

脐带来源间充质干细胞的免疫抑制功能研究

杨莹, 李政楠, 王秀娟, 李伟, 牟春琳, 金星, 徐永胜*

天津长和生物技术有限公司, 天津 301925

摘要: 目的 观察人源脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)对异体总淋巴细胞和不同淋巴细胞亚群增殖能力的影响,以及对细胞因子分泌的影响。方法 分离并培养hUC-MSCs及健康成人外周血淋巴细胞,以淋巴细胞为阴性对照,MTT法检测共培养(淋巴细胞:hUC-MSCs为1:0.5、1:1、1:5、1:10)3d后淋巴细胞的增殖情况;流式细胞仪检测共培养体系中CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺、CD3⁺CD16⁺CD56⁺、CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺的细胞比例;ELISA法检测白细胞介素(IL)-2、IL-4、IL-10、 γ -干扰素(INF- γ)细胞因子分泌情况。结果 与阴性对照组比较,hUC-MSCs对淋巴细胞的增殖具有显著抑制作用($P < 0.05$),抑制效果随数量增加而增强;hUC-MSCs能够显著增加共培养体系中CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺细胞比例($P < 0.05$),显著降低CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺细胞比例($P < 0.05$),对CD3⁺CD16⁺CD56⁺细胞比例无显著影响;hUC-MSCs能够显著降低IL-2、IL-4、INF- γ 水平,显著增加IL-10的分泌水平($P < 0.05$)。结论 hUC-MSCs具有免疫抑制功能。

关键词: 脐带间充质干细胞;淋巴细胞;免疫反应;细胞因子

中图分类号: R329

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2020)12-2385-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.12.005

Research on immunosuppressive function of umbilical cord mesenchymal stem cells

YANG Ying, LI Zhengnan, WANG Xiujuan, LI Wei, MU Chunlin, JIN Xing, XU Yongsheng

Ever Union Biotechnology Company Limited, Tianjin 301925, China

Abstract: Objective To observe the effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) on the proliferation of allogeneic total lymphocytes and different lymphocyte subsets, as well as the secretion of cytokines. **Methods** hUC-MSCs and peripheral blood lymphocytes of healthy adults were isolated and cultured; MTT method was used to detect the proliferation of lymphocytes by after co-culture for 3 days; the proportion of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺ and CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺ in the co-culture system was detected by flow cytometry; ELISA was used to detect the secretion of IL-2, IL-4, IL-10 and INF- γ . **Results** hUC-MSCs could significant inhibit the proliferation of T lymphocytes, and the anti-proliferative effect was enhanced with the increase of the number of lymphocytes; the proportion of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ cells in co-culture system was increased by hUC-MSCs ($P < 0.05$); the proportion of CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺ cells showed a downward tendency, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$); however, there was no significant difference in CD3⁺CD16⁺CD56⁺ cells. hUC-MSCs could reduce the levels of IL-2, IL-4 and INF- γ , but increase the secretion level of IL-10, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** HUC-MSCs had immunosuppressive function.

Key words: umbilical cord mesenchymal stem cells; lymphocytes; immune response; cytokines

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)来源于发育早期的中胚层和外胚层,属于多能干细胞,因其具有多向分化潜能^[1]、造血支持和促进干细胞植入、免疫调控和自我复制等特点而日益受到人们的关注。早期MSCs研究主要集中于骨髓来源的MSCs,随着研究的深入,发现MSCs几乎存在于所

有的成体组织中,如骨髓、脂肪组织、血液、骨髓、脐带和胎盘^[2-4]。人源脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)由于来源广泛、取材方便,在细胞治疗和组织工程中具有广泛的应用前景。

干细胞治疗目前在全球开展了多项临床试验,覆盖了140多种疾病,其中包括不同种干细胞类型

收稿日期: 2020-09-11

基金项目: 国家重点研发计划“干细胞及转化研究”重点专项(2019YFA0112100);天津市科技计划项目(17ZXXYSY00020)

*通信作者: 徐永胜 E-mail: brian.xu@chinaeubio.com

及多种疾病类型,主要包括心脑血管疾病、骨科疾病、神经系统疾病、呼吸系统疾病、肝病、风湿免疫病、免疫排斥等。2015年7月31日,国家卫生计生委办公厅、国家食品药品监管总局办公厅发布的《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》中指出,MSCs制剂作为一种新型生物治疗产品,其在细胞质量、安全性和生物学效应方面都应进行全面的研发及质量控制^[5]。本研究体外检测脐带来源干细胞制剂对总淋巴细胞增殖和对不同淋巴细胞亚群增殖能力的影响,及对相关细胞因子分泌的影响,初步探究hUC-MSCs的免疫抑制功能,为脐带MSCs制剂的质量研究提供依据。

1 材料

1.1 主要试剂

α -MEM[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; Corning淋巴细胞无血清KBM 581培养基(康宁公司); Ausbian特级胎牛血清(FBS,上海威正翔禹生物科技有限公司);淋巴细胞分离液(康宁公司);流式抗体(BD生物);MTT试剂盒(默克公司);ELISA试剂盒(北京达科为生物技术有限公司)。

1.2 主要仪器

生物安全柜(BSC-1600IIA2,苏州安泰空气技术有限公司);CO₂恒温培养箱[150i,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];流式细胞仪[FACSCalibur,碧迪医疗器械(上海)有限公司];酶标仪[Multiskanfc,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];倒置显微镜(TI-S,尼康株式会社)。

2 方法

2.1 hUC-MSCs及人外周血淋巴细胞分离及培养

脐带来源于健康状态良好、足月剖宫产产妇自愿捐献。以PBS反复冲洗脐带,去除残留血液。剔除脐带内动静脉血管及表皮组织。将脐带标本用手术剪剪成小块后均匀接种于培养瓶中,置于5% CO₂、37℃培养箱内,静置4h后加入含有10%胎牛血清的 α -MEM培养基,继续培养5~7d,细胞生长融合约70%后进行胰酶消化传代。每次传代后培养2~3d,传至P7代,显微镜观察生长状态。

取健康成年人自愿捐献外周血,2 000 r/min离心15 min,去除血浆,向吸弃血浆后的血液样本加入PBS制成细胞悬液,缓慢加在淋巴细胞分离液液面上,2 000 r/min离心20 min,离心后小心吸取淋巴细胞层,使用PBS常规离心洗涤2次,用KBM581培养基培养重悬细胞,调整细胞浓度为 1×10^8 /mL,置于5% CO₂、37℃培养箱中待用。

2.2 hUC-MSCs表型鉴定

取P3代hUC-MSCs(生长融合约80%),使用胰酶消化后加入FBS终止消化,加入PBS,1 000 r/min离心5 min,重复洗涤2次,PBS调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,100 μ L/管,分装至11个流式管中,分别向其中加入5 μ L CD73、CD90、CD105、CD29、CD44、CD34、CD45、CD11b、CD19和HLA-DR抗体,避光孵育20 min,PBS离心洗涤1次,500 μ L PBS重悬细胞,使用流式细胞仪检测分析。

2.3 淋巴细胞增殖抑制检测

取第4代hUC-MSCs,用25 μ g/mL的丝裂霉素C于37℃预处理30 min,抑制其过度增殖。分别以每孔 2.5×10^4 、 5.0×10^4 、 2.5×10^5 、 5.0×10^5 个4种不同浓度接种于24孔板中,每组4孔,待细胞完全贴壁后,每孔加入 5×10^4 个淋巴细胞悬液,同时设立阴性对照组:淋巴细胞组,每孔加入0.25 g/L植物血凝素100 μ L。共培养3d后,收集共培养体系上清加入96孔板,每组5孔,每孔加5 g/L MTT 20 μ L,37℃孵育4 h,加入二甲基亚砷150 μ L,温和震荡10 min,酶标仪490 nm波长处测吸光度(A)值,实验重复3次。

2.4 特定淋巴细胞亚群检测

按照“2.3”项方法处理hUC-MSCs,然后以 5.0×10^4 /孔接种于24孔板中,待细胞完全贴壁后,每孔加入 2×10^5 个淋巴细胞悬液,同时设立阴性对照组:淋巴细胞,每孔加入0.25 g/L的植物血凝素100 μ L,共培养3d。取各组培养体系中的上清,离心收集淋巴细胞,PBS洗涤、重悬。根据检测需求,标记CD4、CD25、FOXP3、CD3、CD16、CD56、CD45A、CCR7,4℃避光孵育30 min,PBS洗涤1次,100 μ L PBS重悬细胞,流式细胞仪检测各种类型细胞的比例,实验重复3次。

2.5 细胞因子水平检测

取“2.4”项中共培养上清液,根据ELISA白细胞介素(IL)-2、IL-4、IL-10、 γ -干扰素(IFN- γ)检测试剂盒说明书,使用酶标仪测定相关细胞因子水平,实验重复3次。

2.6 统计学分析

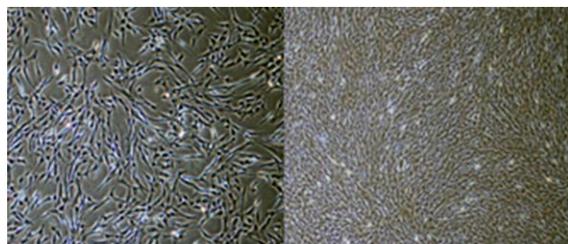
采用SPSS 11.5软件进行数据统计处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 hUC-MSCs的形态学特征

经组织块贴壁培养5~7d后,可在组织块周围长出大片hUC-MSCs,经传代后,细胞生长速度增

加,可在3 d左右达到80%融合,倒置显微镜观察细胞形态为均一的梭形,呈平行排列或旋涡状生长。台盼蓝染色显示,细胞存活率大于90%。P3代细胞倒置显微镜下观察图,见图1。



培养第1天 80%~90%融合

图1 hUC-MSCs P3代细胞形态观察(×40)

Fig. 1 Morphological observation of hUC-MSCs in P3 passage (×40)

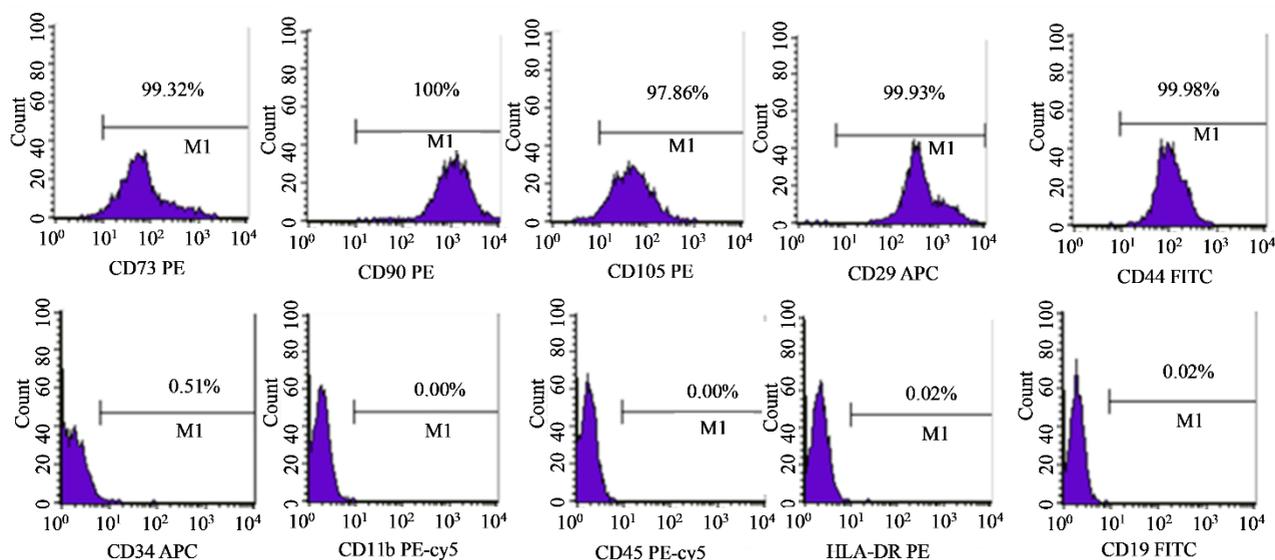


图2 hUC-MSCs免疫表型

Fig. 2 Immunophenotype of hUC-MSCs

表1 hUC-MSCs对淋巴细胞增殖抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Anti-proliferative effect of hUC-MSCs on lymphocyte proliferation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	比例	A值
阴性对照	—	0.638±0.04
淋巴细胞:hUC-MSCs	1:0.5	0.247±0.04*
	1:1	0.228±0.02*
	1:5	0.185±0.03*
	1:10	0.170±0.04*

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs negative control group

3.2 hUC-MSCs免疫表型

通过流式细胞仪检测细胞免疫表型,结果表明,CD73-PE、CD90-PE、CD105-PE、CD29-APC、CD44-FITC表达阳性,阳性率 $\geq 95\%$;CD34-APC、CD45-PE-Cy5、CD11b-PE-Cy5、CD19-FITC、HLA-DR-PE表达阴性,阴性率 $\leq 2\%$,符合MSCs的表面分子特征。结果见图2。

3.3 hUC-MSCs对淋巴细胞增殖抑制

MTT法检测hUC-MSCs对淋巴细胞增殖抑制的影响。与阴性对照组比较,共培养组A值均显著下降,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明,hUC-MSCs对淋巴细胞的增殖具有抑制作用,且随着hUC-MSCs数量增加,增殖抑制效果也随之增加(表1)。

3.4 hUC-MSCs对特定淋巴细胞亚群的作用

流式细胞术检测特定淋巴细胞亚群结果表明,与阴性对照组比较,共培养组CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺细胞比例显著增加($P < 0.05$);CD3⁺CD16⁺CD56⁺细胞比例无明显变化;CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺细胞比例显著下降($P < 0.05$)。见表2。

3.5 细胞因子分泌水平

ELISA法检测结果显示,与阴性对照组比较,hUC-MSCs能够显著降低淋巴细胞分泌的细胞因子中IL-2、IL-4、INF- γ 的水平,显著增加IL-10的分泌水平,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

4 讨论

随着生物技术的快速发展,细胞技术已经被视

表2 hUC-MSCs对淋巴细胞亚群比例的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 2 Effect of hUC-MSCs on lymphocyte subsets ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	比例	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ /%	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ /%	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ /%
阴性对照	—	3.88±0.95	7.50±1.46	20.22±4.91
淋巴细胞:hUC-MSCs	1:0.25	8.35±1.24*	6.01±1.19	9.85±2.46*

与阴性对照组比较:* $P<0.05$ * $P < 0.05$ vs negative control group表3 细胞因子水平测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 3 Results of cytokine level determination ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	比例	IL-2/(pg·mL ⁻¹)	IL-4/(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)	INF- γ /(pg·mL ⁻¹)
阴性对照	—	48.87±3.32	26.70±2.94	8.98±1.22	151.48±6.09
淋巴细胞:hUC-MSCs	1:0.25	29.56±2.56*	12.41±1.50*	11.65±0.70*	128.42±5.25*

与阴性对照组比较:* $P<0.05$ * $P < 0.05$ vs negative control group

为第四大治疗手段用于临床治疗。MSCs缺乏组织相容性复合物类分子和其他经典的共刺激分子,因此MSCs拥有非免疫原性,避免了免疫系统对其的攻击。

MSCs通过直接的物理接触,以及最为重要的旁分泌作用产生多种生长因子、黏附分子、趋化因子等募集、动员或抑制T淋巴细胞、B淋巴细胞直至整个免疫系统^[6]。因此,不论自体或同种异体的MSCs用于治疗,一般都不会引起宿主的免疫反应^[7]。本实验通过MTT法检测hUC-MSCs对淋巴细胞增殖抑制的影响,研究是否会出现异常免疫反应,实验结果表明,hUC-MSCs对外源刺激下的淋巴细胞的增殖具有抑制作用,且随着hUC-MSCs数量增加,增殖抑制效果也随之增加,为MSCs的临床应用提供依据。

移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)是移植治疗中的主要问题,T淋巴细胞在抑制免疫中起着关键作用,所以研究MSCs对T淋巴细胞的免疫抑制作用极其重要^[8]。有研究发现,MSCs能抑制初始T细胞向Th1和Th2细胞亚群分化,促进调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)的产生^[9]。本实验结果显示,hUC-MSCs能够增加共培养体系中CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺细胞比例,细胞比例从(3.88±0.95)%增加至(8.35±1.24)%;初始T细胞(CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺)比例从(20.22±4.91)%下降至(9.85±2.46)%。同时MSCs可以改变NK细胞的表型,进而减低CD56的表达,减少NK细胞肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的分

泌^[10]。而在本实验中CD3⁺CD16⁺CD56⁺细胞未呈现显著性差异,在后续研究中还将继续深入实验。

IL-10是Treg发挥其免疫抑制功能的关键性细胞因子,Treg通过分泌IL-10抑制Th1介导的免疫反应、Th2介导的抗体产生和CD8细胞毒性T细胞的活化^[11]。在hUC-MSCs对T淋巴细胞细胞因子分泌的影响实验中,经共培养后,IL-10的分泌水平显著升高。推测hUC-MSCs不仅使Treg在数量上发生了扩增,可能还对其活化和功能具有促进作用。

在T淋巴细胞中,Th1类细胞主要分泌IL-2和INF- γ ,IL-2能够激活淋巴细胞,并促进其增殖,INF- γ 调节GVHD^[12]。在以免疫性血小板减少症患者为研究对象时,分析在体外MSCs对效应性T细胞和Treg比例的影响,发现MSCs在很大程度上抑制Th1细胞分泌IL-2和INF- γ ^[13]。本研究发现,经共培养后,IL-2、INF- γ 的分泌水平均显著下降,同时由Th2细胞分泌的IL-4水平也呈现下降的现象。综合上述实验结果,初步表明hUC-MSCs具有免疫抑制功能。

参考文献

- [1] Sasaki M, Honmou O. Mesenchymal Stem Cell. In: Houkin K, Abe K, Kuroda S. *Cell Therapy Against Cerebral Stroke: Comprehensive Reviews for Translational Researcher and Clinical Trial* [M]. sapporo: Springer, 2017: 147-155.
- [2] Ma S, Xie N, Li W, et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells [J]. *Cell Death Different*, 2014, 21: 216-225.

- [3] Wei X, Yang X, Han Z P, et al. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34: 747-754.
- [4] Kim N, Cho S G. Clinical applications of mesenchymal stem cells [J]. *Kor J Int Med*, 2013, 28: 387-402.
- [5] 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行). [S]. 2015.
- [6] Zhao Q J, Ren H Y, Han Z C. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases [J]. *J Cell Immunother*, 2016, 2(1): 3-20.
- [7] 孙瑞婷, 陈瑶瑶, 王 华, 等. 脐带来源的间充质干细胞的制备及其质量检定 [J]. *中国医药生物技术*, 2013, 8 (6): 401-407.
- [8] Ikhsan R, Putra A, Munir D, et al. Mesenchymal stem cells induce regulatory T-cell population in human SLE [J]. *Bangladesh J Med Sci*, 2020, 19: 743-748.
- [9] Luz-Crawford P, Kurte M, Bravo-Alegria J, et al. Mesenchymal stem cells generate a CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4: 65.
- [10] Sotiropoulou P A, Perez S A, Gritzapis A D, et al. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(1): 74-85.
- [11] Selmani Z, Naji A, Zidi I, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25⁺ high FOXP3⁺ regulatory T cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(1): 212-222.
- [12] Spaggiari G M, Capobianco A, Becchetti S, et al. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSC, whereas MSC can inhibit IL-2 induced NK-cell proliferation [J]. *Blood*, 2006, 107(4): 1484-1490.
- [13] Ma X H, Xiao L, Shi B Y. Research advance in immunosuppressive action and application of mesenchymal stem cells in transplantation immunity [J]. *Chin J Cell Stem Cell*, 2015, 5(1): 42-47.