

β 2微球蛋白在骨髓基质干细胞的表达

范时洋 金海东 戴 兵 潘 骏*

(温州医科大学附属第二医院骨科, 温州 325027)

摘要 通过流式细胞技术和激光共聚焦显微镜探索骨髓基质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs) β 2微球蛋白(beta 2 microglobulin, β 2M)的表达情况。取第3代相同状态的SD大鼠骨髓基质干细胞, 分为A、B两组, A组为未分化的BMSCs, B组为软骨诱导分化1周的BMSCs, 两组均采用流式细胞技术和激光共聚焦显微镜分别从数量和细胞轮廓上检测 β 2M的表达。流式细胞仪和激光共聚焦显微镜检测结果均表明, 未分化BMSCs的 β 2M表达明显低于软骨诱导分化的BMSCs。结果表明, 未分化的BMSCs免疫原性较低, 处于软骨分化的BMSCs免疫原性明显增强。

关键词 骨髓基质干细胞; β 2微球蛋白; 免疫原性

Beta 2 Microglobulin Expression in Bone Mesenchymal Stem Cells

Fan Shiyang, Jin Haidong, Dai Bing, Pan Jun*

(Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China)

Abstract The study explores beta 2 microglobulin (β 2M) expression in bone mesenchymal stem cells (BMSCs) by means of flow cytometry technique and laser confocal microscope. SD rat BMSCs in the same condition have been divided into A and B groups. Group A is undifferentiated BMSCs, while group B is induced in chondrogenesis medium for 1 week, and both two group using flow cytometry and laser confocal microscope to detect the expression of β 2M. The results of both flow cytometry and laser confocal microscope show that group A is significantly lower than group B in β 2M expression. All the results suggested that undifferentiated BMSCs possess low immunogenicity, while BMSCs that induced in chondrogenesis medium for 1 week obviously increased its immunogenicity.

Key words bone mesenchymal stem cells; beta 2 microglobulin; immunogenicity

早在1976年, Fridenshtein等^[1]把骨髓标本接种到含胎牛血清的培养体系中, 发现一种纤维母样细胞并命名为骨髓基质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)。BMSCs缺乏特异性的表面标志物, 目前国内绝大多数人认可的诊断标准为^[2]: (1)BMSCs必须贴壁生长; (2)BMSCs必须表达CD105、CD73和CD90, 不表达CD45、CD34、CD14、CD11b、CD79a、CD19及HLA-DR; (3)在合适的培养条件下, BMSCs在体外

可以分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞。目前, MSC在骨、软骨、肌腱损伤的修复等方面的研究较为深入。然而, BMSCs广泛应用于临床的进度并不理想, 阻碍其临床应用的一个难题就是免疫排斥反应。Aggarwal等^[3]观察到, BMSCs能分泌IL-6、IL-8、前列腺E2等细胞因子, 可以增强其免疫调节作用。Alain等^[4]用体外培养时表现出低免疫原性的BMSCs皮下注射入体内时发现, 免疫球蛋白M和G

收稿日期: 2013-05-21 接受日期: 2013-08-07

浙江省自然科学基金(批准号: Y2100899)、浙江省科技厅(批准号: 2009C33131)和温州市科技局(批准号: H20080057)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-88002831, E-mail: panandjun@hotmail.com

Received: May 21, 2013 Accepted: August 7, 2013

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.Y2100899), the Project of Science Technology Department of Zhejiang Province (Grant No.2009C33131) and the Project of Wenzhou Science and Technology Bureau (Grant No.H20080057)

*Corresponding author. Tel: +86-577-88002831, E-mail: panandjun@hotmail.com

网络出版时间: 2013-09-17 15:25

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130917.1525.001.html>

增多,发生特殊的细胞和体液反应,异体BMSCs在体外虽无免疫反应性,但移植到体内后却发生了免疫排斥反应。Nauta等^[5]将同种异体BMSCs静脉注入小鼠体内后,记忆T细胞显著增多,排斥反应明显。决定MSC的免疫原性最主要成分就是主要组织相容性复合体I(major histocompatibility complex I, MHC I), MHC I由一条 α 链和一条 β 2链组成, α 链决定了MHC I分子的多态性, β 2链主要成分是 β 2微球蛋白(beta 2 microglobulin, β 2M), β 2M牢固地结合在 α 链的 α 1和 α 2片段之间,与 α 链相互作用,对维持MHC I类分子天然构型的稳定性及其分子表达具有重要意义,成为检测MHC I分子免疫原性的一个重要指标^[6-7]。在人体中, β 2M通常由肾脏代谢排出^[8-9], β 2M的基因突变是肿瘤细胞逃脱宿主细胞免疫的主要原因^[10], β 2M缺陷细胞将不能表达膜结合型MHC I类分子。当外源BMSCs注入体内时,必然受到体内的各种环境因子的刺激,其免疫特性也会随之相应改变,处于定向诱导分化状态中的BMSCs同样也受到各种细胞因子刺激,免疫原性情况如何尚未见报道。我们从体外和模拟体内环境两种状况下检测骨髓间充质干细胞的 β 2M的表达情况,通过检测未分化状态及在软骨诱导分化过程中的BMSCs的 β 2M含量来探究BMSCs向软骨诱导过程中免疫原性的变化。

1 材料与方法

1 主要试剂与仪器

BMSCs基础培养基:高糖DMEM,10% FBS;成软骨诱导培养基:基本培养基97 mL,地塞米松10 μ L,抗坏血酸盐300 μ L,ITS⁺ 1 mL,丙酮酸钠盐100 μ L,脯氨酸100 μ L,TGF- β 3 1 mL,以上试剂均购自广州赛业公司;FBS、Trypsin购自GIBCO公司; β 2M-FITC antibody、 β 2M-FITC Isotype antibody购自Santa Cruz公司;BSA购自Sigma公司;二氧化碳培养箱:3111型,Thermo公司;倒置荧光显微镜:ECLIPSE Ti-S型,Nikon公司。激光共聚焦显微镜:LSM 700型,Zeiss公司。流式细胞仪:Accuri C6,BD公司。台式低速离心机:80-2型,上海医疗器械(集团)有限公司。

1.2 BMSCs的体外分离、培养

将清洁级SD大鼠脱颈处死后,在新洁尔灭中浸泡15~30 min,用无菌的器械取出大鼠双下肢,在超净工作台上,干净剔除股骨和胫骨上附着的肌肉、筋膜等组织,用10% FBS的L-DMEM培养液反复冲

洗骨髓腔,之后用吸管对细胞悬液进行吹打,使细胞分散成单个体,接种至培养瓶,放入5% CO₂、饱和湿度条件下的孵箱中培养。接种48 h后换液,倒掉悬浮细胞,隔日换液,待细胞长至90%汇合度时,0.25%胰蛋白酶消化,1:3传代,取相同生长状态的P3代BMSCs进行实验分组。

1.3 实验分组

本实验分为A、B两组,将未分化P3代BMSCs作为A组,依照软骨诱导培养基说明书,取P3代BMSCs接种6孔板,37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。待细胞融合度>80%时,PBS洗涤细胞两次,以BMSCs成软骨细胞诱导培养基诱导BMSCs定向分化,隔日更换诱导培养基,将培养第7 d的BMSCs作为B组。两组分别采用流式细胞技术检测 β 2M表达量及激光共聚焦显微镜定位细胞上 β 2M分布情况。

1.4 流式细胞仪检测细胞表面标记

分别取A、B组的BMSCs,胞计数约 3×10^5 ,PBS洗细胞两遍,1 500 r/min,5 min。100 μ L PBS重悬细胞,4 °C放置。两组细胞分别设置Blank(加入等体积PBS)、Isotype(加入 β 2M Isotype antibody)和 β 2M(加入 β 2M antibody)组,孵育抗体,4 °C避光30 min。上机检测。重复三次,结果进行采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析,采用方差分析。 $P < 0.05$,A、B两组结果差异具有统计学意义。

1.5 激光共聚焦显微镜下定位细胞 β 2M分布

取对数生长期细胞以 2×10^5 /孔接种6孔板,每孔放一载玻片,培养过夜,48 h后PBS洗两遍。5% BSA封闭细胞1 h,PBS洗两遍。孵育 β 2荧光一抗,37 °C,避光1 h,PBS洗2遍。10 μ L Dio染色,室温,避光15 min,PBS洗两遍。4%多聚甲醛固定细胞,室温1 h。PBS洗两遍。小心取出玻片,30%甘油封片。激光共聚焦显微镜下检测。

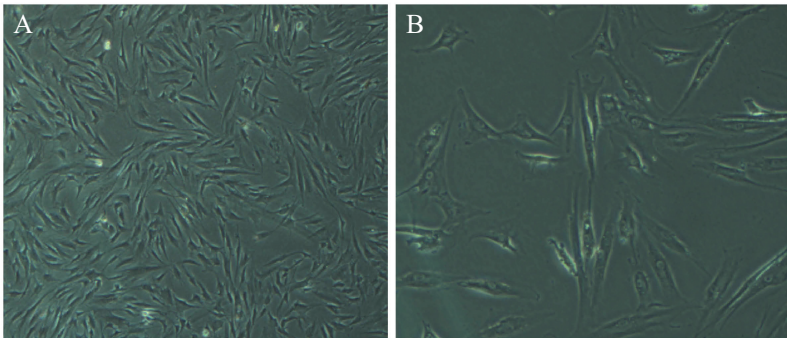
2 结果

2.1 细胞形态学观察

BMSCs呈长梭形贴壁生长并散在分布,5 d后细胞克隆融合,可传代,传代后,第3代BMSCs细胞形态较一致,多为长梭形,呈“旋涡”样生长(图1)。

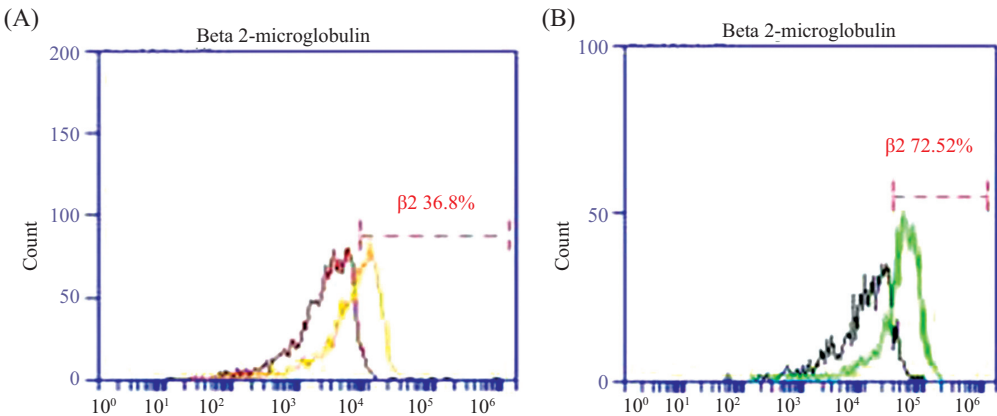
2.2 流式细胞仪检测

第3代A组未分化BMSCs细胞 β 2M表达量为36.80%,B组向软骨诱导分化1周的BMSCs细胞 β 2M表达为72.52%,明显增高,两组均重复三次检测,组



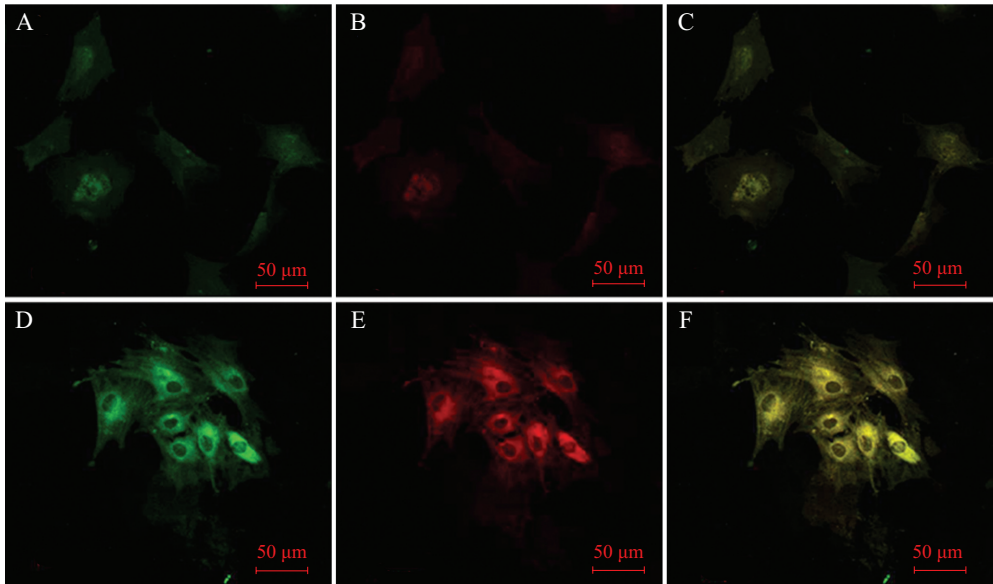
第3代骨髓基质干细胞。A: 40 $\times$; B: 100 $\times$ 。
Morphology of passage 3 bone mesenchymal stem cells. A: 40 $\times$; B: 100 $\times$.

图1 倒置相差显微镜下观察SD大鼠骨髓间质干细胞
Fig.1 SD rat bone mesenchymal stem cells by phase contrast microscope



A: 未分化组; B: 经软骨细胞诱导液培养1周。
A: undifferentiated BMSCs; B: one week after cartilage differentiation BMSCs.

图2 流式细胞仪检测BMSCs上 $\beta 2$ M表达结果
Fig.2 Flow cytometry inspection of the $\beta 2$ M expression



未分化BMSCs细胞 $\beta 2$ M表达。A: 免疫荧光FITC; B: 红色为核染色; C: 黄色为绿、红叠加图; D~F为经软骨诱导分化1周后的BMSCs上 $\beta 2$ M表达。
Undifferentiated BMSCs. A: FITC; B: DAPI; C: merge image; D~F: cartilage differentiation of BMSCs.

图3 激光共聚焦显微镜下观察BMSCs上 $\beta 2$ M表达
Fig.3 Laser confocal microscope detect $\beta 2$ M expression of BMSCs

间数据无统计学差异(图2)。

2.3 用激光共聚焦显微镜检测

在未分化的BMSCs可见淡淡的绿色荧光分布在细胞几乎全部轮廓,细胞膜几乎均匀分布;而经软骨液培养1周的BMSCs可发现整个细胞轮廓绿色荧光较未分化组明显,其中绿色为 $\beta 2M$ 荧光,细胞膜上仍均匀分布(图3)。

3 讨论

血浆 $\beta 2M$ 的检测最早用于临床自身免疫疾病、肿瘤、传染病和肾脏疾病中^[11-12],也用于一些心血管内膜增厚、粥样硬化等疾病^[13]。现在临床上脱落细胞 $\beta 2M$ 检测已成为了一些癌症(如食管癌、子宫颈癌)早期诊断和高危人群筛查的有效手段及预后老年人死亡的一个重要指标^[14]。

那么, $\beta 2M$ 在正常细胞上的分布情况如何呢?我们实验设计就是要从数量和空间上分析BMSCs上 $\beta 2M$ 分布情况。我们将生长状态一致的第3代BMSCs均分为A、B两组,A组是未分化的BMSCs,未分化的BMSCs在体外具有低免疫原性,低表达MHC^I^[15],我们通过流式检测到A组 $\beta 2M$ 的表达量为36.80%;B组是经软骨诱导液培养1周的BMSCs,软骨诱导液包括DMEM、地塞米松、抗坏血酸盐、ITS⁺丙酮酸钠盐、脯氨酸、TGF- $\beta 3$ 等有机成分,这些有机成分大都是体内不可或缺的有机组成,我们用此来模拟体内的微环境,以达到探究BMSCs注入

异体中的免疫原性。流式细胞仪检测结果显示B组的BMSCs $\beta 2M$ 表达量迅速上升,达到72.52%,较A组明显升高,两组实验结果具有统计学差异,A、B两组均重复三次流式细胞仪检测,组内差异无统计学意义(图4)。

由此可以大胆猜测异体,BMSCs注入宿主后不可避免地会发生免疫排斥反应,这也是阻碍BMSCs广泛临床应用的一个重要因素。流式细胞技术是从数量上衡量 $\beta 2M$ 。我们又用激光共聚焦显微镜从空间轮廓上来定位 $\beta 2M$ 在细胞上的分布,结果发现两组细胞的表面均有绿色荧光均匀分布,A组较为暗淡稀少,而B组明显增强,表明 $\beta 2M$ 表达量明显增多,与流式细胞仪检测的结果完全一致。

软骨诱导液模拟体内微环境,BMSCs生长在软骨诱导液中受到各种有机成分的刺激, $\beta 2M$ 表达明显增多,免疫原性增强,这与文献[3-4]报道的完全符合。至于软骨诱导液的环境与体内微环境相差多少,能反应的真实程度又是多少?尚需更多更细致的研究。检测 $\beta 2M$ 的最终目的还是为了掌握BMSCs的免疫原性,探寻免疫排斥反应内在机制,为治疗自体免疫系统疾病,减少器官移植免疫排斥反应提供有价值的实验依据。

参考文献 (References)

- 1 Friedenstien AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4(5): 267-74.
- 2 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- 3 Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105(4): 1815-22.
- 4 Poncelet AJ, Vercruysse J, Saliez A, Gianello P. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic *in vitro*, intracardiac injection elicits an immune response *in vivo*. *Transplantation* 2007; 83(6): 783-90.
- 5 Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 2006; 108(6): 2114-20.
- 6 Koch M, Camp S, Collen T, Avila D, Salomonsen J, Wallny HJ, *et al*. Structures of an MHC class I molecule from B21 chickens illustrate promiscuous peptide binding. *Immunity* 2007; 27(6): 885-99.
- 7 Macdonald IK, Harkiolaki M, Hunt L, Connelley T, Carroll AV, MacHugh ND, *et al*. MHC class I bound to an immunodominant

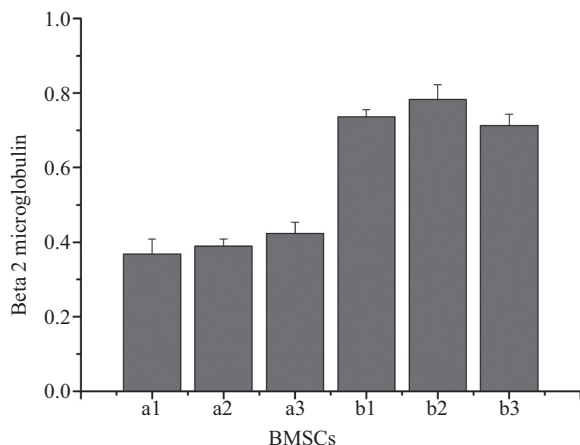


图4 重复三次流式检测发现未分化组(a)明显低于软骨诱导分化一周的BMSCs(b) $\beta 2M$ 表达量

Fig.4 Undifferentiated BMSCs in significantly lower than the cartilage differentiation of BMSCs in $\beta 2M$ expression by flow cytometry 3 times

- Theileria parva* epitope demonstrates unconventional presentation to T cell receptors. PLoS Pathog 2010; 6(10): e1001149.
- 8 Heegaard NH. beta(2)-microglobulin: from physiology to amyloidosis. Amyloid 2009; 16(3): 151-73.
- 9 Platt GW, Radford SE. Glimpses of the molecular mechanisms of beta2-microglobulin fibril formation *in vitro*: Aggregation on a complex energy landscape. FEBS Lett 2009; 583(16): 2623-9.
- 10 Paschen A, Arens N, Sucker A, Greulich-Bode KM, Fonsatti E, Gloghini A, *et al*. The coincidence of chromosome 15 aberrations and beta2-microglobulin gene mutations is causative for the total loss of human leukocyte antigen class I expression in melanoma. Clin Cancer Res 2006; 12(11 Pt 1): 3297-305.
- 11 Cooper EH, Plesner T. Beta-2-microglobulin review: Its relevance in clinical oncology. Med Pediatr Oncol 1980; 8(4): 323-34.
- 12 Trof RJ, Di Maggio F, Leemreis J, Groeneveld AB. Biomarkers of acute renal injury and renal failure. Shock 2006; 26(3): 245-53.
- 13 Zumrutdal A, Sezer S, Demircan S, Seydaoglu G, Ozdemir FN, Haberal M. Cardiac troponin I and beta 2 microglobulin as risk factors for early-onset atherosclerosis in patients on haemodialysis. Nephrology (Carlton) 2005; 10(5): 453-8.
- 14 Shinkai S, Chaves PH, Fujiwara Y, Watanabe S, Shibata H, Yoshida H, *et al*. Beta2-microglobulin for risk stratification of total mortality in the elderly population: Comparison with cystatin C and C-reactive protein. Arch Intern Med 2008; 168(2): 200-6.
- 15 Castillo M, Liu K, Bonilla L, Rameshwar P. The immune properties of mesenchymal stem cells. Int J Biomed Sci 2007; 3(2): 76-80.