

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20131114

白细胞介素-10 基因修饰对骨髓间充质干细胞体外免疫效应的影响

方针强¹,戴 玮²,贾维胜¹,何 凡¹,沈崇星¹,刘永亮¹,周 锋¹,叶 钢¹

(1. 第三军医大学新桥医院泌尿外科,重庆 400037;2. 重庆石油医院内科,重庆 400037)

【摘要】目的:研究白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)基因修饰的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)体外免疫效应。**方法:**RT-PCR 克隆大鼠 IL-10 基因并构建逆转录病毒 pLNCX-IL-10,转染大鼠 BMMSCs;流式细胞仪检测 IL-10 基因修饰的 BMMSCs(BMMSCs_{IL-10})体外对 T 淋巴细胞亚群的影响,CCK-8 法检测 BMMSCs_{IL-10} 及其培养上清液对体外混合淋巴细胞增殖的影响。**结果:**BMMSCs_{IL-10} 能明显减少 CD4⁺T,降低 CD4⁺/CD8⁺比值,比 BMMSCs 作用明显($P=0.000$);BMMSCs_{IL-10} 及其培养上清液比 BMMSCs 更能明显抑制 T 淋巴细胞增殖反应($P=0.000$)。**结论:**IL-10 基因修饰能增强 BMMSCs 的体外免疫抑制作用。

【关键词】骨髓间充质干细胞;白细胞介素-10;免疫抑制

【中国图书分类法分类号】R392.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-07-25

Effects of interleukin-10 modification on in vitro immunosuppression of bone marrow mesenchymal stem cells

FANG Zhenqiang¹, DAI Wei², JIA Weisheng¹, HE Fan¹, SHEN Chongxing¹, LIU Yongliang¹, ZHOU Feng¹, YE Gang¹

(1. Department of Urology, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University;

2. Department of Internal Medicine, Chongqing Petroleum Hospital)

【Abstract】Objective: To study the in vitro immunosuppression of interleukin-10(IL-10) modified bone marrow mesenchymal stem cells(BMMSCs_{IL-10}). **Methods:** IL-10 was cloned by RT-PCR and was used to construct pLNCX-IL-10. The constructed retrovirus was transfected into rat BMMSCs. T lymphocyte subsets in vitro influenced by BMMSCs_{IL-10} were detected by flow cytometry. Effects of BMMSCs_{IL-10} and its culture supernatant on in vitro mixed heterologous T lymphocyte proliferation were detected by CCK-8. **Results:** BMMSCs_{IL-10} significantly reduced CD4⁺T and lowered the ratio of CD4⁺/CD8⁺, more intense than BMMSCs($P=0.000$). BMMSCs_{IL-10} and its culture supernatant significantly inhibited T lymphocyte proliferation, more intense than BMMSCs($P=0.000$). **Conclusions:** IL-10 modification can enhance the in vitro immunosuppressive effect of BMMSCs.

【Key words】bone marrow mesenchymal stem cells; interleukin-10; immunosuppression

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)是骨髓组织中具有一定可塑性的亚全能成体干细胞,有研究显示,BMMSCs 具有一定免疫调节功能^[1]。为增强其免疫抑制效果,本实验拟通过逆转录病毒介导 SD 大鼠白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)转染 SD 大鼠 BMMSCs,观察 IL-10 基因修饰的 BMMSCs(BMMSCs_{IL-10})的体外免疫效果,探讨 BMMSCs_{IL-10} 用于抑制同种异体移植免疫反应的可行性。

1 材料和方法

1.1 IL-10 cDNA 的克隆

切取 SD 大鼠脾脏,收集脾细胞,培养 4 h 后离心收集脾细胞,抽提细胞总 RNA 为模板,采用特异性上游引物 5'-GCTAAGCTTATGCCTGGCTCAGCACTGCT-3'(-8~21 bp),下游引物 5'-TCTCTGGATCCGATTTAGAAG-3'(597~576 bp),进行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR),获得大鼠 IL-10 cDNA 并测序鉴定。

1.2 pLNCX-IL-10 重组质粒的构建及病毒的制备

将测序正确的 IL-10 cDNA 以 Hind III 和 HpaI 双酶切后亚克隆至 pLNCX 载体,将构建的 pLNCX-IL-10 重组质粒转化感受态 DH5 α 大肠杆菌,扩增,抽提纯化,通过酶切鉴定正确的克隆,以脂质体法转染重组质粒 pLNCX-IL-10 至包装细胞系 PT67,培养 48 h,用含 400 μ g/ml G418 的 DMEM 筛选 PT67 细胞,加压筛选 2 周后改半量维持筛选,挑选阳性克

作者介绍:方针强,Email:fangzhengqiang123@126.com,

研究方向:肾脏缺血再灌注损伤,肾移植,泌尿系肿瘤。

通信作者:叶 钢,Email:ganyge@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81200500);重庆市科委自然科学基金计划资助项目(编号:CSTC,2009BB5154)。

隆扩大培养,收集培养液上清,经浓缩纯化,经 TCID₅₀ 法测定病毒滴度,并调节滴度为 10⁵ cfu/ml 冰冻备用。

1.3 大鼠 BMMSCs_{IL-10} 的制备

颈椎脱臼法处死 SD 大鼠 10 只,浸泡消毒后,无菌条件下分离股骨和胫骨,剪除骨垢端,暴露骨髓腔,以 DMEM 培养液正反方向冲洗骨髓腔,收集冲洗液反复抽吸吹打形成单细胞悬液,采用密度梯度离心法分离纯化 BMMSCs 并传代培养^[2]。

取第 3 代 BMMSCs 血细胞计数板计数后接种至 24 孔板,以感染复数为 1 500 加入逆转录病毒 pLNCX-IL-10,摇匀,培养 24 h,次日换常规培养液,获得 BMMSCs_{IL-10}。

1.4 BMMSCs_{IL-10} 体外免疫抑制实验

1.4.1 流式细胞仪检测 T 淋巴细胞亚群 取 SD 大鼠外周血,加入大鼠红细胞裂解液,混匀,裂解 10 min, PBS 洗涤后计算细胞浓度,与 BMMSCs_{IL-10} 共培养 24 h,设为 BMMSCs_{IL-10} 组。应用直接双标记技术,分设实验管及对照管,加入肝素抗凝血 100 μl 及相应的荧光标记单克隆抗体 (CD4FITC/CD8PE、IgG1FITC/IgG1PE 为美国 IMMUNOTECH 公司产品) 20 μl,室温避光孵育 30 min,加入溶血素 2 ml 混匀,10 min 后离心 2 次 (2 000 r/min,离心半径为 9.5 cm),弃上清,0.5 ml 1%多聚甲醛悬浮细胞,待上机检测。光源为氩离子激光器,波长 488 nm, cell Quest 软件进行资料采集和分析,流式细胞仪 (美国 Becton-Dickinson 公司) 自动检测及图形处理。根据分析得出 CD4⁺、CD8⁺ T 的百分比,计算 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比例。另以 BMMSCs 替代 BMMSCs_{IL-10} 作为 BMMSCs 组,两者均不加者为对照组。比较各组 T 淋巴细胞亚群的变化。

1.4.2 BMMSCs_{IL-10} 对淋巴细胞增殖反应能力的影响

1.4.2.1 混合淋巴细胞制备 取脾脏制备脾淋巴细胞悬液 (方法同前),调整密度为 1 × 10⁶ 个/ml。Wister 大鼠脾淋巴细胞为反应细胞;SD 大鼠脾淋巴细胞为刺激细胞,取 9 ml 加入配制好的丝裂霉素 1 ml (500 g/ml),孵育 30 min 后离心洗涤,调整密度为 1 × 10⁶ 个/ml。

1.4.2.2 分组及测定 96 孔细胞培养板每孔总体积控制在 300 μl,分 6 组,每组 3 复孔。A 组:每孔加入反应细胞 0.1 ml; B 组:每孔加入反应细胞和刺激细胞各 0.1 ml; C₀ 组:每孔加入反应细胞、刺激细胞和 BMMSCs 各 0.1 ml; D₀ 组:每孔加入反应细胞、刺激细胞和 BMMSCs_{IL-10} 各 0.1 ml; C₁ 组:每孔加入反应细胞、刺激细胞和 BMMSCs 培养上清液各 0.1 ml; D₁ 组:每孔加入反应细胞、刺激细胞和 BMMSCs_{IL-10} 的培养上清液各 0.1 ml。

各组于 37 ℃, 5%CO₂ 条件下孵育 72 h 加细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 30 μl/孔, 37 ℃继续培养 4 h, 选择 490 nm 波长,光度仪测定各孔吸光度 (absorbance, A) 值。

1.5 统计学方法

用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有数据采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的测定结果

3 组大鼠外周血表达 CD4⁺、CD8⁺ 的 T 细胞占总淋巴细胞的比例及 CD4⁺/CD8⁺ 比值见表 1。

表 1 大鼠外周血中 T 淋巴细胞亚群 (CD4⁺、CD8⁺) 比例及 CD4⁺/CD8⁺ 比值 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.1 Proportion of T lymphocyte subsets (CD4⁺ and CD8⁺) in rat peripheral blood and ratio of CD4⁺/CD8⁺ ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
BMMSCs _{IL-10} 组	37.58 ± 3.92 ^{ab}	50.70 ± 5.51 ^{ab}	0.75 ± 0.16 ^{ab}
BMMSCs 组	46.42 ± 3.41 ^a	43.43 ± 4.49	1.08 ± 0.17 ^a
对照组	53.55 ± 3.76	38.95 ± 3.56	1.39 ± 0.21
F 值/P 值	23.341/0.000	8.531/0.005	15.520/0.000

注:a,与对照组比较, $P<0.05$; b,与 BMMSCs 组比较, $P<0.05$

2.2 BMMSCs_{IL-10} 对淋巴细胞增殖反应能力的影响

在大鼠 T 淋巴细胞增殖反应能力实验中,各组 T 淋巴细胞增殖反应的 A_{490 nm} 值见表 2。

表 2 各组大鼠 T 淋巴细胞增殖反应实验中的 A_{490 nm} 值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.2 A_{490 nm} value in rat T lymphocyte proliferation test

($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	A _{490 nm} 值	F 值	P 值
A 组	2.2 ± 0.1		
B 组	4.7 ± 0.1		
C ₀ 组	3.5 ± 0.1	379.758 ^a	0.000 ^a
C ₁ 组	4.0 ± 0.1	362.303 ^b	0.000 ^b
D ₀ 组	2.8 ± 0.1	384.576 ^c	0.000 ^c
D ₁ 组	3.6 ± 0.1	360.576 ^d	0.000 ^d

注:a, A、B、C₀ 和 D₀ 4 组组间比较结果; b, A、B、C₀ 和 C₁ 4 组组间比较结果; c, A、B、D₀ 和 D₁ 4 组组间比较结果; d, A、B、C₁ 和 D₁ 4 组组间比较结果

2.2.1 BMMSCs_{IL-10} 对混合淋巴细胞培养的影响 C₀ 组和 D₀ 组 A_{490 nm} 值均明显低于 B 组; 而且 D₀ 组 A_{490 nm} 值明显低于 C₀ 组 ($P=0.000$)。提示 BMMSCs_{IL-10} 和 BMMSCs 均能抑制 T 淋巴细胞增殖, 其中 BMMSCs_{IL-10} 抑制 T 淋巴细胞增殖的作用更明显。

2.2.2 BMMSCs_{IL-10} 培养液对混合淋巴细胞培养的影响 C₁ 组和 D₁ 组 A_{490 nm} 值均明显低于 B 组; 而且 D₁ 组 A_{490 nm} 值明显低于 C₁ 组 ($P=0.000$)。提示 BMMSCs_{IL-10} 和 BMMSCs 培养液上清均能抑制 T 淋巴细胞增殖, 其中 BMMSCs_{IL-10} 培养液抑制 T 淋巴细胞增殖的作用更明显。

2.2.3 BMMSCs_{IL-10} 及其培养液影响淋巴细胞增殖反应的比较 C₀ 组和 D₀ 组 A_{490 nm} 值均分别明显低于对应的 C₁ 组和 D₁ 组 ($P=0.004$; $P=0.001$), 说明 BMMSCs_{IL-10} 和 BMMSCs 与 T 淋巴细胞的接触式培养比非接触式培养抑制 T 细胞增殖的作用更强。

3 讨论

器官移植的理想状态就是诱导免疫耐受的形成, 基因治疗的发展和应用于这种理想状态的实现带来了希望。在此过程中, 关键的问题是选择恰当的载体实现合适的目的基因靶向、可控及有效表达。

BMMSCs 是具有多系分化潜能的成体干细胞,

在前期研究中,已经发现 BMMSCs 能够向缺血再灌注损伤肾脏定向迁移,并转化为肾细胞,参与肾脏修复,同时能作为良好的载体携带外源基因,达到靶向基因治疗的目的^[2-4]。进一步研究显示 BMMSCs 具有免疫调节功能,能在一定程度上诱导异种移植免疫耐受,但在实际应用过程中,往往难以得到令人满意的效果^[1]。为了增强 BMMSCs 诱导免疫耐受的作用,并充分利用 BMMSCs 作为载体细胞的优势,本研究想到了基因治疗。

近年来 IL-10 在器官移植方面的应用备受青睐,这主要归功于 IL-10 具有很强的免疫抑制活性^[5]。研究显示:IL-10 可抑制受体对移植物的排斥反应,并诱导移植免疫耐受。研究者将重组鼠 IL-10 基因的腺病毒分别导入受鼠的异体移植肺和心脏,发现能明显延长移植肺和心脏的存活时间,而且表现出移植物的局部免疫抑制状态^[6-7]。

因此,本实验以 IL-10 作为目的基因,使用逆转录病毒介导的方法,观察 IL-10 基因修饰的 BMMSCs 的体外免疫抑制作用。

在前期的实验中,观察到携带 IL-10 基因的逆转录病毒可以成功转染 BMMSCs,并通过超声联合微泡的方式明显提高其转染效率。转染后 1 月内,利用 ELISA 的方法仍可检测到转染 IL-10 的 BMMSCs 培养上清液 IL-10 蛋白的含量高达 135.8 pg/ml (结果另行发表)。

机体的免疫状态尤其是细胞免疫发挥了重要的作用,T 细胞是其主要的效应细胞之一,尤其以 T 细胞亚群的 CD4⁺、CD8⁺两类占主导地位^[8]。在既往的研究中,CD4⁺和 CD8⁺T 细胞的数量及 CD4⁺/CD8⁺比值可以作为人体重要的免疫状态监测指标^[9];在发生移植肾急性排斥时,CD4⁺T 细胞计数增加,CD4⁺/CD8⁺比值明显升高^[10]。本实验结果显示:BMMSCs_{IL-10}和 BMMSCs 均能明显减少 CD4⁺T 细胞计数,CD4⁺/CD8⁺比值降低;而 BMMSCs_{IL-10}比 BMMSCs 的作用更明显,说明 BMMSCs_{IL-10}分泌的 IL-10 能够协同 BMMSCs 发挥抑制 CD4⁺T 细胞增殖的作用,并促使器官移植后细胞因子谱系的转化,从而有利于诱导免疫偏移形成免疫耐受。

淋巴细胞增殖反应能力实验的结果表明:BMMSCs_{IL-10}抑制异种淋巴细胞增殖的能力比 BMMSCs 明显增加;同时,BMMSCs 和 BMMSCs_{IL-10}及两者上清液均能抑制淋巴细胞增殖,说明 BMMSCs 可通过接触式和非接触式培养发挥作用,但 BMMSCs_{IL-10}的接触式培养抑制淋巴细胞增殖的能力最强。

综上所述,本实验结果显示 IL-10 基因修饰后的 BMMSCs_{IL-10}能明显减少 CD4⁺T,降低 CD4⁺/CD8⁺比值,同时抑制混合淋巴细胞增殖反应体系中的淋

巴细胞增殖,证实了 BMMSCs_{IL-10}能发挥更强的体外免疫抑制作用,这为后期利用 BMMSCs 靶向携带目的基因 IL-10 实现 BMMSCs_{IL-10}体内应用诱导免疫耐受提供了理论依据。由于 IL-10 重组病毒无法在移植肾局部诱导免疫耐受,为了实现 IL-10 对移植肾的靶向治疗,减轻病毒注射治疗的副作用,我们拟在后期利用 BMMSCs 的靶向迁移特性,采用 BMMSCs_{IL-10}细胞移植实现 IL-10 和 BMMSCs 靶向联合治疗作用研究,观察移植肾局部免疫耐受形成情况,从而探索一种保护同种异体移植肾的新方法。

参 考 文 献

- [1] Chidgey A P, Layton D, Trounson A, et al. Tolerance strategies for stem-cell-based therapies[J]. Nature, 2008, 453(7193): 330-337.
- [2] Fang Z Q, Ye B W, Liu Y L, et al. Localized expression of human BMP-7 by BM-MSCs enhances renal repair in an vivo model of ischemia-reperfusion injury[J]. Genes Cells, 2012, 17(1): 53-64.
- [3] 方针强, 叶 钢, 刘永亮, 等. 兔自体骨髓间充质干细胞移植对冷缺血再灌注损伤肾脏细胞增殖与凋亡和肾功能的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(9): 1166-1170.
- [4] Fang Z Q, Ye G, Liu Y L, et al. Effects of autologous bone marrow mesenchymal stem cells on the renal cell proliferation and apoptosis and renal function in a rabbit of renal ischemia-reperfusion injury[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2009, 34(9): 1166-1170.
- [5] 方针强, 刘永亮, 王祥卫, 等. hBMP-7 修饰的骨髓间充质干细胞对肾脏 BMP-7 的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(15): 1590-1593.
- [6] Fang Z Q, Liu Y L, Wang X W, et al. hBMP-7-modified bone marrow mesenchymal stem cells attenuate kidney ischemia-reperfusion injury in rabbits[J]. Journal of Third Military Medical University, 2011, 33(15): 1590-1593.
- [7] Tavakoli R, Gazdhar A, Pierog J, et al. Electroporation-mediated interleukin-10 overexpression in skeletal muscle reduces acute rejection in rat cardiac allografts[J]. J Gene Med, 2006, 8(2): 242-248.
- [8] Okada Y, Zuo X J, Toyoda M, et al. Adenovirus mediated IL-10 gene transfer to the airway of the rat lung for prevention of lung allograft rejection[J]. Transpl Immunol, 2006, 16(2): 95-98.
- [9] Furukawa H, Oshima K, Tung T, et al. Liposome-mediated combinatorial cytokine gene therapy induces localized synergistic immunosuppression and promotes long-term survival of cardiac allografts[J]. J Immunol, 2005, 174(11): 6983-6992.
- [10] Sui W, Zou H, Zou G, et al. Clinical study of the risk factors of insulin resistance and metabolic syndrome after kidney transplantation[J]. Transplant Immunology, 2008, 20(1-2): 95-98.
- [11] Li Y, Geng S, Yin Q, et al. Decreased level of recent thymic emigrants in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from CML patients[J]. J Transl Med, 2010, 8: 47.
- [12] Lopez-Hoyos M, Segundo D S, Fernandez-Fresnedo G, et al. Regulatory T cells in renal transplantation and modulation by immunosuppression[J]. Transplantation, 2009, 88(3s): 31-39.

(责任编辑:冉明会)