doi:10.11659/jjssx.03E022058

·基础研究·

THBS1 基因编辑 BMSCs 对变应性鼻炎模型小鼠鼻黏膜屏障功能及炎症反应的影响

王 丽,黄永阳,张 义,綦 彬,万 龙,杜炎平,陈才盛 (黄冈市中心医院耳鼻喉头颈外科,湖北 黄冈 438000)

[摘 要] **目的** 探究血小板反应蛋白 1(THBS1)基因编辑骨髓间充质干细胞(BMSCs)对变应性鼻炎(AR)小鼠的鼻黏膜屏障功能与炎症反应的影响。**方法** 分离培养小鼠 BMSCs,流式细胞仪测定细胞表面标记物表达,茜素红染色和油红 O 染色检测细胞成骨与成脂分化能力,鉴定分离的结果;使用含 THBS1 基因的慢病毒感染 BMSCs,荧光显微镜观察细胞内绿色荧光蛋白 EGFP 表达,并以实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测细胞内 THBS1 mRNA 和蛋白表达情况,鉴定感染效果。实验分为对照组、模型组、BMSCs组、THBS1-BMSCs 组,每组 15 只,除对照组外的其余 3 组小鼠均构建 AR 模型,对照组和模型组小鼠均尾静脉注射 0.1 mL PBS,BMSCs 组和 THBS1-BMSCs 组小鼠分别尾静脉注射 0.1 mL BMSCs、0.1 mL 经 THBS1 基因编辑的 BMSCs。处理结束后,对各组小鼠流涕、挠鼻及喷嚏情况进行统计,ELISA 法检测血清 IFN-γ、IgE、TNF-α、IL-4 及 IL-6 的含量,HE 染色和 PAS 染色观察鼻黏膜病理形态学变化,免疫荧光染色检测鼻黏膜内 CK-5 与 β-tubulin 表达情况,Western blot 检测鼻黏膜内紧密连接蛋白 Claudin-1、Occludin 的水平。**结果** 分离的细胞表面 CD105、CD90 和 CD73 为阳性表达,CD34 和 CD45 为阴性表达,并具备良好的成骨与成脂分化能力,说明成功分离到 BMSCs。经含 THBS1 基因的慢病毒感染后的 BMSCs 出现明显绿色荧光蛋白 EGFP 表达,THBS1 mRNA 和蛋白相对表达均上调($P<0.05$)。与对照组比较,模型组小鼠精神萎靡,伴有连续性喷嚏和挠鼻次数增加($P<0.05$),血清 IFN-γ 含量降低,IgE、TNF-α、IL-4、IL-6 含量均升高($P<0.05$),鼻黏膜结构受损,有大量嗜酸性粒细胞浸润,且杯状细胞数目也明显增加($P<0.05$),CK-5 与 β-tubulin 的荧光强度均减弱($P<0.05$),Claudin-1、Occludin 的蛋白相对表达均下调($P<0.05$);与模型组比较,BMSCs 组和 THBS1-BMSCs 组小鼠精神状态有所好转,喷嚏和挠鼻次数减少($P<0.05$),血清 IFN-γ 含量升高,IgE、TNF-α、IL-4、IL-6 含量均降低($P<0.05$),鼻黏膜内嗜酸性粒细胞与杯状细胞数目均减少($P<0.05$),CK-5 与 β-tubulin 的荧光强度增强($P<0.05$),Claudin-1、Occludin 的蛋白相对表达量均上调($P<0.05$);与 BMSCs 组比较,THBS1-BMSCs 组小鼠喷嚏和挠鼻次数减少($P<0.05$),血清 IFN-γ 含量升高,IgE、TNF-α、IL-4、IL-6 含量均降低($P<0.05$),鼻黏膜嗜酸性粒细胞与杯状细胞数目均进一步减少($P<0.05$),CK-5 与 β-tubulin 荧光强度显著增强($P<0.05$),Claudin-1、Occludin 的蛋白相对表达均上调($P<0.05$)。**结论** 经 THBS1基因编辑的 BMSCs 可明显增强 AR 小鼠的鼻黏膜屏障功能,降低炎症反应,从而减轻鼻部症状。

[关键词] 血小板反应蛋白 1;骨髓间充质干细胞;变应性鼻炎;鼻黏膜功能;炎症

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-03-11

Effects of THBS1 gene-edited BMSCs on nasal mucosal barrier function and inflammatory response in model mice with allergic rhinitis

WANG Li, HUANG Yong-yang, ZHANG Yi, QI Bin, WAN Long, DU Yan-ping, CHEN Cai-sheng (Department of Otolaryngology and Head and Neck Surgery, Huanggang Central Hospital, Huanggang Hubei 438000, China)

Abstract: Objective To explore the effects of thrombospondin-1 (THBS1) gene-edited bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on the nasal mucosal barrier function and inflammatory response in mice with allergic rhinitis (AR). **Methods** Mouse BMSCs

[基金项目] 湖北省卫生和计划生育委员会科研项目(WJ2018F087)

[13] Lee JS, Kim HS, Hahm KB, et al. Effects of genetic and pharmacologic inhibition of COX-2 on colitis-associated carcinogenesis in mice[J]. J Cancer Prev, 2020, 25(1): 27-37. doi: 10.15430/JCP.2020.25.1.27.

[14] Yin J, Xia W, Li Y, et al. COX-2 mediates PM2.5-induced apoptosis and inflammation in vascular endothelial cells[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(9): 3967-3976.

[15] Abbate A, Santini D, Biondi-Zoccai GG, et al. Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) expression at the site of recent myocardial infarction: friend or foe? [J]. Heart, 2004, 90(4): 440-443. doi: 10.1136/hrt.2003.010280.

[16] 贾 丹,张 媛,连 鑫,等. 抑制 COX-2 表达对心肌缺血再灌注损伤过程中心肌细胞保护作用的研究[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(3): 495-498. doi: 10.3969/j.issn.1007-4287.2020.03.042.

[17] 王明亮,刘 敏,徐亚伟,等. 心肌缺血再灌注时内皮功能紊乱与心肌细胞凋亡的相关性研究[J]. 中华老年医学杂志, 2021, 40(4): 501-505. doi: 10.3760/cma.j.issn.0254-9026.2021.04.020.

[18] Chen W, Lv L, Nong Z, et al. Hyperbaric oxygen protects against myocardial ischemia reperfusion injury through inhibiting mitochondria dysfunction and autophagy[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(5): 4254-4264. doi: 10.3892/mmr.2020.11497.

[19] Yuan Y, Zheng Y, Zhang X, et al. BNIP3L/NIX-mediated mitophagy protects against ischemic brain injury independent of PARK2[J]. Autophagy, 2017, 13(10): 1754-1766. doi: 10.1080/15548627.2017.1357792. doi: 10.1080/15548627.2017.1357792.

(编辑:龙小芬)

were isolated and cultured. The expression of stem cell surface markers was measured by flow cytometry. Alizarin red staining and oil red O staining were used to detect the osteogenic and adipogenic differentiation abilities, and the isolated results were identified; Lentivirus containing THBS1 gene was used to infect BMSCs, fluorescence microscope was used to observe the expression of green fluorescent protein EGFP in cells, and real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot were used to detect the expression of THBS1 mRNA and protein of cells to identify the infection effect. The experiment was divided into the control group, the model group, the BMSCs group, and the THBS1-BMSCs group, with 15 mice in each group, and the other three groups except the control group all constructed AR models. The mice in the control group and the model group were injected with 0.1 mL PBS through tail vein. The mice in the BMSCs group and the THBS1-BMSCs group were injected with 0.1 mL BMSCs and 0.1 mL THBS1 gene-edited BMSCs through tail vein, respectively. After the treatment, the runny nose, nosal scratching and sneezing of mice in each group were statistically analyzed. ELISA was used to detect the serum contents of IFN-γ, IgE, TNF-α, IL-4 and IL-6, HE staining and PAS staining were used to observe the pathological changes of nasal mucosa, immunofluorescence staining was used to detect the expression of CK-5 and β-tubulin in the nasal mucosa, Western blot was used to detect the levels of tight junction proteins Claudin-1 and Occludin in the nasal mucosa. **Results** The isolated cells showed positive expression of CD105, CD90 and CD73, and negative expression of CD34 and CD45, and had good osteogenic and adipogenic differentiation abilities, indicating that BMSCs were successfully isolated. BMSCs infected with the lentivirus containing THBS1 gene showed obvious green fluorescent protein EGFP expression, and the relative expressions of THBS1 mRNA and protein were up-regulated ($P<0.05$). Compared with the control group, the mice in the model group were lethargic, accompanied by continuous sneezing and frequent nasal scratching ($P<0.05$), the serum IFN-γ content decreased, and the IgE, TNF-α, IL-4 and IL-6 contents increased ($P<0.05$), the structure of nasal mucosa was damaged, a large number of eosinophils were infiltrated, and the number of goblet cells was also significantly increased ($P<0.05$), the fluorescence intensity of CK-5 and β-tubulin were both weakened ($P<0.05$), and the relative protein expressions of Claudin-1 and Occludin were all down-regulated ($P<0.05$). Compared with the model group, the mental state of the mice in the BMSCs group and the THBS1-BMSCs group were improved, the times of sneezing and nasal scratching decreased ($P<0.05$), the serum IFN-γ content increased, and the IgE, TNF-α, IL-4 and IL-6 contents decreased ($P<0.05$), the number of eosinophils and goblet cells in the nasal mucosa decreased ($P<0.05$), and the fluorescence intensity of CK-5 and β-tubulin increased ($P<0.05$), the relative protein expressions of Claudin-1 and Occludin were all up-regulated ($P<0.05$). Compared with the BMSCs group, the times of sneezing and nasal scratching of the mice in the THBS1-BMSCs group decreased ($P<0.05$), the serum IFN-γ content increased, and the IgE, TNF-α, IL-4, and IL-6 content decreased ($P<0.05$), the number of eosinophils and goblet cells in the nasal mucosa were further decreased ($P<0.05$), and the fluorescence intensity of CK-5 and β-tubulin significantly enhanced ($P<0.05$), and the relative protein expressions of Claudin-1 and Occludin were all up-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** THBS1 gene-edited BMSCs can significantly strengthen the nasal mucosal barrier function of AR mice, reduce the inflammatory response, thereby reducing nasal symptoms.

Keywords: thrombospondin-1; bone marrow mesenchymal stem cells; allergic rhinitis; nasal mucosal function; inflammation

血小板反应蛋白家族是一类具有多个结构域的钙相关糖蛋白,主要位于细胞膜表面,由于其特殊的三聚体结构,血小板反应蛋白可通过与各种靶蛋白的相互作用,广泛参与多种生理及病理活动过程,如血管生成、细胞运动、细胞黏附、细胞骨架组成和细胞外基质反应[1-2]。血小板反应蛋白 1(thrombospondin-1, THBS1)作为血小板反应蛋白家族最早确定的成员,由16 393个碱基组成,包括 22 个外显子,由包括血小板、巨噬细胞和脂肪细胞等在内的多种细胞分泌,暂存于细胞外基质中,可抑制内皮细胞的迁移及血管内皮生长因子的释放[3]。有研究表明,THBS1 在炎症疾病、组织纤维化、组织损伤、多项肿瘤及血管形成过程中均发挥重要作用[4-5]。

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是具有自我更新和多向分化潜力的细胞,具有组织修复功能,并且可作为免疫反应的调节剂。鉴于其免疫抑制特性、组织修复能力和各种生物因子的分泌能力,目前基于 BMSCs 的疗法已在多种疾病的临床前研究和临床试验中开展,包括心血管疾病、神经系统疾病、器官损伤、器官移植、慢性炎症和自身免疫性疾病等[6-7]。变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)作为一种常见的慢性可逆性鼻腔炎症性疾病,主要表现为阵发性反复打喷嚏、流鼻涕或鼻塞,症状通常连续出现 2 d 或更长时间,通常会导致嗅觉功能严重受损[8]。AR 参与全身炎症过程,并与哮喘、鼻窦炎和过敏性结膜炎等炎症性疾病有关,对患者的睡眠、学习、工作和社交生活均会造成严重影响,并导致更高的社会医疗成本。AR 治疗的关键在于防止体内进一步的炎症病变并促进组织功能的恢复。BMSCs 移植被认为是一种有潜力的 AR 治疗方法。本研究通过以 THBS1基因编辑的 BMSCs 移植治疗 AR 小鼠,观察该作用下小鼠鼻黏膜屏障功能及炎症反应变化,以期为 AR 的治疗寻找新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

65 只 SPF 级健康 BALB/c 小鼠,10 周龄,雌雄各半,体质量 18 ~ 25 g,由湖北省实验动物研究中心提供,生产许可证号:SCXK(鄂)2015-0018,饲养于无特定病原体屏障饲养室内,温度 22 ~ 24 ℃,相对湿度(50 ± 5)%,12 h/12 h 明暗周期交替,期间喂食鼠粮,自由饮水。本研究获得我院医学伦理委员会审核批准(KY20210519108)。

1.2 主要材料与试剂

卵清蛋白(ovalbumin,OVA)和氢氧化铝(美国 Sigma 公司),胎牛血清、青霉素/链霉素混合液、L-谷胺酰胺、DMEM 培养液及胰蛋白酶(美国 HyClone 公司),RNAiso Plus、逆转录和实时荧光定量试剂盒(日本 Takara 公司),茜素红染液、油红 O 染液、BCA 蛋白测定试剂盒及 ECL 超敏发光液(上海碧云天生物研究所),酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所),HE 染色试剂盒和 PAS 染色试剂盒(北京索莱宝科技公司),免疫荧光染色试剂盒(武汉博士德生物公司),异硫氰酸荧光素标记的 CD34、CD45、CD73、CD90 及 CD105 抗体,兔抗 THBS1、Claudin-1、CK-5、β-tubulin 单克隆抗体和兔抗 Occludin、GAPDH 多克隆抗体(英国 Abcam 公司),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 及荧光标记的山羊抗兔 IgG 抗体(北京康为世纪)。含 THBS 基因—绿色荧光蛋白 EGFP 标记的慢病毒载体以及空载体—绿色荧光蛋白 EGFP 标记的慢病毒载体由上海吉凯基因公司构建、完成包装及滴度测定。

1.3 BMSCs 分离与鉴定

将 5 只 BALB/c 小鼠以脱臼法处死,无菌环境下取其股骨和胫骨,PBS 清洗,断开股骨暴露骨髓腔,用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素及 2 mmol/L L-谷胺酰胺的 DMEM 培养液反复冲洗,并收集冲洗液置于干净离心管,以 4 000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 洗涤,加入新鲜培养液重悬细胞,以 1×10^6/mL 的密度接种于培养瓶,放置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,期间每 2 d 换液 1 次。待细胞生长至融合度为 80% ~ 90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,常规传代培养,倒置显微镜下观察细胞形态与生长情况。取第 5 代呈对数生长的 BMSCs,消化后取细胞悬液,分别加入异硫氰酸荧光素标记的 CD34、CD45、CD73、CD90 及 CD105 抗体,经流式细胞仪测定细胞表面标记物表达。分别使用成骨完全培养基诱导 21 d,以成脂分化培养基诱导 14 d,诱导结束后,通过茜素红染色和油红 O 染色检测细胞成骨与成脂分化能力。

1.4 THBS1 基因修饰 BMSCs 构建

取对数生长的 BMSCs,以 5×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板内,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中过夜培养。次日,在培养孔细胞中添加含 THBS1 基因—绿色荧光蛋白 EGFP 标记的慢病毒液或空载体—绿色荧光蛋白 EGFP 标记的慢病毒液感染 BMSCs,分别记为 THBS1-BMSCs 组、NC-BMSCs 组,同时添加感染增强液以提高效果,复感染指数 MOI = 10,置于细胞培养箱孵育 24 h 后,更换为含嘌呤霉素的完全培养基进行筛选,以正常培养的 BMSCs 作为对照组。48 h 后用荧光显微镜观察感染后细胞内绿色荧光蛋白 EGFP 表达。

1.5 实时荧光定量 PCR

根据 RNAiso Plus 试剂说明书提取感染后细胞总 RNA,紫外分光光度计测量 OD 值,确定 RNA 样品的质量浓度。以总 RNA 为底物逆转录合成 cDNA,再以 cDNA 为模板,通过荧光实时定量 PCR 测定 THBS1 mRNA 水平,根据定量试剂盒说明书操作,以 GAPDH 为内参基因,扩增条件:第 1 阶段,95 ℃ 3 min(1 个循环);第 2 阶段,95 ℃ 12 s,62 ℃ 40 s,95 ℃ 15 s(42 个循环)。基因引物序列:THBS1 上游引物 5'-AGCCGC-CACATCAAACACATA-3',下游引物 5'-CGCTGGAT-TCTCAAGTCGTT-3';GAPDH 上游引物 5'-AACG-GATTTGGTCGTATTG-3',下游引物 5'-GGAAGATG-GTGATGGGATT-3'。扩增结束后,采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 THBS1 mRNA 相对表达水平。

1.6 Western blot

RIPA 缓冲液预冷处理后,加入到感染后细胞或研磨后的鼻黏膜组织中,提取总蛋白,以 BCA 法测定浓度。取等量蛋白样品与 5 × Loading buffer 混合,沸水浴煮沸 10 min,上样至 10% SDS-PAGE 凝胶孔内,80 V恒压电泳 20 min 后,将电压调为 110 V 电泳 60 min,恒压 100 V,冰上 2 h 转至 PVDF 膜,加入 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,TBST 洗膜,膜上滴加兔抗 THBS1单克隆抗体、兔抗 Claudin-1 单克隆抗体和兔抗 Occludin多克隆抗体,均按 1∶1 000 稀释,4 ℃孵育过夜;次日,TBST 洗膜,加入对应辣根过氧化物酶标记二抗,以 1∶5 000 稀释,室温孵育 1 h。TBST 再次洗膜,ECL 显色,凝胶成像系统扫膜拍照,Image-ProPlus 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 作为内参蛋白。

1.7 动物模型构建与分组处理

60 只小鼠随机分为对照组、模型组、BMSCs 组、THBS1-BMSCs 组,每组 15 只。除对照组外,其余 3 组小鼠构建 AR 模型。AR 造模:取适应性饲养后的 BALB/c 小鼠,参考文献[9]建立 AR 实验动物模型,首先进行基础致敏,以 1 mL 生理盐水溶解 0.3 mg OVA 与 30 mg 氢氧化铝,混匀制备混悬液,进行小鼠

腹腔注射,隔日注射 1 次,共注射 8 次,开始注射时记为 1 d,16 d 后结束,对照组小鼠同时注射等量生理盐水;基础致敏后,进行激发,配制 10 mg/100 L OVA,以微量进样器从小鼠双侧鼻腔滴入,每天 1 次,连续 7 d,对照组同时滴入等量生理盐水,22 d 后结束。激发后第22 ~25 天,用酒精擦拭鼠尾静脉消毒,对照组和模型组小鼠均尾静脉注射 0.1 mL PBS,BMSCs 组小鼠尾静脉注射 0.1 mL BMSCs(含 5×10^5 个细胞),THBS1-BMSCs 组小鼠尾静脉注射 0.1 mL 经 THBS1 基因编辑的 BMSCs(含 5×10^5 个细胞)。

1.8 生物学症状评分

造模后观察各组小鼠活动、摄食及饮水等情况,对其流涕、挠鼻及喷嚏情况进行统计,各项叠加量化计分:喷嚏,1 ~3 个记 1 分,4 ~10 个记 2 分,11 个以上记 3 分;流鼻涕,流至前鼻孔记 1 分,流出超过前鼻孔记 2 分,流至面部记 3 分;挠鼻,1 ~5 次记 1 分,6 ~15 次记 2 分,16 次以上记 3 分。评分总分大于 5 分即为造模成功[10]。给药后统计各组小鼠挠鼻与喷嚏次数,并进行比较。

1.9 ELISA 测定血清炎症因子水平

通过眼眶采集各组小鼠血液,置于室温下 2 h,以 4 000 r/min离心 15 min,收获血清弃去余物,在 -80 ℃冰箱中保存。使用特异性 ELISA 试剂盒检测各组小鼠血清 IFN-γ、IgE、TNF-α、IL-4 及 IL-6 的含量,实验步骤严格按照试剂盒说明书操作。

1.10 HE 染色和 PAS 染色观察鼻黏膜病理形态学

处死小鼠后取鼻中隔黏膜,用 4% 多聚甲醛固定 24 h,常规石蜡包埋,连续切片(厚度 4 μm),进行 HE 染色,中性树胶封固切片,每张切片随机选择 5 个区域,在光镜下观察组织病理学改变,采集图像储存,计数嗜酸性粒细胞数目,结果以平均值表示。

将制备的鼻黏膜组织切片脱蜡至水,浸入阿利新蓝染液处理 15 min,蒸馏水清洗,置于过碘酸溶液中氧化 5 min,以 SchiffReagent 浸染 10 min,流水冲洗后,酸性分化液分化,氨水返蓝,经梯度乙醇脱水与二甲苯透明后,中性树胶封固,在光镜下观察统计杯状细胞数目,采集图像储存,同样随机选择 5 个视野,结果以平均值表示。

1.11 免疫荧光染色检测鼻黏膜 CK-5 与 β-tubulin 蛋白表达

将鼻黏膜组织复温并晾干,使用预冷的丙酮固定 10 min,PBS 清洗,组化笔在组织周围画圈,滴加蛋白酶 K 液于圈内,37 ℃孵育 30 min 后,在圈内滴入适量破膜工作液,常温孵育 30 min,PBS 清洗,3% BSA 封闭 30 min。弃去封闭液后,在切片上滴加稀释后的兔抗 CK-5 与 β-tubulin 单克隆抗体(1∶200),4 ℃隔夜孵育。次日,弃去原液,加入荧光标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1∶200),室温孵育 2 h,DAPI 避光染核 10 min,中性树胶封固,在荧光显微镜下观察组织染色情况并采集图像储存,随机选择 5 个视野,计算各蛋白表达的平均荧光强度。

1.12 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计软件分析数据。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组重复测量数据的比较采用单因素方差分析,组内两两数据的比较采用 *LSD-t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 鉴定

通过倒置显微镜观察分离培养的细胞,可见细胞生长状态良好,大小一致,呈网状或放射状,见图 1a。经过茜素红染色和油红 O 染色后,细胞内出现明显橘红色钙沉淀和红色脂滴积累,见图 1b、c。流式细胞结果显示,细胞表面抗原 CD105、CD90 和 CD73 均呈阳性表达,而 CD34 和 CD45 均呈阴性表达,并具备良好的成骨与成脂分化能力,说明成功分离到 BMSCs,见图 1d。

2.2 THBS1 基因编辑 BMSCs 的效果测定

倒置荧光显微镜观察到 NC-BMSCs 组和 THBS1-BMSCs 组细胞中均可见明显的绿色荧光蛋白 EGFP 表达,感染率在 90% 以上,而对照组未见明显的绿色荧光蛋白 EGFP 表达,见图 2a。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测结果显示,与对照组和 NC-BMSCs 组比较,THBS1-BMSCs 组细胞中 THBS1 mRNA 和蛋白相对表达量均显著上调($P<0.05$),见图 2b、c。

2.3 各组小鼠生物学症状评分

经统计,造模后小鼠生物学症状评分大于 5 分,提示造模成功。与对照组比较,模型组小鼠出现连续性喷嚏,频繁挠鼻,次数显著增加($P<0.05$);与模型组比较,BMSCs 组和 THBS1-BMSCs 组小鼠喷嚏和挠鼻次数显著减少($P<0.05$);与 BMSCs 组比较,THBS1-BMSCs 组小鼠的喷嚏和挠鼻次数均显著减少($P<0.05$),见表 1。

2.4 各组小鼠血清炎症因子水平比较

ELISA 结果显示,模型组小鼠血清 IFN-γ 含量显著低于对照组,IgE、TNF-α、IL-4 及 IL-6 含量均显著高于对照组($P<0.05$);与模型组比较,BMSCs 组和 THBS1-BMSCs 组小鼠血清 IFN-γ 含量显著升高,IgE、TNF-α、IL-4、IL-6 含量均显著降低($P<0.05$);与 BMSCs组比较,THBS1-BMSCs 组小鼠血清 IFN-γ 含量进一步显著升高,而 IgE、TNF-α、IL-4、IL-6 含量均显著下降($P<0.05$),见表 2。

2.5 各组小鼠鼻黏膜病理形态学与炎症反应观察

HE 染色结果显示,对照组小鼠鼻黏膜结构清晰

完整,未见明显上皮细胞脱落与炎症细胞浸润;模型组小鼠鼻黏膜纤毛排列不规则,上皮细胞脱落且间质水肿,有大量嗜酸性粒细胞浸润,嗜酸性粒细胞数目较对照组显著增加($P<0.05$),黏膜下腺体增生;与模型组比较,BMSCs 组小鼠鼻黏膜上皮细胞脱落明显减少,层间间质水肿减轻,嗜酸性粒细胞数目显著减少($P<0.05$),腺体增生减轻,THBS1-BMSCs 组小鼠鼻黏膜病变得到明显改善,上皮细胞脱落不多,未见明显嗜酸性粒细胞浸润,嗜酸性粒细胞数目显著减少($P<0.05$),腺体轻微增生。

PAS 染色结果中深紫色为杯状细胞,经观察发现,对照组小鼠鼻黏膜上皮层未见明显杯状细胞,而模型组小鼠鼻黏膜上皮层可见大量杯状细胞,数目较对照组显著增加($P<0.05$);与模型组比较,BMSCs 组和 THBS1-BMSCs 组小鼠鼻黏膜上皮层杯状细胞数目显著减少($P<0.05$),THBS1-BMSCs 组较 BMSCs 组进一步显著减少($P<0.05$),见图 3。

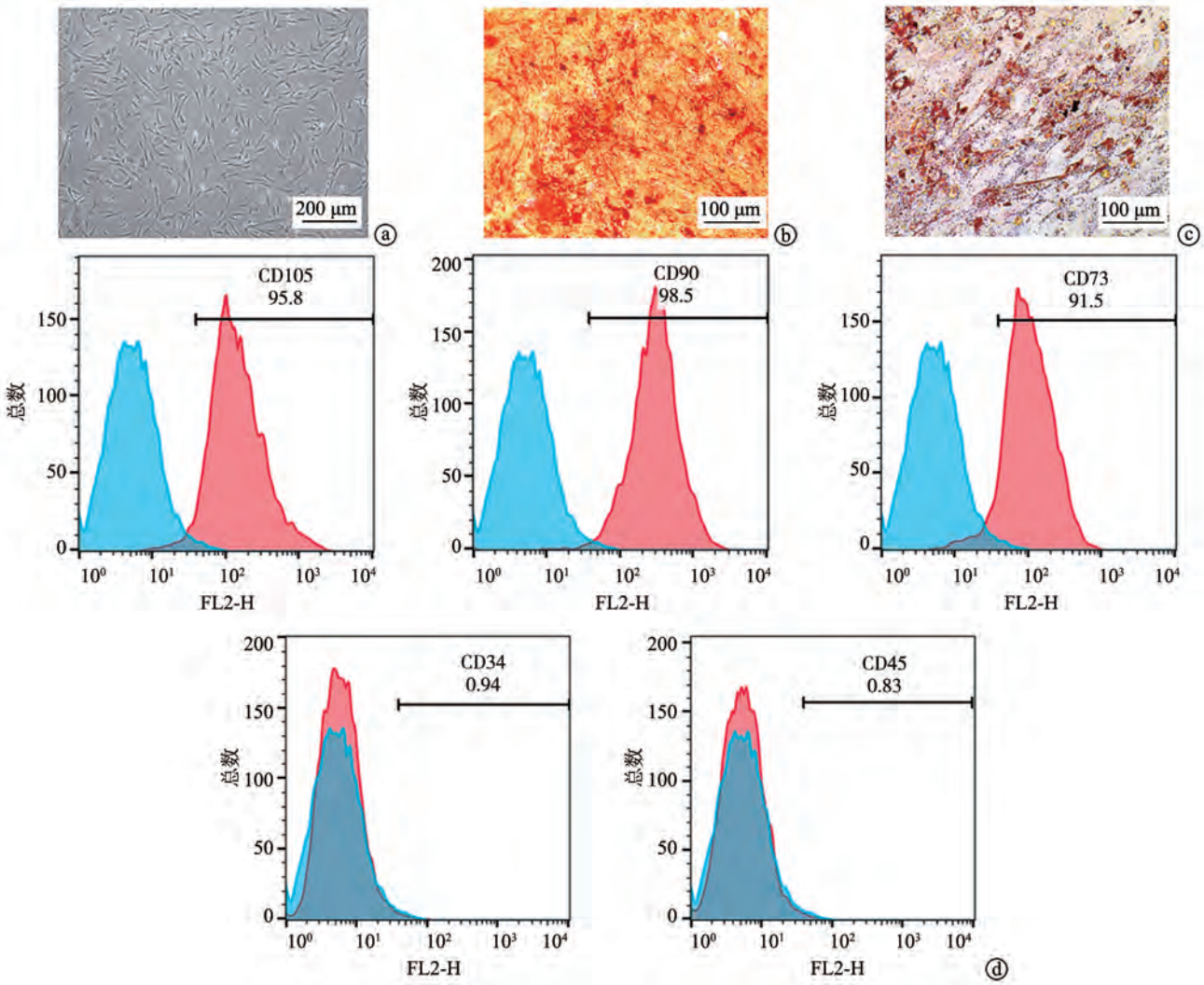
2.6 各组小鼠鼻黏膜 CK-5 与 β-tubulin 蛋白表达比较

免疫荧光染色结果显示,模型组小鼠鼻黏膜 CK-5 与 β-tubulin 的荧光强度均显著低于对照组($P<0.05$);与模型组比较,BMSCs 组和 THBS1-BMSCs 组小鼠鼻黏膜 CK-5 与 β-tubulin 的荧光强度均显著增强($P<0.05$);THBS1-BMSCs 组小鼠鼻黏膜 CK-5 与 β-tubulin 的荧光强度显著高于 BMSCs 组($P<0.05$),见图 4。

表 1 各组小鼠喷嚏与挠鼻次数比较($\bar{x}\pm s$,次)

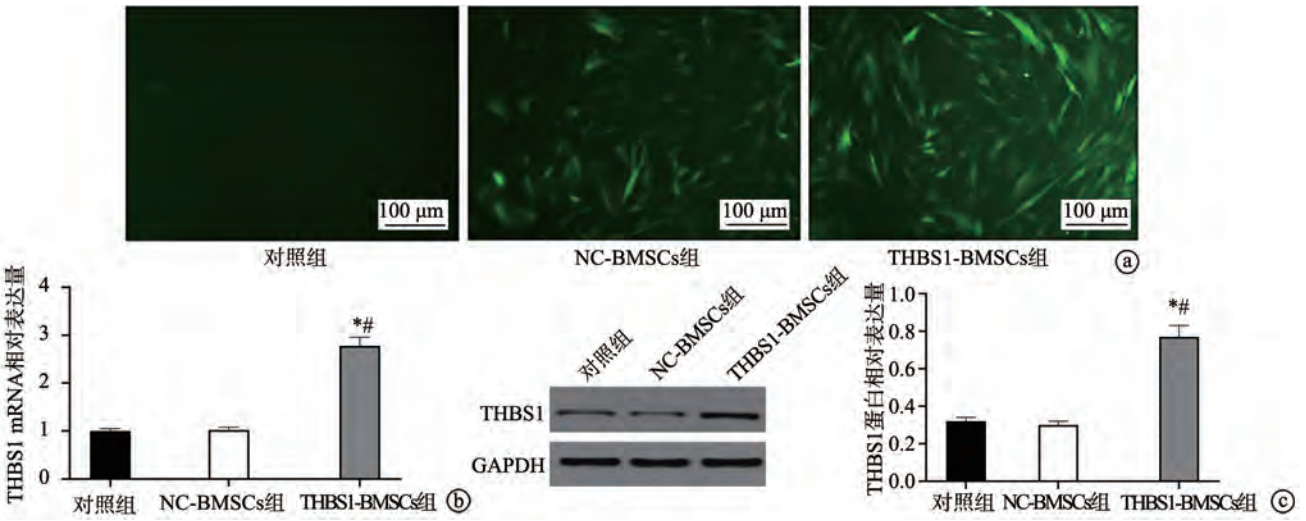
组别	喷嚏	挠鼻
对照组	0.85±0.06	1.76±0.14
模型组	34.42±2.30*	32.50±2.91*
BMSCs 组	26.56±1.95#	18.75±1.49#
THBS1-BMSCs 组	8.95±0.76#△	10.45±0.84#△

*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与 BMSCs 组比较,$P<0.05$



a:倒置显微镜观察细胞形态;b:茜素红染色检测细胞成骨分化能力;c:油红 O 染色检测细胞成脂分化能力;d:流式细胞仪测定干细胞标记物表达

图 1 BMSCs 的鉴定



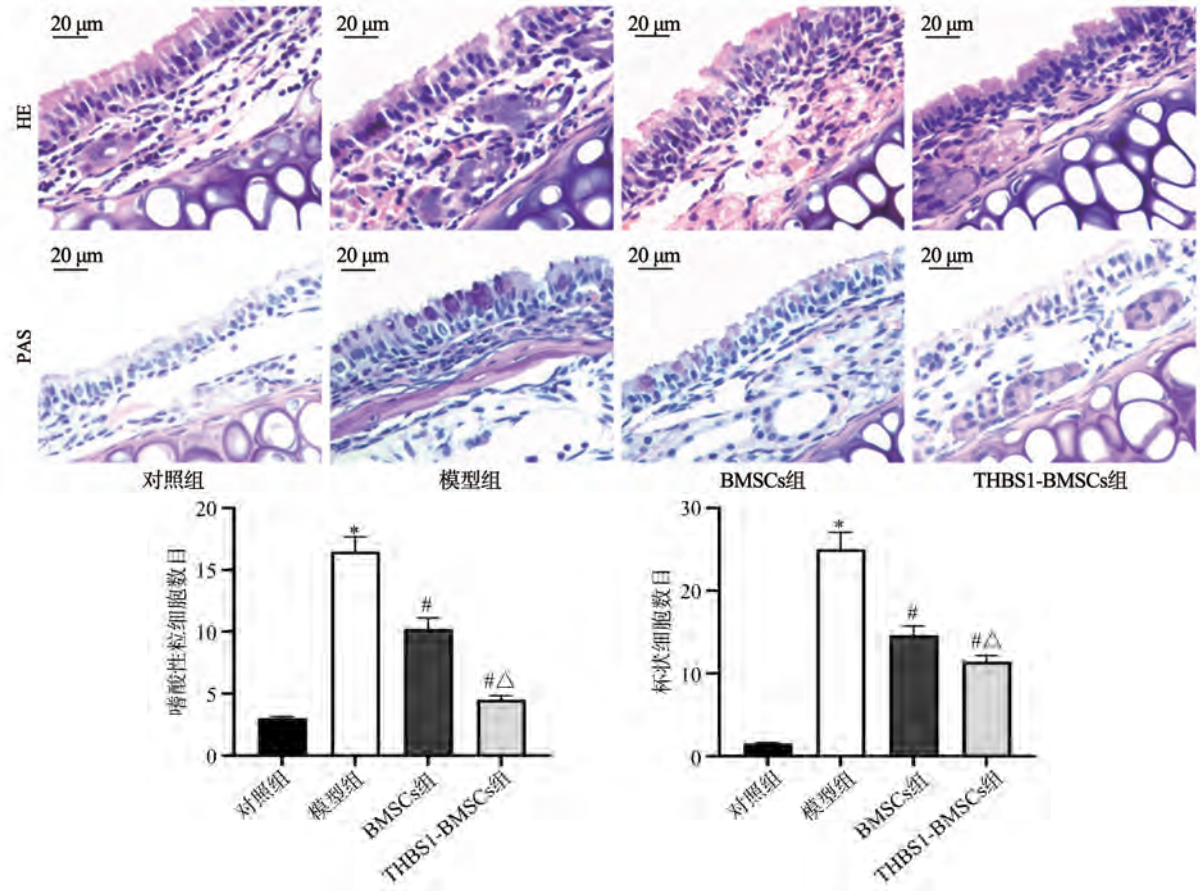
a:倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白 EGFP 表达;b:实时荧光定量 PCR 检测 THBS1 mRNA 表达;c:Western blot 检测 THBS1 蛋白表达 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与 NC-BMSCs 组比较,$P<0.05$

图 2 THBS1 基因编辑 BMSCs 结果

表 2 各组小鼠血清炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	IFN-γ	IgE	TNF-α	IL-4	IL-6
对照组	198.34±17.02	141.67±11.72	203.59±18.65	56.81±5.01	24.50±2.33
模型组	129.03±10.56*	338.51±28.99*	534.65±45.84*	111.72±9.34*	73.81±6.96*
BMSCs 组	167.88±12.43#	255.63±20.46#	336.70±21.96#	79.67±7.17#	56.70±5.34#
THBS1-BMSCs 组	177.91±13.75#△	236.70±19.85#△	285.17±24.43#△	71.63±6.91#△	42.74±3.88#△

*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与 BMSCs 组比较,$P<0.05$

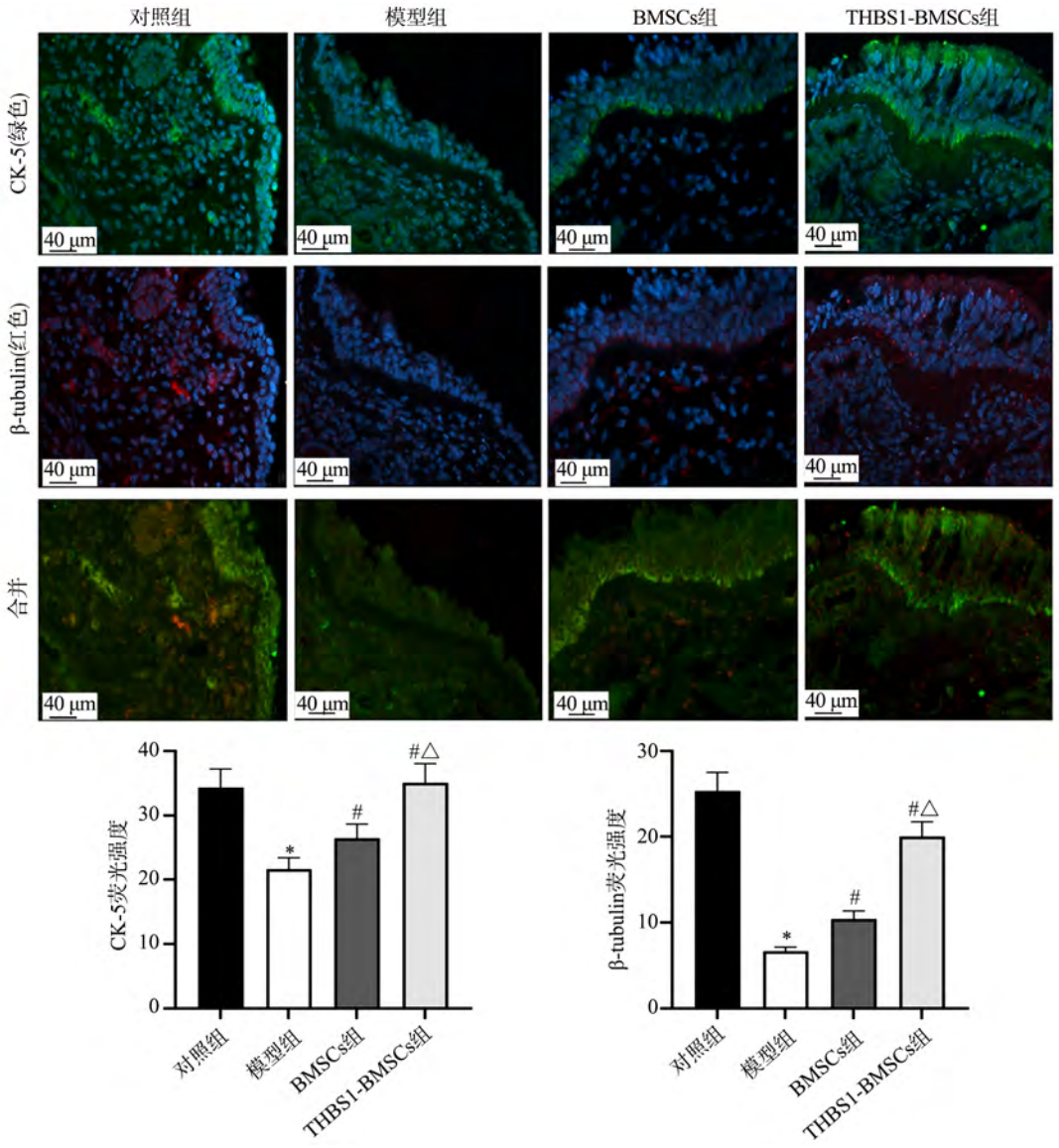


*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与 BMSCs 组比较,$P<0.05$

图 3 各组小鼠鼻黏膜病理形态学分析

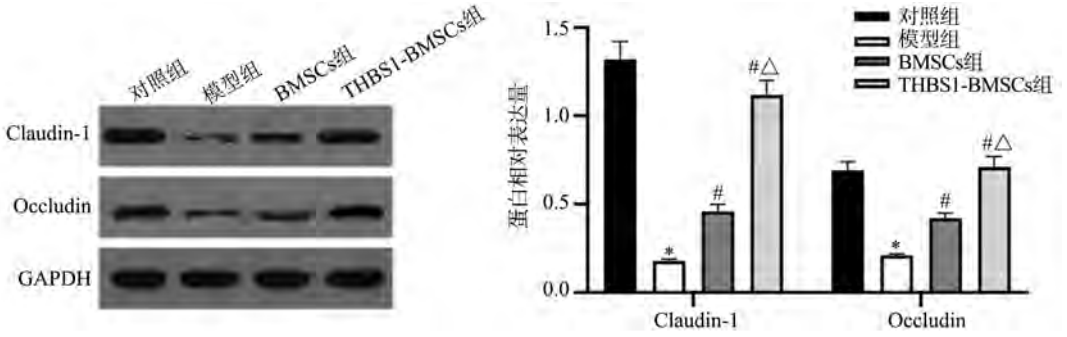
2.7 各组小鼠鼻黏膜 Claudin-1 与 Occludin 蛋白表达比较

Western blot 结果显示,与对照组比较,模型组小鼠鼻黏膜 Claudin-1 与 Occludin 蛋白表达水平均显著下调($P<0.05$);与模型组比较,BMSCs 组和 THBS1-BMSCs 组小鼠鼻黏膜 Claudin-1 与 Occludin 蛋白表达水平均显著上调($P<0.05$),见图 5。



*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与 BMSCs 组比较,$P<0.05$

图 4 免疫荧光染色观察各组小鼠鼻黏膜组织 β-tubulin 表达



1:对照组;2:模型组;3:BMSCs 组;4:THBS1-BMSCs 组 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与 BMSCs 组比较,$P<0.05$

图 5 Western blot 检测各组小鼠鼻黏膜组织内 Claudin-1 与 Occludin 蛋白表达

3 讨论

流行病学研究表明,10% ~40%的成年人与2% ~25%的儿童患有AR,且AR的患病率在全球范围内不断增加[11]。在病理学上,AR与过敏原特异性IgE介导的针对环境过敏原的免疫反应有关,且经过对鼻—支气管系统功能研究发现,过敏不是局限于某个特定器官,而是涉及整个呼吸道的疾病,并表现出广泛的症状[8]。鼻炎已被确定为哮喘发展的独立危险因素,寻找鼻炎的有效治疗方法可预防或延缓哮喘发作。特应性个体通过激活树突细胞和T淋巴细胞对过敏原敏感,树突细胞位于鼻黏膜表面,通过捕获过敏原并将过敏原肽呈递给引流淋巴结中的T淋巴细胞,引起2型辅助性T淋巴细胞(T-helper lymphocyte type-2,Th2)过敏反应。因此,Th2相关细胞因子的释放增强了B淋巴细胞产生IgE,并促进了鼻组织中嗜酸性粒细胞的募集。更确切地说,IgE分子被释放到血液中并与组织肥大细胞和循环嗜碱性粒细胞表面的高亲和力受体结合,导致预先形成的介质(如组胺)快速释放,从而引发早期症状,如打喷嚏、鼻痒和流鼻涕。而脂质介质(如白三烯C4和前列腺素D2)的产生,通过刺激内皮细胞上黏附分子的表达促进嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和$CD4^+$T细胞等炎症细胞的流入,引起鼻塞等晚期症状[12-13]。目前,常规药物治疗可以缓解过敏症状,但并不能干扰过敏反应。此外,药物治疗后复发以及副作用产生都会影响AR的疗效,严重影响患者的生活质量,因此,寻找更有效的AR治疗策略意义重大。

近年来,间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)已被证实可抑制炎症,是一种有前景的治疗AR的疗法。Desai等[14]证实,与过敏性哮喘中的MSCs相比,AR小鼠模型中的MSCs可促进炎症细胞因子的产生并向APCs呈递过敏原,从而促进淋巴细胞增殖;Fan等[15]研究表明,诱导多能干细胞衍生的MSCs可激活$CD4^+$、$CD8^+$T细胞及Treg细胞,调节Th1/Th2细胞因子水平,提高AR患者的调节性T细胞反应,并可根据不同疾病阶段发挥不同的免疫调节功能;Zhao等[16]证明在AR小鼠模型中静脉注射BMSCs可明显减轻过敏症状并减少嗜酸性粒细胞浸润,降低Th2型细胞因子IL-4、IL-5、IL-13等水平,升高Th1型细胞因子IFN-γ水平。本研究结果显示,AR小鼠在尾静脉注射BMSCs后,血清IFN-γ含量升高而IgE、TNF-α、IL-4、IL-6含量均下降,抑制了鼻黏膜组织嗜酸性粒细胞浸润与杯状细胞增加的现象。目前,基因修饰和干细胞相结合的疗法是一项研究热点,经过基因编辑的BMSCs输送到机体后,不仅能够发挥干细胞归巢与修复的作用,还可以提高目的基因的表达,两者协同进而起到扩大间充质干细胞治疗疾病的作用[17]。本研究结果显示,相较于BMSCs单独作用,经THBS1基因编辑BMSCs治疗的AR小鼠,其连续性喷嚏、频繁挠鼻等症状进一步缓解,血清IFN-γ含量升高,IgE、TNF-α、IL-4、IL-6含量均下降,同时,鼻黏膜组织嗜酸性粒细胞浸润减轻,杯状细胞也明显减少,由此说明,THBS1基因编辑BMSCs对AR小鼠的改善作用优于BMSCs单独作用。

鼻黏膜上皮屏障作为机体免疫防御的第一道防线,能够抵御外界多种病原菌、毒物等入侵及破坏,对于保护鼻黏膜内部环境至关重要,与AR的发生、发展及好转均密切相关[18-19]。鼻黏膜上皮细胞作为鼻黏膜屏障的主要组成部分,其基本功能是依赖于多种蛋白之间形成的复合物形成紧密连接的能力,从而在气道腔和上皮下组织之间形成物理屏障。其中,Claudin-1与Occludin作为紧密连接蛋白,在细胞连接中发挥屏障及栅栏作用,是决定细胞旁通透性的关键因素,能够显示细胞形成紧密屏障的能力[20]。CK-5主要分布于上皮细胞,作为上皮细胞分化的标志物,能够与膜蛋白形成复杂的网络,主要功能是维持上皮组织的完整性及连续性,并在细胞形态和信号传导中具有重要作用[21]。β-tubulin是细胞的一种骨架蛋白,参与多种重要的细胞功能,如维持结构、运输途径和细胞分裂等[22-23]。本研究结果显示,AR小鼠鼻黏膜CK-5与β-tubulin荧光强度减弱,Claudin-1与Occludin蛋白表达水平均下调,而经BMSCs或THBS1基因编辑BMSCs治疗的AR小鼠的鼻黏膜CK-5与β-tubulin荧光强度增强,Claudin-1与Occludin蛋白表达水平也上调;此外,相较于BMSCs单独作用,THBS1基因编辑BMSCs治疗的AR小鼠鼻黏膜CK-5与β-tubulin荧光更强,Claudin-1与Occludin蛋白表达水平更高,由此表明,THBS1基因编辑BMSCs能够增强鼻黏膜屏障功能,逆转鼻黏膜的重塑。

综上,THBS1基因编辑BMSCs可减轻AR小鼠流涕、打喷嚏等过敏症状,减少嗜酸性粒细胞浸润、杯状细胞过度增殖以及炎症因子的释放,增强鼻黏膜屏障功能,延缓AR进展。然而,THBS1基因编辑BMSCs对于细胞间连接的其他组成部分以及具体机制,仍有待后续进一步研究。

[参考文献]

[1] Zhang K, Li M, Yin L, et al. Role of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 in cardiovascular diseases (Review)[J]. Int J Mol Med, 2020,45(5):1275-1293. doi:10.3892/ijmm.2020.4507.

[2] Shoemark DK, Ziegler B, Watanabe H, et al. Emergence of a thrombospondinsuperfamily at the origin of metazoans[J]. Mol Biol Evol, 2019,36(6):1220-1238. doi:10.1093/molbev/msz060.

[3] Isenberg JS, Roberts DD. THBS1 (thrombospondin-1)[J]. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol, 2020, 24(8):291-299. doi:10.4267/2042/70774.

[4] Murphy-Ullrich JE, Suto MJ. Thrombospondin-1 regulation of latent TGF-β activation: a therapeutic target for fibrotic disease[J]. Matrix Biol,2018(68/69):28-43. doi:10.1016/j.matbio.2017.12.009.

[5] Kaur S, Bronson SM, Pal-Nath D, et al. Functions of thrombospondin-1 in the tumor microenvironment[J]. Int J Mol Sci,2021,22(9):4570. doi:10.3390/ijms22094570.

[6] Rodríguez-Fuentes DE, Fernández-Garza LE, Samia-Meza JA, et al. Mesenchymalstem cells current clinical applications: asystematicreview [J]. Arch Med Res,2021,52(1):93-101. doi:10.1016/j.arcmed.2020.08.006.

[7] Costa LA, Eiro N, Fraile M, et al. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses[J]. Cell Mol Life Sci,2021,78(2):447-467. doi:10.1007/s00018-020-03600-0.

[8] 刘蓉蓉,聂丽华,杨 欣. 变应性鼻炎免疫治疗的研究进展[J]. 检验医学与临床,2021,18(21):3201-3204. doi:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.21.037.

[9] 苗明三,项丽玲,苗艳艳. 变应性鼻炎动物模型制备规范(草案)[J]. 中草药,2018,49(1):50-57. doi:10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.006.

[10] Wang L, Lv Q, Song X, et al. ADRB2 suppresses IL-13-induced allergic rhinitis inflammatory cytokine regulated by miR-15a-5p[J]. Hum Cell, 2019,32(3):306-315. doi:10.1007/s13577-019-00259-z.

[11] Bernstein DI, Schwartz G, Bernstein JA. Allergic rhinitis: mechanisms and treatment[J]. Immunol Allergy Clin North Am,2016,36(2):261-278. doi:10.1016/j.iac.2015.12.004.

[12] Drazdauskaitė G, Layhadi JA, Shamji MH. Mechanisms of allergen immunotherapy in allergic rhinitis[J]. Curr Allergy Asthma Rep,2020, 21(1):2. doi:10.1007/s11882-020-00977-7.

[13] Rahim NA, Jantan I, Said MM, et al. Anti-Allergic rhinitis effects of medicinal plants and their bioactive metabolitesviasuppression of the immune system: amechanistic review[J]. Front Pharmacol,2021,12:660083. doi:10.3389/fphar.2021.660083.

[14] Desai MB, Gavrilova T, Liu J, et al. Pollen-induced antigen presentation by mesenchymal stem cells and T cells from allergic rhinitis[J]. ClinTransl Immunology,2013,2(10):e7. doi:10.1038/cti.2013.9.

[15] Fan XL, Zeng QX, Li X, et al. Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells activate quiescent T cells and elevate regulatory T cell response via NF-κB in allergic rhinitis patients[J]. Stem Cell Res Ther,2018,9(1):170. doi:10.1186/s13287-018-0896-z.

[16] Zhao N, Liu Y, Liang H, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce immune reaction in a mouse model of allergic rhinitis[J]. Am J Transl Res,2016,8(12):5628-5636.

[17] 杨鑫宇,王大勇,高 旭. 基因编辑技术和细胞疗法在体外基因治疗中的应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2020,36(11):1265-1272. doi: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2020.09.1261.

[18] Nur Husna SM, Tan HT, Md Shukri N, et al. Nasalepithelial barrier integrity and tight junctions disruption in allergic rhinitis: overview and pathogenic insights[J]. Front Immunol, 2021, 12: 663626. doi: 10.3389/fimmu.2021.663626.

[19] 续 珊,陈始明,焦沃尔,等. 变应性鼻炎发病机制研究的新进展[J]. 现代生物医学进展,2019,19(6):1180-1183. doi:10.13241/j.cnki.pmb.2019.06.040.

[20] Bergougnan C, Dittlein DC, Hümmer E, et al. Physical and immunological barrier of human primary nasal epithelial cells from non-allergic and allergic donors[J]. World Allergy Organ J,2020,13(3):100109. doi:10.1016/j.waojou.2020.100109.

[21] Eldirany SA, Ho M, Bunick CG. The Interface between keratin structurotype and human disease[J]. Structure, 2020, 28(3):271-273. doi:10.1016/j.str.2020.02.002.

[22] Binarová P, Tuszynski J. Tubulin: structure, functions and roles in disease[J]. Cells,2019,8(10):1294. doi:10.3390/cells8101294.

[23] Eshun-Wilson L, Zhang R, Portran D, et al. Effects of α-tubulin acetylation on microtubule structure and stability[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(21): 10366-10371. doi: 10.1073/pnas.1900441116.

(编辑:贺绍梅)