

强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞的生物学及免疫学特性

刘 鹤¹, 任明亮¹, 王满婷², 杨 睿³, 王 鹏³, 李 辉¹, 刘冬斌¹, 余嘉洪¹

(1 南方医科大学附属南海医院骨外科; 2 儿科 528200 广东省佛山市;

3 中山大学孙逸仙纪念医院骨外科 510120 广州市)

【摘要】目的:探讨强直性脊柱炎(AS)患者骨髓间充质干细胞(BMSCs)的生物学及免疫学特性,为进一步阐明 AS 的发病机制和寻找新的治疗靶点提供理论依据。**方法:**选取 37 例活动期 AS 患者(AS 组),男 34 例,女 3 例,平均年龄(24.3 ± 5.4)岁,HLA-B27 均为阳性;49 例健康志愿者作为对照组(HD 组),男 43 例,女 6 例,平均年龄(25.7 ± 4.9)岁;其中 HLA-B27 阴性 44 例(HD1 组),HLA-B27 阳性 5 例(HD2 组)。从每例受检者髂后上棘穿刺采集骨髓组织,分离 BMSCs,培养扩增至第 3 代,以 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 的浓度接种于 96 孔板中, $100 \mu\text{l}/\text{孔}$,从第 1 天开始每日取 3 孔进行细胞计数,共计 12d,绘制生长曲线;每日取 3 孔经 MTT 处理后测定吸光度值,绘制细胞活力曲线,观察 BMSCs 的生物学特性。使用流式细胞仪检测各受检者 BMSCs 的细胞表面表型。将第 3 代 BMSCs 细胞接种于 U 形底 96 孔板,培养 4h 后使用 ^{60}Co 照射 30Gy;取健康志愿者外周血采用密度梯度法分离单个核细胞(PBMCs),加入细胞培养液,计数后按 BMSCs:PBMCs 1:20、1:10、1:5、1:2、1:1 的比例接种于已接种 BMSCs 的 96 孔板,共培养 5d,观察双向混合淋巴细胞反应情况;同样获取 PBMCs,计数后同样以 5 个比例接种于 96 孔板,加入植物血凝素(PHA) $4 \mu\text{g}/\text{ml}$,充分接触后共培养 5d,观察淋巴细胞增殖反应情况。对组间进行统计学比较。**结果:**AS 组、HD1 和 HD2 组第 3 代 BMSCs 体外培养 1~12d 时的增殖能力、细胞活力无显著性差异($P>0.05$);三组细胞表面表型均为高水平表达 CD105、CD73 和 CD90,不表达 CD45、CD34、CD14 和 HLA-DR。HD1 组和 HD2 组 BMSCs 与不同比例 PBMCs 共培养的双向混合淋巴细胞反应和 PHA 刺激的淋巴细胞增殖反应均无显著性差异($P>0.05$);AS 组与 HD 组比较有显著性差异($P<0.05$)。**结论:**AS 患者 BMSCs 的生物学特性无明显改变,但其免疫调节功能明显下降,其可能在 AS 的发病机制中扮演重要角色。

【关键词】强直性脊柱炎;骨髓间充质干细胞;生物学特性;免疫学特性

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2012.06.16

中图分类号:R593.23, R363.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2012)-06-0559-07

Biological characteristics and immunologic properties of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in ankylosing spondylitis/LIU Hu, REN Mingliang, WANG Xiaoping, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2012, 22(6): 559-565

【Abstract】Objectives: To study the biological characteristics and immunomodulation properties of bone marrow-derived mesenchymal stem cells(BMSCs) in ankylosing spondylitis(AS), and to offer theoretical basis for clarifying the pathogenesis and searching new therapy target of AS. **Methods:** 37 AS patients(3 females and 34 males) with an average age of 24.3 ± 5.4 years in active stage and 49 healthy donors(HDs) (6 females and 43 males) with an average age of 25.7 ± 4.9 years were included in the study. All of the AS patients were HLA-B27-positive; conversely, 44 healthy donors were HLA-B27-negative(HD1) and 5 healthy donors were HLA-B27-positive (HD2). The bone marrow samples were obtained from every AS patient and healthy donor by posterior superior iliac spine aspiration. BMSCs were separated, cultured in vitro to the third generation (P3), and seeded in 96-well plates at a concentration of $1 \times 10^4/\text{ml}$, $100 \mu\text{l}/\text{well}$. Three wells of each sample were digested for cell counting per day up to 12 days. The BMSCs growth curves were made using the data for cell proliferation obtained above. Using MTT that was to determine absorbance at 490nm, the cell viability curves for BMSCs were also acquired. The surface markers of BMSCs were assayed using flow cytometry.

第一作者简介:男(1973-),医学硕士,副主任医师,研究方向:脊柱退变性疾病、脊柱创伤与慢性损伤、脊髓损伤

电话:(0757)86395163 E-mail:rmld1@163.com

Briefly, BMSCs were seeded in U-bottomed, 96-well culture plates for 4 hours for adherence, and then irradiated(30Gy) with ^{60}Co before being cultured with the mixed PBMCs in 2-way MLR or the PBMCs stimulated by PHA in the lymphocytes proliferation reaction. PBMCs were obtained by the Ficoll-Hypaque gradient separation of the buffy coat of HDs. The mixed PBMCs were then mixed with different amounts(1:20, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1, BMSCs:PBMCs) of BMSCs in the 96-well plates co-cultured for 5 days, 2-way MLR was studied. Compared with the MLR, the allogeneic PBMC proliferation assay only used one allogeneic PBMC from a healthy volunteer stimulated with PHA, co-cultured with BMSCs for 5 days, lymphocytes proliferation reaction was also studied. The results of groups were analysed with statistics. **Results:** There was no any significant difference about proliferation ability and cell viability of P3 BMSCs cultured ex vivo 1-12 days among the AS patients, healthy donors 1 and healthy donors 2 ($P>0.05$). They all expressed high levels of the surface markers CD105, CD73 and CD90, and lack expression of CD45, CD34, CD14 and HLA-DR surface molecules. But, in either the MLR or the PBMC proliferation assay stimulated with PHA, the ^3H -TdR assay and MTT assay data suggested a statistically significant reduced immunomodulation potential of BMSCs from AS patients, compared with the healthy donors($P<0.05$), the difference between HD1 and HD2 was not significant statistically ($P>0.05$). **Conclusions:** Biological characteristics of BMSCs from patients with AS do not change, but the immunomodulation properties of BMSCs reduced in AS, and the BMSCs with reduced immunomodulation potential may be involved and play a novelty role in pathogenesis of AS.

[Key words] Ankylosing spondylitis; Bone marrow-derived mesenchymal stem cells; Biological characteristics; Immunologic properties

[Author's address] Department of Othopedics, Affiliated Nanhai Hospital, Southern Medical University, Foshan, 528200, China

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种主要侵犯人体中轴骨关节以及外周大关节的慢性进行性自身免疫性疾病,炎症主要累及肌腱、滑膜等关节部位,特征性病理改变是肌腱和韧带附着点的慢性炎症。其发病机制目前仍不十分清楚^[1]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于中胚层的具有多向分化潜能的干细胞,分布广,以骨髓组织中的骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived MSCs, BMSCs)含量最多。研究发现,BMSCs具有免疫抑制^[2]与抗炎^[3]作用,作为自身免疫性疾病新的治疗手段和靶点也越来越受到重视^[4,5]。本研究通过检测 AS 患者 BMSCs 的增殖能力、细胞活力、细胞表型以及免疫调节能力,进一步评估 AS 患者 BMSCs 的生物学与免疫学特性,为临床治疗 AS 提供理论依据和实验室基础。

1 材料及方法

1.1 研究对象

选取 37 例活动期 AS 患者,来自南方医科大学附属南海医院($n=19$)及中山大学孙逸仙纪念医院($n=18$)门诊或住院部,符合 1984 年修订的 AS 纽约诊断标准^[6],Bath 强直性脊柱炎病情活动

指数(Bath ankylosing spondylitis disease activity index, BASDAI)1~4 分,HLA-B27 均为阳性。排除标准:有严重心、肝、肾等重要脏器和血液、内分泌系统病变及病史以及有多发性硬化病史者;孕妇、哺乳期妇女;以前接受过抗肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)药物治疗;正处于急、慢性感染期间,查体时发现泌尿系、心肺、口咽、眼耳鼻等感染者;现患或曾患活动性结核病患者;恶性肿瘤患者;炎症肠病、银屑病或活动性前葡萄膜炎患者。男 34 例,女 3 例,年龄 17~45 岁,平均 24.3 ± 5.4 岁。选取 49 例健康志愿者作为对照组(HD 组),均知情同意,自愿接受骨髓穿刺参加本研究;男 43 例,女 6 例,年龄 19~39 岁,平均 25.7 ± 4.9 岁;44 例 HLA-B27 阴性(HD1 组),5 例 HLA-B27 阳性(HD2 组)。除特别标注外,所用实验试剂及材料均购自 Sigma 公司。

1.2 BMSCs 的分离与扩增

两组受检者均行髂后上棘骨髓穿刺,采集 20ml 骨髓组织。根据梯度离心原理,采用 Ficoll 分离骨髓中的有核细胞,通过对 BMSCs 在培养皿的附壁特性进行筛选。细胞扩增进入第 3 代时,用质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶+1mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)消化后混悬于低糖改良细胞培养

基 (L-Dulbecco's modified eagle media, L-DMEM)+10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 GIBCO 公司及杭州四季清) 培养液中待用。

1.3 细胞增殖与活力检测

将每例受试者的第 3 代 BMSCs 以 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 的浓度接种于 96 孔板, $100 \mu\text{l}/\text{孔}$, 共接种 36 个孔。从接种第 1 天起, 每日取 3 个孔进行细胞计数, 共计 12d, 取其平均值绘制 BMSCs 生长曲线。采用与绘制细胞增殖曲线一样的方法接种细胞, 每日取 3 个孔的细胞经 MTT 法^[7]处理后测定每孔吸光度值 (OD) 绘制 BMSCs 的细胞活力曲线。

1.4 细胞表型检测

利用 FACScan laser flow cytometry system (Becton Dickinson) 及流式抗体 CD105 (FITC)、CD73 (FITC)、CD90 (FITC)、CD34 (FITC)、CD45 (FITC)、CD14 (PE) 和 HLA-DR (FITC) (表 1) 分别检测两组受试者 BMSCs 的细胞表面表型表达情况。均使用相应荧光染料标记的同型单克隆抗体作为阴性同型对照 (isotype control)。

1.5 BMSCs 免疫调节能力测定

分别使用 ^3H -TdR 法^[8]及 MTT 法^[7]检测两组 BMSCs 对双向混合淋巴细胞反应及 PHA 刺激的淋巴细胞增殖反应的抑制能力。将第 3 代 BMSCs 接种于 U 形底 96 孔板, 培养 4h 贴壁后使用 ^{60}Co 照射 30Gy 备用。

1.5.1 双向混合淋巴细胞反应 (2-way MLR) 从 2 例健康成人志愿者抽取外周血 10ml, 密度梯度离心分离单个核细胞 (PBMCs), 加入细胞培养液 [RPMI 1640 基础培养液 (美国 GIBCO 公司)+10%FBS], 细胞计数后以相比于 BMSCs 的 5 个比例 ($15 \times 10^3=1:20$, $3 \times 10^4=1:10$, $6 \times 10^4=1:5$, $15 \times 10^4=1:2$, $3 \times 10^5=1:1$; BMSCs:PBMCs; cells/cm²) 接种于备用的 BMSCs U 形底 96 孔板中, 与 BMSCs 充分接

触共培养 5d。每例受检者均设 3 个复孔, 收获时用 ^3H -TdR 法测定每分钟闪烁计数 (count per minute, CPM) 值, MTT 法检测 570nm 处吸光度 (OD) 值。

1.5.2 淋巴细胞增殖反应 (allogeneic PBMC-proliferation assay) 同样方法获取 PBMCs, 细胞计数后同样以 5 个比例接种于 96 孔板, 加入植物血凝素 (PHA, $4 \mu\text{g}/\text{ml}$, Roche Mannheim, Germany), 与 BMSCs 充分接触共培养 5d。每例受检者设 3 个复孔, 收获时用 ^3H -TdR 法测定 CPM 值, MTT 法检测 570nm 处的 OD 值。

结果均以抑制率 (inhibition rate, IR) 表示, $\text{IR}=1-[\text{ODexp.}-\text{ODadj.}]/\text{ODb1a.}$ 或 $1-[\text{CPMexp.}-\text{CPMadj.}]/\text{CPMb1a.}$ 。ODexp.、ODadj. 和 ODb1a. 分别代表实验孔 (experiment wells), 调控孔 (adjust wells) 和空白对照孔 (blank wells) 的平均 OD 值, CPMexp.、CPMadj. 及 CPMb1a. 则分别代表相应各孔的平均 CPM 值。各孔细胞种植分布情况见表 2。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 16.0 统计软件, 组间进行独立样本 *t* 检验, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 BMSCs 的增殖能力与细胞活力

见图 1。AS 患者与健康对照者的 BMSCs 增殖曲线具有大致相同的走向趋势 (图 1a), 各时间点的细胞数无统计学差异 ($P>0.05$)。AS 患者与健康对照者 BMSCs 在每一个时间点都表现出近似甚至相同的细胞活性 (图 1b), 在 490nm 水平的平均 OD 值无统计学差异 ($P>0.05$)。AS 患者, HLA-B27 阴性 (HD1) 及阳性 (HD2) 的健康对照者的 BMSCs 的纯度分别为 (QL, QU)=(95, 99) (%),

表 1 骨髓间充质干细胞表型分析流式抗体
Table 1 Antibodies used to phenotype bone marrow-derived mensenchymal stem cells by flow cytometry

抗体名称 Antibodies	种属与类型 Isotype	克隆编号/荧光染料 Clone/fluorochrome	浓度 (μg/ml) Concentration	生产厂家 Source
#CD105 (ENG)	Mouse IgG1	266/FITC	10	Becton Dickinson, Bedford, MA
#CD73 (NTSE)	Mouse IgG1	A02/FITC	20	Becton Dickinson, Bedford, MA
#CD90 (THY1)	Mouse IgG1	5E10/FITC	1	Becton Dickinson, Bedford, MA
#CD34	Mouse IgG1	5B1/FITC	50	Southern Biotech, Birmingham, AL
#CD45 (PTPRC)	Mouse IgG1	HI30/FITC	10	Caltag, Burlingame, CA
#CD14	Mouse IgG1	6103/PE	200	Santa cruz biotechnology, Inc.
#HLA-DR	Mouse IgG2a	L243/FITC	200	Santa cruz biotechnology, Inc.

(QL,QU)=(96,98)(%) 和 (QL,QU)=(96,99)(%)。

2.2 BMSCs 细胞表型

AS 患者与健康对照者 (包括 HLA-B27 阳性和阴性) 的 BMSCs 具有相同的细胞表面标志,与典型的 MSCs 细胞表型一致。他们都表达高水平的 CD105、CD73 和 CD90, 同时不表达 CD45、CD34、CD14 和 HLA-DR(图 2)。

2.3 BMSCs 免疫调节能力

2.3.1 双向混合淋巴细胞反应 见表 3。与健康对照者的 BMSCs 比较,AS 患者的 BMSCs 对双向混合淋巴细胞反应的抑制能力明显下降,5 个比例水平(BMSCs:PBMCs 1:20~1:1)的检测结果均有统计学意义($P<0.001$)。

2.3.2 PHA 刺激的淋巴细胞增殖反应 见表 4。与双向混合淋巴细胞反应相似,与健康对照者的 BMSCs 比较,AS 患者的 BMSCs 对 PHA 刺激的淋巴细胞增殖反应的抑制能力也明显下降,5 个比

例水平的检测结果也均有统计学意义($P<0.001$)。

3 讨论

AS 患者的典型临床表现为脊柱僵硬,关节强直和骨赘生成^[1],主要为脊柱炎症及结构破坏所致^[9]。由于脊柱强直及僵硬主要为成骨细胞异位骨化引起,而大多数成骨细胞来自于 BMSCs^[10,11];同时,某些自身免疫性疾病,例如重度再生障碍性贫血(severe aplastic anemia, SAA)存在 BMSCs 的某些生物学特性的异常,如多向分化潜能^[4]。本研究观察了 AS 患者 BMSCs 的生物学特性,结果显示 AS 患者的 BMSCs 具有正常的增殖能力、细胞活力、细胞表面表型,但是其免疫调节能力显著下降。比较 HLA-B27 阳性(HD2)与 HLA-B27 阴性(HD1)的健康对照者各项检测结果的差异也无统计学意义。Braun 等^[12]对 AS 患者骶髂关节活检标本的免疫组化检测发现明显的 T 细胞、巨噬细胞浸润,肿瘤坏死因子(TNF- α)过表达。这些结果表明,一直以来被认为诱导了其自身异位骨化的 BMSCs 的内在成骨分化潜能可能不是真正的“凶手”,而存在于内环境中、在体内一直起着支持 BMSCs 作用的各类细胞及细胞因子功能的异常可能在 BMSCs 异位骨化过程中起着某种关键的作用^[13]。

近来,有研究^[14]发现,T 辅助细胞 1 群(T helper cell 1, Th1)细胞、T 辅助细胞 2 群(T helper cell 2, Th2)细胞、分泌 IL-17 的 T 辅助细胞(Th17)及 T 调节细胞(Treg)的失衡可能促进了实验性自身免疫性脑脊髓膜炎(EAMG)的发病过程;使用 BMSCs 可明显减轻 EAMG 的严重程度,可能机制为通过分泌生长转化因子 β (TGF- β)抑制抗原特异性 T 淋巴细胞的增殖,进而平衡 4 种

表 2 各细胞培养孔细胞分布设计
Table 2 Details regarding the cells inoculated in the corresponding culturing wells

	双向混合淋巴细胞反应 2-way MLR	淋巴细胞增殖反应 Allogeneic PBMC- proliferation assay
实验孔 Experiment wells	BMSCs+2 HD-PBMCs	BMSCs+1 HD-PBMCs +PHA
调控孔 Adjust wells	BMSCs	BMSCs
空白对照孔 Blank wells	2 HD-PBMCs	1 HD-PBMCs+PHA

注:BMSCs,骨髓间充质干细胞;HD-PBMCs,健康对照者外周血单个核细胞;PHA,植物血凝素
Note: BMSCs(bone marrow-derived mensenchymal stem cells); HD-PBMCs (peripheral blood mononuclear cells of healthy donor); PHA (phytohemagglutinin)

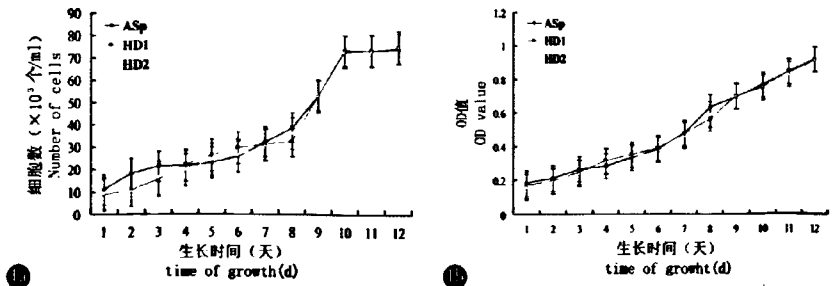


图 1 a AS 患者与健康对照者 BMSCs 的生长曲线 b AS 患者与健康对照者 BMSCs 的细胞活力曲线

Figure 1 a BMSCs growth curves of patients with AS and healthy donors(HD) b BMSCs cell viability curves of patients with AS and HD

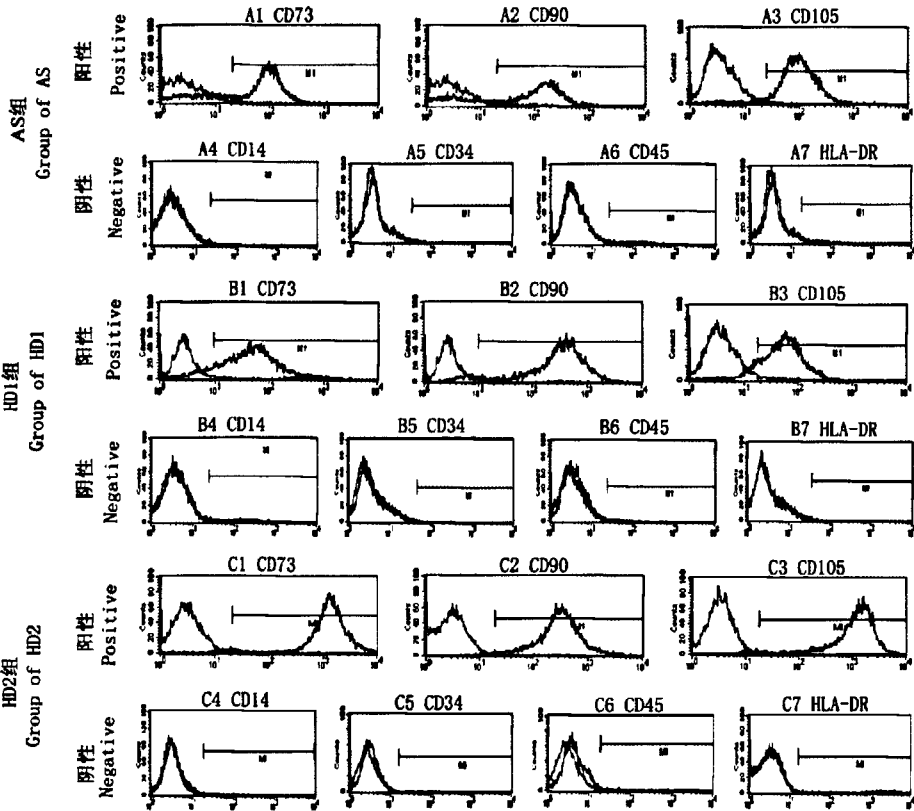


图 2 AS 患者与健康对照者 BMSCs 表型的流式细胞分析结果 (A1~A3、B1~B3、C1~C3 蓝线显示 MSC 表面特征标记物, A4~A7、B4~B7、C4~C7 蓝线显示 MSC 表面排除标记物; 红线为使用 IgG 同型对照所得基底荧光强度; x 轴: 荧光强度; y 轴: 细胞计数)

Figure 2 Phenotyping of BMSCs from patients with AS and healthy donors for typical MSC surface markers(Blue lines: (A1~A3, B1~B3, C1~C3) individual MSC markers and (A4~A7, B4~B7, C4~C7) MSC exclusion markers; red lines: background fluorescence obtained with isotype control IgG; x axis: fluorescence intensity; y axis: cell counts

表 3 AS 患者与正常对照者不同比例 BMSCs 对双向混合淋巴细胞反应的抑制率 (x±s, %)

Table 3 Inhibition ratio of different proportion BMSCs from AS patients and healthy controls on two-way mixed lymphocytes reaction

BMSCs:PBMCs	AS患者(n=37) AS patients		正常对照组 1(HD1,n=44) Healthy donors 1		正常对照组 2(HD2,n=5) Healthy donors 2	
	MTT法 MTT assay	³ H-TdR 法 ³ H-TdR assay	MTT法 MTT assay	³ H-TdR 法 ³ H-TdR assay	MTT法 MTT assay	³ H-TdR 法 ³ H-TdR assay
1:20	11.29±4.10 ^①	10.76±2.50 ^①	26.02±4.60	23.40±2.80	24.31±3.20 ^②	22.30±2.60 ^②
1:10	16.13±3.61 ^①	14.50±2.60 ^①	56.39±5.62	46.40±6.00	55.43±3.80 ^②	4.50±4.30 ^②
1:5	27.31±4.12 ^①	18.79±3.10 ^①	77.92±11.21	70.50±4.80	70.32±4.03 ^②	69.90±5.40 ^②
1:2	20.68±3.76 ^①	24.56±4.50 ^①	68.00±8.91	80.80±7.30	79.90±3.90 ^②	81.80±8.90 ^②
1:1	30.53±4.50 ^①	29.87±4.90 ^①	89.05±8.80	92.10±9.60	90.91±5.14 ^②	93.40±10.40 ^②

注: MTT 法, 噻唑蓝比色法; ³H-TdR 法, 氚化胸腺嘧啶摄取试验; BMSCs, 骨髓间充质干细胞; PBMCs, 外周血单个核细胞; 正常对照组 1(HD1), HLA-B27 阴性的健康对照组; 正常对照组 2(HD2), HLA-B27 阳性的健康对照组; ①与 HD1 和 HD2 比较 P<0.001, ②与 HD1 比较 P>0.05

Note: MTT assay, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay; ³H-TdR assay, tritiated thymidine ingestion assay; BM-SCs, bone marrow-derived mesenchymal stem cells; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; healthy donors 1(HD1), HLA-B27 negative; healthy donors 2(HD2), HLA-B27 positive; ①Compared with HD1 or HD2 P<0.001, ②Compared with HD1 P>0.05

表 4 AS 患者与正常对照者不同比例 BMSCs 对 PHA 刺激的淋巴细胞增殖反应的抑制率 ($\bar{x}\pm s, \%$)

Table 4 Inhibition ratio of different proportion BMSCs from AS patients and healthy controls on lymphocytes proliferation reaction with PHA

BMSCs:PBMCs (比值)	AS 患者 (n=37) AS patients		正常对照组 1 (n=44) Healthy donors 1		正常对照组 2 (n=5) Healthy donors 2	
	MTT 法 MTT assay	³ H-TdR 法 ³ H-TdR assay	MTT 法 MTT assay	³ H-TdR 法 ³ H-TdR assay	MTT 法 MTT assay	³ H-TdR 法 ³ H-TdR assay
1:20	11.23±2.10 ¹	8.76±1.50 ¹	24.80±3.40	26.40±1.80	25.40±3.20 ²	25.30±1.60 ²
1:10	19.09±2.82 ¹	15.50±2.50 ¹	65.32±4.81	48.40±3.00	60.20±4.50 ²	47.50±3.30 ²
1:5	27.23±4.21	19.79±3.70 ¹	73.96±9.91	72.10±3.80	69.50±7.50 ²	69.90±4.40 ²
1:2	21.75±4.02 ¹	26.56±4.50 ¹	70.22±8.72	83.20±6.80	73.22±7.80 ²	84.80±7.10 ²
1:1	30.20±5.90 ¹	33.87±4.60 ¹	90.43±10.20	90.80±7.60	89.92±9.20 ²	91.40±7.70 ²

注: MTT 法, 噻唑蓝比色法; ³H-TdR 法, 氚化胸腺嘧啶摄取试验; BMSCs, 骨髓间充质干细胞; PBMCs, 外周血单个核细胞; 正常对照组 1 (HD1), HLA-B27 阴性的健康对照组; 正常对照组 2 (HD2), HLA-B27 阳性的健康对照组); ①与 HD1 和 HD2 比较 $P<0.001$, ②与 HD1 比较 $P>0.05$

Note: MTT assay, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay; ³H-TdR assay, tritiated thymidine ingestion assay; BM-SCs, bone marrow-derived mesenchymal stem cells; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; healthy donors 1 (HD1), HLA-B27 negative; healthy donors 2 (HD2), HLA-B27 positive; ①Compared with HD1 or HD2 $P<0.001$, ②Compared with HD1 $P>0.05$

T辅助淋巴细胞亚群及所分泌的细胞因子比例等而发挥作用。此外, 体外实验研究发现人类 MSCs 可以诱导 CD4 阳性的 T 淋巴细胞表达调节功能亚型, 即调节性 T 细胞(Treg)^[2,15]。可见, BMSCs 主要是通过调节 T 淋巴细胞各个亚群之间的比例、平衡, 影响 T 细胞的活化、增殖及细胞因子的分泌活性而发挥免疫调节功能的。

最新的研究表明, AS 患者体内存在着自身免疫调节异常。Wang 等^[16]的研究认为细胞因子 IL-17 和 IL-23 的特异性高表达与 AS 的发病机制有关; Boissier^[17]与 Nistala^[18]等发现了 AS 患者体内存在着 T 淋巴细胞亚群的失衡, 即 Th17 细胞明显升高而 Treg 细胞明显降低, 二者在多种自身免疫性疾病的发病机制中发挥着至关重要的作用, 而二者的失衡也进一步证实了 AS 患者体内存在着自身免疫调节异常。本研究所发现的 AS 患者 BMSCs 免疫调节能力异常, 极可能是体内 T 淋巴细胞各个亚群间比例或功能失衡的“导火索”, 也可能是这些致病细胞因子的“煽动者”, 与 AS 自身免疫调节异常的宏观表象直接相关。另外, 在本研究中, HLA-B27 阳性与阴性的健康对照者之间比较没有发现任何有统计学意义的差异, 其在所检测的各个指标方面都基本一致。表明 AS 患者的这些异常可能并不是由 HLA-B27 引起的。

以上结果说明使用正常健康人的 BMSCs 治疗 AS 存在理论上的可能性。越来越多的证据表明, BMSCs 可能是一种治疗固体器官移植的良好免疫抑制细胞, 同时也是人类自身免疫性疾病细

胞治疗的理想细胞选择^[19-21]。BMSCs 的优点显而易见; 可以很容易地从众多的组织中获取, 体外培养扩增几乎没有限制, 并且具有非常肯定的免疫调节作用^[22]。BMSCs 的免疫调节功能给包括 AS 在内的自身免疫性疾病的细胞治疗带来了曙光, 它能左右人类的健康与疾病, 为这类疾病的治疗干预措施提供了新的思路。AS 患者 BMSCs 明显下降的免疫调节功能极可能是 AS 病理发生的起始因子, 或者在 AS 的发病机制中扮演了某种角色。因此, BMSCs 可能会成为 AS 的治疗靶点, 临床上可以考虑使用来自健康人的 BMSCs 治疗 AS。然而, 未来 AS 免疫调节治疗靶点的确定还有很长的路要走, 对 BMSCs 治疗作用机制的进一步阐明或许会有所帮助。

4 参考文献

- Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis[J]. Lancet, 2007, 369(9570): 1379-1390.
- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [J]. Blood, 2005, 105(4): 1815-1822.
- Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy[J]. Blood, 2005, 106(5): 1755-1761.
- Bacigalupo A, Valle M, Podesta M, et al. T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia[J]. Exp Hematol, 2005, 33(7): 819-827.
- Bernardo ME, Avanzini MA, Cicciocioppo R, et al. Phenotypic/functional characterization of in vitro-expanded mesenchy-

- mal stromal cells from patients with Crohn's disease [J]. Cytotherapy, 2009, 11(7): 825-836.
6. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: a proposal for modification of the New York criteria [J]. Arthritis Rheum, 1984, 27(4): 361-368.
7. Jung JW, Cho SD, Ahn NS, et al. Ras/MAP kinase pathways are involved in Ras specific apoptosis induced by sodium butyrate[J]. Cancer Lett, 2005, 225(2): 199-206.
8. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo[J]. Exp Hematol, 2002, 30(1): 42-48.
9. Wanders A, Landewe R, Dougados M, et al. Association between radiographic damage of the spine and spinal mobility for individual patients with ankylosing spondylitis: can assessment of spinal mobility be a proxy for radiographic evaluation [J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64(7): 988-994.
10. El Tamer MK, Reis RL. Progenitor and stem cells for bone and cartilage regeneration [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2009, 3(5): 327-337.
11. Yang Y. Skeletal morphogenesis during embryonic development[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2009, 19(3): 197-218.
12. Braun J, Bollow M, Neure L, et al. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis[J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(4): 499-505.
13. Rifas L. T-cell cytokine induction of BMP-2 regulates human mesenchymal stromal cell differentiation and mineralization[J]. J Cell Biochem, 2006, 98(4): 706-714.
14. Kong QF, Sun B, Bai SS, et al. Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF-beta [J]. J Neuroimmunol, 2009, 207(1-2): 83-91.
15. Maccario R, Podesta M, Moretta A, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype[J]. Haematologica, 2005, 90(4): 516-525.
16. Wang X, Lin Z, Wei Q, et al. Expression of IL-23 and IL-17 and effect of IL-23 on IL-17 production in ankylosing spondylitis[J]. Rheumatol Int, 2009, 29(11): 1343-1347.
17. Boissier MC, Assier E, Falgarone G, et al. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm[J]. Joint Bone Spine, 2008, 75(4): 373-375.
18. Nistala K, Wedderburn LR. Th17 and regulatory T cells: rebalancing pro-and anti-inflammatory forces in autoimmune arthritis[J]. Rheumatology(Oxford), 2009, 48(6): 602-606.
19. Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, et al. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 363(2): 247-252.
20. Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, et al. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(4): 1006-1019.
21. Kong QF, Sun B, Wang GY, et al. BM stromal cells ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th cells through the secretion of IDO [J]. Eur J Immunol, 2009, 39(3): 800-809.
22. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(9): 726-736.

(收稿日期:2011-11-12 修回日期:2012-01-12)

(英文编审 孙浩林/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)