

文章编号: 1001-6325(2014)01-0104-05

研究论文

人脂肪间充质干细胞对再生障碍性贫血 T 淋巴细胞的免疫调节作用

王 棕, 刘国强, 徐 敏, 邢 健, 赵 霞, 韩 芳, 丁慧芳*

(胜利油田 中心医院 血液内科, 山东 东营 257034)

摘要:目的 研究人脂肪间充质干细胞(haMSCs)对再生障碍性贫血(AA)T 淋巴细胞(TLCs)的作用,初步探讨其治疗 AA 的机制。方法 从人脂肪中提取并培养 haMSCs;从 AA 患者外周血中分离 T 淋巴细胞(AA-TLCs);将两者共培养后,MTT 法检测细胞增殖;real-time RCR 和 Western blot 测定 T-bet 和 GATA-3 的表达,ELISA 法检测上清 IL-2、IL-4、IL-10 和 INF- γ 的水平。结果 HaMSC 呈时间依赖性的抑制 AA-TLCs 的增殖,AA-TLCs 与 haMSCs 共培养 3、5 和 7 d 后的抑制率分别为 $34.94\% \pm 10.11\%$ 、 $53.44\% \pm 6.16\%$ 和 $68.13\% \pm 15.24\%$ ($P < 0.05$);haMSC 能够下调 AA-TLCs 转录因子 T-bet 的表达,同时上调 GATA-3 的表达($P < 0.05$);haMSCs 能够升高 Th2 类细胞因子 IL-4、IL-10 的水平,降低 Th1 类细胞因子 INF- γ 、IL-2 的水平。[MSCs + AA-TLCs 组:IL-4 (88.6 ± 15.2) ng/L、INF- γ (8.7 ± 2.7) ng/L;AA-TLCs 组:IL-4 (1.4 ± 0.6) ng/L、INF- γ (41.5 ± 3.7) ng/L ($P < 0.05$)]。结论 HaMSCs 在体外对 AA 患者 TLCs 具有免疫调节作用,其机制可能是通过调节转录因子 T-bet 和 GATA-3 的表达从而抑制 Th 细胞向 Th1 细胞方向分化。

关键词: 间充质干细胞;再生障碍性贫血;免疫调节;T-bet;GATA-3

中图分类号:R 556.5 文献标志码:A

Immune-modulatory effect of human adipose derived mesenchymal stem cells on T lymphocytes of patients with aplastic anemia

WANG Liang, LIU Guo-qiang, XU Min, XING Jian, ZHAO Xia, HAN Fang, DING Hui-fang*

(Dept. of Hematology, Shengli Oilfield Center Hospital, Dongying 257034, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of human adipose derived mesenchymal stems cells (haMSC) on T lymphocytes of aplastic anemia patients (AA) and to explore its possible mechanism. **Methods** HaMSCs were extracted from human adipose tissues. T lymphocytes were isolated from peripheral blood of patients with AA by density gradient centrifugation. HaMSCs were co-cultured with T-lymphocytes. Inhibitory effect of haMSCs on AA-TLCs was measured by MTT assay, T-bet and GATA-3 level were examined by real-time PCR and Western blot. The level of INF- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 was detected by ELASA. **Results** HaMSCs showed inhibitory effect on lymphocyte proliferation of aplastic anemia patients in a time dependent manner: After 3, 5 and 7 days' co-culturing, their inhibitory rates were $34.94\% \pm 10.11\%$, $53.44\% \pm 6.16\%$, $68.13\% \pm 15.24\%$, respectively ($P < 0.05$). The T-bet mRNA and protein levels in MSCs + AA-TLCs group were significantly lower than that in AA-TLCs group, while the GATA-3 mRNA and protein levels were significantly higher than that in AA-TLCs group. The concentrations of Th1 type cytokines INF- γ and IL-2 in MSCs + AA-TLCs group [(8.7 ± 2.7) ng/L and (7.3 ± 1.3) ng/L, respectively] were significantly lower than those in AA-TLCs group [(41.5 ± 3.7) ng/L and (61.5 ± 8.7) ng/L, respectively] ($P < 0.05$). But the concentrations of Th2 type cytokines IL-4 and IL-10 in MSCs + AA-TLCs group [(88.6 ± 15.2) ng/L and (38.3 ± 11.8) ng/L, respectively] were significantly higher than those in AA-TLCs group [($1.4 \pm$

收稿日期:2013-04-12 修回日期:2013-05-24

* 通信作者(corresponding author): dingmx2008@126.com

0.6) ng/L and (1.3 ± 0.2) ng/L, respectively ($P < 0.05$)]. **Conclusions** HaMSCs can regulate T lymphocytes of aplastic anemia patients *in vitro*, which was related with the depression of Th1-dominant response due to the disorder of T-bet and GATA-3 gene expression.

Key words: mesenchymal stem cells (MSCs); aplastic anemia (AA); Immune-modulatory; T-bet; GATA-3

再生障碍性贫血 (aplastic anemia, AA) 是一种以造血系统为靶器官的、T 淋巴细胞 (T lymphocytes, TLCs) 介导的自身免疫疾病, 主要发病机制是细胞免疫异常介导的 TLCs 异常激活增殖、CD4 + / CD8 + 比例失调, 造血负调控因子分泌增多^[1]。因此, AA 的治疗关键是抑制 TLCs 的活化与增殖。

间充质干细胞 (mesenchymal stems cells, MSCs) 可分泌多种细胞因子支持造血干细胞的增殖和分化, 此外, 还可通过分泌转化生长因子 (transforming growth factor, TGF- β)、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 等细胞因子对 T 淋巴细胞增殖起到抑制作用^[2]。目前已有临床应用造血干细胞联合 MSCs 输注治疗再生障碍性贫血的报道^[3-4], 但具体的机制还不明确。人脂肪来源的间充质干细胞 (human adipose derived mesenchymal stems cells, haMSCs) 具有多向分化能力, 且脂肪取材安全, 来源广泛, 因此具有用于细胞替代治疗的可能。本实验通过研究 haMSCs 对 AA 患者外周血 T 淋巴细胞增殖的抑制作用, 阐明 haMSCs 抑制 AA-TLCs 增殖和免疫调控机理, 旨在为 MSCs 在免疫治疗方面的开发利用提供理论依据, 为 AA 免疫治疗方法开创新思路。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取 2012 年 1 月至 2013 年 1 月在胜利油田中心医院收治的 AA 患者 10 例, 诊断标准统一参照张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》^[5], 经医院伦理委员会同意, 并签署了知情同意书, 患者的基本情况见表 1。所有患者在采集外周血前 3 个月均未接受免疫抑制剂或激素类药物治疗。健康志愿者经本院体检, 均无肿瘤、外伤、感染、传染病及自身免疫性疾病史。

1.2 主要试剂

DMEM、DF12、RPMI1640、胎牛血清、EDTA 和胰蛋白酶 (GibcoBRL 公司); MCDB、干细胞生长因子 (Sigma 公司); SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒 (Takara 公司); 反转录及 PCR 扩增试剂 (天根生化科技有限

表 1 患者的基本情况表
Table 1 Basic condition of patients

number	age	gender	diagnose	date of diagnose	immunization or steroid treatment
1	17	female	AA	aug-12	no
2	33	male	AA	jun-12	no
3	56	male	AA	may-10	no
4	49	male	AA	feb-11	no
5	26	male	AA	aug-11	no
6	25	female	AA	feb-12	no
7	21	female	AA	sep-12	no
8	32	female	AA	aug-12	no
9	17	female	AA	dec-12	no
10	15	male	AA	apr-12	no

公司); 流式抗人 CD29、CD31、CD34、CD45、CD105、CD106 和 HLA-DR 抗体 (BD Pharmingen 公司); 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) (Sangon 公司); 兔抗 β -actin 单克隆抗体, 兔抗人 T-bet 单克隆抗体, 兔抗人 GATA-3 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司); 辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔二抗 (BD Pharmingen 公司); IL-2、IL-4、IL-10、INF- γ ELISA 试剂盒 (R&D Systems 公司)。

1.3 方法

1.3.1 人脂肪来源间充质干细胞 (haMSCs) 的分离、培养和鉴定: 1) 建立培养基培养 haMSCs: 脂肪组织来源于临床脂肪抽取术, 经 I 型胶原酶消化获取原代 haMSCs。取第 2 代和第 4 代 MSCs 培养 haMSCs 实验备用。培养方法见参考文献 [6]。2) 流式细胞仪检测 haMSCs 的表型: 用间接免疫荧光法检测细胞的表型, 间充质干细胞经胰蛋白酶消化后, 洗涤 2 次, 再用洗液 (0.5% 牛血清白蛋白的 PBS) 洗涤 1 次, 加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min (一抗为小鼠抗人的单克隆抗体 CD105、CD106、CD34、CD31、CD29、CD44 和 HLA-DR), 洗液洗涤 2 次, 用洗液洗涤后, 加入 FITC 标记的羊抗鼠二抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。孵育结束后, 细胞洗涤 3 次, 并悬浮在 500 μL 的 PBS 中, 置于冰上待流式细胞仪检测。

1.3.2 T 淋巴细胞 (TLCs) 的分离: 取经肝素抗凝的

再生障碍性贫血患者和正常人外周血 5 ~ 10 mL (红细胞 Coombs 试验阴性), PBS 倍比稀释后, 用淋巴细胞分离液分离出外周血单个核细胞, PBS 洗涤 2 次, RPMI1640 重悬并经尼龙棉柱纯化后得到 TLCs。

1.3.3 有丝分裂原刺激的 T 细胞增殖: 选取形态及密度均合适的孔内的 haMSC 作为饲养层细胞, 分 3 组进行实验: 1) 正常 TLCs; 2) MSC + AA-TLCs; 3) AA-TLCs。应用 96 孔细胞培养板, 按照上述实验分组方案, 加入相应外周血 TLCs、AA-TLCs、haMSCs 及植物血凝素 (phytohemagglutinin, PHA), 细胞数为 2×10^4 个/孔, 每组设 3 个复孔。调整反应体系至 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养箱孵育 7 d。分别于第 3、5 和 7 天, 收集 3 个复孔的细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 分装, -80 $^{\circ}$ C 冻存留待细胞因子的检测。余每孔加入 MTT (5 g/L) 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 h 后, 小心吸取上清, 每孔加入 DMSO 150 μ L, 酶标仪 540 nm 波长测吸光度 (A 值)。计算 TLCs 增殖抑制率。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 检测 T-bet 与 GATA-3 mRNA 的表达: 按照 Takara 公司 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒说明, 在 IQ5 实时定量 PCR 仪上运行 real-time PCR。每份样品设置 3 个复孔, 独立实验重复 3 次。具体方法见参考文献 [7]。引物序列如下: GAPDH: 上游引物: 5'-GGTCACCAGGGCTGCTTTTA-3', 下游引物: 5'-GGATCTCGCTCCTGGAAGATG-3'; T-bet 上游引物为: 5'-GCTGGAGAAAAGAAGACAAGAAAG-3', 下游引物为: 5'-AAGAAAAAACACACCCCACACAC-3'; GATA-3 上游引物为: 5'-AGGGAGTGTGTGAAGTGTGGG-3', 下游引物为: 5'-CTTCGCTTGGGCTTAATGAGG-3' (由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。

1.3.5 Western blot 检测 T-bet 与 GATA-3 蛋白的表达: 采用放射免疫沉淀试验提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度后, 每泳道以 50 μ g 蛋白质样品进行 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 恒压 100 mV 电泳 2 h, 恒流 250 mA 转膜 4 h, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 用兔抗人 T-bet 与 GATA-3 单克隆抗体于 4 $^{\circ}$ C 培育过夜 (1:500), 吐温-Tris 盐缓冲液 (TBST) 漂洗 3 遍后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:1 500), 37 $^{\circ}$ C 摇床温育 2 h, 最后经 ECL 系统曝光显影, β -actin 为对照。

1.3.6 造血调控因子 IL-2、IL-4、IL-10、INF- γ 的测定: 在无血清培养基条件下分别收集单独培养的健康志愿者的 TLCs、AA-TLCs 的培养上清, 以及 haMSCs 与健康志愿者的 TLCs、AA-TLCs 共培养的上清, 根据试剂盒说明书提供的操作步骤检测 IL-2、IL-4、IL-10 和 INF- γ 分泌水平值。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件学软件进行分析, 结果均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 样本均数先采用单因素方差分析 (ANOVA), 然后采用 LSD t 检验进行两样本均数比较。

2 结果

2.1 haMSCs 的形态和免疫表型

光镜下细胞贴壁生长, 呈梭形、三角形, 折光性较好; 细胞核清晰可见, 折光率均匀, 内含 1 至多个核仁; 偶见处于分裂状态的细胞。原代培养的细胞大部分于接种后 24 h 逐步即贴壁, 经换液、传代后细胞均呈梭形、成纤维样细胞。流式细胞仪检测显示细胞表型高表达黏附分子 CD29、CD44 和 CD105; 但造血内皮细胞的标记 CD34、CD31 的表达均为阴性, 也不表达 CD106 和 MHC-II 类分子 HLA-DR (图 1)。

2.2 haMSCs 对 AA-TLCs 增殖的影响

单纯 T 淋巴细胞能对 PHA 刺激起反应, 保持增殖活性。在植物血凝素 (phytohemagglutinin, PHA) 体外活化的 AA-TLCs 反应体系中加入 haMSCs, haMSCs 能抑制淋巴细胞对 PHA 刺激的反应性, 并且抑制程度呈时间依赖性 (图 2)。AA-TLCs 与 haMSCs 接触性培养后 3、5 和 7 d 的抑制率分别为 34.94% $\pm$ 10.11%, 53.44% $\pm$ 6.16%, 68.13% $\pm$ 15.24% ($P < 0.05$)。

2.3 T-bet 和 GATA-3 表达水平的比较

在 AA-TLCs 与 haMSCs 共培养 7 d 后, MSCs + AA-TLCs 组 T-bet mRNA 及蛋白表达水平均低于 AA-TLCs 组 ($P < 0.05$); 而 MSCs + AA-TLCs 组 GATA-3 mRNA 及蛋白水平均高于 AA-TLCs 组 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.4 ELISA 法检测上清 IL-2、IL-4、IL-10、INF- γ 的水平

HaMSC 和 AA-TLCs 共培养 7 d 后, MSC + AA-TLCs 组 Th1 类细胞因子 INF- γ 、IL-2 水平明显低于

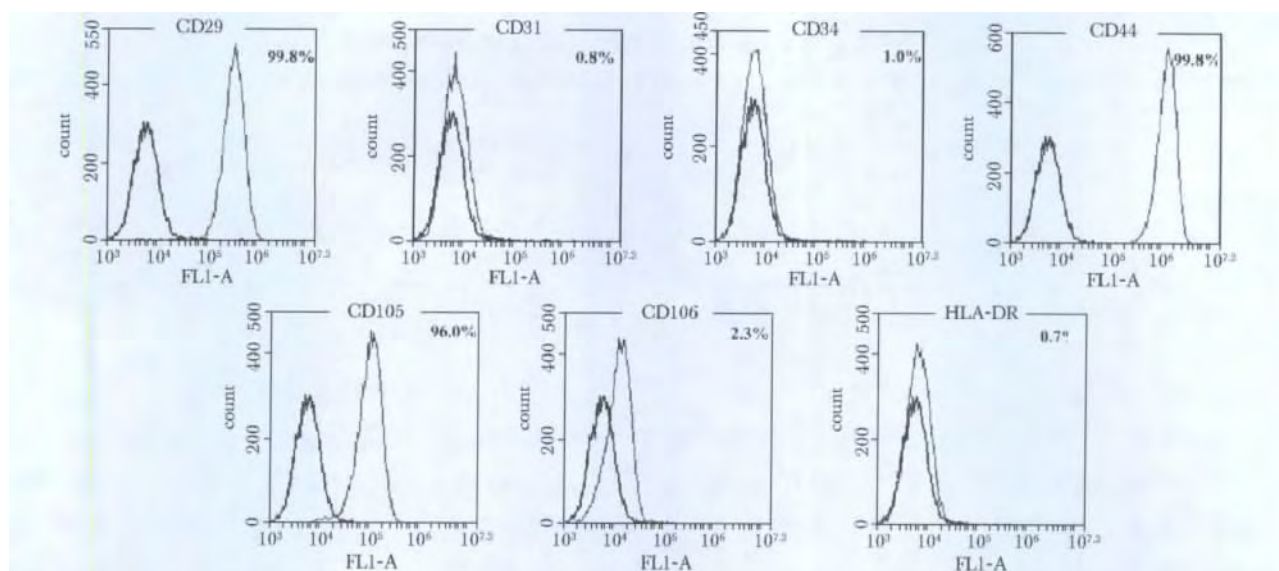
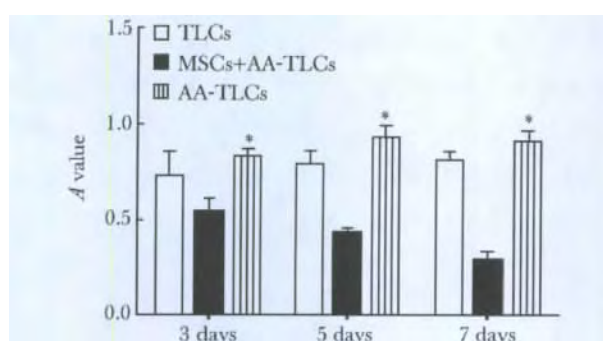


图 1 haMSCs 的免疫表型

Fig 1 Flow cytometric profile of haMSCs



the ratio of haMSCs to AA-TLCs is 1:1; * $P < 0.05$ compared with MSCs + AA-TLCs

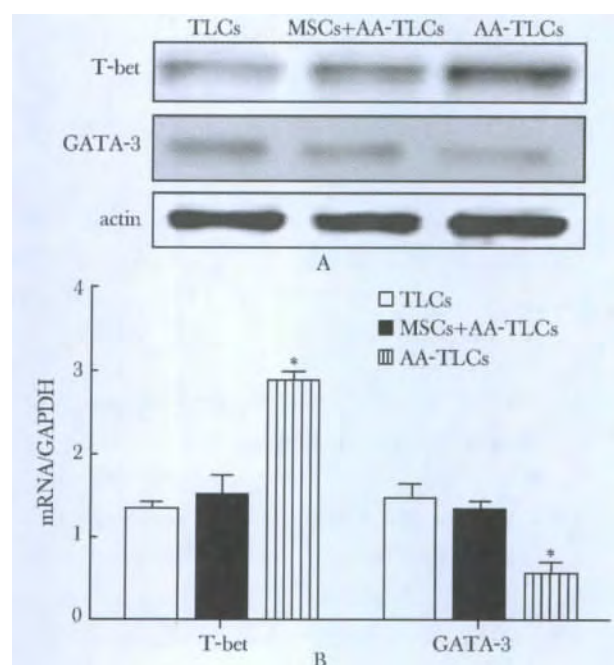
图 2 haMSCs 能够时间依赖性的抑制 AA T 淋巴细胞的增殖

Fig 2 Suppression of AA T cells proliferation by haMSC in a time-dependent manner ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

AA-TLCs 组 ($P < 0.05$); 而 MSC + AA-TLCs 组 Th2 类细胞因子 IL-4、IL-10 水平明显高于 AA-TLCs 组 ($P < 0.05$)。但 haMSC 对正常 TLCs Th1、Th2 细胞因子的分泌水平无明显影响(表 2)。

3 讨论

抑制 TLCs 的活化与增殖是治疗再生障碍性贫血的关键。近年来, MSCs 的免疫调节作用受到越来越多的关注。在控制骨髓移植引起的移植物抗宿主病以及 AA 等疾病方面, 已经取得了初步疗效^[3-4], 有报道指出, 将不同来源的 MSCs 加入混合的淋巴细胞



A. the protein levels of T-bet and GATA-3 detected by Western blot; B. the mRNA levels of T-bet and GATA-3 analyzed by real-time PCR; * $P < 0.05$ compared with MSCs + AA-TLCs group

图 3 T-bet 和 GATA-3 在 3 组中的表达水平

Fig 3 The expression of T-bet and GATA-3 in three groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

反应中, 或加入 PHA 刺激的淋巴细胞中, 淋巴细胞的增殖活性均下降^[8], 本实验可得到与之一致的结果: haMSC 对 TLCs 增殖具有明显的抑制作用,

表2 共培养前后细胞因子 INF- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 的水平Table 2 Level of IL-2 IL-4 IL-10 INF- γ in medium of AA-TLCs before and after co-culture with haMSCs($\bar{x} \pm s$, ng/L $n=10$)

group	INF- γ	IL-2	IL-4	IL-10
TLCs	7.1 $\pm$ 1.7	5.2 $\pm$ 2.1	4.7 $\pm$ 1.7	3.3 $\pm$ 0.8
MSCs + TLCs	10.3 $\pm$ 4.8	6.3 $\pm$ 5.7	8.1 $\pm$ 1.1	12.1 $\pm$ 3.4
AA-TLCs	61.5 $\pm$ 8.7	41.5 $\pm$ 3.7	1.4 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.2
MSCs + AA-TLCs	8.7 $\pm$ 2.7*	7.3 $\pm$ 1.3*	88.6 $\pm$ 15.2*	38.3 $\pm$ 11.8*

* $P < 0.05$, compared with the AA-TLCs group.

且随共培养时间的延长,抑制程度增强。

T-bet 是 Th1 细胞特异性转录因子,能够促进 Th0 向 Th1 细胞分化,抑制 Th2 细胞的分化^[9]。GATA-3 是 Th2 细胞特异性转录因子,可减少 INF- γ 的生成,使 Th1 前体细胞向 Th2 方向分化^[9]。Th0 细胞分化为 Th1 和 Th2 过程中,分别受到转录因子 T-bet 和 GATA-3 的调控。正常情况下 T-bet 与 GATA-3 两者相互抑制,并维持动态平衡,因此 T-bet/GATA-3 比值常用来评价机体免疫功能有无失衡。INF- γ 、IL-2 是 Th1 类细胞因子的典型代表,IL-4、IL-10 是 Th2 类细胞因子的典型代表,常被用来验证 Th 细胞的分化方向^[10]。

本研究通过建立 haMSCs 与 AA-TLCs 共培养模

型,研究 haMSC 是否能够抑制 AA-TLCs 的活化与增殖从而治疗 AA,并通过检测 T-bet 及 GATA-3 的表达,初步探讨 haMSC 对 AA 的影响机制,为临床应用提供理论依据。通过本研究,发现 haMSCs 对 AA 有一定免疫调节作用,经细胞因子的水平变化证实出现 Th1/Th2 平衡向 Th2 方向漂移的结果。T-bet mRNA 和蛋白表达水平明显减少,而 GATA-3 mRNA 和蛋白表达明显升高,提示间充质干细胞影响 Th1/Th2 分化状态与影响转录因子 T-bet 和 GATA-3 的表达有关。本研究提示 haMSCs 有可能成为治疗再生障碍性贫血一种有效可行的方法。但实验仅限于在体外,临床应用时 haMSCs 所需剂量以及在患者体内是否仍能达到预期的效果需进一步研究。

参考文献:

- [1] Scheinberg P. Aplastic anemia: therapeutic updates in immunosuppression and transplantation [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2012, 2012:292-300.
- [2] Koc ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic [J]. Bone Marrow Transplant, 2001, 27:235-239.
- [3] Jaganathan BG, Tisato V, Vulliamy T, et al. Effects of MSC co-injection on the reconstitution of aplastic anemia patient following hematopoietic stem cell transplantation [J]. Leukemia, 2010, 24:1791-1795.
- [4] 徐丽昕,曹永彬,王志红,等. 单倍体相合造血干细胞联合脐带血间充质干细胞移植治疗急性重型再生障碍性贫血的疗效观察 [J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19: 1241-1245.
- [5] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准(第3版) [M]. 北京:科学出版社, 2007: 268-271.
- [6] 徐琦璘,王棕,赵春华. 人脂肪来源间充质干细胞诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞上皮间质转化 [J]. 基础医学与临床, 2012, 32: 623-627.
- [7] Qilin Xu, Liang Wang, Hongling Li, et al. Mesenchymal stem cells play a potential role in regulating the establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition in MCF7 human breast cancer cells by paracrine and induced autocrine TGF- β [J]. Int J Oncol, 2012, 41: 959-968.
- [8] Najjar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, et al. Impact of different mesenchymal stromal cell types on T-cell activation, proliferation and migration [J]. Int Immunopharmacol, 2013, 15:693-702.
- [9] Chakir H, Wang H, Lefebvre DE, et al. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3 [J]. J Immunol Methods, 2003, 278:157-169.
- [10] Pletinckx K, Stijlemans B, Pavlovic V, et al. Similar inflammatory DC maturation signatures induced by TNF or Trypanosoma brucei antigens instruct default Th2-cell responses [J]. Eur J Immunol, 2011, 41:3479-3494.