

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.09.005

脐带间质干细胞移植对 Graves 病小鼠调节性 B 细胞的影响*

李荣良,韩扣兰,戴小丽,黄 诚,李卫勇

(盐城卫生职业技术学院临床医学院,江苏盐城 224005)

[摘要] **目的** 探讨脐带间质干细胞(UC-MSCs)治疗 Graves 病(GD)小鼠的作用机制。**方法** 32 只小鼠随机分为正常对照组(G0 组)、GD 对照组(G1 组)和 UC-MSCs 治疗组(G2 组)。留取小鼠血清,化学发光法检测血清游离甲状腺素(FT4)水平,酶联免疫吸附法检测甲状腺刺激抗体(TSAb)浓度。取甲状腺,制备石蜡切片行苏木精-伊红染色。取脾脏,部分制成单个核细胞悬液,行三标记免疫荧光染色、流式细胞分析 CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺ Bregs 比例;部分脾脏提取总 RNA,实时荧光定量 PCR 检测 Bregs 相关细胞因子白细胞介素-10(IL-10)mRNA 和转化生长因子-β(TGF-β)mRNA 的表达水平。**结果** 26 周时 G2 组血清中 TSAb 浓度与脾脏组织中 CD19⁺ B 细胞较 G1 组明显降低($P < 0.05$),B 细胞中 CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺ Bregs 所占比例和脾组织 IL-10 mRNA、TGF-β mRNA 表达量较 G1 组却明显上升($P < 0.05$),且在移植前、后血清 TSAb 浓度差与脾脏中 CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺ Bregs 所占比例变化呈显著负相关,与 IL-10、TGF-β mRNA 的表达量变化呈显著正相关。**结论** UC-MSCs 可能通过上调 Bregs 表达而发挥治疗作用。

[关键词] 脐带;间质干细胞;Graves 小鼠;调节性 B 细胞

[中图分类号] R392.12

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)09-1168-03

The effect of umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation for the GD mice on regulatory B cells*

Li Rongliang, Han Koulan, Dai Xiaoli, Huang Cheng, Li Weiyong

(Department of Dentistry, Yancheng Institute of Health Science, Yancheng, Jiangsu 224005, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the therapeutic mechanism of umbilical cord mesenchymal stem cell(UC-MSCs) transplantation for the graves disease(GD)mice. **Methods** Thirty two mice were divided into 3 groups as following:normal control group (G0),GD control group (G1),UC-MSCs group(G2). Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)was used to measure the level of TSAb in blood serum and the expression of FT4 was measured by chemiluminescence. Thyroid sections were stained with hematoxylin and eosin(HE)for histological examination. Splenocytes were stained with multicolor immunofluorescence and detected by flow cytometry to analyze the percentages of CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺ regulatory B cells(Bregs). Expressions of IL-10 and TGF-β mRNA in spleen organization were measured by Real-time PCR. **Results** At 26 weeks, the level of TSAb in blood serum in G2 was more significantly decreased than in G1($P < 0.05$),and the level of CD19⁺ B in spleen in G2 was also more significantly decreased than in G1($P < 0.05$),however, the percentage of CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺ Bregs splenocytes and the levels of IL-10 and TGF-β mRNA in spleen organization were more significantly increased than in G1($P < 0.05$). The concentration differences of TSAb in serum was negatively correlated with the percentage differences of CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺ Bregs,however, positively correlated with the expression differences of IL-10 and TGF-β mRNA in spleen before and after transplantation. **Conclusion** Activation of Bregs may be one of the mechanisms of UC-MSCs therapeutic effect on GD mice.

[Key words] umbilical cord;mesenchymal stem cells;Graves mice;regulatory B cells

毒性弥漫性甲状腺肿(Grave's disease, GD)是以甲状腺的自身免疫为特点的多系统临床综合征,是甲亢的主要类型之一。GD 患者体内存在免疫应答调节受损,以致免疫应答反应过强而造成甲状腺细胞的自身免疫性损伤。脐带间质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)是一种具有向多向分化潜能的祖细胞,在体外能大量扩增,能着巢于受损组织。MSCs 通过对 T 细胞、B 细胞和树突状细胞(DC)等免疫活性细胞的调节发挥作用^[1]。MSCs 免疫原性较低,在异基因 MSCs 移植时未发现明显的排斥反应。MSCs 在分化成其他细胞类型时仍保留其免疫调节作用^[2]。目前,在临床上, MSCs 已被广泛用于治疗移植抗宿主病(GVHD)、系统性红斑狼疮(SLE)等自身性免疫病^[3]。Choi 等^[4]最近研究发现脂

肪来源的 MSCs 可以影响 T 辅助(Th)细胞因子的平衡治疗甲状腺炎。作者先前研究表明,UC-MSCs 治疗 GD 小鼠安全有效^[5]。本实验将通过比较 UC-MSCs 治疗 GD 小鼠前、后脾脏 Bregs 表达量与对照小鼠有无差异,以及其与甲状腺刺激抗体(TSAb)水平是否存在相关性来初步探讨 MSCs 治疗 GD 的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 基因扩增引物设计及合成 根据美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站 GenBank 查询鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(上游引物:5'-AAG CCT GAC CAC GCT TTC TA-3',下游引物:5'-ATG AAG TGG TTG GGG AAT GA-

3')、白细胞介素-10(IL-10)(上游引物:5'-CCA AGC CTT ATC GGA AAT GA-3',下游引物:5'-TTT TCA CAG GGG AGA AAT CG-3')、转化生长因子-β(TGF-β)(上游引物:5'-TGC GCT TGC AGA GAT TAA AA-3',下游引物:5'-CGT CAA AAG ACA GCC ACT CA-3')mRNA 序列。以上引物的设计与合成由大连 TaKaRa 公司利用 Primer express 软件完成。

1.1.2 试剂与动物 36 只 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠(上海斯莱克实验动物有限公司),体质量(20.0±2.0)g。脐带标本来源于健康产妇正常分娩足月新生儿(来自于盐城市妇幼保健院产科),UC-MSCs 分离、培养与鉴定所需的试剂同前期研究^[6]。血清游离甲状腺素(FT4)检测试剂盒与 TSAb 检测酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒分别由美国 DPC 与天津瑞爱金生物科技有限公司提供;PE-CD1d、FITC-CD5、PerCP-cyTM5.5-CD19 共 3 种不同荧光标记抗鼠单克隆抗体均购自美国 BD 公司;RNA 反转录试剂盒与 SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒均来源于 TaKaRa 公司。

1.2 方法

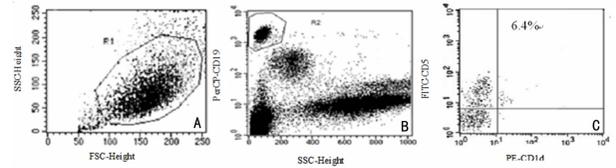
1.2.1 GD 模型小鼠的制备与分组 GD 模型小鼠(在江苏省医药动物实验中心 SPF 级环境下饲养)的免疫方法与步骤同本课题组之前的研究^[5],在第 3 次免疫后 21 d(18 周)测定移植前血清中 FT4 与 TSAb 的表达量,细针穿刺甲状腺组织苏木精-伊红(HE)切片染色。第 19 周分别随机选择 3 只 GD 模型小鼠与 1 只正常对照小鼠处死,将剩余小鼠分成 3 组,即正常对照组(G0 组,8 只)、GD 对照组(G1 组,12 只)、UC-MSCs 治疗组(G2 组,12 只)。第 20 周 G1 组与 G2 组分别于予 0.5 mL 生理盐水和 1×10⁶ P3 代 UC-MSCs 尾静脉注射 1 次,第 26 周处死所有小鼠,检测实验预先设计内容。

1.2.2 UC-MSCs 收集和单个核细胞分离及培养、鉴定 同本课题组之前的研究方法^[5],将脐带从手术台上取下,将脐带剪碎后用胰酶消化成单个细胞,培养与传代至细胞融合,最后应用 FACSscan 流式细胞仪检测 MSCs 表面标志。

1.2.3 血清 TSAb、FT4 的测定 ELISA 法测定血清 TSAb 的浓度,FT4 测定按试剂盒说明书操作。

1.2.4 组织鉴定 将甲状腺固定、包埋、切片与 HE 染色,最

后在光学显微镜下观察小鼠甲状腺滤泡结构等组织学变化。
1.2.5 调节性 B 细胞(Bregs)的检测 在小鼠脾脏单个核细胞悬液(1.0×10⁶/mL)加入脂多糖(LPS)10 μg/mL,在标准条件下培养 24 h 后,加入 PE-CD1d、FITC-CD5、PerCP-cyTM5.5-CD19 共 3 种不同荧光标记抗鼠单克隆抗体,并做荧光染色对照,前向散射光(FSC)与侧向散射光(SSC)联合设门流式检测小鼠脾脏 CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺ 细胞的表达量(图 1)。



A: FSC 与 SSC 设门图;B: CD19 设门图;C: CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺ Bregs 百分比。

图 1 流式细胞术检测 CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺ Bregs 代表图

1.2.6 实时荧光定量 PCR 分析 应用 TRIzol-氯仿法试剂裂解、纯化抽提脾脏总 RNA,将总 RNA 反转录为互补 DNA(cDNA),再在 ABI Prism7500 型高通量荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)上进行实时荧光定量 PCR。按 2 步法 PCR 扩增标准程序将不同基因的标本做 3 个复孔。扩增条件为第 1 步(预变性),95 °C 10 s 1 个循环;第 2 步(PCR 反应)95 °C 5 s,60 °C 34 s 45 个循环。最后以 SDS2.0(PE Biosystem)软件分析其 Ct 值。计算各标本平均 Ct 值,以 GAPDH 作为内参,将 IL-10、TGF-β Ct 值减去 GAPDH Ct 值作为 ΔCt 值。计算标准化后的 2^{-ΔΔCt} 值表示 mRNA 的相对表达含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件将数据进行统计学处理,对各分组进行单因素方差分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UC-MSCs 移植对 GD 小鼠血清 FT4 及 TSAb 的影响 移植后,G1 组血清 FT4 与 TSAb 水平均显著高于 G0 组(P<0.05);G2 组 FT4 与 TSAb 表达低于 G1 组,但 FT4 无显著差异,而 TSAb 差异明显(P<0.05),见表 1。

表 1 移植后血清 FT4、TSAb 水平与脾脏 CD19⁺ B 细胞、CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺ Bregs 百分比(±s)

组别	n	FT4(pmol/L)	TSAb(U/mL)	CD19 ⁺ B 细胞(%)	CD1d ^{hi} CD5 ⁺ CD19 ⁺ Bregs(%)
G0 组	8	4.98±0.20	2.90±0.37	7.81±0.89	6.21±0.43
G1 组	12	12.07±1.11*	5.73±0.65*	11.00±1.41*	4.16±0.67*
G2 组	12	11.60±1.19	3.09±0.31 [△]	8.05±0.84 [△]	6.76±0.88 [△]

*: P<0.05,与 G0 组比较;[△]: P<0.05,G0 组比较。

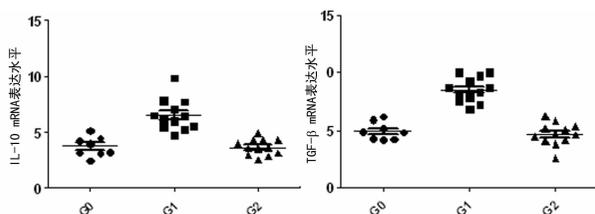


图 2 UC-MSCs 移植后脾脏 IL-10 与 TGF-β mRNA 的表达水平

2.2 UC-MSCs 移植对 GD 模型鼠脾脏 CD19⁺ B 细胞与 CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺ Bregs 表达影响 移植后,G1 组血清 CD19⁺ B 细胞百分比均显著高于 G0 组(P<0.05),而 CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺ Bregs 百分比却显著低于 G0 组(P<0.05);G2 组 CD19⁺ B 细胞百分比明显低于 G1 组(P<0.05),但 CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺ Bregs 百分比明显高于 G1 组(P<0.05)。

2.3 UC-MSCs 移植对 GD 模型鼠脾脏组织 IL-10 与 TGF-β mRNA 表达的影响 移植后,G1 组脾脏 IL-10 与 TGF-β mRNA 水平均显著低于 G0 组与 G2 组(P<0.05),见图 2。

2.4 TSAb 与 CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺Bregs 在移植前、后表达水平变化的相关性 G2 组 GD 小鼠血清 TSAb 浓度差(治疗前一治疗后)与 CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺Bregs 水平变化(治疗前一治疗后)呈显著负相关($r = -0.943, P < 0.01$),与 IL-10 与 TGF- β mRNA 表达水平的 $\Delta\Delta$ Ct 值(治疗前一治疗后)呈显著正相关($r = 0.800, 0.768, P < 0.01$),见图 3。

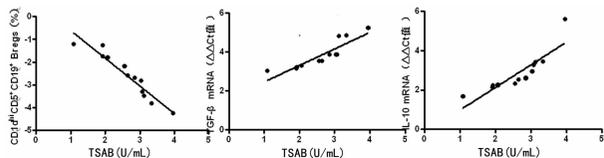


图 3 UC-MSCs 移植前、后 TSAb 与 CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺Bregs 表达的相关性

3 讨论

促甲状腺素受体抗体 (TRAb) 是由 B 淋巴细胞产生的一类具有异质性的特异性免疫球蛋白 (IgG 类), 其中, TSAb 能够与促甲状腺素受体结合, 刺激甲状腺激素的合成和分泌, 从而引起甲状腺功能亢进的表现。Bregs 是新发现的 B 细胞亚群之一, CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺ 是目前国际上比较公认的 Bregs 表型^[6]。研究发现, Bregs 在炎症肠病、1 型糖尿病、多发性硬化症等自身免疫病的发生、发展及转归过程中发挥重要作用^[7-11]。UC-MSCs 移植治疗 GD 小鼠时发现, G2 组 GD 小鼠血清 TSAb 的水平较对照组明显下降, 同时脾脏 CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺Bregs 的水平较对照组却明显上升, 且二者的变化存在明显相关性。这说明 UC-MSCs 移植治疗 GD 小鼠可能是通过上调 CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺Bregs 而发挥治疗作用。

在辅助性 T 细胞诱导下 GD 患者体内被激活的 B 细胞分泌大量的自身抗体, CD19 与 B 细胞活化和信号转导密切相关^[12]。有研究表明, IL-10、TGF- β 是 2 种重要的抑制性细胞因子, Bregs 可通过其分泌发挥免疫调节作用^[13]。通常把产生 IL-10 的具有 CD1d^{hi}CD5⁺CD19⁺ 表型的 Bregs 亚群称之为 B10 细胞, 它们能特异地产生 IL-10 并且是其主要的 B 细胞来源, 而且它们可能只产生 IL-10^[14]。Hussain 等^[8] 研究发现, 给 1 型糖尿病的 NOD 模型小鼠静脉输注经 B 细胞抗原受体 (BCR) 激活的 B 细胞, 可以通过其产生的 IL-10 使 NOD 小鼠的胰岛炎症指标表达下降, 延缓糖尿病的发生和发展。还有一种在体外可以被 LPS 刺激活化而分泌 TGF- β 的 Bregs 细胞^[15]。同样, 在给患有结肠炎的 SAMP1/Yit 小鼠体内静脉输注经过 LPS 刺激 CD1d⁺ 的 B 细胞亚群, 可以通过它产生 TGF- β 抑制免疫反应, 减少炎症损伤^[15]。

本研究发现, GD 小鼠脾脏 IL-10 mRNA 与 TGF- β mRNA 表达量较正常对照小鼠明显降低, 但经过 UC-MSCs 移植治疗后其表达却明显上升。

综上所述, Bregs 异常表达不仅与 GD 发病密切相关, 而且 UC-MSCs 可通过上调 Bregs 而产生 IL-10、TGF- β , 在治疗 GD 中介导免疫耐受, 发挥免疫调节作用。

参考文献

[1] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [J]. *Blood*, 2005, 105(4): 1815-1822.
[2] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of

severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells [J]. *Lancet*, 2004, 363(9419): 1439-1441.

[3] 张华勇, 冯学兵, 马晓蕾, 等. 异基因骨髓间充质干细胞移植治疗系统性红斑狼疮 11 例临床分析 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2009, 13(2): 89-92.
[4] Choi EW, Shin IS, Lee HW, et al. Transplantation of CT-LA4Ig gene-transduced adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reduces inflammatory immune response and improves Th1/Th2 balance in experimental autoimmune thyroiditis [J]. *J Gene Med*, 2011, 13(1): 3-16.
[5] 李荣良, 韩扣兰, 戴小丽, 等. 人脐带间充质干细胞移植治疗 Graves 病小鼠的疗效 [J]. *山东医药*, 2013, 53(36): 17-20.
[6] Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, et al. A regulatory B cell subset with a unique CD1d^{hi}CD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses [J]. *Immunity*, 2008, 28(5): 639-650.
[7] Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, et al. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(10): 3420-3430.
[8] Hussain S, Delovitch TL. Intravenous transfusion of BCR-activated B cells protects NOD mice from type 1 diabetes in an IL-10-dependent manner [J]. *Immunol*, 2007, 179(11): 7225-7232.
[9] Lenert P, Brummel R, Field EH, et al. TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production [J]. *J Clin Immunol*, 2005, 25(1): 29-40.
[10] Yanaba K, Hamaguchi Y, Venturi GM, et al. B cell depletion delays collagen-induced arthritis in mice; arthritis induction requires synergy between humoral and cell-mediated immunity [J]. *J Immunol*, 2007, 179(2): 1369-1380.
[11] Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells [J]. *J Immunol*, 2006, 176(2): 705-710.
[12] Fujimoto M, Sato S. B lymphocytes and systemic sclerosis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2005, 17(6): 746-751.
[13] Zhang X, Ing S, Fraser A, et al. Follicular helper T cells: new insights into mechanisms of autoimmune diseases [J]. *Ochsner J*, 2013, 13(1): 131-139.
[14] Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, et al. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis [J]. *J Immunol*, 2010, 185(4): 2240-2252.
[15] Mishima Y, Ishihara S, Aziz MM, et al. Decreased production of interleukin-10 and transforming growth factor- β in Toll-like receptor-activated intestinal B cells in SAMP1/Yit mice [J]. *Immunology*, 2010, 131(4): 473-487.