

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2006)04-0433-03

间充质干细胞对混合淋巴细胞反应体系中 T 淋巴细胞的免疫调节作用

宣 隽, 邱国强, 谢晓宝* (苏州大学附属第三医院血液科, 江苏 常州 213003)

Immune modulatory effects of mesenchymal stem cells on T lymphocytes in mixed lymphocyte culture

XUAN Min, QIU Guo-qiang, XIE Xiao-bao*

Department of Hematology, Third Affiliated Hospital, Soochow University, Changzhou 213003, China

[Abstract] AIM: To investigate the features of immune modulatory function derived from the interaction of mesenchymal stem cells (MSC) with T lymphocytes in vitro. METHODS: Normal human bone marrow mononuclear cells were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient, then ex vivo MSCs were cultured, expanded, and obtained after the third passage. The MSCs were added to the two-way mixed lymphocyte culture (MLC) according to different proportion. On day 3 and 5, proliferation of T lymphocytes in each group of MLC-MSC and ctrl-MLC was measured with MTT colorimetry. The surface phenotypes of T lymphocytes were analyzed by flow cytometry before and after coculture of MLC with MSC. RESULTS: MLC added with MSC induced dose- and time-dependent inhibition of T lymphocytes proliferation. $CD4^+$ T cell subsets were not suppressed so obviously as $CD8^+$ T cell subsets. $CD25$ expression of T lymphocytes appeared to be lower in MLC-MSC than in ctrl-MLC. But the $CD4^+CD25^+$ double positive cells were evidently increased versus control cultures without MSC. The HLA-DR of activated T lymphocytes was slightly decreased compared to the control. CONCLUSION: MSC can significantly suppress T lymphocytes' proliferation, especially $CD8^+$ T cell subsets (CTL). In addition, it can down-regulate the expression of some special surface marker such as $CD25$ and HLA-DR, on the activated T lymphocytes.

[Keywords] mesenchymal stem cells (MSC); mixed lymphocyte culture; surface phenotype

[摘要] 目的: 探讨间充质干细胞(MSC)在体外对 T 淋巴细胞免疫调节作用的特点。方法: 通过 Ficoll 梯度密度离心法分离出正常人骨髓单个核细胞, 体外培养扩增 MSC, 获取第 3

代细胞。将其按照不同的比例加入双向混合淋巴细胞培养(MLC)体系中, 在第 3、5 天, 采用 MTT 比色法检测各组 MLC 中的 T 淋巴细胞的增殖情况, 再用流式细胞术分析其与 MSC 共孵育前后细胞表面标记的变化情况。结果: 加入了 MSC 的 MLC 体系中, MSC 对 T 淋巴细胞的增殖抑制具有剂量依赖性, 且随着时间延长, 抑制程度增强; 其中, $CD4^+$ T 细胞亚群受抑不如 $CD8^+$ T 细胞亚群显著; 另外, T 淋巴细胞表面 $CD25$ 的表达虽然较对照组有所下降, 但是 $CD4$ 、 $CD25$ 共表达的细胞却较对照组有明显的上升趋势。T 淋巴细胞表面活化抗原 HLA-DR 的表达较对照组有轻度减低。结论: MSC 在体外能够明显抑制 T 淋巴细胞的增殖, 其主要是针对 $CD8^+$ T 细胞(CTL)。另外, 它还能下调活化 T 淋巴细胞上一些较特异的表面标记 $CD25$ 和 HLA-DR 的表达。

[关键词] 间充质干细胞(MSC); 混合淋巴细胞培养; 表面标记

[中图分类号] R392.12

[文献标识码] A

存在于人骨髓中的间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是形成骨髓内环境的主要前体细胞^[1], 具有可塑性, 可移植性, 以及可诱导免疫细胞的低反应性的能力。MSC 对异体 T 细胞的免疫抑制作用^[2]为其与骨髓造血干细胞混合移植提供了优越可行的途径。但是, 就 MSC 究竟针对抑制于哪一种 T 细胞以及其免疫抑制机制, 还不十分明确。本研究旨在初步探讨 MSC 对 MLC 体系中的 T 细胞的增殖, 活化, 以及其表面特异性标记的调节作用, 从而为临床 MSC 的移植提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 实验的骨髓标本取自成人健康骨髓供者。Ficoll-hypaque 分离液购自上海试剂二厂。肝素、低糖 DMEM (L-DMEM), 胎牛血清(FBS)和 RPM 1640 均为 GIBCO 公司产品。胰蛋白酶为 SIGMA 公司产品。FITC(或 PE)的鼠抗人 $CD3$ 、 $CD4$ 、 $CD8$ 、 $CD29$ 、 $CD44$ 、 $CD34$ 、 $CD45$ (PerCP)、 $CD71$ 、 $CD117$ 、 $CD13$ 、 $CD25$ 、HLA-DR 等单克隆抗体(mAb)及同型对照 γ_1/γ_2a 购自 BD 公司。流式细胞仪(FAC-Scalibur 型)为 BD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 MSC 的体外培养及鉴定 无菌条件下采集健康骨髓供者骨髓 5~8 mL, 肝素抗凝, 以 Ficoll 分离液分离, 收集单个核细胞层, 用含 20 mL/L FBS 的 L-DMEM 洗涤 2 次, 以 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ /L 的细胞密度接种于培养瓶中, 培养液为含

收稿日期: 2005-07-07; 接受日期: 2005-08-24

作者简介: 宣 隽(1979-), 女, 江苏常州人, 硕士生

* Corresponding author Tel: 0519-6180883

E-mail: xuamin17@ sina.com

100 mL/L FBS的 L-DMEM, 每瓶 5 mL, 置于 37℃、50 mL/L CO₂ 培养箱中培养, 72 h后, 每隔 3~4 d换液 1次。原代培养细胞贴壁对接度达 80%~90%以上时, 吸去培养液, 用无血清 L-DMEM液洗涤 2次。加入 37℃预温的 2.5 g/L胰蛋白酶 2 mL消化 (约 1~2 min)后, 加入 100 mL/L胎牛血清的 L-DMEM液终止, 洗涤 1次, 重悬后按 1:2比例分瓶进行传代培养, 并标记为 P1细胞。传代培养过程中每 2~3 d换液 1次, 细胞贴壁达 90%后, 重复以上操作进行传代, 并标记为 P2。用胰蛋白酶消化收获细胞, PBS洗涤后, 分别与 CD71、CD34、HLA-DR (FITC-)与 CD13、CD29、CD44、CD117、CD45 (PE-/PerCP-)mAb低温避光共孵育 30 min后, 洗涤稀释, 以流式细胞术检测。

1.2.2 单个核细胞 (MNC)悬液的获取 取健康人外周血 20 mL, 肝素抗凝。用 Ficoll分离, RPMI 1640液洗涤 2遍。镜下记数后, 用培养液将细胞密度调整至 2×10^9 /L备用。取其中 1 mL的 MNC, PBS洗涤 2遍后加入荧光标记的 CD3、CD4、CD8 mAb各 10 μ L。对照为 Mouse IgG1-FITC/PE, 低温避光孵育 30 min后用 PBS稀释, 流式细胞术检测 MNC中 T细胞的纯度。将两组 HLA不同来源的外周血所分离的 MNC, 以每组 2×10^9 /L, 1 mL混合在 24孔板中。

1.2.3 共孵育体系反应的制备 以 MLC体系中的 T细胞为反应细胞 (R), MSC(预先用 25 mg/L的丝裂霉素于 37℃预处理 30 min, 抑制其过度分化)作为刺激细胞 (S)。将 2×10^8 个/L反应细胞与相应不同浓度的刺激细胞 (S:R 分别为 1:20, 1:40, 1:80)加入 24孔培养板中, 并且设置对照。放入 37℃, 50 mL/L CO₂ 的培养箱中培养 1~7 d, 每 3 d再加入一定量含 100 mL/L FBS的培养液维持营养。分为 3组: 即 A组: 单独培养 T细胞组; B组: MLC组; C组: MSC与 MLC共孵育组 (1:20, 1:40, 1:80)。

1.2.4 MTT法评估 T细胞受抑情况 分为 4组: A组 (阴性对照组): 单独培养 T细胞组; B组 (阳性对照组): MLC组; C组 (共孵育组): MLC中加入不同浓度的 MSC (S:R 为 1:20, 1:40, 1:80)组; D组 (背景消除组): 单独培养 MSC组。将其加入 96孔细胞培养板中, 调整反应体系至 200 μ L/孔, 每组设 3个复孔, 于 37℃、50 mL/L CO₂ 培养箱中培养至第 3~5天。终止反应前 4 h, 每孔加入 MTT (5 g/L) 20 μ L, 继续孵育 4 h后, 弃上清, 加入酸化异丙醇 (含 0.04 mol/L的 HCl) 200 μ L/孔终止, 待结晶完全溶解后, 用酶标仪于波长 570 nm处测定 A值。并计算其抑制率 (SR): $SR = [1 - (\text{实验组 A值} - \text{阴性对照组 A值}) / (\text{阳性对照组 A值} - \text{阴性对照组 A值})] \times 100\%$ (其中: 实验组 A值 = 共孵育组 A值 - 背景消除组 A值)。

1.2.5 T细胞亚群及其表面活化标记的检测 分别于 MSC与 MLC孵育前, 共同孵育后第 3天, 第 5天采用流式细胞术直接免疫荧光标记法检测各组 T细胞亚群的百分比以及 T细胞的活化标记 CD25、HLA-DR。

1.2.6 统计学分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对或独立 t检验和一元方差分析, 应用 SPSS10.0 数据统计软件分析实验结果。

2 结果

2.1 hBM MSCs的形态学观察 骨髓单个核细胞接种于 T-25 cm² 培养瓶后, 2~3 h细胞开始贴壁, 呈圆形或多角型散在分布, 72 h后半量换液, 细胞贴壁较牢固, 部分聚集为团, 以后每 3~4 d全量换液, 7~9 d细胞呈长梭状生长并且有集落生成。20 d左右细胞长满瓶底, 交叉成网格状, 旋涡状。传代后细胞生长迅速, 平均 3~4 d再次传代, 形态比较均一, 胞体较原代稍大 (图 1)。

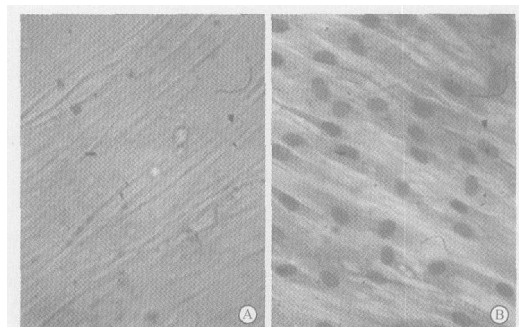


图 1 培养的 MSC形态

Fig 1 Morphology of mesenchymal stem cell

A: Mesenchymal stem cell (MSCs) from human bone marrow cultured for 10 days (magnification: $\times 200$); B: MSCs stained by Wright-Giemsa cultured for 10 days (magnification: $\times 200$).

2.2 hBM MSCs的表型鉴定及外周血 MNC表面抗原 CD3的检测 流式细胞术所测得的 MSC表面标记为 CD13、CD29、CD44、CD71表达阳性; 而 CD34、CD45、CD117、HLA-DR呈阴性表达 (图 2)。

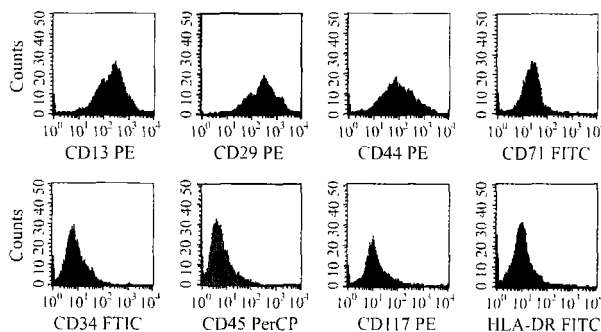


图 2 MSC的表面标记

Fig 2 Surface antigens of human mesenchymal stem cells detected by flow cytometry

MSCs were positive for CD13, CD29, CD44, CD71 and negative for CD34, CD45, CD117, HLA-DR.

流式细胞术检测结果显示经本实验方法分离所获的人外周血单个核细胞表面抗原 CD3的比例为 $(72.94 \pm 6.7)\%$ 。

2.3 MSC对 MLC中 T细胞增殖能力的影响 MSC与 MLC体系共孵育第 3天时, MTT法的结果显示阳性对照组较阴性对照组的 A值明显上升, 说明 MLC体系中 T淋巴细胞互相刺激引起增殖活跃, 而加入了 MSC的实验组 A值较其有显著下降, 显示出 MSC在体外对 T淋巴细胞的抑制特性, 并且其抑制作用随着加入的浓度升高而增强, 以 1:20 (S:R) 组最为明

显, 抑制率 (SR) 为 $(82.96 \pm 1.11)\%$; 其次是 1:40 组 [SR 为 $(56.63 \pm 0.77)\%$], 1:80 组 [SR 为 $(38.83 \pm 0.63)\%$], 但是后两组的组间差别不是很明显 ($P > 0.05$, 表 1)。在 MSC 与 MLC 体系共孵育第 5 天时, 3 个实验组 (1:80, 1:40, 1:20) 的 A 值均有轻度上升, 抑制率分别为 $(91.32 \pm 3.61)\%$ 、 $(62.44 \pm 2.40)\%$ 、 $(58.7 \pm 2.11)\%$, 较第 3 天时抑制效果略有增强。

表 1 各组 MTT 测得的 A 值改变

Tab 1 A value in control and experiment groups ($n=7$, $\bar{x} \pm s$)

Group	A ₅₇₀ value	P value		
Negative control	0.3835 ± 0.063			
Positive control	0.8048 ± 0.087	<0.05		
S:R (1:80)	0.6124 ± 0.103	<0.05	<0.05	
S:R (1:40)	0.5096 ± 0.089	<0.05	<0.05	>0.05
S:R (1:20)	0.3723 ± 0.075	<0.05	<0.05	<0.05

2.4 MSC 对 MLC 中 T 细胞亚群及其表面标记的影响

MSC 与 MLC 共培养 5 d 后, $CD3^+ CD4^+$ T 淋巴细胞各组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) $CD3^+ CD8^+$ T 淋巴细胞的比例则较对照组有明显下降, 并呈现一定的量效关系 ($P < 0.05$, 图 3), $CD4^+ / CD8^+$ 值略有上升。CD25 在实验组中的表达略有下降 ($P < 0.05$), 但是 $CD4^+ CD25^+$ T 细胞, 即总体活化 T 辅助细胞的数量有所上升 ($P < 0.05$), 其占 $CD3^+ CD4^+$ T 淋巴细胞的百分比则显著增加。另外, T 细胞表面活化抗原 HLA-DR 的表达较对照组却有轻度减低, 但是组间差异并无统计学意义。

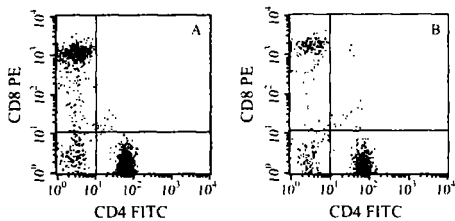


图 3 CD4 和 CD8 在 MLC 组以及实验组 (S:R=1:20) 中的表达

Fig 3 Expressions of CD4 and CD8 in control MLC and group A (S:R=1:20)

A: CD4 and CD8 in ctrl MLC (CD4:54.72% CD8:32.63%); B: CD4 and CD8 in group A (S:R=1:20) (CD4:56.61% CD8:26.98%).

3 讨论

MSC 作为成体干细胞具有多向分化的潜能^[3]。另外, 它还可以通过分泌细胞因子、表达自身抗原和形成滋养层来辅助造血干细胞 (HSC) 的生长扩增、成熟分化和黏附归巢等过程。近些年来, 一些体外实验和动物模型则证实了 MSC 还具有较强的免疫调节的作用^[4], 尤其是作用于 T 淋巴细胞。但是其中的途径和机制还不清楚, 有的人认为是通过分泌特殊的细胞因子^[5]或者吡啶胺 2, 3 二氧化酶 (IDO) 抑制途径而间接抑制^[6]。还有的研究则显示细胞间的直接接触也必不可少^[7]。MSC 的 T 淋巴细胞抑制性, 可能会为其与 HSC 共同移植后可能产生的急性移植病 (aGVHD) 带来可行的预防和解决方法。

本实验中采用了 HLA 不同 T 细胞组成的 MLC

体系模仿简单的移植后免疫环境, 而 MSC 因为已被确认为非抗原提呈细胞, 且在组织工程中被证实不易被宿主免疫系统识别排斥^[8], 所以实验采用了第 3 方来源体外扩增后的 MSC 作为实验刺激细胞。结果证实, 经体外扩增 hMSC 与 MLC 一起共同孵育后, 能明显的抑制体系中 T 淋巴细胞的增殖, 且在一定浓度范围内呈量效和时效正比。T 细胞作为反应细胞, 其中以 $CD8^+$ T 细胞亚群受抑比较明显, 此与 Djouad 等^[9]的实验结论相似。而 IL-2 低亲和性受体 CD25 (即 IL-2R α) 的表达虽然较对照组有所下降, 但是 CD4 CD25 共表达的细胞, 即总的已活化的 T 辅助细胞数量有明显上升趋势。估计可能 $CD4^+ CD25^+$ 调节性 T 细胞也参与了 MSC 的免疫抑制效应过程, 从而抑制了效应性 T 细胞, 有待进一步的探讨。另外, 共孵育体系中活化 T 细胞所表达的 HLA-DR 分子较对照组有轻度下降, 结合活化 T 淋巴细胞表面抗原 CD25 的减低, 我们推测 MSC 不只是抑制 T 淋巴细胞的增殖, 而且可能还干扰了 T 淋巴细胞的活化途径。

参考文献:

- [1] Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo [J]. Transplantation. 1974, 17(4): 331-340.
- [2] Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex [J]. Scand J Immunol. 2003, 57(1): 11-20.
- [3] 庞永刚, 崔鹏程, 陈文弦, 等. 人骨髓间质干细胞作为骨、软骨组织工程种子细胞的实验研究 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(3): 306-309.
- [4] Angoulvant D, Clerc A, Benchalal S, et al. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens [J]. Biotheology. 2004, 41(3-4): 469-476.
- [5] 陈健琳, 郭子宽, 徐晨, 等. 间充质干细胞分泌 TGF- β 1 抑制异体 T 细胞反应性 [J]. 中国实验血液学杂志, 2002, 10(4): 285-288.
- [6] 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 [J]. Blood. 2004, 103(12): 4619-4621.
- [7] Krampert M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide [J]. Blood. 2003, 101(9): 3722-3729.
- [8] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo [J]. Exp Hematol. 2002, 30(1): 42-48.
- [9] Djouad F, Plence P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals [J]. Blood. 2003, 102(10): 3837-3844.