

脐带华氏胶来源间充质干细胞对 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞免疫抑制作用

何海萍^{1, 2}, 杨同华², 姚翔媚², 陆智祥², 王启², 秦涛²

(1. 昆明理工大学医学院, 昆明 650504; 2. 云南省第一人民医院 血液内科, 昆明 650032)

摘要: 已证实间充质干细胞(mesenchymal stromal cell, MSC)具有免疫调节作用, 骨髓来源的 MSC 具有显著的免疫抑制效果, 但骨髓的采集对供者而言是创伤性操作。脐带为产科废弃物, 采集容易且对产妇、婴儿无任何损伤。为了探索脐带华氏胶来源 MSC(Wharton's jelly-derived MSC, WJ-MSC)的免疫抑制作用, 采用混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR)评估 WJ-MSC 对 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞的免疫抑制作用。研究证实在 MLR 中, 异基因来源的反应性 T 淋巴细胞可以有效地被来自供者、受者或第三方的 WJ-MSC 抑制; 在 Transwell 分离培养中, WJ-MSC 的免疫抑制作用较直接接触培养弱; 随着吲哚胺-2, 3-双加氧酶(indoleamine-2, 3-dioxygenase, IDO)抑制剂 1-甲基色氨酸(1-methyl-tryptophan, 1-MT)剂量的增加, WJ-MSC 对 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞的抑制作用逐渐减弱; 长期培养传代后的第 10 代 WJ-MSC 也有较好的免疫抑制作用。这说明 WJ-MSC 的免疫抑制作用不受 MHC 的限制, 其免疫抑制作用主要是通过 T 淋巴细胞直接接触表达, 而 IDO 是 WJ-MSC 有效的可溶性免疫抑制因子。

关键词: 脐带华氏胶来源间充质干细胞; T 淋巴细胞; 免疫抑制作用

中图分类号: R392.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)01-0030-07

人间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)可以从多种组织中分离, 包括骨髓、脐带、胎盘和脂肪组织^[1]。有研究表明 MSC 拥有多向分化潜能, 可以分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等^[2-3], 能够迁移到炎症组织发挥免疫抑制作用^[4]。此外, 它可协同造血干细胞共同治疗免疫性疾病^[5]。骨髓来源 MSC 具有免疫抑制作用, 其中一部分是由其本身分泌的可溶性因子包括转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)、HLA-G、前列腺素 E2 等发挥的^[6]。目前, 骨髓来源 MSC 已应用于治疗及预防急性移植物抗宿主病^[7], 然而骨髓的收集对供者是创伤性操作。脐带为产科废弃物, 采集容易且对产妇、婴儿无任何损伤。本研究选择脐带华氏胶来源 MSC(Wharton's jelly-derived MSC, WJ-MSC), 运用常规贴壁培养方法分离、培养及收集细胞^[8], 采用国际细胞治疗标准定义的 MSC 表面标志物, 即阳性表达

CD105、CD73、CD90 和 HLA-I 类表面标志簇, 而阴性表达 CD45 和 HLA-DR^[9]鉴定细胞。本研究主要通过混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR)来探讨 WJ-MSC 对 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞的免疫抑制作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料 α MEM 培养液, 为美国 Invitrogen 公司产品; 植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)、FCS, 为澳大利亚 Excell 公司产品; 淋巴细胞分离液(Ficoll, 1.077), 为深圳达科为生物技术股份有限公司产品; CD73-藻红蛋白(phycoerythrin, PE)抗体、CD90-PE 抗体、CD105-FITC 抗体、CD271-PE 抗体、HLA-DR-PE 抗体、HLA-ABC-FITC 抗体、CD45-FITC 抗体、CD4-FITC 抗体、CD8-PE 抗体、凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC/PI), 为美国 BD 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 WJ-MSC 的分离培养 使用生理盐水将脐带清洗 2 遍, 清洗血管中及表面的血液, 将脐带放于 75% 的医用酒精中浸泡约 30 s, 取出脐带用生理盐水清洗 2 遍后剥离华氏胶, 将其切成 2 mm × 2 mm 小块, 置于直径 10 cm 培养皿中, 加 10 mL 含 10% FCS 的 α MEM 培养液, 置 5% CO₂、37 °C

收稿日期: 2018-04-05

基金项目: 国家自然科学基金(81760028); 昆明理工大学校人才培养立项(kksy201560048); 昆明医科大学应用基础研究联合专项(2018FE001-129)

作者简介: 何海萍(1974—), 女, 博士, 讲师, 主要从事血液系统肿瘤免疫治疗及间充质干细胞研究

通信作者: 何海萍(E-mail: 2398230256@qq.com)

培养箱中培养。取第3代细胞,将细胞密度调整为 2×10^5 个/mL,用抗体CD73-PE、CD90-PE、CD105-FITC、CD271-PE、CD45-FITC、HLA-DR-PE、HLA-ABC-FITC标记,流式细胞仪检测细胞免疫表型。

1.2.2 制备单个核细胞(mononuclear cell, MNC) 将医院产科获取的脐带血(cord blood, CB)及不同健康志愿者的外周血(peripheral blood, PB)采用Ficoll密度梯度离心法经1200 r/min离心20 min后,收集CB-MNC及PB-MNC, PBS冲洗2遍, Sysmex XE 2100计数MNC数量。

1.2.3 制备刺激性细胞(stimulator cell, S) 将CB-MNC或PB-MNC调整密度至 1×10^7 个/mL,加入含10% FCS的RPMI 1640培养液,置于直径10 cm的培养皿中,37℃孵育5 d后,加入10 ng/mL TNF- α 培养2 d,第7天收集所有悬浮及贴壁的细胞,调整密度至 2×10^5 个/mL,待用。

1.2.4 制备羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(hydroxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE)标记的反应性细胞(responder cell, R) 将2.5 μ mol/L CFSE (Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit, 美国Invitrogen公司)加入CB-MNC或PB-MNC,在PBS中放置,37℃培养箱中孵育9 min,之后加入含50% FCS的RPMI 1640培养液使反应停止,调整细胞密度至 2×10^6 个/mL,待用。

1.2.5 MLR 调整WJ-MSC密度至 2×10^5 个/(mL·孔),先在24孔培养板内培养2 d,在进行MLR当日,重新悬浮WJ-MSC,CFSE荧光标记的CB-MNC或PB-MNC来源的R、S和WJ-MSC按10:1:1比例进行混合,培养于RPMI 1640培养液中,阳性对照为R加入10 μ g/mL的PHA。4 d后收集细胞,加入CD4或CD8抗体,通过CFSE标记的R来检测CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞在WJ-MSC共同培养时的分裂增殖情况。经PBS洗涤离心后将细胞密度调整至 1×10^6 个/mL,取200 μ L细胞悬液检测CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞的分裂增殖情况。

1.2.6 Transwell分离培养 为了评估WJ-MSC是依赖与淋巴细胞直接接触,还是其分泌的可溶性因子发挥免疫抑制作用,使用Transwell将WJ-MSC与反应性及刺激性T淋巴细胞分离培养,WJ-MSC以 2×10^5 个/mL密度培养在Transwell培养板上,2 d后,CFSE标记的R(CB-MNC 2×10^6 个/mL)及制备的S(2×10^5 个/mL)按10:1比例添加,混合培养于Transwell小室中。为观察WJ-MSC对PHA刺

激的T细胞发挥的免疫抑制作用,将PHA(5 μ g/mL)刺激的CB-MNC(2×10^6 个/mL)培养于Transwell小室中,WJ-MSC培养于培养板上。将不加入WJ-MSC的MLR作为阳性对照。培养板置于37℃、5% CO₂孵箱中连续培养3 d,收集细胞并用PBS洗涤离心后,镜下计数。各组收集3个孔的细胞,洗涤后加入CD4-FITC、CD8-PE抗体各2 μ L,室温避光孵育30 min, PBS混匀离心后用流式细胞仪检测CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞的增殖情况。

1.2.7 评估吲哚胺-2,3-双加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO) 为了观察WJ-MSC分泌的IDO在免疫抑制中发挥的作用,将IDO的抑制剂1-甲基色氨酸(1-methyl-tryptophan, 1-MT)按不同比例(0.1、0.5、1 mmol/L)加入混合淋巴细胞与WJ-MSC共同培养体系中,4 d后收集细胞,用流式细胞仪检测CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞的增殖情况。

1.2.8 长期培养的WJ-MSC免疫抑制作用 为了观察长期培养后的WJ-MSC的免疫抑制效果,取第1代和第10代的WJ-MSC,将细胞密度调整至 2×10^5 个/mL,进行MLR,比较两者对CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞的抑制效果。

1.3 统计学处理 使用不同脐带与CB独立重复实验3次,Excel计算组内数据标准差,进而计算组间数据标准误,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用Graph-Pad Prism 6软件分析并进行t检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 WJ-MSC的表型 流式细胞术结果显示WJ-MSC高表达CD73、CD90、CD105、HLA-ABC,阴性表达CD45、CD271、HLA-DR(图1)。

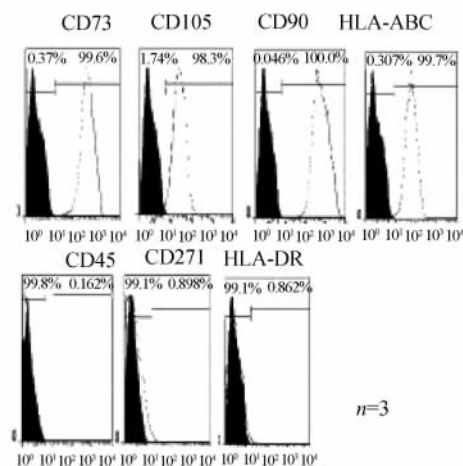


图1 WJ-MSC的流式细胞术检测

2.2 WJ-MSC 抑制活化的 T 淋巴细胞增殖 显微镜下可见 MLR 的第 4 天, 上清液中悬浮大量聚集成团的淋巴细胞(图 2A), 而与 WJ-MSC 共培养后, 上清液中的淋巴细胞明显减少(图 2B); 体外培养的 WJ-MSC 在自体、异体及第三方 MLR 中对

PB 或 CB 来源的 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞均有极强的免疫抑制作用(图 2C、图 2D), 说明 WJ-MSC 对 T 淋巴细胞增殖的抑制作用不受 MHC 限制, 无论是来自供者、受者还是第三方的 MSC 都具有相似的免疫调节作用。

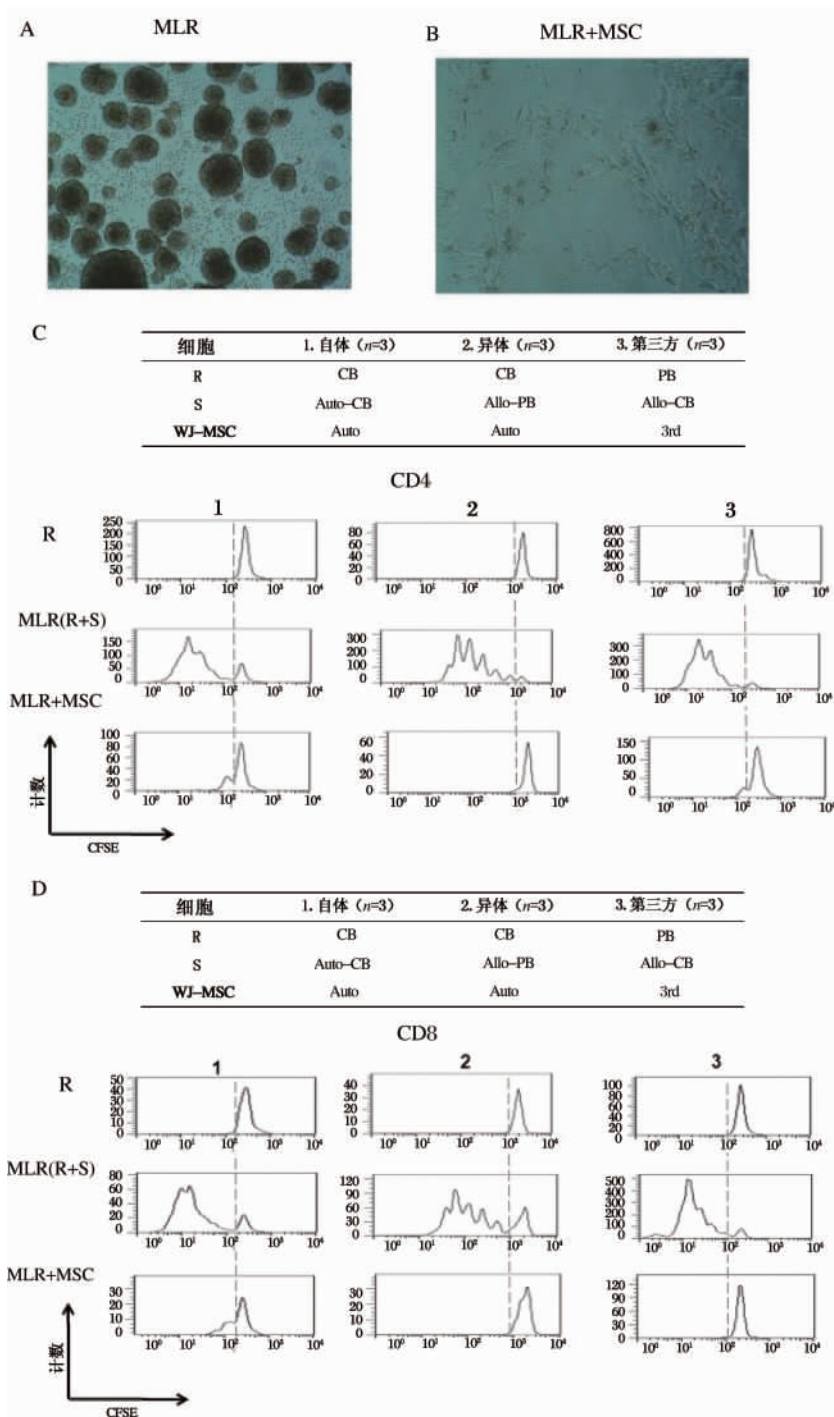


图 2 WJ-MSC 抑制活化的 T 淋巴细胞

注: A. 显微镜下见 MLR 的第 4 天, 上清液中悬浮大量的 T 淋巴细胞团; B. 加入 WJ-MSC 共培养时, 上清液中的 T 淋巴细胞明显减少; C、D. CFSE 荧光标记 WJ-MSC 在自体、异体及第三方 MLR 中对 PB 或 CB 来源的 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞均有较好的免疫抑制作用

2.3 WJ-MSC 通过细胞间接触而发挥最佳免疫抑制效果 将 WJ-MSC 与混合淋巴细胞通过 Transwell 分离培养后收集细胞, 分析 WJ-MSC 对 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞的免疫抑制效果, 评估 WJ-MSC 是依赖与 T 淋巴细胞直接接触, 还是其分泌的可溶性因子发挥免疫抑制作用。经过分离培养, WJ-MSC 免疫抑制效应较接触共培养组弱(图

3A), 将培养后的 WJ-MSC 上清液加入 MLR 中, 发现单纯的 WJ-MSC 分泌的细胞因子没有发挥免疫抑制作用(图 3B)。这可能是在分离培养中, WJ-MSC 分泌的细胞因子虽然对活化 T 淋巴细胞的后期分裂增殖有抑制作用, 但作用较弱, 共接触培养具有更为明显的抑制作用, 说明 WJ-MSC 是通过细胞间直接接触而发挥最佳免疫抑制作用的。

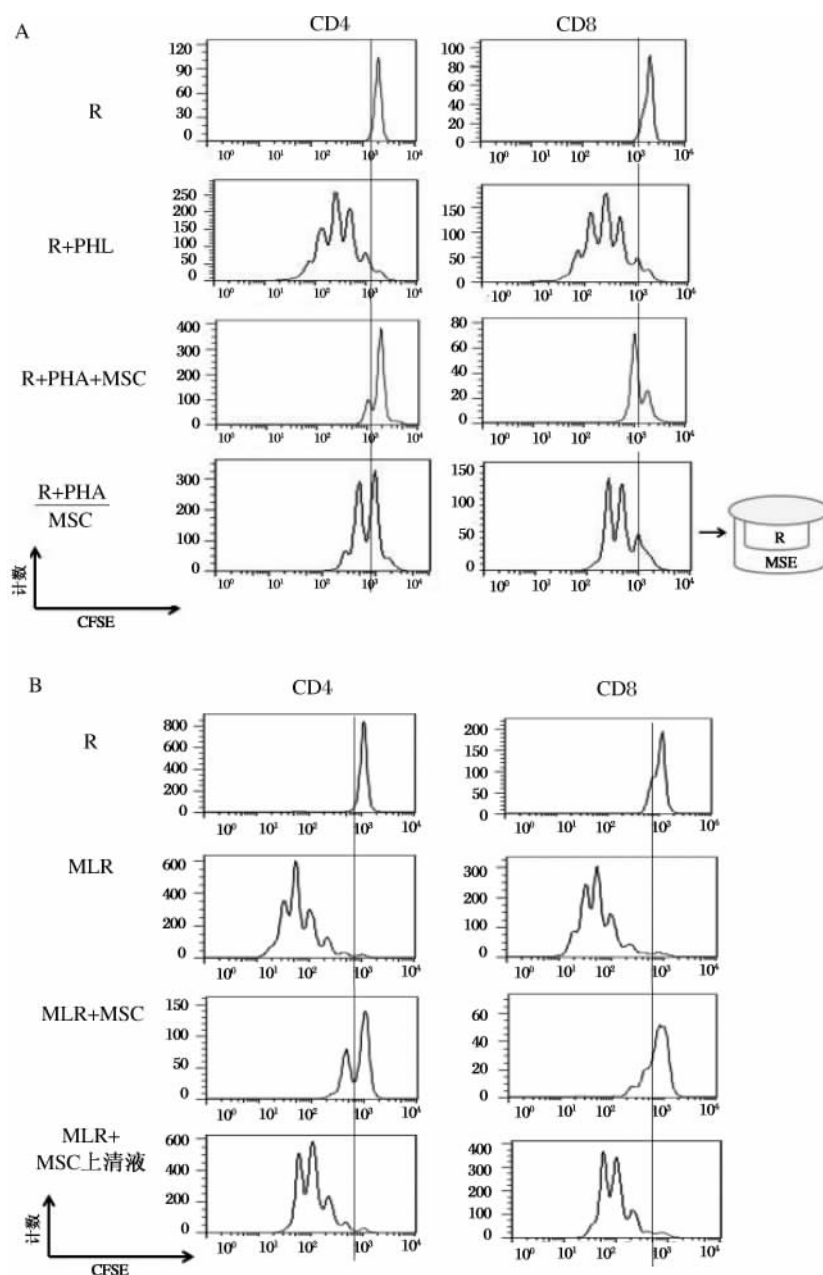


图3 WJ-MSC 分离培养及其上清液对 T 淋巴细胞的免疫抑制作用

注: A. WJ-MSC 与 R、S 通过 Transwell 分离培养, WJ-MSC 对 MLR 的活化 T 淋巴细胞的后期分裂增殖有抑制作用, 但作用较弱; B. WJ-MSC 上清液在 MLR 中没有呈现出明显的免疫抑制作用

2.4 IDO 是 WJ-MSC 分泌的可溶性免疫抑制因子 将 IDO 的抑制剂 1-MT 按不同比例(0.1、0.5 和

1 mmol/L)加入混合 T 淋巴细胞与 WJ-MSC 共同培养体系中, 随着 1-MT 剂量的增加, WJ-MSC

对 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞的抑制作用逐渐减弱, 说明 IDO 是 WJ-MSC 分泌的可溶性免疫抑制因子 (图 4)。

2.5 长期培养后的 WJ-MSC 发挥免疫抑制作用

比较长期培养传代的第 10 代 WJ-MSC 与第 1 代

WJ-MSC 的免疫抑制作用, 结果显示在 MLR 中, 两者对 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞发挥同样的免疫抑制作用 (图 5), 说明经过长期传代培养的 WJ-MSC 依然保持着免疫抑制作用。

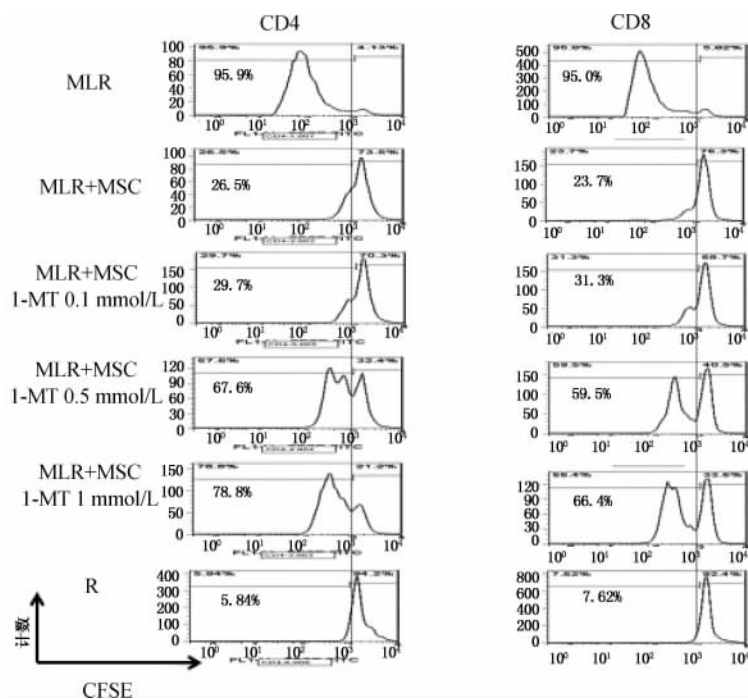


图 4 IDO 抑制剂 1-MT 对 WJ-MSC 发挥免疫抑制作用的影响

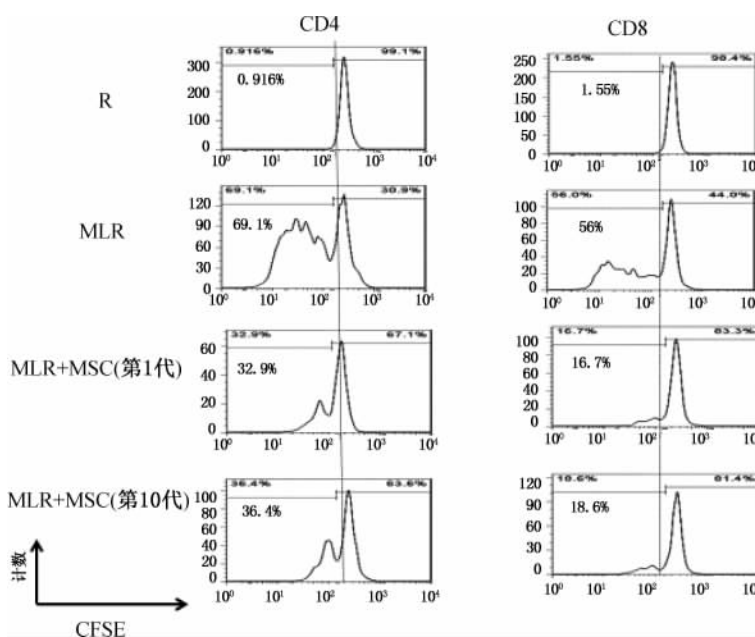


图 5 第 1 代 WJ-MSC 和第 10 代 WJ-MSC 在 MLR 中的免疫抑制作用

3 讨论

已知 MSC 可以迁移到炎症部位发挥免疫抑制作用, MSC 贴壁生长, 呈纺锤形, 阳性表达 CD105、CD73 和 CD90, 阴性表达 CD45、CD34、CD14、CD19 和 HLA-DR^[10]。有研究证明 MSC 不仅具有向成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞分化的能力^[2-3], 而且还有免疫抑制作用, 包括 WJ-MSC、脐带内皮 MSC、脐带血管周围细胞和整个脐带 MSC^[11-14]。本研究 WJ-MSC 在自体、异体及第三方 MLR 中对 PB 或 CB 来源的 T 淋巴细胞均有极强的免疫抑制作用, 说明 WJ-MSC 对 T 淋巴细胞增殖的抑制作用不受 MHC 的限制, 无论是来自供者、受者还是第三方的 MSC 都具有相似的免疫调节作用。同时, 通过 Transwell 培养板将 WJ-MSC 与 CB 或 PB 淋巴细胞分离培养, 减弱了抑制增殖作用, 说明细胞间相互接触比 Transwell 分离培养所释放的免疫抑制因子具有更为明显的抑制能力。另有报道证实, 脐带 MSC 中释放的可溶性因子如前列腺素 E2、galectin-1 和 HLA-G5 可以有效抑制免疫应答^[15]。IDO 可以在炎症细胞因子 IFN- γ 诱导下催化色氨酸转化为犬尿氨^[16-17]。本研究选用的 IDO 抑制剂 1-MT 呈剂量依赖性反转了 WJ-MSC 的免疫抑制效应, 提示可溶性 IDO 为有效的免疫抑制效应因子。近年有研究证实, 免疫细胞释放某些促炎细胞因子如 IL-10^[18]、TNF- α ^[19]、IFN- γ ^[20]、IL-1 α 和 IL-1 β ^[15], 可以刺激 MSC 发挥免疫抑制功能。Girdlestone 等^[11]报道了脐带内皮 MSC 以剂量依赖的方式抑制 T 淋巴细胞的增殖。在本研究中, MSC 与 R、S 维持的比例为 1:10:1, 但是针对动物实验及将来的临床应用, 还需要根据体内复杂的环境探索合适的 MSC 浓度。另外, WJ-MSC 抑制 T 淋巴细胞增殖似乎是通过阻滞细胞周期来实现的, 而不是杀死 T 淋巴细胞, 因为与 R 相比, WJ-MSC 的细胞数量没有减少。尽管 WJ-MSC 发挥免疫抑制作用依赖其分泌的免疫抑制性可溶性因子, 但在 WJ-MSC 与活化的 T 淋巴细胞之间, 直接接触是更重要的因素。WJ-MSC 对 T 淋巴细胞存在的免疫抑制效应将为自身免疫性疾病及移植抗宿主反应的治疗提供新的思路。

参考文献

[1] 方洪松, 周建林, 彭昊, 等. 不同来源间充质干细胞生物学特性差异[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(32): 5243-5248.

- [2] Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ, *et al.* Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord[J]. *Int J Hematol*, 2009, 90: 261-269.
- [3] He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, *et al.* Stage-specific embryonic antigen 4 in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency[J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20: 1314-1324.
- [4] 秦静, 赵振林. 骨髓间充质干细胞的免疫原性特点及其免疫调节能力[J]. 现代免疫学, 2010, 30(6): 515-519.
- [5] 张光峰, 张晓. 间充质干细胞和造血干细胞移植治疗自身免疫病的机制[J]. 现代免疫学, 2006, 26(5): 438-441.
- [6] Yang SH, Park MJ, Yoon IH, *et al.* Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10[J]. *Exp Mol Med*, 2009, 41: 315-324.
- [7] Dotoli GM, De Santis GC, Orellana MD, *et al.* Mesenchymal stromal cell infusion to treat steroid-refractory acute GvHD III/IV after hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Bone Marrow transplant*, 2017, 52(6): 859-862.
- [8] 马锡慧, 肖漓, 冯凯, 等. 人脐带和骨髓间充质干细胞体外分离培养及生物学特性比较[J]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2015, 5(2): 10-13.
- [9] Galipeau J, Krampera M, Barrett J, *et al.* International society for cellular therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials[J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(2): 151-159.
- [10] Hong JQ, Gao Y, Song J, *et al.* Comparison of biological characteristics and immunosuppressive activity between human amniotic mesenchymal stem cells and human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2016, 24(3): 858-864.
- [11] Girdlestone J, Limbani VA, Cutler AJ, *et al.* Efficient expansion of mesenchymal stromal cells from umbilical cord under low serum conditions[J]. *Cytotherapy*, 2009, 11: 738-748.
- [12] Ennis J, Gotherstrom C, Le Blanc K, *et al.* *In vitro* immunologic properties of human umbilical cord perivascular cells[J]. *Cytotherapy*, 2008, 10: 174-181.
- [13] Wu X, Xu L, Shen Y, *et al.* MALP-2, an agonist of TLR6, promotes the immune status without affecting the differentiation capacity of umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6): 5540-5546.
- [14] Kikuchi-Taura A, Taguchi A, Kanda T, *et al.* Human umbilical cord provides a significant source of unexpanded mesenchymal stromal cells[J]. *Cytotherapy*, 2012, 14: 441-450.
- [15] Bruno S, Deregibus MC, Camussi G. The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation[J]. *Immunol Lett*, 2015, 168(2): 154-158.
- [16] Nagamura-Inoue T, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility[J]. *World J Stem Cells*, 2014, 6: 195-202.

- [17] Rojas D, Krishnan R. IFN-gamma generates maturation-arrested dendritic cells that induce T cell hyporesponsiveness independent of Foxp3⁺ T-regulatory cell generation [J]. *Immunol Lett*, 2010, 132(1-2): 31-37.
- [18] Barnhoorn M, de Jonge-Muller E, Molendijk I, *et al.* Endoscopic administration of mesenchymal stromal cells reduces inflammation in experimental colitis[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24(8): 1755-1767.
- [19] Miettinen JA, Pietila M, Salonen RJ, *et al.* Tumor necrosis factor alpha promotes the expression of immunosuppressive proteins and enhances the cell growth in a human bone marrow-derived stem cell culture[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317: 791-801.
- [20] Sheng H, Wang Y, Jin Y, *et al.* A critical role of IFN gamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1 [J]. *Cell Res*, 2008, 18: 846-857.

The immunosuppressive effect of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells on CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes

HE Hai-ping^{1,2}, YANG Tong-hua², YAO Xiang-mei², LU Zhi-xiang², WANG Qi², QIN Tao² (1. *Medical School of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650504, China*; 2. *Department of Hematology, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China*)

Abstract: Many studies have revealed that mesenchymal stromal cell (MSC) has immunomodulatory effect. Bone marrow derived MSCs show distinct immunosuppressive effect, however, bone marrow collection is an invasive operation. Compared with bone marrow, umbilical cord is obstetric waste, easy to collect and has no damage to donors. Umbilical cord Wharton's jelly (WJ) is a rich source of MSC. In order to investigate the immunosuppressive effect of WJ-MSC, we evaluated the immunosuppressive effect of WJ-MSC on CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes by mixed lymphocyte reaction (MLR). Here, we demonstrated that WJ-MSC efficiently inhibited the proliferation of responder T lymphocytes triggered by autologous or allogeneic dendritic cells in MLR. Moreover, even 3rd party-derived WJ-MSC also strongly suppressed allogeneic MLR. The inhibitory effects of WJ-MSC on T lymphocyte proliferation were attenuated by the blockade of cell-cell contact using the Transwell chamber. Indoleamine-2, 3-dioxygenase (IDO) inhibitor 1-methyl-tryptophan (1-MT) reversed WJ-MSC immunosuppressive effect in a dose dependent manner. Our results indicated that the immunosuppressive effect of WJ-MSC was not restricted by MHC. The immunosuppressive effect was mainly through direct contact with T lymphocytes. Therefore, IDO is an effective soluble mediator of WJ-MSC.

Key words: umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cell; T lymphocyte; immunosuppressive effect