

• 临床研究 •

再生障碍性贫血患者 CX3CR1 介导的
T 细胞趋化和黏附功能异常*侯晓燕¹ 王琳琳¹ 任娟¹ 李辉¹ 彭军¹

〔摘要〕 目的:探讨 CX3CL1/CX3CR1 对获得性再生障碍性贫血患者 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞迁移和黏附功能的影响。方法:17 例重型再障患者和 10 例健康对照,应用 MACS 免疫磁珠分选法分选 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞,在自身骨髓血浆或 CX3CR1 的配体 CX3CL1 的作用下通过 Transwell 迁移实验比较患者和健康对照 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞表面 CX3CR1 介导的趋化活性以及阻断 CX3CR1 对其趋化活性的影响;采用细胞基质黏附实验比较患者和健康对照 CX3CL1/CX3CR1 介导的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的黏附能力。结果:再障患者骨髓 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞 CX3CL1/CX3CR1 介导的迁移活性及黏附能力均高于正常对照组 ($P < 0.05$),尤以 CD8⁺ 细胞更为显著 ($P < 0.05$)。结论: CX3CL1/CX3CR1 的相互作用可能参与了 T 细胞介导的再障的发病机制,对 CX3CR1 的阻断有望成为治疗再障的新靶点。

〔关键词〕 再生障碍性贫血;CX3CR1;T 淋巴细胞;hCX3CL1 类似物

〔中图分类号〕 R556 **〔文献标志码〕** A **〔文章编号〕** 1004-2806(2013)03-0158-04

CX3CR1-mediated chemotactic and adhesive dysfunction
of T cells in aplastic anemia patients

HOU Xiaoyan WANG Linlin REN Juan LI Hui PENG Jun

(Department of Hematology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, 250012, China)

Corresponding author: PENG Jun, E-mail: junpeng88@sina.com

Abstract Objective: To investigate the effect of Fractalkine/CX3CR1 on CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes migration and adhesion in patients with acquired aplastic anemia. **Method:** Seventeen patients with aplastic anemia (AA) and 10 healthy controls matched with age and gender were enrolled in this study. Immunomagnetic beads sorting was used to isolate CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes from the bone marrow of AA patients and healthy controls. Transwell migration assay was used to compare CX3CR1-mediated chemotaxis of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes to autologous bone marrow plasma or CX3CR1 ligand and to analyze the effect of CX3CR1 blockage on the chemotaxis activity. Cell matrix adhesion assay was used to demonstrate CX3CL1/CX3CR1-mediated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte adhesion in SAA patients as compared with healthy controls. **Result:** CX3CR1-mediated chemotaxis and adhesion ability in bone marrow CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte in AA patients was higher than healthy controls ($P < 0.05$), especially in CD8⁺ T lymphocytes ($P < 0.05$). **Conclusion:** The interaction of Fractalkine with CX3CR1 may be involved in the T cell mediated pathogenesis of aplastic anemia, suggesting the blockage of CX3CR1 as a promising therapy target in aplastic anemia.

Key words aplastic anemia; CX3CR1; T Cells; hCX3CR1 analog

再生障碍性贫血(AA,简称再障)是一种以造血功能衰竭为特征的自身免疫性疾病,以贫血、出血、感染为常见临床表现。免疫失衡,尤以活化的T淋巴细胞介导对造血细胞的破坏是再障的发病机制^[1-2]。T细胞发挥免疫应答与其表面表达的黏附分子和趋化因子受体密切相关,它们通过配体-受体结合的形式参与细胞的识别、迁移等过程,是免疫应答过程的分子基础。CX3CL1(Fracta-

lkine)作为趋化因子家族 CX3C 家族中惟一认知的人的趋化因子,作用于单核细胞和记忆 T 细胞的黏附和启动过程,参与炎症反应并促进多种炎症性疾病的发生^[3]。F1 是 Philippe 等^[4]利用噬菌体技术所设计的一种 hCX3CL1 的类似物,通过对 hCX3CL1 的 N 端修饰,可在一定的浓度范围内有效抑制 CX3CL1/CX3CR1 介导的趋化及黏附活性,有望成为一种新的抗炎物质。我们的前期研究表明,CX3CL1 及其受体在再障患者中表达明显升高^[5]。本试验在前期研究基础上进一步研究再障患者 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞 CX3CL1/CX3CR1 介导

* 基金项目:山东省优秀中青年科研奖励基金(No: BS2009YY049)

¹ 山东大学齐鲁医院血液科(济南,250000)

通信作者:彭军, E-mail: junpeng88@sina.com

的趋化活性和黏附能力,为寻求再障治疗的新靶点进行探讨。

1 资料与方法

1.1 研究对象

17 例样本取自 2011-05—2012-03 在山东大学齐鲁医院血液科及门诊初次治疗的患者,依据其临床表现、外周血细胞计数、细胞形态学、骨髓穿刺及活检结果皆符合重型再生障碍性贫血。其中男 11 例,女 6 例;年龄 19~62 岁。健康对照 10 例,其中男 6 例,女 4 例;年龄 24~45 岁。诊断标准均符合张之南《血液病诊断及疗效标准》^[6]。

1.2 仪器与试剂

人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品;Mini-MACS 磁珠分选系统、CD4⁺和 CD8⁺磁珠分选单克隆抗体及免疫磁珠分选液购自德国 Miltenyi Biotec 公司;FN(fibronectin)购自美国 sigma 公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;CX3CL1 及抗人 CX3CL1/Fractalkine 单克隆抗体均购自美国 R&D 公司;hCX3CL1 analog(F1)由法国 Philippe Deterre 教授惠赠;聚苯乙烯材质的 96 微孔反应板购自 Costar 公司;抗多聚组氨酸抗体购自美国 R&D 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本处理 常规采取患者骨髓血,EDTA 抗凝,充分混匀(标本 4 h 内处理,无菌操作)。1 000 r/min 离心 5 min,上清-20℃保存以备后用,沉淀梯度离心法用人淋巴细胞分离液分离出骨髓单个核细胞(BMMCS)。

1.3.2 免疫磁珠法阳性分选 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞 收集浓度为 10¹⁰/L 的 BMMCS,用 80 μl 的磁珠分选液重选细胞,加入 20 μl 的 CD8 抗体 4℃避光孵育 30 min。Mini-MACS 磁珠分选系统分离出 CD8⁺细胞;未标记的细胞同理分离出 CD4⁺细胞。调整 CD4⁺和 CD8⁺的细胞浓度为 10⁹/L,用流式细胞仪测定细胞浓度。

1.3.3 Transwell 迁移及迁移阻断实验 采用 8 μm 孔径的 24 孔 Transwell 小室,小室下均匀平铺 FN(10 μg/ml,40 μl),操作台内通风晾干,各小室内分别加入浓度为 2×10⁵/200 μl 细胞,室外 24 孔板贴壁加入自身骨髓血浆或溶入 CX3CL1(50 ng/ml)的 Buffer A(RPMI 1640 内含有 0.5%的 BSA,20 mmol/L HEPES,pH 7.4)500 μl,注意避免气泡产生;对照组内小室外 CX3CL1 缺失。37℃,5%CO₂ 培养 12 h,小室内的细胞弃掉,1×PBS 清洗,4%多聚甲醛固定 30 min,1×PBS 清洗 2 遍,结晶紫染色 30 min,倒置显微镜下 400×观察并随机选取 5 个视野,计算平均数比较细胞的趋化活性。阻断实验类似,室外 24 孔板加入 F1(300 ng/ml),抗人 CX3CL1/Fractalkine 单克隆抗体(10

μg/mL)。以上孔内加入再障患者的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞均为同一患者,且浓度一致。健康对照组同上。每个样本均做 3 个重复的复孔。

1.3.4 黏附实验 37℃、5%CO₂ 条件下聚苯乙烯材质的 96 微孔反应板包被抗多聚组氨酸抗体 1 h,后 4℃过夜,形成固相载体。PBS(1:1 000)清洗 2 遍,洗去未结合的抗体和杂质。37℃、5%CO₂ 条件下 Buffer A(RPMI 1640 内含有 0.5%的 BSA,20 mmol/L HEPES,pH 7.4)高蛋白封闭 1 h。弃去 buffer A,每孔加入溶于 buffer A 的 CX3CL1(105 ng/ml),室温反应 1 h。待抗体结合后,弃去 buffer A,每孔分别加入 5×10⁵/100 μl 的 CD4⁺,CD8⁺细胞,37℃、5%CO₂ 条件下反应 1 h。PBS 清洗未结合细胞,瑞特染液 30 min,倒置显微镜下 400×观察并随机选取 5 个视野,计算平均数比较细胞的粘附能力。空白组不加入 CX3CL1,阻断组加入 F1(300 ng/ml),健康对照组同上。每样本均做 3 个重复的复孔。

1.4 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件分析,检验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,首先对各组数据做正态性检验,符合正态分布的数据,经方差齐性检验,作两独立样本 *t* 检验(*t* 检验);不符合正态分布的数据,采用成组设计两样本比较的秩和检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 趋化实验结果

再障患者 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞的趋化活性无论在 CX3CL1 作用下还是自身血浆替代的条件下,都较正常对照组显著升高,尤其以 CD8⁺细胞更为明显(*P*<0.05);分别运用抗人 CX3CL1/Fractalkine 单克隆中和抗体和 hCX3L1 的类似物 F1,对 CX3CL1 和 CX3CR1 进行阻断后,再障患者 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞的趋化活性明显下降(*P*<0.01)。

2.2 黏附实验结果

相对正常对照组,再障患者 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞 CX3CL1/CX3CR1 介导的黏附能力均较正常对照组升高,尤其以 CD8⁺细胞更为明显(*P*<0.05)。应用 F1 对 CX3CL1/CX3CR1 的相互作用进行阻断,阻断后再障患者 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞黏附能力显著降低(*P*<0.01)。

3 讨论

近年来,对再障发病机制的研究主要集中在 T 细胞亚群的失衡、Th1 类细胞的过度激活以及淋巴因子的分泌失调。Young 等^[2]用流式细胞技术显示再障患者骨髓中 CD3⁺与 CD8⁺细胞均明显升高,CD4⁺/CD8⁺细胞比值倒置,证明了 T 细胞的数量和亚群的变化与造血抑制密切相关。细胞因子

分泌是T细胞活化的主要表现形式。几乎任何改

表 1 骨髓血 CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 细胞表面 CX3CR1 和 F1 及自身血浆的趋化活性和阻断作用						$\bar{x} \pm s$
组别	血浆	血浆 + F1	血浆 + 抗-CX3CL1	CX3CL1	CX3CL1 + F1	
对照组						
CD4 ⁺	5.50 ± 3.30 ¹⁾	3.60 ± 1.64	3.70 ± 2.87	6.50 ± 4.28 ¹⁾	4.60 ± 2.06	
CD8 ⁺	7.30 ± 3.97 ¹⁾	4.40 ± 3.60	4.80 ± 2.10	7.60 ± 3.53 ¹⁾	4.90 ± 2.92	
AA 组						
CD4 ⁺	13.65 ± 6.41	7.06 ± 3.78 ²⁾	7.29 ± 2.20 ²⁾	16.06 ± 9.80	8.18 ± 3.66 ²⁾	
CD8 ⁺	21.12 ± 7.25	8.00 ± 3.87 ²⁾	10.12 ± 4.89 ²⁾	24.41 ± 17.19	10.94 ± 4.83 ²⁾	

与 AA 组比较,¹⁾ $P < 0.05$; AA 组间差异,²⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 各组骨髓血 CD4 ⁺ /CX3CR1 ⁺ , CD8 ⁺ /CX3CR1 ⁺ 的黏附能力及 F1 的阻断作用				$\bar{x} \pm s$
组别	空白对照	CX3CL1	F1	
对照组				
CD4 ⁺	50.60 ± 14.11	65.40 ± 11.65	40.70 ± 19.30	
	75.90 ± 21.39	82.80 ± 24.04	67.20 ± 26.99	
AA 组				
CD4 ⁺	95.06 ± 35.67	211.35 ± 80.50 ¹⁾	89.40 ± 57.12 ²⁾	
	153.29 ± 111.33	467.47 ± 198.79 ¹⁾	138.59 ± 87.44 ²⁾	

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$; AA 组间差异,²⁾ $P < 0.01$ 。

变细胞动态平衡的刺激(例如感染和免疫失衡),都可以促使 T 细胞通过分泌趋化因子、黏附分子、蛋白酶及其他炎症物质与基膜及细胞外基质相互作用向炎症部位迁移,进而参与疾病的发生、发展过程。然而,炎症因子的过度参与会导致活化的白细胞产生广泛的组织损害^[7-8]。趋化因子作为重要的调节因素,有效地参与了炎症过程中淋巴细胞的生成、游走、归巢及分化。CX3CL1 是一种新发现的 CX3C 家族的小分子可溶性蛋白,通过与具有趋化因子受体超家族保守序列特性的 7 次跨膜 G 蛋白偶联受体 CX3CR1 的相互作用诱导白细胞的趋化和黏附反应^[9-14]。既往大量的实验研究表明 CX3CL1 在多种自身免疫性疾病中表达升高,如 SLE、关节炎、肉芽肿等。更重要的是,在动物实验中发现抑制 CX3CL1 的表达可能延迟狼疮性肾炎的进展^[15]。作为 CX3CL1 的高亲和力受体, CX3CR1 不但在结构域上保留了趋化因子受体超家族的保守序列^[16-18],而且其黏蛋白样的杆状结构可使其 N 端片段与趋化因子结合,进一步促进了该受体与 CX3C 结构的结合^[17]。此外,传统意义上的 T 细胞的迁移过程由其表面表达的黏附分子及它们的配体相互作用而介导的,例如作用于淋巴细

胞的 IFA-1/ICAM-1 及 VLA-4/VCAM-1 的受体-配体的相互作用。然而,Lmai 等^[18]在一系列试验中揭示 CX3CL1/CX3CR1 可直接介导 T 细胞的游走、趋化、粘附而不需要其他黏附分子。上述的研究均提示, CX3CL1/CX3CR1 在介导 T 细胞迁移过程中具有趋化粘附双重活性,是参与炎症性疾病中的重要环节。因此,临床上已经显示出 hCX3CR1 拮抗剂的应用前景, CX3CL1/CX3CR1 有望成为抗炎药物的新靶点。该实验中,我们首先利用小鼠来源的 Anti-hCX3CL1 单克隆中和抗体在配体水平对 CX3CL1/CX3CR1 的相互作用进行拮抗,随后又应用 Philippe 等设计的 hCX3CL1 的类似物 F1,通过 F1 与 CX3CL1 的竞争来拮抗 CX3CR1。F1 本身虽不是信号分子也不诱发趋化活性、钙内流,且不导致 CX3CR1 的内化,却潜在地抑制了小鼠及人起源的主要表达 CX3CR1 的细胞上由 CX3CL1 诱导的钙内流及趋化活性,同样有效地抑制 CX3CL1/CX3CR1 的黏附能力^[4]。我们进一步探讨了 CX3CL1/CX3CR1 在介导 T 细胞迁移的免疫过程中对再障发病机制中的作用。我们发现,不论在再障患者外周血和骨髓的 T 细胞亚群,还是在免疫荧光染色的骨髓石蜡切片上, CX3CR1 都广泛表达于再障患者 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞表面。与此同时,我们检测到再障患者外周血浆和骨髓中 CX3CR1 的配体 Fractalkine 水平同样上升^[5]。本研究中我们测定了健康对照组和再障患者 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞表面的 CX3CR1 介导的趋化活性和黏附能力。结果显示,再障患者 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞趋化、黏附能力均较正常对照组显著升高,尤以 CD8⁺ 细胞更为明显, Anti-hCX3CL1 单克隆中和抗体和 F1 在 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞迁移过程中亦有效拮抗了 CX3CR1 的作用。当前,对再障的有效治疗主要采用造血干细胞移植和免疫抑制剂的应用。然而由于骨髓移植来源的局限性和再障病情本身的反复性,临床上对再障的治疗仍然存在局限性。CX3CL1/CX3CR1 在介导再障患者 T 细胞从外周血迁移至骨髓进而导致造血细胞的损害中起到重要作用。无论是对 CX3CL1 的竞

争拮抗还是对 CX3CR1 的直接抑制作用都有可能为再障的靶向分子治疗开辟新的途径。

参考文献

[1] YOUNG N S, SCHEINBERG P, CALADO R T. Aplastic anemia[J]. *Curr Opin Hematol*, 2008, 15: 162—168.

[2] YOUNG N S, CALADO R T, SCHEINBERG P. Review current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia[J]. *Blood*, 2006, 108: 2509—2519.

[3] YOUNG N S, BACIGALUPO A, MARSH J C. Aplastic anemia: pathophysiology and treatment[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010, 16 (1 Suppl): S119—25.

[4] DORGHAM K, GHADIRI A, HEMAND P, et al. An engineered CX3CR1 antagonist endowed with anti-inflammatory activity[J]. *J Leukocyte Biol*, 2009, 86: 903—911.

[5] 任娟,孙琳,彭军,等.再生障碍性贫血患者 T 细胞表面 VLA-4 和 CX3CR1 的表达[J]. *临床血液学杂志*, 2011, 24(1): 309—310.

[6] 张之南,沈悌.血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版.北京:科学出版社,2007:19—23.

[7] UMEHARA H, BLOOM E T, OKAZAKI T, et al. Fractalkine in vascular biology from basic research to clinical disease[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 34—40.

[8] SPRINGER T A. Trafficsignal for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration; the multistep paradigm[J]. *Cell*, 1994, 76: 301—301.

[9] FRATICELLI P, SIRONI M, BIANCHI G, et al. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses[J]. *J Clin Invest*, 2001, 107: 1173—1181.

[10] NAKAYAMA M, YONEDA O, HIESHIMA K, et al. Dual functions of Fractalkine/CX3C ligand 1 in traf-

ficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression [J]. *J Immunol*, 2002, 168: 6173—6180.

[11] FONG A M, ROBINSON L A, STEEBER D A, et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow[J]. *J Exp Med*, 1998, 188: 1413—1419.

[12] FONG A M, ALAM S M, IMAI T, et al. CX3CR1 tyrosine sulfation enhances fractalkine-induced cell adhesion[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 19418—19423.

[13] COMBADIERE B, FAURE S, AUTRAN B, et al. The chemokine receptor CX3CR1 controls homing and anti-viral potencies of CD8 effector-memory T lymphocytes in HIV-infected patients[J]. *AIDS*, 2003, 17: 1279—1290.

[14] 王磊. Fkn 及其受体 CX3CR1[J]. *国外医学生理病理科学与临床分册*, 2002, 22(5): 487—489.

[15] BJERKELI V, DAMAS J K, FEVANG B, et al. Increased expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, in Wegener's granulomatosis possible role in vascular inflammation[J]. *Rheumatology*, 2007, 46: 1422—1427.

[16] BAZAN J F, BACON K B, HARDIMAN G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif[J]. *Nature*, 1997, 385: 640—644.

[17] MIZOUE L S, BAZAN J F, HANDEL T M, et al. Solution structure and dynamics of the CX3C chemokine domain of fractalkine and its interaction with an N-terminal fragment of CX3CR1 [J]. *Biochemistry*, 1999, 38: 1402—1414.

[18] IMAI T, HIESHIMA K, HASKELL C. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesions[J]. *Cell*, 1997, 91: 521—530.

(收稿日期: 2012-09-12 修回日期: 2012-11-13)

量和单位的规范用法

胆固醇、三酰甘油、葡萄糖的旧制单位 mg/dl 现已废除,新的法定计量单位为 mmol/L。胆固醇、三酰甘油、葡萄糖新旧单位之间的换算系数分别为: 0. 025 9、0. 011 3、0. 055 5。例如: 胆固醇: 110 mg/dl×0. 025 9→2. 85 mmol/L; 三酰甘油: 20 mg/dl×0. 0113→0. 226 mmol/L; 血糖: 70 mg/dl×0. 055 5→3. 89 mmol/L。