

间充质干细胞免疫调节作用研究进展

郑杰 周联 综述 王培训 审校 (广州中医药大学免疫研究室, 广州 510405)

中国图书分类号 R392.12 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2007)04-0377-04

骨髓间充质干细胞 (Mesenchymal stem cell, MSCs) 是骨髓中的多能祖细胞, 具有向成骨细胞、成软骨细胞、成脂肪细胞、成肌细胞等多种结缔组织分化的性质, 并可支持造血^[1,4]。体外试验和转基因移植研究中均显示, MSCs 具有较强的免疫调节功能, 近年来对 MSCs 的免疫调节及其临床应用的研究取得了较大进展。

1 MSCs 发现过程

早在 1867 年, 德国病理学家 Cohnheim 在研究创伤愈合时, 提出了骨髓中可能存在非造血组织干细胞的观点。1976 年 Friedenstein 等^[5]证实了骨髓中非造血干细胞的存在, 他们首先报道了骨髓中有小部分黏附细胞在培养过程中可分化形成类似骨或软骨的集落, 推测这种细胞可能是间质细胞的前体细胞, 并将之称为骨髓多能基质干细胞。之后, 一系列研究报道从骨髓中分离到的这些有黏附贴壁能力的非造血干细胞, 可分化成多种成熟的间质细胞, 1991 年 Caplan^[6]将其命名为骨髓间充质干细胞 (MSCs)。MSCs 又称骨髓基质细胞 (Marrow stromal cell, MSC)、基质祖细胞 (Stromal precursor cell)、骨髓基质干细胞 (Bone marrow stromal stem cell)、间充质祖细胞 (Mesenchymal progenitor cell)、成纤维细胞集落形成单位 (Colony-forming unit fibroblastic, CFU-F) 等^[7]。2001 年 Minguell 等^[8]将 MSCs 概括为: 存在于骨髓基质内的非造血细胞来源的细胞亚群, 可在体外扩增, 体外经诱导后可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌腱细胞、肌管、神经细胞与支持造血干细胞的基质细胞。

2 MSCs 分离培养及生物学特征

MSCs 属于骨髓中的单个核细胞, 可通过密度梯度离心和塑料贴附性进行分离, 在含 10% 胎牛血清

作者简介: 郑杰 (1975 年 -), 男, 博士, 主要从事中医药免疫药理研究, 现工作于广东工业大学;

通讯作者及指导教师: 王培训 (1941 年 -), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中西医结合基础研究, E-mail: wpx@gzhtcm.edu.cn。

的低糖 DMEM 培养液中可稳定生长, 第 1、3、5 代细胞的生长曲线相似, 每代细胞可 2.2 倍扩增, 细胞周期研究表明 10% 的 MSCs 处于 DNA 合成期, 细胞表面表达 SH2、SH3、SH4、SB10、SB20、SB21、CD13、CD29、CD44、CD49b、CD90、CD120a 及 CD124 等表面抗原以及纤维连接蛋白和 I 型胶原, 不表达 CD3、CD19、CD33、CD34、CD38、CD45、HLA-DR 等, MSCs 不表达 MHC-II 分子、CD40、CD40L、CD80 (B7-1) 和 CD86 (B7-2), 低表达或不表达 MHC-I 类分子, MSCs 的一些典型的表面标记见表 1^[9,10]。MSCs 经过数十代传代和低温冷冻保存后, 表型和分化潜能不发生明显改变^[11]。成人骨髓中分离得到的 MSCs 经培养后为异质细胞, 形态学上存在差异, 以 3 cells/cm² 的低密度进行培养, 可观察到几种形态不同的细胞: 形体较大, 呈梭形而增殖较慢的细胞和快速增殖的细胞; 此外, 还有一种较小的细胞, 其直径约 7 μm, 以对称或不对称方式增殖, 增殖相当迅速, 该类细胞称为 RS (Rapidly self-renewing) 细胞。在同一培养体系中, RS 细胞的上述抗原表达较弱, 而 CD117 和 KDR 的表达比成熟 MSCs 要高, RS 同样具有多向分化潜能, 只是 RS 细胞在自我更新和多向分化上更加原始^[12,13]。

3 MSCs 免疫调节作用

MSCs 不仅参与调节髓系细胞的生长, 也参与淋巴细胞的发育, 是构成早期淋巴细胞生长的微环境成分之一。研究表明 MSCs 表达胸腺上皮细胞相似的表面分子, 提示 MSCs 可能在骨髓微环境的免疫调节中发挥重要作用, 在骨移植同时进行骨髓移植, 发现供者基质细胞能够从骨髓转移至胸腺, 并在其中参与胸腺细胞的阳性选择^[14]。尽管对 MSCs 与免疫系统的关系并不清楚, 但现有的研究表明 MSCs 可通过不同机制调节机体免疫系统。体外研究提示, MSCs 能够抑制淋巴细胞增殖反应和调节淋巴细胞部分细胞因子的分泌。

MSCs 不能刺激同种异体 T 细胞增殖, 也不刺激其表达活化分子, 如 CD25、CD134 等^[15]。用 IFN-γ 诱导 MSCs, 使 MSCs MHC-I 抗原表达增高, 并表达 MHC-II 抗原, 甚至再加入 CD28 抗体以传递共刺激

表 1 人骨髓间充质干细胞的典型表面标记
Tab. 1 Phenotypic characterization of human mesenchymal stromal cultures

Common name	CD locus	Detection
Adhesion molecules		
ALCAM	CD166	+
ICAM-1	CD54	+
ICAM-2	CD102	+
ICAM-3	CD50	+
E-selectin	CD62E	-
L-selectin	CD62L	+
P-selectin	CD62P	+
LFA-3	CD58	-
Cadherin 5	CD144	-
PECAM-1	CD31	-
NCAM	CD56	+
HCAM	CD44	+
VCAM	CD106	+
Hyaluronate receptor	CD44	+
Additional markers		
T6	CD1a	-
CD3 complex	CD3	-
T4, T8	CD4, CD8	-
Tetraspan	CD9	+
LPS receptor	CD14	-
LewisX	CD15	-
—	CD34	-
Leukocyte common antigen	CD45	+
5 terminal nucleotidase	CD73	-
B7-1	CD80	-
HB-15	CD83	-
B7-2	CD86	-
Thy-1	CD90	+
Endoglin	CD105	+
Growth factors and cytokine receptors		
IL-1R (α and β)	CD121a, b	+
IL-2R	CD25	-
IL-3R	CD123	+
IL-4R	CD124	+
IL-6R	CD126	+
IL-7R	CD127	+
Inteferon γ R	CDw119	+
TNF- α -1R	CD120a	+
TNF- α -2R	CD120b	+
FGFR	+	+
PDGFR	CD140a	+
Transferrin receptor	CD71	+
Integrins		
VLA- α 1	CD49a	+
VLA- α 2	CD49b	+
VLA- α 3	CD49c	+
VLA- α 4	CD49d	-
VLA- α 5	CD49e	+
VLA- α 6	CD49f	+
VLA- β chain	CD29	+
β_4 integrin	CD104	+
LFA-1 α chain	CD11a	-
LFA-1 β chain	CD18	-
Vitronectin R α chain	CD51	-
Vitronectin R β chain	CD61	+
CR4 α chain	CD11c	-
Mac1	CD11b	-
MUC18	CD146	+
BST-1	CD157	+

分子 B7 仍不能引起异体 T 细胞增殖^[16]。在同种异体的混合淋巴细胞培养体系 (Mixed lymphocyte culture, MLC) 中加入 MSCs, 几乎使 T 细胞增殖被完全抑制, 该抑制作用是非 MHC 限制性的, 第三者 MSCs (非刺激源非反应源) 也有相似的效应^[17,18]。MSCs 可抑制 PHA 刺激的 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞增殖, 可显著降低 PHA 刺激后 T 细胞 CD25、CD38 和 CD69 的表达, 可抑制 MLC 和 PHA 引起的淋巴细胞增殖, 这种抑制作用具有剂量依赖性, 淋巴细胞增殖的抑制程度随 MSCs 数量的增加而加强, 当 MSCs 与淋巴细胞的比例为 1:100 时仍可对 T 细胞的增殖产生一定程度的抑制作用^[19,20]。MSCs 的 T 细胞抑制作用不能被抗 SDF-1、OPG、HGF 和 TGF- β 抗体所恢复, 在包含 MSCs 的 PHA 刺激的粒细胞培养中, 加入鸟嘌呤核苷, 不影响淋巴细胞的增殖。MSCs 可抑制 CD4⁺ 和 CD8⁺ 淋巴细胞的增殖, 并能降低活化标记的表达^[21]。

来源于成人骨髓、胎肝及小鼠、狒狒的 MSCs 均可抑制由非特异性丝裂原 (刀豆蛋白、植物血凝素等) 或同种异体甚至异种刺激引起的淋巴细胞增殖反应^[17,20,22,23]。

MSCs 引起 Th1 细胞 IFN- γ 分泌减少, 而使 Th2 分泌 IL-4 增加^[24]。T 细胞和 MSCs 共培养后, CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞亚群和 CD8⁺ T 细胞亚群在共培养后显著增加^[25]。

以上资料说明在体外实验中, 无论是同基因还是异基因的 MSCs 都能有力地抑制淋巴细胞增殖反应, 包括细胞和非特异性丝裂原刺激的 T 细胞增殖反应。MSCs 的免疫调节成为目前移植领域研究的新热点, 对其可能的机制进行了研究, 目前认为主要有以下几方面。

在加入 MSCs 的 MLC 中同时加入抗 TGF- β_1 和 HGF, T 细胞增殖反应得到了一定程度的恢复, 故 MSCs 的抑制效应可能通过 TGF- β_1 和 HGF 介导^[21]。以 CD3/CD28 抗体联合刺激小鼠 T 细胞, 加入 MSCs 后, T 细胞增殖被显著抑制, MSCs 的免疫抑制效应无需抗原递呈细胞参与^[26]。

MSCs 与成熟树突状细胞 (DCs) 共培养后 CD83 的表达显著降低, 使其处于不成熟状态; 同时, 提高了 DCs 抗原提呈分子 HLA-DR、CD1a 和共刺激分子 CD80 和 CD86 的表达, 下调了 IL-12 的分泌; 经 MSCs 处理的成熟 DCs 对异基因 T 细胞的刺激能力减弱; MSCs 能够抑制单核细胞分化为 DCs, 该作用是可逆的, 且不需细胞直接接触; 证明 MSCs 对特异性免疫应答具有相当的调节能力^[27]。MSCs 可引起

成熟的 DC1 细胞的 TNF- α 分泌降低, DC2 分泌 IL-10 增加, NK 细胞 IFN- γ 分泌减少, 实验表明了转基因 MSCs 和上述免疫细胞之间的作用, 提供体外 MSCs 介导的免疫耐受的机制, 为移植排斥反应以及自身免疫性疾病的治疗提供了实验依据^[24]。

对 MSCs 分化为骨、软骨和脂肪细胞后的免疫特性研究表明, 分化细胞表面有 HLA- I 分子表达而无 HLA- II 分子表达, Western blot 法可检测到细胞内表达 HLA- II 分子; 以分化的细胞作为刺激细胞, 不引起同种异体淋巴细胞增殖反应, 甚至分化细胞经 IFN- γ 刺激也未发生该反应^[28]。

4 动物实验及临床研究

MSCs 不表达 MHC- I 类分子和 FasL, 不表达或低表达 MHC- I 类分子, 也不表达共刺激分子 B7-1、B7-2、CD40、CD40L, 提示 MSCs 在体内很难被免疫系统识别, 输注到转基因宿主体内后, 能够逃逸宿主的免疫监视系统, 在宿主体内长期存活^[29]。有研究表明 MSCs 无免疫原性, 能够逃逸细胞毒性 T 细胞和自然杀伤细胞的作用, 是一类免疫特许细胞, 因此, 使 MSCs 成为理想的细胞治疗材料, 即使在 HLA 不匹配的个体间进行移植也不需要宿主采用免疫抑制, 在细胞替代治疗中具有良好应用前景^[9]。这些现象的发现为 MSCs 在免疫调节中的应用提供了基础。

将黑色素瘤细胞与 MSCs 同时输注给小鼠, 可明显促进肿瘤细胞在小鼠体内的生长, 因而在未来的有关 MSCs 的临床研究中应该充分考虑这种潜在的副作用^[23]。Bartholomew 等^[20]观察到狒狒的 MSCs 除了体外能够抑制混合淋巴细胞培养中 T 细胞增殖外, 在皮肤移植的同时体内一次性静脉注射供者或第三者 MSCs, 可以延长移植皮片的存活时间, 其效果与当前临床应用的免疫抑制剂环孢霉素 A 相当。接受同种异体心脏移植的大鼠输注基因标记的 MSCs 后, 在骨髓和排斥的心脏组织中发现了标记细胞, 免疫排斥组织中的标记细胞表现为成纤维样, 其中一小部分向心肌细胞分化, 说明标记细胞能够迁移至免疫排斥组织中, 并参与组织修复^[30]。

Lazarus 等^[31]报道一组临床接受同种转基因骨髓移植患者, 其中同时接受同种转基因 MSCs 者的移植排斥疾病 (Graft versus host disease, GVHD) 发生率明显降低。Katarina 以转基因造血干细胞移植治疗一个 9 岁患急性淋巴细胞白血病的男孩, 发生了 GVHD, 通过移植其母亲的 MSCs, 其 GVHD 症状和相关的临床病理学指征得到了明显改

善, 该患者 1 年后仍生存正常, 可见 MSCs 在体内具有相当的免疫调节作用^[32]。MSCs 成为 GVHD 治疗的一种新的方法^[33]。MSCs 可通过诱导 T 细胞无反应性, 改善实验性自身免疫病脑脊髓炎的病情, MSCs 在自身免疫病的治疗中具有良好的应用前景^[34,35]。

5 展望

综上所述, 过去几年中对 MSCs 的免疫调节作用及其临床应用的研究取得了长足进展。结合其促进造血重建的作用, 可以预见 MSCs 在防治 GVHD 和宿主抗移植病 (免疫排斥) 中能发挥有效作用。进一步的研究将拓展 MSCs 的应用范围, 扩大 MSCs 作为细胞治疗的适应症, 为治疗疾病提供新策略。MSCs 具有广阔的应用前景, 但还有许多问题有待解决, 如 MSCs 的起源, MSCs 特定功能的调控机制, 体外操作对其生物学特性的影响等。进一步深入开展 MSCs 免疫调节功能的基础研究, MSCs 体内免疫调节效应研究等具有重要意义。另外, 如何充分发挥中医药多途径、多靶点、毒副作用小等优势, 通过实验研究筛选有效的中药及其有效成分, 在动物体内外对 MSCs 进行干预, 值得进一步研究。

6 参考文献

- 1 Bruder S P J N, Ricalton N S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration [J]. Clin Orthop, 1998; 355(Suppl):247-256.
- 2 Yong R G B D, Weber W. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair [J]. J Orthop Res, 1998; 16: 406-413.
- 3 Spees J L O S, Ylostalo J. Differentiation, cell fusion and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stromal [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003; 100:2397-2402.
- 4 Koc O N G S, Cooper B W. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expand marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy [J]. J Clin Oncol, 2000; 18:307-316.
- 5 Friedenstein A J, Gorskaja J F, Kulagina N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs [J]. Exp Hematol, 1976; 4(5): 267-274.
- 6 Caplan A I. Mesenchymal stem cells [J]. J Orthop Res, 1991; 9(5): 641-650.
- 7 Bianco P, Riminucci M, Gronthos S *et al.* Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications [J]. Stem Cells, 2001; 19(3): 180-192.
- 8 Minguell J J, Ericas A, Conget P. Mesenchymal stem cells [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2001; 226(6): 507-520.
- 9 Niemeyer P, Seckinger A, Simank H G *et al.* Allogenic transplantation of human mesenchymal stem cells for tissue engineering purposes: an in vitro study [J]. Orthopade, 2004; 33(12): 1346-1353.
- 10 Deans R J, Moseley A B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses [J]. Exp Hematol, 2000; 28(8): 875-884.
- 11 Zhang B, Wang F, Deng L *et al.* Isolating and culturing rat marrow

- mesenchymal stem cells and studying their phenotypical and functional properties [J]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2003; 34(4): 738-741.
- 12 Prockop D J, Sekiya I, Colter D C. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells [J]. *Cytotherapy*, 2001; 3(5): 393-396.
 - 13 Zhou Z, Jiang E L, Wang M *et al.* Comparative study on various subpopulations in mesenchymal stem cells of adult bone marrow [J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2005; 13(1): 54-58.
 - 14 Li Y H H, Inaba M. Evidence for migration of donor bone marrow stromal cells into recipient thymus after bone marrow transplantation plus bone grafts: A role of stromal cells in selection [J]. *Exp Hematol*, 2000; 28:950-960.
 - 15 McIntosh K B A. Stromal cell modulation of the immune system [J]. *Graft*, 2000; 3:324-328.
 - 16 Tse W T P J, Beyer W M. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation [J]. 2003; 75(3):389-397.
 - 17 Blanc K L T L, Sundberg B. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte culture and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex [J]. *Scandinavian J Immunology*, 2003; 57(1):11-20.
 - 18 Klyushnendova E S V, Mosca J. Human mesenchymal stem cells induce unresponsiveness in preactivated but not native alloantigen specific T cells [J]. *Exp Hematol*, 1999; 27:122.
 - 19 Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli [J]. *Blood*, 2002; 99(10): 3838-3843.
 - 20 Bartholomew A S C, Siatakas M. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo [J]. *Exp Hematol*, 2002; 30:42-48.
 - 21 Le Blanc K, Rasmusson I, Gotherstrom C *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohemagglutinin-activated lymphocytes [J]. *Scand J Immunol*, 2004; 60(3): 307-315.
 - 22 Gotherstrom C R O, Westgren M. Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2003; 32:265-272.
 - 23 Djouad F P P, Bony C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals [J]. *Blood*, 2003; 102:3837-3844.
 - 24 Aggarwal S, Pittenger M F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [J]. *Blood*, 2005; 105(4): 1815-1822.
 - 25 Ning H M, Jin J G, Hu J W *et al.* Effect of human bone marrow mesenchymal stem cell on allogeneic T lymphocyte phenotype in vitro [J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2005; 13(1): 43-49.
 - 26 Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D *et al.* Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness [J]. *Blood*, 2005; 105(5): 2214-2219.
 - 27 Jiang X X, Zhang Y, Liu B *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells [J]. *Blood*, 2005; 105(10): 4120-4126.
 - 28 Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K *et al.* HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells [J]. *Exp Hematol*, 2003; 31(10): 890-896.
 - 29 Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005; 11(5): 321-334.
 - 30 Wu G D N J, Jin Y S. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection [J]. *Transplantation*, 2003; 75(5): 679-685.
 - 31 Lazarus H C P, Devine S. Role of mesenchymal stem cells in allogeneic transplantation. Early phase I clonical results [J]. *Blood*, 2000; 96:392.
 - 32 Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells [J]. *Lancet*, 2004; 363(9419): 1439-1441.
 - 33 Zappia E, Casazza S, Pedemonte E *et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T cell anergy [J]. *Blood*, 2005; (4):1496-1501.
 - 34 Svennilson J. Novel approaches in GVHD therapy [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2005; 35(Suppl 1):65-67.
 - 35 El-Badri N S, Maheshwari A, Sanberg P R. Mesenchymal stem cells in autoimmune disease [J]. *Stem Cells Dev*, 2004; 13(5): 463-472.

[收稿 2005-10-29]

(编辑 许四平 张晓舟)

· 征订启事 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》2007 年度征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》是由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的国家级医学学术期刊(刊号为 CN31-1725/R), 双月刊。本刊为中国肿瘤生物治疗领域唯一的高级学术刊物, 重点报道我国肿瘤生物治疗方面基础理论与临床的最新研究成果、新实验技术及其学术进展, 宣传我国肿瘤生物治疗的政策和发展策略。主要栏目有述评、专家论坛、论著、研究快报、学术争鸣、技术方法、文献综述、专题讲座、科技动态等。以肿瘤防治专业的中高级临床和科研工作者、医药院校师生及其他相关学科的科技人员为读者对象。

《中国肿瘤生物治疗杂志》每期定价 8.00 元, 全年定价 48.00 元, 邮发代号: 4-576, 请通过邮局订阅。若错过, 可从本刊编辑部补订, 请将 48.00 元(优惠免邮资)寄本刊编辑部, 并注明详细通讯地址及邮政编码, 编辑部将负责如期寄至您的手中。

联系地址: 上海市翔殷路 800 号第二军医大学免疫楼《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部 邮政编码: 200433

联系人: 王莹, 韩丹

联系电话: 021-55620605-22 021-25070316-22

传真: 021-25074547

E-mail: cjb@biother.org <http://www.biother.org>