

网络出版时间: 2016-6-6 13:52:32 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160606.1352.022.html>

硼替佐米对小鼠骨髓移植后 Th1/Th2/Th17 细胞亚群分化的影响

王永庆 李庆生 吴 炜 夏雷鸣

摘要 目的 观察硼替佐米对小鼠急性移植物抗宿主病(aGVHD)后辅助性T细胞(Th)1/Th2/Th17细胞亚群分化及其主要的效应性细胞因子[γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素(IL)-4、IL-17A]表达的影响。方法 建立小鼠aGVHD动物模型,将小鼠随机分3组:正常对照组、移植对照组、移植+硼替佐米组。观察各组小鼠的生存时间、aGVHD表现和嵌合度,流式细胞术检测第7天外周血Th1/Th2/Th17细胞亚群的表达,ELISA法检测血清中IFN- γ 、IL-4、IL-17A水平。结果 移植对照组小鼠出现典型的aGVHD症状,2周内死于aGVHD,平均存活时间为11d,移植+硼替佐米组小鼠aGVHD症状明显减轻,平均生存时间较移植对照组显著延长,60d时生存率为60%。移植对照组小鼠Th1/Th17细胞亚群明显升高($P < 0.01$),Th2细胞亚群比例降低($P < 0.01$)。输注硼替佐米后Th1/Th17细胞亚群比例降低,但仍高于正常对照($P < 0.05$),Th2细胞亚群比例上升,与正常对照差异无统计学意义。移植对照组小鼠血清IFN- γ 和IL-17A水平明显升高($P < 0.01$),IL-4水平显著降低($P < 0.01$)。输注硼替佐米后IFN- γ 和IL-17A水平降低,但仍高于正常对照($P < 0.05$),IL-4水平上升,低于正常对照($P < 0.05$)。结论 移植后早期输注硼替佐米可通过下调Th1/Th17细胞分化比例及IFN- γ 和IL-17A的表达来减轻小鼠异基因移植后的aGVHD,提高生存率。

关键词 硼替佐米;小鼠;急性移植物抗宿主病;Th1细胞;Th2细胞;Th17细胞

中图分类号 R 457.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-0969-05

2016-03-25 接收

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金项目(编号:Kj2011Z165)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院血液内科,合肥 230022

作者简介:王永庆,男,副主任医师;

李庆生,男,博士,副主任医师,责任作者,E-mail: wshysh@sina.com

异基因造血干细胞移植是治疗恶性血液病和某些非恶性遗传性缺陷病的最有效方法之一,但移植后急性移植物抗宿主病(acute graft-versus-host disease, aGVHD)的发生率高达20%~80%,是造成患者死亡和生活质量下降的主要原因之一^[1]。因此,寻找新的药物和方法防治aGVHD成为目前研究的热点。硼替佐米作为首个应用于临床的蛋白酶体抑制剂,其作用机制与核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)途径的抑制有关^[2]。NF- κ B途径在活化的自身反应性T细胞中的活性明显增强,而自身反应性T细胞的异常活化正是aGVHD的主要发病机制^[3]。早期的研究^[4-5]证实移植后早期输注硼替佐米可减轻小鼠异基因移植后的aGVHD、提高生存率;而移植后延期输注硼替佐米则会加重aGVHD,但移植后早期输注硼替佐米减轻小鼠异基因移植后的aGVHD作用机制尚不明确。该研究观察aGVHD时小鼠经早期输注硼替佐米作用后外周血辅助性T细胞(helper T cell, Th)1/Th2/Th17细胞亚群分化及其主要的效应性细胞因子 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素(interleukin, IL)-4、IL-17A表达,以探讨硼替佐米防治aGVHD的作用机制,为其进一步临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 小鼠移植模型的建立

1.1.1 药品、试剂和设备 硼替佐米购自美国Millennium公司;刺激剂PMA、Ionomycin购自美国Sigma公司;FITC标记的anti-mouse CD3、PE标记的anti-mouse CD4、APC标记的anti-mouse IFN- γ 、IL-4、

while Western blot was used to analyze the expressions of Runx-2, Hif-1 α protein. **Results** The osteogenic differentiation of PDLSCs under hypoxia condition was higher than the osteogenic differentiation of PDLSCs cultured under normoxia condition, however, the osteogenic differentiation of PDLSCs cultured under hypoxia condition for 48 h was inhibited. **Conclusion** Hypoxia can enhance the osteogenic differentiation of PDLSCs within 48 h, however, inhibit the osteogenic differentiation of PDLSCs after 48 h.

Key words human periodontal ligament stem cells; hypoxia; osteogenic

IL-17A、蛋白转运抑制剂 Monensin 购自美国 eBio-science 公司; RPMI 1640 培养基购自美国 Invitrogen 公司; 小鼠 IFN- γ 、IL-4、IL-17A ELISA 试剂盒购自广州瑞博奥生物科技有限公司; FCM Beckman Coulter EPICS XL-4C 购自美国 Beckman Coulter 公司; 全自动酶标仪 Ultra-Mark 购自美国 Bio-Bad 公司。

1.1.2 受鼠准备 清洁级近交系 BALB/c (H-2d +) 小鼠, 雌性, 7~9 周龄, 17~22 g。受鼠饮用添加红霉素(250 mg/L) 和庆大霉素(32×10^4 U/L) 的灭菌水, 饲料经紫外线照射后放入层流架中, 并持续到移植后 4 周。移植前 4 h 小鼠经 60 Co γ 射线全身均匀照射 (total body irradiation, TBI), 总剂量为 7.0 Gy, 剂量率为 0.5 Gy/min。

1.1.3 供鼠骨髓细胞的准备 取 10~12 周雄性 C57BL/6 (H-2b +) 小鼠, 颈椎脱位法处死, 浸入 75% 乙醇 10 min, 分离股骨和胫骨。用 RPMI 1640 从骨髓腔冲出单个核细胞, 调整细胞密度为 5×10^7 /ml。

1.1.4 实验分组 正常对照组 (8 只): 未做任何处理; 移植对照组 (20 只): TBI 后输入供鼠骨髓细胞 0.4 ml; 移植 + 硼替佐米组 (20 只): TBI 后输入供鼠骨髓细胞 0.4 ml, 第 0~2 天接受尾静脉输注硼替佐米 1 mg/(kg · d)。在层流柜中无菌饲养观察至第 60 天。另设预处理对照组 (8 只), 单纯接受 TBI, 以观察预处理方案是否为清髓性的。

1.2 主要观察指标

1.2.1 一般状况观察 定期检测小鼠体重, 观察进食以及精神状况, 有无弓背、翘毛、腹泻、体重减轻、精神萎靡等 aGVHD 表现, 记录每只小鼠的存活时间; 存活超过 60 d, 体重、饮食及活动正常者为长期生存, 并计算生存率。

1.2.2 嵌合度检测 取 2 只存活超过 30 d 的小鼠的骨髓细胞, H-2b-PE 荧光抗体染色, 流式细胞术检测受鼠中供鼠来源的细胞 (H-2b +) 的百分比以确定嵌合体形成情况。

1.3 流式细胞术检测外周血 Th1/Th2/Th17 细胞亚群 第 7 天采集受鼠眼球血 1 ml, 肝素抗凝, 淋巴细胞分离液分离淋巴细胞层, PBS 洗涤后用 RPMI1640 重悬。将淋巴细胞悬液置于 24 孔培养板中, 每孔加入 2×10^6 细胞, 加入 PMA (终浓度 50 ng/ml)、Ionomycin (终浓度 1 μ g/ml) 及 Monensin (终浓度 2 mmol/L), 加 RPMI1640 至 1 ml; 置 37 $^{\circ}$ C、50 ml/L CO₂ 培养箱中培养 4 h 后收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入 FITC 标记的 anti-mouse CD3、PE 标记的

anti-mouse CD4 4° C 避光孵育 30 min。洗涤 2 次后加入固定液 100 ml 4° C 固定 15 min 后, 加入破膜液 4° C 孵育 15 min, 洗涤 2 次后每管分为 3 份分别加入 APC 标记的 anti-mouse IFN- γ 、IL-4、IL-17A 4° C 避光孵育 30 min。洗涤 2 次后上流式细胞仪检测, 以 CD4⁺IFN- γ ⁺、CD4⁺IL-4⁺、CD4⁺IL-17A⁺ 细胞占 CD3 阳性细胞比例进行分析。

1.4 检测血清中 IFN- γ 、IL-4、IL-17A 的浓度 第 7 天采集受鼠眼球血, 室温静置 1 h, 2 000 r/min 离心 10 min 后分离血清, 按照 ELISA 试剂盒说明检测血清中 IFN- γ 、IL-4、IL-17A 的浓度。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用方差分析检测组间的总差异。所有实验重复 3 次以上。

2 结果

2.1 移植小鼠 aGVHD 的发生情况 小鼠死亡时白细胞 (white blood cell, WBC) $< 0.5 \times 10^9$ /L 为移植失败; WBC $\geq 0.5 \times 10^9$ /L 并有弓背、翘毛、脱毛、腹泻及体重减轻等表现者为 aGVHD 征象。单纯照射小鼠在 5 d 内全部死亡, 死亡前 WBC $< 0.5 \times 10^9$ /L, 说明为清髓性预处理方案。移植对照组小鼠于移植后第 6 天开始出现倦怠、消瘦、食欲下降、皮毛紊乱、无光泽、弓背, 1/2 小鼠出现皮肤溃疡、腹泻表现, 14 d 内全部死亡 (死亡前 WBC $> 0.5 \times 10^9$ /L), 平均存活时间为 11 d。移植 + 硼替佐米组小鼠有 16 只出现倦怠、体重下降、弓背、翘毛、腹泻等 aGVHD 表现, 但较移植对照组减轻, 40% 于 TBI 后 14 d 死于 aGVHD, 60 d 时生存率为 60%。

2.2 嵌合度检测 应用流式细胞术随机检测移植 + 硼替佐米组 2 只存活受鼠 30 d 骨髓中 H-2b + 细胞的百分率, 结果显示嵌合度在 95% 以上, 表明移植成功 (图 1)。

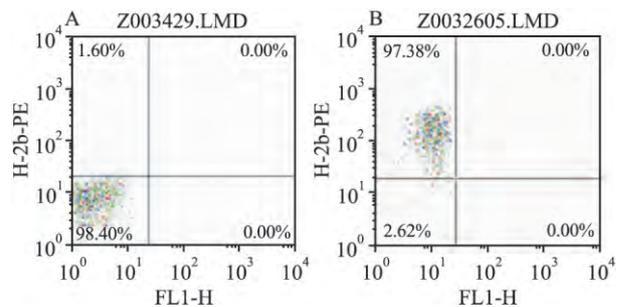


图 1 移植后 H-2b 细胞表达率与正常 BALB/c 小鼠比较
A: 正常 BALB/c 小鼠; B: 移植 30 d BALB/c 小鼠

2.3 外周血 Th1/Th2/Th17 细胞亚群分化比率变化 3组小鼠外周血 Th1/Th2/Th17 细胞亚群分化比率变化见表1。移植对照组小鼠 Th1/Th17 细胞亚群明显升高 ($P < 0.01$) ,Th2 细胞亚群比例降低 ($P < 0.01$) 。移植 + 硼替佐米组小鼠 Th1/Th17 细胞亚群比例较移植对照组减少 ,但仍高于正常对照组 ($P < 0.05$) ,Th2 细胞亚群比例上升 ,与正常对照组差异无统计学意义(图2)。

2.4 小鼠细胞因子水平测定 移植对照组小鼠血清 IFN- γ 和 IL-17A 水平明显升高 ($P < 0.01$) ,IL-4

水平显著降低 ($P < 0.01$) 。移植 + 硼替佐米组小鼠血清 IFN- γ 和 IL-17A 水平较移植对照组降低 ,但仍高于正常对照组 ($P < 0.05$) ,IL-4 水平上升 ,低于正常对照组 ($P < 0.05$) 。见表2。

表1 3组小鼠外周血 Th1/Th2/Th17 细胞亚群分化 ($\bar{x} \pm s$)

项目	正常对照组	移植对照组	移植 + 硼替佐米组	F 值
Th1	1.82 \pm 0.49	4.21 \pm 0.56 **	2.65 \pm 0.52*	32.57
Th2	2.73 \pm 0.82	1.37 \pm 0.34 **	2.56 \pm 0.53	9.24
Th17	2.03 \pm 0.71	4.52 \pm 0.54 **	3.09 \pm 0.65*	23.14

与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

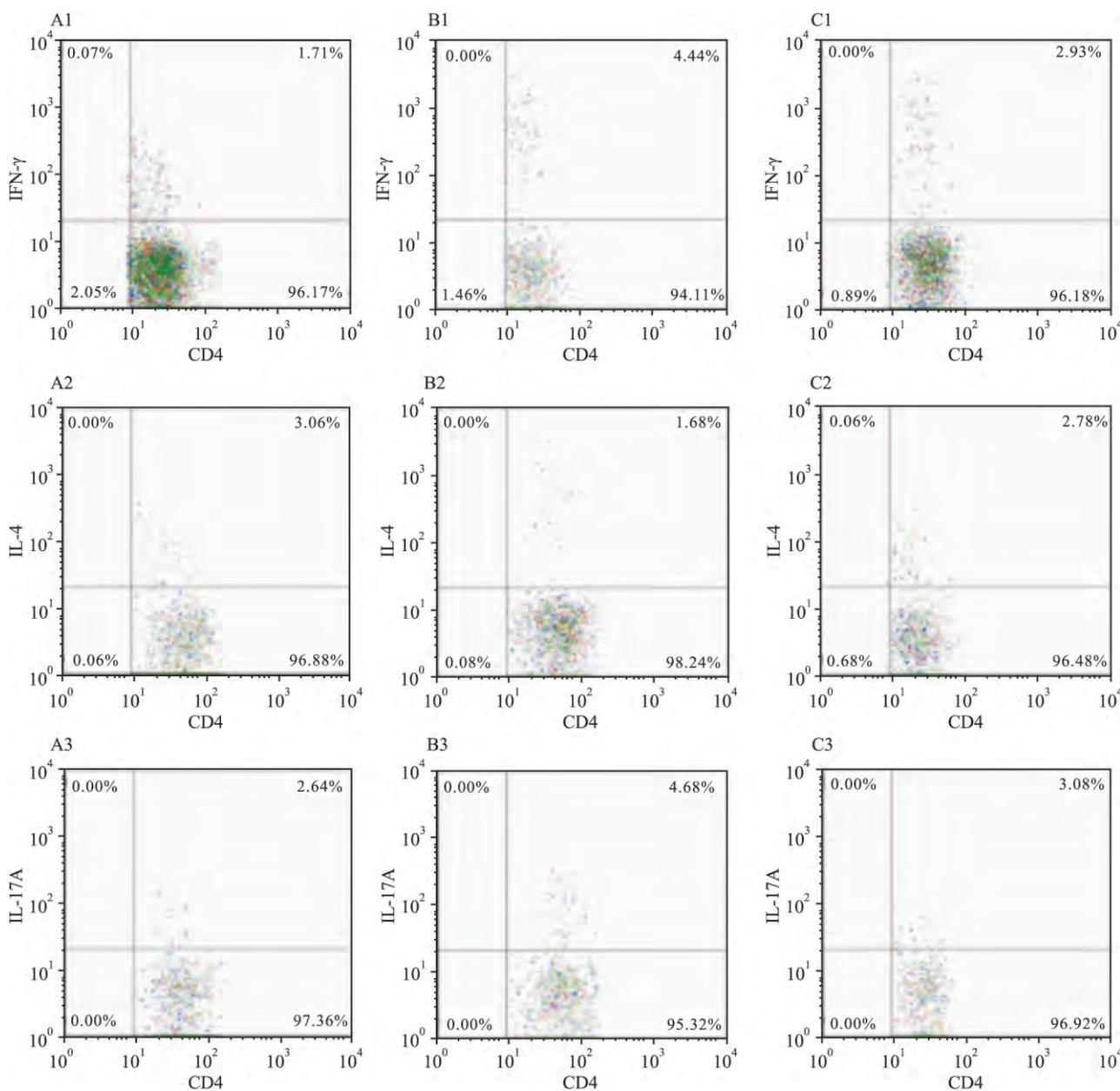


图2 流式细胞术检测3组小鼠外周血 Th1/Th2/Th17 细胞比例

A: 正常对照组; B: 移植对照组; C: 移植 + 硼替佐米组; 1: IFN- γ ; 2: IL-4; 3: IL-17A; Th1 细胞: CD4⁺ IFN- γ ⁺; Th2 细胞: CD4⁺ IL-4⁺; Th17 细胞: CD4⁺ IL-17A⁺

表 2 3 组小鼠血清中 IFN- γ 、IL-4、IL-17A 的水平($\bar{x} \pm s$)

项目	正常对照组	移植对照组	移植 + 硼替佐米组	F 值
IFN- γ (pg/ml)	158.93 \pm 52.91	630.24 \pm 67.63 **	451.28 \pm 71.59*	81.32
IL-4(pg/ml)	230.64 \pm 54.36	124.67 \pm 38.42 **	190.58 \pm 55.34*	6.88
IL-17A(pg/ml)	210.98 \pm 34.96	365.17 \pm 45.63 **	259.42 \pm 51.38*	18.83

与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

aGVHD 的组织损伤是由供者的 T 细胞识别受者不同组织相容性抗原所介导的细胞毒作用引起, 而 Th 细胞产生和释放的细胞因子参与了 aGVHD 的发生, 因此 Antin^[6] 提出了“细胞因子风暴”学说。一般认为, T 前体细胞在抗原的刺激下, 在不同的微环境中, 可选择性分化为 Th1、Th2、Th17 和 Treg 等细胞^[7]。早期的研究^[8] 显示, Th1 类细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 等促进 aGVHD 的发生, 而 Th2 类细胞因子能抑制 IFN- γ 的分泌, 减轻 aGVHD。最近的研究^[9-10] 表明, Th17 细胞产生的细胞因子 IL-17 也参与了 aGVHD 的发生、发展。小鼠动物实验研究^[11] 显示, Th17 细胞产生的 IL-17 可以引起小鼠肺和皮肤组织严重的 GVHD。若对宿主组织器官予以保护, 可以减轻宿主组织器官炎性细胞因子的过度分泌, 使 allo-BMT 后 Th1/Th2/Th17 类细胞因子的产生趋于平衡, 从而改善 aGVHD^[12]。

硼替佐米是哺乳动物细胞中 26S 蛋白酶体糜蛋白酶样活性的可逆抑制剂, 在临床上用于治疗多发性骨髓瘤和某些恶性淋巴瘤患者, 已经取得了良好的疗效, 其作用机制与抑制 NF- κ B 的活性有关^[2]。而 NF- κ B 是 T 细胞活化过程中至关重要的信号分子, NF- κ B 经分子信号转导进入细胞核内, 可以调节下游目的基因的表达, 从而调控 T 细胞活化。鉴于 aGVHD 发生过程中自身反应性 T 细胞的异常活化以及 NF- κ B 在 T 细胞活化过程中的作用, 故硼替佐米有可能在 aGVHD 的治疗过程中发挥作用。前期的研究^[13] 表明, 硼替佐米可抑制骨髓移植清髓照射小鼠预处理损伤所致肝脏及小肠组织中 NF- κ B 的表达与激活。但硼替佐米对移植小鼠 Th 细胞亚群分化及其主要的效应性细胞因子的分泌的影响目前尚未有报道。

本研究结果显示, 移植对照组小鼠移植后第 7 天外周血 Th1 和 Th17 细胞比例明显上升, 而 Th2 细胞比例下降, 同时血清中 IFN- γ 和 IL-17A 水平也明显上升, IL-4 水平显著降低, 与文献^[8-9] 报道一致,

说明 Th 细胞及其分泌的细胞因子参与了 aGVHD 的发生、发展。本研究进一步显示, 移植后第 3 天输注硼替佐米后, 小鼠外周血中 Th1 和 Th17 细胞比例较移植对照组显著下降, Th2 细胞亚群比例上升, 与正常对照组差异无统计学意义, 与此同时血清中 IFN- γ 和 IL-17A 水平较移植对照组降低, IL-4 水平升高, aGVHD 症状明显减轻, 平均生存时间较移植对照组显著延长, 这说明硼替佐米的应用可能使移植后小鼠 Th 细胞及其分泌的细胞因子的产生发生改变, 从而减轻了 aGVHD 症状, 延长了生存时间。因此, 硼替佐米应用后降低相关细胞因子的水平从另一方面说明将其应用于 aGVHD 的防治是可能的。

综上所述, 硼替佐米有明显的抗小鼠 aGVHD 作用, 这与其降低 Th1/Th17 细胞及其相关细胞因子比例, 提升 Th2 细胞及其相关细胞因子比例有关, 提示硼替佐米在防治 aGVHD 方面有明显的应用前景。

参考文献

- [1] Martin P J, Rizzo J D, Wingard J R, et al. First-and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2012, 18 (8): 1150-63.
- [2] Sunwoo J B, Chen Z, Dong G, et al. Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth and angiogenesis in squamous cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7 (5): 1419-28.
- [3] Fulton L M, Taylor N A, Coghill J M, et al. Altered T-cell entry and egress in the absence of Coronin 1A attenuates murine acute graft versus host disease [J]. Eur J Immunol, 2014, 44 (6): 1662-71.
- [4] Sun K, Wilkins D E, Anver M R, et al. Differential effects of proteasome inhibition by bortezomib on murine acute graft-versus-host disease (GVHD): delayed administration of bortezomib results in increased GVHD-dependent gastrointestinal toxicity [J]. Blood, 2005, 106 (9): 3293-9.
- [5] 李振宇, 吴圣豪, 徐开林, 等. 硼替佐米对小鼠急性移植植物宿主病作用及其机制的研究 [J]. 中华血液学杂志, 2009, 30 (6): 399-403.

- [6] Antin J H. T-cell depletion in GVHD: less is more [J]. *Blood*, 2011, 117 (23): 6061-2.
- [7] Raphael I, Nalawade S, Eagar T N, et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases [J]. *Cytokine*, 2015, 74 (1): 5-17.
- [8] Henden A S, Hill G R. Cytokines in graft-versus-host disease [J]. *J Immunol*, 2015, 194 (10): 4604-12.
- [9] Serody J S, Hill G R. The IL-17 differentiation pathway and its role in transplant outcome [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012, 18 (1 Suppl): S56-61.
- [10] 王静, 王兴兵, 汪健, 等. GVHD患者外周血 Th17/Treg 细胞相关的细胞因子检测与临床意义 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(2): 422-6.
- [11] Carlson M J, West M L, Coghill J M, et al. *In vitro*-differentiated Th17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations [J]. *Blood*, 2009, 113 (6): 1365-74.
- [12] Toubai T, Tanaka J, Paczesny S, et al. Role of cytokines in the pathophysiology of acute graft-versus-host disease (GVHD): are serum/plasma cytokines potential biomarkers for diagnosis of acute GVHD following allogeneic hematopoietic cell transplantation (Allo-HCT) [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2012, 7 (3): 229-39.
- [13] 陆跃武, 耿华云, 盖灿, 等. 硼替佐米对骨髓移植清髓照射小鼠肝及小肠内 NF- κ B 表达的影响 [J]. *安徽医药*, 2013, 17 (5): 747-9.

Effects of bortezomib on the polarization of Th1/Th2/Th17 cells after bone marrow transplantation in mice

Wang Yongqing, Li Qingsheng, Wu Wei, et al

(Dept of Hematology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the possible role of bortezomib on the polarization of Th1/Th2/Th17 cells and the expression of IFN- γ , IL-4 and IL-17A in mice with acute graft versus host disease (aGVHD). **Methods** To establish the animal model of mouse aGVHD, mice were randomly divided into 3 groups: normal control group, transplantation control group, transplantation and early injection bortezomib group. The survival time, clinical manifestations of aGVHD and levels of recipients H-2b cells detected by flow cytometry in the recipient mice were observed. The percentages of Th1, Th2 and Th17 cells in T lymphocytes of peripheral blood were measured by flow cytometry. Double antibody sandwich ELISA was employed to detect the levels of IFN- γ , IL-4 and IL-17A in serum. **Results** The mice in transplantation control group appeared typical symptoms of aGVHD and all died of aGVHD within 2 weeks after transplantation, and the mean survival time was 11 days. The symptoms of aGVHD was milder in transplantation and early injection bortezomib group than transplantation control group, and the median survival time was significantly longer. The 60 d survival rate was 60%. The mice in transplantation control group, the peripheral blood Th1 and Th17 cells subsets proportion was significantly increased ($P < 0.01$) and Th2 cells subsets reduced ($P < 0.01$). After injection bortezomib, the peripheral blood Th1 and Th17 cells subsets proportion was reduced, but still higher than the normal control group ($P < 0.05$), Th2 cell subsets increased, there was no difference between with normal control. The mice in transplantation control group, higher levels of IFN- γ and IL-17A also found in serum and the concentrations of IL-4 reduced ($P < 0.01$). After injection bortezomib, levels of IFN- γ and IL-17A decreased significantly, but still higher than the normal control group ($P < 0.05$), levels of IL-4 increased, but still lower than normal control ($P < 0.05$). **Conclusion** Bortezomib administered immediately after bone marrow transplantation can prevent aGVHD, improve the survival rate. Its mechanism maybe down-regulate the expression of Th1 and Th17 cells differentiation and the ratio of IFN- γ and IL-17A.

Key words bortezomib; murine; acute graft-versus-host disease; Th1 cells; Th2 cells; Th17 cells