

环磷酰胺联合间充质干细胞对干扰素- γ 诱导的32D细胞凋亡的影响及机制

王莉 穆慧 林赠华 张琳琳 徐亚 刘红

南通大学附属医院血液科 226000

通信作者:刘红,Email:hongliu63@126.com

基金项目:国家自然科学基金(81070400);江苏省“强卫工程”医学重点学科(zdxkb2016009)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.02.013

The effects of cyclophosphamide binding mesenchymal stem cells on IFN- γ induced 32D cells apoptosis and its mechanism

Wang Li, Mu Hui, Lin Zenghua, Zhang Linlin, Xu Ya, Liu Hong

Department of Hematology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China

Corresponding author: Liu Hong, Email:hongliu63@126.com

再生障碍性贫血(AA)是一组通过不同机制引起的骨髓造血干/祖细胞生成减少及功能异常的骨髓造血功能衰竭综合征。活化的T淋巴细胞及其分泌的淋巴因子导致的造血干细胞过度凋亡在AA发病中起主导作用^[1],目前AA的一线治疗为免疫抑制治疗(IST)及造血干细胞移植(HSCT)。环磷酰胺(CTX)曾是AA的二线疗法,因其骨髓抑制严重而逐渐被淘汰^[2]。最新研究显示CTX等细胞毒药物在杀伤肿瘤细胞同时,会通过激活WNT信号通路促进肿瘤干细胞的增殖^[3],提示CTX治疗AA的机制与抗胸腺细胞球蛋白(ATG)可能不完全相同。

近来的研究证实AA骨髓微环境的改变,如间充质干细胞(MSC)对造血干/祖细胞的异常调节可能是AA发病的另一个重要机制^[4]。我们前期的研究证实了重型AA(SAA)小鼠模型中骨髓MSC(BM-MSC)过度衰老,且mTOR通路激活可能是导致其衰老发生的机制^[5]。既然AA小鼠BM-MSC由于衰老而影响了骨髓微环境对正常造血的支持及免疫耐受,是否可以通过减少CTX的剂量以减轻其对造血细胞的抑制,同时又通过加入正常MSC来进一步诱导免疫耐受并同时促进造血恢复? IFN- γ 是干细胞和前体细胞增殖和存活的负性调节剂,可以抑制造血细胞系的形成,高表达的IFN- γ 能够促进造血细胞凋亡,抑制骨髓造血功能^[6-8]。既往实验中,我们曾用小鼠造血干/祖细胞——32D细胞,观察到IFN- γ 可以通过干扰PI3K/Akt信号通路抑制干/祖细胞的增殖^[9]。本实验中我们继续以32D细胞作为靶细胞,在32D细胞中加入IFN- γ ,以模拟活化T淋巴细胞分泌的淋巴因子对造血干/祖细胞的抑制,再分别观察CTX、CTX联合MSC对IFN- γ 处理后的32D细胞增殖及凋亡的影响并探讨其可能的机制。

材料与方 法

1. 试剂与仪器:CTX为美国Selleck公司产品;RPMI 1640培养液、DMEM-F12培养液、2.5 g/L胰蛋白酶-EDTA和胎牛血清为美国Gibco公司产品;CCK-8试剂盒购于日本同仁化学研究所;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒为江苏凯基生物有限公司产品;小鼠MSC表型鉴定试剂盒购于美国Bio-Techne公司;IFN- γ 和IL-3为美国PeproTech公司产品;non-p- β -catenin、cleaved-caspase3、CD44、 β -actin、c-myc等兔抗鼠单抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗为美国CST公司产品;PVDF膜为美国Millipore公司产品;SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、ECL发光液和SDS上样缓冲液为中国新赛美公司产品;Western blot全套仪器为美国Bio-Rad公司产品;FACS Calibur流式细胞仪为美国BD公司产品;全自动酶标仪为美国BioTek公司产品。

2. 细胞培养:32D细胞由美国俄亥俄州Toledo大学董凡教授提供,为未分化原始细胞,生长和增殖依赖IL-3的存在,培养于含10%胎牛血清、1%青链霉素溶液和1%IL-3的RPMI 1640培养液中,置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱,2~3d传代1次,取对数生长期细胞用于实验。

3. 小鼠MSC的分离、培养:雌性BABL/c小鼠由南通大学医学院实验动物中心提供,20只,清洁级,8~12周龄,体重18~22g。断颈处死小鼠,75%乙醇浸泡5min后,无菌条件下取胫骨与股骨,含10%胎牛血清和1%青链霉素溶液的DMEM-F12完全培养基冲洗骨髓腔3~4次,充分混匀细胞悬液,接种于25cm²培养瓶中,37℃、5%CO₂、饱和湿度培养,每3d换液1次。当细胞生长融合达70%~80%时,用2.5g/L胰蛋白酶-EDTA消化细胞,显微镜下控制消化时间,

按 1:3 传代,取第 3~4 代细胞用于实验。

4. 实验分组:取第 3 代 MSC,调整细胞密度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$,接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 完全培养基的 6 孔板中,待 MSC 完全贴壁后去上清,接种细胞密度为 $10^6/\text{ml}$ 的 32D 细胞于 MSC 上层,两者用 RPMI 1640 完全培养基共培养。未加 IFN- γ 组:分别设正常对照组、CTX 组和 CTX+MSC 组;加 IFN- γ 组:接种 IFN- γ 处理 24 h 的 32D 细胞于 MSC 上层,分别设 IFN- γ 组、IFN- γ +CTX 组、IFN- γ +MSC 组和 IFN- γ +CTX+MSC 组。实验重复 3 次,设 3~4 个复孔。

5. 细胞增殖抑制实验:取 32D 细胞,调整细胞密度为 $10^6/\text{ml}$,96 孔板中每孔加入 90 μl 的细胞悬液,在培养箱中预培养细胞,向培养板中加入 10 μl 不同浓度的 CTX 培养 24 h,每孔加入 10 μl CCK-8,培养 4 h 后用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值。

6. Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率:收集处理后细胞,加入 5 μl PI 和 5 μl Annexin V-FITC,室温避光孵育 20 min 后上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

7. Western blot 法检测蛋白表达水平:收集处理后细胞,加入细胞裂解液混匀后冰上裂解 60 min,12 000 r/min(离心半径 16 cm),4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 后收集上清,检测蛋白浓度后,进行 SDS-PAGE 后转膜至 PVDF 膜上,50 g/L 脱脂牛奶室温封闭 2 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗过夜,次日 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,室温孵育相应二抗 2 h,TBST 洗涤 3 次(每次 10 min)后进行 X 线片显影,扫描后与内参进行对比分析计算各蛋白的表达量。

8. 统计学处理:采用 Graphpad Prism 6.0 软件进行数据分析及绘图,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述,两组间均数比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. IFN- γ 对 32D 细胞增殖与凋亡的影响:使用 IFN- γ 在体外模拟活化 T 淋巴细胞分泌的淋巴因子对造血干/祖细胞的抑制作用,结果显示 IFN- γ 浓度在 $10^2 \sim 10^3 \text{U/ml}$ 时抑制 32D 细胞的增殖(表 1),当 IFN- γ 浓度为 10^3U/ml 时,和未加 IFN- γ 组相比,细胞增殖率差异有统计学意义。流式细胞仪检测不同浓度 IFN- γ 对 32D 细胞凋亡的影响,结果显示 IFN- γ 浓度在 $10^2 \sim 10^3 \text{U/ml}$ 时,32D 细胞凋亡率增加(表 1)。本研究中,我们选择 10^3U/ml IFN- γ 用于后续实验。

2. CTX 对 IFN- γ 诱导的 32D 细胞的影响:CTX 对 32D 细胞增殖的影响见表 2,CTX 呈剂量依赖性抑制 32D 细胞的增殖。当 10^3U/ml IFN- γ 作用 32D 细胞 24 h 后,使用不同浓度的 CTX 干预 IFN- γ 诱导后的 32D 细胞,CTX $\leq 200 \mu\text{mol/L}$ 时,对 IFN- γ 诱导的 32D 细胞无抑制作用(非细胞毒性)(表 3),综合考虑,我们选择非细胞毒作用的 200 $\mu\text{mol/L}$ CTX 用于后续实验。

3. MSC 对 IFN- γ 诱导的 32D 细胞的影响:MSC 与正常条件下的 32D 细胞共同培养后,MSC 对正常的 32D 细胞的增

表 1 不同浓度 IFN- γ 干预 32D 细胞 24 h 的增殖及凋亡情况 ($\bar{x} \pm s$)

| IFN- γ 浓度(U/ml) | 细胞增殖率 | 细胞凋亡率(%) |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 0 | 1.000 \pm 0.000 | 2.230 \pm 0.141 |
| 10^2 | 0.986 \pm 0.037 | 2.503 \pm 0.276 |
| 10^3 | 0.869 \pm 0.033 ^a | 4.347 \pm 1.321 ^a |
| 10^4 | 1.046 \pm 0.061 | 2.827 \pm 0.550 |
| 10^5 | 0.475 \pm 0.034 ^a | 4.620 \pm 1.246 ^a |

注:与未加 IFN- γ 组比较,^a $P < 0.05$ 。实验重复 3 次,设 3~4 个复孔

表 2 不同浓度环磷酰胺(CTX)作用 32D 细胞 24 h 和 48 h 的增殖情况($\bar{x} \pm s$)

| CTX 浓度($\mu\text{mol/L}$) | 细胞增殖率 | |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | 24 h | 48 h |
| 0 | 1.000 \pm 0.000 | 1.000 \pm 0.000 |
| 10 | 1.028 \pm 0.063 | 1.032 \pm 0.052 |
| 20 | 1.016 \pm 0.038 | 1.031 \pm 0.038 |
| 40 | 0.981 \pm 0.112 | 0.974 \pm 0.151 |
| 80 | 0.965 \pm 0.046 | 1.077 \pm 0.086 |
| 100 | 0.946 \pm 0.046 | 0.935 \pm 0.170 |
| 200 | 0.990 \pm 0.032 | 0.959 \pm 0.032 |
| 400 | 0.994 \pm 0.137 | 0.980 \pm 0.121 |
| 800 | 0.884 \pm 0.120 | 0.920 \pm 0.253 |
| 1 000 | 0.765 \pm 0.039 | 0.760 \pm 0.345 |
| 2 000 | 0.674 \pm 0.109 ^a | 0.663 \pm 0.274 ^a |
| 4 000 | 0.470 \pm 0.101 ^a | 0.369 \pm 0.085 ^a |

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ CTX 组比较,^a $P < 0.05$ 。实验重复 3 次,设 3 个复孔

表 3 不同浓度环磷酰胺(CTX)对 IFN- γ 诱导的 32D 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 细胞增殖率 |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 正常对照 | 1.000 \pm 0.000 |
| 10^3U/ml IFN- γ | 0.870 \pm 0.053 ^a |
| 10^3U/ml IFN- γ +10 $\mu\text{mol/L}$ CTX | 0.927 \pm 0.019 |
| 10^3U/ml IFN- γ +20 $\mu\text{mol/L}$ CTX | 0.891 \pm 0.057 |
| 10^3U/ml IFN- γ +40 $\mu\text{mol/L}$ CTX | 0.876 \pm 0.070 |
| 10^3U/ml IFN- γ +80 $\mu\text{mol/L}$ CTX | 0.913 \pm 0.056 |
| 10^3U/ml IFN- γ +100 $\mu\text{mol/L}$ CTX | 0.888 \pm 0.047 |
| 10^3U/ml IFN- γ +200 $\mu\text{mol/L}$ CTX | 0.964 \pm 0.057 |
| 10^3U/ml IFN- γ +400 $\mu\text{mol/L}$ CTX | 0.839 \pm 0.131 |
| 10^3U/ml IFN- γ +800 $\mu\text{mol/L}$ CTX | 0.713 \pm 0.062 ^b |
| 10^3U/ml IFN- γ +1 000 $\mu\text{mol/L}$ CTX | 0.578 \pm 0.080 ^b |

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与 10^3U/ml IFN- γ 组比较,^b $P < 0.05$ 。实验重复 3 次,设 4 个复孔

殖(1.089 \pm 0.224 对 1.000 \pm 0.000, $P = 0.562$)无明显影响。MSC 与 IFN- γ 诱导的 32D 细胞共培养后,MSC 可以促进 32D 细胞的增殖(1.182 \pm 0.102 对 1.000 \pm 0.000, $P = 0.027$)。

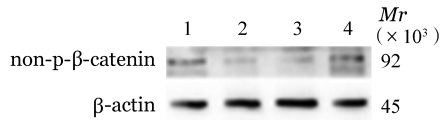
4. CTX 联合 MSC 对 IFN- γ 诱导的 32D 细胞的影响及机制:Annexin V-FITC/PI 双染法检测正常对照组、CTX 组、MSC 组和 CTX+MSC 组细胞凋亡率,差异无统计学意义

(表4)。10³ U/ml IFN-γ培养32D细胞24 h后,流式细胞仪检测IFN-γ组、IFN-γ+CTX组、IFN-γ+MSC组和IFN-γ+CTX+MSC组细胞凋亡率,结果显示200 μmol/L CTX联合MSC可以最大程度减少IFN-γ诱导的32D细胞凋亡,差异有统计学意义($P < 0.05$) (表4)。WNT/β-catenin通路激活后,β-catenin由胞质入核,p-β-catenin表达增加,non-p-β-catenin表达减少。Western blot检测结果显示,与IFN-γ组相比,IFN-γ+CTX+MSC组non-p-β-catenin表达下调,而与干细胞相关的WNT通路相关基因c-myc、CD44和Id2表达增强,提示32D细胞增殖(图1~3)。

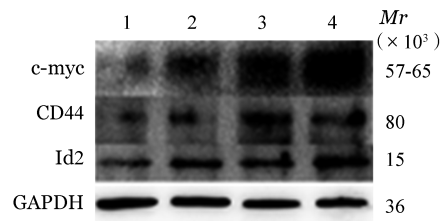
表4 不同条件下培养32D细胞24 h的凋亡情况($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 细胞凋亡率(%) |
|----------------|--------------------------|
| 正常对照组 | 0.867±0.115 |
| CTX组 | 0.800±0.267 |
| MSC组 | 0.733±0.321 |
| CTX+MSC组 | 0.667±0.115 |
| IFN-γ组 | 12.530±2.383 |
| IFN-γ+CTX组 | 10.880±3.281 |
| IFN-γ+MSC组 | 9.607±2.245 |
| IFN-γ+CTX+MSC组 | 6.530±2.011 ^a |

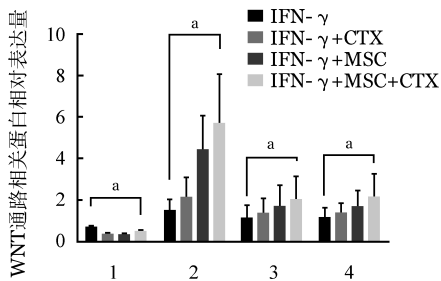
注:CTX:200 μmol/L环磷酰胺;MSC:间充质干细胞。实验重复3次,设3个复孔。与IFN-γ组相比,^a $P < 0.05$



1:IFN-γ组;2:IFN-γ+CTX组;3:IFN-γ+MSC组;4:IFN-γ+CTX+MSC组
图1 适量环磷酰胺(CTX)联合间充质干细胞(MSC)对IFN-γ诱导的32D细胞WNT/β-catenin信号通路的影响



1:IFN-γ组;2:IFN-γ+CTX组;3:IFN-γ+MSC组;4:IFN-γ+CTX+MSC组
图2 适量环磷酰胺(CTX)联合间充质干细胞(MSC)对IFN-γ诱导的32D细胞WNT通路相关基因表达的影响



1: non-p-β-catenin; 2: c-myc; 3: CD44; 4: Id2

图3 适量环磷酰胺(CTX)联合间充质干细胞(MSC)对IFN-γ诱导的32D细胞WNT通路相关蛋白相对表达量的影响($P < 0.05$)

讨论

CTX是临床上常用的细胞毒性药物,可杀伤异常活化的T细胞。WNT通路分为经典和非经典,经典的WNT/β-catenin信号通路对造血干细胞自我更新和扩增的调控有重要意义,对血液系统恶性肿瘤中肿瘤干细胞的发展也是必备的,激活后能上调原始红细胞生成的关键转录因子和造血细胞表面的特异性标志物^[10]。最新研究显示,CTX等细胞毒药物会通过激活WNT信号通路促进肿瘤干细胞的增殖,而且WNT通路在正常造血干细胞的增殖、分化中有重要作用^[3],因而我们研究既能避免较高死亡率又能达到治疗目的的最适CTX浓度,并探究治疗AA的机制。本研究选用小鼠多能造血干/祖细胞,即32D细胞作为实验对象,以IFN-γ模拟活化T淋巴细胞分泌的淋巴因子对造血干/祖细胞的抑制,结果表明一定浓度的IFN-γ可以引起32D细胞凋亡,与我们之前的研究结果一致,本实验观察到CTX浓度小于200 μmol/L时,CTX对IFN-γ诱导的32D细胞无细胞毒性,所以选择非细胞毒性浓度CTX(200 μmol/L)用于实验。

与正常人相比,AA患者MSC形态异常,增生减低、凋亡增加,易分化成脂肪细胞^[4],但是MSC异常的机制目前尚不明确。MSC通过细胞与细胞的直接接触及旁分泌功能调节多种免疫细胞^[11]。MSC临床应用的首次成功就是将单倍型相合骨髓来源的MSC输注至环孢素A和类固醇抵抗的IV级急性GVHD患者体内。本研究中我们发现正常MSC可以减少IFN-γ诱导的细胞凋亡,同时non-p-β-catenin表达量减少,提示WNT通路激活。

曾有研究证明AA小鼠使用大剂量CTX处理后,仅少数小鼠存活,然而输注MSC后,存活小鼠比例增加,其机制尚不明确。我们使用适量CTX联合MSC后,IFN-γ诱导的细胞凋亡减少,non-p-β-catenin蛋白表达减少,推测MSC与CTX协同减少细胞凋亡,可能与WNT通路有关。然而,信号通路是一个复杂的网络系统,复杂性有待我们进一步研究。李清等^[12]提出IFN-γ预处理的MSC治疗可大大提高GVHD小鼠的存活率,所以我们不排除MSC促进IFN-γ诱导的32D细胞增殖与IFN-γ的作用有关,骨髓微环境中调控因子之间关系十分复杂,具体机制有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia [J]. Blood, 2006, 108(8):2509-2519. DOI: 10.1182/blood-2006-03-010777.
- [2] Tisdale JF, Dunn DE, Geller N, et al. High-dose cyclophosphamide in severe aplastic anaemia: a randomised trial [J]. Lancet, 2000, 356(9241):1554-1559. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)03126-3.
- [3] Milanovic M, Fan D, Belenki D, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness [J]. Nature, 2018, 553(7686):96-100. DOI: 10.1038/nature25167.
- [4] Li J, Yang S, Lu S, et al. Differential gene expression profile associated with the abnormality of bone marrow mesenchymal

- stem cells in aplastic anemia [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (11): e47764. DOI: 10.1371/journal.pone.0047764.
- [5] 欧议清, 刘海燕, 陆伟, 等. 重型再生障碍性贫血模型小鼠骨髓间充质干细胞过度衰老的机制研究[J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38 (4): 325-329. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.04.012.
- [6] 童来根, 刘红, 林赠华, 等. IFN- γ 对 AKT 基因激活的 32D 细胞的影响及作用机制探讨[J]. *中华血液学杂志*, 2010, 31(12): 826-829. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2010.12.009.
- [7] 林赠华, 刘红, 李俊宏, 等. 重型再生障碍性贫血患者血清对小鼠造血干/祖细胞株 32D 细胞凋亡和 Stat3、Stat5 分子表达的影响[J]. *中华血液学杂志*, 2009, 30(11):767-769. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2009.11.013.
- [8] 胡成俊, 刘红, 林赠华, 等. 间充质干细胞对再生障碍性贫血患者血清诱导 32D 细胞凋亡的影响及其机制[J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35 (1): 58-61. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.01.016.
- [9] Liu H, Mihara K, Song G, et al. Interferon-gamma attenuates the survival activity of G-CSF through PI3K/Akt signaling pathway in mouse multipotent progenitor cells [J]. *Ann Hematol*, 2007, 86(8):547-555. DOI: 10.1007/s00277-007-0308-4.
- [10] Reya T, Duncan AW, Ailles L, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2003, 423 (6938):409-414. DOI: 10.1038/nature01593.
- [11] Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets [J]. *Blood*, 2005, 106 (2):419-427. DOI: 10.1182/blood-2004-09-3507.
- [12] 李清, 时玉舫, 唐笛, 等. 间充质干细胞与免疫的相互作用:从基础研究到临床应用[J]. *生命科学*, 2016, 28 (8):933-940. DOI: 10.13376/j.cbls/2016126.

(收稿日期:2019-08-07)

(本文编辑:刘爽)