

# 人脐带间充质干细胞的体外免疫调节特性

刘梦婷<sup>1</sup>, 饶巍<sup>1</sup>, 韩兵<sup>1</sup>, 肖翠红<sup>1</sup>, 武栋成<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>武汉汉密顿生物科技股份有限公司研发中心, 湖北省武汉市 430075; <sup>2</sup>武汉大学基础医学院, 湖北省武汉市 430071)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1862

ORCID: 0000-0003-4450-086X(刘梦婷)

文章快速阅读:

### 文章特点一

- (1) 采用自主技术分离培养人脐带间充质干细胞, 通过与免疫细胞体外共培养, 探讨其免疫调节功能和可能的作用途径;
- (2) 实验从淋巴细胞增殖、特殊 T 淋巴细胞亚群调节、炎症因子分泌等方面阐明了脐带间充质干细胞的免疫调节特性, 免疫调节作用依赖细胞与细胞间的接触。

### 方法:

人脐带间充质干细胞与外周血单个核细胞按不同比例直接接触或非接触体系 (Transwell) 共培养。

### 检测:

- (1) 流式细胞仪检测淋巴细胞的增殖情况;
- (2) 流式细胞仪检测直接接触共培养体系中 Th1、Th17 及 Treg 淋巴细胞亚群的比例;
- (3) ELISA 测定直接接触共培养体系中淋巴细胞分泌的炎症因子水平。

### 结论:

- (1) 人脐带间充质干细胞能够抑制淋巴细胞增殖并呈剂量依赖性; 增加 Treg 细胞的比例, 而降低 Th1/Th17 的比例; 抑制炎症因子肿瘤坏死因子  $\alpha$  及干扰素  $\gamma$  的产生;
- (2) 人脐带间充质干细胞的免疫抑制作用依赖于细胞与细胞间直接接触。

### 文题释义:

**植物血凝素:** 是一种有丝分裂原, 能激活小淋巴细胞转化为淋巴母细胞, 继而分裂增殖, 释放淋巴因子, 并能提高巨噬细胞的吞噬功能。作为干扰素诱导剂可以刺激机体产生白细胞介素 2 和干扰素; 还可以刺激机体产生非特异性抗体。由于其较难提纯, 且成本极高, 所以一直以来仅在实验室中作为刺激淋巴细胞增殖的试剂。

**免疫调节:** 是人脐带间充质干细胞主要生物学特性之一, 体现在抑制免疫细胞的增殖, 调节淋巴细胞亚群的分化及相关细胞因子的产生, 维持免疫平衡。

### 摘要

**背景:** 人脐带间充质干细胞被应用于治疗多种疾病, 包括与免疫相关疾病的临床应用研究。深入研究人脐带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。

**目的:** 探讨人脐带间充质干细胞的免疫调节特性及作用途径。

**方法:** 人脐带间充质干细胞与荧光染料 CFSE 标记的人外周血单个核细胞直接共培养(二者比例为 1:5, 1:10, 1:20), 或在 Transwell 非接触体系中间接共培养(二者比例为 1:5), 流式细胞术检测植物血凝素刺激的外周血单个核细胞增殖情况, Th1、Th17 及 Treg 淋巴细胞亚群的比例; ELISA 检测炎症因子肿瘤坏死因子  $\alpha$  及干扰素  $\gamma$  水平。

**结果与结论:** ①直接接触共培养时, 人脐带间充质干细胞对植物血凝素刺激的外周血单个核细胞增殖呈显著的剂量依赖性抑制; 采用非接触培养体系, 外周血单个核细胞的增殖未受明显抑制; ②人脐带间充质干细胞共培养显著抑制炎症性淋巴细胞 Th1、Th17 亚群的比例, 升高抑制性淋巴细胞 Treg 的比例; ③人脐带间充质干细胞共培养显著抑制外周血单个核细胞的肿瘤坏死因子  $\alpha$  及干扰素  $\gamma$  分泌水平; ④结果显示, 人脐带间充质干细胞通过细胞间相互接触而对免疫细胞的增殖、分化及其炎症因子的产生发挥抑制性调节作用。

### 关键词:

人脐带间充质干细胞; 免疫调节; 免疫抑制; 炎症抑制; 淋巴细胞增殖; 淋巴细胞亚群

中图分类号: R459.9; R394.2; R593

### 基金资助:

武汉市第十一批 3551 光谷人才计划(武新管[2018]48 号), 项目参与人: 武栋成

## Immunomodulatory characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells *in vitro*

Liu Mengting<sup>1</sup>, Rao Wei<sup>1</sup>, Han Bing<sup>1</sup>, Xiao Cuihong<sup>1</sup>, Wu Dongcheng<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>R&D Center, Wuhan Hamilton Biotechnology Co., Ltd., Wuhan 430075, Hubei Province, China; <sup>2</sup>School of Basic Medical Science, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China)

刘梦婷, 女, 1991 年生, 湖北省荆门市人, 汉族, 2017 年武汉大学毕业, 硕士, 目前主要从事脐带间充质干细胞的有效性研究及新药开发。

通讯作者: 武栋成, 博士, 教授, 武汉汉密顿生物科技股份有限公司研发中心, 湖北省武汉市 430075; 武汉大学基础医学院, 湖北省武汉市 430071

文献标识码:A

来稿日期: 2019-04-15

送审日期: 2019-04-20

采用日期: 2019-06-27

在线日期: 2019-09-29



Liu Mengting, Master, R&D Center, Wuhan Hamilton Biotechnology Co., Ltd., Wuhan 430075, Hubei Province, China

Corresponding author: Wu Dongcheng, MD, Professor, R&D Center, Wuhan Hamilton Biotechnology Co., Ltd., Wuhan 430075, Hubei Province, China; School of Basic Medical Science, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) have been drawing a great attention due to their potential therapeutic effect in a variety of diseases, including immune-mediated diseases. Further characterization of the immunomodulatory properties and action pathways of hUC-MSCs is necessary to ensure their safety and effectiveness in clinical application.

**OBJECTIVE:** To investigate the immunomodulatory properties of hUC-MSCs.

**METHODS:** hUC-MSCs were directly co-cultured with CFSE-labeled peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) at the ratio of 1:5, 1:10, and 1:20, or indirectly co-cultured with CFSE-labeled PBMCs at the ratio of 1:5 via the Transwell co-culture system. Phytohemagglutinin-stimulated PBMC proliferation and the percentages of Th1, Th17 and Treg subgroups in the CD4<sup>+</sup> T cells were determined by flow cytometry. The levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interferon  $\gamma$  were determined by ELISA.

**RESULTS AND CONCLUSION:** After direct co-culture, hUC-MSCs significantly inhibited the phytohemagglutinin-stimulated PBMCs proliferation in a dose-dependent manner, whereas the inhibitory effect disappeared in the Transwell co-culture system. A significant decrease of Th1, Th17 cells and an increase of Treg cells were detected in the PBMCs co-cultured with hUC-MSCs compared to the PBMCs cultured alone. Furthermore, hUC-MSCs co-culture significantly reduced tumor necrosis factor  $\alpha$  and interferon  $\gamma$  levels in the PBMCs. These findings indicate that cell-to-cell contact is essential for hUC-MSCs to inhibit the proliferation, differentiation and inflammatory factor secretion of immune cells.

**Key words:** human umbilical cord mesenchymal stem cells; immunomodulation; immunosuppression; inflammatory suppression; lymphocyte proliferation; lymphocyte subsets

**Funding:** The 11<sup>th</sup> 3551 Optical Valley Talents Plan of Wuhan, No. WXG[2018]48 (to WDC [project participant])

## 0 引言 Introduction

间充质干细胞是一类具有自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞,是目前临床应用研究较多的一类干细胞<sup>[1-2]</sup>。间充质干细胞通过多向分化与旁分泌作用发挥组织再生与损伤保护作用,而间充质干细胞独特的免疫调节功能也是其临床应用的基础之一。既往的研究显示,间充质干细胞对自然杀伤细胞、树突状细胞以及B、T淋巴细胞等多种免疫细胞的活化、增殖与分化均有调节作用,并能提高调节性T(T regulatory, Treg)细胞的比例,维持体内免疫环境的稳定<sup>[3-4]</sup>。间充质干细胞的免疫调节特性已被应用于急性移植植物抗宿主病<sup>[5-6]</sup>、系统性红斑狼疮<sup>[7-8]</sup>、1型糖尿病<sup>[9-10]</sup>、类风湿性关节炎<sup>[11-12]</sup>、炎症性肠病等免疫异常和炎症相关疾病的临床研究<sup>[13-14]</sup>,初步结果显示了一定的有效性,但其最终治疗效果尚待进一步的研究确定。此外,间充质干细胞通过何种途径发挥免疫调节作用尚存在不同的研究结果与解释,倾向性意见是通过细胞接触和/或分泌多种调节因子,如转化生长因子 $\beta$ 、肝细胞生长因子、前列腺素E<sub>2</sub>、白细胞介素10、一氧化氮、吲哚胺2,3双加氧酶发挥调节作用<sup>[15]</sup>。

与其他组织(如骨髓、脂肪)来源的间充质干细胞相比较,人脐带间充质干细胞的免疫原性更低、扩增速率更快、分化潜能更强;尤其是人脐带间充质干细胞取材容易,无道德伦理争议,能够大量产业化扩增存储而被广泛关注<sup>[16]</sup>。该研究中,作者采用自主技术分离培养人脐带间充质干细胞,在完成全面的质量检测与生物学特性研究的基础上,通过与免疫细胞体外共培养,探讨其免疫调节功能及其可能的作用途径,为其临床应用奠定基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年6月至2019年2月在武汉汉密顿生物科技股份有限公司研发中心实验室完成。

1.3 材料 在武汉大学人民医院采集足月健康剖腹产新生儿脐带组织,由产妇自愿捐赠并签署知情同意书。采集

健康成人志愿者外周静脉血,已签署知情同意书。

**实验试剂与仪器:** 无血清间充质干细胞培养液(瑞士Lonza公司); RPMI1640培养液、胎牛血清、PBS(美国Gibco公司); Ficoll(美国GE Healthcare公司); CFSE、Th1/Th17检测试剂盒、Treg细胞检测试剂盒、Leukocyte Activation Cocktail(美国BD公司); 植物血凝素、丝裂霉素C、12孔及24孔细胞培养板、Transwell小室(0.3  $\mu$ m)(美国Corning公司); 人肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和干扰素 $\gamma$  ELISA检测试剂盒(碧云天生物技术研究所); 流式细胞仪(BD公司)。

### 1.4 方法

1.4.1 人脐带间充质干细胞的分离培养与鉴定 人脐带间充质干细胞按照武汉汉密顿生物科技股份有限公司专利技术(ZL201110261543.5)分离培养。简述如下,分离脐带华通氏胶,剪碎后收集于T175培养瓶,加入无血清间充质干细胞培养基,置37  $^{\circ}$ C,体积分数为5%CO<sub>2</sub>,饱和湿度培养至组织块周围爬出细胞。收集分离的脐带间充质干细胞,反复传代培养至第5代建立各种细胞库。脐带间充质干细胞的分离培养、表型及分化能力鉴定结果参见已发表的文献<sup>[17]</sup>。

### 脐带间充质干细胞的培养及鉴定

<b>细胞来源:</b>	人脐带组织
<b>原代培养方法:</b>	组织块贴壁法
<b>基础培养基:</b>	无血清干细胞专用培养基(Lonza 公司)
<b>添加材料:</b>	血清替代物(Life Science 公司)
<b>原代培养时间:</b>	从分离至培养到第 5 代共需要 20-30 d
<b>细胞传代:</b>	细胞融合至 80%-90%开始用胰酶消化传代,按 3-7 d 传 1 代,共传 5 代
<b>细胞鉴定:</b>	流式细胞仪检测人脐带间充质干细胞高表达 CD73、CD105、CD44、CD90(阳性率大于 95%),低表达 CD34、CD45、HLA-DR(阳性率小于 2%);同时进行成脂、成骨、成软骨诱导培养证实具有多向分化能力
<b>伦理学批准:</b>	该实验经过武汉大学人民医院临床伦理学委员会批准

**1.4.2 外周血单个核细胞的分离及CFSE标记** 取健康成人外周血50 mL, 采用Ficoll密度梯度离心法分离外周血单个核细胞, 重悬于含体积分数为10%胎牛血清的RPMI1640培养基中待用。细胞计数后, 以 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度重悬于PBS中, 并加入CFSE染液(终浓度为 $0.2 \mu\text{mol/L}$ ),  $37^\circ\text{C}$ 避光孵育2.0-3.0 min标记细胞; 用含体积分数为10%胎牛血清的RPMI1640培养液洗涤2次, 除去多余的染料。

**1.4.3 人脐带间充质干细胞对植物血凝素刺激外周血单个核细胞增殖的影响** 实验分为外周血单个核细胞单独培养组、植物血凝素刺激外周血单个核细胞增殖组、外周血单个核细胞+人脐带间充质干细胞共培养组。共培养组设置3个浓度梯度, 人脐带间充质干细胞和外周血单个核细胞的比值为1:5, 1:10, 1:20。将相应数量的人脐带间充质干细胞均匀接种于12孔或24孔板, 培养过夜, 待细胞完全贴壁后加入丝裂霉素C(终质量浓度为 $10 \text{ mg/L}$ ),  $37^\circ\text{C}$ , 体积分数为5%CO<sub>2</sub>条件下孵育20 min, 弃上清, PBS清洗2次, 每孔加入CFSE标记的外周血单个核细胞悬液1 mL(含 $1 \times 10^6$ 个细胞), 增殖组和共培养组加入植物血凝素(终质量浓度为 $10 \text{ mg/L}$ )和白细胞介素2(终浓度为 $200 \text{ IU/mL}$ ), 每组设置3个复孔; 置 $37^\circ\text{C}$ , 体积分数为5%CO<sub>2</sub>饱和湿度培养16-20 h, 离心弃上清, 更换新鲜培养液, 继续培养2 d。收集外周血单个核细胞, 流式细胞仪FITC通道检测分析各组外周血单个核细胞的增殖率。外周血单个核细胞单独培养组仅加入 $1 \times 10^6$ 个CFSE标记的外周血单个核细胞于12孔板, 培养3 d后流式细胞仪检测。

为研究人脐带间充质干细胞对植物血凝素刺激的外周血单个核细胞增殖的抑制作用是否依赖于细胞间直接接触, 实验将人脐带间充质干细胞( $2 \times 10^5$ /孔)接种于24孔板内, 将外周血单个核细胞( $1 \times 10^6$ /孔)接种于孔径为 $0.3 \mu\text{m}$ 的Transwell小室内。按上述同样条件处理3 d后, 流式细胞术检测外周血单个核细胞的增殖情况。

**1.4.4 人脐带间充质干细胞对淋巴细胞亚群的调节** 按前述方法将人脐带间充质干细胞均匀接种于24孔板培养过夜贴壁及丝裂霉素C处理, 以1:10的比例加入外周血单个核细胞(数量 $1 \times 10^6$ )共培养, 以外周血单个核细胞单独培养组为对照, 每组设置3个复孔。培养48 h后, 每孔添加 $2 \mu\text{L}$ 的Leukocyte Activation Cocktail With BD GolgiPlug, 继续培养5 h。收集外周血单个核细胞, 按照Th1/Th17检测试剂盒操作步骤处理细胞后进行流式检测。

按前述方法将人脐带间充质干细胞均匀接种于24孔板培养过夜贴壁及丝裂霉素C处理, 以1:10的比例加入外周血单个核细胞(数量 $1 \times 10^6$ )共培养, 以外周血单个核细胞单独培养组为对照, 每组设置3个复孔。培养48 h后, 每添加白细胞介素2(终浓度 $200 \text{ IU/mL}$ )后培养5 d。收集外周血单个核细胞, 按照Treg细胞检测试剂盒操作步骤处理细胞后进行流式检测。

**1.4.5 外周血单个核细胞分泌的炎症因子水平** 实验分为外周血单个核细胞单独培养组和共培养组(人脐带间充质干细胞:外周血单个核细胞=1:10), 每组设置3个复孔。将 $1 \times 10^6$ 个人脐带间充质干细胞均匀接种于24孔板培养过夜贴壁及丝裂霉素C处理后, 每孔加入1 mL外周血单个核细胞悬液(数量 $1 \times 10^6$ )、植物血凝素(终质量浓度为 $5 \text{ mg/L}$ )及白细胞介素2(终浓度 $200 \text{ IU/mL}$ ), 共培养5 d。收集上清, 按照ELISA试剂盒说明书检测肿瘤坏死因子 $\alpha$ 及干扰素 $\gamma$ 水平。

**1.5 主要观察指标** ①外周血单个核细胞的增殖情况; ②Th1/Th17/Treg细胞的比例; ③肿瘤坏死因子 $\alpha$ 及干扰素 $\gamma$ 水平。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析, 独立样本间比较采用 $t$ 检验, 组间比较采用单因素方差分析, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 人脐带间充质干细胞抑制植物血凝素刺激的外周血单个核细胞增殖** 为检测人脐带间充质干细胞对外周血淋巴细胞增殖的调节作用, 将CFSE标记的外周血单个核细胞与人脐带间充质干细胞按不同比例共培养3 d, 流式细胞术检测外周血单个核细胞增殖情况。结果显示, 与植物血凝素刺激的外周血单个核细胞阳性对照组相比, 当人脐带间充质干细胞与外周血单个核细胞以1:5, 1:10, 1:20的比例共培养时, 分别有45%、71%和83%的外周血单个核细胞发生了增殖, 见图1。以上结果提示, 人脐带间充质干细胞能够显著抑制植物血凝素刺激外周血单个核细胞的增殖( $P < 0.05$ 或 $P < 0.001$ ); 且呈剂量依赖性。

**2.2 人脐带间充质干细胞对外周血单个核细胞增殖的抑制作用依赖于细胞间接触** 采用Transwell系统对人脐带间充质干细胞与外周血单个核细胞进行非接触共培养, 并与直接接触的共培养比较, 以确定细胞间直接接触是否为人脐带间充质干细胞抑制淋巴细胞增殖的必要条件。结果显示, 与植物血凝素刺激的外周血单个核细胞阳性对照组相比, 人脐带间充质干细胞对直接接触共培养组外周血单个核细胞增殖有非常显著性抑制作用( $P < 0.001$ ), 而对Transwell非接触共培养组外周血单个核细胞的增殖则无显著性抑制作用( $P > 0.05$ ), 见图2。这一结果提示人脐带间充质干细胞对外周血单个核细胞增殖的抑制作用依赖于细胞间接触。

**2.3 人脐带间充质干细胞抑制Th1、Th17淋巴细胞亚群的分化** 将人脐带间充质干细胞和外周血单个核细胞以1:10的比例共培养2 d, 流式细胞术检测CD4<sup>+</sup>辅助性T淋巴细胞中Th1(CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>)和Th17(CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>)的比例。与外周血单个核细胞单独培养对照组相比, 人脐带间充质干细胞共培养组Th1和Th17细胞比例均显著降低( $P < 0.01$ 或

$P < 0.05$ ), 见图3。结果提示人脐带间充质干细胞抑制T淋巴细胞亚群Th1和Th17的比例。

**2.4 人脐带间充质干细胞促进Treg细胞的分化** Treg细胞亚群是具有免疫抑制功能的调节性T细胞。白细胞介素2条件下, 人脐带间充质干细胞和外周血单个核细胞以1:10的比例共培养5 d后, 流式细胞术检测Treg细胞比例。与外周血单个核细胞单独培养组比较, 共培养组Treg细胞比例显著上升( $P < 0.05$ ), 见图4。结果提示, 人脐带间充质干细胞能提高免疫抑制性T淋巴细胞亚群Treg的比例。

**2.5 人脐带间充质干细胞抑制外周血单个核细胞的炎症因子分泌** 人脐带间充质干细胞和外周血单个核细胞以1:10的比例共培养5 d后, ELISA检测细胞上清中炎症因子水平。与外周血单个核细胞单独培养组相比, 外周血单个核细胞与人脐带间充质干细胞共培养组上清液中的肿瘤坏死因子 $\alpha$ 及干扰素 $\gamma$ 水平显著性降低( $P < 0.01$ ), 见图5。结果提示, 人脐带间充质干细胞能够抑制炎症因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ 及干扰素 $\gamma$ 分泌。

### 3 讨论 Discussion

实验通过人脐带间充质干细胞和外周血单个核细胞体外共培养, 系统地研究了人脐带间充质干细胞对淋巴细胞增殖、T淋巴细胞特殊亚群及炎症因子分泌的免疫调节作用, 并对其可能的作用途径进行了初步探讨。结果显示, 人脐带间充质干细胞能够显著性抑制植物血凝素刺激的人外周血淋巴细胞的增殖, 下调T淋巴细胞Th1、Th17亚群而上调免疫抑制性Treg细胞的比例, 抑制炎症因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ 及干扰素 $\gamma$ 的分泌。人脐带间充质干细胞对淋巴细胞增殖抑制可能依赖于细胞间直接接触。

既往研究表明, 间充质干细胞对外周血单个核细胞增殖的抑制效应与淋巴细胞激活的方式无关, 在混合淋巴细胞培养体系<sup>[15]</sup>, 或植物血凝素或CD3/CD28抗体等不同的刺激条件下<sup>[18-19]</sup>, 人脐带间充质干细胞均可抑制外周血单个核细胞的增殖。该研究结果也证实, 人脐带间充质干细胞对植物血凝素刺激的外周血单个核细胞增殖具有显著抑制作用, 且人脐带间充质干细胞比例越高, 对淋巴细胞增殖的抑制越明显, 呈剂量依赖性。文献报道, 脐血间充质干细胞对植物血凝素刺激的淋巴细胞增殖的抑制作用达80%<sup>[20]</sup>, 而骨髓间充质干细胞对植物血凝素刺激的淋巴细胞增殖的抑制作用为60%<sup>[21]</sup>。该研究中人脐带间充质干细胞对植物血凝素刺激的淋巴细胞的增殖的抑制率为55%, 抑制效果的不同可能与间充质干细胞的来源与分离方法、淋巴细胞刺激剂的类型、浓度和时间有关。

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。然而, 间充质干细胞和T细胞的直接接触对T细胞增殖的抑制作用是否有关, 仍然存在争议<sup>[19, 22]</sup>。这些分歧可能与间充

质干细胞的来源、淋巴效应细胞的种类、刺激方式及培养条件的差异有关。该研究采用Transwell系统对人脐带间充质干细胞和外周血单个核细胞进行非接触共培养, 与直接接触培养相比, 人脐带间充质干细胞未能显著抑制植物血凝素刺激的外周血单个核细胞增殖, 初步推测细胞与细胞的直接接触是人脐带间充质干细胞抑制外周血单个核细胞增殖的必要条件之一。有研究认为, 激活淋巴细胞分泌的促炎因子干扰素 $\gamma$ 可诱导间充质干细胞表面分子PD-L1的表达, 与淋巴细胞表面分子PD-1相互作用, 介导间充质干细胞对淋巴细胞的增殖抑制作用<sup>[23]</sup>。

T淋巴细胞占人外周血单个核细胞的55%-84%, 在免疫相关疾病的发病与进展中发挥重要作用。根据T细胞所处的微环境不同, 初始CD4<sup>+</sup>T细胞接受抗原刺激后可以分化为不同的效应Th细胞, 如Th1、Th2、Th17及Treg细胞。有研究报道间充质干细胞调节Th1、Th17及Treg细胞比例平衡, 促进抗炎性免疫应答是其治疗异常免疫疾病的重要机制<sup>[24-26]</sup>。该研究显示, 人脐带间充质干细胞能够显著性降低CD4<sup>+</sup>细胞中促炎性免疫细胞Th1、Th17亚群的比例, 升高免疫抑制性Treg细胞亚群的比例, 并降低免疫细胞促炎因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ 及干扰素 $\gamma$ 的产生, 这与GHANNAM等<sup>[27]</sup>的研究结论一致。给予系统性红斑狼疮模型鼠骨髓来源间充质干细胞治疗, 能显著降低异常活性的Th17细胞的比例而升高免疫抑制性Treg细胞的比例, 减轻肾功能损伤, 改善免疫紊乱<sup>[28]</sup>。给予免疫肠炎模型鼠人脐带间充质干细胞治疗能够升高脾和淋巴结Treg/Th17比例<sup>[29]</sup>。下一步, 在动物模型上验证人脐带间充质干细胞的免疫调节功能。

综上所述, 人脐带间充质干细胞具有抑制淋巴细胞增殖, 抑制促炎性T细胞亚群并提升免疫抑制性T细胞亚群, 以及降低免疫细胞炎症因子分泌的免疫调节作用, 这一作用依赖于与免疫细胞的直接接触。该研究为临床应用人脐带间充质干细胞治疗免疫炎症性疾病的有效性提供了依据。对于人脐带间充质干细胞免疫调节的作用机制有待后续细胞与相关动物实验进一步深入研究。

**作者贡献:** 实验设计为刘梦婷和韩兵, 实验实施、资料收集为刘梦婷, 实验评估为韩兵和武栋成, 文章校准为饶巍, 间充质干细胞培养方法由肖翠红创建。

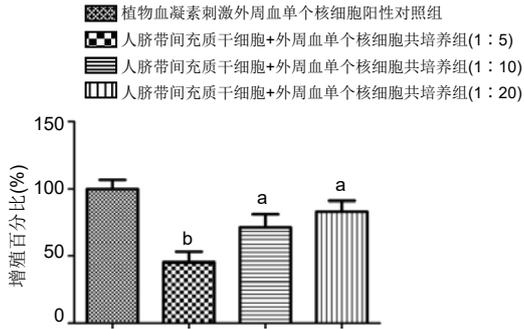
**经费支持:** 该文章接受了“武汉市第十一批3551光谷人才计划(武新管[2018]48号)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 该研究的实施符合武汉大学人民医院的相关伦理要求(伦理批件号: WDRY2017-Q014)。

**知情同意问题:** 实验所用脐带标本来源于健康产妇, 并签订知情同意书, 由武汉大学人民医院产科收集。外周静脉血来源于健康自愿者, 并签订知情同意书, 由武汉大学人民医院检验科收集。

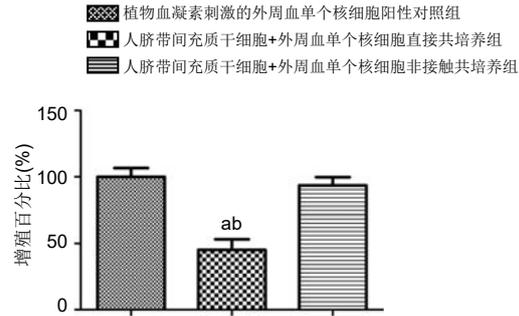
**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。



图注: 与植物血凝素刺激的外周血单个核细胞阳性对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.001$

图 1 人脐带间充质干细胞呈剂量依赖性抑制植物血凝素诱导的外周血单个核细胞增殖

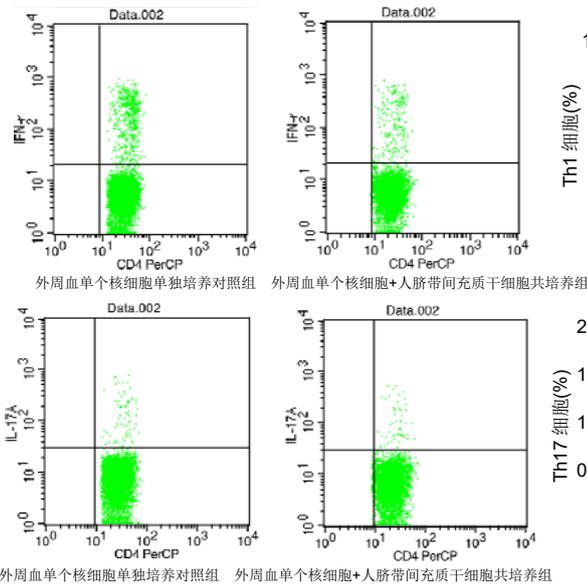
Figure 1 Human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit the phytohemagglutinin-stimulated proliferation of peripheral blood mononuclear cells in a dose-dependent manner



图注: 与植物血凝素刺激的外周血单个核细胞阳性对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.001$ ; 与 Transwell 非接触共培养组相比, <sup>b</sup> $P < 0.001$

图 2 细胞间直接接触是人脐带间充质干细胞抑制外周血单个核细胞增殖的基本条件

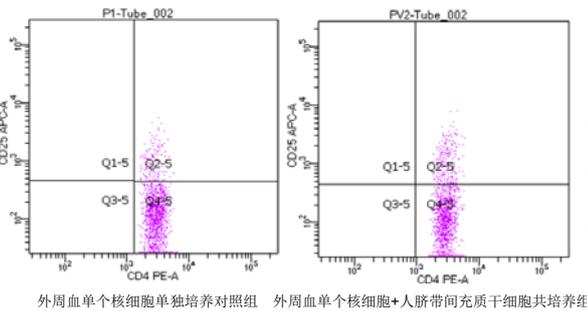
Figure 2 Cell-to-cell contact is essential for the inhibitory effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells on the proliferation of peripheral blood mononuclear cells



图注: 与外周血单个核细胞单独培养组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 3 人脐带间充质干细胞抑制 Th1 和 Th17 淋巴细胞亚群的分化

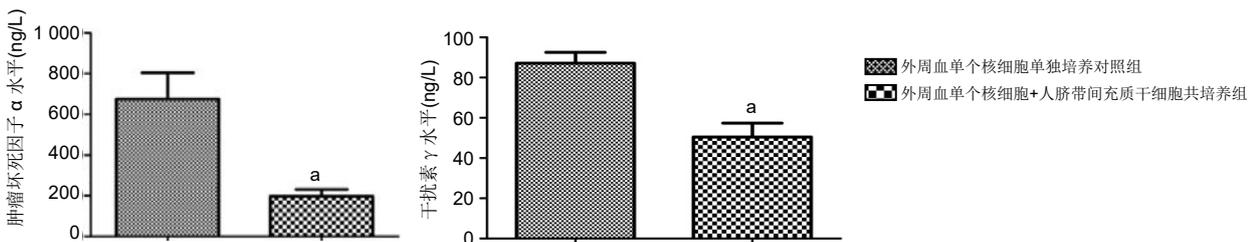
Figure 3 Human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of Th1 and Th17 subsets of T cells



图注: 与外周血单个核细胞单独培养组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$

图 4 人脐带间充质干细胞对调节性 Treg 细胞的促进作用

Figure 4 Human umbilical cord mesenchymal stem cells promote the differentiation of Treg cells



图注: 与外周血单个核细胞单独培养组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$

图 5 人脐带间充质干细胞抑制外周血单个核细胞分泌炎症因子肿瘤坏死因子 α 及干扰素 γ

Figure 5 Human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit the secretion of inflammatory factors, tumor necrosis factor α, and interferon γ from peripheral blood mononuclear cells

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过武汉大学生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

[1] PHINNEY DG, PROCKOP DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*. 2007; 25(11):2896-2902.

[2] EL OMAR R, BEROUD J, STOLTZ JF, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014;20(5):523-544.

[3] AGGARWAL S, PITTENGER MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-1822.

[4] UCCELLI A, DE ROSBO NK. The immunomodulatory function of mesenchymal stem cells: mode of action and pathways. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1351:114-126.

[5] NASSEREDDINE S, RAFEI H, ELBAHESH E, et al. Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review. *Anticancer Res*. 2017;37(4):1547-1555.

[6] BERNARDO ME, LOCATELLI F. Mesenchymal Stromal Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Methods Mol Biol*. 2016;1416:3-20.

[7] FATHOLLAHI A, GABALOU NB, ASLANI S. Mesenchymal stem cell transplantation in systemic lupus erythematosus, a mesenchymal stem cell disorder. *Lupus*. 2018;27(7): 1053-1064.

[8] CHEN C, LIANG J, YAO G, et al. Mesenchymal stem cells upregulate Treg cells via sHLA-G in SLE patients. *Int Immunopharmacol*. 2017;44:234-241.

[9] HU J, YU X, WANG Z, et al. Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from the umbilical cord for newly-onset type 1 diabetes mellitus. *Endocr J*. 2013;60(3):347-357.

[10] MOREIRA A, KAHLENBERG S, HORNSBY P. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for diabetes. *J Mol Endocrinol*. 2017;59(3):R109-R120.

[11] WANG L, WANG L, CONG X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: safety and efficacy. *Stem Cells Dev*. 2013;22(24):3192-3202.

[12] ANSBORO S, ROELOFS AJ, DE BARI C. Mesenchymal stem cells for the management of rheumatoid arthritis: immune modulation, repair or both. *Curr Opin Rheumatol*. 2017;29(2): 201-207.

[13] LIEW A, O'BRIEN T, EGAN L. Mesenchymal stromal cell therapy for Crohn's disease. *Dig Dis*. 2017;35(1-2):115-122.

[14] ZHANG XM, ZHANG YJ, WANG W, et al. Mesenchymal Stem Cells to Treat Crohn's Disease with Fistula. *Hum Gene Ther*. 2017;28(7):534-540.

[15] CHAE HK, SONG WJ, AHN JO, et al. Immunomodulatory effects of soluble factors secreted by feline adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2017;191:22-29.

[16] WANG Q, YANG Q, WANG Z, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Wharton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy. *Hum Vaccin Immunother*. 2016; 12(1):85-96.

[17] 张权, 张亚奇, 饶巍. 长期传代培养对人脐带间充质干细胞生物学特性的影响[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(1):42-52.

[18] POLTAVTSEV AM, POLTAVTSEVA RA, YUSHINA MN, et al. Proliferation of Peripheral Blood Lymphocytes and Mesenchymal Stromal Cells Derived from Wharton's Jelly in Mixed and Membrane-Separated Cultures. *Bull Exp Biol Med*. 2017;163(4):542-549.

[19] TSE WT, PENDLETON JD, BEYER WM, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003; 75(3):389-397.

[20] 徐志娟, 盛立霞, 欧阳桂芳. 脐血间充质干细胞抑制外周淋巴细胞增殖的作用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(9):968-971.

[21] RASMUSSEN I, RINGDÉN O, SUNDBERG B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res*. 2005;305(1):33-41.

[22] ALIKARAMI F, YARI F, AMIRIZADEH N, et al. The Immunosuppressive Activity of Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells on T Lymphocytes. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2015;7(3):90-96.

[23] 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. *Cell Res*. 2008;18(8): 846-857.

[24] YANG H, SUN J, LI Y, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells suppress proliferation of PHA-activated lymphocytes in vitro by inducing CD4(+) CD25(high)CD45RA(+) regulatory T cell production and modulating cytokine secretion. *Cell Immunol*. 2016;302: 26-31.

[25] PIANTA S, BONASSI SIGNORONI P, MURADORE I, et al. Amniotic membrane mesenchymal cells-derived factors skew T cell polarization toward Treg and downregulate Th1 and Th17 cells subsets. *Stem Cell Rev*. 2015;11(3):394-407.

[26] WANG D, HUANG S, YUAN X, et al. The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(5): 423-431.

[27] GHANNAM S, PÈNE J, MOQUET-TORCY G, et al. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol*. 2010;185(1):302-312.

[28] SUN L, AKIYAMA K, ZHANG H, et al. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells*. 2009; 27(6):1421-1432.

[29] LI L, LIU S, XU Y, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells downregulate inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in experimental colitis. *Pharmacology*. 2013;92(5-6):257-264.