

环孢素 A 对脐带血干细胞和 T 淋巴细胞的影响*

燕法红¹ 居瑞雪² 赵云霞³ 毛晓臻³ 林彩莲³

[摘要] 目的:探讨环孢素 A(CsA)对脐带血干细胞及 T 淋巴细胞的影响。方法:采集 10 例产妇的脐带血,每例脐带血分为 5 份,每份 2 mL,设对照组(无 CsA)、CsA 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、CsA 10 $\mu\text{mol/L}$ 组、CsA 20 $\mu\text{mol/L}$ 组、CsA 40 $\mu\text{mol/L}$ 组,用血细胞分析仪检测各组的白细胞数,应用流式细胞术检测各组的干细胞(CD34⁺ 细胞)、T 淋巴细胞(CD3⁺ 细胞)占 CD45⁺ 细胞的比例,并分别计算出干细胞、T 淋巴细胞的数值。采用配对样本 *t* 检验,分别比较不同浓度的 CsA 组与对照组在白细胞数、干细胞数、T 淋巴细胞数方面的差别。以线性相关分析各组白细胞数与 T 淋巴细胞数之间的相关性。**结果:**①白细胞数:CsA 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、CsA 10 $\mu\text{mol/L}$ 组、CsA 20 $\mu\text{mol/L}$ 组、CsA 40 $\mu\text{mol/L}$ 组均低于对照组($P < 0.05$)。②干细胞数:CsA 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、CsA 10 $\mu\text{mol/L}$ 组、CsA 20 $\mu\text{mol/L}$ 组、CsA 40 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。③T 淋巴细胞数:高浓度 CsA 组(10~40 $\mu\text{mol/L}$)与对照组比较,T 淋巴细胞数均降低($P < 0.01$);低浓度 CsA 组 T 淋巴细胞数与对照组差异无统计学意义($P = 0.133$)。④各组内白细胞数与 T 淋巴细胞数之间无相关性($P > 0.05$)。**结论:**CsA 无法提高脐带血中的干细胞数,可降低脐带血中的白细胞数和 T 淋巴细胞数。

[关键词] 环孢素 A;脐带血;干细胞;T 淋巴细胞;白细胞

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.08.008

[中图分类号] R329.2,R557 **[文献标志码]** A

Impact of cyclosporin A on umbilical cord blood stem cell and T lymphocyte

YAN Fahong¹ JU Ruixue² ZHAO Yunxia³ MAO Xiaozhen³ LIN Cailian³

(¹Department of Hematology, First Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang People's Hospital, Weifang, 261041, China; ²Department of Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang People's Hospital; ³Department of Obstetrics, First Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang People's Hospital)

Abstract Objective: To explore the impact of cyclosporin A on umbilical cord blood stem cell and T lymphocyte. **Methods:** Ten umbilical cord blood units were collected and each was divided into five groups including control group(without CsA), CsA 5 $\mu\text{mol/L}$ group, CsA 10 $\mu\text{mol/L}$ group, CsA 20 $\mu\text{mol/L}$ group and CsA 40 $\mu\text{mol/L}$ group with two milliliters for each group. White blood cell(WBC) was measured using automated hematology analyzer. CD34⁺ and CD3⁺ cell ratios were analyzed using flow cytometry. CD34⁺ and CD3⁺ cell counts were further calculated. Paired sample *t* test was used to compare difference of WBC, stem cell, T lymphocyte between each CsA group and control group respectively. Relationships between WBC and T lymphocyte in each group were analyzed using linear correlation. **Results:** ①WBC count was lower in each CsA group compared to control group($P < 0.05$). ②There was no difference of stem cell count between each CsA group and control group($P > 0.05$). ③T lymphocyte count of CsA 10-40 $\mu\text{mol/L}$ group was all lower than that of control group($P < 0.01$). There was no difference of T lymphocyte count between CsA 5 $\mu\text{mol/L}$ group and control group($P = 0.133$). ④There was no relationship between WBC and T lymphocyte in each group($P > 0.05$). **Conclusion:** CsA can not improve stem cell of umbilical cord blood and can reduce WBC and T lymphocyte.

Key words cyclosporin A; umbilical cord blood; stem cell; T lymphocyte; white blood cell

脐带血干细胞移植是治疗血液系统疾病的一种重要手段,但由于脐带血中干细胞数量较少,导致该技术在临床上无法广泛开展。如何提高脐带血中的干细胞数量,是造血干细胞移植领域的一个重要课题。既往有研究显示,生理状态下,脐带血

干细胞处于相对低氧的环境,低氧环境有利于干细胞的增殖与分化^[1-4]。在脐带血采集过程中,干细胞暴露于空气中的常氧,可使干细胞受到氧化应激损伤,减少干细胞数量、降低移植效果;而在低氧环境中采集脐带血可保护脐带血干细胞、提高干细胞采集效率及移植效果。此外,在常氧环境下于采集物中加用环孢素 A(cyclosporin A, CsA),亦可阻断氧化应激对干细胞的损伤,达到同样的效果^[5]。目前国内未见相关报道。本研究观察不同浓度的 CsA 对脐带血干细胞的采集效率有无影响。由于 CsA 可抑制 T 淋巴细胞的增殖,而 T 淋巴细胞在

*基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(No: 2016WS0644)

¹潍坊医学院第一附属医院,潍坊市人民医院血液内科(山东潍坊,261041)

²潍坊医学院第一附属医院,潍坊市人民医院检验科

³潍坊医学院第一附属医院,潍坊市人民医院产科

通信作者:林彩莲, E-mail:1135081139@qq.com

移植后移植物抗宿主病(GVHD)、移植物抗白血病效应(GVL)、抗感染等过程中均发挥重要作用,本研究同时观察 CsA 处理后脐带血中 T 淋巴细胞的变化。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

CsA 注射液(规格 250 mg/5mL)购自诺华制药公司。PC7-anti CD45、PE-anti CD34、FITC-anti CD3 流式抗体购自美国 Becton Dickinson 公司。血细胞分析仪为日本 Sysmex 公司产品。流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司产品。

1.2 人脐带血采集及处理

10 份人脐带血来自我院健康产妇。采集脐带血前制备稀释的 CsA 溶液:抽取 CsA 注射液,加入到无菌生理盐水中,浓度为 4 mg/mL。胎儿断脐后,用无菌采血针采集血样入含有 EDTA 的真空抗凝管中,每管 2 mL,共 5 管。分别为对照组(无 CsA)、CsA 5 μmol/L(6 μg/mL)组、CsA 10 μmol/L(12 μg/mL)组、CsA 20 μmol/L(24 μg/mL)组、CsA 40 μmol/L(48 μg/mL)组。对照组开盖、暴露于室温空气中。CsA 5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、40 μmol/L 组分别加入适量稀释后的 CsA 溶液。CsA 溶液加入后迅速盖严、用无菌干燥注射器抽尽气体。每管加入 CsA 与抽气的过程均在 10 s 内完成。充分混匀,密封条件下室温放置约 4 h,使得 CsA 进入细胞内,然后开盖暴露于空气中约 2 h。应用血细胞分析仪检测每管的白细胞浓度。然后进行流式检测。

1.3 流式检测

每组加入 PC7-anti CD45、PE-anti CD34、FITC-anti CD3 流式抗体各 5 μL,加入 50 μL 充分混匀后的脐带血,避光孵育 20 min。加裂红液 250 μL,放置 10 min。加 PBS 2 mL,300 × g 离心 5 min,弃上清。再洗一遍。以 PBS 0.5 mL 重悬细胞,用流式细胞仪检测。以 CD45/SSC 设门,定位白细胞群。分析 CD34⁺、CD3⁺细胞占 CD45⁺细胞的比例,然后乘以白细胞浓度,分别得出 CD34⁺、CD3⁺细胞的数量。

1.4 统计学分析

数据采用 SPSS 22.0 进行统计。各组资料经检验为正态分布后,采用配对样本 *t* 检验分别比较不同浓度的 CsA 组与对照组之间白细胞数、CD34⁺细胞数、CD3⁺细胞数的差异。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以线性相关分析各组白细胞数与 T 淋巴细胞数之间的相关性。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白细胞数的比较

对照组、CsA 5 μmol/L 组、CsA 10 μmol/L 组、CsA 20 μmol/L 组、CsA 40 μmol/L 组白细胞数分别为(13.12 ± 1.89) × 10⁹/L、(12.51 ± 1.78) × 10⁹/L、(12.30 ± 1.80) × 10⁹/L、(12.20 ± 1.88) × 10⁹/L、(12.11 ± 2.04) × 10⁹/L。不同 CsA 浓度组与对照组比较,白细胞数均降低(*P* < 0.05),不同 CsA 浓度组间两两比较,差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。

2.2 干细胞数的比较

对照组、CsA 5 μmol/L 组、CsA 10 μmol/L 组、CsA 20 μmol/L 组、CsA 40 μmol/L 组干细胞数分别为(2.75 ± 1.51) × 10⁷/L、(2.91 ± 1.67) × 10⁷/L、(2.76 ± 1.49) × 10⁷/L、(2.97 ± 1.63) × 10⁷/L、(2.73 ± 1.60) × 10⁷/L。不同 CsA 浓度组与对照组比较,干细胞数差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

2.3 T 淋巴细胞数的比较

对照组、CsA 5 μmol/L 组、CsA 10 μmol/L 组、CsA 20 μmol/L 组、CsA 40 μmol/L 组 T 淋巴细胞数分别为(2.59 ± 0.60) × 10⁹/L、(2.45 ± 0.64) × 10⁹/L、(2.38 ± 0.62) × 10⁹/L、(2.35 ± 0.54) × 10⁹/L、(2.39 ± 0.55) × 10⁹/L。高浓度 CsA 组(10~40 μmol/L)与对照组比较,T 淋巴细胞数均降低(*P* < 0.01)。低浓度 CsA 组(5 μmol/L)与对照组比较,T 淋巴细胞数无差别(*P* = 0.133)。不同 CsA 浓度组间两两比较,差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。

2.4 白细胞数与 T 淋巴细胞数之间的相关性

各组内白细胞数与 T 淋巴细胞数之间,无相关性(*P* > 0.05),见表 1。

表 1 各组白细胞数与 T 淋巴细胞数之间的相关性分析

	对照组	CsA 5 μmol/L 组	CsA 10 μmol/L 组	CsA 20 μmol/L 组	CsA 40 μmol/L 组
<i>r</i>	-0.429	-0.340	-0.255	-0.373	-0.282
<i>P</i>	0.217	0.337	0.477	0.288	0.430

3 讨论

氧化应激是缺血再灌注后器官组织损伤的重要机制。缺血缺氧的器官组织如心、脑、肾等在得到重新灌注、恢复供血供氧后,线粒体上的通透性转换孔(mitochondrial permeability transition

pore,MPTP)开放,产生大量的活性氧(reactive oxygen species,ROS),同时细胞内钙超载、炎症反应等的发生,可导致器官组织受到损伤。多项研究表明,CsA 在降低心、脑、肾等脏器缺血性疾病的再灌注损伤中起到一定保护作用^[6-16]。CsA 可与

MPTP 的组成成分亲环素 D 结合,抑制 MPTP 开放,减少 ROS 的释放,从而阻断线粒体的氧化应激过程。超氧化物歧化酶(SOD)等亦可保护组织免受氧化应激时 ROS 的损伤^[17]。然而,亦有不同的研究发现 CsA 并不能起到有效的保护作用^[18-21]。

有关氧化应激对造血干细胞影响的研究较少。Mantel 等^[5]研究发现,在低氧环境中处理骨髓或脐带血干细胞,以及在空气中的常氧环境下应用 CsA 处理干细胞,都能增加长期增殖干细胞(LT-HSC)数量、提高移植效果。CsA 可使脐带血中 CD34⁺ 细胞提高 6.1 倍,但 $P=0.05$,有显著提高干细胞的趋势。为使得 CsA 充分进入细胞发挥阻断 MPTP 作用,参照有关文献^[13],在体外乏氧环境下应用 CsA 预处理脐带血 4 h 左右,然后暴露于空气中发生氧化应激损伤。在本研究中,发现不同浓度的 CsA 未能提高脐带血中干细胞数量,鉴于目前相关研究较少,可进一步对本课题深入研究,例如通过扩大样本量或优化处理方法,并进行相关机制的研究,明确 CsA 对脐带血中干细胞的影响。同时发现,经过 CsA 处理、特别是较高浓度的 CsA 处理后,脐带血中 T 淋巴细胞数量下降,可能与 CsA 抑制淋巴细胞增殖、活化有关。因此,在脐带血中预先加入 CsA 可在一定程度上起到体外去 T 细胞的作用,对于高危 GVHD 的脐带血移植患者,在脐带血中加入 CsA 可能会起到预防 GVHD 的作用。本研究还发现,经过 CsA 处理后的白细胞数轻度降低,且与 T 淋巴细胞的降低之间无明显相关性,其机制尚待进一步阐明。

总之,这是国内首次应用 CsA 处理脐带血的研究。从本研究中发现应用 CsA 处理脐带血并不是提高干细胞数量的有效方法。此外,观察了 CsA 对脐带血中 T 淋巴细胞及白细胞的影响,本研究有望为今后的有关基础研究与临床应用提供一定的思路。

参考文献

- [1] Huang X, Trinh T, Aljoufi A, et al. Hypoxia Signaling Pathway in Stem Cell Regulation: Good and Evil[J]. *Curr Stem Cell Rep*, 2018, 4(2): 149-157.
- [2] Mohammadali F, Abroun S, Atashi A. Mild hypoxia and human bone marrow mesenchymal stem cells synergistically enhance expansion and homing capacity of human cord blood CD34⁺ stem cells[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(7): 709-716.
- [3] Shin DY, Huang X, Gil CH, et al. Physioxia enhances T-cell development ex vivo from human hematopoietic stem and progenitor cells[J]. *Stem Cells*, 2020, 38(11): 1454-1466.
- [4] Chabi S, Uzan B, Naguibneva I, et al. Hypoxia Regulates Lymphoid Development of Human Hematopoietic Progenitors[J]. *Cell Rep*, 2019, 29(8): 2307-2320.
- [5] Mantel CR, O'Leary HA, Chitteti BR, et al. Enhancing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Efficacy by Mitigating Oxygen Shock[J]. *Cell*, 2015, 161(7): 1553-1565.
- [6] Zhang CX, Cheng Y, Liu DZ, et al. Mitochondria-targeted cyclosporin A delivery system to treat myocardial ischemia reperfusion injury of rats[J]. *J Nanobiotechnology*, 2019, 17(1): 18.
- [7] Alexopoulos P, Panoutsopoulou K, Vogiatzis G, et al. Combined Treatment With Exenatide and Cyclosporine A or Parstatin 1-26 Results in Enhanced Reduction of Infarct Size in a Rabbit Model[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2017, 70(1): 34-41.
- [8] Ikeda G, Matoba T, Nakano Y, et al. Nanoparticle-Mediated Targeting of Cyclosporine A Enhances Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20467.
- [9] 黄光银, 文星, 付世全, 等. 环孢素 A 联合缺血适应对于急性 ST 段抬高型心肌梗死患者再灌注损伤的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2019, 28(23): 2528-2532, 2536.
- [10] Okahara A, Koga JI, Matoba T, et al. Simultaneous targeting of mitochondria and monocytes enhances neuroprotection against ischemia-reperfusion injury[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 14435.
- [11] Forsse A, Nielsen TH, Nygaard KH, et al. Cyclosporin A ameliorates cerebral oxidative metabolism and infarct size in the endothelin-1 rat model of transient cerebral ischaemia[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3702.
- [12] Fakharnia F, Khodaghali F, Dargahi L, et al. Prevention of Cyclophilin D-Mediated mPTP Opening Using Cyclosporine-A Alleviates the Elevation of Necroptosis, Autophagy and Apoptosis-Related Markers Following Global Cerebral Ischemia-Reperfusion[J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 61(1): 52-60.
- [13] Serkova N, Donohoe P, Gottschalk S, et al. Comparison of the effects of cyclosporin a on the metabolism of perfused rat brain slices during normoxia and hypoxia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(3): 342-352.
- [14] Lemos SV Neto, Vianna IG, Castiglia YM, et al. Cyclosporine A attenuates apoptosis and necrosis after ischemia-reperfusion-induced renal injury in transiently hyperglycemic rats[J]. *Acta Cir Bras*, 2017, 32(3): 203-210.
- [15] Yang H, Li R, Zhang L, et al. p53-cyclophilin D mediates renal tubular cell apoptosis in ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 317(5): F1311-F1317.

- 国临床医生杂志,2020,48(5):505-507.
- [5] 广圣芳,翟荣荣,王璐,等. 血清同型半胱氨酸,胱抑素 C,超氧化物歧化酶对 2 型糖尿病肾病的早期诊断价值[J]. 中国实验诊断学,2020,24(7):1114-1117.
- [6] 王强. 糖尿病肾病患者血清 Cys C、Hcy 和尿 mindin、NAG 含量检测及对疾病早期诊断的价值[J]. 海南医学院学报,2016,22(10):980-983.
- [7] 闫绍荣,何令伟,钱定良. 尿视黄醇结合蛋白、尿触珠蛋白、尿足细胞标志蛋白、尿肾小球裂隙膜蛋白联合检测对 2 型糖尿病肾病早期诊断的意义[J]. 中国卫生检验杂志,2020,30(10):1176-1179.
- [8] 李红金,赵敏,蔡雯雯,等. 2010 美国糖尿病协会糖尿病治疗指南[J]. 中国卒中杂志,2011,6(4):316-324.
- [9] 苟惠,梁静,估测肾小球滤过率对老年糖尿病肾病的诊断价值[J]. 解放军医药杂志,2018,30(5):79-82.
- [10] 汤巍,刘娜,范莹莹. 补充益生菌对老年糖尿病肾病患者疾病进展风险的影响[J]. 中国微生态学杂志,2020,32(5):570-574.
- [11] Lin YC, Chang YH, Yang SY, et al. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease [J]. J Formos Med Assoc, 2018, 117(8): 662-675.
- [12] Alicic RZ, Johnson EJ, Tuttle KR. Inflammatory Mechanisms as New Biomarkers and Therapeutic Targets for Diabetic Kidney Disease[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2018, 25(2): 181-191.
- [13] Matoba K, Takeda Y, Nagai Y, et al. Unraveling the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Diabetic Kidney Disease[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(14): 3393.
- [14] 陈璐,张洁,熊健哲,等. 2 型糖尿病肾病患者同型半胱氨酸水平与胰岛素抵抗的关系讨论[J]. 河北医学, 2019, 25(1): 111-115.
- [15] 黄河祥. 2 型糖尿病肾病患者同型半胱氨酸水平与胰岛素抵抗的关系探讨[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(19): 3339-3340.
- [16] Pasala S, Carmody JB. How to use...serum creatinine, cystatin C and GFR[J]. Arch Dis Child Educ Pract Ed, 2017, 102(1): 37-43.
- [17] 王芳,金雪雯. RBP、CysC 联合检测在糖尿病肾病早期诊断中的应用效果[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(9): 1278-1281.
- [18] 彭岚竹,庄兰良,金国玺,等. SOD、CysC 和 GHbA1c 构成的联合因子对早期糖尿病肾病的诊断价值[J]. 新医学, 2020, 51(9): 687-690.
- [19] Daza González MA, Miró G, Fermín Rodríguez M, et al. Short term impacts of meglumine antimoniate treatment on kidney function in dogs with clinical leishmaniasis[J]. Res Vet Sci, 2019, 126: 131-138.
- [20] 张艳霞,刘玉清,张娟,等. Ghb、HCY 及 ALB 与 2 型糖尿病合并肾脏微血管病变[J]. 医药论坛杂志, 2019, 40(10): 122-124.
- [21] 张岱,叶山东,陈超. 尿系列蛋白检测在 2 型糖尿病肾脏疾病诊断中的意义[J]. 安徽医学, 2017, 38(3): 339-342.
- [22] 胡鹏,汪薇,姜兰斌,等. Cys-C、RBP、 β 2-MG 联合检测对 2 型糖尿病肾病早期诊断的价值[J]. 华南国防医学杂志, 2019, 33(10): 691-694.
- [23] 梁涛,张晓宝,张德太,等. 3 项指标联合检测在糖尿病肾病中的早期诊断价值[J]. 临床血液学杂志, 2019, 32(4): 247-251.

(收稿日期:2021-01-08)

(上接第 563 页)

- [16] Lemoine S, Pillot B, Augeul L, et al. Dose and timing of injections for effective cyclosporine A pretreatment before renal ischemia reperfusion in mice[J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0182358.
- [17] 程小欢,袁佳仪,荣伽玲,等. 老年心肺慢性疾病中氧化应激指标的变化差异分析[J]. 临床血液学杂志, 2020, 33(6): 402-406.
- [18] Oliveira ACC, Módolo NSP, Domingues MAC, et al. Effects of cyclosporine on ischemia-reperfusion injuries in rat kidneys. An experimental model[J]. Acta Cir Bras, 2019, 34(8): e201900806.
- [19] Upadhaya S, Madala S, Baniya R, et al. Impact of cyclosporine A use in the prevention of reperfusion injury in acute myocardial infarction: A meta-analysis[J]. Cardiol J, 2017, 24(1): 43-50.
- [20] Ottani F, Latini R, Staszewsky L, et al. Cyclosporine A in Reperfused Myocardial Infarction: The Multi-center, Controlled, Open-Label CYCLE Trial [J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 67(4): 365-374.
- [21] Ederoth P, Dardashti A, Grins E, et al. Cyclosporine before Coronary Artery Bypass Grafting Does Not Prevent Postoperative Decreases in Renal Function: A Randomized Clinical Trial [J]. Anesthesiology, 2018, 128(4): 710-717.

(收稿日期:2020-12-09)