

论 著

人脐带间充质干细胞抑制 T 细胞免疫作用

阳莉¹, 林惠珠¹, 钱师宇², 陈晓燕¹, 陈文捷¹, 卢建溪^{1*}

(¹ 中山大学附属第三医院生物治疗中心, 广州 510000; ² 暨南大学基础医学与公共卫生学院, 广州 510632)

〔摘要〕目的 研究人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)在体外对淋巴细胞增殖和免疫调控功能的影响。方法 采用组织块贴壁法分离健康捐献者来源的脐带进行分离培养。培养至第 3~5 代时, 进行多向分化和细胞表型鉴定。获取健康供者外周血单个核细胞, 并通过 CD3 免疫磁珠分选出 T 淋巴细胞, 进行荧光染料 CFSE 标记, 然后分成单独培养组(T 细胞)和共培养组(按 T:MSC=5:1 的比例共培养), 两组均采用 CD3/CD28 单克隆抗体活化, 培养 3 d 后通过流式细胞术检测 T 淋巴细胞的增殖情况, 并检测 Th1/Th17 细胞亚群的变化以及对 Treg 细胞亚群的影响。结果 健康捐献者来源的 hUC-MSCs 高表达 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166、HLA-DR, 不表达 CD31、CD34、CD45, 并具有多向分化潜能。与单独培养组比较, 共培养组中的 T 淋巴细胞增殖率和 Th1、Th17 细胞亚群比例明显降低, Treg 细胞比例明显升高。结论 hUC-MSCs 通过抑制 T 淋巴细胞的增殖、下调 Th1/Th17 和上调 Treg 细胞参与免疫调节, 发挥免疫抑制作用。

〔关键词〕间充质干细胞; 淋巴细胞亚群; 免疫调节

〔中图分类号〕R392.11 〔文献标识码〕A DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2022.04.001

Human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit T cell immunity

Yang Li¹, Lin Huizhu¹, Qian Shiyu², Chen Xiaoyan¹, Chen Wenjie¹, Lu Jianxi^{1*}

(¹Biotherapy Center, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, China; ²Department of Public Health and Preventive Medicine, School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

〔Abstract〕Objective To investigate the effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell (hUC-MSCs) on lymphocyte proliferation and immunoregulation *in vitro*. Methods The umbilical cord from healthy donors was isolated and cultured by the method of tissue explant attachment. Multidirectional differentiation and phenotypic identification were carried out at the 5th passage. Peripheral blood mononuclear cells were obtained from healthy donors, T lymphocyte were isolated by CD3 immunomagnetic beads, and labeled with fluorescent dye CFSE, and then divided into single culture group (T cell) and co-culture group (co-culture according to the ratio of T:MSC=5:1), both groups were activated with CD3/CD28 monoclonal antibodies. After 3 days, T cell proliferation and Th1/Th17 subsets were examined by Flow cytometry. Results hUC-MSCs from healthy donors expressed high levels of CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 and HLA-DR, but not expressed CD31, CD34 and CD45, and had multidirectional differentiation potential. Compared with the single culture group, the T cell proliferation rate and the percentage of TH1 and TH17 subsets were significantly lower, and the percentage of Treg was significantly higher, in the co-culture group. Conclusion hUC-MSC plays an immunosuppressive role by inhibiting T-cell proliferation, down-regulating Th1/Th17 subsets and up-regulating Treg cells.

〔Keywords〕Mesenchymal stem cells; lymphocyte subsets; immunomodulation

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类具有自我更新和多向分化能力的成体干细

胞, 来源于中胚层, 广泛存在于骨髓、脐带、胎盘、脐血、牙龈、脂肪等组织。MSCs 具有低免疫原性, 同时还具有强大的免疫调节能力, 被应用于治疗多种疾病, 目前对 MSCs 的研究涉及到抗炎治疗、组织修复和再生、移植物抗宿主病(GVHD)、自身免疫性疾病等免疫异常和炎症相关疾病^[1,2]。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)因为取材方便、来源丰富、分化潜能大和增殖能力强, 有望成为最具临床应用前

〔收稿日期〕2022-01-05 〔修回日期〕2022-08-10

〔基金项目〕广东省药品监督管理局科技创新项目(2021 TDB22)

〔作者简介〕阳莉, 女(1981 年), 硕士, 主管技师

* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed):

1390619968@qq.com

景的间充质干细胞。MSCs的免疫调节效应是非抗原特异性和非选择性的,其对自体或是异体来源的各种免疫细胞如T淋巴细胞、B淋巴细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞等均具有免疫调节作用,通过多向分化与旁分泌作用发挥组织再生与损伤修护作用^[3,4]。深入研究间充质干细胞免疫调节特性及其作用途径,是其临床应用的基础。

材料与方法

1 实验材料

研究选取我院产科健康供体来源的脐带约20cm,共采集8条,并签署知情同意书。

2 主要仪器与试剂

间充质干细胞成脂、成骨、成软骨诱导分化培养试剂盒(广州Cyagen公司),间充质干细胞无血清培养液(以色列BI公司),RPMI 1640培养液、DMEM低糖培养液(美国Gibco公司),人淋巴细胞分离液(挪威Axis-shield公司),Treg细胞检测试剂盒、白细胞活化试剂盒(美国BD公司),流式抗体CD29-FITC、CD31-FITC、CD34-FITC、CD44-FITC、CD45-FITC、CD73-PE、CD90-PE、CD105-PE、CD166-PE、HLA-DR-FITC(美国Bechman Coulter公司),流式抗体FITC-CD3、APC-CD8、PE-cy7 IFN- γ 、APC IL-17A、FITC-CD8和破膜剂(美国BD公司),CD3细胞分选磁珠(德国Miltenyi公司),Cell Trace™ CFSE细胞增殖试剂盒(美国Thermo Scientific公司),CD3单克隆抗体、CD28单克隆抗体、IL-2(美国Perprotech公司)。离心机为Centrifuge 5810R(德国Eppendorf公司),二氧化碳培养箱240i(美国Thermo Scientific公司),CytoFLEX流式细胞仪(美国Bechman Coulter公司)。

3 hUC-MSCs的分离培养

分离脐带华通氏胶,剪碎后接种于D150培养皿,加入无血清间充质干细胞培养基,置37℃,体积分数5% CO₂,饱和湿度条件培养箱中培养至组织块周围爬出细胞,换液、传代培养至第3代,冻存备用。本次共分离了8株细胞用于实验。

4 hUC-MSCs表型鉴定

取体外培养到第3~5代的hUC-MSCs消化重悬成 1×10^6 cells/mL,分别取100 μ L细胞悬液进行CD29-FITC、CD31-FITC、CD34-FITC、CD44-

FITC、CD45-FITC、CD73-PE、CD90-PE、CD105-PE、CD166-PE、HLA-DR-FITC标记,经流式细胞仪鉴定,证明体外传代培养对hUC-MSCs细胞表型无影响。

5 hUC-MSCs体外定向诱导成骨、成脂和成软骨分化

取第3~5代的hUC-MSCs按 2×10^4 cells/cm²的密度接种于24孔板,细胞融合度达到60%~70%时,小心地吸走培养液,沿板壁缓慢加入500 μ L成骨诱导分化完全培养基,每隔3d更换新鲜的成骨诱导分化完全培养基,置37℃,体积分数5% CO₂、饱和湿度条件培养箱中,按成骨诱导分化培养试剂盒诱导培养2~4周;成骨诱导分化结束后,吸走培养液,加入生理盐水洗3次,加入500 μ L的4%多聚甲醛室温固定30 min。茜素红染色后,光学显微镜下观察染色结果。

同样将第3~5代的hUC-MSCs按照 2×10^4 cells/cm²的细胞密度接种在24孔板中,每孔加干细胞培养液500 μ L,细胞融合度达到90%时,小心地吸走培养液,沿孔壁缓慢加入500 μ L成脂诱导分化培养基,按成脂诱导分化培养试剂盒培养结束后,吸走培养液,生理盐水洗3次后,加入500 μ L的4%多聚甲醛室温固定1 h。油红O染色后,光学显微镜下观察染色结果。

取 2×10^5 个第3~5代的hUC-MSCs于15 mL透气离心管中,加入5 mL生理盐水,300 g,离心5 min,去上清。加入500 μ L已添加TGF- β_3 的成软骨诱导分化完全培养基,150 r/min,离心5 min,使细胞聚集于离心管底部,直立放置于培养箱中培养,每3d换一次液。连续培养1月后,吸掉培养液,将软骨组织加入10%多聚甲醛固定。同时准备人软骨组织做阳性对照和非软骨组织做阴性对照,对照组组织大小与诱导成软骨大小相同,同样10%多聚甲醛固定,切片后阿尔新蓝染色,光学显微镜下对比观察切片。

6 外周血T淋巴细胞的制备

用肝素钠抗凝管采集健康人外周血30 mL,通过密度梯度离心法分离全部单个核细胞。用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基悬浮细胞,即获得人外周血单个核细胞。经CD3磁珠分选外周血T淋巴细胞,分选所得的细胞用FITC-CD3标记后流式细

胞仪检测其纯度。

7 hUC-MSCs 对 T 淋巴细胞增殖影响检测

外周血 T 淋巴细胞标记: 取 1×10^6 cells/mL 分选好的外周血 T 淋巴细胞, 加入 CFSE (工作浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$, 按 $1 \mu\text{L/mL}$ 添加), 37°C 避光孵育 30 min; 加入 5 倍体积预冷的含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 冰浴 5 min, 终止染色; 用生理盐水洗涤 3 次后重悬, 并调整细胞浓度至 1×10^6 cells/mL。

hUC-MSCs 与 T 淋巴细胞共培养: 将 MSCs 与上述标记的 T 淋巴细胞按 5:1 的比例共培养, 即 $\text{CD}3^+$ T 细胞 5×10^5 cells/well, hUC-MSCs 1×10^5 cells/well, 培养体系总体积为 $500 \mu\text{L}$, 加入 $1 \mu\text{g/mL}$ CD3 单克隆抗体和 500 ng/mL CD28 单克隆抗体, 加入 IL-2 至终浓度 500 IU/mL , 同时设 T 淋巴细胞单独培养孔。取 10^6 个已分选但未加 CD3/CD28 单克隆抗体活化的淋巴细胞于另一孔为流式检测时的空白对照。

细胞增殖流式细胞术检测: 共培养 3 d 后, 收集对照孔、单独培养孔和共培养孔的细胞, 加入生理盐水, 300 r/min , 离心 5 min, 去掉上清, 加入 $250 \mu\text{L}$ 生理盐水重悬, 上机检测。CFSE 进入活细胞后与胞内蛋白结合释放绿色荧光, 随着细胞分裂而平均分配至子代细胞, 而导致荧光强度递减, 依据这一特性, 可用流式细胞仪 FITC 通道检测淋巴细胞增殖的情况^[5]。

8 hUC-MSCs 调节 T 淋巴细胞亚群检测

将 MSCs 与步骤 5 制备的外周血 T 淋巴细胞按 5:1 的比例共培养, 即 $\text{CD}3^+$ T 细胞 5×10^5 cells/well 和 hUC-MSC 1×10^5 cells/well, 培养体系总体积为 $500 \mu\text{L}$, 加入 $1 \mu\text{g/mL}$ CD3 单克隆抗体和 500 ng/mL CD28 单克隆抗体, 加入 IL-2 至终浓度 500 IU/mL , 同时设 T 淋巴细胞单独培养孔。取 10^6 个已分选但未加 CD3/CD28 单克隆抗体活化的淋巴细胞于另一孔作为流式检测时的空白对照。共培养 3 d 后, 按白细胞活化试剂盒说明刺激细胞 6h, 收集处理好的细胞

用 APC-CD8 和 FITC-CD8 标记, 破膜后, 分别进行 PE-cy7 IFN- γ 和 APC IF-17A 染色, 流式细胞仪检测 Th1 ($\text{CD}8\text{-IFN-}\gamma^+$) 细胞亚群和 Th17 ($\text{CD}8\text{IL}17^+$) 细胞亚群的比例; 按 Treg 细胞检测试剂盒标记细胞, 流式细胞仪检测 Treg 细胞 ($\text{CD}4^+\text{CD}25^+\text{FoxP}3^+$) 的比例。

9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6 软件进行统计分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 单独培养组与共培养组之间的比较采用配对样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 hUC-MSCs 的鉴定及体外诱导分化成骨、成脂、成软骨

人脐带在体外成功分离培养出 MSCs, 镜下可见细胞形态均一, 折光性强, 长梭形, 呈旋涡状贴壁生长 (图 1A)。hUC-MSCs 在体外具有诱导分化成骨、成脂、成软骨的功能。成脂诱导 21 d 后可见大而圆的脂滴, 油红 O 染色后, 脂滴红染 (图 1B); 成骨诱导 21 d 后出现钙化结节, 经茜素红染色后呈红色 (图 1C); 成软骨诱导 21 d 后切片观察, 可见经阿尔新蓝染料染成蓝色的软骨细胞 (图 1D)。

流式细胞术结果显示, hUC-MSCs 高表达间充质干细胞标志物 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166 ($> 95\%$), 低或不表达造血干细胞表面抗原 CD34、CD45 及其他抗原分子如 CD31、HLA-DR ($< 2\%$) (图 2)。这些结果表明, 本实验室制备的 hUC-MSCs 纯度高, 符合国际细胞治疗协会 ISCT 间充质干细胞标准^[6]。

2 hUC-MSCs 抑制 T 淋巴细胞的增殖

外周血单个核细胞用 CD3 磁珠分选所得的细胞用流式细胞仪检测其纯度 $> 95\%$ (图 3A)。将 CFSE 标记的 T 淋巴细胞与人脐带间充质干细胞共

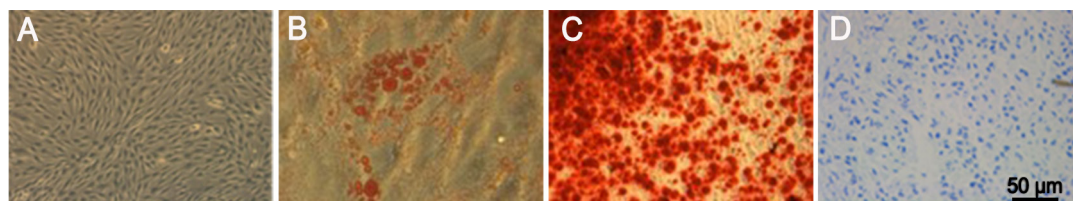


图 1 hUC-MSCs 体外诱导分化检测。A, P3 代 hUC-MSCs 形态; B, 油红染色; C, 茜素红染色; D, 阿尔新蓝染色

Fig.1 Examination of *in vitro* induced-differentiation of hUC-MSCs. A, morphology of P3 hUC-MSCs; B, Oil Red staining; C, Alizarin Red staining; D, Alcian Blue staining

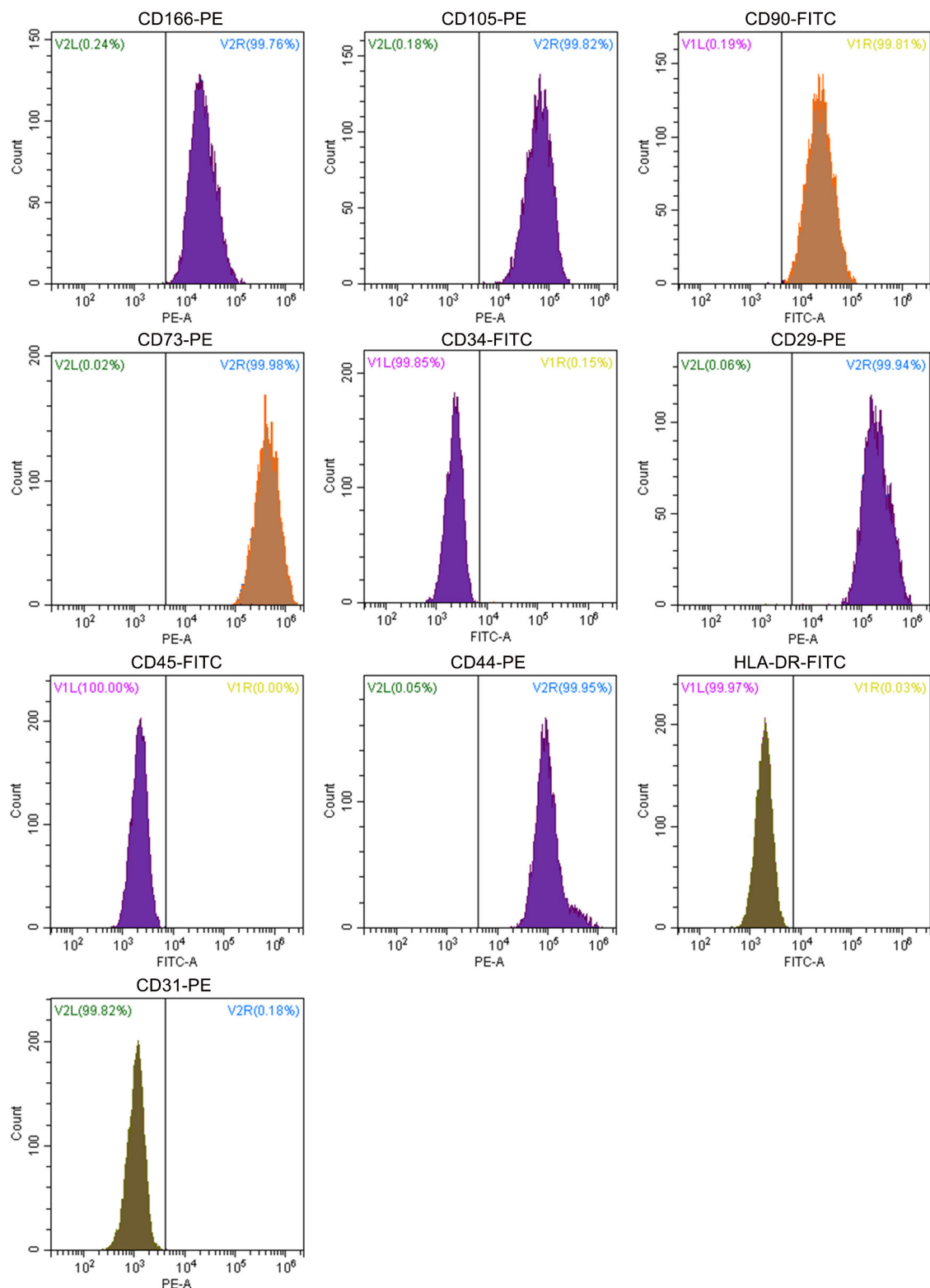


图 2 hUC-MSCs 表型代表性流式细胞术分析结果。CD90、CD73、CD29、CD44、CD166、CD105 表达率大于 95%，CD34、CD45、HLA-DR、CD31 表达率小于 2%，符合 MSCs 的鉴定标准

Fig.2 Representative flow cytometric analysis results of phenotypes of hUC-MSCs. The expression rates of CD90, CD73, CD29, CD44, CD166, CD105 were more than 95% while the expression rates of CD34, CD45, HLA-DR, CD31 were less than 2%. This accorded with the identification standard of surface markers of MSCs

培养 3 d 后进行流式细胞术检测 T 细胞增殖 (图 3B 中 P4 门) 显示, 共培养组中 T 细胞增殖的比例为 $(2.90 \pm 1.61)\%$, 显著低于单独培养组中 T 细胞增殖的比例 $(29.04 \pm 1.47)\%$ (图 3C), 由此提示, hUC-MSCs 明显抑制 T 淋巴细胞的增殖。

3 hUC-MSCs 抑制 Th1/Th17 淋巴细胞亚群分化

Th1 和 Th17 淋巴细胞亚群是具有免疫促进作用的辅助性 T 细胞。流式细胞术检测 Th1 细胞亚群 (图 4 中十字门右下象限) 和 Th17 细胞亚群 (图 4 中 P4

门) 的比例显示, 共培养组 Th1 和 Th17 亚群的比例分别为 $(0.95 \pm 0.44)\%$ 和 $(0.24 \pm 0.20)\%$, 明显低于单独培养组 Th1 和 Th17 亚群的比例 $(3.33 \pm 0.46)\%$ 和 $(1.23 \pm 0.19)\%$ (图 4), 由此表明 hUC-MSCs 抑制 Th1 和 Th17 细胞亚群的分化。

4 hUC-MSCs 促进 Treg 细胞的生成

Treg 细胞是具有免疫抑制功能的调节性 T 细胞。流式细胞分析以 $CD4^+$ 细胞进行设门, 分析该群细胞中 $CD25^+FoxP3^+$ 细胞比例 (图 5 中十字门右

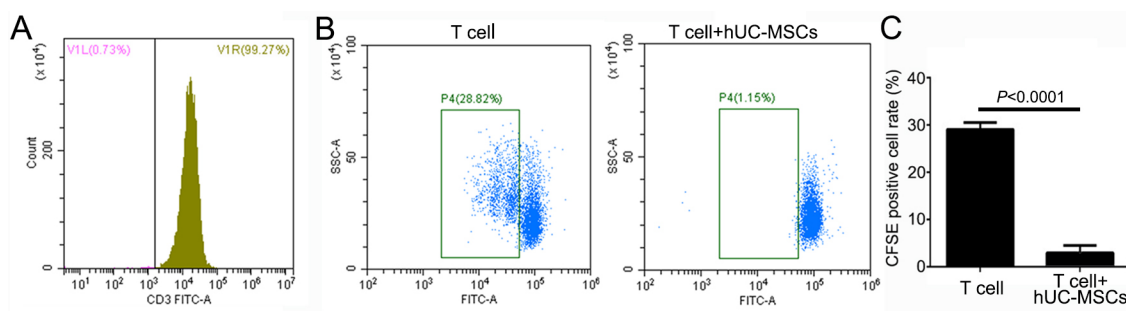


图 3 hUC-MSCs 对 T 淋巴细胞增殖的影响。A, T 淋巴细胞纯度的代表性流式细胞术检测结果。B, hUC-MSCs 对 T 淋巴细胞增殖影响的代表性流式细胞术检测结果; C, 与 hUC-MSCs 对 T 淋巴细胞增殖影响的统计学分析 ($n=8$)

Fig. 3 Effect of hUC-MSCs on proliferation of T lymphocyte. A, representative flow cytometric analysis result of the purity of T lymphocyte. B, representative flow cytometric analysis results of the effect of hUC-MSCs on proliferation of T lymphocyte; C, statistical analysis of the effect of hUC-MSCs on proliferation of T lymphocyte ($n=8$)

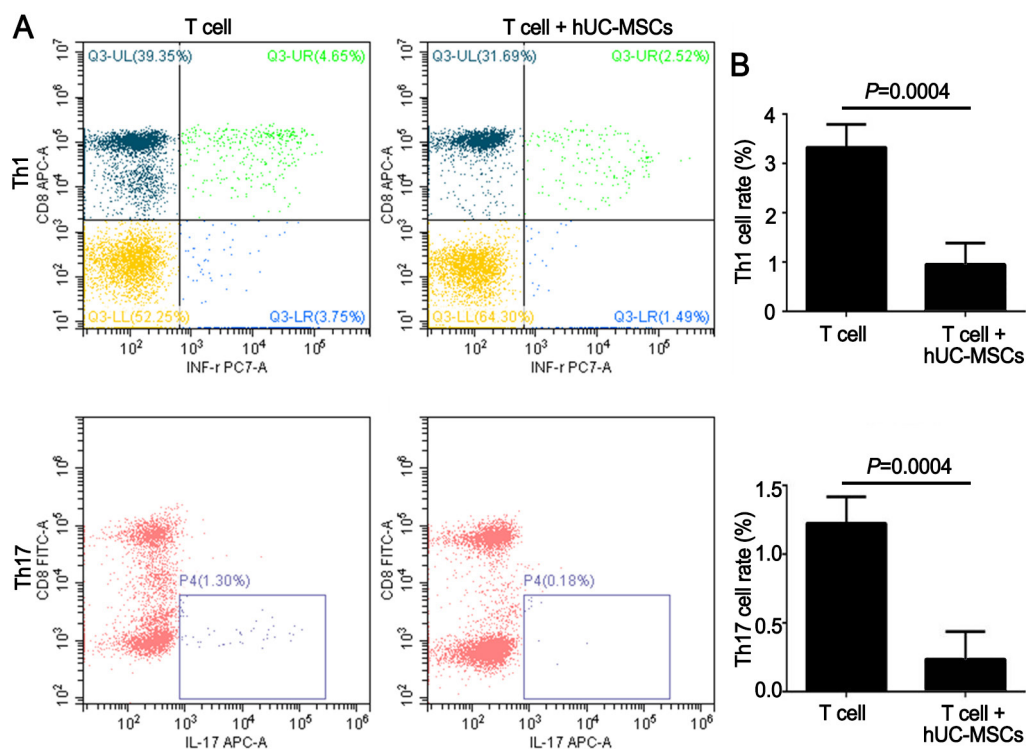


图 4 hUC-MSCs 对 Th1 和 Th17 淋巴细胞亚群分化的影响。A, hUC-MSCs 对 Th1 和 Th17 淋巴细胞亚群分化影响的代表性流式细胞术检测结果; B, hUC-MSCs 对 Th1 和 Th17 淋巴细胞亚群分化影响的统计学分析 ($n=8$)

Fig. 4 Effect of hUC-MSCs on the differentiation of Th1 and Th17 subsets of T cells. A, representative flow cytometric analysis results for effect of hUC-MSCs on the differentiation of Th1 and Th17 subsets of T cells; B, statistical analysis for the effect of hUC-MSCs on the differentiation of Th1 and Th17 subsets of T cells ($n=8$)

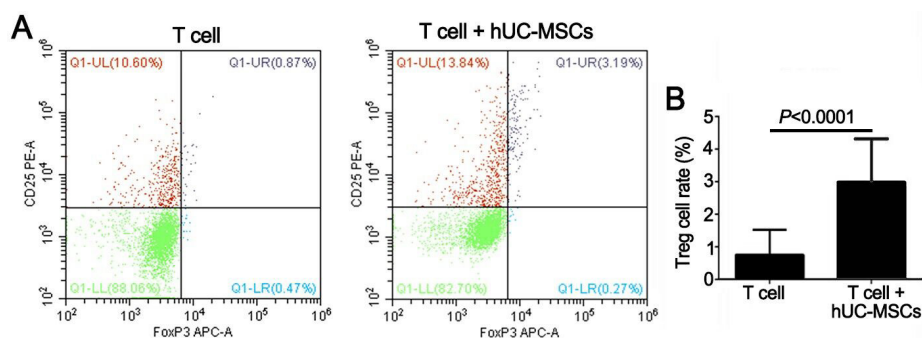


图 5 hUC-MSCs 对 Treg 细胞生成的影响。A, hUC-MSCs 对 Treg 细胞生成影响的代表性流式细胞术检测结果; B, hUC-MSCs 对 Treg 细胞生成影响的统计学分析 (n=8)

Fig. 5 Effect of hUC-MSCs on the formation of Treg cells. A, representative flow cytometric analysis results for effect of hUC-MSCs on the formation of Treg cells; B, statistical analysis for effect of hUC-MSCs on the formation of Treg cells (n=8)

上象限)显示:共培养组 $CD25^{+}FoxP3^{+}$ 细胞比例为 $(3.00 \pm 1.32)\%$, 显著高于单独培养组 $CD25^{+}FoxP3^{+}$ 细胞比例 $(0.76 \pm 0.22)\%$ (图 5), 由此表明 hUC-MSCs 能诱导 Treg 细胞的生成。

讨 论

MSCs 对先天性免疫和获得性免疫均具有免疫调节作用。研究发现 MSCs 不仅增强 Treg 细胞的免疫调节能力, 还能抑制 DC 成熟或促进已成熟 DC 向未成熟 DC 方向转化^[7,8], 以此来降低机体免疫反应, 同时 MSCs 能诱导单核细胞分化为 M2 型免疫抑制性巨噬细胞, 使巨噬细胞分泌 IL-10 增加, 分泌的 IL-10 进一步抑制 T 淋巴细胞的增殖, 从而达到抗炎反应的作用^[9-11]。总结现有研究成果, MSCs 能通过抑制 DC 成熟、抑制 T 细胞活化增殖、诱导 M2 型巨噬细胞、诱导 Treg 细胞增殖、维持促炎因子/抑炎因子平衡等多种机制发挥免疫调节功能。

应用流式细胞术分析 Th1/Th17 细胞亚群, 一般采用 CD4 设门, 通过检测 $CD4^{+}$ 细胞群中 IFN- γ 和 IL-17 的表达来确定 Th1 和 Th17 细胞的比例。可是在白细胞活化剂的刺激下, CD4 的表达会迅速下调甚至丧失, 使测量值偏低, 因此采用 CD8 反向设门^[12]。因为 CD8 不受白细胞刺激剂的影响, 且绝大多数 $CD3^{+}CD8^{-}$ 的细胞都是 $CD3^{+}CD4^{+}$ 的细胞, 可通过 $CD3^{+}$ 细胞群中的 $CD8^{-}IFN-\gamma^{+}$ 细胞和 $CD8^{-}IL-17^{+}$ 细胞来分析 Th1/Th17 细胞亚群的比例。

体内环境中炎症因子的水平和类型以及机体的免疫状态均能影响 MSCs 的调节作用。早期认为 MSCs 是免疫细胞的抑制剂, 但目前的研究显示

MSCs 具有促进炎症反应和抑制炎症反应两方面的能力, 这种免疫调节的可塑性由免疫微环境决定, 微环境的炎症因子水平决定了 MSCs 的免疫调节方向^[13]。有关间充质干细胞的免疫调节作用途径与机制至今尚未完全阐明, 现在大多数研究更倾向于间充质干细胞分泌的细胞因子对免疫细胞激活、增殖和分化的调节作用。因此, 需要使用标准化的免疫实验进一步研究不同免疫状态下不同来源 MSCs 的免疫调节趋势, 针对不同的疾病阶段进行个体化、差异化治疗, 这将有助于 MSCs 的临床应用^[14-16]。

参 考 文 献

- [1] 丁志, 杨松林. 间充质干细胞生物学特性及其分化潜能[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15 (01): 147-150.
- [2] 何川, 刘霆. 间充质干细胞生物学特性的研究进展[J]. 西部医学, 2020, 32 (01): 148-151.
- [3] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses[J]. Blood, 2005, 105(4): 1815-1822.
- [4] Uccelli A, de Rosbo NK. The immunomodulatory function of mesenchymal stem cells: mode of action and pathways[J]. Ann N Y Acad Sci, 2015, 1351: 114-126.
- [5] 包晶晶, 林海霞, 马璟. CFSE 标记技术的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2010(5):461-464.
- [6] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317.
- [7] Spaggiari GM, Moretta L. Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity[J]. Immunol Cell Biol, 2013, 91(1): 27-31.

(下转 366 页)

