

脐血来源间充质干细胞可抑制异体 T 细胞的反应

李志斌*, 曹引丽, 刘嗣超, 董莉洁, 鲁会英

(陕西省妇幼保健院, 陕西 西安 710003)

摘要:目的 研究脐血间充质干细胞(HUCB-MSCs)对异体 T 细胞的抑制作用。方法 体外培养 HUCB-MSCs, 流式细胞术测表面标记;取正常人外周血, 免疫磁珠分离 CD3⁺T 细胞, 将分离的 CD3⁺T 与 HUCB-MSCs 1:1 混合培养 5 d, PHA 刺激或不刺激, 采用³H-TdR 掺入法观察 T 细胞增殖, ELISA 方法检测细胞因子, 流式细胞术观察细胞凋亡。结果 HUCB-MSCs 呈纺锤样的细胞形态, 不表达 CD14、CD34、CD45、HLA-DR, 而表达 CD29、CD44、HLA-ABC。HUCB-MSCs 抑制 PHA 引起的 T 细胞增殖($5\,230 \pm 550$ vs $10\,500 \pm 800$ counts/min, $P < 0.001$); HUCB-MSCs 还能抑制异体 T 细胞分泌 IFN- γ (510 ± 60 vs $1\,580 \pm 100$ pg/mL, $P < 0.001$) 和 TNF- α (590 ± 20 vs $1\,180 \pm 30$ pg/mL, $P < 0.001$), 上调 IL-4(16.3 ± 8.2 vs 4.1 ± 1.8 pg/mL, $P < 0.001$) 和 IL-10(105 ± 5 vs 17 ± 2 pg/mL, $P < 0.001$) 分泌; HUCB-MSCs 不诱导 T 细胞的凋亡。结论 HUCB-MSCs 能抑制异体 T 细胞免疫反应。

关键词: 脐血; 间充质干细胞; T 淋巴细胞; 抑制

中图分类号: R 392.7 文献标志码: A

Mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood inhibit the allogeneic peripheral blood T lymphocytes

LI Zhi-bin*, CAO Yin-li, LIU Si-chao, DONG Li-jie, LU Hui-ying

(Shanxi Province Woman & Child Hospital, Xi'an 710003, China)

Abstract: **Objective** To study the influences of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood (HUCB-MSCs) on allogeneic peripheral blood T lymphocytes. **Methods** HUCB-MSCs were isolated from normal human umbilical cord blood, isolated and cultured *in vitro*, and then surface marker was examined with FCM. After isolating CD3⁺T cells from normal human peripheral blood, CD3⁺T cells were mixed with HUCB-MSCs stimulated with PHA or not. Five days later, the effects of HUCB-MSCs on T-cell proliferation was detected by ³H-TdR. Cytokines production of PHA-stimulated T cells in co-culture was measured with ELISA. T-cell apoptosis affected by HUCB-MSCs were also observed by FCM. **Results** HUCB-MSCs showed a spindle-shaped fibroblastic morphology in culture. The populations appeared as a homogenous population and were uniformly positive for the expression of CD29, CD44, and HLA-ABC, but negative for the expression of CD14, CD34, CD45, and HLA-DR. In co-culture, MSCs significantly suppressed PHA-stimulated T-cell proliferation($5\,230 \pm 550$ vs $10\,500 \pm 800$ counts/min, $P < 0.001$). Both pro-inflammatory cytokines IFN- γ (510 ± 60 vs $1\,580 \pm 100$ pg/mL, $P < 0.001$) and TNF- α (590 ± 20 vs $1\,180 \pm 30$ pg/mL, $P < 0.001$) secreted by T cells were inhibited by HUCB-MSCs while anti-inflammatory cytokines IL-10(105 ± 5 vs 17 ± 2 pg/mL, $P < 0.001$) and IL-4(16.3 ± 8.2 vs 4.1 ± 1.8 pg/mL, $P < 0.001$) were

up-regulated. In addition, MSCs-inhibited T cells were not apoptotic during 5 days' culture. **Conclusions** HUCB-MSCs may inhibit the activity of allogeneic peripheral blood T lymphocytes.

Key words: umbilical cord blood; mesenchymal stem cells; T lymphocytes; inhibition

自上世纪九十年代开始,骨髓来源的间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)就一直是干细胞方面研究的热点。本世纪以来,有学者发现异体 BMSCs 能够抑制异体的混合淋巴细胞反应及多克隆刺激剂(PMA、PHA 等)引起的 T 细胞的增殖活化^[1]。预示着 BMSCs 在免疫学领域将具有更大的应用前景^[2]。

人脐血来源的间充质干细胞(human umbilical cord blood mesenchymal stem cells, HUCB-MSCs)与骨髓相比,来源更为方便且数量较多。但是,尽管有 HUCB-MSCs 被证明可向成骨细胞分化^[3] 低免疫原性的报道^[4],关于 HUCB-MSCs 是否能仍具有免疫抑制作用,目前仍少见报道。因此,本实验在体外条件下研究了 HUCB-MSCs 对异体 T 细胞免疫抑制作用,以探讨 HUCB-MSCs 对一些免疫性疾病的潜在治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料

脐血标本 20 份,每份 50 ~ 100 mL,取自陕西省妇幼保健院健康妊娠产妇分娩的胎儿脐带血;外周血标本 10 份,每份 20 mL 取自健康供者(年龄 20 ~ 25 岁)(采血前均签署知情同意书);低糖 DMEM (LG-DMEM);25 cm² 塑料细胞培养瓶;96 孔细胞培养板(Gibco 公司);胎牛血清(FBS)(杭州四季清公司);荧光标记的抗人 CD14 mAb-Percp、抗 CD34 mAb-PE、抗 CD45 mAb-Percp,及其同型阴性对照 mAb(BD 公司);荧光标记的抗人 CD29 mAb-PE、抗 CD44 mAb-FITC、抗 HLA-ABC mAb-FITC、抗 HLA-DR mAb-FITC、抗 CD3 mAb-Percp 及其同型阴性对照(Pharmingen 公司);非特异刺激剂 PHA、IL-4、IL-10、IFN- γ 和 TNF- α ELISA 试剂盒(深圳晶美生物技术有限公司);细胞凋亡试剂盒 Annexin V FITC(北京宝赛生物技术公司)。

1.2 HUCB-MSCs 的分离、培养

按照文献[5]的方法,将肝素抗凝的脐血与等量磷酸盐缓冲液(PBS)混合,缓慢加入预先加有等

体积淋巴细胞分离液液面上,1 000 $\times$ g 离心 15 min,收集单个核细胞层,以 $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种于细胞培养瓶,置 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱中培养。隔日换液,待细胞 90% 以上汇合后,按 1:3 的比例进行传代。

1.3 HUCB-MSCs 表面标记物的流式细胞术检测

分别收集第 2 代及第 3 代细胞,消化后制成 1×10^6 个/mL 的细胞悬液,分别以荧光素标记的抗 CD29 mAb-PE、抗 CD44 mAb-FITC、抗 HLA-ABC mAb-FITC、抗 HLA-DR mAb-FITC、抗 CD14 mAb-Percp、抗 CD34 mAb-PE、抗 CD45 mAb-FITC,对细胞行染色,流式细胞术检测,Cell - Quest 软件分析。

1.4 正常人 T 细胞的分离

将肝素抗凝的正常人外周血 10 mL 与等量 PBS 混合,使用淋巴细胞分离液分离单个核细胞。使用免疫磁珠,将单个核细胞分为 CD3⁺ T 细胞与 CD3⁻ 非 T 细胞。CD3⁻ 的非 T 细胞在实验中作为抗原呈递细胞使用。

1.5 HUCB-MSCs 对 T 细胞增殖能力的影响

实验前将 CD3⁻ 的非 T 细胞与 HUCB-MSCs 均接收 Co^{60} 照射(30 Gy)以灭活其增殖活性。以 10^5 /孔的密度将 HUCB-MSCs 加入 96 孔板中,待 HUCB-MSCs 贴壁后,将 CD3⁺ T 细胞与 CD3⁻ 的非 T 细胞按 1:1 的比例(细胞数均为 10^5 个/孔)加入到 96 孔板中。实验分组, A: CD3⁺ T 细胞 + CD3⁻ 非 T 细胞(对照组); B: CD3⁺ T 细胞 + CD3⁻ 非 T 细胞 + PHA; C: CD3⁺ T 细胞 + CD3⁻ 非 T 细胞 + HUCB-MSCs; D: CD3⁺ T 细胞 + CD3⁻ 非 T 细胞 + HUCB-MSCs + PHA。PHA 刺激的终浓度为 10 ng/mL。将 96 孔板放置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱中培养 3 d 后,采用 ^3H -TdR 掺入法进行 T 细胞增殖分析。

1.6 HUCB-MSCs 对 T 细胞产生细胞因子的影响

细胞处理方法同增殖实验。实验分组为 A: CD3⁺ T 细胞 + CD3⁻ 非 T 细胞 + PHA; B: CD3⁺ T 细胞 + CD3⁻ 非 T 细胞 + HUCB-MSCs + PHA; C: HUCB-MSCs 单独培养。待细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱中培养 5 d 后,收集培养上清,

使用 ELISA 试剂盒检测各组中细胞因子 IL-4, IL-10, IFN- γ 和 TNF- α 的分泌水平。

1.7 HUCB-MSCs 对 T 细胞凋亡的影响

细胞处理同前,实验分组同增殖实验。待细胞在37 ℃,5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养5 d后,收集各组悬浮的细胞(即 CD3⁺T 细胞和 CD3⁻非 T 细胞),以荧光素标记的抗 CD3 mAb-Percp 抗体以及凋亡试剂盒中抗 Annexin V-FITC 抗体对细胞进行双重荧光染色。洗涤后用流式细胞术进行检测,Cell-Quest 软件分析。

1.8 统计学分析

所有实验均设副孔,且每个实验至少重复3次。实验结果用($\bar{x} \pm s$)表示,并采用 *t* 检验进行数据分析。

2 结果

2.1 HUCB-MSCs 的分离、培养,生长状态及形态学观察

20 例标本均成功培养出 HUCB-MSCs,平均传至 15 代。原代细胞培养24 h后可见少量细胞贴壁,

大部分细胞呈球形,悬浮于培养液中(图 1A);48 ~ 72 h,细胞呈纺锤形、多角形改变(图 1B);12 ~ 15 d 后细胞铺满瓶底(图 1C);普通显微镜下观察,可见原代细胞较杂,细胞间散在较多圆形细胞,这些圆形细胞随着传代逐渐减少,第 3 代后可见细胞形态比较均一(图 1D)。

2.2 细胞表面标记检测

细胞不表达由造血干细胞分化来的一些表面标记如 CD14、CD34、CD45 等,也不表达与移植排斥密切相关的标记 HLA-DR;但 90% 以上的细胞高表达 CD29 和 CD44,而且 MHC-I 类分子 HLA-ABC 也表达阳性(图 2)。这与源于骨髓 MSCs 的表面抗原标记相一致。

2.3 HUCB-MSCs 对 T 细胞增殖能力的影响

与对照组 CD3⁺T 细胞 + CD3⁻非 T 细胞单独培养相比,PHA 能够显著刺激 CD3⁺T 细胞增殖[B 组 *vs* A 组:(10 500 $\pm$ 800) *vs* (3 600 $\pm$ 800) counts/min, *P* < 0.001],而 HUCB-MSCs 并不能引起异体 T 细胞增殖[C 组 *vs* A 组:(3 760 $\pm$ 730) *vs* (3 600 $\pm$ 800) counts/min, *P* > 0.05],提示 HUCB-MSCs 具有低的

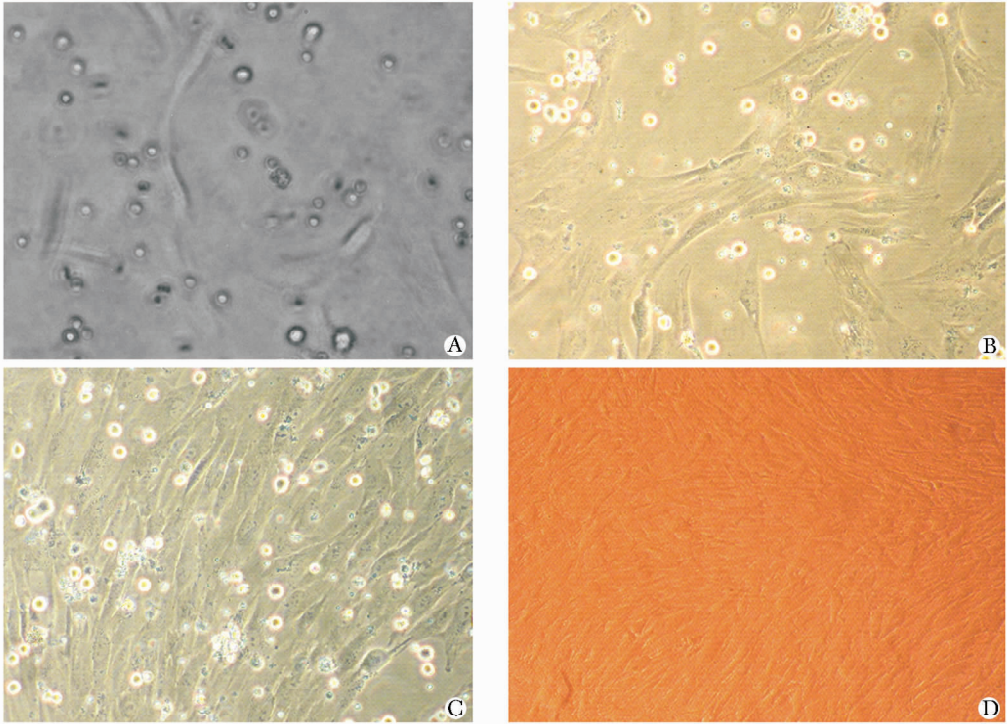
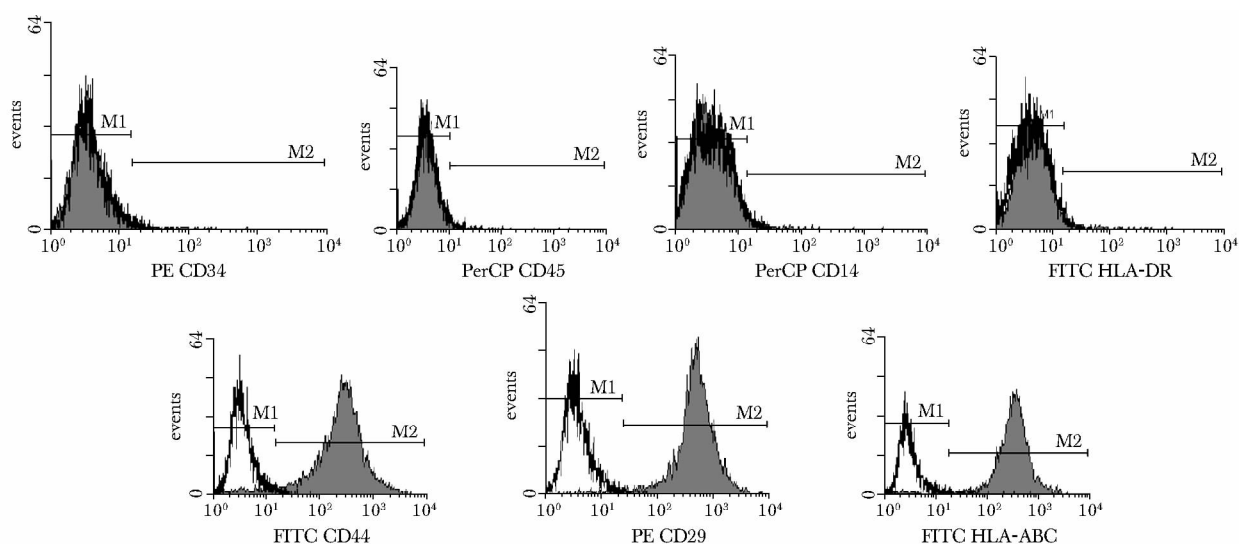


图 1 原代培养的细胞形态
Fig 1 The phenotype of cells in primary culture($\times 100$)



Black blank: control; Red solid: the expression of the markers

图2 细胞表面标记的表达

Fig 2 The expression of markers on cultured cells surface

免疫原性。然而, HUCB-MSCs 却能够显著抑制 PHA 引起的 T 细胞增殖 [D 组 *vs* B 组: $(5\,230 \pm 550)$ *vs* $(10\,500 \pm 800)$ counts/min, $P < 0.001$]。

2.4 HUCB-MSCs 对 T 细胞产生细胞因子的影响

HUCB-MSCs 本身几乎不分泌细胞因子 IL-4, IL-10, IFN- γ 和 TNF- α 等。然而, HUCB-MSCs 却能够显著抑制 PHA 刺激 T 细胞所产生大量的促炎因子 IFN- γ [B 组 *vs* A 组: (510 ± 60) *vs* $(1\,580 \pm 100)$ pg/mL, $P < 0.001$] 和 TNF- α [B 组 *vs* A 组: (590 ± 20) *vs* $(1\,180 \pm 30)$ pg/mL, $P < 0.001$]。PHA 不能够刺激 T 细胞分泌大量的抗炎因子如 IL-4 和 IL-10。但是, 在与 HUCB-MSCs 共培养后, 尽管存在 PHA 的刺激, T 细胞仍能高分泌 IL-4 [B 组 *vs* A 组: (16.3 ± 8.2) *vs* (4.1 ± 1.8) pg/mL, $P < 0.001$] 和 IL-10 [B 组 *vs* A 组: (105 ± 5) *vs* (17 ± 2) pg/mL, $P < 0.001$]。

2.5 HUCB-MSCs 对 T 细胞凋亡的影响

各组中 T 细胞的 Annexin V 表达的百分率无显著性差异 (图 3)。

3 讨论

HUCB-MSCs 是近年来发现的另一种多能干细胞。鉴于 BMSCs 在免疫治疗方面的潜力, 本实验在体外条件下研究了 HUCB-MSCs 对异体来源的 T 细胞的作用, 期望为今后探讨采用 HUCB-MSCs 进行

免疫治疗提供实验依据。

实验发现, HUCB-MSCs 虽然表达主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) I 类分子 HLA-ABC, 但对于与移植排斥密切相关的 MHC-II 类分子 HLA-DR 却表达阴性, 提示 HUCB-MSCs 移植后可能并不会引起异体的移植排斥反应。而且, HUCB-MSCs 和 T 细胞共培养后, 并不引起异体 T 细胞的增殖, 进一步证明了 HUCB-MSCs 的低免疫原性和移植的安全性。更重要的是, HUCB-MSCs 能够显著抑制 PHA 刺激所致的 T 细胞的增殖与炎性细胞因子 IFN- γ 和 TNF- α 的分泌, 同时能够提高抗炎性因子 IL-4, IL-10 的表达, 这是 HUCB-MSCs 免疫治疗的主要作用。为进一步探讨, HUCB-MSCs 发挥其抑制作用的机制, 我们进一步检测了各组中 T 细胞凋亡水平, 结果发现, HUCB-MSCs 发挥其抑制作用并不是通过诱导 T 细胞的凋亡来实现的。从反面说明, HUCB-MSCs 移植后并不会导致体内细胞的凋亡, 进一步证明了移植 HUCB-MSCs 的安全性。

许多疾病是由 T 细胞的异常所介导的, 最常见就是移植排斥反应。现有的免疫抑制药物虽然可缓解症状, 但价格昂贵, 且患者需要终生服药。近年来, 众多的自身免疫病也被发现是与 T 细胞的异常有关, 如类风湿性关节炎, 系统性硬化症等。如何有效地抑制 T 细胞的异常增殖活化, 诱导患者机体对

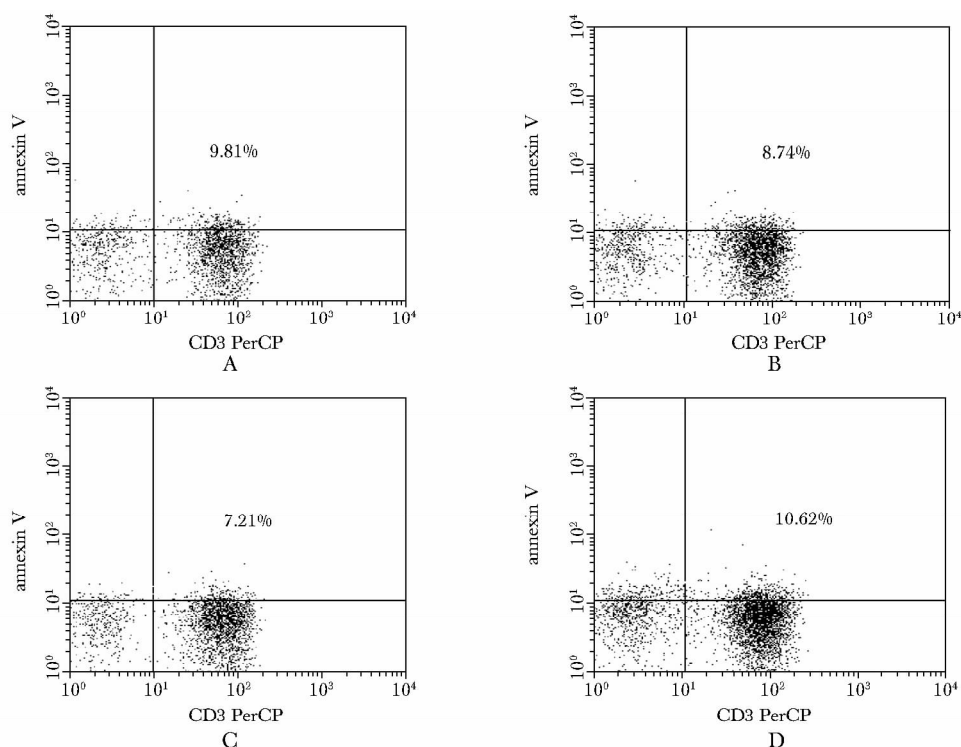


图3 凋亡细胞染色流式细胞术检测结果图

Fig 3 Results of apoptosis of HUCB-MSCs detected by flow cytometry

自身抗原的免疫耐受,一直是治疗这些疾病的研究热点。虽然自体骨髓移植是治疗难治性自身免疫病的一种重要手段。但有学者发现,自身免疫病患者自身的骨髓本身就存在着一定的缺陷^[6],使得寻找异体的骨髓成为了一种必需。目前人们尝试采用异体 MSCs 治疗一些自身免疫病,已经取得了初步成功。

本文在体外对于 HUCB-MSCs 免疫学特性的研究则提示了脐血来源的间充质干细胞与 BMSCs 一样,同样可作为免疫治疗的一种选择。由于其具有的易于收集的优势,甚至比 BMSCs 具有更大的发展潜力。虽然对于 HUCB-MSCs 的研究还需要进一步的深入,但通过本研究,为尝试采用 HUCB-MSCs 进行免疫治疗提供很好的实验依据。

参考文献:

- [1] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli [J]. *Blood*, 2002, 99:3838 - 3843.
- [2] 宋丽,陈嘉林. 间充质干细胞免疫调节作用及其在自身免疫病中的意义[J]. *基础医学与临床*, 2010, 29:1221 - 1223.
- [3] 葛薇,李长虹,李云涛. 脐血来源的间充质干细胞生物学特性与向成骨细胞分化能力的研究[J]. *中华血液学杂志*, 2006, 27:749 - 752.
- [4] 范存刚,周景儒,张庆俊. 人脐带间充质干细胞的生物学性质研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2010, 30:215 - 217.
- [5] 蒋志琼,唐中,袁国华,等. 间充质干细胞在 T 细胞免疫反应中的调节作用[J]. *基础医学与临床*, 2010, 30:547 - 549.
- [6] Jones EA, English A, Henshaw K, *et al.* Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50:817 - 827.