

Ki67法检测间充质干细胞对淋巴细胞增殖抑制能力

韩莹¹, 时玉峥¹, 魏训东², 曹利人^{1*}

1. 普华赛尔生物医疗科技有限公司, 北京 100000

2. 北京医院 生物治疗中心, 北京 100000

摘要:目的 对比Ki67法与羧基荧光素乙酰乙酸(carboxyfluorescein di-acetate succinimidyl ester, CFSE)法检测间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs)对淋巴细胞的增殖抑制能力, 开发MSCs免疫调控功能评价的新方法。方法 选取5批脐带来源的MSCs, 流式细胞术进行表面标志物(阳性CD73/CD90/CD105/CD44、阴性CD34/CD45/CD14/CD19)检测; 试剂盒诱导后染色进行成脂、成骨、成软骨三系分化能力检测; 流式细胞术进行增殖指数检测; CCK8法进行群体倍增时间检测; 生物学有效性检测合格后与相同供者来源的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)进行共培养, 分别用CFSE法与Ki67法检测MSCs对PBMC的增殖抑制率。结果 制备的MSCs生长状态良好, CD73/CD90/CD105/CD44表达率均 $\geq 98\%$, CD34/CD45/CD14/CD19表达率均 $\leq 3\%$, 成脂、成骨、成软骨三系分化能力良好, 增殖指数为 35.8 ± 9.9 , 倍增时间为 (19.1 ± 1.2) h, 增殖情况良好。CFSE法检测5批MSCs对PBMC的增殖抑制率为 $(91.20 \pm 0.70)\%$, Ki67法检测5批MSCs对PBMC的增殖抑制率为 $(89.99 \pm 1.45)\%$, 2种方法比较, 差异无统计学意义。结论 Ki67法可作为评价MSCs免疫调控功能的新方法, 有效避免传统方法在检测过程中的局限性。

关键词: Ki67; 羧基荧光素乙酰乙酸(CFSE); 间充质干细胞(MSCs); 外周血单个核细胞(PBMC); 免疫调控; 增殖

中图分类号: R329 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2022)04-0673-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.04.009

Inhibitory effect of mesenchymal stem cells on lymphocyte proliferation was detected by Ki67 assay

HAN Ying¹, SHI Yuzheng¹, WEI Xundong², CAO Liren¹

1. Everbright Cell Biotech Inc, Beijing 100000, China

2. Beijing Hospital Biotherapy Center, Beijing 100000, China

Abstract: **Objective** Ki67 method was compared with carboxyfluorescein di-acetate succinimidyl ester (CFSE) method was used to detect the inhibition of mesenchymal stem cells (MSCs) on lymphocyte proliferation, to proposed a new idea for the evaluation of the immunoregulatory function of MSCs. **Methods** Five batches of MSCs from umbilical cord were selected. Surface markers (positive CD73/CD90/CD105/CD44, negative CD34/CD45/CD14/CD19) were detected by flow cytometry. After induction of the kit, staining was performed to detect the differentiation ability of lipid, osteogenic and chondrogenic lines. Proliferation index was detected by flow cytometry. CCK8 method was used to detect population doubling time. After qualified biological validity test, the Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from the same donor were co-cultured with MSCs, and then, CFSE and Ki67 methods were used to detect the inhibition rate of MSCs on lymphocyte proliferation, respectively. **Results** The expression rates of CD73/CD90/CD105/CD44 were $\geq 98\%$, and CD34/CD45/CD14/CD19 were $\leq 2\%$. The proliferation index of MSCs was 35.8 ± 9.9 , and the multiplication time was (19.1 ± 1.2) h. The proliferation was good. The proliferation inhibition rate of five batches of MSCs on PBMC was $(91.20 \pm 0.70)\%$ by CFSE method, and $(89.99 \pm 1.45)\%$ by Ki67 method. There was no statistical difference between the two methods. **Conclusion** Ki67 method can be used as a new method to evaluate the immunoregulatory function of MSCs, so as to avoid the limitations of traditional methods in the detection process.

Key words: Ki67; carboxyfluorescein di-acetate succinimidyl ester (CFSE); mesenchymal stem cells (MSCs); peripheral blood mononuclear cells (PBMC); immunoregulatory; proliferation

收稿日期: 2021-07-26

第一作者: 韩莹, 研究方向为间充质干细胞的体外安全性、有效性。E-mail: yhan568@163.com

*通信作者: 曹利人 E-mail: mweyvjn@dingtalk.com

间充质干细胞(MSCs)来源于中胚层,是一类具有自我复制、高度自我更新能力、连续传代培养仍具有多向分化潜能及免疫调控能力的成体干细胞^[1]。MSCs来源较为广泛,包括骨髓、脐带、脂肪等,由于脐带具有符合伦理、取材无创等特点,目前脐带来源的MSCs为研究热点^[2]。由于MSCs的免疫原性低,且在毒理研究中安全性得到广泛认可^[3],近年来对MSCs有效性的研究备受关注,主要包括诱导分化功能、免疫调控功能、组织再生功能。其中,基于免疫调控功能,MSCs已经应用于很多疾病的临床研究中,包括类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病^[4]。已有研究报道,MSCs能够抑制淋巴细胞的增殖,其增殖抑制率作为MSCs免疫调控功能的关键评价指标^[5]。通常将MSCs与植物血凝素M(phytohemagglutinin M, PHA-M)活化的淋巴细胞在体外共同培养,通过MSCs对淋巴细胞的增殖抑制能力来研究MSCs的免疫调控功能^[6]。目前,检测MSCs对淋巴细胞增殖抑制作用常用的方法包括氘标记胸腺嘧啶核苷(³Hthymidine, ³HTdR)掺入法、CCK8法、羧基荧光素乙酰乙酸(carboxyfluorescein di-acetate succinimidyl ester, CFSE)法。

Ki67是1983年德国科学家Gerdes等在德国Kiel市首次制备出的一种核抗体,实验所用培养皿编号为67号,故命名Ki67^[7]。Ki67蛋白的分子结构为双链,是由相对分子质量为345 000和395 000的2种蛋白质组成,其基因编码位于人类10号染色体上^[8]。在细胞周期中,Ki67与细胞的有丝分裂密切相关,在G₁期、S期、G₂期均有表达,在G₁期中,参与DNA的合成,在S期、G₂期位于整个细胞核内,在G₀期即静息状态下的细胞中不表达,因此,常作为细胞增殖的评价指标^[9]。由于Ki67的半衰期较短,平均半衰期60~90 min,脱离细胞周期后能迅速降解,因此能够实时反映细胞的增殖活性,是临床上检测细胞增殖及肿瘤发展的常用指标^[10]。

本实验室提出使用Ki67法进行MSCs对淋巴细胞增殖抑制的检测,分别通过细胞形态、表面标志物检测、成脂/成骨/成软骨诱导分化能力、细胞群体倍增时间来进行MSCs质量检验,检测合格后的5根脐带来源的MSCs与同一供者来源的PBMC进行共培养,分别使用CFSE及Ki67法进行检测单独培养PBMC、MSCs与PBMC共培养后PBMC的增殖情况,并收集培养上清,检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量变化。

1 材料

1.1 主要试剂

外周淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);细胞消化液、MSCs完全培养基[友康生物科技(北京)股份有限公司];氯化钠注射液(华润双鹤药业股份有限公司);流式检测抗体(BD生物科学):anti-human CD44、anti-CD105、anti-human CD90、anti-human CD73,阴性表达anti-human CD34、anti-human CD19、anti-human CD45、anti-human CD14;CCK8试剂盒(同仁化学研究所);细胞周期检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);MSCs成脂诱导分化试剂盒、MSCs成骨诱导分化试剂盒、MSCs成软骨诱导分化试剂盒(Biological Industries);FITC-Ki67单克隆抗体、细胞增殖试剂盒CellTrace CFSE、permeabilization buffer 10 $\times$ 、eBioscience fixation/permeabilization diluent、fixation/permeabilization concentrate(美国英杰生命技术有限公司);Human TNF- α ELISA检测试剂盒(R&D Systems);PHA-M(默克生命科学);丝裂霉素C(STEMCELL Technologies);CD3流式检测抗体(BD生物科学)。

1.2 主要仪器

超净工作台(苏州安泰-实验室仪器有限公司,型号SW-CJ-1F);细胞培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司,型号HF151);倒置显微镜(奥林巴斯,型号CKX53);水平离心机(湘仪仪器有限公司,型号H1650-W);流式细胞仪(BD公司,型号VERSE)。

2 方法

2.1 MSCs制备

采集健康产妇的脐带(由北京医院妇产科采集),采集过程通过北京医院伦理委员会审批,并与产妇签署知情同意书、健康调查表,确保产妇无传染性疾病、无家族遗传性疾病,采集足月婴儿脐带。脐带编号分别为UC01、UC02、UC03、UC04、UC05,采集脐带后通过脐带组织植块法进行脐带MSCs的原代分离,并按照8 000~10 000 cm⁻²的密度进行传代培养。MSCs传代培养至3代作为种子库细胞进行冻存,复苏后培养至5代进行相关质量检测。

2.2 MSCs表面标志物检测

收集第5代MSCs,分组为阳性染色管(流式检测抗体为CD73/CD90/CD105/CD44)、阴性染色管(流式检测抗体为CD34/CD45/CD14/CD19)、单染管、空白管,每个流式检测管中含(0.5~1.0) $\times 10^6$ 个细胞,加入氯化钠注射液洗涤细胞中残余的培养

基,各检测管中分别加入100 μL 氯化钠注射液和流式检测抗体混合液,室温避光孵育15 min后,加入氯化钠注射液洗涤未结合的流式检测抗体,将细胞制备成单细胞悬液,上机检测。

2.3 MSCs成脂、成骨、成软骨三系分化能力检测

收集第5代MSCs,将细胞以每孔 6×10^4 接种于24孔细胞培养板中,分别按照成脂、成骨诱导分化试剂盒说明书进行诱导分化,并用油红O染料进行成脂诱导分化后染色,用茜素红染料进行成骨诱导分化后染色。另外,将细胞密度调成 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$,按照每孔10 μL 的细胞数接种于96孔U型培养板,2 h后补加100 μL 的MSCs完全培养基,24 h后更换成软骨诱导分化培养基,按照软骨诱导分化试剂盒说明书进行诱导,并用阿利新兰进行诱导分化后染色。显微镜下观察并拍照。

2.4 MSCs增殖指数检测

收集第5代MSCs,取 2×10^6 个,加入3 mL冰预冷70%乙醇中,轻轻吹打混匀,封口膜封口,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜固定。配制碘化丙啶染色液:每个样品0.5 mL染色缓冲液、25 μL 碘化丙啶染色液($20\times$)、10 μL 的RNase A($50\times$)。次日,洗涤固定液后每管细胞样品中加入0.5 mL碘化丙啶染色液,缓慢并充分重悬细胞沉淀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温浴30 min后进行流式检测,用MODIFIT软件进行分析。

2.5 MSCs群体倍增时间检测

收集第5代MSCs,调整细胞浓度为 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,96孔板中每孔加入100 μL 的细胞悬液,每个孔板5个复孔,共接种5块96孔板,接种当日为第0天(D0),每天取1块96孔板进行增殖检测。检测方法:每孔100 μL 的细胞悬液加入10 μL 的CCK8溶液,放入细胞培养箱中培养2 h。在酶标仪450 nm处检测吸光度(A)值。

5个复孔中,去除A值最大和最小的孔,其余3个复孔的A值取平均值。以培养时间为横轴,A值为纵轴,绘制生长曲线。取生长曲线上对数期线性部分的点计算细胞倍增时间(DT)。

$$DT = t \cdot [\lg 2 / (\lg Nt_2 - \lg Nt_1)]$$

t代表生长曲线中的对数增殖时间段($t_2 - t_1$);通常Nt1取接种24 h后测得的A值,Nt2取对数增殖末期的A值

2.6 MSCs的免疫调控功能检测

2.6.1 MSCs准备 将浓度为 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的MSCs加入6孔板中,每孔1.5 mL,24 h贴壁后,加入终质量浓度10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的丝裂霉素C,反应0.5 h,去除MSCs的增殖能力,之后用氯化钠注射液洗2遍,以

备加入PBMC细胞悬液。

2.6.2 PBMC准备 取健康供者外周血,用Ficoll淋巴细胞分离液($1.077 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)分离成单个核细胞,用氯化钠注射液洗涤2次。细胞计数,调整PBMC密度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,所用培养基为RPMI 1640+10% FBS+10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PHA-M。

2.6.3 CFSE法检测MSCs的免疫调控功能 CFSE配制:50 μg CFSE加入18 μL DMSO,配制成5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液,分装成每管1 μL 冻存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,使用时取1 μL 的CFSE加入1 mL的PBMC悬液中,CFSE的工作浓度为5 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育10 min,每2分钟混匀细胞。反应结束后,加入37 $^{\circ}\text{C}$ 温育的含5% FBS的完全培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育5 min,用含有终质量浓度为10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的PHA-M的RPMI 1640完全培养基重悬细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,接种于准备好的MSCs孔板中,每孔1.5 mL,MSCs与PBMC效靶比1:10,同时接种PBMC单独培养组作为对照,共培养72~96 h。

MSCs对PBMC的增殖抑制率=(PBMC分裂指数-PBMC&MSCs分裂指数)/PBMC分裂指数

2.6.4 Ki67法检测MSCs的免疫调控功能 取“2.6.1”项MSCs,每孔加入1.5 mL的PBMC细胞悬液,同时,铺板PBMC单独培养组作为对照组,共培养72~96 h后进行检测。

收集各组细胞,离心并用盐水洗涤后,先用CD3流式检测抗体室温孵育15 min进行表面染色。各组中分别加入500 μL 的Fixation/Permeabilization重悬细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min进行固定,固定后使用permeabilization buffer洗涤1次,600 $\times g$ 离心5 min。用100 μL permeabilization buffer重悬细胞后加入Ki67流式抗体,混匀后室温避光孵育30 min,洗涤后流式细胞仪检测。

MSCs对PBMC的增殖抑制率=(Ki67表达量_{PBMC}-Ki67表达量_{PBMC&MSCs})/Ki67表达量_{PBMC}

2.7 统计学分析

数据采用SPSS 20.0统计学软件进行统计学分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较用GraphPad Prism 9进行分析,采用配对样本t检验。

3 结果

3.1 MSCs形态观察

细胞在无血清培养基下培养,接种密度为8 000 $\cdot \text{cm}^{-2}$,培养3 d后,40 $\times$ 显微镜下观察,细胞呈长梭形、有一定的方向性和规律性,生长状态良好(图1)。

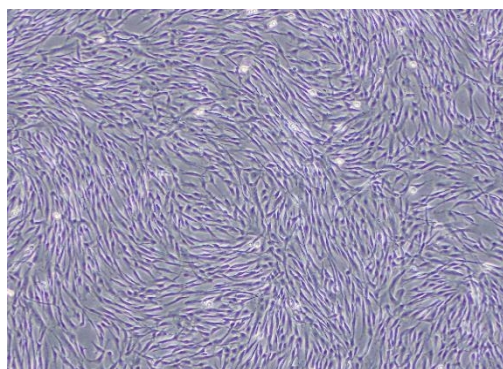


图1 MSCs培养72 h后细胞形态(×40)

Fig. 1 Cell morphology of MSCs after 72 h (×40)

3.2 细胞表面标志物检测

流式细胞仪检测 CD73/CD90/CD105/CD44 表达率均 $\geq 98\%$, CD34/CD45/CD14/CD19 表达率均 $\leq 3\%$, 符合 MSCs 标准。结果见表1、图2。

3.3 成脂、成骨、成软骨三系分化能力检测

经诱导分化、染色后,成脂诱导组经过18 d的诱导分化后,均出现明显脂肪滴,且显微镜下观察,出现脂肪滴的细胞占总细胞的比例 $\geq 50\%$ (图3-A)。成骨诱导组经过21 d诱导分化后,显微镜下可见明显的矿化结节,经过茜素红染色后为红色,矿化结节的面积占总面积的比例 $\geq 50\%$ (图3-B)。软骨诱导组经过成软骨诱导分化后,形成软骨球,且

表1 5批脐带 MSCs 的细胞表面标志物 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Cell surface markers of five batches of umbilical cord MSCs ($\bar{x} \pm s, n=5$)

标志物	表达率/%
CD44	99.68 $\pm$ 0.268
CD105	99.94 $\pm$ 0.055
CD90	99.92 $\pm$ 0.044
CD73	99.78 $\pm$ 0.216
CD34	0.084 $\pm$ 0.073
CD19	0.135 $\pm$ 0.191
CD45	0.021 $\pm$ 0.035
CD14	0.282 $\pm$ 0.558

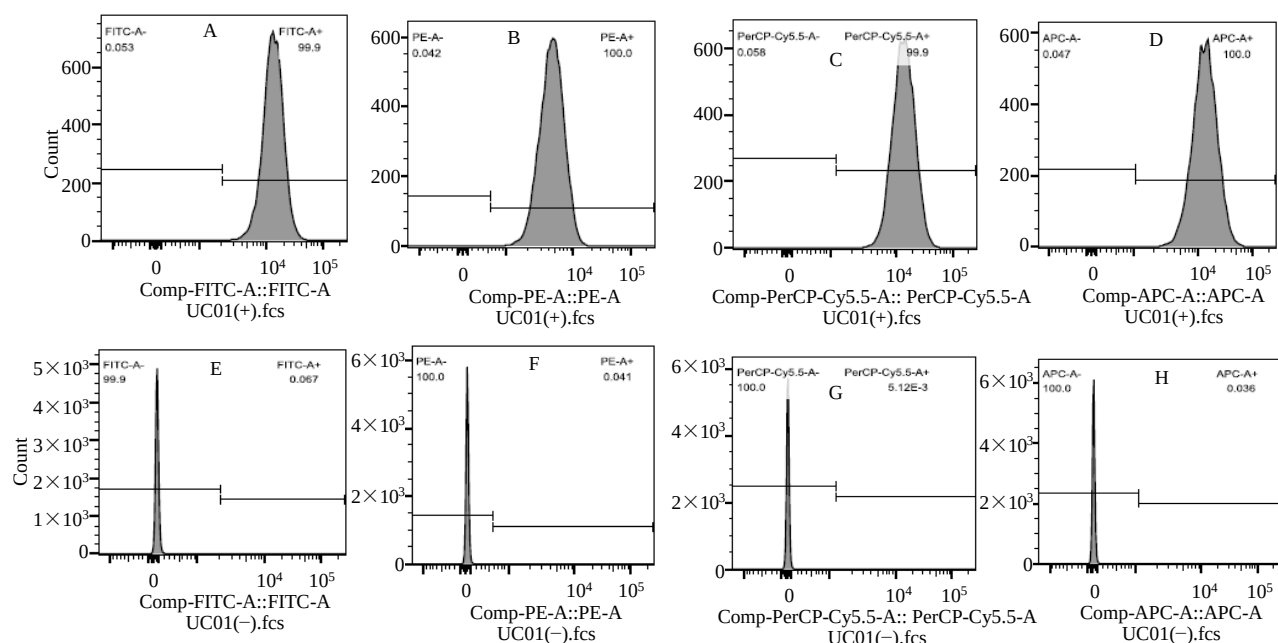
随着诱导时间延长,软骨球逐渐变大,诱导21 d后经过阿利新兰染色后,软骨球呈深蓝色(图3-C)。

3.4 细胞周期

流式细胞仪检测后(图4),采用 Modfit 软件进行分析,5批脐带的增殖指数为 35.8 ± 9.9 ,表明脐带 MSCs 有丝分裂旺盛,增殖能力强及可维持细胞性状稳定。

3.5 细胞增殖

MSCs 生长曲线见图5,5批脐带 MSCs 的群体 DT 为 $(19.1 \pm 1.2)h$,表明细胞增殖情况良好,活力较强。



阳性表达 anti-human CD44(A)、anti-CD105(B)、anti-human CD90(C)、anti-human CD73(D); 阴性表达 anti-human CD34(E)、anti-human CD19(F)、anti-human CD45(G)、anti-human CD14(H)

Positive expression of anti-human CD44(A), anti-CD105(B), anti-human CD90(C), and anti-human CD73(D); Negative expression of anti-human CD34(E), anti-human CD19(F), anti-human CD45(G), and anti-human CD14(H)

图2 MSCs 流式表型检测结果

Fig. 2 Flow cytometric phenotype test results of MSCs

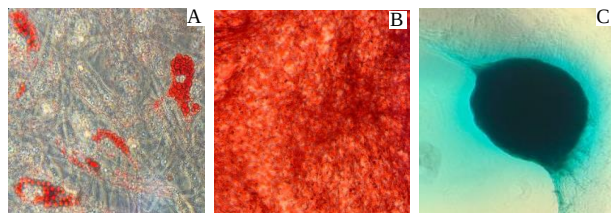


图3 MSCs三系诱导分化结果
A-脐带MSCs成脂诱导第18天(×100);B-脐带MSCs成骨诱导第21天(×40);C-脐带MSCs软骨诱导第21天(×40)
A-Umbilical cord MSCs adipogenesis induction day 18(×100);B-Umbilical cord MSCs osteogenic induction day 21 (×40);C-Umbilical cord MSCs cartilage induction day 21 (×40)

图3 MSCs三系诱导分化结果
Fig. 3 Induced differentiation results of MSCs

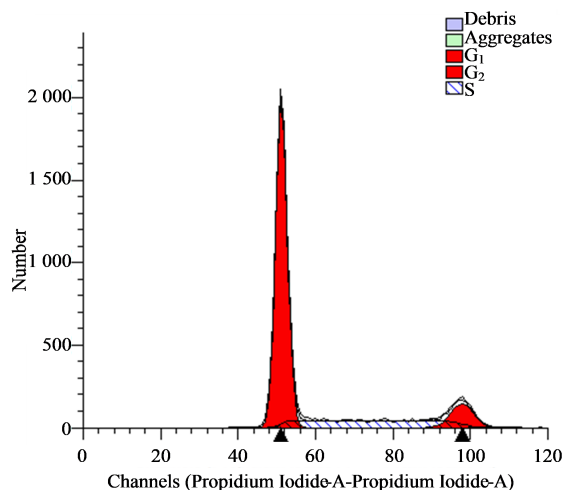
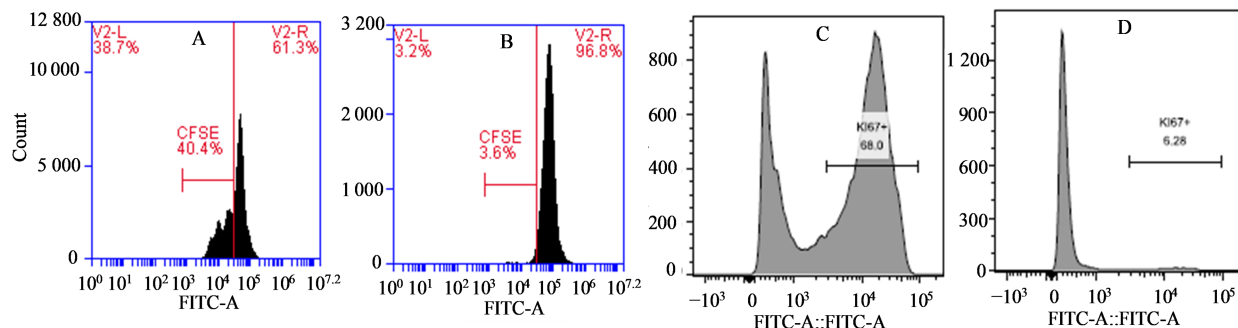


图4 脐带MSCs生长汇合度为70%~90%时细胞周期
Fig. 4 Cell cycle of umbilical cord MSCs cells of confluence 70%—90%

3.6 对比CFSE法与Ki67法检测MSCs的免疫调控

流式细胞仪检测各组细胞,通过CFSE荧光强度的变化观察淋巴细胞增殖情况,CFSE荧光强度



A-CFSE法检测PBMC单独培养增殖情况;B-CFSE法检测PBMC/MSCs共培养后PBMC增殖情况;C-Ki67法检测PBMC单独培养增殖情况;D-Ki67法检测PBMC/MSCs共培养后PBMC增殖情况

A-CFSE method was used to detect proliferation of PBMC in single culture;B-CFSE method was used to detect proliferation of PBMC after PBMC/MSCs co-culture; C-Ki67 was used to detect proliferation of PBMC in single culture;D-Ki67 was used to detect proliferation of PBMC after PBMC/MSCs co-culture

图6 CFSE法与Ki67法检测MSCs对PBMC的增殖抑制作用

Fig. 6 Proliferation inhibition of MSCs on PBMC detected by CFSE and Ki67

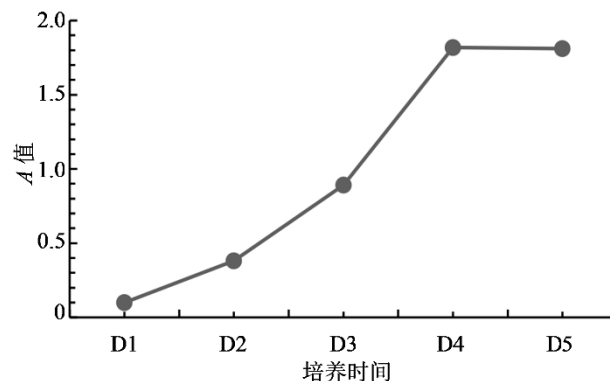


图5 5批脐带MSCs的生长曲线
Fig. 5 Growth curve of five batches of umbilical cord MSCs

分析使用FITC通道(图6)。PBMC组经过72 h的培养后,部分细胞进行分裂,荧光强度递减(图6-A)。PBMC与MSCs共培养组的PBMC极少分裂(图6-B),CFSE法检测PBMC单独培养及与MSCs共培养后PBMC的分裂指数见图7。用Prism 9分析CFSE法检测5批MSCs对PBMC的增殖抑制率为 $(91.20 \pm 0.70)\%$ (图8)。

流式细胞仪检测各组细胞中Ki67的表达量,Ki67代表细胞有丝分裂的情况,PBMC单独培养组Ki67高表达(图6-C),PBMC与MSCs共培养组Ki67低表达(图6-D),Ki67法检测PBMC单独培养及与MSCs共培养后PBMC的分裂指数见图7。Ki67法检测5批MSCs对PBMC的增殖抑制率为 $(89.99 \pm 1.45)\%$ (图8)。用Prism 9对CFSE及Ki67法所得的MSCs对PBMC的增殖抑制率进行配对样本 t 检验, $P=0.335$,2种检测方法所得的结果无统计学差异,说明使用CFSE与Ki67法检测MSCs对PBMC的增殖抑制率结果一致。

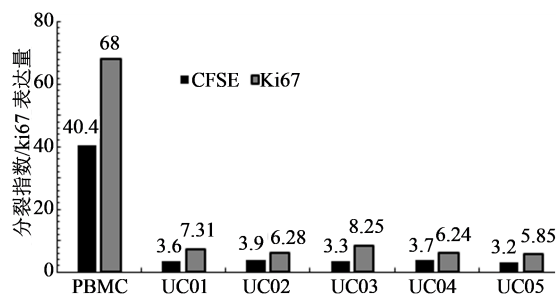


图7 PBMC单独培养及与MSCs共培养后的CFSE分裂指数、Ki67表达量

Fig. 7 CFSE division index and Ki67 expression quantity of PBMC cultured alone and co-cultured with MSCs

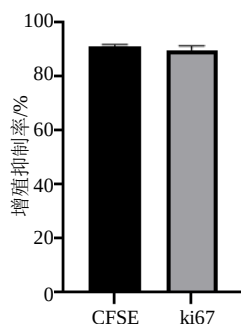


图8 MSCs对PBMC的增殖抑制率

Fig. 8 Proliferation inhibition rate of MSCs on PBMC

4 讨论

目前常用的淋巴细胞增殖检测的方法包括³H-TdR掺入法、CCK8法、CFSE法,但均有各自不足之处。其中³H-TdR掺入法,由于试验过程中需要使用放射性同位素标记,具有潜在的污染,目前应用较少^[11]。CCK8细胞增殖检测试剂盒中主要功能成分为WST-8,化学名为2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐,因此命名为CCK8,CCK8中的WST-8被细胞内脱氢酶氧化还原后生成的橙黄色甲臞染料能够溶解在组织培养基中,生成的甲臞量与活细胞量呈正比,通过酶标仪读取A值,从而检测到细胞增殖状态^[11]。CCK8法操作相对容易,是根据总体活细胞数量来反映MSCs的免疫调控功能,不能通过增殖的机制去说明,并且也无法测定不同淋巴细胞亚群的增殖情况。

现在研究中常用的淋巴细胞增殖检测的方法为CFSE染色法,CFSE是一种可穿透细胞膜的荧光染料,具有与细胞特异性结合的琥珀酰亚胺脂基团和非酶促水解作用的羟基荧光素二醋酸盐基团,因此是良好的细胞标记物,CFSE可穿过细胞膜,不可逆地与细胞内的氨基共价结合偶联到细胞内蛋白。在细胞分裂增殖过程中,CFSE标记的荧光可平均

分配到两个子代细胞中,出现连续的荧光强度递减现象,是目前应用最多的方法^[12-14]。但CFSE法有一定的不足之处:(1)由于CFSE对细胞具有一定的毒性,该方法对CFSE浓度要求较高,如果CFSE浓度较低会限制细胞分裂代数,如果CFSE较高会对细胞造成损伤,影响细胞活性和增殖能力;(2)CFSE染色时间与温度都会影响细胞后续的增殖情况,不能反映淋巴细胞未进行标记的状态下增殖情况。尤其在MSCs免疫调控检测中,不能准确判断PBMC的增殖情况,会直接影响MSCs的免疫调控功能的判断,因此,本研究中心提出使用Ki67方法进行MSCs免疫调控功能的检测。

在进行CFSE法与Ki67法检测PBMC与MSCs共培养前后PBMC的分裂指数时,发现CFSE法检测PBMC组、PBMC与MSCs共培养组的PBMC的分裂指数均低于Ki67法检测的结果,分析可能是由于CFSE对PBMC具有一定的毒性,使用CFSE处理后,细胞的增殖能力略有降低,而Ki67法是分离得到的PBMC没有经过任何染色处理,而是共培养结束后,进行检测时对细胞进行固定、破膜、核内染色,这样更能真实的反映细胞的增殖情况。因此,使用Ki67法检测MSCs对免疫细胞增殖的影响优势在于(1)与³H-TdR掺入法相比可以避免放射同位素的潜在污染;(2)Ki67是一种标记细胞增殖状态的核抗原,主要表达于G₁期、S期、G₂期及有丝分裂间期的细胞,但是在G₀期即静息状态的细胞中不表达,其功能与有丝分裂密切相关,灵敏度高^[15];(3)Ki67法是通过增殖机制来判断免疫细胞的增殖情况,且可以进行不同淋巴细胞亚群的增殖的分析^[16];(4)操作简单,在淋巴细胞增殖及MSCs与淋巴细胞共培养时,无任何检测试剂对细胞增殖能力的干扰,仅需要在共培养后进行核内抗体染色即可^[17],且通过本实验证明使用Ki67法检测MSCs免疫调控功能的可行性。

Ki67作为一种细胞核内抗原,在临床上常作为评价肿瘤进展及预后的指标,在多种实体瘤如胃肠道间质瘤、肺癌、垂体腺瘤、乳腺癌、前列腺癌等^[9,18-21]中应用,本研究依据Ki67的作用机制,将其用于MSCs免疫调控功能评价中,解决了在MSCs功能研究中的技术难题,其从细胞的有丝分裂出发去分析细胞的增殖情况,灵敏度和准确性更高,且操作简单、检测误差小,将Ki67法引入细胞治疗的临床前药学研究中,推动了细胞治疗产业的发展。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Pittenger M F, MacKay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [2] Davies J E, Walker J T, Keating A. Concise review: Wharton's jelly: The rich, but enigmatic, source of mesenchymal stromal cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(7): 1620-1630.
- [3] Beeravolu N, McKee C, Alamri A, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta [J]. *J Vis Exp*, 2017(122): 296-305.
- [4] 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 [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2015, 11(3): 394-407.
- [5] Bonzano C, Canciani B, Olivari S, et al. CFSE: A new method for identifying human limbal stem cells and following their migration in human cornea [J]. *In Vivo*, 2019, 33(6): 1851-1855.
- [6] Wang D D, Huang S S, Yuan X R, et al. The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus [J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(5): 423-431.
- [7] Lopez F, Belloc F, Lacombe F, et al. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes [J]. *Cytometry*, 1991, 12(1): 42-49.
- [8] Hudspeth K, Wang S, Wang J, et al. Natural killer cell expression of Ki67 is associated with elevated serum IL-15, disease activity and nephritis in systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Exp Immunol*, 2019, 196(2): 226-236.
- [9] Zhou Y, Hu W Q, Chen P, et al. Ki67 is a biological marker of malignant risk of gastrointestinal stromal tumors: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(34): e7911.
- [10] Yoshii D, Inomata Y, Komohara Y, et al. Ki67 expression at Kasai portoenterostomy as a prognostic factor in patients with biliary atresia [J]. *BJS Open*, 2020, 4(5): 873-883.
- [11] Mazzocco P, Bernard S, Pujo-Menjouet L. Estimates and impact of lymphocyte division parameters from CFSE data using mathematical modelling [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179768.
- [12] Quah B J C, Parish C R. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation [J]. *J Vis Exp*, 2010, 12(44):2259.
- [13] Banks H T, Choi A, Huffman T, et al. Quantifying CFSE label decay in flow cytometry data [J]. *Appl Math Lett*, 2013, 26(5): 571-577.
- [14] Bocharov G, Luzyanina T, Cupovic J, et al. Asymmetry of cell division in CFSE-based lymphocyte proliferation analysis [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 264.
- [15] Soares A, Govender L, Hughes J, et al. Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific *in vitro* lymphoproliferation [J]. *J Immunol Methods*, 2010, 362(1/2): 43-50.
- [16] Imaizumi K, Suzuki T, Kojima M, et al. Ki67 expression and localization of T cells after neoadjuvant therapies as reliable predictive markers in rectal cancer [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(1): 23-35.
- [17] Kramer E, Herman O, Frand J, et al. Ki67 as a biologic marker of basal cell carcinoma: A retrospective study [J]. *Isr Med Assoc J*, 2014, 16(4): 229-232.
- [18] Garg R, Bal A, Das A, et al. Proliferation marker (Ki67) in sub-categorization of neuroendocrine tumours of the lung [J]. *Turk Patoloji Derg*, 2019, 35(1): 15-21.
- [19] Petry C, Poli J H Z, de Azevedo Dossin I, et al. Evaluation of the potential of the Ki67 index to predict tumor evolution in patients with pituitary adenoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(1): 320-326.
- [20] Hashmi A A, Hashmi K A, Irfan M, et al. Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters [J]. *BMC Res Notes*, 2019, 12(1): 605.
- [21] Hammarsten P, Josefsson A, Thysell E, et al. Immunoreactivity for prostate specific antigen and Ki67 differentiates subgroups of prostate cancer related to outcome [J]. *Mod Pathol*, 2019, 32(9): 1310-1319.

【责任编辑 兰新新】