

[文章编号] 1000-4718(2007)05-0986-05

人源化 NOD/SCID 小鼠免疫细胞的动态变化与鉴定*

林 晨¹, 谭玉波¹, 白 雪¹, 陈少华², 杨力建², 江振友¹, 李扬秋²
(暨南大学医学院¹微生物学与免疫学教研室,²血液病研究所, 广东 广州 510632)

[摘 要] 目的: 比较脐血干细胞与单个核细胞移植 NOD/SCID 鼠所建立的人源化 SCID 模型, 分析人源化淋巴细胞重建。方法: 磁珠分选法分离脐血中 CD34⁺ 细胞, 淋巴细胞分层液分离脐血单个核细胞, 分别经尾静脉输入 NOD/SCID 小鼠。每隔 2 周采血至 10 周, 流式细胞术动态检测人源淋巴细胞 CD45、CD19、CD3 抗原。第 10 周处死小鼠收集外周血、骨髓、胸腺组织, RT-PCR 检测模型鼠组织中人 β_2M 基因及 RAG2 基因。结果: 两种类型细胞移植均可重建人源免疫细胞, 人源淋巴细胞表达水平均在第 8 周达高峰。骨髓中人源淋巴细胞表达水平明显高于外周血。RT-PCR 在外周血与骨髓检测到人 β_2M 基因及 RAG2 基因标志。结论: CD34⁺ 细胞移植重建人源化 NOD/SCID 免疫系统模型效果要好于脐血单个核细胞。人源 T 淋巴细胞在模型鼠骨髓中分化成熟。

[关键词] 造血干细胞; NOD/SCID 鼠; CD34⁺ 细胞; T 淋巴细胞
[中图分类号] R392.11 [文献标识码] A

Distribution and identification of immunocytes in humanized SCID mouse model

LIN Chen¹, TAN Yu-bo¹, BAI Xue¹, CHEN Shao-hua², YANG Li-jian², JIANG Zhen-you¹, LI Yang-qiu²

(¹ Department of Microbiology and Immunology, ² Institute of Hematology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China. E-mail: tlinc@jnu.edu.cn)

[ABSTRACT] AIM: Humanized-NOD/SCID(hu-NOD/SCID) mouse model was established and the level of immune reconstitution was assessed in this model. METHODS: Mononuclear cells (MNC) and CD34⁺ cells were isolated or sorted from cord blood (CB). Human CD45, CD19, CD3 markers on cells from NOD/SCID murine peripheral blood (PB), bone marrow (BM), thymus were detected by FCM from 4 to 10 weeks after hematopoietic stem cell transplantation. After 10 weeks, the gene expressions of the human β_2M and RAG2 were detected by RT-PCR in PB or bone marrow of mice model. RESULTS: Human CD45, CD19, CD3 cells populations in PB and BM were found by flow cytometry in mice model transplanted with CD34⁺ cells or CB MNC from 4 to 10 weeks. The highest positivity of human lymphocytes was at 8 week after transplantation. The levels of human cell engraftment in mice transplanted with CD34⁺ cells were higher than those in mice transplanted with CB MNC. The mRNA of human β_2M and RAG2 were found by RT-PCR in BM. CONCLUSION: The higher level of human lymphocyte engraftment is established in NOD/SCID mouse model transplanted with CD34⁺ compared with CB MNC. The maturation of T lymphocytes could be happened in bone marrow of mice model.

[KEY WORDS] Hematopoietic stem cells; NOD/SCID mice; CD34⁺ cells; T-lymphocytes

在联合免疫缺陷小鼠(severe combined immunodeficiency mice, SCID)小鼠体内建立人的免疫系统,提供研究人免疫系统的体内实验平台,对研究开发疫苗、药物试验、肿瘤防治等方面具有重要意义^[1-4],近年来国内外这方面研究不断升温^[2,5]。本研究根据现有条件,比较脐血干细胞与脐血单个核细胞移植所建立的人源化 NOD/SCID 鼠模型(hu-SCID)体内免疫细胞动态变化,并利用 RT-PCR 技术检测模型鼠人源 β_2M 及

重组激活蛋白 RAG2 基因表达,初步了解模型鼠体内人源淋巴细胞分化成熟情况,以期今后应用该模型奠定基础。

材 料 和 方 法

1 脐血来源

脐血来源于广州华侨医院产科,选择足月顺产、身体健康、无急慢性感染、无血液学疾患及遗传病史的产妇,肝素抗凝,采集后 8 h 内分离单个核细胞。

[收稿日期] 2006-06-26 [修回日期] 2006-09-26

* [基金项目] 广东省科技项目资助(No. 2002C1040501; No. 2005B50301016; No. 06025169);中德生物技术合作项目资助(No. CHN02/319);广州科委科技攻关项目资助(No. 2003J1-I0011;No. 2005Z1-E4015)

Tel: 020-85220257; E-mail: tlinc@jnu.edu.cn

2 实验动物

NOD/SCID 小鼠, SPF 级, 雄性, 周龄 4-6 周, 体重 14.5-24 g, 购自中山大学实验动物中心。NOD/SCID 小鼠饲养于无菌层流室(暨南大学医学院实验动物中心)。室温 18-28 °C, 相对湿度 50%-80%, 每日光照 12 h, 自由饮水摄食。

3 CD34⁺ 细胞分离纯化

常规分离脐血单个核细胞(MNC), 按 CD34 磁珠分选试剂盒(StemCell Technologies 公司)说明操作, 用磁珠分离缓冲液洗涤脐血 MNC 2 次, 并调整细胞浓度至 1×10^{11} cells/L。按 1×10^8 细胞加入 100 μ L 标记生物素抗人 CD34⁺ 细胞抗体, 4-8 °C, 孵育 15 min。加 60 μ L 结合抗生物素抗体的磁珠, 4-8 °C, 孵育 15 min。加缓冲液洗涤 1 次, 将细胞悬液加入固定于高强度磁场中的分离柱中, 细胞悬液缓慢通过磁柱, 用 500 μ L 缓冲液缓慢冲洗, 重复两遍。将磁柱从磁座移开, 更换收集管。将 500 μ L 缓冲液加入磁柱, 用活塞挤压洗脱阳性细胞, 冲洗吸附柱即获得纯化的 CD34⁺ 细胞。最后收集的细胞进行台盼蓝染色观察细胞活性, 计数细胞, 将细胞数调整到 2×10^9 cells/L。经流式细胞仪(FCM)鉴定 CD34⁺ 细胞纯度达 80%-95%。

4 人造血干细胞移植

4-6 周龄的雄性 NOD/SCID 小鼠随机分 5 组。A 组: 不照射移植组, 6 只鼠, 每只输注 CD34⁺ 4×10^5 ; B 组: 照射移植组, 8 只鼠, 每只输注 CD34⁺ 4×10^5 ; C 组: 照射移植 MNC 组, 6 只鼠, 每只输注 MNC 5×10^6 ; D 组: 照射对照组, 4 只鼠; E 组: 正常对照组, 无照射, 4 只鼠; 后两组输注 0.2 mL PBS。所有照射移植组 NOD/SCID 小鼠均给予 300 cGy ⁶⁰Co 亚致死剂量辐照, 辐照后 8 h 内完成尾静脉输注细胞。

5 小鼠样品采集

移植后 4-10 周, 各组小鼠每 2 周经尾静脉采集外周血, 每只 100 μ L, 流式细胞仪(FCM)动态检测人 CD45、CD3、CD19 分子表达情况。各组移植第 10 周, 摘眼放血处死存活小鼠, 收集外周血, 胸腺、骨髓, 提取 RNA 及 FCM 检测, 测定人源 β_2 M 及重组激活蛋白 RAG2 基因表达。

6 FCM 检测免疫表型

常规分离制备小鼠外周血、骨髓细胞、脾脏细胞、胸腺细胞悬液, 溶解去除红细胞后, 洗涤计数备用。直接免疫荧光抗体标记法染色, 待测细胞 50 μ L 分别加入 FITC-CD45、PE-CD3、APC-CD19 标记单抗, 对照管中分别加入 FITC-IgG、APC-IgG、PE-IgG 作阴性对照。37 °C 避光放置 15 min, 1% 多聚甲醛固定, 24 h 内上机检测, 结果用 CELLQUEST 软件分析处理。

7 RNA 提取和合成 cDNA

按常规方法应用 TRIzol 试剂盒提取(Gibco-BRL)和异硫氰酸胍法提取 RNA, 应用随机引物和逆转录酶 SuperScript II(Gibco-BRL)合成 cDNA。以 1 μ g RNA 加入混合液(7 μ L 蒸馏水, 2 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 2 μ L 0.1 mmol/L DTT, 5 μ L 12.5 mmol/L dNTP, 0.5 μ L Rand. Hexamer)中合成 cDNA。每份 cDNA 合成体系加入 0.6 μ L RNasin(33 U/L)和 0.5 μ L superscript(2×10^2 U/L), 按试剂盒说明合成 cDNA。保存于 -20 °C。

8 RT-PCR 检测人 β_2 微球蛋白基因(β_2 M)及重组活化蛋白 2 基因(RAG2)

以 MHC- β_2 M 基因及 RAG2 基因设计相应的特异性上、下游引物。 β_2 -M 5': 5'-TACACTGAATTC-CACCCAC; β_2 -M 3': 5'-CACTCAATCCAAAT-GCGCA; RAG2 5': 5'-GCAACATGGGAAATG-GAACTG; RAG2 3': 5'-GGTGTCAAATTCATCAT-CACCATC。

RT-PCR 按常规方法进行, 反应条件: 94 °C 1 min(首次 3 min), 60 °C 1 min 和 72 °C 1 min(末次 6 min), 共进行 40 个循环, 最后 PCR 产物保存于 4 °C 中。取 8 μ L PCR 产物和 2 μ L 溴酚蓝于 2.5% 琼脂糖(EB 染色)中电泳分析 PCR 产物。

9 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用方差分析与 *t* 检验进行统计学处理。

结 果

1 小鼠移植后一般情况

移植后经照射各组小鼠一般状态较差, 毛色发灰, 纳差, 不喜动, 多数在移植后 6 d 左右逐渐恢复。小鼠存活情况见图 1。

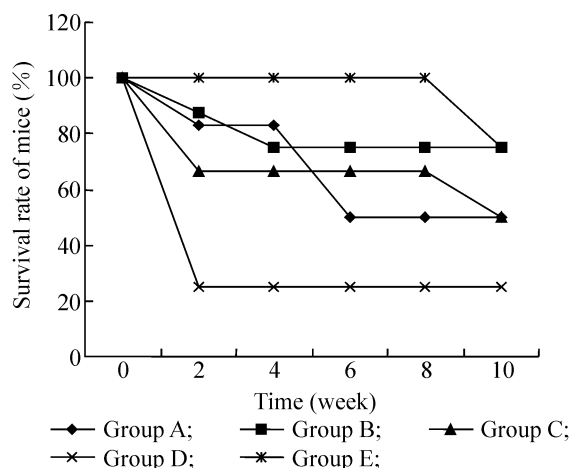


Fig 1 Survival rate of mice transplanted with cord blood stem cells and mononuclear cells.

图 1 各组模型鼠存活率曲线

2 FCM 检测移植后小鼠的植入人源细胞的动态变化

2.1 外周血 选择 CD45 为标志物,代表植入的总人源细胞,选择 CD19、CD3 为标志物分别代表功能性 B、T 细胞。移植后第 4 周起,用 FCM 检测各组小鼠外周血人源 CD45、CD19、CD3 细胞含量。D、E 组无人源细胞表达。以 CD45 表达大于 0.5% 为人源细胞植入标准,A、B、C 组植入率分别为 17%、75%、67%。B、C 组均可检测到人 CD45、CD19、CD3 抗原表达,A 组仅有 1 只植入,且只表达 CD45、CD19。移植后,各组植入小鼠外周血细胞 CD45⁺ 表达水平于 6-8 周达到高峰。SCID 鼠移植脐血干细胞组与移植脐血单个核细胞组外周血人源淋巴细胞表达情况比较,脐血干细胞移植后人源淋巴细胞阳性率均高于脐血单个核细胞,见图 2-3。

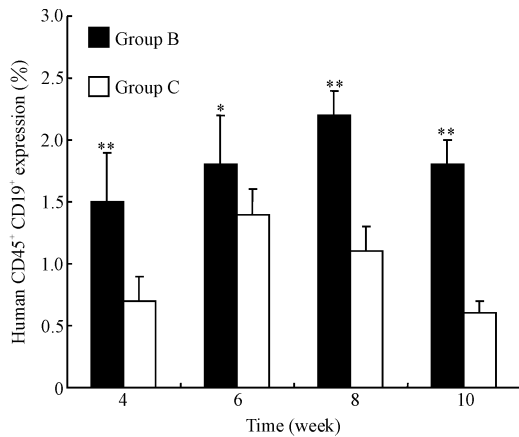


Fig 2 The kinesis of human CD45⁺ CD19⁺ expressed on peripheral blood cell of mice transplanted with cord blood stem cells and mononuclear cells. $\bar{x} \pm s$. Group B, $n = 8$. Group C, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group C.

图 2 移植后鼠外周血表达人源 CD45⁺ CD19⁺ 细胞动态水平

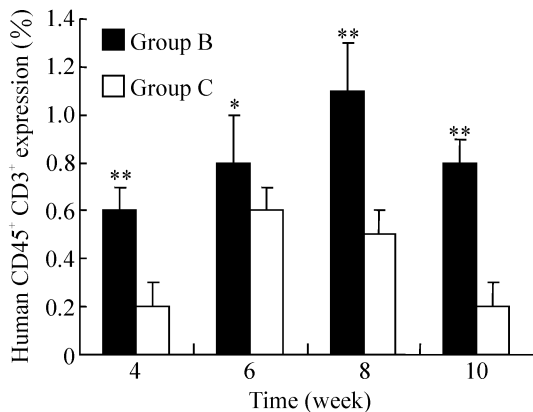


Fig 3 The kinesis of human CD45⁺ CD3⁺ expressed on peripheral blood cells of mice transplanted with cord blood stem cells and mononuclear cells. $\bar{x} \pm s$. Group B, $n = 8$. Group C, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group C.

图 3 移植后鼠外周血表达人源 CD45⁺ CD3⁺ 细胞动态水平

2.2 骨髓细胞含量 移植后 10 周,检测小鼠骨髓人源 CD45⁺、CD45⁺ CD19⁺、CD45⁺ CD3⁺ 细胞含量。移植脐血干细胞的 B 组骨髓人源淋巴细胞细胞含量均显著高于移植脐血单个核细胞 C 组 ($P < 0.01$),见图 4。

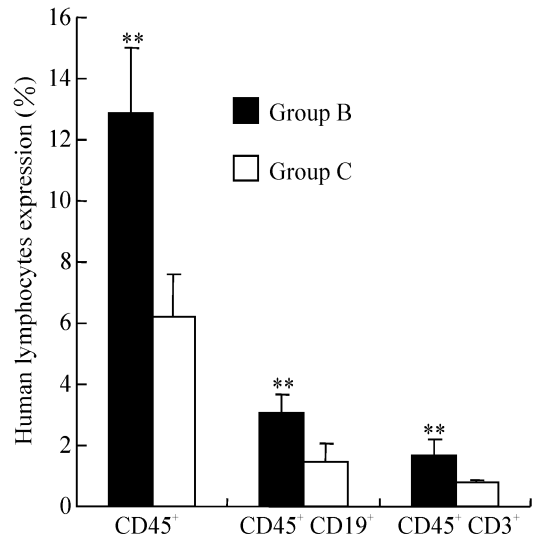


Fig 4 Comparison of human CD45, CD45CD19, CD45CD3 expressed on bone marrow cells of mice ten weeks after transplanted with cord blood stem cells and with mononuclear cells. $\bar{x} \pm s$. Group B, $n = 8$. Group C, $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs group C.

图 4 移植后 10 周鼠骨髓细胞表达人源淋巴细胞水平比较

2.3 骨髓与外周血比较 移植后第 10 周,B 组骨髓与外周血 FCM 检测结果比较,可见骨髓人源淋巴细胞阳性率显著高于外周血细胞 ($P < 0.01$),见图 5。

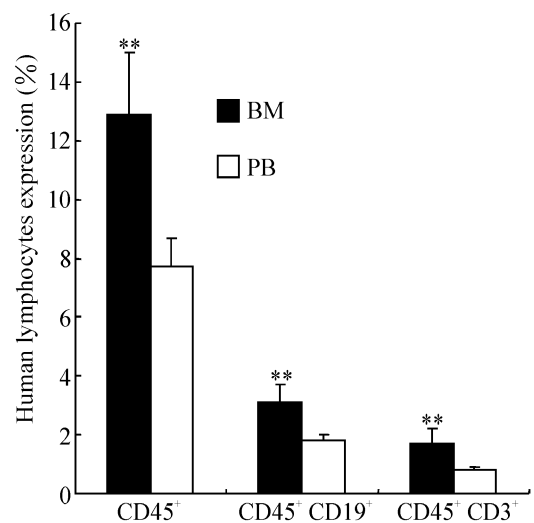


Fig 5 Comparison of human CD45, CD45CD19, CD45CD3 expressed on bone marrow cells and on peripheral blood cells in mice ten weeks after transplanted with CD34⁺ cells. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. ** $P < 0.01$ vs group C.

图 5 CD34⁺ 细胞移植模型鼠骨髓与外周血人源淋巴细胞阳性率比较

2.4 胸腺 移植后 10 周, B、C 组小鼠胸腺仅检测到人源 CD45⁺ 表达细胞, 均未检测到人 CD19、CD3 表达。

3 RT-PCR 检测人 β_2M 基因及 RAG2 基因

选取人 β_2M (144 bp) 与人重组激活蛋白 (RAG2, 245 bp) 基因为检测标志。RAG2 是淋巴细胞特异性因子, 参与淋巴细胞发育和 V(D)J 重组。在 B 组小鼠骨髓中, 检测到人 β_2M 与人 RAG2 基因片段, 见图 7、8。

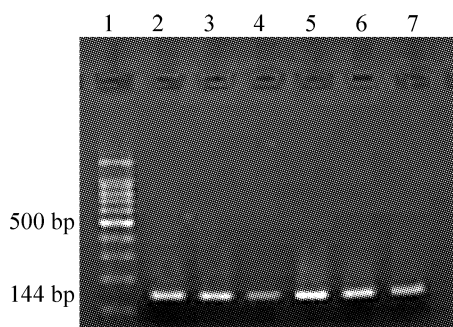


Fig 7 Electrophoretogram of human β_2M in peripheral blood and bone marrow by RT-PCR. Lane 1: marker; Lane 5: cord blood; Lane 2, 3, 4: peripheral blood; Lane 6, 7: bone marrow.

图 7 人 β_2M 基因 RT-PCR 扩增电泳图谱

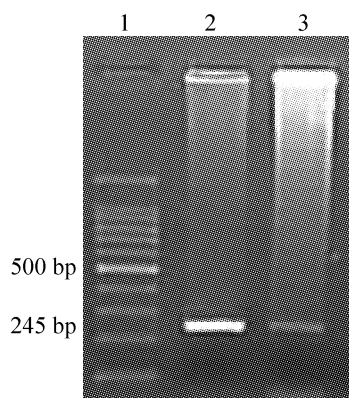


Fig 8 Electrophoretogram of human RAG2 in peripheral blood and bone marrow by RT-PCR. Lane 1: marker; Lane 2: cord blood; Lane 3: bone marrow.

图 8 人 RAG2 基因 RT-PCR 扩增电泳图谱

讨 论

联合免疫功能缺陷小鼠 (NOD/SCID) 具有多方面免疫缺陷, 包括缺乏功能性淋巴细胞、血清免疫球蛋白水平低, NK 细胞活性明显减弱, 成熟巨噬细胞减少, 补体活性减低, 渗漏率低等, 因而在造血移植方面优于 SCID 小鼠, 成为人骨髓、脐血细胞造血及免疫重建研究的优选动物。

CD45 分子属跨膜糖蛋白家族成员, 是一种白细胞共同抗原, 广泛分布于髓系和淋巴系前体细胞及

淋巴结中的成熟细胞表面。CD45 分子在造血、淋巴细胞的生长发育、活化及凋亡过程中担负重要的调控作用^[6]。故我们将其选为指示人源细胞植入水平的指标。本实验结果表明移植后小鼠外周血人 CD45⁺ 的细胞含量在 6 - 8 周较高, 其后呈下降趋势。

有文献报道^[7,8], NOD/SCID 小鼠的低 NK 细胞水平及其对放射的敏感性使其不必接受照射也适合再植细胞 (SCID - repopulating cells, SRC) 的移植并获得有效植入。但 NOD/SCID 小鼠经 250 - 325 cGy 剂量照射后, 自尾静脉注射 5×10^6 个 MNC 或 10^5 个 CD34⁺ 细胞, 体内移植即可获得较高的检测率。本研究结果表明, 经照射移植小鼠组较未照射移植小鼠组的植入率要高, 说明亚致死剂量的辐照能进一步抑制宿主的固有免疫, 抑或增加供给 SRC 植入所需的龛位。在相同照射剂量下, 输注脐血 CD34⁺ 细胞组与 MNC 组的植入率差异并不大 (75%, 67%), 可能原因是脐血 MNC 组的细胞移植数量比较大, 同时细胞种类也较多, 可能通过分泌相关的人源的细胞因子促进植入。本研究中, 照射移植 CD34⁺ 组和移植 MNC 组的外周血、骨髓均检测到 CD19⁺ 和 CD3⁺ 细胞, 且骨髓人源淋巴细胞含量明显较外周血高 (图 6)。

FCM 动态检测结果显示, 脐血 CD34⁺ 干细胞移植后小鼠表达人源淋巴细胞标志的阳性率要高于脐血单个核细胞移植。为进一步证明有效植入以及植入淋巴细胞的分化成熟场所, 我们应用分子生物学的方法检测移植后小鼠体内人源化情况, 所选取的检测指标是两种人看家基因 β_2M 和重组激活蛋白 (RAG)。 β_2M 存在机体所有有核细胞中, 在免疫应答中参与提供抗原肽供淋巴细胞识别。RAG2 是淋巴细胞特异性因子, 为淋巴细胞发育和抗原识别受体 V(D)J 重组所必需^[9]。我们从照射后 CD34⁺ 细胞移植组小鼠的骨髓及外周血细胞提取的 RNA 中, 通过 RT-PCR 的扩增, 明确检测到 β_2M 和 RAG2 两种人基因, 充分证明移植小鼠建立了人源免疫细胞系统, 结果也提示 T 细胞可能也在模型鼠骨髓内成熟分化。文献报道^[10], 在老鼠的研究中发现在胸腺外或缺失胸腺的情况下存在表达 pre-T α (TCR α 链前体)、RAG1 及 RAG2 的 T 系前体细胞 (T cell lineage precursor, TLP), 而 pre-T α 表达于细胞表面标志着 TCR 前体的形成。

综上所述, 我们认为 NOD/SCID 模型鼠经亚致死剂量照射后移植脐血干细胞或脐血单个核细胞均可以较好建立人源免疫系统, 但脐血干细胞移植效果要好于脐血单个核细胞。如何提高人源淋巴细胞的表达水平, 人源 T 细胞在免疫缺陷小鼠体内分化

成熟如何? 这些 T 细胞克隆性如何? 本课题组将对此做进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/ γ (c) (null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells[J]. *Blood*, 2002, 100(9): 3175 - 3182.
- [2] Hiramatsu H, Nishikomori R, Heike T, et al. Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34⁺ cells using the NOD/SCID/ γ (c) (null) mice model[J]. *Blood*, 2003, 102(3): 873 - 880.
- [3] 温冠媚, 李浩威, 肖庆忠, 等. 人骨髓间质干细胞向造血细胞分化潜能的实验研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(2): 157 - 162.
- [4] 谭玉波, 林 晨, 李扬秋. 联合免疫缺陷小鼠的发展及其人免疫重建的研究[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(13): 1415 - 1417.
- [5] 席 泓, 周 桓, 朱一蓓, 等. 人源化 SCID 小鼠模型的建立及其鉴定[J]. *中国免疫学杂志*, 2006, 22(5): 459 - 462.
- [6] Penninger JM, Irie - Sasaki J, Sasaki T. CD45: new jobs for acquaintance[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(5): 359 - 396.
- [7] Tokushima M, Sasayama N, Takahashi T. Repopulating activities of human cord blood cells separated by a stem cell collection filter in NOD/SCID mice: a comparative study of filter method and HES method[J]. *Transfusion*, 2001, 41(8): 1014 - 1019.
- [8] Lowry PA, Shultz LD, Greiner DL, et al. Improved engraftment of human cord blood stem cells in NOD/LtSz - scid/scid mice after irradiation or multiple - day injections into unirradiated recipients [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 1996, 2(1): 15 - 23.
- [9] Yu W, Nagaoka H, Jankovic M, et al. Continued RAG expression in late stages of B cell development and no apparent re - induction after immunization [J]. *Nature*, 1999, 400 (4745): 682 - 687.
- [10] Dejbakhsh - Jones S, Garcia - Ojeda ME, Chatterjea - Matthes D, et al. Clonable progenitors committed to the T lymphocyte lineage in the mouse bone marrow; use of an extrathymic pathway[J]. *PNAS*, 2001, 98(13): 7455 - 7460.

《生理学报》欢迎投稿

《生理学报》是由中国生理学会和中国科学院上海生命科学研究院主办、中英文兼登的学术期刊。现任主编为中国生理学会理事长姚泰教授。双月刊,大 16 开铜版纸印刷,96 页。主要刊登生理学和相关生命科学研究论文、研究快报、实验技术及以本人研究工作为主的综述。该刊的前身是《中国生理学杂志》,于 1927 年创刊,是我国最早出版的生理学学术期刊。从 1953 年起,改名为《生理学报》。在国内外享有较高的声誉。在所刊登的论文全面反映了中国生理学界在各个领域的最新成果和研究进展,具有较高的学术水平和创新性。

《生理学报》已被美国《生物学文摘》、《化学文摘》、《医学索引》、MEDLINE/PubMed、BIOSIS previews 数据库,荷兰《医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》以及中国的《中国科学引文数据库》,中国期刊网,万方数据网,维普数据网等国内外检索期刊或数据库收录,是中国自然科学核心期刊和生物类核心期刊。

《生理学报》1999 年荣获首届国家期刊奖;2000 年获中国科学院优秀科技期刊特别奖;2001 年入选双奖期刊“中国期刊方阵”;2003 年又荣获第二届国家期刊奖;2005 年荣获第三届国家期刊奖百种重点科技期刊。

《生理学报》提供即期全文上网,E-mail 推送下期目录和在线网上投稿、查询的服务。稿件快速处理,1 - 2 个月反馈一审结果。已接受文章摘要提前上网。学术质量好的英文稿件优先发表。

欢迎您向《生理学报》投送优质的稿件!

编辑部地址:上海市岳阳路 319 号 31B 楼 405 室

邮编: 200031

电话: 021 - 54922832

传真: 021 - 54922833

网址: <http://www.actaps.com.cn>

E-mail: actaps@sibs.ac.cn

国内统一刊号: CN31 - 1352/Q

国际标准刊号: ISSN 0371 - 0874

邮发代号: 4 - 157

订阅: 全国各地邮局,也可向编辑部邮购 定价:23 元

热忱欢迎广大读者、作者和商家订阅、投稿和发布广告!