

重组 PACAP13 神经肽对小鼠胸腺功能的影响

吴倩妍¹, 梁阳², 刘贞银³, 张华华¹

摘要 目的 在细胞、器官及个体水平探究垂体腺苷酸环化酶激活肽重组 13 肽 (PACAP13 肽) 对胸腺功能的影响及其机制。**方法** 通过体外原代培养胸腺上皮细胞 (TEC) 及骨髓间充质干细胞 (MSC), 设置淋巴细胞组、淋巴细胞 + TEC 组、淋巴细胞 + MSC 组、淋巴细胞 + TEC + MSC 组, 检测 PACAP13 肽处理后各组淋巴细胞的增殖情况, 检测培养液中细胞因子白细胞介素 (IL)-1、IL-2、IL-6 和转化生长因子 (TGF) 的含量; 上述各组细胞加入地塞米松 (Dex) 诱导细胞凋亡, Annexin V-FITC/PI 流式双染检测 PACAP13 肽对各组淋巴细胞凋亡的情况。设置胸腺组、胸腺 + TEC 组、胸腺 + MSC 组、胸腺 + TEC + MSC 组, 并添加 PACAP13 肽, 实时定量 PCR (qPCR) 检测胸腺信号结合 T 细胞受体删除环 (sjTREC) 的含量。注射降植烷诱导狼疮模型小鼠, 随机分为模型组和 PACAP13 组, 模型组注射 0.9% 生理盐水, PACAP13 组注射 PACAP13 肽, qPCR 检测胸腺、脾脏 sjTREC 含

量; ELISA 检测血清狼疮相关自身抗体水平及逆转录 PCR (qRT-PCR) 检测胸腺相关 mRNA 表达水平。**结果** 与淋巴细胞组相比, 淋巴细胞 + TEC 组、淋巴细胞 + MSC 组、淋巴细胞 + TEC + MSC 组胸腺淋巴细胞增殖率增加, 凋亡率下降 ($P < 0.05$); 与对照组相比, PACAP13 组淋巴细胞增殖率增加, 凋亡率下降, 细胞培养液中细胞因子 IL-1、IL-2、IL-6 和 TGF 增加 ($P < 0.05$)。与胸腺组相比, 胸腺 + TEC 组、胸腺 + MSC 组、胸腺 + TEC + MSC 组胸腺 sjTREC 含量增加; 与对照组相比, PACAP13 肽组胸腺 sjTREC 含量增加。与模型组相比, PACAP13 组狼疮小鼠胸腺和脾脏中 sjTREC 的含量增加 ($P < 0.05$), 胸腺中 Aire、Fezf2、Foxp3、TGF- β mRNA 表达水平增加 ($P < 0.01$), 胸腺 CXCL13 mRNA 表达水平下降 ($P < 0.01$), 血清自身抗体抗 dsDNA 抗体、抗 RNP/sm 抗体、ANA 水平下降 ($P < 0.05$)。**结论** PACAP13 肽能促进胸腺淋巴细胞增殖和抗凋亡, 在体外及体内均具有增强胸腺淋巴细胞的生成和输出能力以及降低狼疮小鼠自身抗体水平的免疫调节作用, 其作用机制与调节胸腺细胞因子分泌和基因转录水平有关。

关键词 PACAP13 肽; 胸腺; 胸腺上皮细胞; 骨髓间充质干细胞

中图分类号 R 392.11

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0877-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.007

2022-03-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31200679); 广东省自然科学基金 (编号: 2018A0303130291)

作者单位: 广东医科大学¹ 基础医学院、³ 科研平台服务管理中心, 东莞 523808

² 广东茂名健康职业学院, 茂名 525400

作者简介: 吴倩妍, 女, 硕士研究生;

张华华, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: huazhang@126.com

ization software UALCAN analyzed SH3BP5-AS1 expression in a large sample of hepatocellular carcinoma tissues ($n = 371$). The expression of SH3BP5-AS1 was detected by qRT-PCR in normal hepatocytes THLE-2 and hepatoma cell lines Huh 7, BEL-7405, SNU-387, Hep 3B. After silencing SH3BP5-AS1 expression by siRNA technology, the effects of silencing SH3BP5-AS1 on the proliferation of Hep 3B cells were detected by CCK-8 assay, cell clone formation assay and Edu assay, and the effects of silencing SH3BP5-AS1 on apoptosis and cycle of Hep 3B cells were detected by flow-through assay. Based on the expression of SH3BP5-AS1 and TM6SF2 in hepatocellular carcinoma tissues, the expression correlation was counted and analyzed. **Results** SH3BP5-AS1 was highly expressed in hepatocellular carcinoma tissues. SH3BP5-AS1 was highly expressed in a large sample of hepatocellular carcinoma tissues from the TCGA database SH3BP5-AS1 was highly expressed in different hepatocellular carcinoma cell lines Huh 7, BEL-7405, SNU-387 and Hep 3B to a different extent. Silencing of SH3BP5-AS1 by siRNA inhibited the proliferation ability of Hep 3B cells, promoted apoptosis ability, affected the cell cycle and increased the number of G1 phase cells. SH3BP5-AS1 and TM6SF2 expression were negatively correlated in hepatocellular carcinoma tissues. **Conclusion** SH3BP5-AS1 is an important oncogenic non-coding RNA that can provide a theoretical basis for tumour-targeted therapy in patients with hepatocellular carcinoma.

Key words lncRNA SH3BP5-AS1; hepatocellular carcinoma; TM6SF2; cell proliferation; cell apoptosis; cell cycle

胸腺是哺乳动物重要的中枢免疫器官,是 T 细胞发育成熟的重要场所。然而很多情况下,包括常见的病毒感染和精神压力、癌症治疗中使用的化学性和放射性疗法、器官移植后免疫抑制剂的长期使用,都会对胸腺造成损伤,从而影响 T 细胞发育成熟,导致 T 细胞短期或长期缺乏;此外,随着年龄的增长,胸腺出现萎缩,促进 T 细胞发育成熟的能力下降,将进一步加剧 T 细胞数量缺乏^[1]。因此,修复胸腺损伤、促进胸腺再生及增加 T 细胞生成具有重要临床意义。垂体腺苷酸环化酶激活肽 (pituitary adenylatecyclase-activating polypeptide, PACAP) 是一种具有多功能的神经多肽, PACAP 及其衍生肽具有抑制促炎因子分泌、促进抗炎因子产生的作用,参与 T 细胞的增殖、分化,具有抑制淋巴细胞凋亡及调节相关免疫功能等作用^[2]。PACAP13 肽是 PACAP(1~13) 序列的肽段 (HSDGIFTDSYSRY), 包含与特异性受体 PAC1R 的结合域及激活域,是 PACAP 中具有重要功能的部分^[3]。此外, PACAP13 肽肽链较短,相比 PACAP 具有更高的穿透能力,因而可能具有更好地与靶点接触的潜能。该研究旨在探讨 PACAP13 肽对胸腺淋巴细胞增殖和凋亡作用,胸腺初始 T 细胞生成作用及其对狼疮模型小鼠胸腺基因转录和自身抗体生成的影响,并初步探究其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 4~5 周龄 SPF 级 Balb/c 小鼠,由南方医科大学实验动物中心提供,实验动物合格证号:SCXK(粤)20160041。

1.1.2 主要试剂 CCK-8 试剂盒(日本同仁化学);鼠抗波形蛋白、鼠抗广谱角蛋白、降植烷、地塞米松 (dexamethasone, Dex) (美国 Sigma 公司); FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (美国 BD 公司);Gold View I 型核酸染料(北京索莱宝科技有限公司);FITC anti-mouse CD44、PE anti-mouse CD34 (美国 BioLegend 公司);小鼠 ELISA 细胞因子检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);血液/细胞/组织全基因 DNA 抽提试剂盒(北京天根生化科技有限公司);PCR 引物 PAGE 纯化、DEPC 水(上海捷瑞生物工程有限公司);TAKARA TaqTTPCR 试剂盒、DL150000 DNA Marker (大连 TaKaRa 公司);SYBR Green qPCR SuperMix UDG 试剂盒(美国 invitrogen 公司);小鼠抗核抗体 (antinuclear antibody,

ANA)、抗 dsDNA 抗体、抗核糖核蛋白/史密斯 (ribonucleoprotein/smith, RNP/sm) 抗体及免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 定量 ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)。

1.1.3 主要仪器 FACS Canto II 流式细胞仪(美国 BD 公司);多功能酶标仪(美国 BioTek 公司);台式高速离心机 TGL-16B(上海安亭科学仪器厂);CO₂ 细胞培养箱、NanoDrop 5000(美国 Thermo 公司);EDC-810 普通 PCR 仪(北京东胜创新生物科技有限公司);电泳仪(北京六一仪器厂);ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);倒置显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司);台式冰冻离心机(上海力申科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 胸腺上皮细胞 (thymus epithelial cell, TEC) 和骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 的培养及 PACAP13 肽对胸腺细胞增殖、凋亡作用的检测

1.2.1.1 TEC 和 MSC 的培养及分组 处死 Balb/c 小鼠后,无菌取胸腺和双侧股骨和胫骨。胸腺置于 DMEM 培养液中清洗并剥离周围结缔组织和血管,剪成小于 1 mm × 1 mm × 1 mm 的块状,放置于培养瓶中,加入含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液;股骨和胫骨用镊子去除周围组织并清洗,剪去骨头两端,用无菌注射器吸取培养液从一端冲洗骨髓腔内容物到无菌培养皿中,直至骨髓腔变透明,将培养皿中的培养基转移至培养瓶中。培养瓶置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中,每 2 d 换 1 次培养液,待细胞铺满底部 80% 左右,进行传代。原代培养的 TEC 和 MSC 传至二代,分别进行免疫组化法观察波形蛋白和广谱角蛋白表达及细胞表面抗原 CD34 和 CD44 检测,取纯度较高的细胞进行下一步实验。TEC 和 MSC 的浓度调整为 1 × 10⁵/ml,根据细胞的组成为 4 组,即淋巴细胞组、淋巴细胞 + TEC 组、淋巴细胞 + MSC 组和淋巴细胞 + TEC + MSC 组 (TEC : MSC = 1 : 1)。淋巴细胞组直接加入胸腺淋巴细胞单细胞悬液(处死 Balb/c 小鼠取出胸腺组织,用研磨器在 300 目滤网上研磨并用培养基冲洗获得),其他组预先加入 TEC 和 MSC 到细胞培养板中,待细胞贴壁生长至融合率达 80%,去除培养板中的培养基,随后加入胸腺淋巴细胞单细胞悬液。胸腺淋巴细胞单细胞悬液浓度为 2 × 10⁵/ml。

1.2.1.2 PACAP13 肽对淋巴细胞增殖作用的检测 用上述方法将 4 组细胞铺于 96 孔板,每组设 6 个

孔,其中3个孔加入终浓度为 10^{-5} mol/L的PAC-AP13肽作为PACAP13组,其余3孔加入等量培养基作为对照组,并设无细胞纯培养基的空白孔。在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 的培养箱中培养48 h后将孔内含悬浮的胸腺淋巴细胞的培养基转移至新的96孔板中并加入 $10\text{ }\mu\text{l}$ CCK-8,3 h后酶标仪检测在 450 nm 的OD值,计算胸腺淋巴细胞增殖率。细胞增殖率 = $(A_{\text{PACAP13组}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白孔}})$ 。实验重复3次。

1.2.1.3 PACAP13肽对淋巴细胞凋亡作用的检测

用上述方法将4组细胞铺于24孔板,每组设6个孔,加入浓度为 10^{-6} mol/L的Dex诱导细胞凋亡,3孔加入终浓度为 10^{-5} mol/L的PACAP13肽作为PACAP13组,其余3孔加入等量培养基作为对照组,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 的培养箱中培养48 h后,吸取孔内含悬浮的胸腺淋巴细胞的培养基离心收集胸腺淋巴细胞,Annexin V-FITC/PI双染色,流式细胞仪检测细胞的凋亡情况,实验重复3次。

1.2.2 胸腺体外培养

根据与胸腺共培养细胞的种类将实验分为4组,即胸腺组(仅有胸腺)、胸腺+TEC组(胸腺与TEC共培养)、胸腺+MSC组(胸腺与MSC共培养)和胸腺+TEC+MSC组(胸腺与TEC、MSC共培养,TEC:MSC=1:1),每组6个孔。胸腺+TEC组、胸腺+MSC组和胸腺+TEC+MSC组预先将TEC和MSC调整浓度为 1×10^5 /ml,接种于24孔板,细胞生长达到80%融合率,将Balb/c小鼠处死后用75%乙醇浸泡2 min,移入超净台无菌操作取胸腺,去除周围结缔组织,放置于培养基中备用,吸走24孔板中的培养基,放入预先挖出小洞的无菌海绵,将胸腺置于海绵挖空的小洞中,加入与海绵持平的培养基,并加入终浓度为 10^{-6} mol/L的Dex诱导淋巴细胞凋亡。其中3个孔中加入终浓度为 10^{-5} mol/L的PACAP13肽作为PACAP13组,其余3个孔加入等量培养基作为对照组。

1.2.3 降植烷诱导狼疮模型小鼠及分组

小鼠单次腹腔注射0.5 ml降植烷注射液,3个月后随机分为PACAP13组和模型组,PACAP13组每天根据体质量按 12.5 ml/kg 腹腔注射 10^{-5} mol/L的PAC-AP13肽溶液,模型组注射等量0.9%氯化钠溶液,连续注射14 d。

1.2.4 qPCR检测体外培养胸腺和狼疮小鼠胸腺、脾脏信号结合T细胞受体删除环(signal joint T cell receptor rearrangement excision circles, sjTREC)含量

1.2.2项的各组胸腺器官在培养箱培养48 h后,

取出胸腺,提取基因组DNA,进行qPCR反应;1.2.3项的狼疮小鼠在PACAP13肽/0.9%氯化钠溶液连续注射14 d结束后处死,收集胸腺及脾脏,提取DNA进qPCR反应。具体方法为:构建TREC和RAG2标准重组质粒,并设置标准质粒阴性对照组、RAG2片段PCR组、TREC片段PCR组、RAG2阳性对照组、TREC阳性和阴性对照组,各组设置两个复管。标准重组质粒以浓度 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 拷贝/ μl 建立标准曲线。PCR反应条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、2 min去UDG, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 min预变性, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 s变性, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、34 s,进行50个循环。根据标准曲线和样本PCR反应Ct值得出样本的TREC和RAG2的拷贝数。以 $[(\text{sjTREC拷贝数}1 + \text{sjTREC拷贝数}2) / (\text{RAG2拷贝数}1 + \text{RAG2拷贝数}2)] \times 2 \times 10^6$,计算 1×10^6 个细胞中sjTREC的拷贝数。引物序列为:sjTREC,(F)5'-CATTGCCTTTGAACCAAGCTG-3',(R)5'-TTATGCACAGGGTGCAGGTG-3';RAG2,(F)5'-TGACGTGGTGTATAGTCGA-3',(R)5'-TCCTGAAGTTCTGGGAGA-3'。

1.2.5 ELISA检测细胞培养液中细胞因子和狼疮小鼠血清自身抗体水平

按1.2.1.1项分组培养的细胞添加终浓度 10^{-5} mol/L的PACAP13肽后在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 的培养箱中培养48 h,吸取细胞培养液,根据ELISA试剂盒说明书测定每个样本的IL-1、IL-2、IL-6、TGF的表达水平。狼疮小鼠在PACAP13肽/0.9%氯化钠溶液连续注射14 d结束后经摘眼球取血,血液室温静置20 min后,3 000 r/min离心20 min并收集上层血清,根据说明书测定ANA、抗dsDNA抗体、抗RNP/sm抗体及IgG水平。每个样本和标准品设置双复孔,在 450 nm 波长下测量OD值,以标准品的梯度浓度和OD值绘制标准曲线,计算各样品的细胞因子含量。

1.2.6 RT-PCR检测胸腺基因表达

狼疮小鼠连续14 d注射PACAP13肽/0.9%氯化钠溶液后处死,收集胸腺,提取RNA,去除基因组DNA后进行RT-PCR检测免疫相关基因CXC趋化因子配子13(CXC chemokine ligand-13, CXCL13)、自身免疫调节因子(autoimmune regulatory factor, Aire)、前脑胚锌指状蛋白2(forebrain zinc finger protein 2, Fezf2)、叉头状蛋白3(forkhead box protein 3, Foxp3)和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)表达水平。反应条件为: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 min, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 s, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 min。采用SYBR-Green进行PCR,反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s预变性; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s,40个

循环,通过 Ct 值定量法计算基因表达的比率,结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示,其中 $\Delta\Delta Ct = PACAP13$ 组 ($Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因}$) - 对照组 ($Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因}$)。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
β -action	F: CCTCACTGTCCACCTTCC R: GGGTGTA AAAACGCAGCTC	120
Aire	F: GCACTCATTGACGGCAT R: CAGGAAGAGAAGGTTGGTG	81
Fez2	F: CGTCTGCGAGTTTTGTGG R: TGGGTGTGCATGTGGAA	150
Foxp3	F: GTCGGGACCTGCGAAGT R: TGTAGGTGGGCTGAGGGA	136
TGF- β	F: GCAACAATTCCTGGCGTTA R: TTCCGTCTCCTTGGTTCAG	117

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。图表采用 Graphpad 8.0 软件进行处理。

2 结果

2.1 TEC 及 MSC 鉴定 传至二代的 TEC 呈多边

形贴壁生长,免疫组织化学结果显示,广谱角蛋白呈阳性表达,而波形蛋白呈阴性表达,见图 1。传至二代的 MSC 呈圆形或梭形贴壁生长;经流式细胞仪检测, MSC 表面 CD34 抗原阳性表达率为 8.65%, CD44 抗原表达率为 99.9%,见图 2。

2.2 TEC、MSC、PACAP13 肽对淋巴细胞增殖及凋亡的影响 CCK-8 检测淋巴细胞的增殖情况,根据 OD 值计算细胞增殖率,结果显示,与淋巴细胞组相比,淋巴细胞 + TEC 组、淋巴细胞 + MSC 组和淋巴细胞 + TEC + MSC 组的淋巴细胞的增殖率增加 ($F = 4.102, P < 0.05$),其中淋巴细胞 + TEC + MSC 组增殖率增加程度最高。与不添加 PACAP13 肽的对照组相比,4 组细胞在添加 PACAP13 肽后其淋巴细胞增殖率均增加,差异有统计学意义 ($t = -5.652, P < 0.05$),见图 3。流式双染检测 Dex 诱导淋巴细胞凋亡的情况,与淋巴细胞 + Dex 组相比,淋巴细胞 + TEC + Dex 组、淋巴细胞 + MSC + Dex 组和淋巴细胞 + TEC + MSC + Dex 组的淋巴细胞的凋亡率下降 ($F = 17.586, P < 0.05$),其中淋巴细胞 + TEC + MSC + Dex 组凋亡率下降程度最高,与不添加 PACAP13 肽的对照组相比,4 组细胞在添加 PACAP13 肽后淋巴细胞凋亡率降低 ($F = 18.842, P < 0.01$)。见图 4。

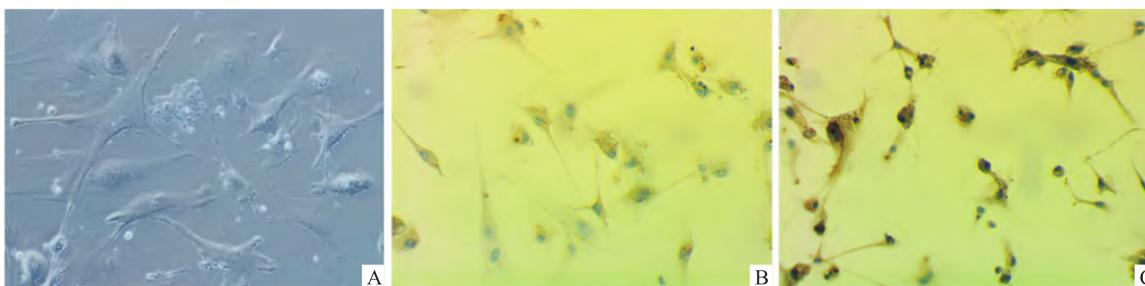


图 1 TEC 的细胞形态及免疫组化 $\times 400$

A: 显微镜下细胞形态; B: 波形蛋白免疫染色; C: 广谱角蛋白免疫染色

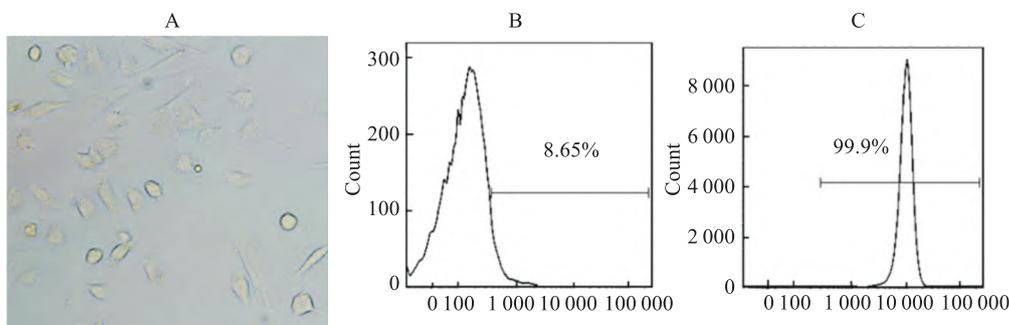


图 2 MSC 细胞形态及流式细胞仪鉴定

A: 显微镜下细胞形态 $\times 400$; B: CD34 表面抗原检测; C: CD44 表面抗原检测

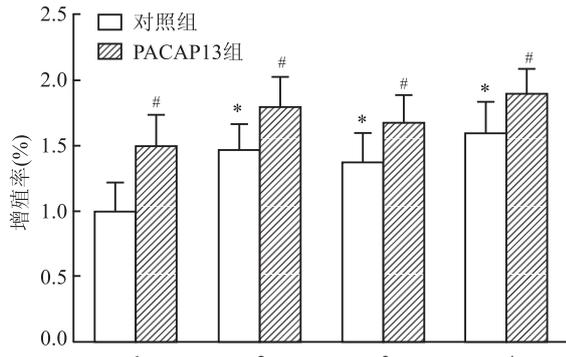


图3 TEC、MSC、PACAP13 肽对淋巴细胞增殖的影响

1:淋巴细胞组;2:淋巴细胞+TEC组;3:淋巴细胞+MSC组;4:淋巴细胞+TEC+MSC组;与淋巴细胞组比较:* $P < 0.05$;与对照组比较:# $P < 0.05$

2.3 qPCR 测定体外培养胸腺及狼疮小鼠胸腺、脾脏 sjTREC 含量 根据标准曲线计算出各样本 sjTREC 和 RAG2 的拷贝数,得出 1×10^6 个细胞中 sjTREC 的含量,进行组间对比。结果显示,与胸腺组相比,胸腺 + TEC 组、胸腺 + MSC 组、胸腺 + TEC + MSC 组胸腺 sjTREC 的含量增加 ($F = 41.553, P < 0.05$);与不添加 PACAP13 肽的对照组相比,添加 PACAP13 肽后胸腺 sjTREC 拷贝数增加 ($t = -7.434, P < 0.05$),见图 5。与模型组相比,PACAP13 肽组小鼠胸腺及脾脏 sjTREC 的含量均增加,其中胸腺 sjTREC 含量增加程度高 ($F = 33.687, P < 0.01$),见图 6。

2.4 PACAP13 肽对体外培养淋巴细胞的细胞因子及狼疮小鼠自身抗体的影响 ELISA 法检测各组体外培养淋巴细胞上层培养液细胞因子含量以及各组小鼠血清自身抗体含量,根据标准曲线求出各样本细胞因子或自身抗体含量。结果显示,与淋巴细胞 + PACAP13 组相比,淋巴细胞 + TEC + MSC + PACAP13 组细胞因子 IL-1、IL-2、IL-6、TGF 水平均显著增加 ($F = 1693.517, P < 0.01; F = 8112.900, P < 0.05; F = 1771.313, P < 0.01; F = 1603.101, P < 0.01$);与淋巴细胞 + PACAP13 组相比,淋巴细胞 + TEC + PACAP13 组 IL-1 和 IL-6 水平明显增加 ($P < 0.01$);与淋巴细胞 + PACAP13 组相比,淋巴细胞 + MSC + PACAP13 组 IL-1、IL-6、TGF 水平均明显增加 ($P < 0.05$)。见表 2。与模型组相比,PACAP13 组血清 ANA、抗 dsDNA 抗体、抗 RNP/sm 抗体的含量均下降 ($F = 25.098, P < 0.01; F = 6.776, P < 0.05; F = 5.346, P < 0.05$),其中 ANA 下降幅度最为明显,而 PACAP13 组 IgG 含量有所下降但与模型组相比差异无统计学意义,见表 3。

2.5 PACAP13 肽对小鼠胸腺功能相关基因表达的影响 与模型组相比,PACAP13 组 Aire、Fezf2、Foxp3、TGF- β mRNA 相对表达量均上升 ($t = -10.405, P < 0.01; t = -5.588, P < 0.01; t = -5.912; t = -4.425, P < 0.01$),CXCL13 mRNA 相对表达量则下降 ($t = 6.109, P < 0.01$)。见图 7。

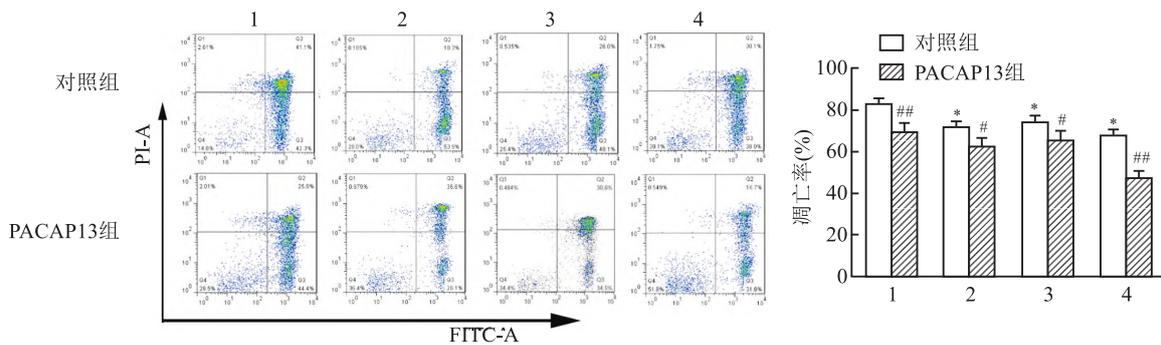


图4 TEC、MSC、PACAP13 肽对 Dex 诱导淋巴细胞凋亡的影响

1:淋巴细胞+Dex组;2:淋巴细胞+TEC+Dex组;3:淋巴细胞+MSC+Dex组;4:淋巴细胞+TEC+MSC+Dex组;与淋巴细胞+Dex组比较:* $P < 0.05$;与对照组比较:# $P < 0.05, ##P < 0.01$

表2 各组细胞培养体系细胞因子的含量 (ng/L, $\bar{x} \pm s, n = 6$)

组名	IL-1	IL-2	IL-6	TGF
淋巴细胞 + PACAP13	87.45 ± 0.75	31.72 ± 0.54	212.65 ± 2.73	321.30 ± 12.44
淋巴细胞 + MSC + PACAP13	92.72 ± 3.06 *	33.41 ± 0.53	225.81 ± 7.85 *	366.59 ± 12.47 *
淋巴细胞 + TEC + PACAP13	97.44 ± 2.87 **	30.03 ± 0.18	238.97 ± 7.63 **	300.29 ± 3.17
淋巴细胞 + MSC + TEC + PACAP13	183.31 ± 2.51 **	65.23 ± 0.31 *	474.38 ± 6.96 **	680.17 ± 8.54 **

与淋巴细胞 + PACAP13 组比较: * $P < 0.05, **P < 0.01$

表3 各组小鼠血清自身抗体含量($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	ANA (U/ml)	抗 dsDNA 抗体 (IU/ml)	抗 RNP/sm 抗体 (ng/ml)	IgG (mg/ml)
模型组	7 801.51 ± 1 001.91	2 622.34 ± 525.51	2 244.30 ± 631.38	84.64 ± 12.75
PACAP13	4 944.37 ± 991.13 * *	1 958.83 ± 314.03 *	1 519.73 ± 397.67 *	66.49 ± 15.38

与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

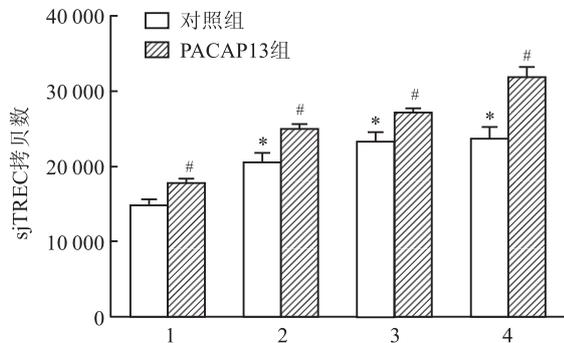


图5 体外培养胸腺 sjTREC 的拷贝数

1: 胸腺组; 2: 胸腺 + TEC 组; 3: 胸腺 + MSC 组; 4: 胸腺 + TEC + MSC 组; 与胸腺组比较: * $P < 0.05$; 与对照组比较: # $P < 0.05$

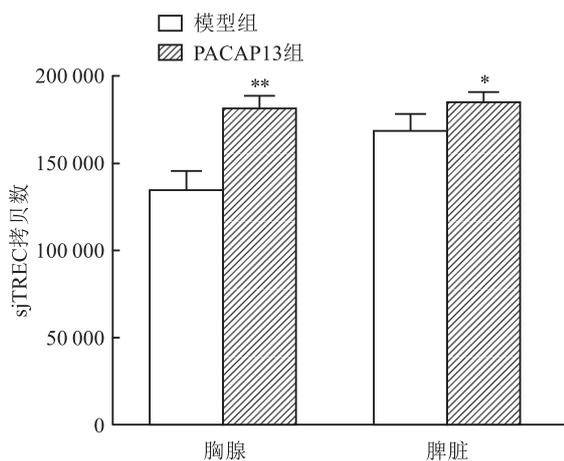


图6 狼疮小鼠胸腺、脾脏 sjTREC 的拷贝数

与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

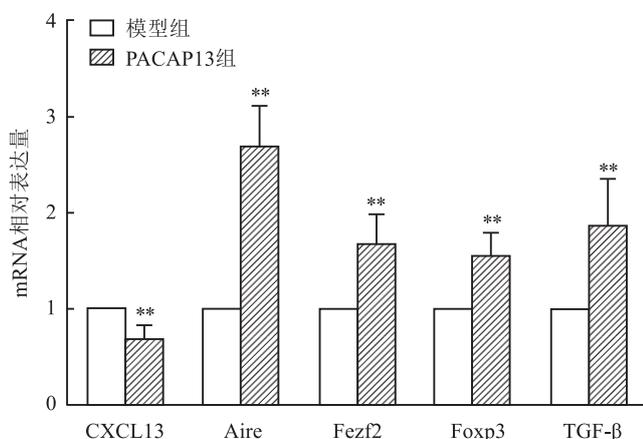


图7 狼疮小鼠胸腺 mRNA 相对表达水平

与模型组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

TEC 是胸腺中主要的基质细胞,是构成胸腺微环境基质网架的主要细胞,将胸腺分为皮质区和髓质区;同时,TEC 能分泌多种细胞因子,促进淋巴细胞的增殖与分化^[4]。MSC 具有干细胞的基本特征:多向分化潜能及自我更新能力,在胸腺微环境中可以作为淋巴细胞前体分化为成熟的淋巴细胞。此外,MSC 还具有自分泌功能,能分泌多种细胞因子,促进淋巴细胞增殖生长及发挥免疫调节作用^[5]。其中 IL-1 和 IL-6 是促炎细胞因子,具有诱导胸腺祖细胞分化为成熟的 T 淋巴细胞的作用^[6]。IL-2 促进调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)分化,Treg 与效应性 T 细胞的平衡是维持机体免疫及自我耐受的关键^[7]。TGF-β,在维持稳态时对自身抗原的免疫耐受具有重要作用^[8]。因此,该研究以 TEC 和 MSC 这两种细胞为对象与淋巴细胞共培养,体外探究 TEC 和 MSC 对胸腺淋巴细胞功能的作用,以及 PACAP13 肽对淋巴细胞、TEC 和 MSC 的作用;TEC 和 MSC 能促进淋巴细胞增殖并抑制凋亡,PACAP13 肽也对淋巴细胞具有明显促增殖和抗凋亡作用。此外,PACAP13 肽对与 TEC 和 MSC 共培养的淋巴细胞的增殖和抗凋亡作用优于单一的淋巴细胞,提示 PACAP13 肽不仅作用于淋巴细胞,同时还可以通过作用于 TEC 和 MSC 来增强这种效应。体外培养的淋巴细胞 + TEC + MSC + PACAP13 组培养液中细胞因子 IL-1、IL-2、IL-6 和 TGF-β 水平均显著增加,而淋巴细胞 + TEC + PACAP13 组和淋巴细胞 + MSC + PACAP13 组则只有部分细胞因子水平增加且增幅较低;一方面提示 PACAP13 肽能促进 TEC 和 MSC 细胞因子的分泌,另一方面 TEC 和 MSC 之间可能还存在相互作用,从而进一步促进细胞因子分泌。

胸腺是 T 淋巴细胞发育、分化、成熟及输出的场所,初始 T 细胞生成数量是胸腺状态和功能的重要评价指标,sjTREC 是 T 细胞受体 α 基因重组过程中必须删除的 T 细胞受体 δ 基因片段,重排完成后经历阴性选择分化为单阳性细胞通过血液循环进入外周免疫器官,删除后的 T 细胞受体 δ 基因片段两

端连接形成环状 DNA 结构,且它不随细胞的分裂而复制,因此能够代表近期初始 T 细胞输出的数量^[9]。有研究^[10]表明,降植烷诱导的狼疮小鼠胸腺 T 细胞出现异常分化的情况,双阳性 T 细胞显著减少,而双阴性 T 细胞增加,细胞从双阴性阶段到表达 CD4 和 CD8 进入双阳性阶段是 T 细胞发育的重要过程,双阴性和双阳性细胞数量异常提示狼疮小鼠 T 细胞发育受到阻滞。该研究显示,体外培养的胸腺, PACAP13 肽干预后明显提高 sjTREC 的含量,提示 PACAP13 肽具有促进 T 细胞发育的作用。MSC 或 TEC 与胸腺共培养都能使胸腺 sjTREC 的含量增加,TEC + MSC 与胸腺共培养条件下, sjTREC 的含量仅比 TEC 或 MSC 单一存在的情况下少量增加,表明 TEC 和 MSC 对初始 T 细胞生成的促进作用可能是有限度的,而添加 PACAP13 肽使 sjTREC 含量增加明显,提示 PACAP13 肽还能作用于 TEC 和 MSC 促进 T 细胞生成。在狼疮小鼠注射 PACAP13 肽后胸腺和脾脏的 sjTREC 含量提高,这也与体外的实验结果胸腺 sjTREC 含量增加的结果相一致;同时,小鼠体内实验还为下一步系统性研究 PACAP13 肽的作用机制提供基础。

Aire 和 Fezf2 具有调节胸腺髓质上皮细胞表达组织性抗原的能力^[11-12],清除自身免疫性细胞对免疫耐受的建立有重要作用。Treg 细胞是发挥免疫抑制的重要亚群,叉头蛋白 3 (Foxp3) 为 Treg 细胞特异性表达的转录因子,对 Treg 细胞的发育和功能起决定性作用,而 Treg 分泌的转化生长因子 β (TGF- β) 能抑制免疫活性细胞的增殖,降低机体的免疫反应^[13]。CXCL13 能趋化 B 细胞的迁移聚集,促进 B 细胞分化为浆细胞,从而促进抗体的产生^[14]。该研究对狼疮小鼠胸腺以上几个基因 mRNA 表达水平进行研究,进而评价 PACAP13 肽对胸腺功能的影响。结果显示,PACAP13 肽增加 Aire、Fezf2、Foxp3、TGF- β mRNA 的表达,同时降低 CXCL13 mRNA 的表达;表明 PACAP13 肽可能通过上调组织性抗原的表达和增强 Treg 细胞的免疫抑制功能,抑制 B 细胞分化为浆细胞,发挥免疫调节作用。同时,小鼠血清中狼疮相关自身抗体水平的下降,需要进一步验证 PACAP13 肽具有调节自身免疫耐受,抑制机体炎症的作用。

综上所述,PACAP13 肽具有促进淋巴细胞增殖

和抗凋亡作用,在体外及体内均具有增强初始 T 细胞生成和输出及减少狼疮小鼠自身抗体产生的免疫调节作用,其作用机制涉及对胸腺细胞因子分泌及基因转录的调控。

参考文献

- [1] Kinsella S, Dudakov J A. When the damage is done: injury and repair in thymus function[J]. *Front Immunol*,2020, 11: 1745.
- [2] Abad C, Tan Y V. Immunomodulatory roles of PACAP and VIP: lessons from knockout mice[J]. *J Mol Neurosci*,2018, 66(1): 102-13.
- [3] Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery[J]. *Pharmacol Rev*,2009, 61(3): 283-357.
- [4] Kadouri N, Nevo S, Goldfarb Y, et al. Thymic epithelial cell heterogeneity: TEC by TEC[J]. *Nat Rev Immunol*,2020, 20(4): 239-53.
- [5] 王严影,杨育坤,朱向情,等. 骨髓间充质干细胞移植干预衰老猕猴胸腺结构和功能的变化[J]. *中国组织工程研究*,2021, 25(1): 13-9.
- [6] Zhong Y B, Zhang X L, Lv M Y, et al. Detection of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in Sprague-Dawley rats' atrophic thymus induced by lipopolysaccharide[J]. *Pol J Vet Sci*,2018, 21(3): 589-97.
- [7] Hemmers S, Schizas M, Azizi E, et al. IL-2 production by self-reactive CD4 thymocytes scales regulatory T cell generation in the thymus[J]. *J Exp Med*,2019, 216(11): 2466-78.
- [8] Sanjabi S, Oh S A, Li M O. Regulation of the immune response by TGF- β : from conception to autoimmunity and infection[J]. *Cold Spring Harb Perspect Bio*, 2017, 9(6): a22236.
- [9] Mikhael N L, Elsorady M. Clinical significance of T cell receptor excision circle (TREC) quantitation after allogenic HSCT[J]. *Blood Res*,2019, 54(4): 274-81.
- [10] Tang W, Zhang Y, Zhang Y, et al. Abnormal thymic B cell activation and impaired T cell differentiation in pristane-induced lupus mice[J]. *Immunol Lett*, 2021, 231: 49-60.
- [11] Passos G A, Speck Hernandez C A, Assis A F, et al. Update on Aire and thymic negative selection[J]. *Immunology*,2018, 153(1): 10-20.
- [12] Takaba H, Morishita Y, Tomofuji Y, et al. Fezf2 orchestrates a thymic program of self-antigen expression for immune tolerance[J]. *Cell*,2015, 163(4): 975-87.
- [13] Liu M, Li S, Li M O. TGF- β control of adaptive immune tolerance: a break from treg cells[J]. *BioEssays*,2018, 40(11): 1800063.
- [14] Yoshitomi H. CXCL13-producing PD-1(hi)CXCR5(-) helper T cells in chronic inflammation[J]. *Immunol Med*,2020,43(4):156-60.

Effect of the recombinant neuropeptide PACAP13 on thymus function of mice model

Wu Qianyan¹, Liang Yang², Liu Zhenyin³, Zhang Huahua¹

(¹*School of Basic Medicine*, ³*Scientific Research Platform Service Management Center*, *Guangdong Medical University, Dongguan 523808*; ²*Guangdong Maoming Health Vocational College, Maoming 525400*)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of pituitary adenylate cyclase activated peptide recombinant 13 peptide (PACAP13) on thymus at cell, organ and individual levels. **Methods** Thymic epithelial cells (TEC) and bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) were cultured *in vitro*, lymphocyte group, lymphocyte + TEC group, lymphocyte + MSC group and lymphocyte + TEC + MSC group were set up to detect the proliferation of lymphocytes in each group treated by PACAP13 peptide, and contents of cytokines interleukin (IL)-1, IL-2, IL-6 and transforming growth factor (TGF) in culture medium were detected. Dexamethasone (Dex) was added to induce cell apoptosis, and Annexin V-FITC/PI flow cytometry double staining was used to detect the effect of PACAP13 peptide on cell apoptosis. Thymus group, thymus + TEC group, thymus + MSC group, thymus + TEC + MSC group were set up, and PACAP13 peptide was added, the content of signal joint T cell receptor rearrangement excision circles (sjTREC) in thymus was detected by real-time quantitative PCR (qPCR). The pristane-induced lupus model mice were randomly divided into model group and PACAP13 group. Model group was injected with 0.9% saline, and PACAP13 group was injected with PACAP13 peptide, thymus and spleen sjTREC levels were detected by qPCR, serum lupus-related autoantibodies were detected by ELISA and thymus-related mRNA expression levels were detected by reverse transcription quantitative PCR (qRT-PCR). **Results** Compared with the lymphocyte group, the proliferation rate of thymus lymphocytes in the lymphocyte + TEC group, lymphocyte + MSC group, lymphocyte + TEC + MSC group increased, and the apoptosis rate decreased ($P < 0.05$), compared with the control group, the proliferation rate of lymphocytes in the PACAP13 group increased, the rate of apoptosis decreased, and the cytokines IL-1, IL-2, IL-6 and TGF in the cell culture medium increased ($P < 0.05$). Compared with the thymus group, thymus + TEC group, thymus + MSC group, thymus + TEC + MSC group increased the content of thymus sjTREC, compared with the control group, PACAP13 peptide group thymus sjTREC content increased. Compared with the model group, the content of sjTREC in the thymus and spleen of lupus mice in the PACAP13 group increased ($P < 0.05$), thymus mRNA expression level of AIRE, Fezf2, Foxp3 and TGF- β increased ($P < 0.01$), and CXCL13 mRNA expression level decreased ($P < 0.01$), the autoantibodies of anti-dsDNA antibody, anti-RNP / sm antibody and ANA decreased in serum ($P < 0.05$). **Conclusion** PACAP13 peptide can promote the proliferation and anti-apoptosis of thymus lymphocytes, enhance the production and output of thymus lymphocytes *in vitro* and *in vivo*, and immunomodulatory effects of reducing the level of autoantibodies in lupus mice, and the mechanism is related to the regulation of thymic cytokine secretion and gene transcription level.

Key words peptide PACAP13; thymus; thymic epithelial cells; bone marrow mesenchymal stem cells