

·基础研究·

脂肪来源间充质干细胞调控原发性免疫性血小板减少症小鼠Th细胞因子失衡

肖建红^{1,2}, 张阳春³

(1. 华中科技大学协和深圳医院血液科, 广东 深圳 518052; 2. 南华大学附属第一医院血液科, 湖南 衡阳 421001; 3. 深圳大学第二附属医院骨科中心, 广东 深圳 518101)

摘要:【目的】探讨脂肪来源的间充质干细胞(AMSCs)对原发性免疫性血小板减少症(ITP)小鼠Th细胞因子失衡免疫调节变化及其特异性转录因子T盒子转录因子/GATA结合蛋白3(T-bet/GATA-3)的影响,并初步探讨其相关机制。【方法】选取人来源健康脂肪组织,分离培养AMSCs,观察生长形态和干细胞鉴定,选取增长稳定的传代AMSCs;将30只BALB/c小鼠随机分为正常对照组(Normal组)、ITP对照组(ITP/PBS组)及ITP实验组(ITP/AMSC组)并进行相应的处理,观察AMSCs对ITP实验组小鼠的治疗作用,Th1/Th2细胞因子及特异性转录因子表达变化,并进行对比分析。【结果】①获取的AMSCs增殖稳定,细胞表面抗原分子CD29、CD44及CD105高表达,CD14及CD45低表达,并鉴定具有多向分化能力,符合AMSCs细胞学特征。②通过AMSCs治疗,ITP实验组小鼠皮肤出血瘀斑明显改善,其血小板水平、Th2细胞转录因子GATA-3 mRNA表达及Th2因子IL-4及IL-10水平高于ITP对照组,同时Th1细胞转录因子T-bet mRNA及Th1因子IL-2、IFN- γ 表达下降(均 $P<0.001$)。【结论】ITP小鼠存在Th1/Th2细胞因子免疫失衡,以Th1细胞因子占主导的自身免疫性疾病,AMSCs可能通过对Th细胞的T-bet/GATA-3的转录调控,减少Th1因子分泌,增加Th2因子分泌,改善ITP免疫失衡,提高血小板水平。

关键词:脂肪间充质干细胞;原发性免疫性血小板减少症;Th1/Th2细胞因子;T盒子转录因子/GATA结合蛋白3;免疫调节

中图分类号:R554.6

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2022)04-0563-10

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0406

Immunoregulation of Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells on Th Cytokines in Primary Immune Thrombocytopenic Mice

XIAO Jian-hong^{1,2}, ZHANG Yang-chun³

(1. Department of Hematology, Huazhong University of Science and Technology Union Shenzhen Hospital, Shenzhen 518052, China; 2. Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of South China University, Hengyang 421001, China; 3. Department of Orthopedics, The Second Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen 518101, China)

Correspondence to: ZHANG Yang-chun; E-mail: zhangyangchun2005@163.com

Abstract:【Objective】To explore the effects and the related mechanisms of AMSCs on Th cytokines and its specific transcription factors T-bet/GATA-3 in mice with ITP.【Methods】Healthy adipose tissues from human selected beforehand were used for isolation and culture of AMSCs. Then its growth morphology and stem-cell identification were observed, and

收稿日期:2022-01-10

基金项目:广东省医学科研基金(B2020020);深圳市南山区科技计划项目(2020023);深圳市三名工程华中科技大学协和深圳医院院内课题(2019007)

作者简介:肖建红,博士,副主任医师,研究方向:原发性免疫性血小板减少症的基础和临床,E-mail: xiaoxiaouser@163.com; 张阳春,通信作者,E-mail: zhangyangchun2005@163.com

the AMSCs with a stable growth situation were selected for next step test. Thirty BALB/c mice were randomly divided into the normal control group (Normal group), ITP control group (ITP/PBS group) and ITP experimental group (ITP/AMSC group), and treated accordingly to observe the therapeutic effect of AMSCs on ITP mice. The expressions of Th1/Th2 cytokines and the specific transcription factors were analyzed.【Results】①The obtained AMSCs proliferated stably with high expression of cell surface antigen molecules of CD29, CD44 and CD105, and low expression of CD14 and CD45. And the AMSCs were identified to have multidirectional differentiation ability, which was consistent with the cytological characteristics of AMSCs. ②After AMSCs treatment, skin bleeding of ITP mice was significantly alleviated, and the platelet level, Th2 transcription factor GATA-3 mRNA expression and Th2 factors IL-4 and IL-10 levels were higher than those in the ITP control group. At the same time, the expression of Th1 transcription factor T-bet mRNA and Th1 factors IL-2 and IFN- γ in the ITP experimental group decreased (all $P < 0.001$).【Conclusions】There is the immune imbalance of Th1/Th2 cytokines in ITP mice. As a autoimmune disease and dominated by Th1 cytokines for ITP, AMSCs could reduce Th1 cytokines secretion and increase Th2 cytokines secretion by regulating T-bet/GATA-3, thus redressing the immune imbalance of ITP and improving platelet level.

Key words: adipose-derived mesenchymal stem cells; primary immune thrombocytopenia; Th1/Th2 cytokines; T-box transcription factor/GATA binding protein 3; immunoregulation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2022, 43(4): 563-572]

原发性免疫性血小板减少症(primary immune thrombocytopenia, ITP)是血液科最为常见的一种由自身免疫紊乱而导致的机体血小板减少,在免疫系统具有器官特异性,由于人体内产生抗血小板自身抗体导致单核巨噬细胞系统破坏血小板过多,从皮肤、黏膜渗血,进而导致多个器官不同程度出血^[1-2]。ITP的发病原因及具体机制仍不完全清楚,在临床治疗上,对轻中度及急性的ITP患者采取一般治疗方法如糖皮质激素、免疫抑制剂、脾切除等等疗效可显著改善,但对于复发、难治性ITP患者目前尚无较好的防治方案^[3-4]。因此,防治ITP新的有效疗法亟待探索。在治疗自身免疫性疾病领域,间充质干细胞已在多个免疫性疾病的治疗理念中有了跨越式发展,目前已成为一种全新的治疗策略^[5-6]。而在干细胞来源种类的选择上,与骨髓等其他来源的间充质干细胞相比,脂肪来源的间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, AMSCs)具有更大优势:供体充足、容易获取及培养、生物个体间免疫原性低等,有着广泛的临床应用前景^[7]。AMSCs能否作为治疗自身免疫性疾病ITP的一种新的手段,尚有待进一步研究证实。基于AMSCs的低免疫原性特征及临床应用研究服务,我们采用人来源的AMSCs,探讨其对ITP小鼠的疗效,免疫失衡的改善及特异性转录因子T-bet/GATA-3表达影响,并阐明AMSCs在ITP中的相关作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

SPF级BALB/c小鼠,体质量为18~26 g,6~8周龄,共30只,动物实验经华中科技大学协和深圳医院伦理委员会批准;脂肪组织供体:筛选在深圳市宝安区人民医院手术室行抽脂术患者或术中相关部位需要行多余脂肪组织切除的患者5例(其中3例女性,2例男性),年龄18~45岁,排除合并自身免疫系统疾病及影响免疫系统的其他疾患,并经外科医师确定获取的脂肪组织无进一步临床应用价值,以及术前术中无污染。所筛选的患者知晓实验目的、知情同意,同时实验方案征得我院医学伦理委员会批准(伦审[2016]A-002号)。

1.2 AMSCs分离、培养及检测 以此为例重新调整标题

手术室获取的脂肪组织快速送往实验室,将其剪为小碎块并清除夹杂的非脂肪组织,加入胶原酶消化后,采用Ficoll密度梯度离心弃除浮游颗粒。AMSCs为贴壁细胞,加入DMEM培养液,5%二氧化碳培养箱培养,经多次换液,待AMSCs细胞生长到90%,再按比例传代,并显微镜下观察AMSCs形态变化。根据前期研究经验^[8],选取生长稳定、增殖能力强的第4代传代细胞,用酶联免疫检测仪波长570nm测定吸光值(OD值),绘制细胞生长曲线;

同时流式细胞检测 AMSCs 表面抗原标记 CD14、CD29、CD44、CD45 及 CD105 分子表达。

1.3 AMSCs 鉴定

1.3.1 诱导成脂分化 将传代好的第4代 AMSCs 以 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 密度接种于6孔板,待增殖达90%后,更换 DMEM 培养液。成脂诱导组细胞每孔加入 2 mL 成脂诱导剂(10% FBS 的 HG-DMEM 培养液中加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松, 10 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素, 200 $\mu\text{mol/L}$ 吡啶美辛和 0.5 mmol/L IBMX), 置 5% 二氧化碳培养箱培养3天,再用成脂诱导保持液处理,循环3次后诱导维持培养液(只含有 10 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素)处理一周并定期换液。对照组细胞加入 10% FBS 的 HG-DMEM 培养液。3周后行油红“O”脂肪染色法观察脂肪颗粒。

1.3.2 油红“O”脂肪染色 AMSCs 成脂诱导达3周后去除细胞当前使用培养液, PBS 清洗3次; 27.5% 甲醛室温固定 20 min 后 PBS 清洗3次, 空气中干燥; 加入 0.5% 的红油室温孵育 1 h, 60% 异丙醇清洗 30 s; PBS 清洗3次后, 倒置显微镜下观察并记录。

1.3.3 诱导成骨分化 将传代好的第4代 AMSCs 以 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 密度接种于6孔板,待增殖达90%后,更换 DMEM 培养液。成骨诱导组细胞每孔加入 2 mL 成骨诱导剂(10% FBS 的 LG-DMEM 培养液中加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸, 10 mmol/L β -磷酸甘油和 100 nmol/L 地塞米松), 置 5% 二氧化碳培养箱培养, 维持诱导3周并定期换液。对照组细胞加入含 10% FBS 的 LG-DMEM 培养液。3周后行茜素红染色法观察钙质颗粒。

1.3.4 茜素红染色 AMSCs 成骨诱导达3周后去除细胞当前使用培养液, 使用 PBS 清洗三次; 使用 10% 甲醛室温固定 15 min 后 PBS 清洗3次; 按照 1 mL/孔加入 40 mmol/L 的茜素红染色液, 室温孵育 20 min 并轻微振荡; 清除掉未完全结合的染料, 用 PBS 漂洗并振荡 5 min 重复4次; 倾斜放置 2 min, 去除多余的清洗液, 倒置显微镜下观察并记录。

1.4 ITP 小鼠建立及处理

将 30 只 BALB/c 小鼠编号并随机分成3组, 即正常对照组(Normal 组)、ITP 对照组(ITP/PBS 组)及 ITP 实验组(ITP/AMSC 组), 每组 10 只, 除正常对照组外, 其余两组均按我们前期已成功建立 ITP 小鼠模型的方法继续造模^[9]。3组小鼠分别处理如下, ITP 实验组: 从 ITP 小鼠尾静脉输注 200 μL 1×10^6

mL AMSCs; ITP 对照组: 从 ITP 小鼠尾静脉输注 200 μL PBS; 正常对照组小鼠不进行任何处理。根据我们既往研究及参考文献, ITP 模型建立后进行 1 次 AMSCs 注射, 处理后的第7天, 断颈处死小鼠, 获取标本并进行相关指标检测。

1.4.1 Th1/Th2 细胞因子 将获取的小鼠部分外周血分离血清, 酶联免疫吸附测定(ELISA)各组血清 IFN- γ 、IL-2、IL-4 及 IL-10 细胞因子表达。96 孔酶标板按照次序分别加入 100 μL 的标准品, 100 μL 样品, 空白对照加入 100 μL 的蒸馏水, 详细步骤按 ELISA 试剂盒说明书, 用酶标仪在 450 nm 处测吸光值(OD 值), 以标准品浓度为横坐标, OD 值为纵坐标绘制标准曲线, 所有样品孔 OD 值均减除空白孔值后计算各种细胞因子含量。

1.4.2 外周血小板水平 按照实验设计定期获取的小鼠尾静脉血 100 μL , 将血液和 100 μL 1% EDTA-Na₂ 抗凝剂充分混合后, 送检验科全自动血细胞分析仪检测血常规并记录外周血小板水平。

1.4.3 免疫磁珠分纯 Th 细胞 密度梯度离心法分离获得的外周血单个核细胞, 将细胞悬液移至 Eppendorf 管, 离心、弃上清、重悬后加入 CD4 Micro-Beads 充分混匀, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵化 15 min; 用 Buffer 洗涤细胞, 再次离心、重悬。将 MS 分离柱放置在 MACS 分离器的磁场中, 以 Buffer 漂洗, 将细胞悬液通过分离柱, 反复 Buffer 冲洗分离柱 3 次。取出分离柱, 用 1 mL Buffer 加压冲洗分离柱, 收集含 CD4⁺T 淋巴细胞流出液, 即 Th 细胞, 已备基因检测。

1.4.4 特异性转录因子基因表达 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测小鼠外周血调控 Th1/Th2 细胞分化的特异性转录因子 T-bet/GATA-3 表达水平, GenBank 上查找目的基因 mRNA 序列, 在 CDS 区设计特异性引物, 序列见表 1。

按常规方法提取总 RNA, 加入 DEPC 水溶解。取 4 μL RNA 模板做逆转录反应, 逆转录聚合酶链反应体系如下: 5 \times 逆转录 buffer 4.0 μL , 下游引物(10 pmol/ μL) 0.5 μL , dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL , MMLV (200 U/ μL) 0.5 μL , DEPC 水 10.5 μL , RNA 模板 4.0 μL , 总体积为 20.0 μL 。实时荧光定量 PCR 反应体系如下: 5 \times SYBR Green I PCR buffer 10 μL , 上游引物 F(10 pmol/ μL) 1.0 μL , 下游引物 R (10 pmol/ μL) 1.0 μL , dNTPs (10 mmol/L) 1.0 μL , Taq 酶 (3 U/ μL) 1.0 μL , cDNA 5.0 μL , ddH₂O 31.0 μL , 总体积: 50.0 μL 。PCR 条件: 93 $^{\circ}\text{C}$, 3 min-

表1 Th细胞特异性转录因子及相关细胞因子引物序列
Table 1 Th cell specific transcription factors and related cytokines' primer sequences

| Gene | Primer sequences |
|--------|-----------------------------|
| GATA-3 | F:GAGGTGGACGTACTTTTAAACATCG |
| | R:GGCATAACCTGGCTCCCGT |
| T-bet | F:GCCAGGGAACCGTTATATG |
| | R:GACGATCATCTGGGTCACATTGT |
| GAPDH | F:ACCACAGTCCATGCCATCAC |
| | R:TCCACCACCCTGTTGCTGTA |

93°C, 15 s-55°C, 30 s-72°C, 30 s,共40循环。

1.5 数据统计处理

实验数据记录采用($\bar{x} \pm s$)描述,SPSS 18.0统计学软件对各组数据进行分析,二组计量资料均数的比较采用用独立样本 t 检验;对于连续性计量资料,不符合正态分布的数据采用Wilcoxon秩和检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

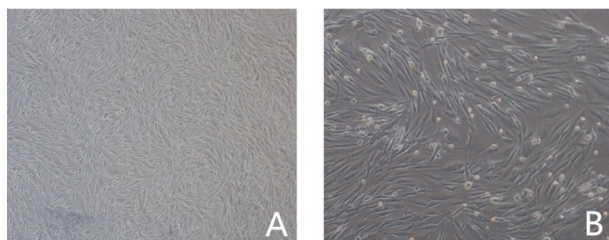
2 结果

2.1 AMSCs细胞形态观察

AMSCs为贴壁细胞,形态多呈梭形,随着细胞增殖和多次传代,呈集落式生长,漩涡状排列;供输注ITP小鼠用的P4代细胞呈不规则梭形,有单个细胞核仁或者双核,核仁基本居中,呈类圆形(图1)。

2.2 AMSCs细胞免疫表型

P4代AMSCs细胞表面CD29、CD44和CD105



A: P4 AMSCs showed typical cell morphology and distributed in colony form microscopically, $\times 40$; B: Microscopically at high magnification, the cells are fusiform with round or ovoid nuclei, mostly centered, $\times 100$.

图1 显微镜下P4代AMSCs细胞形态

Fig. 1 Cell morphology of P4 AMSCs observed under microscope

抗原标记呈强阳性表达,分别为97.54%、97.34%和99.61%;低表达抗原标记CD14及CD45分子,分别为2.51%和0.26%(图2),细胞免疫表型鉴定结果合格。

2.3 AMSCs细胞生长曲线

P4代细胞的生长增殖呈S形,第0~3天时处于起始期,3天后增殖加快并进入对数生长期,1周后进入平台期。按照生长曲线实验数据得细胞的倍增时间为26 h,其生长达平台期平均扩增时间为5 d(图3)。

2.4 AMSCs分化能力测定结果

2.4.1 AMSCs诱导成脂分化 P4代AMSCs增殖稳定后,通过成脂诱导剂达3周后去除细胞培养液,27.5%甲醛等处理后行油红“O”脂肪染色倒置显微镜下观察见细胞内红色脂肪颗粒,结果符合实验预期(图4)。

2.4.2 AMSCs诱导成骨分化 P4代AMSCs增殖稳定后,通过成骨诱导剂达3周后去除细胞培养液,10%甲醛室温固定等处理后,茜素红染色液染色可见细胞质大量红色钙结节(图5)。

2.5 小鼠一般状况

建模后,ITP小鼠一般状况比正常对照组较差,进食量和活动量有所下降;ITP小鼠经过AMSCs治疗1周,进食量和活动量均较治疗前有所增加,且好于ITP对照组。同时ITP实验组经AMSCs治疗1周后观察小鼠皮肤紫癜范围有所减少。分组前及各组小鼠在干预前(0周)、造模后1周(第1周)及AMSCs治疗后1周(第2周)体质量符合正态分布,经单因素方差分析3组小鼠体质量在第1及2周组间差异有统计学意义(统计值分别为 $F=4.12$, $P=0.0354$; $F=5.06$, $P=0.0186$),采用Bonferroni法进一步作两两比较统计得出:ITP小鼠在AMSCs治疗前(第1周)的平均体质量(ITP/PBS组及ITP/AMSC组)均轻于正常小鼠Normal组,差异有统计学意义(分别为 $P=0.0085$, $P=0.0078$),而ITP/PBS组与ITP/AMSC组比较差异无统计学意义($P=0.5251$);2周后,经AMSCs治疗后ITP小鼠的体质量虽未恢复至正常小鼠,差异有统计学意义($P=0.0281$),但比对照组ITP小鼠显著增加,差异有统计学意义($P=0.0006$;表2)。

2.6 外周血小板水平检测

通过血细胞分析仪检测小鼠外周血小板水平,

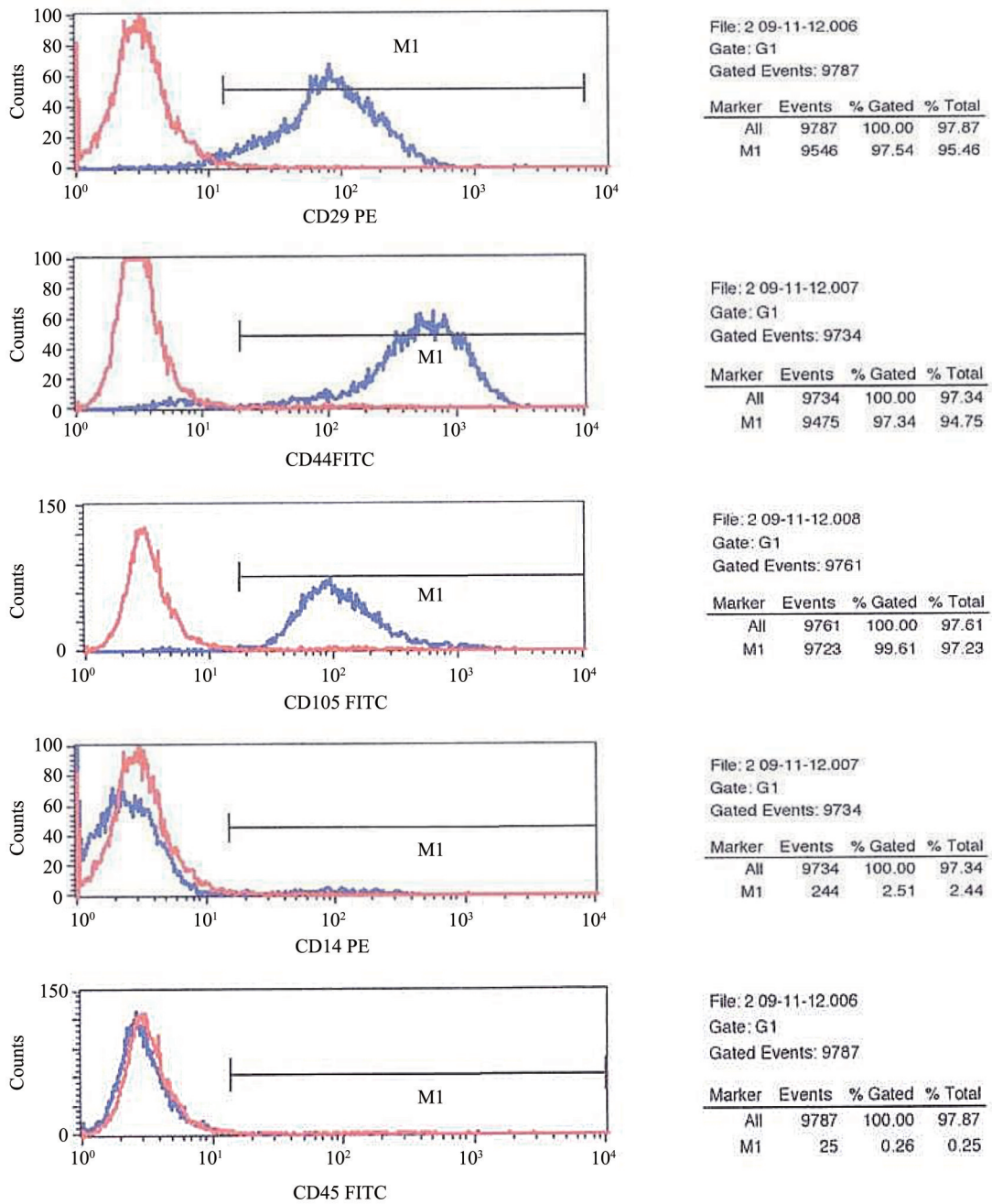


图2 AMSCs免疫表型CD14、CD29、CD44、CD45及CD105表达情况

Fig. 2 Expression of CD14, CD29, CD44, CD45 and CD105 in AMSCs

各组数据符合正态分布,经单因素方差分析,3组小鼠血小板水平在第3~6天组间差异均有统计学意义,第3天($F=56.18, P=0.0000$)、第4天($F=44.35, P=0.0000$)、第5天($F=41.63, P=0.0000$)、第6天($F=37.35, P=0.0000$)。采用Bonferroni法进一步作两两比较发现:与Normal组小鼠比较,ITP/PBS组及ITP/AMSC组小鼠血小板水平较低(均 $P=0.0000$);经AMSCs治疗后,ITP/AMSC组血小板水

平虽有所升高(与ITP/PBS组比较,在第3~6天,均有统计学差异, P 值依次为0.0104、0.0006、0.0000及0.0000),但仍未达到正常水平(与Normal组比较,仍有显著性差异,均 $P=0.0000$;图6)。通过3组数据比较分析得出,AMSCs可提高ITP小鼠血小板水平。

2.7 T-bet/GATA-3表达水平

通过RT-PCR检测特异性转录因子T-bet/GA-

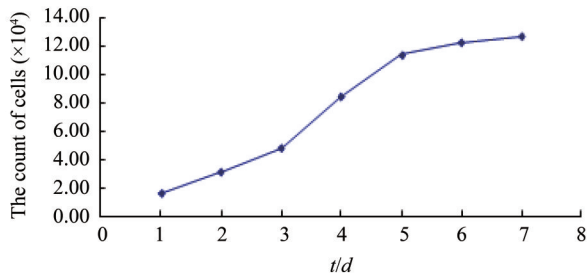
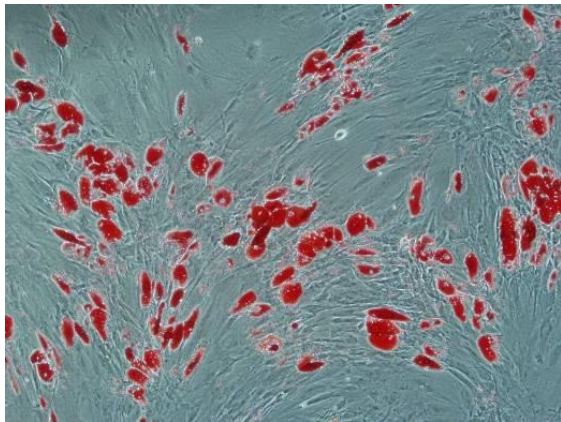


图3 P4代AMSCs细胞生长增殖情况

Fig. 3 Growth and proliferation of P4 AMSCs



Oil red O staining of AMSCs showed red lipid droplets inside the cells, $\times 100$.

图4 AMSCs诱导成脂分化

Fig. 4 Lipogenic induction of AMSCs



Calcium nodules were observed by alizarin red staining after osteogenic differentiation of AMSCs, $\times 100$.

图5 AMSCs诱导成脂分化

Fig. 5 Osteogenic induction of AMSCs

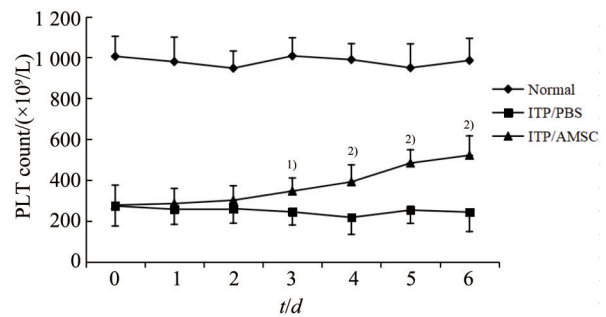
TA-3 mRNA 表达水平, 各组数据符合正态分布, 经单因素方差分析, 3组小鼠 T-bet mRNA 及 GATA-3 mRNA 表达组间差异均有统计学意义(统计值分

表2 不同时间各组小鼠体质量情况比较

Table 2 Comparison of mice weight in each group

| Groups | n | Time/weeks | | |
|----------|----|------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| | | 0 | 1 | 2 |
| Normal | 10 | 19.96 \pm 4.45 | 21.84 \pm 3.52 | 23.82 \pm 3.84 |
| ITP/PBS | 10 | 20.04 \pm 5.12 | 17.26 \pm 4.32 ¹⁾ | 17.98 \pm 4.17 ²⁾ |
| ITP/AMSC | 10 | 20.01 \pm 5.14 | 17.18 \pm 4.20 ¹⁾ | 20.76 \pm 3.75 ^{1),3)} |

Compared with the normal group, ¹⁾ $P < 0.001$; ²⁾ $P < 0.01$; compared with the control group, ³⁾ $P < 0.05$.



After AMSCs treatment, the platelet levels in ITP mice were changed, ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.001$.

图6 3组小鼠外周血小板水平变化

Fig. 6 Changes of peripheral blood platelet levels in three groups

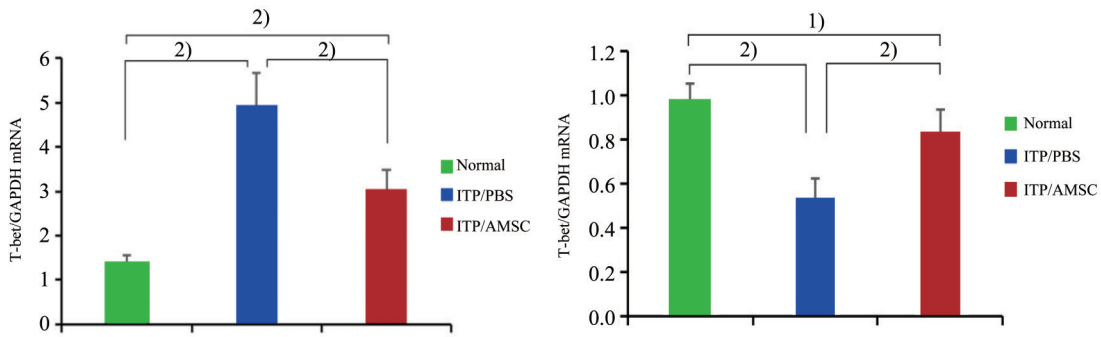
别为 $F=29.86, P=0.0000$; $F=27.35, P=0.0000$)。采用 Bonferroni 法进一步作两两比较发现 ITP/PBS 组小鼠 T-bet 表达明显高于 Normal 组及 ITP/AMSC 组小鼠(均 $P=0.0000$)；经 AMSCs 治疗后, ITP 小鼠 T-bet 表达虽有所降低, 但仍高于正常小鼠, 差异有统计学意义($P=0.0000$)。而对于 Th2 细胞的特异性转录因子 GATA-3 mRNA 表达, ITP/PBS 组小鼠明显低于 Normal 组小鼠表达($P=0.0000$)；经 AMSCs 治疗后, ITP 小鼠 GATA-3 表达显著上升, 高于 ITP/PBS 组小鼠($P=0.0000$), 但仍低于正常小鼠($P=0.0128$; 图7)。

2.8 小鼠外周血 Th1/Th2 细胞因子表达

通过 ELISA 检测小鼠外周血 Th1/Th2 相关细胞因子, 各组数据符合正态分布, 经单因素方差分析, 3组小鼠 IL-2、IFN- γ 、IL-4 及 IL-10 表达组间差异均有统计学意义(统计值分别为 $F=29.86, P=0.0000$; $F=27.35, P=0.0000$)。采用 Bonferroni 法进一步作两两比较发现: ITP/PBS 小鼠血清 Th1 细

胞因子 IFN- γ 、IL-2 水平高于正常 Normal 组 (均 $P=0.000\ 0$), 经 AMSCs 治疗后, ITP 小鼠 IFN- γ 、IL-2 与 ITP/PBS 组比较显著下降, 差异有统计学意义 (分别为 $P=0.000\ 6$, $P=0.000\ 8$), 虽然 IL-2 水平尚未恢复正常小鼠水平 ($P=0.010\ 5$), 但 IFN- γ 因子已接近正常水平, 与 Normal 组比较差异无统计学意

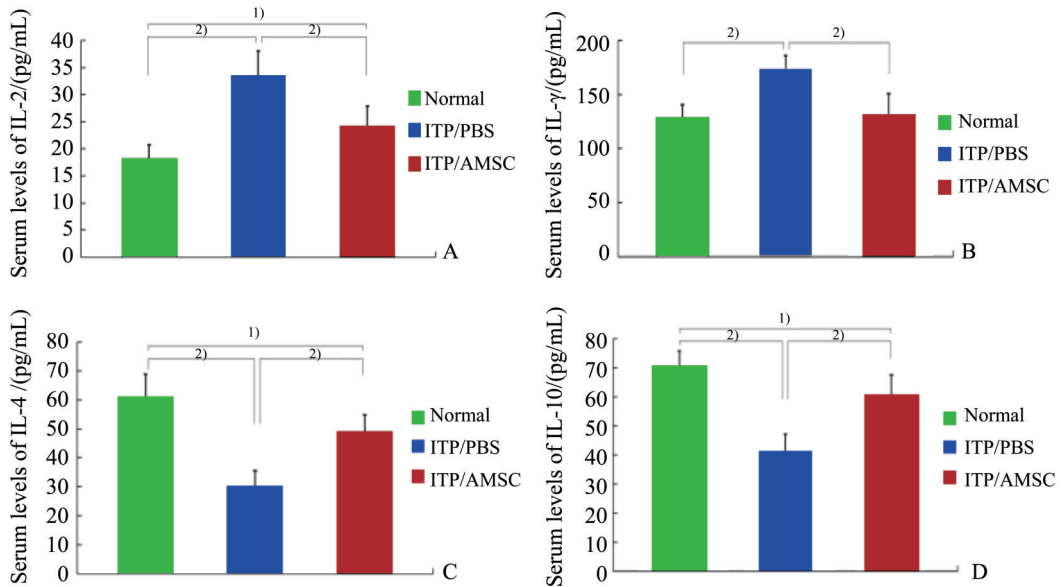
义 ($P=0.084\ 2$); 对于 Th2 细胞因子 IL-4 及 IL-10, ITP/PBS 小鼠显著低于 Normal 组 (均 $P=0.000\ 0$), 经 AMSCs 输注后, ITP 小鼠血清 IL-4 及 IL-10 水平均上升, 虽与 Normal 组比较尚未恢复正常水平 (分别为 $P=0.018\ 4$, $P=0.025\ 1$), 但较 ITP/PBS 组小鼠有非常显著差异 (分别为 $P=0.000\ 1$, $P=0.000\ 7$; 图 8)。



Comparison of expression of T-bet/GATA-3 mRNA in three groups of mice, ¹⁾ $P<0.05$; ²⁾ $P<0.001$.

图 7 T-bet/GATA-3 mRNA 在 3 组小鼠中的表达

Fig. 7 Expression of T-bet/GATA-3 mRNA in three groups of mice



Effect of AMSCs on Th1/Th2 cytokines in ITP mice, IL-2(A), IFN- γ (B), IL-4 (C), IL-10 (D), ¹⁾ $P<0.05$; ²⁾ $P<0.001$.

图 8 ITP 小鼠 Th1/Th2 细胞相关因子表达

Fig. 8 Expression of Th1/Th2 cytokines in ITP mice

3 讨论

ITP 是人体血液系统的常见病, 亦与免疫系统密切相关, 是具有器官特异性的自身免疫紊乱性血液病^[10-11]。由于人体内产生抗血小板自身抗体导

致单核巨噬细胞系统破坏血小板过多, 从早期的皮肤黏膜渗血, 进展为多个重要器官的不同程度出血^[11]。在临床治疗上, 对轻中度及急性的 ITP 患者采取一般治疗方法如糖皮质激素、免疫抑制剂、脾切除等等疗效显著, 但对于复发、难治性 ITP 患者

目前尚无较好的防治方案^[3, 12-13]。近年来,对ITP的发病机制有了更新的认识:ITP患者机体产生了针对自身抗体的淋巴B细胞离不开特异性自身反应性T细胞的辅助即Th细胞(辅助性T淋巴细胞),分化异常的Th及其产生的细胞因子导致机体Th淋巴细胞免疫失衡,进而引起一系列免疫炎症反应,产生针对血小板的自身反应性抗体异常增多,最终导致ITP的发生和发展^[10, 14]。

目前认为,ITP机体Th淋巴细胞免疫的失衡,主要是其产生的Th1细胞因子和Th2细胞因子的比例失衡所致^[15]。Th细胞的分类是根据其生物学特性和产生细胞因子种类而区分为4种不同的类别,除了Th1及Th2细胞外,还有Th3细胞即调节性T细胞(Treg)和较晚发现的Th17细胞^[16-17]。在ITP免疫调节机制中产生关键作用的是Th1及Th2细胞^[16-17]。Th1细胞主要产生IL-2、IFN- γ 等因子,介导固有免疫等细胞免疫应答^[18]。更重要的是在ITP中,Th1细胞因子IFN- γ 的异常升高,能直接抑制Th2细胞的分化和功能,以及Th2细胞因子表达^[18-20]。而Th2细胞主要产生IL-4、IL-10等因子,介导机体体液免疫应答^[18]。ITP患者的Th1和Th2的免疫失衡,主要是Th1细胞因子异常增多导致,是Th1因子占主导地位的免疫性疾病^[18]。作者通过建立ITP小鼠模型,并对外周血对Th1及Th2细胞因子检测,再次探明,ITP小鼠血清Th1细胞因子IFN- γ 及IL-2的表达水平高于正常小鼠;同时Th2细胞因子IL-4及IL-10表达水平低于正常小鼠。

鉴于ITP患者的Th1/Th2细胞因子的免疫失衡,新的治疗理念有了跨越式发展,针对其免疫失衡的新型药物已在临床上逐步开始尝试^[18]。Alemtuzumab,是一种抗糖基磷脂酰肌醇锚定的糖蛋白(CD52)的人源化单克隆抗体,可抑制ITP患者Th细胞免疫失调,虽然具体机制尚有待进一步阐明,但临床研究发现Alemtuzumab可成功改善难治性ITP患者血小板水平并能持续有效,而不足之处是可能由于该药物的免疫原性等问题,患者治疗后多出现的不良反应为发热,带状疱疹等^[3]。人脐带间

充质干细胞是一种仅存在于新生儿脐带组织中的一种多功能干细胞,有文献报道慢性难治性ITP患者经过人脐带间充质干细胞治疗,疗效显著,在两年的随访中,1年的缓解率高达100%^[21]。虽然研究例数不多及还需大样本量进一步证实,但人脐带间充质干细胞治疗后1年的100%有效缓解率及低副作用确实令人瞩目。除了脐带间充质干细胞外,其他如骨髓间充质干细胞、AMSCs等间充质干细胞均有着共性,具有生物个体间低免疫原性,调控过度的细胞免疫应答,改善机体免疫失衡^[22]。相对其他来源的间充质干细胞而言,从脂肪获取的AMSCs,来源广及易培养增殖是其最大的优势。在前期实验的基础上^[23],作者再次通过分离培养人来源的AMSCs输注ITP小鼠,发现AMSCs能改善Th1/Th2细胞因子失衡,Th1细胞代表性因子IFN- γ 、IL-2水平下降,Th2细胞代表性因子IL-4、IL-10的水平上升,同时ITP小鼠外周血血小板水平提高。除了Th1/Th2相关细胞因子,外周血小板水平等客观指标改善外,我们也观察到ITP小鼠经AMSCs输注后体质量有明显提高,虽然ITP小鼠的皮肤黏膜等出血性瘀斑尚无客观指标进行统计分析^[24],实验组ITP小鼠经治疗后表现出紫癜不同程度的减少。更重要是我们进一步深层次发现,ITP小鼠Th细胞特异性转录因子GATA-3和T-bet发生表达改变,T-bet水平显著性高于正常小鼠,同时GATA-3表达低于正常。目前已证实,在自身免疫性疾病中特异性转录因子T-bet和GATA-3与Th细胞的分化和Th1/Th2细胞因子平衡密切相关^[25-27]。通过AMSCs的输注,ITP小鼠T-bet表达下调,同时GATA-3表达增加。据此,我们得出:AMSCs可能通过对T-Bet/GATA3的转录调控,影响Th1/Th2细胞因子失衡,从而改善ITP小鼠血小板水平。

综上所述,ITP机体存在Th1/Th2细胞因子免疫失衡,以Th1细胞因子占主导,AMSCs可能通过对Th细胞的T-bet/GATA-3的转录调控,减少Th1因子分泌、增加Th2因子分泌,改善ITP免疫失衡,恢复血小板水平。

参考文献

- [1] Zainal A, Salama A, Alweis R. Immune thrombocytopenic purpura [J]. *J Community Hosp Intern Med Perspect*, 2019, 9(1):59-61.
- [2] Hadi G, Caroline H, Ibraheem O, et al. Flow cytometry and immune thrombocytopenic purpura [J]. *Transfus Apher Sci*, 2018, 57(6):800-803.
- [3] 袁永平,杨翔,胡贝妮,等.成人原发性免疫性血小板减少性紫癜新型药物治疗的研究进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2020, 28(2):677-681.
Yuan YP, Yang X, Hu BN, et al. Research progress of novel drug therapy for adult idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *J Exp Hematol*, 2020, 28(2):677-681.
- [4] Terrell DR, Neunert CE, Cooper N, et al. Immune thrombocytopenia (ITP): current limitations in patient management [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2020, 56(12):667.
- [5] 路明,尹晓玉,张志清.间充质干细胞对自身免疫病治疗作用研究进展及机制探究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2021, 26(6):700-706.
Lu M, Yin XY, Zhang ZQ. Research progress and mechanism of mesenchymal stem cells in the treatment of autoimmune diseases [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2021, 26(6):700-706.
- [6] Chen Y, Yu Q, Hu Y, et al. Current research and use of mesenchymal stem cells in the therapy of autoimmune diseases [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2019, 14(7):579-582.
- [7] 胡慧青,侯新国,陈丽.脂肪间充质干细胞免疫调节作用的研究进展[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2019(12):958-959.
Hu HQ, Hou XG, Chen L. Advances in immunomodulatory effects of adipose mesenchymal stem cells [J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2019(12):958-959.
- [8] 肖建红,张阳春,张常然,等.人皮下脂肪干细胞的成骨、成脂分化诱导及鉴定[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(32):5155-5161.
Xiao JH, Zhang YC, Zhang CR, et al. Induction and identification of osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells [J]. *Chin J Tiss Eng Res*, 2015, 19(32):5155-5161.
- [9] 肖建红,李君君,张阳春.免疫法ITP小鼠模型的建立与鉴定[J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(12):1849-1853.
Xiao JH, Li JJ, Zhang YC. Establishment and identification of ITP mouse model by immunoassay [J]. *Chin J Immunol*, 2018, 34(12):1849-1853.
- [10] 袁永平,杨翔,陈懿建.原发性免疫性血小板减少症的发病机制研究进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2019, 27(5):1706-1710.
Yuan YP, Yang X, Chen YJ. Progress in pathogenesis of primary immune thrombocytopenia [J]. *J Exp Hematol*, 2019, 27(5):1706-1710.
- [11] Cooper N, Ghanima W. Immune thrombocytopenia [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(10):945-955.
- [12] Chosamata B I. The management of immune thrombocytopenic purpura [J]. *Malawi Med J*, 2015, 27(3):109-112.
- [13] Viana R, D'Alessio D, Grant L, et al. Psychometric evaluation of ITP life quality index (ILQI) in a global survey of patients with immune thrombocytopenia [J]. *Adv Ther*. 2021, 38(12):5791-5808.
- [14] Mohammed S, Samar KE, Mahmoud E, et al. Role of cellular immunity in the pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura in children [J]. *Menoufia Med J*, 2018, 31(2):214-219.
- [15] Feng WY, Zhong YG. Role of Th 1- and Th 2- chemokine receptor in the diagnosis and prognosis of primary immune thrombocytopenia [J]. *Clin Lab*, 2019, 65(6):938-946.
- [16] Tabarkiewicz J, Pogoda K, Karczmarczyk A, et al. The role of IL-17 and Th17 lymphocytes in autoimmune diseases [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2015, 63(6):435-449.
- [17] Muhammad YF, Wong KK, Mohd RN. Th1, Th2, and Th17 cytokines in systemic lupus erythematosus [J]. *Autoimmunity*, 2020, 53(1):8-20.
- [18] Crane IJ, Forrester JV. Th1 and Th2 lymphocytes in autoimmune disease [J]. *Crit Rev Immunol*, 2005, 25(2):75-102.
- [19] 肖建红,李君君,陈运贤,等. CD4⁺ T细胞及其转录激活因子STAT4/6在免疫性血小板减少性紫癜

- 中的表达及意义[J]. 广东医学, 2017, 38(21): 3257-3260.
- Xiao JH, Li JJ, Chen YX, et al. Expression and significance of CD4+ T cells and their transcription activator STAT4/6 in immune thrombocytopenic purpura [J]. *Guangdong Med J*, 2017, 38(21): 3257-3260.
- [20] Xiao J, Zhang C, Zhang Y, et al. Transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells into a murine model of passive chronic immune thrombocytopenia[J]. *Transfusion*, 2012, 52(12):2551-2558.
- [21] Wang X, Yin X, Sun W, et al. Intravenous infusion umbilical cord-derived mesenchymal stem cell in primary immune thrombocytopenia: a two-year follow-up [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(5):2255-2258.
- [22] Wei Z, Yuan J, Wang G, et al. Regulatory effect of mesenchymal stem cells on T cell phenotypes in autoimmune diseases [J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 5583994.
- [23] 肖建红, 刘泽林, 李君君, 等. hADSC对免疫性血小板减少性紫癜小鼠淋巴细胞免疫调节的实验研究[J]. 广东医学, 2020, 41(19):1958-1963.
- Xiao JH, Liu ZL, Li JJ, et al. Experimental study of hADSC on immune regulation of lymphocyte in mice with immune thrombocytopenic purpura [J]. *Guangdong Med J*, 2020, 41(19): 1958-1963.
- [24] 王建祥, 张奉春, 刘晓清, 等. 中国成人血小板减少症诊疗专家共识[J]. 中华内科杂志, 2020, 59(7): 498-510.
- Wang JX, Zhang FC, Liu XQ, et al. Expert consensus for diagnosis and treatment of thrombocytopenia in China[J]. *Chin J Intern Med*, 2020, 59(7):498-510.
- [25] Das A, Ranganathan V, Umar D, et al. Effector/memory CD4 T cells making either Th1 or Th2 cytokines commonly co-express T-bet and GATA-3 [J]. *PLoS One*, 2017, 12(10):e185932.
- [26] Hoyler T, Connor CA, Kiss EA, et al. T-bet and Gata3 in controlling type 1 and type 2 immunity mediated by innate lymphoid cells[J]. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25(2):139-147.
- [27] Kanhere A, Hertweck A, Bhatia U, et al. T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements[J]. *Nat Commun*, 2012, 3:1268.

(编辑 祁方昉)