

人脐带间充质干细胞对再生障碍性贫血患者 T 细胞相关因子调节的体外研究

黄颖¹⁾, 李永志¹⁾, 杨弘¹⁾, 黎承平¹⁾, 李维佳¹⁾, 张春强²⁾
(1) 昆明医学院第一附属医院血液科; 2) 骨科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 体外观察人脐带间充质干细胞对再生障碍性贫血患者和正常对照 T 细胞相关细胞因子 IL-2、IFN- γ 、IL-17、IL-6 的调节作用。 **方法** 采用组织块培养法从脐带分离、培养间充质干细胞。用流式细胞术鉴定脐带间充质干细胞的表型。分离再生障碍性贫血患者和正常对照外周血单个核细胞与脐带间充质干细胞共培养。用 ELISA 法测定外周血单个核细胞组和共培养组培养上清中细胞因子 IL-2、IFN- γ 、IL-17 和 IL-6 的水平。 **结果** 脐带来源间充质干细胞高表达 CD29、CD44、CD105、HLA-I。人脐带间充质干细胞与再生障碍性贫血患者外周血单个核细胞共培养后上清中 IL-2 水平无明显变化 ($P>0.05$) 而 IFN- γ 水平有所下降 ($P>0.05$), IL-17 水平和 IL-6 水平明显上升 ($P<0.01$)。人脐带间充质干细胞与正常对照外周血单个核细胞共培养后上清中 IL-2 和 IFN- γ 水平明显下降 ($P<0.05$) 而 IL-17 水平无明显变化 ($P>0.05$), IL-6 水平明显上升 ($P<0.01$)。 **结论** 人脐带间充质干细胞明显可抑制正常外周血单个核细胞分泌 IL-2、IFN- γ , 其与外周血单个核细胞共培养后可升高 IL-6 水平。

[关键词] 再生障碍性贫血; 脐带间充质干细胞; T 细胞

[中图分类号] Q786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2011) 01-0021-05

Regulatory Effects of Human Umbilical Cord-mesenchymal Stem Cells on Cytokines Related to T Cells in vitro in Aplastic Anemia Patients

HUANG Ying, LI Yong-zhi, YANG Hong, LI Cheng-ping, LI Wei-jia, ZHANG Chun-qiang
(1) Dept. of Hematology; 2) Dept. of Orthopedic, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medicine University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To explore the regulatory effects of human umbilical cord-mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) on cytokines (IL-2, IFN- γ , IL-17, and IL-6) related to T cell in aplastic anemia patients and normals in vitro. **Methods** MSCs were isolated from human umbilical cord and cultured by tissue culture method, and the phenotype of MSCs was indentificated by flow cytometry. Mononuclearcells were isolated from peripheral blood of patients with aplastic anemia and normals, and then were cocultured with hUC-MSCs. The levels of IL-2, IFN- γ , IL-17, and IL-6 in supernatants of coculture were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** CD29, CD44, CD105, and HLA-I were highly expressed in hUC-MSCs. After coculture of hUC-MSCs and mononuclearcells of aplastic anemia patients, the levels of IL-2 in culture

[基金项目] 云南省自然科学基金资助项目 (2008ZC134M); 云南省教育厅科研基金资助项目 (08C0116)

[作者简介] 黄颖 (1977~), 女, 四川夹江县人, 医学博士, 讲师, 主要从事血液内科基础和临床工作。

[通讯作者] 张春强. E-mail: zcq75@yahoo.com.cn

supernatants had no significant changes ($P > 0.05$), the levels of IFN- γ decreased a little, but the difference had no statistical significance ($P > 0.05$), the levels of IL-17 and IL-6 increased significantly ($P < 0.01$). After coculture of hUC-MSCs and mononuclear cells of normal controls, the levels of IL-2 in culture supernatants decreased ($P < 0.05$), the levels of IFN- γ decreased significantly ($P < 0.05$), the levels of IL-17 had no significant changes ($P > 0.05$), the levels of IL-6 increased significantly ($P < 0.01$). **Conclusions** hUC-MSCs can inhibit the secretion of IL-2 and IFN- γ by mononuclear cells of normal controls. The levels of IL-6 in culture supernatants increase significantly after coculture of hUC-MSCs and mononuclear cells.

[**Key words**] Aplastic anemia; Umbilical cord mesenchymal stem cells; T lymphocytes

再生障碍性贫血 (aplastic anemia, AA), 是一种获得性骨髓造血功能衰竭症, 为血液系统常见疾病之一。众多研究报道指出, 再障的发生、发展与 T 细胞功能亢进引起的造血组织损伤密切相关^[1]。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 是一种重要的多潜能干细胞, 具有多项分化的潜能, 支持造血, 免疫调节功能。其中 MSC 所具有的特殊的免疫学特性越来越引起人们的重视。近来研究显示 MSC 具有免疫调节作用, 可以影响淋巴细胞和其他免疫细胞的功能^[2,3]。在体内 MSC 也表现出了类似免疫抑制剂的作用^[4]。综上所述, MSCs 具有治疗 AA 的潜能。本研究通过检测人脐带来源的间充质干细胞 (hUCMSCs) 与 AA 患者外周血单个核细胞共培养后 T 细胞相关细胞因子的表达, 研究其对 AA 患者外周血单个核细胞的部分细胞因子表达的调节作用, 以期为临床治疗 AA 及移植物抗宿主病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 脐带取自昆明医学院第一附属医院产科健康足月胎儿, 经产妇同意。病例选自昆医附一院血液科 2008 年 10 月至 2010 年 3 月收治的 AA 患者 15 例。其中重型再生障碍性贫血 8 例。男女比例 11:4 (2.75:1), 年龄 11~67 岁, 平均 37.93 岁。诊断依据《血液病诊断及疗效标准》中的 AA 诊断标准^[5]。对照组 10 例, 均为正常人。

1.1.2 试剂 南美分装胎牛血清, DMEM/F12 液体培养基, IMDM 液体培养基, 胰蛋白酶 (北京海克隆公司); Ficoll 淋巴细胞分离液 (上海生工生物工程有限公司); 抗人 HLA-I、CD105、CD29、CD44 单克隆抗体 (美国 Biologend 公司); 人 IL-2、IFN- γ 、IL-17、IL-6 ELISA 试剂盒 (上

海依科赛生物制品有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 脐带间充质干细胞 (hUCMSCs) 的培养 取健康足月胎儿脐带, 用含青链霉素双抗的 PBS 液冲洗后剪切为 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小块。取 20~30 块分散接种到 25 cm × 25 cm 培养瓶底, 培养体系为 DMEM/F12; 5% FBS; 10 ng/mL EGF; 1% 谷氨酰胺; 100 U/mL 双抗 (青链霉素)。于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养条件下培养 3~5 d 后换液, 去除漂浮的组织块和残留的血细胞, 待贴壁细胞长满瓶底达 80% 以上融合时, 用弯头吸管挑掉组织块, 以 0.125% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 AA 患者外周血单个核细胞 (PBMC) 的分离培养 采集 AA 患者 EDTA 抗凝外周血 10 mL, Ficoll 分离单个核细胞。计数细胞后接种于 6 孔培养板, 每孔接种 1×10^6 个细胞。培养体系为 IMDM, 10% FBS; 10 ng/mL 二巯基乙醇; 1% 谷氨酰胺; 100 U/mL 双抗。于 37 °C, 含 5% CO₂, 饱和湿度条件下培养。48 h 后离心, 收集上清。上清 -80 °C 贮存备用。

1.2.3 hUCMSCs 与 AA 患者 PBMC 的共培养 将 1×10^5 个 / 孔 hUCMSCs (P3-P4 代) 接种于 6 孔培养板, 12~24 h 后轻轻吸去上清, 加入 AA 患者的 PBMC 1×10^6 个 / 孔。培养体系、条件同 1.2.2。48 h 后离心, 收集上清。上清 -80 °C 贮存备用。

1.2.4 ELISA 检测 IL-2、IFN- γ 、IL-17、IL-6 含量 取 15 例 AA 患者、10 例正常对照 PBMC 培养上清、与 hUCMSCs 共培养后上清作为检测样本, 检测过程按照 ELISA 试剂盒说明书操作。检测前所有的试剂和标本室温平衡。所有的标本、对照和标准品都重复检测 2 次。通过标准品曲线计算样本中 IL-2、IFN- γ 、IL-17、IL-6 的含量。

1.3 统计学处理

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 统计软件包对结果进行 *t* 检验、秩和检验。

2 结果

2.1 脐带来源间充质干细胞 (hUCMSCs) 的培养和鉴定

脐带组织块接种 10 d 左右, 在组织块边缘可见有少量细胞长出, 细胞形态呈长梭形或多角形, 培养 20 d 左右可予传代。P2 代后细胞形态均一, 大部分细胞呈长梭形, 成平行或漩涡状排列。流式细胞术检测显示, hUCMSCs 高表达 HLA-I, CD44, CD105, CD29, 见图 1。

2.2 AA 患者及对照组 PBMC 培养上清、与

hUCMSCs 共培养后上清中 IL-2、IL-6、IL-17、IFN- γ 的水平

hUCMSCs 与 AA 患者外周血单个核细胞共培养后 IL-2 水平无统计学意义 ($P > 0.05$); IFN- γ 水平有所下降, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); IL-17 水平上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); IL-6 水平明显上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。

人脐带间充质干细胞与正常对照外周血单个核细胞共培养后 IL-2 水平下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); IFN- γ 水平明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); IL-17 水平无明显变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); IL-6 水平明显上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2。



A

B

图 1 人脐带间充质干细胞 ($\times 40$)Fig.1 Human umbilical cord-mesenchymal stem cells (hUCMSCs) ($\times 40$)

A:原代细胞; B:第二代脐带间充质干细胞。

表 1 hUCMSCs 对 AA 患者 PBMC 分泌 IL-2、IFN- γ 、IL-17、IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 Effect of hUCMSCs on IL-2, IFN- γ , IL-17 and IL-6 secretion of PBMC of patients with aplastic anemia ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-2 (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)	IL-17 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
PBMC 组	15	32.303 \pm 8.461	75.808 \pm 26.925	6.610 \pm 1.261	3.372 \pm 1.741
PBMC+hUC-MSCs 组	15	36.076 \pm 25.339	63.254 \pm 31.507	12.714 \pm 3.500**	1 141.062 \pm 347.634**

与 PBMC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

表 2 hUCMSCs 对正常对照 PBMC 分泌 IL-2、IFN- γ 、IL-17、IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 2 Effect of hUCMSCs on IL-2, IFN- γ , IL-17 and IL-6 secretion of PBMC of normal subjects ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-2 (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)	IL-17 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
PBMC 组	15	23.812 \pm 10.643	66.789 \pm 31.388	11.202 \pm 11.547	1 1.576 \pm 8.332
PBMC+hUC-MSCs 组	15	10.256 \pm 4.339*	16.091 \pm 3.005*	8.574 \pm 1.970	11 351.885 \pm 0.000**

与 PBMC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

目前尚无经典的检测 MSCs 的特异性方法. 实验中通过形态学观察和流式细胞术检测证实从脐带分离培养得到的这群细胞具有 MSCs 的形态特征, 高表达 HLA-I、CD29、CD44 及 CD105, 符合 MSCs 的表型特征.

IL-2 主要由 T 细胞产生, 它能以自分泌或是旁分泌效应活化 T 细胞, 促进细胞因子产生. IFN- γ 主要由 Th1 细胞分泌, 多数再障患者存在 IFN- γ 基因的高表达. Aggarwal^[6]等通过 MSCs 与提纯的各种免疫细胞共培养, 发现 MSCs 使 Th1 减少了 IFN- γ 的分泌, 使 Th2 分泌 IL-4 增多; MSCs 使调节性 T 细胞 (TRegs) 比例增加, 也使 NK 细胞分泌 IFN- γ 减少. Glennie S^[7]等细胞周期的分析显示 MSCs 可以诱导 T 细胞成为无反应能力的细胞, 主要是抑制 T 细胞的增殖, 使 T 细胞减少分泌 IFN- γ . 与这些研究报道的结果一致, 本研究显示 hUCMSCs 对正常对照者 T 淋巴细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ 是有明显抑制作用的. 但是 AA 患者的外周血单个核细胞与 hUCMSCs 共培养上清中的 IL-2 与 IFN- γ 水平并无下降. 实验中在 AA 组和对照组 hUCMSCs 与外周血单个核细胞的浓度比例均为 1:10. 由于 AA 患者存在 T1 极化现象, MSCs 主要作用是抑制 T 细胞的增殖, 可能该浓度的 hUCMSCs 不足以抑制增多的 T1 细胞亚群. 还需进一步调整 hUCMSCs 浓度以证实. 也有报道认为 MSCs 的生物学功能是由其所在的微环境决定的^[8], 在不同的微环境中表现出不同的生物学功能, 表现为免疫抑制或是免疫增强. 故可能是 AA 患者的免疫细胞分泌了特有的细胞因子或者是其分泌的一些原有的细胞因子的浓度及比例发生了异常, 使 AA 组共培养体系的微环境与对照组存在差异, hUCMSCs 在不同的微环境中发挥了不同的生物学功能.

笔者发现 AA 患者的外周血单个核细胞与 hUCMSCs 共培养后 IL-17 分泌明显增多, 这与文献报道 MSCs 在抑制 Th1 增殖的同时能促进 Th17 的增殖, 也使 Th17 分泌的 IL-17 增加是一致的^[9]. 虽然 AA 患者和正常对照单个核细胞培养上清中 IL-17 的浓度相似, 但是其对 hUCMSCs 的反

应不同. IL-17 作为 T 细胞调控的自身免疫反应中一个关键的炎症因子, 可能与再障的发病机制有关.

本实验结果显示, 无论 AA 患者还是正常对照, 其外周血单个核细胞和 hUCMSCs 共培养后, 培养上清中的 IL-6 水平均明显升高. 且升高的 IL-6 水平已达到检测试剂盒的上限值. Chen^[10]等研究发现将 MSCs 注入患关节炎小鼠体内, 血浆中立刻有 IL-6 的分泌. 体外 MSCs 与脾细胞共培养能促进脾细胞增殖及 IL-6、IL-17 的分泌. Raphaelle^[11]等发现人 MSCs 和巨噬细胞能表达 TLR3 和 TLR4 蛋白, TLR 活化后又促使 MSCs 分泌 IL-1 β , IL-6, IL-8/CXCL8, 和 CCL5. 提示 hUCMSCs 和外周血单个核细胞共培养能诱导 IL-6 分泌增加, 但是 IL-6 水平的上升是以 T 细胞分泌增多为主还是 hUCMSCs 自分泌增多为主目前还不清楚, 其具体的机制也有待研究.

[参考文献]

- [1] YOUNG N S, CALADO R T, SCHEINBERG P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia[J]. *Blood*, 2006, 108(8):2509 - 2519.
- [2] CORCIONE A, BENVENUTO F, FERRETTI E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions [J]. *Blood*, 2006, 107(1):367 - 372.
- [3] AGGARWAL S, PITTENGER M F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [J]. *Blood*, 2005, 105(4):1815 - 1822.
- [4] GERDONI E, GALLO B, CASAZZA S, et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Ann Neurol*, 2007, 61(3):219 - 227.
- [5] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第3版. 北京:科学出版社, 2007:19 - 23.
- [6] AGGARWAL S, PITTENGER M F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [J]. *Blood*, 2005, 105(4):1815 - 1822.
- [7] GLENNIE S, SOEIRO I, DYSON P, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells[J]. *Blood*, 2005, 105(7):2821 - 2827.
- [8] HORWITZ E M. Culture conditions shape mesenchymal stromal cell phenotype and function [J]. *Cytherapy*, 2009, 11(2):101 - 102.

- [9] GUO Z, ZHENG C, CHEN Z, et al. Fetal BM-derived mesenchymal stem cells promote the expansion of human Th17 cells, but inhibit the production of Th1 cells [J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(10): 2840 – 2849.
- [10] CHEN B, HU J, LIAO H, et al. Flk-1+ mesenchymal stem cells aggravate collagen-induced arthritis by up-regulating interleukin-6 [J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 159(3): 292 – 302.
- [11] ROMIEU-MOUREZ R, FRANCRANOIS M, BOIVIN M N, et al. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype [J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 182(12): 7963 – 7973.
(2010 – 12 – 10 收稿)

(上接第 20 页)

- [5] NASEF A, ASHAMMAKHI N, FOUILLARD L. Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms [J]. *Regen Med*, 2008, 3(4): 531 – 546.
- [6] FRIEDENSTEIN A J, GORSKAJA J F, KULAGINA N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs [J]. *Exp Hematol*, 1976, 4: 267 – 274.
- [7] LENNON D P, HAYNESWORTH S E, YONG R G, et al. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Experimental Cell Research*, 1995, 219(1): 211 – 222.
(2010 – 12 – 10 收稿)