

人脐血间充质干细胞对T淋巴细胞旁分泌的免疫调节作用**☆

徐丽南¹, 姚志成², 林楠², 胡昆鹏², 钟跃思²

Immunoregulatory effect of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells on proliferation of T lymphocytes through paracrine mechanism

Xu Li-nan¹, Yao Zhi-cheng², Lin Nan², Hu Kun-peng², Zhong Yue-si²

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that umbilical cord blood mesenchymal stem cells (UCB-MSCs) have a certain role in immune regulation, but the exact mechanism is unknown.

OBJECTIVE: To study the effect of UCB-MSCs on T lymphocytes by paracrine mechanism.

METHODS: We isolated the UCB-MSCs and T lymphocytes from the umbilical cord blood and peripheral blood. Indirect coculture system of UCB-MSCs and T lymphocytes with different proportion was constructed. The group of coculture acted as experiment group, the group of monoculture T lymphocytes as control group.

RESULTS AND CONCLUSION: UCB-MSCs presented a shuffle-type growth which liked the fibroblast in morphology; the flow cytometry showed the results of cellular surface marks: CD29(+), CD44(+), CD34(-), CD45(-), HLA-DR(-). Compared with the control group, the experiment group could dramatically inhibit the proliferation of peripheral blood T lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin in a dose-dependent manner ($P < 0.05$); the concentration of interleukin-10 secreted by UCB-MSCs was significantly higher in the experiment group than the control group ($P < 0.05$). The ability of UCB-MSCs to inhibit the proliferation of T lymphocytes was sharply impaired by neutralization experiments. UCB-MSCs can dramatically inhibit the proliferation of peripheral blood T lymphocytes, which may depend on paracrine interleukin-10 to play an immunoregulatory role.

Xu LN, Yao ZC, Lin N, Hu KP, Zhong YS. Immunoregulatory effect of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells on proliferation of T lymphocytes through paracrine mechanism. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(40): 7463-7466. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 相关研究表明脐血间充质干细胞具有一定的免疫调节作用, 但具体机制不详。

目的: 观察脐血间充质干细胞通过旁分泌机制对T淋巴细胞增殖的影响。

方法: 分离正常分娩产妇脐血间充质干细胞和健康志愿者外周血T淋巴细胞, 按不同比例建立脐血间充质干细胞与T淋巴细胞非接触共培养体系, 以单独培养T淋巴细胞作为对照组。

结果与结论: 脐血间充质干细胞形态学呈现成纤维梭型细胞样, 呈旋涡状团集生长。流式细胞仪检测脐血间充质干细胞表面标记物: CD29(+), CD44(+), CD34(-), CD45(-), HLA-DR(-); 与对照组相比, 共培养组可明显抑制植物血凝素刺激T淋巴细胞的增殖作用($P < 0.05$), 且呈剂量依赖性; ELISA法检测共培养组分泌的白细胞介素10水平较对照组明显升高($P < 0.05$); 中和试验后脐血间充质干细胞对T淋巴细胞增殖的抑制作用明显减弱。结果说明脐血间充质干细胞可明显抑制异体外周血T淋巴细胞的增殖, 可能是通过旁分泌白细胞介素10达到负向免疫调节作用。

关键词: 免疫调节; 脐血间充质干细胞; T淋巴细胞; 旁分泌; 白细胞介素10

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.40.013

徐丽南, 姚志成, 林楠, 胡昆鹏, 钟跃思. 人脐血间充质干细胞对T淋巴细胞旁分泌的免疫调节作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(40):7463-7466. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; Department of Hepatobiliary Surgery, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Xu Li-nan☆, Doctor, Attending physician, Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China drxulinan@gmail.com

Supported by: the National Natural Science Foundation for the Youth, No. 81000674*; the Science and Technology Plan Program of Guangdong Province, No. 2010B031600313*

Received: 2011-07-27
Accepted: 2011-09-07

制对T淋巴细胞增殖的影响。

0 引言

作为目前干细胞领域的研究热点之一, 间充质干细胞是来源于中胚层的一类多能干细胞, 其属于成体干细胞概念范畴。间充质干细胞不但具有干细胞自我更新能力, 还具有向内、中、外各个胚层细胞的分化潜能。越来越多的研究还发现间充质干细胞具有明显的调节同种异体免疫的作用^[1], 依赖此特性使得其在临床上治疗由免疫反应引起的疾病具有重大的研究意义。但是目前脐血间充质干细胞到底是通过什么途径达到免疫调节作用的研究还较少, 因此本实验拟观察脐血间充质干细胞通过旁分泌机

1 材料和方法

设计: 体外细胞实验。

时间及地点: 实验于2010-05/12在中山大学附属第一医院中心实验室与中山大学附属第三医院中心实验室完成。

材料:

脐血和外周血标本: 足月正常分娩产妇脐血及健康志愿者外周血分别来源于中山大学附属第一医院产科、中山大学附属第三医院产科。孕妇无肝炎、艾滋病、梅毒等, 胎儿无畸形。该研究获得医院医学伦理委员会批准。

¹ 中山大学附属第一医院妇产科, 广东省广州市 510080; ² 中山大学附属第三医院肝胆外科, 广东省广州市 510630

徐丽南, 女, 1977年生, 河南省安阳市人, 汉族, 2011年中山大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事围产医学的临床与基础研究。drxulinan@gmail.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2011)40-07463-04

收稿日期: 2011-07-27
修回日期: 2011-09-07
(20110727009/M·W)

主要试剂及实验仪器:

主要试剂及实验仪器	来源
细胞培养瓶, 6孔、24孔培养板, Transwell 培养板	美国 Corning 公司
Dulbecco Modified Eagle Media (DMEM)	美国 Gibco 公司
Percoll 分离液	美国 Pharmacia 公司
胎牛血清	美国 Hyclone 公司
721 分光光度计	上海第三分析仪器厂
倒置显微镜	日本尼康公司
Forma 3110 CO ₂ 恒温培养箱	美国 Thermo 公司
台式高速冷冻离心机	美国 Beckman 公司
流式细胞仪	美国 BD FACS Calibur 公司
恒温恒压电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
超净工作台	苏州净化设备公司
Human IL-10 ELISA 试剂盒	美国 R&D 公司
Anti-human IL-10	美国 Sigma-Aldrich 公司

方法:

脐血间充质干细胞分离、培养及免疫表型鉴定: 取健康足月顺产胎儿脐血标本30 mL(样品在采集12 h内分送), 分成6份, 每份5 mL, 移入含相同体积Percoll淋巴细胞分离液的离心管中, 2 000 r/min离心20 min, 吸取白色界面单个核细胞层, PBS冲洗3次, 在含体积分数为10%胎牛血清的低糖DMEM培养液中接种脐血单个核细胞, 其终浓度为 $1.0 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 。将细胞悬液置于37 °C、体积分数为5% CO₂温箱中培养。48 h后换液, 弃未贴壁细胞, 以后约每3 d半量换液1次。当贴壁细胞达80%~90%融合后, 0.25%胰蛋白酶消化, 按 $2.0 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度进行传代培养。

取第4代间充质干细胞, 0.25%胰酶和1 mmol/L EDTA液消化收获细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 与抗CD13, CD44, CD71, CD166, CD34, CD45抗体室温反应30 min。磷酸盐缓冲液洗涤2次后与荧光标记的二抗避光反应15 min。细胞洗涤后重悬于磷酸盐缓冲液中, 采用流式细胞仪检测细胞表面抗原的表达。

外周血T淋巴细胞的分离、纯化与激活: 取健康供者肝素抗凝外周血20 mL, 利用 $(1.077 \pm 0.001) \text{ g/mL}$ 的Ficoll-Hypaque淋巴细胞分离液, 密度梯度法分离单个核细胞, 磷酸盐缓冲液洗涤2次。计数后以含体积分数为20%胎牛血清的RPMI1640培养基重悬细胞, 浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$; 将细胞悬液加入尼龙棉柱内, 37 °C孵育1 h。用预温至37 °C的培养基冲出非黏附细胞即为T淋巴细胞, 后加入10 mg/L植物血凝素激活外周血T细胞并检测计数备用。

脐血间充质干细胞/T淋巴细胞共培养体系的建立: 将脐血间充质干细胞和T淋巴细胞按不同比例($10^5 \text{ cell/well} : 10^5 \text{ cell/well} : 5 \times 10^5 \text{ cell/well} : 10^5 \text{ cell/well} : 10^6 \text{ cell/well} : 10^5 \text{ cell/well}$)种入Transwell板(孔径0.4 μm)内建立非接触共培养体系, 脐血间充质干细胞种入Transwell小室, T淋巴细胞种入6孔板培养皿作为培养体系下层; 对照组为T淋巴细胞单独培养。

BrdU法检测脐血间充质干细胞对T淋巴细胞增殖的影响: 利用BrdU检测T淋巴细胞的增殖情况, 将10 μmol/L BrdU标记液加入不同比例的共培养组 and 对照组细胞培养液内, 孵育24 h后, 胰酶消化收集细胞, 体积分数为70%乙醇室温固定细胞45 min, 再将细胞加入4 mol/L HCl和含体积分数为10%胎牛血清的PBS中孵育15 min, 荧光抗体孵育, 流式细胞仪检测细胞增殖状况。每组实验均设3复孔。

不同比例共培养体系中T淋巴细胞上清液中白细胞介素10水平检测: 收集共培养24 h后的T淋巴细胞培养液上清, 对照组为单独培养的T淋巴细胞培养液上清, 按ELISA试剂盒说明书(美国R&D公司)方法检测白细胞介素10水平。

中和试验: 在共培养体系中加入不同浓度的Anti-human IL-10(0~1 000 μg/L), 观察并检测添加前后T淋巴细胞增殖情况。

统计学分析: 由第二作者采用SPSS 11.3统计软件对结果进行t 检验分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

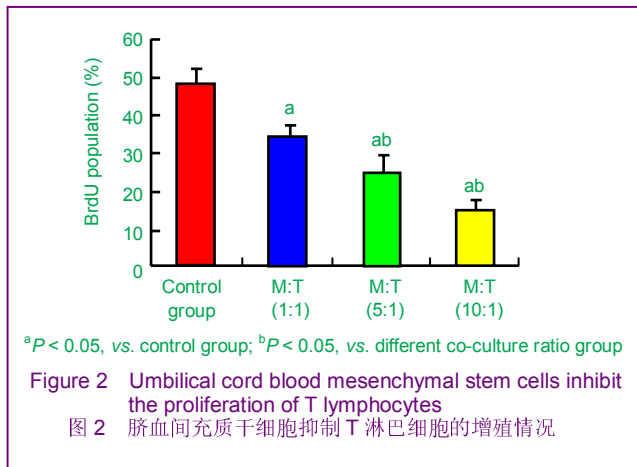
2.1 脐血间充质干细胞形态学特征 脐血间充质干细胞待扩增至第3代后呈现明显成纤维样梭形细胞, 单核并较长的突起, 贴壁生长, 呈簇状、旋涡状团集生长, 较好状态的间充质干细胞在倒置显微镜下表现强的折光性, 见图1。



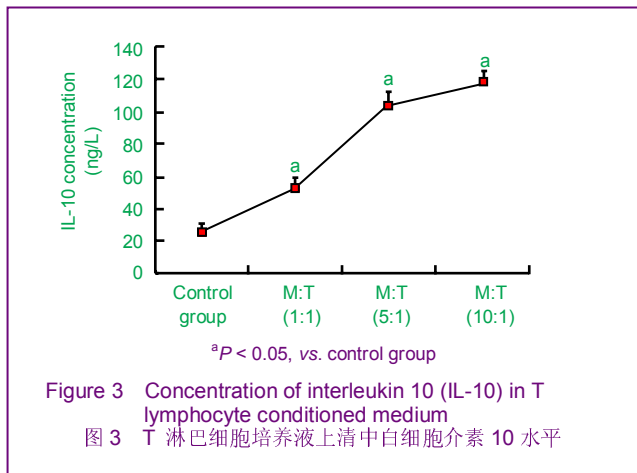
Figure 1 Morphological characteristics of passage 3 umbilical cord blood mesenchymal stem cells (×5)
图1 第3代脐血间充质干细胞形态学特征(×5)

2.2 脐血间充质干细胞的表面抗原表达 取第3代细胞上流式细胞仪检测, 结果提示绝大部分细胞表达CD29, CD44; 而不表达CD34, CD45, HLA-DR(具体结果未给出)。

2.3 脐血间充质干细胞对异体T淋巴细胞增殖的抑制作用 倒置显微镜下观察, 对照组植物凝集素刺激下T淋巴细胞呈集落样增殖, 而共培养组下层的T淋巴细胞集落样增殖较对照组明显减少。BrdU法检测T淋巴细胞增殖情况提示共培养组植物凝集素刺激的T淋巴细胞增殖明显受到抑制($P < 0.05$); 并且T淋巴细胞的增殖在不同比例的共培养组之间也有显著性意义($P < 0.05$), 见图2。

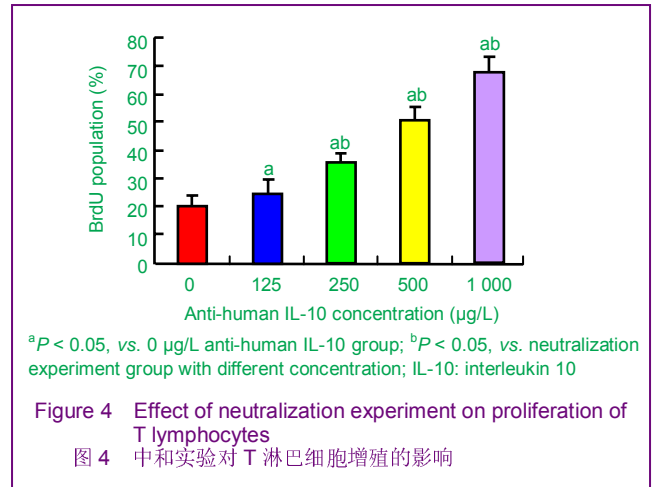


2.4 脐血间充质干细胞上清液中白细胞介素10水平与对照组相比, 共培养组内T淋巴细胞上清液中白细胞介素10水平明显升高($P < 0.05$); 不同比例的共培养体系中T淋巴细胞上清液中白细胞介素10水平也不同, 脐血间充质干细胞量越多, 白细胞介素10水平则越高, 说明白细胞介素10来源于脐血间充质干细胞的分泌, 见图3。



2.5 中和实验后脐血间充质干细胞对T淋巴细胞增殖的抑制作用减弱 在相同共培养体系中(M:T=5:1)加入Anti-human IL-10后, 脐血间充质干细胞对T淋巴细胞增殖的抑制作用明显减弱($P < 0.05$); 且随着

Anti-human IL-10剂量的增大而伴随T淋巴细胞增殖行为的增强($P < 0.05$); 说明脐血间充质干细胞可能是通过旁分泌IL-10来调控T淋巴细胞的增殖, 见图4。



3 讨论

间充质干细胞来源广泛, 如骨髓、子宫内膜、脐带、脐血、羊水、脂肪组织等^[2], 最新的研究表明月经血中也可以是间充质干细胞的来源之一^[3]; 同时相关实验也证明在适宜条件下间充质干细胞可分化为骨细胞、心肌细胞、皮肤细胞、肝细胞、肾、脊髓, 神经细胞等多种组织及细胞从而参与相关组织损伤修复^[4-6]。

与骨髓来源一样, 脐血中也存在着大量的间充质干细胞。并且由于其来源的相对纯净性, 提取过程中更不易受病毒、细菌污染等相关特点, 比骨髓来源的间充质干细胞具有更良好的临床应用前景^[7]。目前间充质干细胞没有明确的标记物^[8], 然而脐血来源的间充质干细胞与其他来源的间充质干细胞一样, 表达目前公认的几个特征性的细胞表面标记物, 例如CD29、CD44、CD73(SH3和SH4)、CD90(Thy-1)、CD105(内皮因子)、CD106(血管细胞黏附因子1)、CD117、CD166、STRO-1和Sca-1等基质细胞和间充质细胞的表面标志^[9-13]; 而不表达造血干细胞和内皮细胞系列的表面标志CD11b、CD14、CD31、CD33、CD34、CD133和CD45^[14]; 早有相关实验证明间充质干细胞具有明显低免疫原性^[15], 作为引起免疫反应的主要抗原HLA-DR, MSCs不表达这种人类主要白细胞相关抗原2(MHC-II型抗原), 而只是中量表达HLA-ABC, 以免受NK细胞的杀灭^[16], 同时也不表达B7-1、B7-2、CD40/CD40L等共刺激分子, 由于缺乏此类分子从而导致效应性T细胞无法激活, 而表现出明显的耐受原性和低免疫原性。本实验在提取、培养脐血间充质干细胞后并对其进行表型鉴定后证实这些细胞表达CD29, CD44; 而不表达CD34, CD45, HLA-DR, 说明用于实验的细胞具有骨髓来源间充质干细胞一样

的低免疫原性和相关细胞表面标记。

间充质干细胞不但具有明显的干细胞能力, 还具有明显的免疫调节作用。Ramasamy等^[17]的实验证明间充质干细胞可以明显抑制T细胞的增殖, 而且这种增殖的程度随着间充质干细胞剂量的增多而增大, 而T细胞活性方面CD25和CD69的表达却不变, 提示这种免疫调节作用主要是通过抑制T细胞增殖达到的; Jeong等^[18]的研究则从机制上证实了这一点, 他们发现间充质干细胞可以有效抑制细胞周期蛋白CyclinD1、CyclinE、CyclinA、CyclinB的表达以及cdk2和cdk4的活化, 从而促使T细胞停留在G0/G1期, 抑制T细胞的克隆扩增, 达到免疫调节的作用。相关研究也发现间充质干细胞在 γ -干扰素诱导下大量表达吲哚胺2, 3双加氧酶(IDO), 通过IDO降解T细胞内色氨酸的作用而达到抑制T细胞增生, 特异性抑制IDO活性后又可以明显抑制间充质干细胞对T淋巴细胞的增生抑制作用^[19-20]。

脐带来源的间充质干细胞也有明显的免疫调节作用, 刘奎利等^[21]发现在给予异位心脏移植模型大鼠内注入脐带间充质干细胞后, 可以明显减少免疫排斥反应, 减少淋巴细胞及炎症细胞的浸润, 从而延长了生存时间; 而陶艳玲等^[22]的实验及白海等^[23]的实验均证明体外条件下将脐血间充质干细胞直接加入有植物血凝素刺激后的T细胞内, 可以明显抑制T细胞的增殖行为。本实验将脐血间充质干细胞与植物血凝素刺激后的T细胞建立非接触的共培养体系, 结果发现脐血间充质干细胞可以有效抑制外周血T细胞的增殖, 证明脐血间充质干细胞可通过旁分泌机制调控T细胞增殖行为, ELISA结果证实与对照组相比, 共培养组的白细胞介素10水平明显升高, 而在给予中和试验后, 脐血间充质干细胞的这种抑制增殖作用则显著降低, 提示其旁分泌机制很可能是通过白细胞介素10的影响达到的, 但是更深入和更完整的机制研究还需要进一步的实验来证实。

4 参考文献

[1] Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, et al. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363(2): 247-252.

[2] Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20(1):5-14.

[3] Allickson JG, Sanchez A, Yefimenko N, et al. Recent Studies Assessing the Proliferative Capability of a Novel Adult Stem Cell Identified in Menstrual Blood. *Open Stem Cell J.* 2011; 3(2011): 4-10.

[4] Okumoto K, Saito T, Hattori E, et al. Differentiation of rat bone marrow cells cultured on artificial basement membrane containing extracellular matrix into a liver cell lineage. *J Hepatol.* 2005;43(1): 110-116.

[5] Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med.* 2006;12(4):459-465.

[6] Mori L, Bellini A, Stacey MA, et al. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp Cell Res.* 2005;304(1):81-90.

[7] Han ZC. Umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSC: biology, banking and clinical applications). *Bull Acad Natl Med.* 2009;193(3):545-547.

[8] Shibata N, Watanabe T, Okitsu T, et al. Establishment of an immortalized human hepatic stellate cell line to develop antifibrotic therapies. *Cell Transplant.* 2003;12(5):499-507.

[9] Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem.* 2003;89(6):1235-1249.

[10] Boiret N, Rapatel C, Veyrat-Masson R, et al. Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. *Exp Hematol.* 2005;33(2):219-225.

[11] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 1999;181(1):67-73.

[12] Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 9):1827-1835.

[13] Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, et al. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs.* 2002;170(2-3): 73-82.

[14] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411): 143-147.

[15] Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant.* 1995;16(4):557-564.

[16] Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells.* 2008;26(2):300-311.

[17] Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, et al. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol.* 2008;251(2):131-136.

[18] Jeong WK, Park SW, Im GI. Growth factors reduce the suppression of proliferation and osteogenic differentiation by titanium particles on MSCs. *J Biomed Mater Res A.* 2008;86(4): 1137-1144.

[19] Yoo KH, Jang IK, Lee MW, et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol.* 2009;259(2):150-156.

[20] Meisel R, Zibert A, Laryea M, et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood.* 2004; 103(12):4619-4621.

[21] Liu KL, Liu DZ, Jin JG, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(6):1048-1052. 刘奎利, 刘德忠, 金建刚, 等. 异体脐带间充质干细胞对大鼠心脏移植的免疫调节[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(6):1048-1052.

[22] Tao YL, Zhang H. Zhongguo Shiyong Erke Zazhi. 2008;23(11): 833-835. 陶艳玲, 张颖. 脐血间充质干细胞对T淋巴细胞增殖和激活影响的实验研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2008, 23(11):833-835.

[23] Bai H, Wang Q, Wu T, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(3):438-441. 白海, 王茜, 吴涛, 等. 人脐血间充质干细胞培养及对异体外周血T淋巴细胞增殖的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(3): 438-441.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 国家自然科学基金青年基金(81000674); 广东省科技计划项目(2010B031600313)。

作者贡献: 实验设计为第一作者, 干预实施为第二、三作者, 结果评估为第四、五作者, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 健康产妇完全知情并同意将其脐带血用于提取脐血间充质干细胞; 健康志愿者均签署知情同意书自愿将其外周血用于分离培养T淋巴细胞。

本文创新性: 首次将脐血间充质干细胞与T淋巴细胞进行非接触共培养, 属于该类实验的方法创新。与国内外同类研究相比, 实验结果创新性的阐述了脐血间充质干细胞可以通过旁分泌白细胞介素10来影响T淋巴细胞的增殖, 从而达到免疫调节的作用。