

碱性成纤维细胞生长因子调节小鼠慢性移植物抗宿主病的作用及其机制

刘一岚, 帅燕蓉, 邓锐, 何光翠, 缪晓娟, 范方毅

(解放军西部战区总医院血液科, 四川 成都 610038)

摘要:目的 分析碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)调节小鼠慢性移植物抗宿主病(cGVHD)的作用及其机制。方法 通过外源性MSC培养传代和分离小鼠脾脏淋巴细胞建立单倍体HSCT后cGVHD的小鼠模型,将实验设立空白对照组($n=12$)、对照组($n=12$)和实验组($n=12$)。空白对照组移植后不采取任何预防cGVHD措施,对照组移植后每只小鼠每天输注20 $\mu\text{g/kg}$ 外源性MSC,实验组移植后每只小鼠每天注射100 $\mu\text{g/kg}$ bFGF,比较三组小鼠生存情况和cGVHD临床表现,采用流式细胞术cGVHD相关免疫细胞检测CD4⁺和CD25⁺细胞水平,采用ELISA酶联免疫细胞因子检测IL-10、IL-12、TGF- β 和TNF- α 水平,观察间充质干细胞培养结果和CD44、CD31表达结果。结果 实验组小鼠生存时间多于空白对照组和对照组,cGVHD临床症状出现时间晚于对照组和空白对照组,且移植后3 d白细胞计数比较,差异无统计学意义($P>0.05$);三组移植后6、9、12、14、15 d白细胞计数,移植后7、14 d cGVHD体重减轻情况,IL-10、IL-12、TNF- β 和TNF- α 水平,CD4⁺和CD25⁺细胞比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。间充质干细胞培养显示,移植后14 d,对照组和空白对照组细胞无法集落和继续生长,而实验组可见大量细胞集落且良好生长,光镜下见细胞呈长梭状且贴壁,细胞核紧密团结。结论 bFGF对cGVHD具有调节作用,其通过促进单倍体HSCT供者来源的间充质干细胞体内增殖,使调节性T细胞、调节性B细胞和骨髓来源的抑制细胞增殖,从而调节cGVHD,延缓其发生。

关键词:碱性成纤维细胞生长因子;慢性移植物抗宿主病;间充质干细胞

中图分类号:R552

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.06.020

文章编号:1006-1959(2021)06-0078-04

Effect Basic Fibroblast Growth Factor Regulates Chronic Graft Versus Host Disease in Mice and Its Mechanism

LIU Yi-lan, SHUAI Yan-rong, DENG Rui, HE Guang-cui, MIAO Xiao-juan, FAN Fang-yi

(Department of Hematology, General Hospital of the Western Theater Command of the PLA, Chengdu 610038, Sichuan, China)

Abstract: Objective To analyze the effect and mechanism of basic fibroblast growth factor (bFGF) in regulating chronic graft-versus-host disease (cGVHD) in mice. Methods A mouse model of cGVHD after haploid HSCT was established by culture and passage of exogenous MSC and isolation of mouse spleen lymphocytes. The experiment was set up as a blank control group ($n=12$), a control group ($n=12$) and an experimental group ($n=12$). After transplantation, the blank control group did not take any measures to prevent cGVHD. After transplantation, each mouse in the control group was infused with 20 $\mu\text{g/kg}$ exogenous MSC per day, and each mouse in the experimental group was injected with 100 $\mu\text{g/kg}$ bFGF per day after transplantation. The survival conditions and clinical manifestations of cGVHD in the three groups of mice were compared, and the levels of CD4⁺ and CD25⁺ cells were detected by flow cytometry cGVHD-related immune cells. ELISA was used to detect the levels of IL-10, IL-12, TGF- β and TNF- α , and observe the results of mesenchymal stem cell culture and the expression of CD44 and CD31. Results The survival time of mice in the experimental group was longer than that of the blank control group and the control group, and the clinical symptoms of cGVHD appeared later than the control group and the blank control group. There was no significant difference in white blood cell counts 3 d after transplantation ($P>0.05$); The white blood cell counts of the three groups at 6, 9, 12, 14, 15 d after transplantation, the weight loss of cGVHD at 7, 14 d after transplantation, the levels of IL-10, IL-12, TNF- β and TNF- α , and the comparison of CD4⁺ and CD25⁺ cells, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The mesenchymal stem cell culture showed that 14 d after transplantation, the control group and blank control group could not colonize and continue to grow, while the experimental group saw a large number of cell colonies and grew well. Under the light microscope, the cells were long spindle-shaped and adherent, and the nuclei were tightly united. Conclusion bFGF has a regulatory effect on cGVHD. It promotes the proliferation of mesenchymal stem cells derived from haploid HSCT donors, and makes regulatory T cells, regulatory B cells and bone marrow-derived suppressor cells proliferate, thereby regulating cGVHD and delaying it occur.

Key words: Basic fibroblast growth factor; Chronic graft versus host disease; Mesenchymal stem cells

异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)是部分遗传性疾病或血液系统恶性肿瘤治疗的主要方式,其可使患者后期出现慢性移植物抗宿主病(chronic graft versus host disease, cGVHD)并发症,对患者生

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题普及应用项目(编号:16PJ013)

作者简介:刘一岚(1983.2-),女,四川眉山人,硕士研究生,主治医师,主要从事白血病及造血干细胞移植研究

通讯作者:范方毅(1981.9-),男,四川隆昌人,博士,副主任医师,主要从事淋巴瘤、多发性骨髓瘤级间充质干细胞研究

活质量造成影响,严重者可导致非复发死亡^[1]。近年来移植供应源主要为外周血干细胞和非血缘供者,加之受者年龄上限提高,cGVHD发病率呈逐年上升趋势^[2,3],因此明确cGVHD发病机制尤为重要。随着发病机制研究不断深入,发现B细胞受体相关的信号通路和B淋巴细胞活化与cGVHD相关,间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是与之相关的治疗方法,其为一群多功能细胞,具有多向分化潜能和自我更新能力,在造血干细胞移植后具有调节免

疫级组织修复作用,其作用机制尚不完全明确,但可知与调节性 T 细胞和 B 细胞有关。目前 MSC 来源主要为骨髓或脐带血体外传代培养,具有一定临床疗效,但需要经过多次输注^[4,5]。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)也为多功能因子,在增殖 MSC 方面具有关键作用^[6]。本研究通过建立单倍体 HSCT 后 cGVHD 的小鼠模型,分析 bFGF 调节小鼠 cGVHD 的作用及其机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 建立单倍体 HSCT 后 cGVHD 的小鼠模型 购买 8~10 周龄雌性 C57BL/6 共 36 只,实验分组:空白对照组、外源性 MSC 治疗组和 bFGF 治疗组,每组 12 只。所有动物均在无菌恒温恒湿条件下饲养。各组老鼠均给予 Co605.5 Gy 全身照射的预处理,其次经腹腔输注供体小鼠 10×10^7 个脾细胞/只,空白对照组输注 0.5 ml RPMI1640 培养液。

1.2 流式细胞术 cGVHD 相关免疫细胞检测 将获得的淋巴细胞浓度调 $1 \times 10^5/100 \mu\text{l}$,吸取 $100 \mu\text{l}$ 细胞悬液至流式检测管中行抗体孵育,调节性 T 细胞表型以 CD4、CD25 标记,4 °C 条件下孵育 30 min。孵育完毕后样品给予 PBS 清洗以去除多余抗体,重悬于 $200 \mu\text{l}$ PBS 液中上机检测,细胞收获总数为 1×10^5 ,收获速度 200~300 cells/s,数据由 FlowJo7.6 软件分析完成。

1.3 ELISA 酶联免疫细胞因子检测 血浆层稀释 2~5 倍。包被:用 0.05 mol/L PH9.0 碳酸盐包被缓冲液将抗体稀释至蛋白质含量为 1~10 $\mu\text{g/ml}$ 。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 0.1 ml,4 °C 过夜。次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次,3 min/次。加样:加一定稀释的待检样品 0.1 ml 于上述已包被之反应孔中,置 37 °C 孵育 1 h,然后洗涤,同时做空白孔,阴性对照孔及阳性对照孔。加酶标抗体:于反应孔中,加入新鲜稀释的酶标抗体 0.1 ml。37 °C 孵育 0.5~1 h,洗涤。加底物液显色:各反应孔中加入临时配制的 TMB 底物溶液 0.1 ml,37 °C 10 min。终止反应:于各反应孔中加入 2 mol/L 硫酸 0.05 ml。结果判定:测 O·D 值:在 ELISA 检测仪上,于 450 nm(若以 ABTS 显色,则 410 nm)处,以空白对照孔调零后测各孔 O·D 值,计出相应因子(IL-10、IL-12、TGF- β 、TNF- α)浓度。

1.4 观察指标 比较三组 cGVHD 临床表现和小鼠生存情况、CD4⁺和 CD25⁺细胞,并观察间充质干细胞培养结果。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件包进行数据处理。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用方差分析或 *t* 检验;计数资料以 $[n(\%)]$ 表示,采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠生存情况 空白对照组移植后 10 d 小鼠开始死亡,17 d 内小鼠全部死亡;对照组移植后 13 d 小鼠开始死亡,19 d 内小鼠全部死亡;实验组移植后 15 d 小鼠开始死亡,其中 2 只小鼠生存时间超过 30 d。实验组小鼠生存时间多于空白对照组和对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 三组 cGVHD 临床症状比较 空白对照组出现上述症状于小鼠移植后 8 d;对照组出现上述症状于小鼠移植后 8 d;实验组出现上述症状于小鼠移植后 10 d。实验组 cGVHD 临床症状出现时间晚于对照组和空白对照组,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 三组 cGVHD 白细胞计数比较 三组移植后 3 d 白细胞计数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);三组移植后 6、9、12、14、15 d 白细胞计数比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);对照组和实验组移植后下降速度较慢,空白对照组白细胞计数下降速度较快,且移植后 15 d 白细胞计数仍 $> 0.5 \times 10^9/L$,见表 1。

2.4 三组 cGVHD 体重减轻情况比较 移植后 7 d,空白对照组体重减轻程度高于对照组和实验组,差异有统计学意义($P < 0.05$);移植后 14 d,空白对照组、对照组体重减轻程度与实验组体重减轻程度高于实验组,差异无统计学意义($P > 0.05$),但空白对照组与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

2.5 三组 IL-10、IL-12、TNF- β 和 TNF- α 比较 对照组 TNF- α 、TNF- β 与实验组比较,空白对照组 TNF- α 与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);实验组 IL-10 和 IL-12 均高于空白对照组和对照组, TNF- α 高于空白对照组, TNF- β 低于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

2.6 三组 CD4⁺和 CD25⁺细胞比较 实验组 CD4⁺和 CD25⁺细胞水平高于空白对照组和对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

2.7 间充质干细胞培养 间充质干细胞培养结果显示,移植后 14 d,对照组和空白对照组细胞无法集落和继续生长,而实验组可见大量细胞集落且良好生长,光镜下见细胞呈长梭状且贴壁,细胞核紧密团结,见图 1。

3 讨论

cGVHD 为 HSCT 治疗后严重并发症,其对患者生命和健康造成较大威胁,如何预防和治疗 cGVHD 成为临床研究热点和重要课题^[7]。目前,细胞疗法为预防和治疗 cGVHD 常用方法,其中 MSC 最受关注。研究证实^[8],MSC 因对免疫功能和造血细胞增殖、分化及成熟具有调节作用,可有效预防急性移植抗宿主病(aGVHD),但是否对 cGVHD 有效尚不可知。另研究发现^[9-11],MSC 可以抑制混合淋巴细胞

表1 三组 cGVHD 白细胞计数比较 ($\bar{x} \pm s, \times 10^9/L$)

| 组别 | n | 移植后 3 d | 移植后 6 d | 移植后 9 d | 移植后 12 d | 移植后 14 d | 移植后 15 d |
|-------|----|-----------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 空白对照组 | 12 | 6.20±0.10 | 3.80±0.20 ^{ab} | 1.90±0.10 ^b | 0.90±0.10 ^b | 0.50±0.03 ^{ab} | 0.50±0.03 ^b |
| 对照组 | 12 | 6.20±0.20 | 6.00±0.10 ^b | 2.00±0.20 ^b | 0.90±0.20 ^b | 1.59±0.15 ^b | 0.50±0.03 ^b |
| 实验组 | 12 | 6.20±0.30 | 8.00±0.20 ^a | 3.90±0.10 ^a | 2.80±0.10 ^a | 1.90±0.50 ^a | 1.90±0.20 ^a |
| F | | 0.000 | 1765.000 | 762.000 | 722.000 | 71.200 | 562.680 |
| P | | >0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |

注:与对照组比较,^aP<0.05;与实验组比较,^bP<0.05表2 三组 cGVHD 体重减轻情况比较 ($\bar{x} \pm s, g$)

| 组别 | n | 移植后 7 d | 移植后 14 d |
|-------|----|-------------------------|------------------------|
| 空白对照组 | 12 | 4.30±0.10 ^{ab} | 5.80±0.20 ^b |
| 对照组 | 12 | 3.30±0.20 ^b | 5.70±0.20 ^b |
| 实验组 | 12 | 2.70±0.30 ^a | 3.60±0.40 ^a |
| F | | 168.000 | 231.500 |
| P | | <0.05 | <0.05 |

注:与对照组相比,^aP<0.05;与实验组相比,^bP<0.05表3 三组 IL-10、IL-12、TGF-β 和 TNF-α 比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | IL-10 (pg/ml) | IL-12 (pg/ml) | TGF-β (ng/ml) | TNF-α (pg/ml) |
|-------|----|----------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| 空白对照组 | 12 | 132.48±10.88 ^{ab} | 142.33±31.55 ^b | 27.30±8.03 ^{ab} | 1.68±0.51 ^b |
| 对照组 | 12 | 156.09±11.20 ^b | 152.12±47.59 ^b | 15.09±6.25 | 2.13±1.00 |
| 实验组 | 12 | 179.09±8.05 ^a | 184.65±44.20 ^a | 13.68±5.00 | 2.62±1.06 |
| F | | 63.362 | 3.395 | 15.713 | 3.347 |
| P | | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |

注:与对照组相比,^aP<0.05;与实验组相比,^bP<0.05表4 三组 CD4⁺和 CD25⁺细胞比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | n | CD4 ⁺ | CD25 ⁺ |
|-------|----|-------------------------|-------------------------|
| 空白对照组 | 12 | 2.41±0.90 ^{ab} | 2.18±0.59 ^{ab} |
| 对照组 | 12 | 3.28±0.51 ^b | 3.16±0.86 ^b |
| 实验组 | 12 | 4.20±0.80 ^a | 4.68±0.96 ^a |
| F | | 16.970 | 28.430 |
| P | | <0.05 | <0.05 |

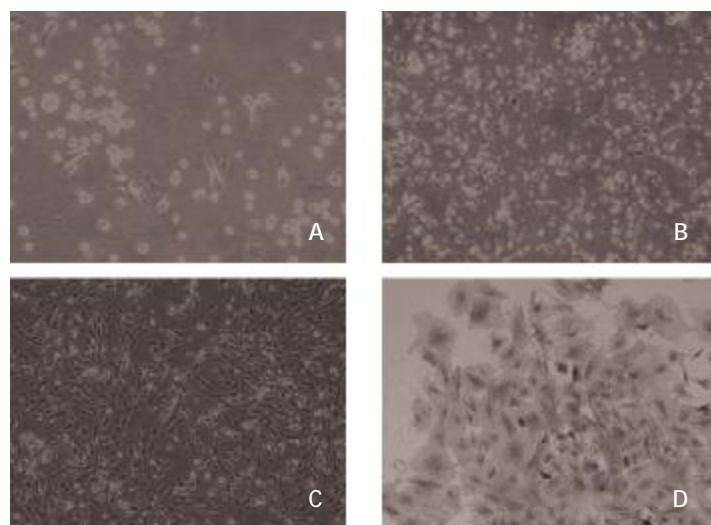
注:与对照组相比,^aP<0.05;与实验组相比,^bP<0.05注:A:空白对照组;B:实验组;C:对照组;D:实验组光镜图($\times 100$)

图1 经 bFGF 处理的小鼠骨髓间充质干细胞培养结果

反应丝裂原,升高 CD8⁺和 CD28⁺调节性 T 细胞亚群比例,促进 CD5⁺调节性 B 细胞增殖且抑制其凋亡,提高 IL-10 分泌水平,降低血清 B 细胞表面受体的表达和 B 细胞激活因子(BAFF)水平,诱导免疫耐受。李潇等^[12]研究发现,调节性 B 细胞在 cGVHD 的发病中起重要作用。bFGF 为广谱的有丝分裂原,对血管内皮细胞、上皮细胞、成骨细胞、成肌细胞等多种起源于中胚层、神经外胚层细胞的增殖分化起刺激和调节作用^[13,14],还可促进血管生成和神经细胞修复,协同其他造血生长因子共同促进造血细胞体外克隆形成。

本研究通过建立单倍体 HSCT 后 cGVHD 的小鼠模型,将实验分为空白对照组、对照组(外源性 MSC 治疗组)和实验组(bFGF 治疗组)并观察各组小鼠生存情况和 cGVHD 临床表现,结果发现实验组小鼠生存时间多于空白对照组和对照组,cGVHD 临床症状出现时间晚于对照组和空白对照组,对照组和实验组移植后下降速度较慢,空白对照组白细胞计数下降速度较快,且移植后 15 d 时白细胞计数仍 $>0.5 \times 10^9/L$,提示注射适量 bFGF 对 cGVHD 发生起一定延缓作用,对 cGVHD 临床症状发生起明显减轻作用,可延长小鼠的生存时间,减少预处理的损害^[15-17]。此外,本研究通过对 MSC 培养检测,结果发现移植后实验组见大量细胞集落且良好生长,光镜下见细胞呈长梭状且贴壁,细胞核紧密团结,说明实验组培养的细胞为 MSC,具备较强的诱导分化能力。本研究发现实验组 CD4⁺和 CD25⁺细胞水平高于空白对照组和对照组,实验组 IL-10 和 IL-12 均高于空白对照组和对照组,TNF- α 高于空白对照组,TNF- β 低于空白对照组($P<0.05$),提示 bFGF 通过增加 CD4⁺和 CD25⁺细胞调节性 T 细胞分泌、促进 IL-10、IL-12 和 TNF- α 分泌和减少 TNF- β 分泌,从而对 GVHD 发生起延缓作用,证实 bFGF 可延缓 GVHD 发生时间,稳定造血微环境,减轻预处理的损伤作用,延长小鼠的生存时间,减轻 GVHD 严重程度,促进 MSC 体内增殖和活性^[18-20]。

综上所述,bFGF 对 cGVHD 具有调节作用,其通过促进单倍体 HSCT 供者来源的间充质干细胞体内增殖,使调节性 T 细胞、调节性 B 细胞和骨髓来源的抑制细胞增殖,从而调节 cGVHD,延缓其发生。

参考文献:

[1] Nunes NS, Kanakry CG. Mechanisms of Graft-versus-Host Disease Prevention by Post-transplantation Cyclophosphamide: An Evolving Understanding[J]. Front Immunol, 2019(10):2668.
[2] 许志锋,李敬来,韩振,等.碱性成纤维细胞生长因子基因修饰骨髓肌卫星细胞自体移植急性心肌梗死组织的血管新生[J].中国组织工程研究,2017,21(9):1397-1401.

[3] 蒋依琳,高洪瑞.个体化综合治疗慢性移植抗宿主病相关干眼的临床研究[J].眼科新进展,2017,37(10):958-961.
[4] 于宁,王彦生,齐常萍.碱性成纤维细胞生长因子基因转染骨髓间充质干细胞在失神经肌肉萎缩中的应用[J].中国组织工程研究,2016,20(1):89-94.
[5] Khoder A, Sarvaria A, Alsuliman A. Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD [J]. Blood, 2014, 124(13):2034-2045.
[6] 仇利红,韩悦,郑惠,等.碱性成纤维细胞生长因子联合血管内皮细胞生长因子促进自体脂肪移植成活的动物实验研究[J].中国美容整形外科杂志,2016,27(12):759-762.
[7] 崔利德,李铁民.碱性成纤维细胞生长因子基因修饰骨髓间充质干细胞移植修复急性肾损伤 [J]. 中国组织工程研究, 2016,20(28):4169-4175.
[8] 黄江南,张文字,焦杨.碱性成纤维细胞生长因子 21 与心血管病关系的研究进展 [J]. 广西医科大学学报,2018,35(7):1022-1025.
[9] 孙艳,蔡雁.碱性成纤维细胞生长因子在产科疾病中的研究进展[J].医学综述,2016,22(15):2946-2949.
[10] 孔庆玲,陈伟,苏贵珍,等.Caspase1 抑制剂 Ac-YVAD-CMK 在防治小鼠急性移植抗宿主病中的作用[J].中国实验血液学杂志,2017,25(1):203-208.
[11] 吕长遥,伍静,龚翰林.六合丹对家兔皮肤感染创面愈合过程中 SP MMP-1 及 bFGF 表达的影响 [J]. 西部医学,2017,29(11):1492-1497.
[12] 李潇,王昀,陈韬亮,等.靶向成纤维细胞生长因子受体抑制胶质瘤中血管生成拟态的生成[J].实用医学杂志,2017,33(11):1735-1738.
[13] 高茜,刘丹,彭雷,等.野黄芩苷对苯并芘致人胚肺成纤维细胞 DNA 损伤的保护作用 [J]. 医学分子生物学杂志,2018(1):30-34.
[14] 王雪梦,吴雷,顾绍庆.人巨细胞病毒感染对人胚肺成纤维细胞自噬的影响[J].江苏大学学报(医学版),2017,27(5):416-419.
[15] 邹力勇,胥光热,刘丽.骨化三醇可抑制大鼠心间质成纤维细胞增殖[J].西部医学,2017,29(9):1208-1210.
[16] 邓陶然,肖毅.慢性移植抗宿主病的治疗进展[J].器官移植,2016,7(1):67-71.
[17] 王飞雁,高春记.慢性移植抗宿主病的治疗进展[J].中国实验血液学杂志,2017,25(1):286-290.
[18] 黄河,周道斌,于力,等.原始骨髓间充质干细胞治疗慢性移植抗宿主病临床研究方案[J].基础医学与临床,2017,37(3):296-299.
[19] 聂倩倩,朱紫菱,姜支农,等.原代癌相关成纤维细胞和正常成纤维细胞特征比较及对结肠癌细胞 EMT 影响[J].医学分子生物学杂志,2016,13(3):136-142.
[20] 徐文倩,黄岩彬,沙苗,等.阳离子化金针菇多糖的制备及其在大鼠胚胎成纤维细胞中的基因转染效率评价[J].江苏大学学报(医学版),2017,27(4):344-349.

收稿日期:2020-10-29;修回日期:2020-12-06

编辑/杜帆