

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.01.011

IL-10 在输血相关性移植物抗宿主病小鼠模型中的免疫调节作用*

梁 静^{1#} 凯赛尔江·多来提^{2#} 范 娜¹ 刘 雯¹ 古丽美热·艾买如拉¹ 郑淑贤¹

(1 新疆医科大学第六附属医院 新疆 乌鲁木齐 830002; 2 新疆医科大学基础医学院人体解剖学教研室 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要 目的: IL-10 在输血相关性移植物抗宿主病小鼠模型中的免疫调节作用。 **方法:** 取 BALB / c 实验小鼠免疫活性淋巴细胞, 分别输注于 BALB / c 小鼠 (设为 A 组) 及 BALB / c 裸鼠 (设为 B 组), 建立 TA-GVHD 模型, 观察小鼠症状, HE 染色判断小鼠肝、肺、小肠、皮肤病理变化情况; 采用双夹心酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测两组小鼠血清 IL-10 浓度; 用逆转录聚合酶链反应法 RT-PCR 检测移植后外周血单个核细胞中 IL-10 的表达。 **结果:** A 组中 2 只死亡 (12.5%), B 组中 3 只死亡 (18.75%), 共 5 只死亡, 29 只存活, 两组死亡率比较无明显差异 ($P > 0.05$)。B 组小鼠累及肝、肺、小肠和皮肤病理损伤程度较 A 组严重; 存活小鼠 IL-10 浓度较死亡小鼠明显升高 ($P < 0.05$); 存活小鼠 IL-10 mRNA 表达阳性率 96.55% 明显高于死亡小鼠 (20.00%)。 **结论:** IL-10 在输血相关的移植物抗宿主病小鼠模型中发挥负向免疫调节—免疫抑制作用。

关键词: IL-10; 输血相关性移植物抗宿主病; 免疫抑制

中图分类号: R-33; R457.2; R392.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)01-55-04

Immunomodulatory Effect of IL-10 in Transfusion-associated Graft-versus-host Disease Mouse Model*

LIANG Jing^{1#}, KAIsaierjiang·duolaiti^{2#}, FAN Na¹, LIU Wen¹, GU Li mei re·ai mai ru la¹, ZHENG Shu-xian¹

(1 Blood transfusion branch, The sixth affiliated hospital of xinjiang medical university, Urumqi, Xinjiang, 830002, China;

2 Human anatomy department of preclinical college of xinjiang medical university, Urumqi, Xinjiang, 830011, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the immunomodulatory effect of IL-10 on mice with transfusion-associated graft-versus-host disease (TA-GVHD). **Methods:** The immune active lymphocytes of BALB/c experimental mice were infused into BALB/c mice (group A) and BALB/c nude mice (group B), respectively. the TA-GVHD model was established and the symptoms of mice were observed. HE staining was used to determine the pathological changes of liver, lung, small intestine and skin of mice. The concentration of serum IL-10 in the two groups was detected by double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expression of IL-10 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after transplantation was detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** Two rats died in group A (12.5%), B group, 3 died (18.75%), 5 died and 29 survived. there was no significant difference in mortality between the two groups ($P > 0.05$). The pathological damage of liver, lung, small intestine and skin in group B was more serious than that in group A; The concentration of IL-10 in surviving mice was significantly higher than that in dead mice ($P < 0.05$), and the positive rate of IL-10mRNA expression in surviving mice was 96.55%, which was significantly higher than that in dead mice (20.00%). **Conclusion:** IL-10 may play an immunosuppressive role in the mouse model of TA-GVHD.

Key words: IL-10; TA-GVHD; Immunosuppression

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R457.2; R392.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)01-55-04

前言

输血相关移植物抗宿主病 (TA-GVHD) 是致死率大于 90% 的输血严重并发症^[1], 急性 TA-GVHD 发生率占 35%~43% 左右^[2]。受血者输入了具有免疫活性的淋巴细胞血液, 但不能清除供血者的 T 淋巴细胞, 使之在受血者体内存活、增殖, 并将宿主的组织器官视为异物进行细胞毒攻击^[3], 其中以肠道、肝脏、皮肤为主要靶目标, 患者多表现为顽固腹泻、皮肤斑丘疹、

痒痛等症状, 因为靶器官损害的症状缺乏特异性, 常与药疹、药物的毒副作用难以鉴别, 易造成 TA-GVHD 漏诊误诊^[4], 因此迫切需求寻找 TA-GVHD 相关特异性指标预防及监测疾病发生发展。

TA-GVHD 的发生发展是多因素共同参与的复杂过程, 其中细胞因子表达水平对于 TA-GVHD 的发生与发展至关重要。近来以细胞因子 IL-10 的双向免疫调节活性最受关注, 有关 IL-10 的负向调节作用及其应用研究不断取得进展, 另一方面,

* 基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2016D01C214)

为共同第一作者

作者简介: 梁静, 女, 副主任医师, 研究生导师, 研究方向: 临床免疫学检验与输血相容性实验研究;

凯赛尔江·多来提, 男, 硕士, 副教授, E-mail: kaisaierjiang1978@163.com

(收稿日期: 2019-07-18 接受日期: 2019-08-14)

其免疫刺激的作用及免疫生物学意义的研究也正逐渐深入^[9]。为探究 IL-10 与免疫功能正常 / 缺陷小鼠 TA-GVHD 发病的相关性,我们通过输注免疫活性淋巴细胞建立 TA-GVHD 小鼠模型,并由此探究 IL-10 在输血相关的移植物抗宿主病小鼠模型中的免疫调节作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB / c 小鼠, 6-8 周龄, 体重 16.5-20.6g, 平均(18.43±1.28)g, 5-6 只 / 笼, 雌雄各 10 只, 共 20 只。BALB / c 裸鼠: 6-8 周龄, 体重 15.9-20.4g, 平均(17.94±1.07)g, 5-6 只 / 笼, 雌雄各 10 只, 共 20 只。对比两组一般资料($P>0.05$)。

1.2 主要仪器与试剂

低温高速离心机、流式细胞仪、生化检测仪、荧光显微镜、体温计、体重秤、红细胞裂解液、缓冲溶液、4%多聚甲醛、HE 染色相关试剂、1 mL 一次性注射器、剪刀及镊子若干、200 目筛网、离心管、刻度吸管、毛细吸管、细胞培养瓶若干。

1.3 免疫活性淋巴细胞

将分离获得的 BALB / c 小鼠脾脏放入装有 2 mL 的淋巴细胞分离液中, 并吹打至混合均匀; 缓缓地加入 2 mL 1640 培养基, 2000 r/min, 离心 30 min; 吸取中间层的灰白细胞, 放入另一只试管中, 加 1640 培养液 (大约 10 mL 左右, 快满即可), 2000 r/min, 离心 10 分钟, 倒掉上清液, 残余细胞为待标记细胞; CFSE 冻干粉 500 μ g 溶于 90 μ L DMSO 中制成 20 mmol/L 的 CFSE 原液。将原液用 PBS 缓冲液稀释至 10 mol/L, 37℃ 与待标记细胞共同孵育 15 min; 离心, 去上清, 加 5 mL 1640 培养液, 用吸管吹打均匀; 采用计数池计数, 至 2×10^7 /mL 备用。

1.4 建立 TA-GVHD 模型

A 组小鼠(BALB / c 小鼠)取 17 只根据重量经尾静脉注入 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 个 BALB / c 小鼠免疫活性淋巴细胞, B 组实验鼠(BALB / c 裸鼠)取 17 只经尾静脉注入 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 个免疫活性淋巴细胞, 第 14d 取外周血及器官样本检测。取 6 只剩余小鼠分别以尾静脉途径输注等量 PBS 溶液作为对照组。

1.5 组织病理学检查

分别取 A 组和 B 组小鼠的肝、肺、小肠、皮肤组织, 并固定在 10% 福尔马林中。用浓度递增酒精置换组织内水分, 石蜡包埋并切成 5 μ m 厚度的切片, 用二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 苏木素-伊红染色, 树脂封片。使用奥林巴斯正置荧光显微镜(日本)采集 H&E 切片的图片, 放大倍率为 200 倍或 400 倍。TA-GVHD 主要靶器官为肝脏、肺、小肠和皮肤, 病理组织切片观察这四个器官的损伤程度。

1.6 IL-10 血清检测

采用双夹心 ELISA 法, 主要步骤为: 取出板条, 留一空白孔, 其他孔加入标本或不同浓度的标准品各 20 μ L, 加入生物素标记的单克隆抗体 100 μ L, 室温静置 60 min, 后洗板 3 次, 加入酶结合物 100 μ L, 室温静置 60 min 后, 再洗板 3 次, 加入底物各 50 μ L, 加入终止液 50 μ L, 读取 450nm 处 OD 值。

1.7 IL-10 基因表达的检测

采用 RT-PCR 法, 由上海生物有限公司合成引物, 按异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取细胞总 RNA, 逆转录反应: 2 μ L

体系内, 含 2 μ g 细胞总 RNA, 0.5 U/ μ L AMV 逆转录酶, 10 pmol 随机引物, 1 U/ μ L RNA 酶抑制剂, 500 μ mol/L dNTPs, 1 $\times$ PCR 缓冲液。42℃ 反应 30 min, 99℃ 加热 5 min, 4℃ 保存; 聚合酶链反应: 25 μ L 体系内, 含 200 μ mol/L dNTPs, 25 pmol 引物, Taq 酶 1.25 U, 1 μ g 总 RNA 来源的 cDNA 模板, 循环参数为变性 94℃ 1 min, 退火 62℃ 1 min, 延伸 72℃ 1 min, 循环数 35; 扩增产物分析: 采用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳。

1.8 统计学分析

数据纳入 SPSS17.0 软件, ($\bar{x} \pm s$) 表示计量资料, t 检验; (%) 表示计数资料, χ^2 检验, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 观察小鼠症状

两组小鼠注入 BALB / c 实验鼠免疫活性淋巴细胞后, 均出现不同程度 TA-GVHD 症状, 表现为形体消瘦、脾脏肿大, 出现皮肤异常及腹泻等肠道症状表现, A 组中 2 只(12.5%)于第 6, 9 日死亡, B 组中 3 只(18.75%)于第 2, 7, 10 天死亡, 共 5 只死亡, 29 只未死亡, 两组死亡率比较无明显差异($P>0.05$)。

2.2 病理改变情况

B 组小鼠累及肝、肺、小肠和皮肤病理损伤程度较 A 组严重; 肝脏中重度损伤病理表现为炎症细胞累及血管的比例大于 15%, 同时浸润肝实质细胞, 造成大片坏死; 肺脏中肺泡内大量炎性细胞增殖浸润, 导致肺间质增厚; 肠道损伤病理表现为隐窝细胞坏死, 炎症细胞浸润固有层, 甚至出现明显溃疡; 皮肤损伤病理表现为淋巴细胞浸润皮肤基底层, 使皮肤结构损坏, 见图 1。

2.3 IL-10 血清检测

A、B 两组存活小鼠 IL-10 浓度无明显统计学差异, 死亡小鼠 IL-10 浓度比较差异无统计学意义, 两组存活小鼠 IL-10 浓度均较死亡小鼠明显升高, 见表 1。

2.4 IL-10 基因表达与 TA-GVHD 的关系

RT-PCR 法检测 TA-GVHD 小鼠模型 IL-10 mRNA 表达结果为: 5 只死亡小鼠 1 只检出 IL-10 产物, 29 只存活小鼠 1 只未检测出 IL-10 产物, 存活小鼠 IL-10 mRNA 表达阳性率 96.55% 明显高于死亡小鼠 IL-10 mRNA 表达阳性率 20.00% ($P<0.01$), 见图 2。

3 讨论

TA-GVHD 发生率不高只有 0.01%-0.1%, 但死亡率却高达 84%-100%^[6-8]。大多报道的 TA-GVHD 病例, 由于其缺乏特异性症状和体征, 临床医生很难判断患者所出现的一系列临床症状与输血有关^[9,10], 多为受血者死亡后检出体内存在供血者 T 淋巴细胞植活, 其淋巴细胞的 HLA 抗原特异性或 DNA 多态性检测证实为 TA-GVHD^[11,12]。如果能找到特异性生物指标提前预测 TA-GVHD 发生发展, 就可以在出现 TA-GVHD 临床征象前预防性采取治疗措施, 从而大大降低 TA-GVHD 相关死亡率。

有研究表明, IL-10 可以发挥负向免疫调节作用, 是抑制 TA-GVHD 应答的典型因子^[13]。动物实验证实, 输入的淋巴细胞数量超过 10^7 /kg, 受者就有发生 TA-GVHD 的可能^[14,16], 抑制淋巴细胞在宿主体内植活是防止 TA-GVHD 发展的关键。细胞

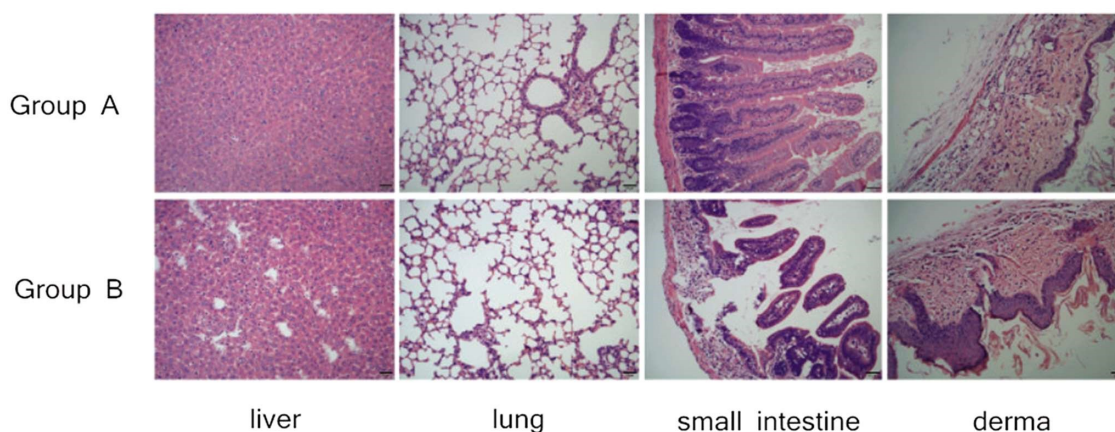


图 1 小鼠模型肝、肺、小肠、皮肤病理改变

Fig. 1 Pathological changes of liver, lung, small intestine and skin in TA-GVHD mouse model

表 1 各组之间血清 IL-10 浓度的比较(ng/mL)

Table 1 Comparison of serum IL-10 concentrations between groups

	Group A	Group B	t1	P1
Death	1.63± 5.26	0.51± 0.14	4.255	>0.05
Live	227.53± 95.67	206.23± 85.52	3.172	>0.05
t_2	5.235	9.133	-	-
P_2	<0.01	<0.01	-	-

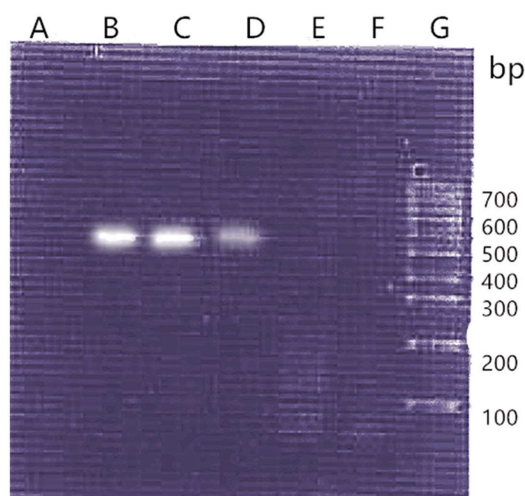


图 2 部分小鼠 IL-10 基因 RT-PCR 扩增片段电泳结果

Fig. 2 DNA electrophoresis results of IL-10 gene mRNA expression in part of mice

Note: A.Negative control; B.Positive control; C.Survival of group A;
D.Survival of group B; E.Death of group A;
F.Death of group B; G.DNA mark.

因子 IL-10 发挥负向免疫调节作用于抗原提呈细胞,降低其表面 MHC II 类分子和共同刺激分子 CD80、CD86 的表达,同时抑制 IL-1、IL-2、IL-6 和肿瘤坏死因子等促炎因子,从而间接降低 T 细胞的活性和免疫应答能力^[17,18]。IL-10 还可直接作用于初始 CD4⁺T 细胞,通过抑制 Th1 细胞亚群分泌 IFN- γ 和 IL-2 影响 T 细胞亚群的分化和成熟^[19-21]。一些临床前动物实验结果表明 IL-10 抑制机体对肿瘤细胞的免疫应答,促进肿瘤细胞的免疫逃

逸^[22-26]。IL-10 还可降低 HLA I 类抗原肽复合物在细胞表面的表达,从而抑制细胞毒性淋巴细胞介导的细胞杀伤作用^[27-30]。

本研究中采用双夹心 ELISA 法检测 A、B 两组中死亡与存活小鼠的 IL-10 血清浓度,结果表明 IL-10 浓度高的小鼠 TA-GVHD 发病程度轻,存活率高,IL-10 浓度低的小鼠 TA-GVHD 肝、肺、小肠和皮肤病理损伤程度严重,发病程度严重,死亡率高,提示高水平 IL-10 在 TA-GVHD 的发病过程中具有保护性作用,一定程度上可以抑制 TA-GVHD 的发生,这与李娟娟^[26]等研究结果相近。为进一步验证 IL-10 在 TA-GVHD 小鼠中的表达情况,我们采用 RT-PCR 法检测外周血单个核细胞中 IL-10 基因表达,实验结果表明:存活小鼠 IL-10 mRNA 表达阳性率 96.55%明显高于死亡小鼠 IL-10 mRNA 表达阳性率 20.00%,进一步提示 IL-10 可以抑制 TA-GVHD 发生。

综上所述,我们发现高水平的 IL-10 与 TA-GVHD 的并发症及死亡率呈负相关,IL-10 在 TA-GVHD 的发病过程中发挥着免疫负向调节作用,但由于本课题实验设计和研究经费有限,未能继续探究及验证 IL-10 抑制淋巴细胞在宿主体内植活的全过程及相关免疫因子的变化情况,我们有必要扩大样本数及监测时限继续进行研究 IL-10 在 TA-GVHD 中发挥的免疫调节作用,同时可以进一步探讨增加 IL-10 是否可降低 TA-GVHD 发病程度,以为今后临床应用 IL-10 监测及防治 TA-GVHD 奠定基础。

参考文献(References)

- [1] Kopolovic I, Ostro J, Tsubota H, et al. A systematic review of transfusion-associated graft versus host disease (TA-GVHD) [J]. Blood, 2015, 126(3): 406-414

- [2] 伊文芳,郭坤元,贺信,等.异基因造血干细胞移植后慢性移植物抗宿主病小鼠模型的建立和评价[J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(12): 1501-1505
- [3] 陈伟红,罗畅如,谢媚,等.肥大细胞瘤小鼠异基因造血干细胞移植的急性移植物抗宿主病动物模型的建立和评价[J]. 广西医科大学学报, 2017, 34(9): 1274-1277
- [4] 胡蓉,黄悦,李红,等.小鼠同种异体造血干细胞移植后急性移植物抗宿主病模型的构建[J]. 局解手术学杂志, 2016, 25(8): 547-551
- [5] Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells[J]. Nature Reviews Immunology, 2010, 10(3): 170-81
- [6] Reed W, Fiebig E W, Lee T H, et al. Chapter 53 - Post-Transfusion Engraftment Syndromes: Microchimerism and TA-GVHD [J]. Blood Banking & Transfusion Medicine, 2007: 713-726
- [7] 胡晓丽,李志强.不同照射剂量建立非清髓性移植物抗宿主病模型小鼠外周血 T 细胞消长性研究 [J]. 中国输血杂志, 2017, 30(3): 262-266
- [8] 冯非儿,王谦明,朱晓璐,等.输血相关移植物抗宿主病的发病机制及预防[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(6): 1774-1779
- [9] 叶苑,李志强.移植物抗宿主病小鼠模型研究进展[J]. 临床输血与检验, 2016, 18(2): 197-200
- [10] 惠玉,刘元林,陈秀慧,等.不同照射剂量对急性移植物抗宿主病小鼠模型建立的影响[J]. 军事医学, 2016, 40(2): 122-126
- [11] Mo Q, Huang Y, Wang L, et al. Photochemical inactivation of lymphocytes by riboflavin with visible light for TA-GVHD prevention[J]. Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology, 2017, 174: 276
- [12] Gokhale S G, Gokhale S S. Transfusion-associated graft versus host disease (TAGVHD)--with reference to neonatal period[J]. Journal of Maternal-Fetal Medicine, 2015, 28(6): 700-704
- [13] Blazar B R, Korngold R, Vallera D A. Recent advances in graft-versus-host disease (GVHD) prevention [J]. Immunological Reviews, 2010, 157(1): 79-109
- [14] Bahar B, Tormey C A. Prevention of Transfusion-Associated Graft-Versus-Host Disease With Blood Product Irradiation: The Past, Present, and Future [J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2018, 142(5): 662-667
- [15] Jawa R S, Young D H, Stothert J C, et al. Transfusion-Associated Graft Versus Host Disease in the Immunocompetent Patient [J]. J Intensive Care Med, 2013, 30(3): 123-130
- [16] Raina A, Chaudhary G, Dogra T D, et al. Benefit of STR-based chimerism analysis to identify TA-GVHD as a cause of death: Utility of various biological specimens [J]. Medicine Science & the Law, 2016, 56(2): 142-146
- [17] Wilke C M, Wei S, Wang L, et al. Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon- γ [J]. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2011, 60(11): 1529-1541
- [18] 陈墨,周泽平. IL-10 与自身免疫病的研究进展[J]. 昆明医科大学学报, 2018, 39(2): 218
- [19] Musuraca G, Matteis S D, Napolitano R, et al. IL-17/IL-10 double-producing T cells: new link between infections, immunosuppression and acute myeloid leukemia [J]. Journal of Translational Medicine, 2015, 13(1): 229
- [20] 新型记忆性 CD4T 细胞亚群负向调控树突状细胞成熟和功能及其机制研究[D]. 浙江大学, 2012
- [21] 骨髓初始髓源抑制细胞亚群表型鉴定及对 T 细胞免疫抑制功能的研究[D]. 南华大学, 2011
- [22] 王佳丽,刘丽华. IL-10 对肿瘤免疫双向调节的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(1): 130-134
- [23] Hamidullah, Changkija B, Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer[J]. Breast cancer research and treatment, 2012, 133(1): 11-21
- [24] Kassianos A J, Hardy M Y, Ju X, et al. Human CD1c (BDCA-1)+ myeloid dendritic cells secrete IL-10 and display an immunoregulatory phenotype and function in response to Escherichia coli[J]. European Journal of Immunology, 2012, 42(6): 1512
- [25] 罗南友,夏庆杰. 白细胞介素 -10 体外抑制慢性乙型重型肝炎患者树突状细胞活性[J]. 华西医学, 2016, (1): 61-65
- [26] 李娟娟,王有为,马凤霞,等. 比较人脐带和胎盘间充质干细胞对小鼠急性移植物抗宿主病的预防作用[J]. 中国组织工程研究, 2017, 38(5): 693-700
- [27] 龚燕萍,张红星,赵超,等. IL-10⁺CD19⁺ 调节性 B 淋巴细胞在慢性乙型肝炎患者外周血中的表达[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(2): 100-104
- [28] 刘超,高慧婕,等. 大黄素对小鼠的免疫调节作用及对脾细胞 TNF- α 和 IL-10 表达的影响[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(09): 88-92
- [29] 翟志敏. IL-2 对免疫激活和免疫耐受的双向调节作用[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(3): 319-322
- [30] Mittal S K, Cho K J, Ishido S, et al. Interleukin 10 (IL-10)-mediated Immunosuppression [J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(45): 27158-27167

(上接第 54 页)

- [28] XT H, X L, ML X, et al. Resveratrol: Review on its discovery, anti-leukemia effects and pharmacokinetics [J]. Chemico-biological interactions, 2019
- [29] IY A, MKO G, BN Z. Leveraging the Cardio-Protective and Anticancer Properties of Resveratrol in Cardio-Oncology [J]. Nutrients, 2019. [Epub ahead of print]
- [30] V V, E P, E B, et al. Resveratrol and capsaicin used together as food complements reduce tumor growth and rescue full efficiency of low dose gemcitabine in a pancreatic cancer model [J]. Cancer letters, 2017, 390: 91-102
- [31] N L, C W, P Z, et al. Emodin inhibits pancreatic cancer EMT and invasion by up regulating microRNA?1271 [J]. Molecular medicine reports, 2018, 18(3): 3366-3374
- [32] 曾勇,刘岸,童洪飞,等. 大黄素联合吉西他滨对体外人胰腺癌细胞株 BxPC-3 生长及凋亡的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(4): 552-554