

PSGL-1 缺失导致 MDSCs 上调

周泽启, 李江超, 张潇涵, 韩 露, 叶宇翔, 王丽京

(广东药学院血管生物学研究所, 广州 510006)

【摘要】 目的 P-选凝素糖蛋白配体 1 (P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1) 主要特异性表达在白细胞上, 我们的研究 PSGL-1 缺失在小鼠体内脾脏、骨髓中 MDSCs 的变化。**方法** 利用我们实验室现有的 PSGL-1^{-/-} 小鼠进行试验, 经过鉴定后, PSGL-1^{-/-} 后代小鼠; 利用流式细胞术检测 C₅₇ 和 PSGL-1^{-/-} 小鼠脾脏、骨髓中 Gr-1 和 CD11b 阳性细胞的变化。**结果** 与对照组 C₅₇ 小鼠相比, PSGL-1^{-/-} 基因工程小鼠 MDSCs 在脾脏、骨髓中显著上调 ($P < 0.001$), **结论** PSGL-1 的缺失导致小鼠脾脏、骨髓中 MDSCs 升高。

【关键词】 PSGL-1; MDSCs; 基因工程小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0042-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.009

MDSCs are upregulated in PSGL-1-deficient mice

ZHOU Ze-qi, LI Jiang-chao, ZHANG Xiao-han, HAN Lu, YE Yu-xiang, WANG Li-jing

(Vascular Biology Center, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective PSGL-1 is specifically expressed in leucocytes. The aim of this study was to explore the changes of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the spleen and bone marrow in PSGL-1-deficient mice. **Methods** PSGL-1^{-/-} mice were used in the experiment. After identification of the offsprings, flow cytometry was used to test the expression of CD11b and Gr-1 in C₅₇ and PSGL-1^{-/-} mice. **Results** Compared with the C₅₇ mice, the expression of MDSCs was up-regulated in the PSGL-1-deficient mice ($P < 0.001$). **Conclusion** The expression of MDSCs is upregulated in PSGL-1-deficient mice.

【Key words】 P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1; Myeloid-derived suppressor cells, MDSCs; Spleen; Bone marrow; Transgenic mice; PSGL-1-deficient mice

P-选凝素糖蛋白配体 1 (P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1) 是 90 年代发现其为同源二聚体的一种跨膜的糖蛋白, 表达于白细胞的膜表面^[1,2]。在炎症环境中, PSGL-1 与 P-选凝素的相互作用, 促进白细胞与内皮细胞的黏附和滚动, 在粘附的起始阶段发挥着重要作用^[3,4]。

在现有的报道中有人认为炎症是能激发先天免疫和组织修复和再生, 但是大多数人认为炎症是

促进机体逐步走向衰老、病态的一个诱因^[5,6]。PSGL-1 介导白细胞粘附的同时, 还作为信号分子转导胞外信号, 促进白细胞活化, 具有重要的生理意义^[7,8]。最近在研究表明, PSGL-1 在血小板与中性粒细胞结合中起到非常重要作用, 当中性粒细胞无法结合血小板时, 它们不能正常迁移, 炎症会减少^[9,10]。在 PSGL-1 介导的粘附过程中发现, 当 PSGL-1 敲除使其粘附血小板的能力降低, 且白细胞

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (44164007; 81472336) 和 广东省医学科研基金, 项目号: A2013312。

【作者简介】 周泽启, 男, 硕士, E-mail: zhouzeqi199131@163.com。

【通讯作者】 王丽京, 女, 教授, E-mail: wanglijing62@163.com。

向炎症部位的爬行变慢。

肿瘤免疫作为一个新型的肿瘤研究方向,其作用方式和免疫应答相当复杂,涉及一系列的免疫分子及其之间的相互作用。髓系抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)作为一种免疫细胞在肿瘤逃逸中越来越引起关注,MDSCs 主要参与肿瘤免疫逃逸、免疫抑制进而促进肿瘤的发生发展。MDSCs 借助外源物质和肿瘤自身的特性进而帮助肿瘤实现逃逸功能。MDSCs 主要是一群异质性细胞和粒细胞,巨噬细胞等的前体,在小鼠体内 MDSCs 即为 CD11b⁺/Gr-1⁺ 双阳性细胞,但是目前国际上对于人的 MDSCs 细胞还没有明确的划分,HLA-DR-CD14-CD33⁺CD11b 被大多数人认可^[11]。在本研究中采取的动物模型为,PSGL-1 缺失的转基因小鼠,其对照鼠采用其背景鼠 C₅₇。首先需要采取基因鉴定的方法鉴定其基因类型,在分别利用流式细胞术检测其脾脏和骨髓中 MDSCs 的变化,在我们的实验中我们发现其脾脏和骨髓中 MDSCs 显著升高。

1 材料和方法

1.1 材料

PSGL-1^{-/-}小鼠(B6. Cg-Selp^{lgtm}^{1Fur}/J)均购买自美国 Jackson 实验室,SPF 环境中饲养扩群。C57BL/6 小鼠购自广东省医学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(粤)2008-0002。使用许可证号,SYXK(粤)2012-0125,PCR 引物由 Invitrogen 公司合成,引物 Mix 购自 thermo。Flowjo 进行流式分析。

1.2 方法

1.2.1 小鼠饲养和鉴定:所有小鼠均于 SPF 级环境下饲养,现将购买的 PSGL-1^{-/-}小鼠与 C57 进行杂交,得到后代中鉴定其基因型,将 PSGL-1^{+/+}雄鼠和 PSGL-1^{+/+}雌鼠杂交,得到的子代有三种情况 PSGL-1^{+/+}、PSGL-1^{+/+}、PSGL-1^{-/-},经鉴定后得到实验鼠 PSGL-1^{-/-}小鼠和对照鼠 PSGL-1^{+/+}。PSGL-1 小鼠鉴定引物序列为: P1: 5'-AGCTTC CTTGTGCTG CTGAC-3', P2: 5'-TCAAAATCGTCATCCCCAAC-3', P3: 5'-CCTTCTATCGCCTTCTTGACG-3'。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min,94℃ /30 s,65℃ /1 min、72℃ /1 min,35 个循环;72℃ 延伸 2 min。P1 和 P2 是鉴定野生型条带,扩增条带为 140 bp,P2 和 P3 是鉴定突变型条带,扩增条带为 500 bp,用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 结果,紫外灯下观察结果并

拍照。

1.2.2 脾脏 MDSCs 细胞检测:取 8 周的 PSGL-1^{-/-}、PSGL-1^{+/+}小鼠各 6 只,眼眶取血,去脾脏用 PBS 在尼龙筛网上进行研磨,取研磨下层的细胞液,用红细胞裂解液进行裂解 15 min,离心,进行计数,取大约 1×10^6 个细胞数,350 r/min,5 min;弃上清液,用纸吸干管口液体,1 mL 0.5% BSA 重悬细胞液,离心,350 r/min,5 min,加入工作液,避光孵育 30 min,弃上清液,洗 1~2 次,上机检测。

1.2.3 骨髓 MDSCs 细胞检测:对上述分组小鼠,取完脾脏后将后腿剪下,抽取骨髓,同上述步骤检测。

2 结果

2.1 PSGL-1 缺失小鼠脾脏中 MDSCs 上调

脾脏是人和脊椎动物最大的淋巴器官,同时也是机体最大的免疫器官。取 C57 小鼠和 PSGL-1^{-/-}小鼠的脾脏进行单细胞悬液的制备,而后用流式细胞术技术标记 Gr-1 和 CD11b 两种抗体,检测结果显示在 PSGL-1 缺失小鼠中两者双阳性细胞即 MDSCs 细胞急剧上升,与正常小鼠对比,统计结果见图 1,差异明显($P < 0.001$)。

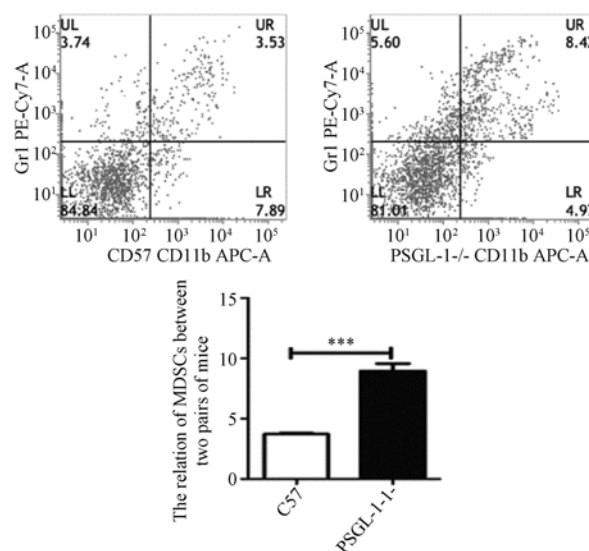


图 1 PSGL-1 缺失小鼠脾脏中 MDSCs 上调

Fig. 1 MDSCs are upregulated in the spleen of the PSGL-1^{-/-} mice

2.2 PSGL-1 缺失小鼠骨髓中 MDSCs 上调

骨髓不但是造血器官,它还是重要的免疫器官。在上述脾脏中看到 MDSCs 急剧上升,但是在白细胞大量来源地的骨髓是否也有同样结果,我

们不得而知,所以接下来我们进行骨髓方面的实验,实验结果显示,同脾脏一样,MDSCs 也是急剧上升,差异明显($P < 0.001$)。具体结果见图 2。

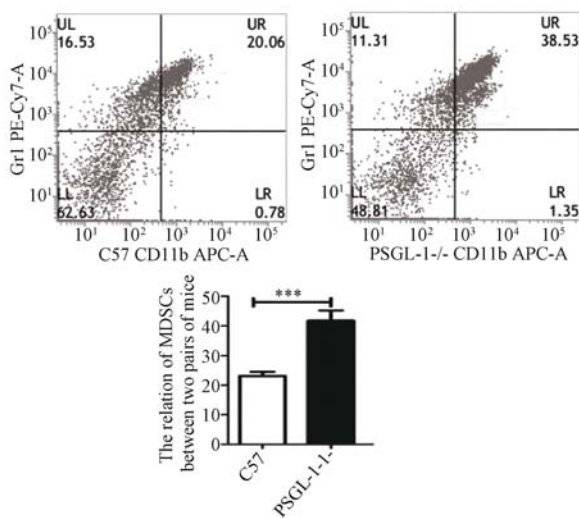


图 2 PSGL-1 缺失小鼠骨髓中 MDSCs 上调

Fig. 2 MDSCs are upregulated in the bone marrow of the PSGL-1^{-/-} mice

3 讨论

在炎症环境中,白细胞的滚动粘附起着重要作用,近年来研究发现的 PSGL-1 与其配体 P-selectin 在粘附的起始阶段发挥着重要作用^[12]。其主要作用是由 PSGL-1 介导的信号级连反应来完成具有重要的生理意义。PSGL-1 有三个与其对应的选凝素,其中造血祖细胞向骨髓的归巢以及细胞的分化是由 E-selectin 介导完成^[13]。研究还发现 PSGL-1 能参与趋化因子的趋化反应,如 PSGL-1 与 CCL19 (chemokine (C-C motif) ligand 19) 和 CCL21 (chemokine (C-C motif) ligand 21) 结合,并支持其趋化反应。也有文献报道 PSGL-1 和多发性骨髓瘤的发病机理有关系^[14-15]。提示 PSGL-1 可能与肿瘤发生发展和转移密切相关。上述研究表明,PSGL-1 在炎症反应中和血液肿瘤中发挥重要作用。

在不同器官,不同组织中,和不同病理条件下(炎症,肿瘤等环境),MDSCs 的表达会有所差异。受细胞因子的作用,这些髓系来源的前体细胞成熟受阻,因而停留在各个分化阶段,成为具有免疫抑制功能的 MDSCs。当在病理条件下,特别是肿瘤情况下,通过自分泌或旁分泌细胞因子,进而抑制 T 细胞正常功能,影响机体免疫。有研究报道靶向 MDSCs 的药物研究能有效抑制黑色素瘤患者的病

理进程,且患者两年生存率良好。所以在此基础上我们的研究才显得意义重大。通过我们的实验研究,发现在 PSGL-1 缺失小鼠中 Gr-1 和 CD11b 双阳性细胞急剧上升,且统计学差异显著($P < 0.001$),提示我们 PSGL-1 对机体免疫防护有着重要指示作用。本研究的创新点在于揭示 PSGL-1 在免疫中 MDSCs 升高,且差异显著。最新研究表明 PSGL-1 介导中性粒细胞引起的血小板黏附,阻断 PSGL-1 时炎症加剧,我们和其他研究者的结果揭示 PSGL-1 在人体机体免疫中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A, Cancer statistics 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012. 62(1): 10-29.
- [2] Wang HB, Wang JT, Zhang L, et al. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation [J]. Nat Immunol, 2007, 8(8): 882-892.
- [3] Thaker AI, Rao MS, Bishnupuri KS, et al. IDO1 metabolites activate beta-catenin signaling to promote cancer cell proliferation and colon tumorigenesis in mice [J]. Gastroenterology, 2013. 145(2): 416-425 e1-4.
- [4] Carlow DA, Gossens K, Naus S, et al. PSGL-1 function in immunity and steady state homeostasis [J]. Immunol Rev, 2009. 230(1): 75-96.
- [5] Wang HB, Wang JT, Zhang L, et al. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation [J]. Nat Immunol, 2007. 8(8): 882-892.
- [6] Katayama Y, Hidalgo A, Furie BC, et al. PSGL-1 participates in E-selectin-mediated progenitor homing to bone marrow: evidence for cooperation between E-selectin ligands and alpha4 integrin [J]. Blood, 2003. 102(6): 2060-2067.
- [7] Veerman KM, Williams MJ, Uchimura K, et al. Interaction of the selectin ligand PSGL-1 with chemokines CCL21 and CCL19 facilitates efficient homing of T cells to secondary lymphoid organs [J]. Nat Immunol, 2007. 8(5): 532-539.
- [8] Matsumoto M, Miyasaka M, Hirata T. P-selectin glycoprotein ligand-1 negatively regulates T-cell immune responses [J]. J Immunol, 2009. 183(11): 7204-7211.
- [9] Chen SC, Huang CC, Chien CL, et al. Cross-linking of P-selectin glycoprotein ligand-1 induces death of activated T cells [J]. Blood, 2004. 104(10): 3233-3242.
- [10] Rivera-Nieves J, Burcin TL, Olson TS, et al. Critical role of endothelial P-selectin glycoprotein ligand 1 in chronic murine ileitis [J]. J Exp Med, 2006. 203(4): 907-917.
- [11] Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition [J]. Curr Opin Immunol, 2010. 148(7): 2574-2527.
- [12] Cunningham D, Zilio S, Marigo I, et al. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2010. 375(9719): 1030-1047.

- [13] Meira, LB, Bugni JM, Green SL, et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice [J]. J Clin Invest, 2008. 118(7): 2516–2525.
- [14] 李江超, 周泽启, 叶杰, 等. PSGL-1 基因敲除小鼠血中 MIP-1 γ 和 TNF- α 的表达 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(02): 70–78.
- [15] Raderer, M, Pfeffel F, Pohl G, et al. Regression of colonic low grade B cell lymphoma of the mucosa associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori* [J]. Gut, 2000. 46(1): 133–135.

[修回日期]2014-05-04

2015 年《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》组织专题计划

2015 年《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》将计划由以下编委组织 7 期高水平专题:(1)顾为望教授:小型猪在生物医药研究中的应用(已完成);(2)范慧敏教授:实验动物心肺移植模型的建立及相关研究(已完成);(3)范永升教授:中医药研究与“病症”结合动物模型(杂志截稿日期:2015 年 2 月 28 日);(4)高诚教授:实验动物质量检测、标识标记、模型和评价(学报截稿日期:2015 年 5 月 31 日);(5)王强教授:斑马鱼在发育生物学及实验动物模型中的应用(学报截稿日期:2015 年 7 月 31 日);(6)代解杰教授:实验动物新资源标准化研究及疾病动物模型的创建(杂志截稿日期:2015 年 8 月 31 日);(7)肖杭教授:实验动物在药理毒理方面的应用研究(杂志截稿日期:2015 年 9 月 30 日)。

欢迎全国的同道积极参与符合上述专题内容的论文撰写、投稿,请注意各个专题的截稿日期;论文可以通过《中国实验动物学报》网站(<http://zgswdw.alljournal.ac.cn/sydwbyjyx/ch/index.aspx>);《中国比较医学杂志》网站(<http://zgswdw.alljournal.ac.cn/zgbjyxzz/ch/index.aspx>)上的两刊远程稿件管理系统注册并投稿(请在投稿后,在“消息管理”中向编辑部发送消息,注明是哪个专题),收到后将与上述各位教授所组织的专题论文一起进行严谨的审稿,入选论文将在两刊专题中刊出。我刊还特别欢迎各位专家教授撰写有学术导向和指导意义的评论性文章(包括专家论坛、专论、学术争鸣,等等),此类论文可以随时通过 Email 直接发送到邮箱:b67761337@126.com。相信在各位编委、审稿专家和广大实验动物工作者的积极参与下,我刊 2015 年的学术质量和影响力度会更上一层楼。

《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》编辑部