ± 2.27)%,加入 IFN-γ 组凋亡率为(56.50 ± 0.16)%,均较正常 MSCs 组[(7.56 ± 1.43)%]显著增高($P < 0.05$)。而 MSCs + IFN-γ 组与 MSCs + Znpp-Ⅸ组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),表明血红素加氧酶-1 的存在对间充质干细胞有明显的抗凋亡作用(图 2)。



A:MSCs 组;B:MSCs + IFN-γ 组;C:MSCs + Znpp-Ⅸ组;D:MSCs + IFN-γ + Znpp-Ⅸ组

图 2 流式细胞术检测 IFN-γ 及 Znpp-Ⅸ对 MSCs 凋亡的影响

3　讨论

MSCs 可表达多种造血细胞因子,具有支持造血、抑制免疫等功能。Chabannes 等[2]报道正常人骨髓间充质干细胞中有 HO-1 的存在。血红素加氧酶(heme oxygenase,HO)是哺乳动物体内与亚铁血红素代谢相关的一种具有多种功能的微粒体氧化酶,主要分布于肺脏、脾脏、肝脏、网状内皮系统和骨髓。在体内 HO 有 HO-1、HO-2、HO-3 3 种同工酶,分别由不同基因所编码。HO-1 为诱导型 HO,亦称热休克蛋白 32(HSP32),许多诱导因素均可引起其活性及蛋白量增加;HO-2 是组成型酶,其作用多认为与 CO 的神经信使作用有关;HO-3 分布广泛,但活性很弱。已有研究证实 HO-1 作为一种应激蛋白,在有害环境刺激和疾病条件下具有抗炎症、抗凋亡、调节细胞分化等作用[6-8]。近年来研究发现 MSCs 是构成骨髓基质的重要组成部分,而造血微环境主要由骨髓基质细胞组成。有证据显示骨髓造血微环境的异常可能参与了再生障碍性贫血发生的某些环节。迄今为止,MSCs 与再障发病机制的报道很少。再生障碍性贫血的发病机制主要包括:①造血干祖细胞缺陷;②异常免疫反应损伤造血干细胞;③造血微环境缺陷。再生障碍性贫血(再障)是造血功能衰竭导致的全血细胞减少,其发病机制复杂,尚未完全阐明,本研究为再障的发病提供了一些新的理论依据。

本实验 RT-PCR 结果显示,正常人骨髓间充质干细胞中加入 IFN-γ 及 PHA 活化的 T 细胞刺激后,MSCs 中 HO-1 mRNA 的表达下调。国内外大量文献报道,加入细胞因子可以使细胞中 HO-1 表达上调。而 Chabannes 等[2]研究显示,加入 IFN-γ 并不能使 HO-1 表达上调,我们的检测结果与该文献报道一致。流式细胞术结果显示,在正常骨髓间充质干细胞中加入IFN-γ可使细胞出现凋亡,推测这种凋亡效应与 HO-1 mRNA 表达下调有关。而加入血红素加氧酶-1 特异性抑制剂 Znpp-Ⅸ后,凋亡较前有所增加,HO-1 特异性抑制剂可直接抑制间充质干细胞中 HO-1 这种蛋白质分子,两者的同时加入在抑制 HO-1 mRNA 的同时,也阻断了 HO-1 的抗凋亡作用,因此,间充质干细胞凋亡更加明显。

在绝大多数再生障碍性贫血患者体内的 IFN-γ 被免疫激活[9],而 IFN-γ 主要由活化 T 细胞及 NK 细胞分泌,是体内重要的免疫效应分子和免疫调节因子。再障患者免疫功能异常,免疫效应细胞及免疫调节因子大量激活,影响到间充质干细胞中 HO-1 mRNA 的表达,使间充质干细胞凋亡增加,进而影响造血微环境异常。这一结果与再障患者间充质干细胞缺陷,造血微环境异常,具有一致性。国内有文献报道,在免疫因素影响下,再障患者间充质干细胞有向脂肪细胞分化的特性。本实验发现,免疫活性细胞、免疫调节因子通过 HO-1 mRNA 的表达下调使骨髓间充质干细胞凋亡增加,进一步会影响到造血微环境的缺陷,微环境的紊乱势必影响造血。这一实验结果将为再障发病机制的研究提供了一些新的理论依据。

综上所述,推测正是由于再障患者骨髓 MSC 中 HO-1 在免疫因素作用下表达下调,HO-1 抗凋亡作用消失,使得 MSCs 凋亡增加。同时有文献报道 MSCs 可向脂肪细胞转化[10],进而引起再障患者造血微环境异常,再综合其他免疫等因素,最终导致了再障的发生。研究再生障碍性贫血患者骨髓 MSCs 功能及 HO-1 的生物学特性,对于揭示和完善再生障碍性贫血的发病机制,指导临床对不同发病原因的患者采取不同的治疗措施以提高疗效均具有重要的意义。

参考文献:

[1] Aggarwal S, Pittenger M F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses[J]. Blood, 2005, 105(4): l815 - l822.

[2] Chabannes D, Hill M, Merieau E, *et al*. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells[J]. Blood, 2007, 110(10): 3691 - 3694.

[3] 邵宗鸿. 再生障碍性贫血[M]//叶任高,陆再英. 内科学. 第 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2004: 572 - 576.

[4] 陈　静,王　茜,施英唐,等. 再生障碍性贫血患儿骨髓间充质干细胞的生物学特点[J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13(5): 832 - 838.

[5] 张　玲,白　海,吴　涛,等. 血红素加氧酶-1 在间充质干细胞免疫抑制效应中的作用[J]. 西北国防医学杂志, 2009, 30(2): 117 - 119.

[6] Otterbein L E, Choi A M. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol , 2000, 279(6): L1029 - L1037.

[7] 王耀宏,赵金垣. 血红素加氧酶的研究进展[J]. 环境与职业医学, 2003, 20(3): 239 - 242.

[8] Terry C M, Clikeman J A, Hoidal J R, *et al*. TNF-alpha and IL-1alpha induce heme oxygenase-1 *via* protein kinase C, Ca^{2+}, and phospholipase A2 in endothelial cells[J]. Am J Physiol,1999, 276(5 Pt 2): H1493 - H1501.

[9] Yang N. 再生障碍性贫血和有关的骨髓衰竭综合症[M]//Goldman L,Benett J. 王贤才,译. 西式内科学. 第5 卷. 第21 版. 西安:兴界图书出版公司,2000: 5 - 26.

[10] 岳　寒,陈　磊,李　静,等. 再生障碍性贫血患者骨髓间充质干细胞生物学特性的初步研究[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(6): 20 - 24,35.

(编辑　张　维)