

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.07.013

干细胞因子对骨髓来源肥大细胞中 蛋白酶 mRNA 水平的影响

杭雪晴, 张 弦, 刘 健

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘 要:文章利用 10、50、200 ng/mL 3 种不同质量浓度的干细胞因子(stem cell factor, SCF)连续培养骨髓来源肥大细胞(bone marrow derived mast cell, BMMC)5 周,并每周检测培养过程中肥大细胞蛋白酶(mast cell protease, MCP)4、MCP5、MCP6 和 MCP7 的表达变化。结果表明,BMMC 中 MCP 的表达水平受 SCF 质量浓度和培养时间的影响。*Mcpt4* 的表达水平随着 SCF 质量浓度的增加而明显上升,在高质量浓度 SCF 培养第 3 周时诱导 *Mcpt4* 高表达;*Mcpt5* 在中质量浓度 SCF 培养条件下表达水平高,并且在培养第 4 周时达到最高水平;*Mcpt6* 在低质量浓度 SCF 培养条件下的表达水平高,并且在培养第 3 周时达到最高水平;*Mcpt7* 的表达水平与 *Mcpt4* 相似,随着 SCF 质量浓度的增加而明显上升,在高质量浓度 SCF 培养第 4 周时表达最高。实验结果为研究肥大细胞活性和生理功能提供了新的依据。

关键词:骨髓来源肥大细胞(BMMC);干细胞因子(SCF);肥大细胞蛋白酶(MCP);类胰蛋白酶(MCT)

中图分类号:Q254 文献标志码:A 文章编号:1003-5060(2025)07-0945-06

Effect of stem cell factor on protease mRNA level in bone marrow derived mast cell

HANG Xueqing, ZHANG Xian, LIU Jian

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract:In this paper, bone marrow derived mast cell(BMMC) was cultured for five weeks with 10 ng/mL, 50 ng/mL and 200 ng/mL stem cell factor(SCF) and the mRNA levels of mast cell protease 4(MCP4), MCP5, MCP6 and MCP7 were detected every week during the culture process. The results showed that the mRNA expression level of MCP was affected by culture duration and SCF concentration. The mRNA expression level of *Mcpt4* significantly increased with the increase of SCF concentration, and the high expression was induced in the third week under high-concentration SCF culture conditions. The mRNA expression level of *Mcpt5* was high under medium-concentration SCF culture conditions and reached a maximum in the fourth week. The mRNA expression level of *Mcpt6* was high under low-concentration SCF culture conditions and reached a maximum in the third week. The mRNA expression level of *Mcpt7* was similar to that of *Mcpt4*, which significantly increased with the increase of SCF concentration, and was the highest in the fourth week under high-concentration SCF culture conditions. The results provide a new basis for studying the activity and physiological functions of BMMC.

Key words: bone marrow derived mast cell(BMMC); stem cell factor(SCF); mast cell protease(MCP); mast cell tryptase(MCT)

收稿日期:2023-04-19;修回日期:2023-05-05

基金项目:国家自然科学基金资助项目(32070757)

作者简介:杭雪晴(1998—),女,安徽淮北人,合肥工业大学硕士生;

刘 健(1970—),男,安徽合肥人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师,通信作者,E-mail:liujian509@hfut.edu.cn.

肥大细胞(mast cell, MC)是免疫系统的重要效应细胞,具有抵抗病原体以及调节免疫系统炎症反应的能力^[1],大量的研究表明,肥大细胞在过敏反应、哮喘、肥胖等生理病理过程中具有免疫调节作用^[2]。肥大细胞的特点是含电子密度极高的致密分泌颗粒,其中充满大量预先形成和预先激活的免疫调节介质^[3]。当肥大细胞被激活时,这些预先形成的颗粒化合物会迅速释放到周围环境中^[4]。肥大细胞对免疫反应的影响与它们释放的颗粒化合物的生物作用密切相关^[5]。研究表明,肥大细胞颗粒蛋白酶在各种炎症环境中发挥不同的作用^[6]。

肥大细胞祖细胞是由骨髓的造血干细胞发育而来。肥大细胞祖细胞由血液循环运输到各组织中,在各组织局部生长因子的影响下发育为成熟的肥大细胞,包括干细胞因子(stem cell factor, SCF)和白细胞介素-3(interleukin-3, IL-3)^[7],这些细胞生长因子对肥大细胞的增殖分化发挥重要的作用。在肥大细胞预先合成的颗粒物质中包含多种肥大细胞蛋白酶(mast cell protease, MCP),包括类胰蛋白酶(mast cell tryptase, MCT)和糜蛋白酶(mast cell chymase, MCC)。MCT 和 MCC 是肥大细胞分泌的中性蛋白酶,是肥大细胞内含量最多的蛋白质。在小鼠肥大细胞颗粒中,主要的类胰蛋白酶是 MCP6 和 MCP7,主要的糜蛋白酶为 MCP1、MCP2、MCP4、MCP5。在人源肥大细胞中,主要包含 α -、 β -类胰蛋白酶和由 CMA1 基因编码的糜蛋白酶^[8]。

骨髓来源肥大细胞(bone marrow derived mast cell, BMMC)是从小鼠骨髓中分离诱导产生的,常使用重组 IL-3 或者分泌 IL-3 细胞系的条件培养基进行诱导。肥大细胞可以根据其分布位置的差异划分为结缔组织肥大细胞(connective tissue mast cell, CTMC)和黏膜肥大细胞(mucosal mast cell, MMC)。其中:CTMC 主要位于结缔组织和皮肤、耳朵等部位,同时脂肪组织中也有少量的肥大细胞^[9],主要表达 MCP4、MCP5、MCP6、MCP7;MMC 在肠道黏膜等区域有一定数量的分布^[10],主要表达 MCP1 和 MCP2。文献^[11]利用 SCF 和细胞因子 IL-9 的组合来诱导金属蛋白酶 MMP-1 和 MMP-2 的表达,这 2 种蛋白酶仅在 MMC 中表达,而 IL-4 则抑制这 2 种酶的表达;文献^[12]在转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、IL-9、IL-4、IL-3 和 SCF 的培养条件下诱导骨髓 4 周产生 MMC,并在 IL-

4、IL-3、SCF 的培养条件下诱导产生 CTMC。BMMC 是肥大细胞体外研究的有效模型,高表达 MCP4、MCP5、MCP6、MCP7,并且由于硫酸软骨素的表达而被钙蓝染色^[13]。

不同细胞因子诱导条件下,BMMC 预先形成颗粒中的蛋白酶种类和含量不同,进而导致 BMMC 的活性和功能存在差异。当肥大细胞培养条件中不存在 SCF 则会导致 Fc ϵ RI 表达的降低和 CD117 表达的增加^[14]。在前人的研究中,发现 SCF 可以直接促进小鼠 IL-3 衍生的 BMMC 或新分离的 CTMC 的生长,并且可诱导 MCP4 的 mRNA 的表达^[15]。因此研究不同培养条件下 BMMC 中肥大细胞蛋白酶表达的变化规律,对体外研究肥大细胞的活性和生理功能具有重要的意义。

本文基于 BMMC 的培养方法,利用低、中、高 3 种不同质量浓度的 SCF 培养 5 周 BMMC,探究小鼠 CTMC 特异表达的 4 种基因 *Mcpt4*、*Mcpt5*、*Mcpt6* 和 *Mcpt7* 在每周的表达水平变化,以此探究 SCF 质量浓度和培养时间对 BMMC 蛋白酶表达水平的影响。为体外研究肥大细胞的活性和生理功能提供新的依据。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂

RNAiso Plus RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、SYBR Green Mixture 均购于 Takara 公司;1640 粉末、胎牛血清、青链霉素双抗溶液均购于 Gibco 公司;碳酸氢钠、氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 BMMC 的培养和处理

将 6~10 周龄的 C57BL/6N 小鼠用 CO₂ 窒息处死,并放入 75%酒精中浸泡;在无菌超净台内将小鼠解剖取其后腿骨,放入 75%酒精浸泡;将后腿骨上的肌肉去除干净,分离胫骨和股骨。用无菌的剪刀剪去骨两侧关节,并用一次性无菌注射器吸取 RPMI 1640 培养基,将骨中的骨髓吹至无菌培养基中;用移液枪将骨髓细胞吹散,静置一段时间待组织碎块沉降,将上清液转移至无菌离心管中,400g、4℃离心 5 min,弃上清;用 RPMI 1640 培养基重悬细胞,加入终质量浓度为 4 ng/mL 的 IL-3;2 周后每周更换 1 次培养基,并加入终质量浓度为 10、50、200 ng/mL 的 SCF,每周收取细胞。

1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

根据制造商的产品说明,使用 RNAiso Plus 试剂从 BMMC 中提取总 RNA。在细胞中加入 300 μ L 的 Trizol,再加入 60 μ L 三氯甲烷,充分震荡后,静置 5 min;在 4 $^{\circ}$ C 的条件下,12 000g 离心 15 min,吸取 100 μ L 的上层无色水相,再加入 100 μ L 异丙醇,充分震荡后,静置 10 min;在 4 $^{\circ}$ C 的条件下,12 000g 离心 10 min,弃上清;加入 1 mL 的 75% 酒精,4 $^{\circ}$ C、12 000g 离心 5 min,弃上清;加入 8 μ L DEPC 水、2 μ L Mix 溶解沉淀,充分振荡以溶解 RNA,然后 4 $^{\circ}$ C、5 000g 离心 2 min;混匀后,在 37 $^{\circ}$ C 条件下反应 50 min,再在 85 $^{\circ}$ C 反应 10 s 得到 cDNA。

1.4 实时荧光定量 PCR 测定

实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测系统采用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 进行。反应体系由 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min 启动,然后进行 35 个循环扩增(95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s)。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析 β actin mRNA 表达正常化后基因表达的相对变化。

本文所用引物序列(5'—3')如下:

Mcpt4-F CTTCTGACTTTATCAAGCCGGG,

Mcpt4-R CACTCCAGTTCGCCCC;

Mcpt5-F TGGAGGCACGGAGTGCATA,

Mcpt5-R AGGAGGACTGTTATAGACCTTCC;

Mcpt6-F GCCCAGCCAATCAGCG,

Mcpt6-R CCAGGGCCACTTACTCTCAGA;

Mcpt7-F CATGCAGCCCCCGGT,

Mcpt7-R TTCCCATGTGCCTCCTGTC;

β actin-F CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC,

β actin-R ATGGAGCCACCGATCCACA。

1.5 数据分析

所有数据以平均值 \pm 标准差表示,图形使用 Origin 8.5 绘制。统计显著性由 t 检验分析,* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$, **** 表示 $P < 0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 SCF 对 *Mcpt4* 的 mRNA 表达量的影响

为了探究 SCF 质量浓度对 BMMC 中蛋白酶表达量的影响,每周收取 0~5 周的 BMMC,利用实时荧光定量 PCR 检测 *Mcpt4* 的表达,如图 1 所示,可以看出,3 种 SCF 质量浓度下在 0~2 周 *Mcpt4* mRNA 表达均保持较低水平。由图 1a 可知,当使用 10 ng/mL SCF 处理 BMMC 时,

Mcpt4 表达于培养第 3 周(即 SCF 加入第 1 周)时显著上升,并于第 4 周和第 5 周持续上升。由图 1b 可知,当使用 50 ng/mL SCF 处理 BMMC 时,*Mcpt4* 表达也于培养第 3 周(即 SCF 加入第 1 周)时显著上升,并于培养第 4 周达到最高表达水平,第 5 周则呈现显著下降。由图 1c 可知,当使用 200 ng/mL SCF 处理 BMMC 时,*Mcpt4* 表达也于培养第 3 周(即 SCF 加入第 1 周)时显著上升,并于第 3 周达到最高表达水平,第 4 周和第 5 周则呈现显著下降。

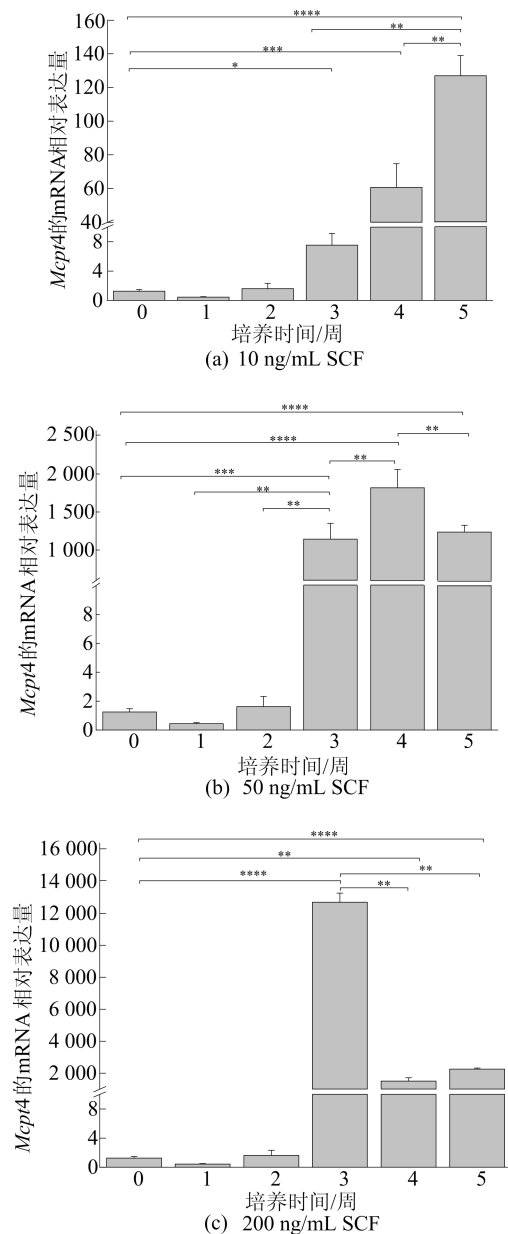


图1 SCF 对 BMMC 中 *Mcpt4* 的 mRNA 表达量的影响

对比 3 种不同质量浓度 SCF 培养 BMMC 可知,随着 SCF 质量浓度的增加,*Mcpt4* 表达水平明显上升。实验结果证明 *Mcpt4* 的表达水平随

着 SCF 质量浓度增加而明显上升,在 SCF 高质量浓度培养第 3 周时诱导 *Mcpt4* 高表达。

2.2 SCF 对 *Mcpt5* 的 mRNA 表达量的影响

本文探究了不同质量浓度 SCF 对 BMMC 中 *Mcpt5* 的 mRNA 表达量的变化,如图 2 所示。利用实时荧光定量 PCR 检测 *Mcpt5* 的表达并对结果进行分析发现,当使用 10、50、200 ng/mL SCF 处理 BMMC 0~4 周时,*Mcpt5* 表达都随着培养时间的增加而升高,于第 4 周达到最高值,而在培养第 5 周时 *Mcpt5* 表达显著下降。

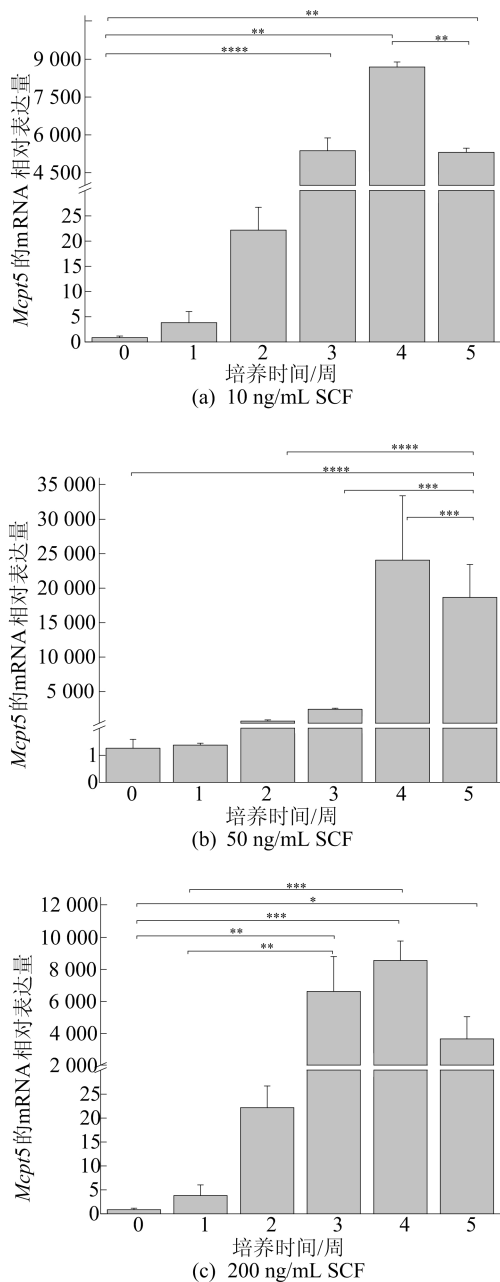


图 2 SCF 对 BMMC 中 *Mcpt5* 的 mRNA 表达量的影响

由图 2 可知,随着 SCF 质量浓度的增加 *Mcpt5* 表达呈现先上升后下降的变化趋势。实验结果说

明,*Mcpt5* 在 SCF 中等质量浓度培养条件下表达水平最高,并且在培养第 4 周时达到最高水平。

2.3 SCF 对 *Mcpt6* 的 mRNA 表达量的影响

本文研究了 SCF 质量浓度对 BMMC 诱导过程中 *Mcpt6* 的 mRNA 表达量的影响,如图 3 所示。

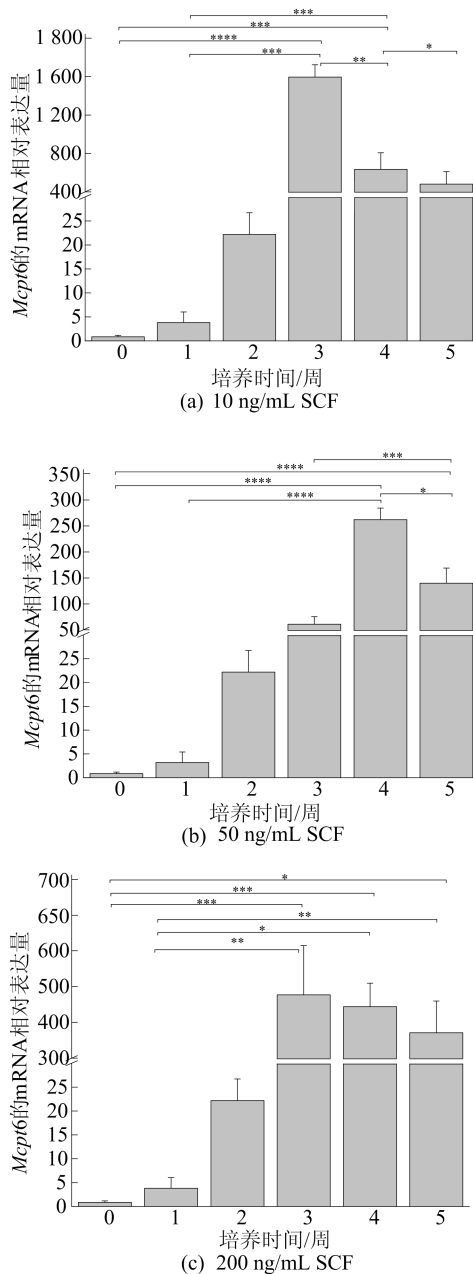


图 3 SCF 对 BMMC 中 *Mcpt6* 的 mRNA 表达量的影响

由图 3 可知,在 0~1 周 *Mcpt6* 的 mRNA 表达保持较低水平,并在第 2 周显著的上升。由图 3a 可知,当使用 10 ng/mL SCF 处理 BMMC 时,*Mcpt6* 的表达在 SCF 加入第 1 周时显著上升,并在此时达到最高表达水平,在第 4~第 5 周时显著下降,但其表达量仍维持在较高水平。由图 3b 可知,当使用 50 ng/mL SCF 处理 BMMC 时,

Mcpt6 的 mRNA 表达水平在培养第 3 周出现一定的上升趋势,并在第 4 周达到最高表达水平,第 5 周时出现显著下降。由图 3c 可知,当使用 200 ng/mL SCF 处理 BMMC 时,*Mcpt6* 的表达量在培养第 3 周达到峰值,并在第 4~第 5 周时维持相似水平。因此,*Mcpt6* 的表达水平在低质量浓度 SCF 培养条件下最高,并且在培养第 3 周时达到最高水平。

2.4 SCF 对 *Mcpt7* 的 mRNA 表达量的影响

本文测定了不同 SCF 质量浓度下 0~5 周诱导培养 BMMC 的过程中 *Mcpt7* 的 mRNA 表达量的变化,如图 4 所示。

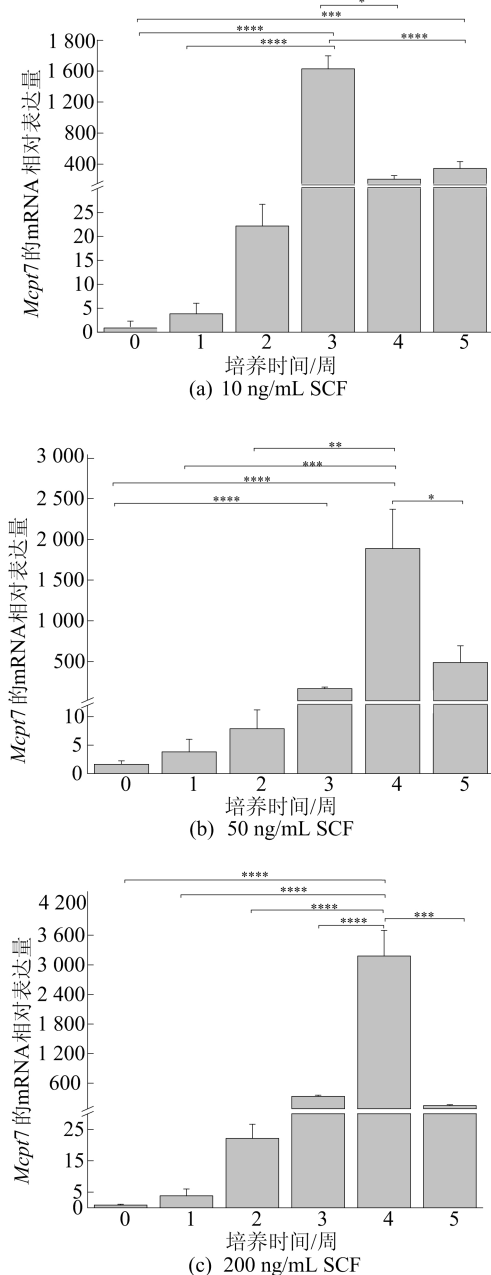


图 4 SCF 对 BMMC 中 *Mcpt7* 的 mRNA 表达量的影响

由图 4 可知:在使用 10 ng/mL 的 SCF 培养 BMMC 时,0~3 周 *Mcpt7* 的表达逐渐上升,在培养第 3 周达到最高水平,而第 4、第 5 周出现显著下降;在 50、200 ng/mL SCF 处理 BMMC 条件下,*Mcpt7* 的 mRNA 在 0~4 周表达逐渐上升并在第 4 周达到最高水平,而第 5 周出现显著下降。因此,随着 SCF 质量浓度的增加 *Mcpt7* 表达明显上升,在 SCF 高质量浓度培养第 4 周时表达最高。

3 讨论

成熟的肥大细胞存在于身体的大多数组织中,通常靠近宿主和环境接触面的部位最丰富,如皮肤和各种黏膜组织^[3]。肥大细胞的分布决定其可以在抵御外部病原体和绝缘其他环境的第一道防线上发挥作用^[5]。BMMC 作为经典的肥大细胞体外模型,与组织中的肥大细胞一样,颗粒物质中含有一些合成介质和细胞因子。然而,在体外诱导过程中,不同诱导条件对 BMMC 的各种蛋白酶表达影响的相关研究并不多。本文采用 3 种不同质量浓度的 SCF 培养和诱导 BMMC,研究了诱导过程中 MCP 表达水平的变化。

为了探究 SCF 对 BMMC 在分化过程中和成熟后 MCP 表达的影响,本研究在 BMMC 诱导分化成熟 5 周的全过程中每周收取细胞,并对其进行了 *Mcpt4*、*Mcpt5*、*Mcpt6*、*Mcpt7* 的 mRNA 表达检测分析,发现 *Mcpt4* 的表达随着 SCF 质量浓度的升高逐渐上升。在 0~5 周内,BMMC 的 *Mcpt4* 表达峰值在 SCF 质量浓度不断升高的情况下逐渐提前。在 200 ng/mL 高质量浓度 SCF 培养条件下,*Mcpt4* 的 mRNA 表达在第 3 周时达到峰值。与文献^[16]相似,在单独使用 IL-3 培养时并不会诱导 MCP4 蛋白的表达,在加入 SCF 后,造成 MCP4 的蛋白水平显著上升。同时,加入 SCF 后会使得 BMMC 中 MCT 表型发生变化。研究发现,不管是加入 SCF 还是在重组 IL-3 中培养,其 MCP5 的蛋白表达维持在较高水平。

本文研究结果表明:*Mcpt5* 的 mRNA 表达在 BMMC 培养的第 2 周就出现显著升高的情况,说明 MCP5 作为肥大细胞中特异的蛋白酶,在肥大细胞成熟早期就有相当量的表达;在 10 ng/mL SCF 培养条件下,*Mcpt6* 的 mRNA 表达量最高,并在第 3 周达到峰值,而在 50、200 ng/mL 培养下,*Mcpt6* 的表达在第 3~第 5 周均保持高水平。然而,在前人的研究中,使用 15 ng/mL SCF 培养 BMMC 时,*Mcpt6* 的表达量在 0~6 周内逐渐上

升^[17],该研究在培养 BMMC 时,SCF 于第 0 周开始加入,而本研究是在第 2 周加入 SCF。这些研究结果的差异性进一步说明了 SCF 的诱导时间和质量浓度会影响 BMMC 的蛋白酶表达和发育分化进程。该结论为体外研究肥大细胞活性和生理功能提供了新的依据。

[参 考 文 献]

- [1] MARSHALL J S. Mast-cell responses to pathogens[J]. Nature Review Immunology, 2004, 4(10): 787-799.
- [2] RIBATTI D. The mast cell[M]. Switzerland: Springer Nature, 2019: 8-12.
- [3] 谢天发,刘长安,刘健. HPLC-MS/MS 检测小鼠脑部组胺和 5-羟色胺[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2018, 41(1): 124-128.
- [4] KRYPEL-WHITE-MORE M, DILEEPAN K N, WOOD J G. Mast cell: a multi-functional master cell[J]. Frontiers in Immunology, 2016, 6: 620-635.
- [5] DAHLIN J S, HALLGREN J. Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues[J]. Molecular Immunology, 2015, 63(1): 9-17.
- [6] FROSSI B, MION F, SIBILANO R, et al. Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? [J]. Immunological Reviews, 2018, 282(1): 35-46.
- [7] GIBSON S, MILLER H R. Mast cell subsets in the rat distinguished immunohistochemically by their content of serine proteinases[J]. Immunology, 1986, 58(1): 101-105.
- [8] DA SILVA E Z, JAMUR M C, OLIVER C. Mast cell function: a new vision of an old cell[J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2014, 62(10): 698-738.
- [9] 张磊,刘健. 利用 FACS 定量研究脂肪组织中肥大细胞的数量[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2017, 40(10): 1416-1419.
- [10] GENTEK R, GHIGO C, HOEFFEL G, et al. Hemogenic endothelial fate mapping reveals dual developmental origin of mast cells[J]. Immunity, 2018, 48(6): 1160-1171.
- [11] EKLUND K K, GHILDYAL N, AUSTEN K F, et al. Induction by IL-9 and suppression by IL-3 and IL-4 of the levels of chromosome 14-derived transcripts that encode late-expressed mouse mast cell proteases[J]. Journal of Immunology, 1993, 151: 4266-4267.
- [12] BENEDE S, CODY E, AGASHE C, et al. Immune characterization of bone marrow-derived models of mucosal and connective tissue mast cells[J]. Allergy Asthma & Immunology Research, 2018, 10(3): 268-277.
- [13] FEYERABEND T B, HAUSSER H, TIETZ A, et al. Loss of histochemical identity in mast cells lacking carboxypeptidase A [J]. Molecular and Cellular Biology, 2005, 25: 6199-6210.
- [14] COLLINGTON S J, WILLIAMS T J, WELLER C L. Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues[J]. Trends in Immunology, 2011, 32: 478-485.
- [15] HAIG D M, HUNTLEY J F, MACKELLAR A, et al. Effects of stem cell factor (kit-ligand) and interleukin-3 on the growth and serine proteinase expression of rat bone-marrow-derived or serosal mast cells [J]. Blood, 1994, 83(1): 72-83.
- [16] GURISH M F, GHILDYAL N, MCNEIL H P, et al. Differential expression of secretory granule proteases in mouse mast cells exposed to interleukin 3 and c-kit ligand [J]. Journal of Experimental Medicine, 1992, 175(4): 1003-1012.
- [17] XIANG Y, EYERS F, YOUNG I G, et al. Identification of microRNAs regulating the developmental pathways of bone marrow derived mast cells [J]. PLoS ONE, 2014, 9(5): 139-156.
- [10] CHEN M, MAO A, XU M, et al. CRISPR-Cas9 for cancer therapy: opportunities and challenges[J]. Cancer Letters, 2019, 447: 48-55.
- [11] GUPTA D, BHATTACHARJEE O, MANDAL D, et al. CRISPR/Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing [J]. Life Sciences, 2019, 232: 116636.
- [12] TERAHARA N, NAMBA K, MINAMINO T. Dynamic exchange of two types of stator units in *Bacillus subtilis* flagellar motor in response to environmental changes[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2020, 18: 2897-2907.
- [13] WADHWA N, BERG H C. Bacterial motility: machinery and mechanisms[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20: 161-173.
- [14] BIQUET-BISQUERT A, LABESSE G, PEDACI F, et al. The dynamic ion motive force powering the bacterial flagellar motor [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 659464.
- [15] TAKEKAWA N, IMADA K, HOMMA M. Structure and energy-conversion mechanism of the bacterial Na(+)-driven flagellar motor[J]. Trends in Microbiology, 2020, 28: 719-731.
- [16] WADHWA N, TU Y, BERG H C. Mechanosensitive remodeling of the bacterial flagellar motor is independent of direction of rotation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118: 12506-12511.

(责任编辑 闫杏丽)

(责任编辑 闫杏丽)