

胸腺肽类药物对体外诱导 ES 细胞分化为 T 细胞的作用

彭延文¹, 徐霖¹, 张秀明², 张嘉晴³, 李树浓², 项鹏²

(1 中山大学中山医学院免疫教研室, 广东 广州 510080; 2. 中山大学干细胞与组织工程研究中心, 广东 广州 510080; 3. 暨南大学医学院生化教研室, 广东 广州 510630)

摘要: 【目的】研究目前临床常用的增强细胞免疫功能的胸腺肽, 胸腺 5 肽和胸腺素 - 1 在小鼠胚胎干细胞向 T 淋巴细胞分化过程中的作用。【方法】借助小鼠胚胎干细胞(ESC)体外自然分化形成的类胚体(EB)中含有三胚层细胞的独特细胞环境, 加入多种细胞因子和胸腺多肽, 体外诱导小鼠 ESC 向 T 淋巴细胞分化。利用流式细胞仪检测在三种不同胸腺多肽的诱导下, 不同时间点的小鼠 ESC 来源的细胞表面 CD3 分子的表达水平。并在相应时间点通过 RT-PCR 检测与 T 淋巴细胞发育密切相关的 Notch 信号分子的转录水平。【结果】在加入胸腺肽和胸腺素 - 1 诱导的实验组, 均有细胞表达 CD3 分子, CD3⁺细胞的百分比随诱导时间的增加而增多; 而加入胸腺五肽的实验组无 CD3⁺细胞出现。加入胸腺素 - 1 和胸腺肽的实验组, 有 Notch1 及其配体 delta-like-1 和 delta-like-4 的转录; 而加入胸腺五肽的实验组的细胞无 Notch1 及其配体转录。【结论】胸腺素 - 1 或胸腺肽可能通过影响 Notch1 信号途径支持 ES 细胞向 T 细胞分化, 而胸腺五肽无此作用。

关键词: 胚胎干细胞; T 淋巴细胞; 胸腺 5 肽; 胸腺素 - 1; 胸腺肽

中图分类号: R392.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)06-0627-04

Effects of Thymic Polypeptides on Thymopoiesis of Mouse Embryonic Stem Cells

PENG Yan-wen¹, XU Lin¹, ZHANG Xiu-ming², ZHANG Jia-qing³, LI Shu-nong², XIANG Peng²

(1. Department of Immunology, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Center for Stem Cell Biology and Tissue Engineering, SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China;

3. Department of Biochemistry, Medical School, Jinan University, Guangzhou 510000, China)

Abstract: 【Objective】To compare the effects of three thymic polypeptides including thymopentin-5 (TP5), thymosin- α 1 (T-1) and thymopeptides on the thymopoiesis of mouse embryonic stem (ES) cells in vitro.

【Method】EBs were obtained from spontaneously differentiated ES cells and were induced into T lymphocytes in vitro by utilizing three different inducing media, which contain TP5, T-1, and thymopeptides, respectively. Then the expression of CD3 on these differentiated cells were analyzed by flow cytometry at different time points. At the corresponding time-point, the transcription levels of Notch signal molecules were also detected by RT-PCR.

【Results】The results showed that inducing systems containing either T-1 or thymopeptides promoted the emergence of CD3⁺ cells during the observation period, and the percentage of CD3⁺ cells increased with a longer induction period. However, we never found CD3⁺ cells in the inducing system containing TP5 throughout the inducing period. And Notch 1 receptor and its ligands, involving Delta-like-1 and Delta-like-4, expressed in inducing systems containing either T-1 or thymopeptides. However, neither Notch1 nor its ligands were detected in the inducing system containing TP-5 during the observation period. 【Conclusion】T-1 and thymopeptides may play a role in promoting T cells differentiation from ES cells by Notch1 signal pathway, while TP-5 may not.

Key words: embryonic stem (ES) cells; T cells; thymopentin-5 (TP5); thymosin - 1 (T-1); thymopeptides

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):627-630]

收稿日期: 2007-07-13

基金项目: 广东省社会发展重大专项基金(2005A30201001); 广州市科技计划项目(2006Z2-E4071)

作者简介: 彭延文(1972-), 女, 湖北武汉人, 博士, 讲师, E-mail:tianjt@21cn.com; 项鹏, 通讯作者, 博士, 副教授, 硕士生导师, E-mail:xiangp@mail.sysu.edu.cn

参与特异性免疫应答的 T 淋巴细胞来源于骨髓多能造血干细胞, 经过一系列高度重组和复杂的过程分化成为成熟细胞。这一过程除了需要胸腺基质细胞的辅助外, 包括多种胸腺多肽分子和细胞因子在内的胸腺体液微环境也发挥至关重要的作用^[1]。胸腺基质细胞和胸腺多肽都通过影响多种信号途发挥作用, 近年来的研究结果显示, 其中最重要的是 Notch 信号途径。胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESC) 又称多能干细胞, 是由受孕 3~5 d 的囊胚内细胞团经体外抑制分化培养所得的一种高度未分化细胞, 在适宜的条件下, 可诱导分化为多种成体细胞。因此, 可以通过 ES 细胞建立体外分化模型, 研究不同基因或细胞因子对不同细胞或组织分化的作用^[2,3]。本课题借助 ES 细胞自然分化形成的 EB 中含有三胚层细胞的独特细胞环境, 研究胸腺肽 (thymopeptides)、胸腺素 1 (thymosin-1, T-1) 和胸腺五肽 (thymopentin-5, TP5) 三种胸腺多肽对 T 细胞发育的作用。同时通过提取不同诱导时期的 RNA, 利用特异性引物及 RT-PCR 技术, 结合细胞的表型特点, 分析这三种胸腺多肽是否通过 Notch 信号途径影响 ES 细胞向 T 淋巴细胞分化。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞系 小鼠胚胎干细胞 E14.1: 建株自 129sv(H-2^b) 雄性小鼠胚胎, 由中山大学附属第二医院儿科黄绍良教授赠送。

1.1.2 主要试剂 高糖 DMEM 培养液、胎牛血清、青霉素钠、链霉素为美国 GibcoBRL 公司产品。白血病抑制因子 (LIF): Chemicon 公司小鼠干细胞因子 (Stem cell factor, SCF)、小鼠白细胞介素-3 (Interleukin-3, IL-3)、小鼠白细胞介素-7 (Interleukin-6, IL-7)、小鼠 Flt-3 配体 (Flt-3 ligand, Flt-3L) 为美国 Perprotech 公司产品。注射用胸腺肽为北京赛生药业有限公司产品, 日达仙胸腺素 α 1 为 Scidone 公司产品, 胸腺 5 肽为海南中和药业有限公司产品。大鼠抗小鼠 CD3e-Cy5 荧光标记抗体, 大鼠抗小鼠 CD3e-Cy5 荧光标记抗体为 eBioscience 公司。逆转录试剂盒: Fermentas 公司。

1.1.3 引 物 引物由上海生物工程公司合成。Notch1: GGAGCGGTGTGAGGGTGATG, ATCTGCGG

TGGGGGAATCTC; Jagged-1: TCTCTGACCCCTGC CATAAC, TTTTACAGGGGTTGCTCTCG; Jagged-2: GCAAAGAAGCCGTGTGTA, TAATAGCCGCCA ATCAGGTT; Delta-like-1: CCTCGGGATCACGC CTTTG, AGACCACCACAGCAGCACAG; Delta-like-4: GCACCAACTCCTTCGTCGTC, TCACAAAA CAGACCTCCCCA; β -actin: GATGACGATATCGCT GCGCTG, GTACGACCAGAGGCATAC.

1.2 培养液的配制

ES 培养液: 在 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 完全培养液中加入 LIF, 使其终浓度为 1 U/L LIF。EB 培养液: 为含 15% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液。

1.3 制备合适的类胚体

取生长状态好的 ES 细胞, 经胰酶消化成单细胞, 用 EB 培养液制成单细胞悬液, 转入 60 mm Petri dish 中培养。

1.4 诱导细胞分化

待 EB 生长 5~7 d 后, 转入诱导分化液中继续培养, 体外诱导 EB 内细胞向 T 细胞分化。首先参照常规 ES 诱导分化为造血细胞的方法设立对照组, 将筛选后的 EB 转入含 SCF, IL-3, IL-7 和 Flt-3L 的 EB 培养液内培养。实验分为 3 组: 第 1 组在常规加入 SCF, IL-3, IL-7 和 Flt-3L 的基础上, 添加了胸腺 5 肽 50 μ g; 第 2 组在加入常规细胞因子的基础上添加胸腺素 1 10 μ g; 第 3 组在加入常规细胞因子的基础上添加胸腺肽 50 μ g。在诱导分化培养的过程中, 常规换液, 去除死细胞等影响 EB 生长的不利因素, 定期在显微镜下观察 EB 的状态。

1.5 诱导细胞的表型检测

分别在诱导分化后第 8、15、22 天收集诱导分化培养液中的 EB, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤后, 加入适量胰酶消化成单细胞, 经台盼蓝染色后显微镜下计数活细胞, 并用 4% 的多聚甲醛固定细胞。加入大鼠抗小鼠 CD32/16 单克隆抗体, 以封闭非特异性结合位点。再分别加入 1 μ g 大鼠抗小鼠 CD3e-Cy5 荧光标记抗体, 利用流式细胞仪检测 EB 中表达 T 细胞表型的细胞。

1.6 RNA 抽提

分别收集诱导分化后第 8、15、22 天的胚体, 常规抽提 RNA。将抽提 RNA, 并用 DNA 酶处理。37 $^{\circ}$ C 处理 30 min, 酶解基因组 DNA。样品中加入

1 μ L 25 mmol/L EDTA, 65 $^{\circ}$ C 处理 10 min 灭活 DNase I。预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 60 $^{\circ}$ C 1 min, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。反应结束后, 取 10 μ L 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 鉴定 PCR 产物。

2 结 果

2.1 诱导分化三周内细胞表型变化

在诱导分化第 8 天检测对照组和实验组 EBs 中的细胞表型, 结果显示没有 CD3⁺ 细胞出现。第 15 天时, 再检测不同诱导体系中 EB 中细胞表型, 结果显示加入胸腺素 1 和胸腺肽的 EB 中的细胞出现 T 细胞特异性的 CD3 分子的表达, CD3⁺ 细胞分别占总细胞数的 6% 和 6.2%。至诱导分化的第 22 天, 流式细胞仪检测的结果显示, 加入胸腺素 1 诱导的 EB, CD3⁺ 的 T 细胞为 12.1%, 而加入胸腺肽诱导的 EB 中, CD3⁺ 的 T 细胞为 13.4%。而加入胸腺五肽的实验组和对照组一样, 均无 CD3⁺ 细胞出现(图 1)。

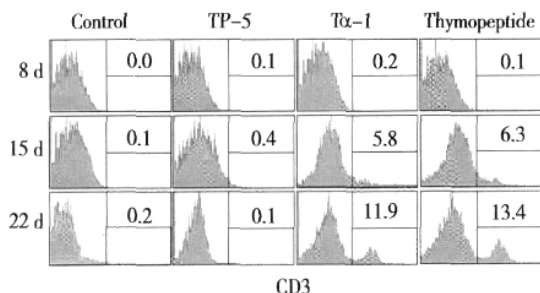


图 1 诱导细胞表面 CD3 分子的表达

Fig.1 Expression of CD3 molecule on embryonic stem (ES) cells after induction

2.2 不同诱导时间细胞内 Notch 及配体转录水平

诱导分化的第 8 天和第 15 天, 加入胸腺素 1 和胸腺肽的 EB 中有 Notch1 及其配体 delta-like-1 转录。第 22 天时, EB 中不仅有 Notch1 及其配体 delta-like-1 转录, 还有 delta-like-4 转录。而加入胸腺五肽诱导的 EB 和对照组的细胞则无 Notch1 及其配体转录(图 2)。

3 讨 论

胸腺肽、胸腺素 1 和胸腺五肽是目前临床广泛应用于免疫功能低下所致疾病的治疗药物^[4-7]。胸腺肽是由动物胸腺提取物制成, 主要成份是胸

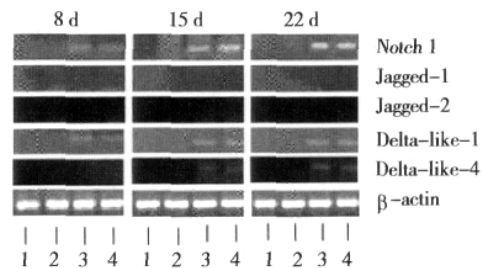


图 2 诱导细胞内 Notch1 分子及其配体的表达

Fig.2 The expression of Notch1 and its ligands in embryonic stem (ES) cells in response to in vitro TP5, T α -1, thymopeptide treatment

1: control; 2: TP5; 3: T α -1; 4: thymopeptide

腺素 1 和一些小分子多肽; 胸腺素 1 是人工合成的含 28 个氨基酸的多肽分子; 胸腺五肽是人工合成的胸腺生成素的免疫活性中心的一个五肽片段。药理学研究发现这些胸腺肽均可增强外周血淋巴细胞的反应性, 产生白细胞介素-2 增多, 受有丝分裂原刺激后, 转化能力增强等, 但其作用机制尚未完全明了。由于胸腺多肽主要在胸腺内产生, 因而考虑它们也可能在 T 细胞胸腺发育期发挥作用, 通过影响 T 细胞的发育成熟来调节机体的免疫功能, 也有少量的研究表明胸腺肽有这样的作用^[8]。但由于以往研究的模型必须依赖胸腺器官培养体系或使用有正常胸腺的动物, 因此, 还没有直接的证据显示这些胸腺肽是否影响 T 细胞的胸腺发育过程以及作用的时期。

ES 细胞具有无限增殖和多向分化的潜能, 在去抑制其分化的因素如 LIF 后, 能在体外自然分化形成具有三个胚层细胞的 EB。在此基础上添加诱导细胞定向分化的细胞因子, 可诱导细胞在体外分化为多种成体细胞。本研究利用 ES 细胞的这种特性, 通过添加胸腺多肽体外诱导 ES 细胞分化为 T 淋巴细胞, 提供了直接研究胸腺多肽对 T 淋巴细胞发育的作用的模型。胸腺素 1 和胸腺肽能在 SCF, IL-3 和 IL-7 等细胞因子的辅助下, 体外诱导 ES 细胞分化为表达 T 细胞特征性表面分子的细胞。而胸腺五肽不能在细胞因子的辅助下, 体外诱导 ES 细胞分化为表达 T 细胞特征性表面分子的细胞。这一结果提示, 胸腺多肽是一组复杂的体液调节因子, T-1 和胸腺肽对 T 细胞成熟的作用与 TP5 促进 T 细胞成熟的作用是不同的。

在造血干细胞向各种血细胞发育过程中, 基质细胞和体液因子都通过细胞内的不同信号途径影响细胞的分化, Notch 是影响 T 细胞分化的一个

重要的信号途径。现在已知 Notch1 通过提供直接信号促进 CLP 向 T 细胞分化, 同时抑制其向 B 细胞的分化来调节 T 细胞发育成熟的起始阶段。HSCs 若失去 Notch1 功能将抑制 T 细胞的分化, 导致胸腺内未成熟 B 细胞大量聚集。相反, 若 Notch1 功能过强将抑制 B 细胞发育, 导致骨髓中出现大量的 T 细胞。Notch 途径还在维持 HSC 细胞、调节胸腺细胞表达 TCR 或 TCR 以及促进 CD4⁺ 或 CD8⁺ 细胞成熟方面发挥作用^[9-13]。Notch 的不同配体与 Notch 受体结合后也影响 T 细胞的发育过程^[14], 其中 delta-like-1 的作用最为明显。Zuniga-Pflucker 的实验组就是通过在培养体系中提供 delta-like-1 配体激活 Notch 信号, 首次在体外不依赖胸腺组织细胞从 HSCs 诱导出成熟的有功能的 T 细胞^[15]。尽管现在 Notch 介导 T/B 细胞分化的细胞和分子基础还有许多疑问存在, 如相关前体细胞的特性, Notch 配体的在 T 细胞发育过程中具体的作用, 其它的 Notch 家族成员的功能, 下游信号途径和相关的靶基因等。但 Notch 在造血细胞生成的许多阶段发挥关键性作用, 对造血干细胞和相关细胞群的自我更新和分化具有潜在调节作用, 影响发育中的淋巴细胞中的许多下游分化物质等作用毋庸置疑的。

本实验中我们分别检测了细胞因子加上胸腺素 1、胸腺肽或胸腺五肽诱导条件下, 不同诱导时间的细胞内 Notch1 信号的转录水平。结果显示加入胸腺素 1 和胸腺肽的诱导环境中, 不仅诱导出表达 T 细胞表型的细胞, 而且这些细胞均有 Notch1 分子及其配体 delta-like-1 和 delta-like-4 的表达。而加入胸腺五肽的诱导环境下, 既无表达 T 细胞表型的细胞出现, 也未检测到 Notch1 分子及其配体的转录。这一结果说明细胞因子加上胸腺素 1 或胸腺肽的共同作用, 在 EB 中激活了 Notch1 信号途径, 并通过 Notch1 的作用在体外诱导出具有 T 细胞表型的细胞。而细胞因子和胸腺五肽的组合不能激活 Notch1 信号途径, 不能在体外诱导 ES 细胞分化为 T 细胞表型的细胞。

参考文献:

- [1] DANIEL H D, TOMOO U, CHIDGEY A P, et al. Controlling the thymic microenvironment [J]. *Curr Opin Immunol*, 2005, 17(2): 137-143.
- [2] 赵明, 任彩萍. 胚胎干细胞诱导分化的研究进展 [J]. *生命科学*, 2005, 17(1): 19-24.
- [3] 章静波, 宗书东, 马文丽. 干细胞 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2003:21-23.
- [4] REYZER M L, CALDWELL R L, DUGGER T C, et al. Early changes in protein expression detected by mass spectrometry predict tumor response to molecular therapeutics [J]. *Can Res*, 2004, 64(24): 9093-9100.
- [5] SHRIVASTAVA P, SINGH S M, SINGH N. Effect of thymosin alpha 1 on the antitumor activity of tumor-associated macrophage-derived dendritic cells [J]. *J Biomed Sci*, 2004, 11(5): 623-630.
- [6] LIAW Y F. Thymalfasin (thymosin-alpha 1) therapy in patients with chronic hepatitis B [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 19(12): S73-75.
- [7] 林炳亮, 黄桂梅, 林潮双, 等. 胸腺肽 1 促进拉米夫定抗乙型肝炎病毒的疗效 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2003, 24(5): 488-491.
- [8] 钟英英. 胸腺肽的研究现状和临床应用 [J]. *中南药学*, 2005, 3(2): 116-118.
- [9] DEFTOS M L, HUANG E, OJALA E W, et al. Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes [J]. *Immunity*, 2000, 13(1): 73-84.
- [10] ROBEY E, CHANG D, ITANO A, et al. An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages [J]. *Cell*, 1996, 87(3): 483-492.
- [11] DOERFLER P, SHEARMAN M S, PERLMUTTER R M. Presenilin-dependent gamma-secretase activity modulates thymocyte development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(16): 9312-9317.
- [12] DEFTOS M L, H Y W, OJALA E W, et al. Correlating Notch signaling with thymocyte maturation [J]. *Immunity*, 1998, 9(6): 777-786.
- [13] GRAHAM A, WILLIAM E J, TERRY J, et al. Establishment and functioning of intrathymic microenvironments [J]. *Immunol Rev*, 2006, 209(1): 10-27.
- [14] ANA C J, HELIA N, ERIK H, et al. Differential Effects of Notch Ligands Delta-1 and Jagged-1 in Human Lymphoid Differentiation [J]. *J Exp Med*, 2001, 194(7): 991-1002.
- [15] THOMAS M S, RENEE F P, MATTEW A G, et al. Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(4): 410-417.