

## 系统性红斑狼疮患者骨髓基质细胞对造血干(祖)细胞的作用

童秀珍<sup>1</sup>, 李娟<sup>1</sup>, 邹外一<sup>1</sup>, 彭爱华<sup>1</sup>, 张祥忠<sup>1</sup>, 叶玉津<sup>2</sup>, 温春光<sup>1</sup>  
(中山大学附属第一医院 1. 血液科, 2. 风湿科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨系统性红斑狼疮(SLE)患者骨髓基质细胞上清液对造血干(祖)细胞的作用及其机制。【方法】半固体集落培养法观察 28 例活动期 SLE 骨髓基质细胞生长及其上清液对正常细胞、自身骨髓干/祖细胞的抑制作用, 检测 SLE 骨髓基质细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  的水平, RT-PCR 法检测骨髓基质细胞 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达。【结果】① 29% 活动期 SLE 患者骨髓基质细胞的集落数较正常人明显减少 ( $P < 0.05$ )。② 体积分数为 15% 的活动期 SLE 骨髓基质上清液对正常人骨髓、自身 SLE 造血干/祖细胞混合集落(CFU-Mix)的形成较对照组具有明显抑制作用 ( $P < 0.05$ )。③ 活动期 SLE 患者骨髓基质细胞的上清液 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  的水平高于稳定期 SLE 组、正常对照组 ( $P < 0.05$ )。④ 70% 活动期 SLE 患者骨髓基质细胞有 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达, 而正常对照则未见有 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达。【结论】活动期 SLE 患者骨髓基质细胞上清液对正常、自身骨髓造血干(祖)细胞的有抑制作用, 这与其基质细胞存在高表达 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  有关。

**关键词:** 红斑狼疮, 系统性; 骨髓基质细胞; 混合集落形成单位, 造血干/祖细胞;  $\alpha$ -肿瘤坏死因子;  $\gamma$ -干扰素

中图分类号: R593.24

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)02-0146-04

## Study of the Suppressive Effect of Cultured Supernants of Bone Marrow Stromal Cells From Active SLE Patients on Haematopoietic Progenitor Cells

TONG Xiu-zhen<sup>1</sup>, LI Juan<sup>1</sup>, ZHOU Wai-yi<sup>1</sup>, PENG Ai-hua<sup>1</sup>, ZHANG Xiang-zhong<sup>1</sup>,  
YE Yu-jin<sup>2</sup>, WEN Chun-guang<sup>1</sup>

(1. Department of Hematology, 2. Department of Rheumatology, The First Affiliated Hospital,  
SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract** 【Objective】To investigate the suppressive effect of cultured supernants of bone marrow stromal cells (BMSC) from active systemic lupus erythematosus (SLE) patients on haematopoietic progenitor cells and its mechanism. 【Methods】The colony formation of stromal cells was examined in 28 patients with active SLE *in vitro* using methycellulose culture. The suppression of mix colony formation units (CFU-Mix) of BMSC from healthy individuals and SLE was studied *in vitro* with cultured supernants of BMSC from 28 active SLE patients. Cytokine IFN- $\gamma$  and IFN- $\alpha$  were measured in culture supernants with SLE by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The IFN- $\gamma$  mRNA expression of marrow stromal cells from patients with systemic lupus erythematosus was assayed by a semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain (RT-PCR). 【Results】① The number of colonies formation stromal cells from 29% patients with active SLE was lower than that healthy individual ( $P < 0.05$ ). ② Cultured supernants of BMSC

收稿日期: 2003-09-09

基金项目: 广东省卫生厅基金资助项目 (A2003180)

作者简介: 童秀珍 (1965 - ), 女, 江西德安人, 博士, 副教授, E-mail: Tongxz@163.net

from 28 active SLE patients at contained 15% was significantly more suppressive to allogeneic and autologous CFU-Mix growth than that of BMSC from control ( $P < 0.05$ ). ③ The TNF- $\alpha$  or INF- $\gamma$  level in cultured supernatants of BMSC from 28 active SLE patients was higher than that from inactive SLE and healthy control ( $P < 0.05$ ). ④ The expression of mRNA IFN- $\gamma$  transcripts was significantly increased in BMSC of 70% patients with active SLE compared with healthy controls ( $P < 0.01$ ).

【Conclusion】Cultured supernatants of bone marrow stromal cells from active SLE patients may suppress the formation of allogeneic and autologous CFU-Mix, which were related to high level IFN- $\gamma$  and IFN- $\alpha$  in bone marrow stromal cells of SLE patients.

**Key words:** lupus erythematosus, systemic ; bone marrow stromal cells ; colony formation of mix progenitor cells (CFU-Mix) ; TNF- $\alpha$  ; INF- $\gamma$

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci) 2004 25(2):146 - 149]

研究表明系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 骨髓干/祖细胞存在缺陷<sup>[1]</sup>, 但引起干/祖细胞异常的机制并不明确。正常情况下, 骨髓微环境在调节造血干细胞增殖、分化以及造血细胞、免疫活性细胞(淋巴细胞)在骨髓中的滞留定位有重要作用。SLE 患者的骨髓造血微环境中基质细胞生长是否存在异常及其培养上清液对造血干/祖细胞的抑制作用罕见报道。本研究采用体外半固体集落培养方法观察 SLE 患者骨髓基质细胞的生长及培养上清液对造血干/祖细胞的抑制作用。用双抗体夹心 ELISA 法检测其上清细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  的水平, RT-PCR 法检测 SLE 骨髓基质细胞 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

1999 年 12 月至 2002 年 1 月我院住院及门诊的 44 例 SLE 患者, 诊断符合美国风湿病协会 1982 年诊断标准。根据系统性红斑狼疮疾病活动指数 (SLE Disease activity index, SLE DAI) 标准对患者的疾病活动程度进行评分。活动期 28 例, 男 3 例, 女 25 例, 年龄 (25 ± 10) 岁。初发病例 20 例, 未用过免疫抑制药和激素冲击治疗, 复发病例 8 例, 停用泼尼松已 2 个月以上。初发病例外周血象: 红细胞 (3.0 ± 0.4) × 10<sup>12</sup>/L, 血红蛋白 (72 ± 17) g/L, 白细胞 (2.1 ± 1.1) × 10<sup>9</sup>/L, 淋巴细胞绝对值为 (1.2 ± 0.3) × 10<sup>9</sup>/L, 血小板 (66 ± 2.0) × 10<sup>9</sup>/L; 骨髓检查: 21 例病人骨髓增生活跃或增生明显活跃, 7 例病人骨髓增生减低; 外周血抗人球蛋白试验 (Coomb's test): 19 例阴性, 1 例阳性。稳定期 16 例, 女 13 例, 男 3 例, 年龄 (26 ± 9) 岁, 12 例已停用

泼尼松 1 个月以上 4 例每天口服 5 mg 泼尼松维持治疗, 血象在正常范围。

正常骨髓 25 例, 取自本院胸外科非恶性血液病患者手术切除的肋骨, 其骨髓造血功能均正常。男 4 例, 女 21 例, 年龄 35 (22 - 45) 岁。

### 1.2 方法

1.2.1 骨髓基质细胞培养的上清液的制备 按参考文献 [2] 进行, 用淋巴细胞分离液分离骨髓单个核细胞, 洗涤 3 次, 用 RPMI1640 培养液配制成 1 × 10<sup>6</sup>/mL, 取 4 mL 加入 35 mm 直径的平皿中, 加入 0.1 mmol/L 氢化可的松, 37 °C, 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 每周半量换液, 14 d 后计数由 50 个以上梭形细胞组成的细胞集落数。当贴壁细胞铺至 85% ± 90% 瓶底时, 吸除上清, 用 RPMI1640 液洗 2 次, 然后加入等量 RPMI1640 液, 添加终质量浓度为 3 mg/L PHA-P 刺激, 诱导细胞因子分泌, 继续孵育 3 ~ 4 d, 收集培养上清。

1.2.2 骨髓造血干/祖细胞混合集落 (CFU-Mix) 的培养 用甲基纤维素培养法。正常骨髓实验组: 加入终体积分数分别为 5%、10%、15% 活动期 SLE 骨髓基质细胞上清液至正常骨髓 CFU-Mix 培养体系中。自身 SLE 组实验组: 在各实验组加入终浓度为 15% 活动期 SLE 骨髓基质细胞上清液至自身 SLE 骨髓 CFU-Mix 培养体系中。CFU-Mix 培养体系: 1 mL 含经上述处理的单个核细胞 2 × 10<sup>5</sup>, 小牛血清 0.3 mL, 2 mmol/L- 谷氨酰胺, SCF 100 μg/L, IL-3 10 μg/L, GM-CSF 20 μg/L, 促红细胞生成素 2 U/mL, 粒细胞刺激因子 (G-CSF) 10 μg, 23 g/L 甲基纤维素 0.45 mL。培养 7 ~ 10 d 计数集落数, ≥ 40 个细胞为 1 个集落数。

1.2.3 骨髓基质细胞上清液细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  测定 采用双抗体夹心 ELISA 法检测。试

试剂盒为 Genzyme 产品(购自深圳晶美生物工程公司)。

1.2.4 RT-PCR 法检测骨髓基质细胞 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达 按参考文献 [3] 将培养的骨髓基质细胞消化后按常规计数,取  $1 \times 10^7$  个细胞。按厂家说明用 Trizol 试剂(GIBCO/BRL)提取总 RNA。cDNA 合成采用逆转录试剂盒(GIBCO/BRL)。cDNA 进行 PCR 扩增。反应总体积为 50  $\mu$ L,含  $10 \times$  PCR 反应缓冲液 2.5  $\mu$ L、0.2 mmol/L dNTP、0.25  $\mu$ mol/L 上游及下游引物、2.5 U Taq DNA 聚合酶、2  $\mu$ L cDNA 模板。反应条件为:94  $^{\circ}$ C 1 min 变性、60  $^{\circ}$ C 1 min 退火、72  $^{\circ}$ C 1 min 延伸 7 min,共 35 个循环。末次循环 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。以  $\beta$ -肌动蛋白(上游)5'-CAACTCCATCATG AAGTGTAAC-3',(下游)5'-CCACACGGAGTACTTGCCTC-3' 扩增产物 180 bp。IFN- $\gamma$ (上游)5'-ATGAAATATACAAGTTAT ATC-3',(下游)5'-GATGCTCTTCGACCTCGAAAC AGCAT-3' 扩增产物 520 bp。取 10  $\mu$ L 扩增产物在含 0.5  $\mu$ g/mL 溴化乙锭的 20 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯下照相。胶片经激光密度扫描仪扫描,所有扩增产物的吸光度均以  $\beta$ -肌动蛋白为基准校正。

### 1.3 统计方法

测定结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用  $t$  检验、 $\chi^2$  检验。

## 2 结 果

### 2.1 SLE 骨髓基质细胞集落形成

71.4% 活动期 SLE 骨髓基质细胞集落数与正常对照比较 ( $60.5 \pm 11.3$  vs  $65.3 \pm 12.5$ ,  $P > 0.05$ ) 差异无显著性。29% (8/28 例) 活动期 SLE 骨髓基质细胞生长的集落数比正常人明显减少 ( $23.2 \pm 4.2$  vs  $65.3 \pm 12.5$ ,  $P > 0.05$ ), 稳定期 SLE 集落数与正常对照比较 ( $53.2 \pm 9.3$  vs  $65.3 \pm 12.5$ ,  $P > 0.05$ ) 差异无显著性,提示有部分活动期患者的骨髓基质细胞生长有缺陷。

### 2.2 活动期 SLE 骨髓基质细胞上清液对骨髓造血干(祖)细胞的作用

2.2.1 SLE 骨髓基质细胞上清液对正常骨髓造血干(祖)细胞 CFU-Mix 的作用 经体积分数为 5%、10%、15% 活动期 SLE 患者骨髓基质细胞培养上清液作用后,其对 CFU-Mix 的抑制率明显高于正常基质细胞上清液,两者 ( $74\% \pm 6\%$  vs  $5\% \pm$

$2\%$ ,  $79\% \pm 7\%$  vs  $6 \pm 4\%$ ,  $83\% \pm 5\%$  vs  $6\% \pm 3\%$ ) 比较差异均有显著性 ( $P < 0.05$ )。

2.2.2 SLE 骨髓基质细胞上清液对自身骨髓 CFU-Mix 的作用 加入体积分数为 15% 的活动期骨髓基质细胞上清液在自身骨髓 CFU-Mix 培养体系中,抑制率为  $73\% \pm 5\%$ ,而稳定期、正常对照的上清液对骨髓 CFU-Mix 生长抑制作用不明显,抑制率分别为  $7\% \pm 3\%$ 、 $4\% \pm 2\%$ ,前者与后两者比较,  $P < 0.05$ ,提示活动期 SLE 骨髓基质细胞上清液对自身骨髓 CFU-Mix 也有抑制作用。

### 2.3 SLE 骨髓基质细胞培养上清液中细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 的检测

活动期 SLE 组的上清液 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  的水平高于正常对照组、稳定期 SLE 组,见表 1。活动期基质细胞生长良好者与缺陷者 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  的水平,差异无显著性。

表 1 SLE 骨髓基质细胞培养上清 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  的水平  
Table 1 The TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  level in cultured supernatants of bone marrow stromal cells(BMSC) from SLE patients

Group	n	(ng/L)	
		TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
Control SLE	25	6.7 $\pm$ 0.4	18.2 $\pm$ 8.6
Active SLE	28	68.5 $\pm$ 9.3 <sup>1)</sup>	90.5 $\pm$ 15.2 <sup>1)</sup>
Inactive SLE	16	10.7 $\pm$ 6.9	24.3 $\pm$ 10.5
BMSC colony formation of SLE			
Absent	8	70.5 $\pm$ 8.3	92.4 $\pm$ 14.3
Present	20	66.5 $\pm$ 9.2 <sup>2)</sup>	88.6 $\pm$ 13.4

1) Compared with control group,  $P < 0.01$  2) BMSC colony formation of SLE, Absent compared with present,  $P > 0.05$

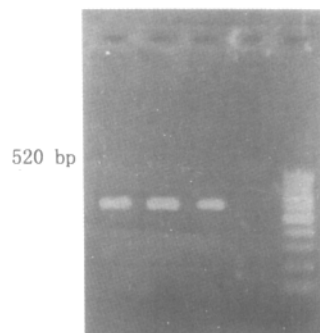


图 1 RT-PCR 检测 SLE 骨髓基质细胞 IFN- $\gamma$  mRNA 表达  
Fig. 1 The expression of IFN- $\gamma$  mRNA of bone marrow stromal cells from SLE by RT-PCR

M: Marker; N: Normal; D1, D2, SLE patient; + Positive control

### 2.4 RT-PCR 法检测 SLE 患者骨髓基质细胞 IFN- $\gamma$ mRNA 的表达

RT-PCR 法检测 20 例活动期有 14 例 SLE 患者

骨髓基质细胞有 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达,而正常对照则未见有 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达(图 1)。

### 3 讨 论

以前研究显示系统性红斑狼疮患者的干/祖细胞有缺陷<sup>[1, 4]</sup>,推测致病因素在损害造血干/祖细胞或诱发免疫异常反应同时累及了造血微环境中基质细胞。骨髓微环境包括多种基质细胞成分及由基质细胞产生的可溶性和膜结合形式的生长因子、黏附分子和细胞外基质成分。基质细胞包括巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞和少量的多能基质干细胞,前者也是重要的抗原提呈细胞,可分泌 IL-1、IL-3、FGF、EPO、GM-CSF 等多种细胞因子<sup>[5]</sup>。

上述细胞因子不仅调节造血干/祖细胞的增殖、分化且对免疫活性淋巴细胞的前体细胞起重要的。骨髓基质细胞分泌异常的细胞因子参与许多疾病的发生、发展。有学者应用 RT-PCR 方法检测了 8 例再生障碍性贫血患者骨髓基质细胞 G-CSF、IL-1b、IL-6、IL-8 及 KLmRNA 表达及其蛋白质水平高于正常对照组<sup>[6]</sup>。

我们应用体外培养技术,观察到大多数患者基质细胞体外生长良好,少数患者生长缺陷或不生长。Otsuka 等<sup>[7]</sup>报道 8 例 SLE 患者骨髓成纤维细胞集落与正常人无差异。另有报道用 5-氟尿嘧啶处理后分离狼疮鼠的造血干细胞体外培养,加入细胞因子 GM-CSF、干细胞因子(SCF)和 IL-3,它不能生长,加入正常骨髓基质细胞则能生长,表明自身免疫狼疮鼠的基质细胞有缺陷。我们的结果及其他研究表明 SLE 骨髓基质细胞的生长存在差异,这与 SLE 是一组异质性疾病有关。

基质细胞可以分泌正性、负性调节细胞因子,两者失平衡时,会对造血产生抑制或功能亢进作用。我们研究的结果发现,加入 15% 的活动期 SLE 上清液对正常造血干(祖)细胞混合集落形成单位(CFU-Mix)的抑制率明显高于正常基质细胞上清液,活动期 SLE 骨髓基质细胞培养液对自身 SLE 造血干(祖)细胞也有抑制作用,说明上清液中有造血抑制物质。进一步证实活动期 SLE 骨髓基质细胞的上清液 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  的水平高于稳定期 SLE 组、正常对照组。而活动期基质细胞生长良好者与

缺陷者 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  的水平无差异。RT-PCR 法检测 SLE 患者骨髓基质细胞有 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达,而正常对照则未见有 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达。说明活动期 SLE 骨髓基质细胞存在高表达 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 。而 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  属于造血负性因子。体外实验证明 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  可直接抑制人骨髓红系、粒系祖细胞的增殖与分化<sup>[8]</sup>。高表达 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  除与疾病的活动性有关,还可抑制造血干、祖细胞的增殖与分化。换言之,SLE 造血干细胞的存在缺陷与骨髓基质细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  增多抑制造血有关。

参考文献:

- [1] Ikehara S. Bone marrow transplantation for autoimmune disease [J]. *Acta Haematol*, 1998, 99(3): 116-9.
- [2] 黄耘,李树浓,罗学群等. 全反式维甲酸对急性淋巴细胞白血病骨髓基质细胞粘附能力的影响[J]. *中山医科大学学报* 2001 22(5): 369-71.
- [3] Csizsar A, Nagy G, Gergely P, *et al.* Increased interferon-gamma, IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 122(3): 464-70.
- [4] 童秀珍,叶任高,罗绍凯等. 系统性红斑狼疮患者血清对正常造血干细胞(祖)细胞的抑制作用[J]. *中华皮肤科杂志* 2002 35(4) 266-8.
- [5] Sensebe L, Deschaseaux M, Li J, *et al.* The broad spectrum of cytokine gene expression by myoid cells from the human marrow microenvironment[J]. *Stems Cells*, 1997, 15(2): 133-7.
- [6] Nissen C, Wondnar-Filipowicz A, Slanincka-Krieger M, *et al.* Persistent growth impairment of bone marrow stroma after antilymphocyte globulin treatment for severe aplastic anaemia and its association with relapse[J]. *Eur J Haematol*, 1995 55(6): 255-61.
- [7] Otsuka T, Nagasawan K, Haradan M, *et al.* Bone marrow microenvironment of patients with systemic lupus erythematosus[J]. *J Rheumatol*, 1993, 20(6): 961-71.
- [8] Rusten L S, Jacobsen S E. Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) directly inhibits human erythropoiesis *in vitro*: role of p55 and p75 TNF receptors[J]. *Blood*, 1995, 85(6): 989-1002.

(编辑 黄小延)