

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.12.001  
文章编号: 1005-8982(2020)12-0001-06

基础研究·论著

## IL-2/GM-CSF 体外处理的外周血单个核细胞对再生障碍性贫血小鼠 T 淋巴细胞亚群及细胞因子的影响\*

詹昱, 曲佳, 冯可欣, 杨郁青, 谭明珠, 谭雪芳, 杨德懋  
(广州市第十二人民医院 血液科, 广东 广州 510620)

**摘要: 目的** 探讨白细胞介素-2(IL-2)/粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)体外处理的外周血单个核细胞输注对再生障碍性贫血(以下简称再障)小鼠 T 淋巴细胞亚群和细胞因子的影响及其促造血作用。**方法** 选取清洁级雌性 BALB/c 小鼠并复制免疫介导再障小鼠模型, 设立对照组、模型组及干预组。干预组取正常同源小鼠外周血单个核细胞, 在 IL-2、GM-CSF 等作用下培养 48 h 后进行尾静脉输注(模型复制第 1、2、4 及 6 天), 模型组输注等体积生理盐水。全部小鼠分别于模型复制第 7、14、21 及 28 天断尾采血检测外周血白细胞、血红蛋白和血小板计数; 于模型复制第 28 天或濒死时处死小鼠, 计数骨髓有核细胞(粒系、红系、淋巴细胞比例及巨核细胞数), 检测外周血 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>(T 辅助细胞、Th 细胞)、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>(T 抑制细胞、T<sub>s</sub> 细胞)及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>(调节性 T 细胞、T-reg<sub>s</sub>) 细胞比例, 检测血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、γ 干扰素(IFN-γ)水平。**结果** 模型组和干预组外周血 WBC 较对照组低( $P < 0.05$ ), 干预组在第 21 和 28 天较模型组高( $P < 0.05$ )。模型组和干预组外周血 PLT 较对照组低( $P < 0.05$ ), 干预组在第 21 和 28 天较模型组高( $P < 0.05$ )。模型组和干预组外周血 Hb 较对照组低( $P < 0.05$ ), 干预组在第 28 天较模型组高( $P < 0.05$ )。模型组和干预组粒系比例、红系比例及巨核细胞数较对照组低, 淋巴细胞比例较对照组高( $P < 0.05$ ), 干预组骨髓粒系比例、红系比例及巨核细胞数较模型组高, 淋巴细胞比例较模型组低( $P < 0.05$ )。模型组 Th 细胞比例、T-reg<sub>s</sub> 细胞比例较对照组低( $P < 0.05$ ), T<sub>s</sub> 细胞比例较对照组高( $P < 0.05$ )。干预组 Th 细胞比例、T-reg<sub>s</sub> 细胞比例较模型组高, T<sub>s</sub> 细胞比例较模型组低( $P < 0.05$ )。模型组外周血 TNF-α、IFN-γ 水平较对照组高( $P < 0.05$ ), 干预组较模型组低( $P < 0.05$ )。**结论** IL-2/GM-CSF 体外处理的外周血单个核细胞输注有助于调节再障小鼠 T 淋巴细胞亚群紊乱, 下调造血负调控细胞因子, 从而改善骨髓造血功能。

**关键词:** 贫血, 再生障碍性; 白细胞介素 2; 集落刺激因子; 单核细胞

**中图分类号:** R556.5

**文献标识码:** A

## Effects of peripheral blood mononuclear cells treated with IL-2 and GM-CSF in vitro on T lymphocyte subsets and cytokines in aplastic anemia mice\*

Yu Zhan, Jia Qu, Ke-xin Feng, Yu-qing Yang, Ming-zhu Tan, Xue-fang Tan, De-mao Yang  
(Department of Hematology, Guangzhou Twelfth People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510620, China)

**Abstract: Objective** To explore the effects of peripheral blood mononuclear cells treated with IL-2 and GM-CSF in vitro on T lymphocyte subsets and cytokines in aplastic anemia mice. **Methods** Models of immune-mediated aplastic anemia were established according to literature methods, and a control group, a model group and an intervention group were established. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from normal homologous mice and cultured for 48

收稿日期: 2019-12-30

\* 基金项目: 广东省医学科学技术研究基金(No: A2017499)

hours under the effects of IL-2 and GM-CSF and administered intravenously to mice in the intervention group (on the 1st d, 2nd d, 4th d and 6th d). The model group was given equal volume of normal saline. The counts of WBC, PLT, and Hb level in peripheral blood were tested in all mice on the 7th d, 14th d, 21st d, and 28th d. All mice were sacrificed on the 28th d or the brink of death. The numbers of bone marrow nucleated cells (granulocytes, erythrocytes, lymphocytes, megakaryocytes) were counted. The proportions of CD3+CD4+(T helper cells, Th cells), CD3+CD8+(T suppressor cells, Ts cells), CD4+CD25+CD127 (regulatory T cells, T-regs) cells in peripheral blood were measured, and the levels of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in serum were measured. **Results** The WBC of the model group and the intervention group was lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ), and the WBC of the intervention group was higher than that of the model group on the 21st and 28th d ( $P < 0.05$ ). PLT in the model group and the intervention group was lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ), and higher in the intervention group on the 21st and 28th day ( $P < 0.05$ ). The Hb of model group and intervention group was lower than that of control group ( $P < 0.05$ ), and the Hb of intervention group was higher than that of model group on the 28th day ( $P < 0.05$ ). The proportion of granulocytes, erythrocytes and megakaryocytes in the model group and the intervention group were lower than those in the control group, and the proportion of lymphocytes in the intervention group was higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The proportion of Th cells and T-regs cells in the model group was lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ), and the proportion of TS cells in the model group was higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The proportion of Th cells and T-regs cells in the intervention group was higher than that in the model group, and the proportion of TS cells in the intervention group was lower than that in the model group ( $P < 0.05$ ). The levels of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in the model group were higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ), and the levels in the intervention group were lower than those in the model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Infusion of peripheral blood mononuclear cells treated with IL-2/GM-CSF in vitro can help to regulate T lymphocyte subsets disorder and reduce the hematopoietic negative cytokines, so as to improve the bone marrow hematopoietic function in aplastic anemia mice.

**Keywords:** anemia, aplastic; interleukin-2; granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; monocytes

再生障碍性贫血（以下简称再障）是一种主要由 T 淋巴细胞免疫紊乱介导的获得性骨髓造血功能衰竭症，主要表现为全血细胞减少，可出现较严重的感染、贫血及出血。随着免疫抑制剂治疗及造血干细胞移植技术的发展，该病的预后得到大大改善。尽管如此，仍有部分患者对免疫抑制剂治疗不耐受、无效<sup>[1-2]</sup>。本课题组前期应用白细胞介素-2（Interleukin-2, IL-2）/ 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF）体外处理的自体外周血单个核细胞治疗约 200 例再障患者，获得约 80% 总有效率及 30% 完全缓解率，未发现严重不良反应，为再障患者提供了开创性的可选择的治疗法，但缺乏系统的机制探索<sup>[3-7]</sup>。T 淋巴细胞功能亢进及多种与造血有关的正负调控细胞因子分泌异常在再障的发生、发展及临床转归中起着重要作用。因此，本实验通过观察 IL-2/GM-CSF 体外处理的外周血单个核细胞对再障小鼠 T 淋巴细胞亚群比例及造血细胞因子水平的影响来探讨再障细胞治疗的机制，为临床研究提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物及分组

清洁级雌性 BALB/c 小鼠（H-2<sup>d</sup>, Mls<sup>b</sup>）42 只，8 ~

10 周龄，体重 16 ~ 18 g，由广东省医学实验动物中心提供。其中 6 只不做任何处理的小鼠作为对照组；24 只小鼠复制免疫介导模型后作为模型组和干预组，模型组 12 只小鼠输注生理盐水，干预组 12 只小鼠输注细胞。剩余 12 只小鼠采集外周血单个核细胞。清洁级 DBA/2 小鼠（H-2<sup>d</sup>, Mls<sup>a</sup>）3 只，雌雄兼用，6 ~ 14 周龄，体重 16 ~ 20 g，作为胸腺、淋巴结细胞供体，由广东省医学实验动物中心提供。动物许可证号：SCXK（粤）2013-0002。

### 1.2 模型复制

依据参考文献 [8] 和 [9]，将 3 只 DBA/2 小鼠颈椎脱臼处死，常规消毒，无菌取出胸腺及颈部、颌下、肠系膜等处淋巴结，分别获胸腺、淋巴结细胞悬液，细胞浓度为  $5 \times 10^6$  个/ml，按胸腺细胞与淋巴结细胞 1 : 2 混合，获得胸腺淋巴结细胞悬液。用台盼蓝鉴定细胞活性，活性细胞 >95%。雌性 BALB/c 小鼠经 5.5 Gy（1.1 Gy/min, 5 min）<sup>60</sup>Co  $\gamma$ -射线全身照射，照射后 4 h 内经尾静脉注入 DBA/2 小鼠胸腺淋巴结细胞（ $1 \times 10^6$  个/只）。小鼠照射后立即移入 SPF 级无菌层流室内，饮用加入庆大霉素（40 万 u/L）和二性霉素 B（50 mg/L）的高压灭菌水。

### 1.3 外周血单个核细胞分离、培养

参考课题组前期动物实验方法<sup>[10]</sup>，将 12 只健康

BALB/c 小鼠颈椎脱臼处死, 常规消毒, 无菌心脏采血, 分离单个核细胞。加入含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基 (美国 Invitrogen 公司), 添加小鼠 IL-2 (2 ng/ml)、GM-CSF (1 ng/ml)、钙离子载体 (100 ng/ml) (美国 Sigma 公司) 等刺激因子, 置于 37℃、饱和湿度的二氧化碳培养箱培养 48 h。

#### 1.4 细胞输注

参考课题组前期动物实验方法<sup>[10]</sup>并优化方案, 收集上述培养后的细胞, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^6$  个/ml, 干预组再障小鼠模型复制第 1、2、4 及 6 天经尾静脉各输注 1 次, 每只小鼠输注细胞数为  $1 \times 10^6$  个 (0.2 ml) / 次。模型组小鼠每次输注等体积无菌生理盐水。对照组小鼠不做任何处理。

#### 1.5 观察指标及结果分析

每日观察并记录小鼠活力、形态、饮食、体重等一般情况。于模型复制第 7、14、21 及 28 天断尾采血检测外周血 WBC、Hb 及 PLT。于模型复制第 28 天或濒死时处死小鼠, 对照组小鼠也同步处死。取股骨冲洗, 收集骨髓计数有核细胞 (粒系、红系和淋巴细胞比例及巨核细胞数), 摘眼球采血用流式细胞仪检测外周血 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (T 辅助细胞、Th 细胞)、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (T 抑制细胞、Ts 细胞) 及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> (调节性 T 细胞、T-reg<sub>s</sub>) 细胞比例 (小鼠单克隆抗体购自美国 Becton Dickinson 公司), 采用 ELISA 法检测血清中 TNF- $\alpha$ 、 $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 水平, ELISA 试剂盒购自奥地利 Bender Medsystems 公司。

通过比较各组小鼠一般情况及外周血细胞计数、骨髓有核细胞计数了解再障模型复制是否成功, 了解干预组小鼠骨髓造血是否改善。通过比较各组小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群比例及造血细胞因子水平, 寻找规律, 探索机制。

#### 1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用方差分析, 进

一步两两比较用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞输注对再障小鼠一般情况的影响

对照组、模型组、干预组小鼠模型复制前体重分别为 ( $17.1 \pm 0.8$ )、( $17.2 \pm 0.7$ ) 和 ( $17.1 \pm 0.6$ ) g, 经方差分析, 差异无统计学意义 ( $F = 0.068$ ,  $P = 0.934$ )。模型组和干预组模型复制后较对照组一般情况差, 且行动迟缓、弓背、竖毛及食量减少。模型复制第 7 天, 模型组和干预组饮食、饮水明显减少, 体重减少。模型复制第 14 天, 干预组一般情况逐渐好转, 活动增多, 弓背、竖毛逐渐好转, 饮食、饮水量增加, 体重增加; 模型组小鼠一般情况无改善, 且开始出现死亡。对照组、模型组、干预组小鼠模型复制第 28 天体重分别为 ( $22.1 \pm 0.8$ )、( $18.9 \pm 0.8$ ) 和 ( $21.5 \pm 0.7$ ) g, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 36.844$ ,  $P = 0.000$ ); 模型组较对照组和干预组轻 ( $P < 0.05$ ), 干预组接近对照组 ( $P > 0.05$ )。模型组共死亡 4 只, 干预组无死亡。

### 2.2 细胞输注对再障小鼠外周血细胞计数的影响

各组小鼠不同时间点外周血 WBC 比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 模型组和干预组较对照组低 ( $P < 0.05$ ), 干预组在第 21 和 28 天较模型组高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

各组小鼠不同时间点外周血 PLT 比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 模型组和干预组较对照组低 ( $P < 0.05$ ), 干预组在第 21 和 28 天较模型组高 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

各组小鼠第 7 天外周血 Hb 比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。各组小鼠第 14、21 和 28 天外周血 Hb 水平比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 模型组和干预组较对照组低 ( $P < 0.05$ ), 干预组在第 28 天较模型组高 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 1 各组小鼠不同时间点外周血 WBC 比较 ( $\times 10^9/L$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照组	$8.4 \pm 1.4$	$7.6 \pm 0.8$	$8.2 \pm 1.3$	$8.2 \pm 1.3$
模型组	$3.6 \pm 0.9$ <sup>①</sup>	$2.9 \pm 1.1$ <sup>①</sup>	$2.5 \pm 0.8$ <sup>①</sup>	$2.4 \pm 0.6$ <sup>①</sup>
干预组	$3.6 \pm 0.8$ <sup>①</sup>	$2.9 \pm 1.0$ <sup>①</sup>	$4.6 \pm 1.0$ <sup>①②</sup>	$5.6 \pm 1.3$ <sup>①②</sup>
F 值	57.041	52.060	64.959	46.743
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较,  $P < 0.05$ ; ②与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

表 2 各组小鼠不同时间点外周血 PLT 比较 ( $\times 10^9/L, \bar{x} \pm s$ )

组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照组	529.8 ± 47.0	583.2 ± 55.4	555.0 ± 47.6	571.5 ± 73.8
模型组	122.7 ± 22.8 <sup>①</sup>	103.7 ± 21.7 <sup>①</sup>	100.2 ± 20.3 <sup>①</sup>	96.7 ± 22.5 <sup>①</sup>
干预组	128.3 ± 20.8 <sup>①</sup>	118.0 ± 20.0 <sup>①</sup>	285.4 ± 38.5 <sup>①②</sup>	397.6 ± 40.0 <sup>①②</sup>
F 值	493.196	580.010	310.146	198.409
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较,  $P < 0.05$ ; ②与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

表 3 各组小鼠不同时间点外周血 Hb 比较 ( $g/L, \bar{x} \pm s$ )

组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照组	150.7 ± 16.1	157.4 ± 15.3	158.7 ± 16.7	154.0 ± 14.6
模型组	147.2 ± 14.0	122.5 ± 18.7 <sup>①</sup>	110.7 ± 15.3 <sup>①</sup>	109.0 ± 16.7 <sup>①</sup>
干预组	145.7 ± 15.7	126.6 ± 16.9 <sup>①</sup>	116.1 ± 18.7 <sup>①</sup>	134.6 ± 18.7 <sup>①②</sup>
F 值	0.224	8.690	16.520	12.058
P 值	0.800	0.001	0.000	0.000

注: ①与对照组比较,  $P < 0.05$ ; ②与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

### 2.3 细胞输注对再障小鼠骨髓有核细胞计数的影响

各组小鼠骨髓粒系比例、红系比例、淋巴细胞比例及巨核细胞数比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 模型组和干预组粒系比例、红系比例及巨核细胞数较对照组低, 淋巴细胞比例较对照组高 ( $P < 0.05$ ), 结合上述模型组一般情况差和外周血细胞计数降低, 提示再障模型复制成功。干预组骨髓粒系比例、红系比例及巨核细胞数较模型组高, 淋巴细胞比例较模型组低 ( $P < 0.05$ ), 结合上述干预组小鼠一般情况改善和外周血细胞计数升高, 提示干预组小鼠骨髓造血改善。见表 4。

### 2.4 细胞输注对再障小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群比例的影响

各组小鼠外周血 Th 细胞比例、T-reg<sub>s</sub> 细胞比例

及 T<sub>s</sub> 细胞比例比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。模型组 Th 细胞比例、T-reg<sub>s</sub> 细胞比例较对照组低 ( $P < 0.05$ ), T<sub>s</sub> 细胞比例较对照组高 ( $P < 0.05$ ); 干预组 Th 细胞比例、T-reg<sub>s</sub> 细胞比例较模型组高, T<sub>s</sub> 细胞比例较模型组低 ( $P < 0.05$ ); 干预组与对照组小鼠外周血 Th 细胞比例、T-reg<sub>s</sub> 细胞比例及 T<sub>s</sub> 细胞比例比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 5。

### 2.5 细胞输注对再障小鼠外周血 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 水平的影响

各组小鼠外周血 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  水平比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。模型组较对照组高 ( $P < 0.05$ ), 干预组较模型组低 ( $P < 0.05$ ); 干预组与对照组小鼠外周血 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  水平比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 5。

表 4 各组小鼠骨髓粒系比例、红系比例、淋巴细胞比例及巨核细胞数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	骨髓粒系比例 /%	红系比例 /%	淋巴细胞比例 /%	巨核细胞数 / 个
对照组	6	56.5 ± 2.2	20.3 ± 2.4	22.1 ± 1.6	40.2 ± 2.9
模型组	8	18.7 ± 1.6 <sup>①</sup>	9.4 ± 1.4 <sup>①</sup>	69.7 ± 4.3 <sup>①</sup>	5.9 ± 2.0 <sup>①</sup>
干预组	12	38.7 ± 2.7 <sup>①②</sup>	15.1 ± 1.7 <sup>①②</sup>	43.9 ± 3.4 <sup>①②</sup>	28.7 ± 3.5 <sup>①②</sup>
F 值		475.755	64.919	338.065	255.692
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较,  $P < 0.05$ ; ②与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

表 5 各组小鼠外周血 Th 细胞比例、T-regs 细胞比例及 Ts 细胞比例和 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Th 细胞比例 /%	T-regs 细胞比例 /%	Ts 细胞比例 /%	TNF- $\alpha$ / (ng/L)	IFN- $\gamma$ / (ng/L)
对照组	6	37.1 $\pm$ 2.8	8.5 $\pm$ 1.6	13.6 $\pm$ 2.7	330.4 $\pm$ 45.7	267.7 $\pm$ 43.9
模型组	8	23.3 $\pm$ 2.5 <sup>①</sup>	3.7 $\pm$ 1.1 <sup>①</sup>	25.5 $\pm$ 2.5 <sup>①</sup>	543.3 $\pm$ 97.2 <sup>①</sup>	355.5 $\pm$ 58.7 <sup>①</sup>
干预组	12	34.3 $\pm$ 3.4 <sup>②</sup>	7.2 $\pm$ 1.3 <sup>②</sup>	15.9 $\pm$ 3.8 <sup>②</sup>	351.8 $\pm$ 47.1 <sup>②</sup>	282.1 $\pm$ 32.4 <sup>②</sup>
F 值		44.419	26.065	29.839	25.088	8.826
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.001

注: ①与对照组比较,  $P < 0.05$ ; ②与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

再障发病机制极为复杂, 主要涉及免疫功能紊乱、造血微环境异常和造血干/祖细胞缺陷, 其中 T 淋巴细胞免疫功能紊乱导致造血干/祖细胞损伤是发病的主要环节<sup>[11-12]</sup>。目前认为 T 细胞可通过以下 3 种重要途径导致骨髓衰竭: ①直接损伤造血干/祖细胞, 抑制其增殖; ②造成细胞因子分泌紊乱, 正负调控造血细胞因子失调, 尤其是 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等造血抑制因子明显升高, 参与抑制造血; ③直接或通过造血细胞因子间接诱导造血干细胞或祖细胞发生凋亡<sup>[11-12]</sup>。T 淋巴细胞功能亢进及多种与造血有关的正负调控细胞因子分泌异常在再障的发生、发展及临床转归中起着重要作用。因此, 本实验拟通过观察 IL-2/GM-CSF 体外处理的外周血单个核细胞对再障小鼠 T 淋巴细胞亚群比例及造血细胞因子水平的影响, 来探讨再障细胞治疗的机制。

本研究成功复制了再障小鼠模型, 再障小鼠模型复制后一般情况较差, 行动迟缓、弓背及竖毛, 饮食、饮水减少, 体重减轻, 外周血细胞计数减少, 骨髓粒系比例、红系比例及巨核细胞数下降, 淋巴细胞比例升高。其中接受细胞输注的干预组小鼠, 模型复制第 14 天一般情况开始好转, 第 21 天外周血细胞水平开始改善, 第 28 天体重及外周血细胞水平、骨髓有核细胞比例均升高, 而模型组小鼠一般情况无改善, 外周血细胞水平及骨髓有核细胞比例均无改善。结果表明, 输注 IL-2/GM-CSF 体外处理的外周血单个核细胞后再障小鼠骨髓造血功能得到显著改善。

有研究表明, 再障患者体内 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞 (Ts 细胞) 数量增加、功能增强, 是骨髓造血衰竭的直接原因; 活化的 Ts 细胞通过释放穿孔素、颗粒酶 B 等直接杀伤造血细胞, 同时还分泌 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等造血负调控细胞因子, 表达上调的负调控因子一方面直接抑制造血细胞的增殖、分化, 另一方面诱导造血

细胞发生凋亡; 活化的 Ts 细胞还通过 Fas/FasL 通路的异常活化介导骨髓单个核细胞凋亡, 直接损伤造血干细胞或祖细胞<sup>[13-16]</sup>。

有研究也证实, CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞平衡紊乱也是再障骨髓造血衰竭的重要原因, 包括 Th 细胞 (Th1 细胞、Th2 细胞)、T-regs 细胞比例失衡等; T-regs 细胞通过抑制自身反应性效应 T 细胞来控制自身免疫的发生、发展, 再障患者体内 Th1 比例明显增高, T-regs 细胞数量降低、功能减弱, 免疫抑制功能缺陷导致对效应 T 细胞的免疫监控能力下降, 从而介导骨髓造血功能损伤<sup>[17-20]</sup>。淋巴细胞亚群紊乱导致再障患者血液中造血负调控细胞因子 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等显著上调, 加重免疫炎症反应, 进一步促进再障的发生、发展。

本研究发现, 模型组小鼠外周血 Th 细胞、T-regs 细胞比例较对照组降低, Ts 细胞比例较对照组升高, TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  水平较对照组升高, 而干预组 Th 细胞、T-regs 细胞比例较模型组升高, Ts 细胞比例较模型组降低, TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  水平较模型组降低。该结果提示, T 淋巴细胞亚群紊乱、T 细胞异常活化及造血负调控细胞因子水平升高参与模型复制后再障小鼠疾病的发生、发展, 而细胞输注有助于上调 Th 细胞比例、Ts 细胞比例, 下调 T-regs 细胞比例及造血负调控细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ , 从而发挥其促造血作用。

综上所述, 本研究提示输注 IL-2/GM-CSF 体外处理的外周血单个核细胞有助于调节再障小鼠 T 淋巴细胞亚群紊乱、下调造血负调控细胞因子, 从而改善骨髓造血功能, 为自体外周血单个核细胞治疗再障患者的临床研究提供了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] PESLAK S A, OLSON T, BABUSHOK D V. Diagnosis and treatment of aplastic anemia[J]. Curr Treat Options Oncol, 2017,

- 18(12): 70.
- [2] BACIGALUPO A. How I treat acquired aplastic anemia[J]. *Blood*, 2017, 129(11): 1428-1436.
- [3] CHEN J Y, LIU W W, WANG X, et al. Ex vivo immunotherapy for patients with benzene-induced aplastic anemia[J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2003, 12(5): 505-514.
- [4] CHEN J Y, LIU W W, YU W, et al. A novel cell-based therapy for patients with aplastic anemia[J]. *Cytotherapy*, 2010, 12(5): 678-683.
- [5] 刘薇薇, 陈嘉榆, 余卫, 等. 细胞因子诱导的免疫细胞治疗苯中毒再生障碍性贫血的临床研究 [J]. *中国工业医学杂志*, 2010, 23(1): 13-17.
- [6] 陈玲珍, 陈嘉榆, 余卫, 等. IL-2/GM-CSF 体外处理的自体外周血单个核细胞治疗再生障碍性贫血 49 例长期随访 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(3): 781-786.
- [7] 詹昱, 陈玲珍, 曲佳, 等. IL-2/GM-CSF 体外处理的自体外周血单个核细胞治疗再生障碍性贫血 131 例临床研究 [J]. *国际医药卫生导报*, 2018, 24(21): 3219-3223.
- [8] 赵忻, 汪明春, 廖继东, 等. 免疫介导小鼠再障模型方法的改进 [J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(6): 716-717.
- [9] LI J, CHEN H, LV Y B. Intraperitoneal injection of multipotent pooled cells treatment on a mouse model with aplastic anemia[J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016(3): 1-6.
- [10] LI G, WANG X, WU L, et al. Ex vivo activated immune cells promote survival and stimulate multilineage hematopoietic recovery in myelosuppressed mice[J]. *J Immunother*, 2005, 28(4): 420-425.
- [11] SCHOETTLER M L, NATHAN D G. The pathophysiology of acquired aplastic anemia: current concepts revisited[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2018, 32(4): 581-594.
- [12] YOUNG N S. Aplastic anemia[J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(17): 1643-1656.
- [13] 冯乐, 付蓉, 王化泉, 等. 重型再生障碍性贫血患者 CD8<sup>+</sup> 效应 T 细胞损伤骨髓造血途径的研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2011, 9(32): 597-601.
- [14] CHEN Y, ZOU Z, WU Z, et al. TNF- $\alpha$ -induced programmed cell death in the pathogenesis of acquired aplastic anemia[J]. *Expert Rev Hematol*, 2015, 8(4): 515-526.
- [15] LIN C Y, FU R, WANG H Q, et al. Fas/FasL in the immune pathogenesis of severe aplastic anemia[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(2): 4083-4088.
- [16] LIN F C, KARWAN M, SALEH B, et al. IFN- $\gamma$  causes aplastic anemia by altering hematopoietic stem/progenitor cell composition and disrupting lineage differentiation[J]. *Blood*, 2014, 124(25): 3699-3708.
- [17] 何广胜, 邵宗鸿, 和虹, 等. 重型再生障碍性贫血患者骨髓中辅助性 T 细胞亚群数量及功能的变化 [J]. *中华血液学杂志*, 2004, 25(10): 613-616.
- [18] YAN L, FU R, LIU H, et al. Abnormal quantity and function of regulatory T cells in peripheral blood of patients with severe aplastic anemia[J]. *Cell Immunol*, 2015, 296(2): 95-105.
- [19] 王娜, 张虹, 苏津蕊. 再生障碍性贫血患者外周血 Th17、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞的免疫应答研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(19): 2799-2802.
- [20] 钟敏, 苏群豪, 胡敏, 等. 新发重型再生障碍性贫血患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞及其细胞因子表达观察 [J]. *山东医药*, 2019, 59(9): 74-76.

(李科 编辑)

本文引用格式: 詹昱, 曲佳, 冯可欣, 等. IL-2/GM-CSF 体外处理的外周血单个核细胞对再生障碍性贫血小鼠 T 淋巴细胞亚群及细胞因子的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(12): 1-6.