

骨髓间充质干细胞对实验性自身免疫性重症肌无力大鼠的治疗作用

付裕 滕银燕 徐朝伟 张旭

【摘要】 目的 探讨骨髓间充质干细胞对实验性自身免疫性重症肌无力大鼠模型的治疗作用及其可能机制。方法 全骨髓贴壁筛选法分离培养 Lewis 大鼠骨髓间充质干细胞,流式细胞术检测其表面分子 CD34、CD44 的表达。经 Lewis 大鼠尾静脉注射经体外培养至第 3 代的骨髓间充质干细胞,7 d 后腹腔注射抗乙酰胆碱受体单克隆抗体(mAb35)建立实验性自身免疫性重症肌无力动物模型,按照 Lennon 评分标准进行临床症状评分、Western blotting 法检测肌肉组织中乙酰胆碱受体蛋白表达、流式细胞术检测外周血 CD4⁺CD25⁺ T 细胞比率、酶联免疫吸附试验检测血清转化生长因子- β 、干扰素- γ 和 IL-4 表达变化。结果 与生理盐水对照组相比,注射骨髓间充质干细胞的实验性自身免疫性重症肌无力大鼠模型临床评分降低($t = 8.062, P = 0.000$),乙酰胆碱受体 α 蛋白表达水平升高($t = 8.092, P = 0.000$);同时血清转化生长因子- β 表达水平升高($t = 9.859, P = 0.000$),干扰素- γ ($t = 9.040, P = 0.000$)和 IL-4($t = 3.320, P = 0.004$)表达水平降低,两组之间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 骨髓间充质干细胞能够显著减轻实验性自身免疫性重症肌无力大鼠模型临床症状,减少乙酰胆碱受体缺失。其作用机制可能与分泌免疫抑制性细胞因子转化生长因子- β 上调 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞表达水平,以及抑制炎症促进因子干扰素- γ 和 IL-4 的分泌有关。

【关键词】 重症肌无力,自身免疫性,实验; 间质干细胞移植; 印迹法,蛋白质; 骨髓移植; 流式细胞术

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2012.02.014

The effect of bone marrow stem cells on the treatment of experimental autoimmune myasthenia gravis rat

FU Yu, TENG Yin-yan, XU Chao-wei, ZHANG Xu

Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

Corresponding author: ZHANG Xu (Email: drzhangxu@gmail.com)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of bone marrow stem cells (BMSCs) on the treatment of experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) and the possible pathogenesis. **Methods** BMSCs were obtained from Lewis rat bone marrow selected by cell attachment, cultured and proliferated in vitro. The expression of surface molecules of CD34 and CD44 was analyzed by flow cytometry. The Lewis rats were divided randomly into group A and group B. The rats in group A were transplanted with the third passage BMSCs, and the rats in group B were injected with physiological saline. Seven days after injection, the rat model of EAMG was established by injecting mAb35 to rats in both groups. Clinical signs and symptoms were assessed with Lennon score. Western blotting method was used to determine the expression of acetylcholine receptor (AChR) protein. The CD4⁺CD25⁺ Treg cell ratio was analyzed by flow cytometry. Plasma TGF- β , IFN- γ and IL-4 expressions were detected by ELISA. **Results** The clinical scores of rats treated with BMSCs were significantly lower than those untreated ($t = 8.062, P = 0.000$). In comparison with group B, the expression levels of AChR protein ($t = 8.092, P = 0.000$) and TGF- β ($t = 9.859, P = 0.000$) in group A were all higher, while IFN- γ ($t = 9.040, P = 0.000$) and IL-4 ($t = 3.320, P = 0.004$) were all lower in group A. **Conclusion** Transplantation with BMSCs can relieve the

基金项目:浙江省科技厅基金资助项目(项目编号:2006C33008)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院神经内科

通讯作者:张旭(Email:drzhangxu@gmail.com)

clinical syndrome of EAMG and reduce the lost of AChR by promoting the level of TGF- β , up regulating the expression of CD4⁺CD25⁺ Treg cell ratio, and suppressing IFN- γ and IL-4.

【Key words】 Myasthenia gravis, autoimmune, experimental; Mesenchymal stem cell transplantation; Blotting, western; Bone marrow transplantation; Flow cytometry

Fund Project: Science Technology Department of Zhejiang Province (No. 2006C33008)

重症肌无力(MG)是由乙酰胆碱受体抗体(AChRab)破坏突触后膜运动终板上的乙酰胆碱受体(AChR),导致AChR分子大量丢失,出现肌无力症状的自身免疫性疾病,由抗体介导的体液免疫和T细胞介导的细胞免疫异常是其主要的发病机制之一^[1]。通过被动注射乙酰胆碱受体抗体可建立实验性自身免疫性重症肌无力(EAMG)动物模型,该模型起病迅速、发病率高且易于评价,是研究重症肌无力的理想动物模型。骨髓间充质干细胞(BMSCs)为一类具有自我更新和多向分化潜能的成体干细胞,容易在体外分离培养,免疫原性弱、体内移植不良反应少^[2],具有负性免疫调节特性,免疫排斥反应低,可用于治疗自身免疫性疾病^[3]。在本实验中,我们采用经大鼠尾静脉注射骨髓间充质干细胞的方法,诱导EAMG,以探讨骨髓间充质干细胞对EAMG的治疗作用及其可能机制。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物 清洁级(SPF)健康雌性Lewis大鼠22只,6~8周龄,体质量140~160g,平均(149±5.47)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。实验前于温度25℃、湿度60%~70%的清洁环境下饲养。

2. 主要试剂 DMEM/F12培养基、DMEM培养基、胎牛血清(FBS)均购自美国Gibco公司。抗乙酰胆碱受体单克隆抗体(mAb35)杂交瘤细胞株(TIB-175)购自美国ATCC公司。免疫试剂中I抗为异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗大鼠CD4、FITC-小鼠抗大鼠CD34、藻红蛋白(PE)标记的小鼠抗大鼠CD44和PE-小鼠抗大鼠CD25单克隆抗体,购自美国Becton Dickinson(BD)公司;转化生长因子- β (TGF- β)、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-4(IL-4)ELISA检测试剂盒由深圳晶美生物工程有限公司提供;抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(1:500)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗大鼠IgG II抗(1:1000)购自上海碧云天生物技术公司。

3. 主要仪器 OLYMPUS倒置显微镜购自日本Olympus公司。超净工作台为苏州安泰空气技术有限公司产品。细胞培养恒温箱由美国Thermo Scientific公司提供。流式细胞仪购自美国Becton Dickinson(BD)公司。

二、研究方法

1. 骨髓间充质干细胞的分离培养及表面分子检测 采用断颈法处死2只Lewis大鼠,以体积分数为75%乙醇浸泡10min,无菌条件下切取双侧股骨和胫骨,剔除骨表面软组织。剪去骨端,5ml注射器吸取无血清DMEM/F12培养液于培养皿中冲洗骨髓腔,1ml注射器反复吹打形成单细胞悬液,离心半径10cm、1000r/min离心10min,弃上清液,配制成含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12完全培养基重悬细胞,接种于5cm×5cm培养瓶,置于37℃、体积分数为5%二氧化碳饱和湿度培养箱中培养,24h后半量换液、3d后全量换液,以后每间隔2~3d换液1次,培养8~10d待细胞生长达80%~90%融合后,以0.25%胰蛋白酶和0.1mmol/L乙二胺四乙酸(EDTA)1:2消化传代,每天于倒置显微镜下观察细胞形态,直至细胞达80%~90%融合。采集经体外培养至第3代且达80%~90%融合的骨髓间充质干细胞,0.25%胰蛋白酶消化,细胞计数后取2管分别加入FITC-小鼠抗大鼠CD34和PE-小鼠抗大鼠CD44单克隆抗体(I抗),以及相同荧光素标记的同型对照抗体,室温下避光孵育15min,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后行流式细胞仪检测。

2. 实验性自身免疫性重症肌无力模型的建立和行为学评价 (1)骨髓间充质干细胞移植:取经体外培养至第3代的骨髓间充质干细胞,调整细胞浓度至 1×10^7 /ml。20只Lewis大鼠按随机数字表法分为A、B两组,每组10只,A组大鼠经尾静脉注射1ml骨髓间充质干细胞细胞悬液,B组则注射等量生理盐水。(2)抗体制备:将抗乙酰胆碱受体单克隆抗体杂交瘤细胞株置于含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基中培养,每隔3d更换培养基,收集细胞培养上清液,以体积分数为45%的硫酸铵盐析,

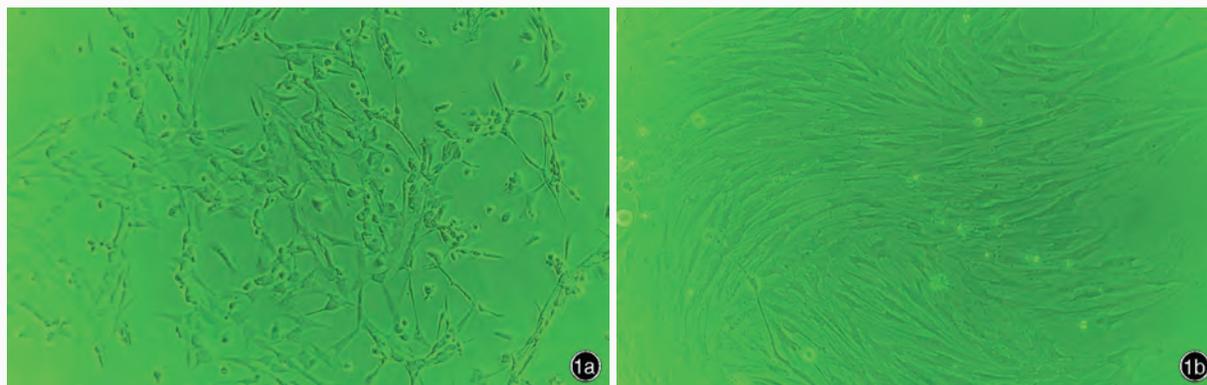


图1 于体外培养的骨髓间充质干细胞的形态观察 倒置显微镜 $\times 200$ 1a 原代培养至第10天的骨髓间充质干细胞呈长梭形或多角形,达80%~90%融合 1b 经体外培养至第3代的骨髓间充质干细胞呈长梭形,形态均一,呈漩涡状生长

Figure 1 Cytomorphology of BMSCs in vitro Inverted microscope $\times 200$. 10 days primary cultured BMSCs present long fusiform or polygonal in shape with 80%~90% confluence (Panel 1a). The 3rd passage BMSCs are homogeneously long fusiform in shape and present helicoid in growth (Panel 1b)

置4℃冰箱中磷酸盐缓冲液透析过夜,制成40倍浓缩抗体,-20℃冻存备用。(3)模型制备及行为学评价:骨髓间充质干细胞悬液注射第7天,两组大鼠均经腹腔注射5ml浓缩杂交瘤细胞培养上清液,诱导产生EAMG,每8h测量大鼠体质量,并观察其毛色、步态及摄食情况,按照Lennon临床评分标准^[4]评价大鼠行为学变化。0分,无明确肌无力表现;1分,日常活动轻度减少,撕、咬、抓、握无力,易疲劳;2分,日常活动明显减少,体质量明显下降,休息时身体呈隆起姿势,头尾下垂,前肢趾屈曲,行走不稳,震颤;3分,重度全身无力,无抓握、撕咬动作,呼吸困难,濒死状态;4分,死亡。

3. Western blotting法检测AChR α 蛋白表达水平 (1)检测方法:EAMG模型诱导48h后断颈处死,切取大鼠腓肠肌肌肉组织,液氮研磨,滴加冰预冷蛋白质裂解液匀浆,冰上放置30min,4℃、离心半径10cm、12000r/min高速离心20min,取上清液,二辛可酸(BCA)法检测蛋白质表达水平。取100 μ g总蛋白沸水中煮5min进行变性,120g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳,300mA恒湿法电转移55min至0.20 μ m聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,以体积分数为5%脱脂奶粉室温封闭2h,然后将杂交瘤细胞培养上清液(I抗)4℃摇床过夜,以TBST(含Tween20的Tris-HCl缓冲液)洗膜10min($\times 3$ 次),HRP标记的山羊抗大鼠IgG(1:1000,II抗)于室温孵育2h,TBST洗膜10min($\times 3$ 次),ECL显色液显色5min,暗室中曝光、显影、定影。(2)结果判断:Quantity One软件(美国Bio-Rad公司)分析不同电泳条带光密度值(OD值),GAPDH(1:1000)作为内参照物。结果以

目的条带OD值与同一标本GAPDH蛋白OD值之比作为标准进行判断。

4. 细胞免疫和体液免疫检测 (1)流式细胞术检测CD4⁺CD25⁺T细胞表达变化:EAMG模型诱导48h后采集大鼠外周血,分离外周血淋巴细胞,磷酸盐缓冲液洗涤,调整细胞密度至 1×10^7 /ml,滴加经稀释的由FITC标记的CD4和PE标记的CD25单克隆抗体,并行流式细胞术检测。(2)ELISA法检测细胞因子表达变化:EAMG模型诱导48h后采集大鼠外周血,分离血清,分别检测TGF- β 、IFN- γ 和IL-4表达水平。实验步骤严格按照试剂盒说明书进行,于酶标仪波长为450nm处读取A值。

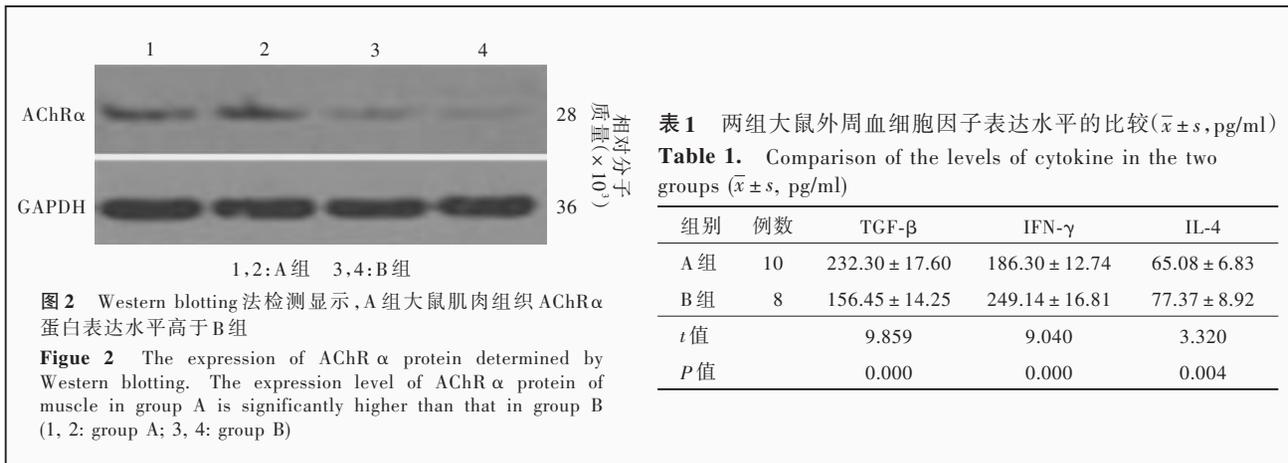
5. 统计分析方法 所有实验数据均经SPSS 17.0软件进行计算与分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同处理组间的比较采用两独立样本均数的t检验。统计推断的检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

一、骨髓间充质干细胞组织形态学特征

1. 形态学观察 在培养初期,可见大量圆形悬浮细胞;24h后呈散在椭圆形和梭形贴壁细胞,经多次换液后,悬浮细胞逐渐消失;经体外培养至第7天时细胞融合成单层,梭形和多角形细胞增多并呈集落生长,逐渐融合成片;第8~10天细胞达80%~90%融合,培养至第3代,每隔3d传代1次,以后细胞逐渐纯化,细胞形态变得均一,多为细长梭形,分布均匀(图1)。

2. 表面分子检测 流式细胞术检测显示,经体外培养至第3代的骨髓间充质干细胞CD44表达阳



性率约为 96.50%, CD34 阳性率为 1.30%。

二、实验性自身免疫性重症肌无力模型评价

经抗乙酰胆碱受体单克隆抗体浓缩杂交瘤细胞培养液诱导 48 h 后, 除 B 组 2 只大鼠因严重呼吸肌无力死亡外, 其余 18 只大鼠均出现不同程度肌无力症状与体征, 表现为日常活动明显减少、低头、弓背姿势, 抓握、悬吊后无力等; A 组大鼠平均临床评分(1.32 \pm 0.28) 低于 B 组(2.46 \pm 0.32), 且组间差异具有统计学意义($t = 8.062, P = 0.000$)。

三、抗乙酰胆碱受体抗体 α 蛋白表达变化

Western blotting 法检测显示, AChR α 蛋白相对分子质量为 28×10^3 , 内参照蛋白 GAPDH 相对分子质量为 36×10^3 (图 2)。A、B 两组大鼠肌肉组织 AChR α 蛋白与 GAPDH 蛋白 OD 值比值分别为 0.3155 ± 0.047 和 0.1577 ± 0.032 , A 组表达水平明显升高, 组间差异有统计学意义($t = 8.092, P = 0.000$)。

四、免疫学检测

1. 外周血 CD4⁺CD25⁺ T 细胞检测 经抗乙酰胆碱受体单克隆抗体浓缩杂交瘤细胞培养液诱导 48 h 后, 采集大鼠外周血并分离单个核细胞, 经流式细胞术检测显示 A 组大鼠外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞阳性表达率为 (3.52 \pm 0.65)%, 明显高于 B 组(1.40 \pm 0.19)%, 组间差异具有统计学意义($t = 8.878, P = 0.000$)。

2. 细胞因子表达变化 经抗乙酰胆碱受体单克隆抗体浓缩杂交瘤细胞培养液诱导 48 h 后, 检测两组大鼠外周血各项细胞因子水平。与 B 组相比, A 组大鼠外周血 TGF- β 表达水平显著升高($t = 9.859, P = 0.000$); IFN- γ ($t = 9.040, P = 0.000$) 和 IL-4 ($t = 3.320, P = 0.004$) 表达水平降低(均 $P < 0.01$, 表 1)。

讨 论

重症肌无力是由 B 细胞介导、T 细胞依赖和补体参与的神经系统自身免疫性疾病, AChR 蓄积于神经肌肉接头处导致其大量缺失, 神经递质传递障碍, 而位于神经肌肉接头处的烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR) 作为自身抗原诱发了这一病理反应^[1]。nAChR 由 4 类共 5 个亚基($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 β 、 γ 和 δ) 构成, 其中 α 亚基约占 nAChR 分子的 40%, 在功能上起着决定性的作用^[5]。目前国内对重症肌无力的治疗主要采用非特异性免疫抑制治疗^[6-7], 不良作用明显, 停药后极易复发, 不能从根本上解决 T 细胞和 B 细胞免疫功能的异常, 因此寻找一种能够下调特异性自身免疫反应的治疗方法成为近年来研究的热点。mAb35 为 AChR 的一种单克隆抗体, 其成分为大鼠 IgG1, 可直接作用于多种品系乙酰胆碱受体 α 亚单位的主要免疫区肽段, 是建立 EAMG 被动转移模型的理想抗体^[8]。在本实验中, 我们采用 mAb35 腹腔注射诱导建立 Lewis 大鼠 EAMG 模型, 该模型起病迅速, 发病率高且易于评价, 免疫病理学研究显示乙酰胆碱受体特异性破坏, 是进一步研究人类重症肌无力的理想工具。

有研究显示, 自体干细胞移植能使 EAMG 大鼠的血清抗 AChR 抗体水平明显下降^[9], 为自身免疫性疾病的治疗提供了良好的思路。骨髓间充质干细胞为一类具有自我更新和多向分化潜能的成体干细胞, 可以抑制 T 细胞的反应性, 通过直接接触或分泌 TGF- β 等具有免疫抑制作用的细胞因子发挥免疫调节作用^[10-12]。我们采用全骨髓贴壁筛选方法分离培养骨髓间充质干细胞, 取经体外培养至第 3 代

的骨髓间充质干细胞进行表面分子表达检测,结果显示:CD44 表达阳性、CD34 表达阴性,符合干细胞表型特点;与生理盐水组大鼠相比,注射骨髓间充质干细胞的 EAMG 大鼠的临床评分显著降低($P < 0.01$),乙酰胆碱受体 α 蛋白和免疫抑制细胞因子 TGF- β 表达水平显著升高(均 $P < 0.01$)。提示:骨髓间充质干细胞能够通过免疫调节作用治疗重症肌无力,并可调控乙酰胆碱受体特异性 T 细胞的免疫应答反应。

CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞是一类具有免疫抑制作用的 T 细胞,在体外可有效地抑制抗原特异性 T 细胞激活,抑制 CD4⁺T 细胞诱导的器官特异性自身免疫性疾病^[13]。重症肌无力患者外周血存在比例异常的 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞^[14],使自身反应性 CD4⁺T 细胞被大量激活,辅助 B 细胞产生自身抗体,但当机体能够产生足量的 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞对抗自身反应性 T 细胞时,重症肌无力病情即可趋于稳定甚至缓解^[15]。本实验结果显示,与生理盐水组大鼠相比,注射骨髓间充质干细胞的大鼠外周血 TGF- β 分泌增多,从而抑制了 B 细胞的功能,同时亦抑制了抗原特异性 T 细胞的增殖,使外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞表达水平明显上调($P < 0.01$),拮抗 IFN- γ 和 IL-4 等具有免疫增强活性细胞因子的功能,使 IFN- γ 和 IL-4 分泌水平降低($P < 0.01$),致病性抗体减少、补体介导的溶膜作用减轻,继而使实验性自身免疫性重症肌无力大鼠的临床肌无力症状得到明显改善。虽然,本研究结果表明骨髓间充质干细胞治疗实验性自身免疫性重症肌无力大鼠有效,但将干细胞治疗重症肌无力应用于临床,尚需更多研究结果的验证。

参 考 文 献

- [1] Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol*, 2009, 8:475-490.
- [2] Chanda D, Isayeva T, Kumar S, et al. Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in prostate cancer bone metastasis. *Clin Cancer Res*, 2009, 15:7175-7185.
- [3] Nasef A, Ashammakhi N, Fouillard L. Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms. *Regen Med*, 2008, 3:531-546.
- [4] Gomez AM, Vrolix K, Martínez-Martínez P, et al. Proteasome inhibition with bortezomib depletes plasma cells and autoantibodies in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol*, 2011, 186:2503-2513.
- [5] Luo J, Taylor P, Losen M, et al. Main immunogenic region structure promotes binding of conformation - dependent myasthenia gravis autoantibodies, nicotinic acetylcholine receptor conformation maturation, and agonist sensitivity. *J Neurosci*, 2009, 29:13898-13908.
- [6] Li XH, Cheng Y, Yang L. Progress in the research of immunoadsorption therapy for myasthenia gravis. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2007, 7:458-460. [李秀华, 程焱, 杨丽. 免疫吸附法治疗重症肌无力的研究进展. *中国现代神经疾病杂志*, 2007, 7:458-460.]
- [7] Hua L, Wang LL, Liu YZ, et al. Therapeutic effectiveness of high dose intravenous immunoglobulin for the treatment of myasthenia gravis. 2006, 6:148-150. [华玲, 王利力, 刘玉楨, 等. 大剂量免疫球蛋白静脉注射治疗重症肌无力的疗效观察. *中国现代神经疾病杂志*, 2006, 6:148-150.]
- [8] Poulas K, Tsouloufis T, Tzartos SJ. Treatment of passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis using papain. *Clin Exp Immunol*, 2000, 120:363-368.
- [9] Levinson AI, Wheatley LM. The thymus and the pathogenesis of myasthenia gravis. *Clin Immunol Immunopathol*, 1996, 78:1-5.
- [10] Chen PM, Yen ML, Liu KJ, et al. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*, 2011, 18:49.
- [11] Hematti P. Role of mesenchymal stromal cells in solid organ transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*, 2008, 22:262-273.
- [12] Deng QJ, Zhang JN, Wang ZT, et al. Study on multi-oriented differentiation potential of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2007, 7:521-526. [邓全军, 张建宁, 王志涛, 等. 体外大鼠骨髓间充质干细胞多向分化潜能的研究. *中国现代神经疾病杂志*, 2007, 7:521-526.]
- [13] Vargas - Rojas MI, Crispin JC, Richaud - Patin Y, et al. Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus*, 2008, 17:289-294.
- [14] Zhang Y, Wang HB, Chi LJ, et al. The role of FoxP3+CD4+CD25hi Tregs in the pathogenesis of myasthenia gravis. *Immunol Lett*, 2009, 122:52-57.
- [15] Liu R, La Cava A, Bai XF, et al. Cooperation of invariant NKT cells and CD4+CD25+ T regulatory cells in the prevention of autoimmune myasthenia. *J Immunol*, 2005, 175:7898-7904.

(收稿日期:2012-02-17)

· 小词典 ·

中英文对照名词词汇(七)

辛伐他汀与干扰素- β 1a 联合治疗复发-缓解型
多发性硬化研究

Simvastation as add-on Therapy to Interferon-Beta1a for
Relapsing-remitting Multiple Sclerosis
(SIMCOMBIN study)

I 型神经纤维瘤病 neurofibromatosis type 1(NF1)

性别决定区 Y 基因相关高可变区基因 10
sex-determining region Y-box 10(Sox-10)

血管紧张素转换酶 angiotensin-converting enzyme(ACE)