

骨髓间充质干细胞抑制再生障碍性贫血患者外周血T细胞增殖的实验研究*

刘增慧^{1,2}, 肖 扬¹, 蒋祖军¹, 李 力¹, 高 颀¹, 李勇华¹, 李 利¹, 王耀春¹, 邝丽萍¹

Experimental study on bone marrow mesenchymal stem cells inhibiting T lymphocytes proliferation in patients with aplastic anemia

Liu Zeng-hui^{1,2}, Xiao Yang¹, Jiang Zu-jun¹, Li Li¹, Gao Yang¹, Li Yong-hua¹, Li Li¹, Wang Yao-chun¹, Kuang Li-ping¹

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have found bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) have immunosuppressive effects. T lymphocytes in patients with aplastic anemia (AA) are abnormal activatory and proliferous.

OBJECTIVE: To study the inhibitory effects of BMSCs on T lymphocyte proliferation *in vitro* in AA patients.

METHODS: T lymphocytes were isolated from the peripheral blood of patients with AA and stained with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA SE), and then co-cultured with BMSCs at 1:3 ratio using closing-contact and Transwell methods. Phytohemagglutinin was added to stimulate T lymphocytes proliferation. Besides, negative and positive controls were set.

RESULTS AND CONCLUSION: Flow cytometry was used to detect the T cell proliferation. CFDA SE staining analysis showed that T lymphocyte proliferation in closing-contact group was much lower than positive control ($P < 0.01$). T lymphocyte proliferation in Transwell group was lower than positive control ($P < 0.05$). Besides, T lymphocyte proliferation in closing-contact group was much lower than Transwell group ($P < 0.01$). BMSCs can inhibit abnormal proliferation of T cells in patients with AA possibly through closing contact and secreting some cytokines, which makes it possible to correct the immune abnormalities in AA. Furthermore, the closing-contact mechanism may play a major role in inhibiting T cell proliferation.

Liu ZH, Xiao Y, Jiang ZJ, Li Li, Gao Y, Li YH, Li L, Wang YC, Kuang LP. Experimental study on bone marrow mesenchymal stem cells inhibiting T lymphocytes proliferation in patients with aplastic anemia. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(36): 6679-6682. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 既往研究发现骨髓间充质干细胞具有免疫抑制作用, 而再生障碍性贫血患者存在 T 淋巴细胞异常活化及增殖。

目的: 体外分析骨髓间充质干细胞对再生障碍性贫血患者外周血 T 淋巴细胞增殖的抑制作用。

方法: 分离再生障碍性贫血患者外周血 T 淋巴细胞, 行羧基荧光素乙酯乙酸琥珀酰亚胺酯(CFDA SE)荧光染色, 与体外培养扩增的骨髓间充质干细胞按 3:1 比例直接接触法及 Transwell 法共培养, 加入植物血凝素(PHA)刺激 T 淋巴细胞增殖, 并设阴性及阳性对照。流式细胞术检测各组 T 细胞增殖情况, 评价骨髓间充质干细胞对 T 淋巴细胞增殖的影响。

结果与结论: CFDA SE 染色分析显示, 直接接触组 T 细胞增殖较阳性对照组明显减低($P < 0.01$); Transwell 组 T 细胞增殖亦较阳性对照组减低($P < 0.05$); 直接接触组 T 细胞增殖较 Transwell 组明显减低($P < 0.01$)。骨髓间充质干细胞可能通过直接接触及分泌某些细胞因子方式抑制再生障碍性贫血患者异常增殖的 T 细胞, 以直接接触方式发挥主要作用。

关键词: 再生障碍性贫血; 骨髓间充质干细胞; T 淋巴细胞; 增殖; 免疫抑制

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.36.007

刘增慧, 肖扬, 蒋祖军, 李力, 高颀, 李勇华, 李利, 王耀春, 邝丽萍. 骨髓间充质干细胞抑制再生障碍性贫血患者外周血 T 细胞增殖的实验研究[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(36):6679-6682. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Department of Hematology, General Hospital of Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China;
²Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Liu Zeng-hui★, Master, Department of Hematology, General Hospital of Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China; 10304254@qq.com

Correspondence to: Xiao Yang, Master, Department of Hematology, General Hospital of Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China jdxiao111@163.com

Received: 2011-02-19
Accepted: 2011-04-20

0 引言

T 细胞免疫机制在再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)的发病中占有重要地位, 既往研究发现, AA 患者外周血中存在 T 淋巴细胞的异常活化和增殖^[1-2]。近年来, 随着对骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cell, BMSC)研究的不断深入, 发现 BMSC 在体内、外均可抑制淋巴细胞的增殖, 具有免疫抑制作用。体外研究表明, 间充质干细胞可抑制丝裂源刺激的 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞增殖, 可显著降低丝裂源刺激后 T 细胞活化标记 CD25、CD38 和 CD69 的表达。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间充质干细胞数量的增加而加强, 当间充质干细胞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^[3-5]。最近的研究明确指出, 间充质干细胞对 T 细胞增殖的抑制作用不受主要组织相容性复合物的限制, 因为无论是来自供体、受体或第三者的间充质干细胞均具有相似的免疫调节作用^[6-8]。因此, 体外分离、扩增 BMSC, 在 AA 疾病领域中探索其对异常活化、增殖淋巴细胞的作用及机制具有重要意义。

1 对象和方法

设计: 细胞学体外实验。

¹ 解放军广州军区总医院血液科, 广东省广州市 510010; ² 广州中医药大学, 广东省广州市 510405

刘增慧★, 女, 1982 年生, 山东省莱阳市人, 汉族, 硕士, 主要从事骨髓间充质干细胞对再障患者 T 细胞免疫调节作用方面的研究。10304254@qq.com

通讯作者: 肖扬, 硕士, 解放军广州军区总医院血液科, 广东省广州市 510010 jdxiao111@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)36-06679-04

收稿日期: 2011-02-19
修回日期: 2011-04-20
(20110219009/M · W)

时间及地点: 于2010-10/2011-01在解放军广州军区总医院医学实验科完成。

对象:

纳入标准: ①根据血液病诊断及疗效标准(第三版)诊断为CAA的患者。②年龄18~70岁, 性别不限。③心脏彩超左室射血分数大于50%, 肝功能转氨酶、血肌酐在正常值上限2倍以内。④无急性传染病。

排除标准(排除含以下任一种情况): ①有恶性肿瘤及其他克隆性疾病者。②有严重心、肝、肾疾病及严重并发症患者。③活动性结核、急性重症肝炎及其他传染病活动期者。④合并严重感染者。

共纳入3例CAA患者, 均为本院血液科收治的住院患者。

另选择3名健康志愿者提供骨髓培养 BMSC。

实验试剂和仪器:

实验试剂和仪器	来源
淋巴细胞分离液(密度为 1.073 g/mL)	天津 TBD 公司
25 cm ² 细胞培养瓶	Corning 公司
胎牛血清、DMEM(低糖)培养基	Hyclone 公司
0.125%胰蛋白酶-EDTA	Gibco 公司
Rosette Sep [®] 富集 T 细胞抗体混合物	Stem cell 公司
红细胞裂解液、CFDA SE 细胞标记液、CFDA SE 细胞储存液	碧云天
流式细胞仪	德国美天旎公司

实验方法:

BMSC的分离、培养: 肝素抗凝的健康成人骨髓10 mL, 小心铺于8~10 mL淋巴细胞分离液上层, 行密度梯度离心(2 300 r/min, 20 min), 收集中间白膜层单个核细胞, PBS洗涤2次, 按 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 密度接种于25 cm²细胞培养瓶中, 培养体系为含体积分数为10%胎牛血清的低糖 DMEM培养基, 在37 °C, 体积分数为5%CO₂, 饱和湿度条件下培养。48 h后去除非贴壁细胞, 以后每3 d或4 d换液1次, 当贴壁细胞达80%~90%融合时, 用0.125%胰蛋白酶-EDTA消化, 细胞按 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种传代, 传至第3代的细胞备实验用。

AA患者外周血T淋巴细胞的富集、纯化: 取 EDTA抗凝的新鲜AA患者外周血10 mL, 按比例加入Rosette Sep[®] 富集T细胞抗体混合物500 μL, 混匀, 室温下孵育20 min, 用等量含体积分数为2%胎牛血清的PBS稀释, 轻轻混匀。将稀释后的血液小心地铺在淋巴细胞分离液上层, 室温下1 200 g, 离心20 min。小心收

集离心后中间层细胞, 用含体积分数为2%胎牛血清的PBS洗涤两次。用5 mL红细胞裂解液重悬富集细胞, 混匀, 室温下裂解4.0~5.0 min, 1 200 g, 离心5 min, 弃上清, PBS洗涤2次。视情况可重复裂解1次。

T淋巴细胞行CFDA SE染色: 在15 mL离心管中用1 mL CFDA SE细胞标记液重悬T细胞。用1 mL CFDA SE细胞标记液将2 μL CFDA SE细胞储存液(1 000×)稀释为2×, 加入离心管中, 混匀。37 °C孵育10 min, 立即加入10 mL含体积分数为10%胎牛血清的1640培养基, 上下颠倒混匀, 1 200 g, 离心5 min, 再用5~10 mL完全细胞培养液洗涤1次, 加入5 mL完全细胞培养液, 37 °C孵育5 min, 离心去上清, 完成最后一次洗涤。荧光显微镜下(488 nm激发)观察细胞标记情况, 标记后细胞用于后续实验。

BMSC与T淋巴细胞共培养: ①细胞直接接触培养: 将3代BMSC消化后按每孔 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于24孔板中, 24 h后待BMSC完全贴壁后吸弃上清, 用完全培养基重悬T淋巴细胞, 按每孔 $1.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于BMSC上层。②Transwell小室分隔培养法: 将3代BMSC消化后按每孔 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于Transwell小室下层, 24 h后用完全培养基重悬T淋巴细胞, 按每孔 $1.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于Transwell小室中, 体积为200 μL。

实验分组: 将共培养细胞按上述共培养方式分为直接接触组、Transwell组, 同时设阴性对照组(单独T细胞组)及阳性对照组(T细胞+PHA), 对照组T细胞密度同上。在阳性对照组及共培养体系中加入5% PHA 50 μL(Transwell组60 μL)。每组设3个平行重复孔, 组内重复3次, 组间(不同患者)重复3次。

BMSC表面分子鉴定: 将第3代BMSC消化制成 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 单细胞悬液, 与抗CD29、CD44、CD106、CD45、CD34、HLA-DR荧光标记抗体室温反应30 min, 洗涤、固定, 流式细胞仪检测。

流式细胞仪检测T淋巴细胞增殖: 培养48 h后收集各孔T淋巴细胞, 流式细胞仪绿光通道检测各孔T细胞增殖情况, 所得数据经MACSQuant流式细胞仪CellQuest 软件获取, 每管样品检测10 000个细胞, 获得的数据用CellQuest和ModFit软件进行分析。

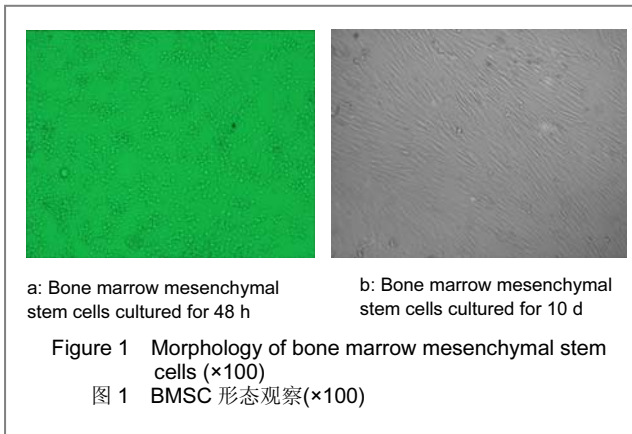
主要观察指标: ①BMSC的形态观察。②荧光显微镜下观察T淋巴细胞CFDA SE染色情况。③T淋巴细胞增殖情况。

统计学分析: 统计各组每孔增殖细胞比例, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 组间比较采用两独立样本的 t 检验进行分析。

2 结果

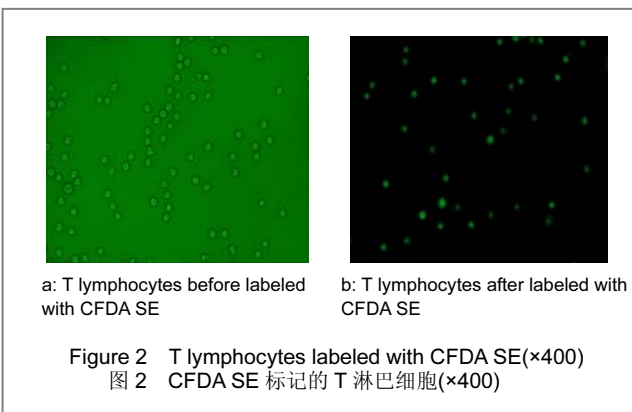
2.1 BMSC的鉴定

倒置显微镜下观察: 新分离的骨髓单个核细胞透亮度好, 细胞呈大小、形态均一的圆形。接种后 24~48 h 内, BMSC 开始贴壁, 贴壁后细胞开始分裂增殖, 部分区域形成细胞团簇或克隆样, 贴壁细胞体积增大, 呈梭形或纤维细胞样外观, 见图 1a。一两周后, 细胞融合成单层, 梭形突起变长, 排列有明显方向性, 细胞排列成漩涡状, 见图 1b。



免疫表型: 流式细胞仪检测 MSC 的免疫表型, 结果如下: $CD29^+$ 、 $CD44^+$ 、 $CD106^+$ 、 $CD45^{Low}$ 、 $CD34^{Low}$ 、 $HLA-DR^{Low}$ 。

2.2 CFDA SE 标记 T 淋巴细胞 标记细胞用蓝光激发, 激发波长 488 nm, 荧光显微镜下观察, 可见标记细胞呈绿色荧光, 见图 2。



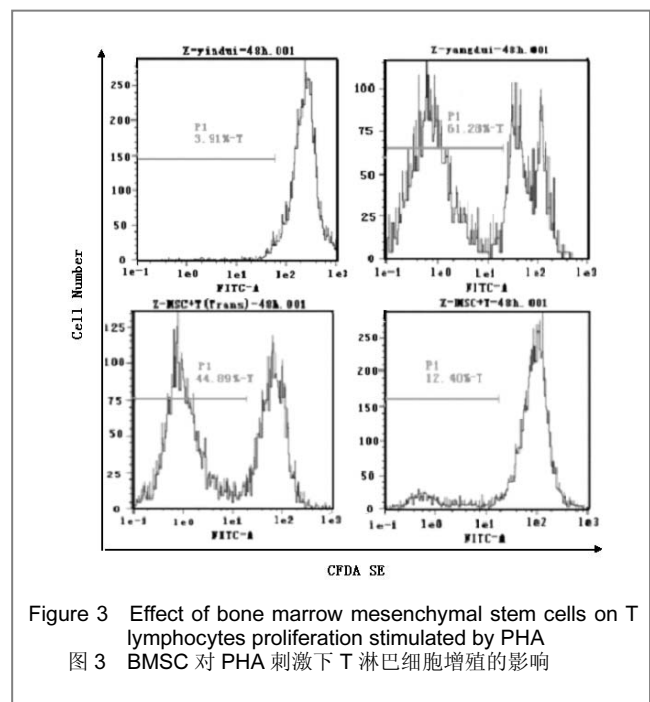
2.3 BMSC 对 PHA 刺激下 T 淋巴细胞增殖的影响 CFSE 标记技术是利用活细胞染料 CFDA SE 随细胞每增殖一代, CFSE 荧光强度系列减半的特征, 结合流式细胞术, 动态分析淋巴细胞增殖的技术。共培养 48 h

后, 阴性对照组仅见一个亲代峰, 基本未出现 CFSE 荧光强度的减弱; 而阳性对照组出现子代细胞峰, 增殖细胞比例高, CFSE 荧光强度减弱; 与 BMSC 按不同方式共培养后, 与阳性对照组相比, 直接接触时仅有少量细胞增殖; 而 Transwell 法培养亦可见子代峰出现, 但增殖细胞比例较阳性对照组低。结果见表 1、图 3 (以 1 次结果为例)。

表 1 CFDA SE 染色分析 BMSC 对 PHA 诱导的 T 细胞增殖的影响
Table 1 Effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on T cells proliferation induced by PHA with CFDA SE staining ($\bar{x} \pm s$, %)

Group	n	Proliferation Rate
Negative control T	9	3.01 $\pm$ 0.76
Positive control T+PHA	9	57.25 $\pm$ 3.50
Transwell BMSCs+T+PHA	9	47.75 $\pm$ 3.65 ^a
Closing contact BMSCs+T+PHA	9	12.56 $\pm$ 1.49 ^{ab}

^a $P < 0.05$, vs. positive control group; ^b $P < 0.01$, vs. transwell group



3 讨论

对 AA 患者骨髓及外周血淋巴细胞表型检测发现, 活化的 T 细胞比例显著增加。AA 患者 T 淋巴细胞及其分泌的造血负调控因子与造血功能衰竭密切相关^[1-2]。活化的 T 细胞可分泌 γ -干扰素和肿瘤坏死因子 α 等造血负调控因子, 研究表明, 在含干细胞因子, 白细胞介素 3, 促红细胞生成素, 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的甲基纤维素体系中加入 γ -干扰素或肿瘤坏死因子 α , $CD34^+CD38^+$ 和更原始的 $CD34^+$ 、 $CD38^+$ 造血祖细胞的

集落形成能力受抑制。 γ -干扰素和肿瘤坏死因子 α 还能刺激CD34⁺细胞中Fas抗原表达, 而成为细胞毒性T细胞或表达大量FasL的活化淋巴细胞的靶细胞而致其凋亡。一些文献表明, AA患者的CD4⁺T细胞在PHA刺激后激活的数量增多, 具有活化CD8⁺T细胞同样的细胞毒作用, 因此CD4⁺与CD8⁺T细胞均涉及AA患者免疫异常导致的造血衰竭, T细胞的异常活化和增殖是AA免疫发病的生物学基础。免疫介导的AA治疗的关键是抑制T细胞的活化与增殖。

BMSC是一类来源于中胚层的未分化间质干细胞, 具有多向分化、高度增殖及体外扩增能力^[9]。典型的细胞表面标志是CD29、CD44、CD166、CD105、SCA-1, 而CD34、CD45、HLA-DR阴性。可表达干细胞因子、FLT3-Ligand、血小板生成素、白血病抑制因子、粒细胞集落刺激因子、白细胞介素6、白细胞介素11等多种造血细胞因子, 具有支持造血功能^[10-11]。不表达或低表达MHC分子及其刺激分子, 无免疫原性, 可逃避CTL和NK细胞攻击^[12-13]。在动物试验和 I 期临床试验中发现其可减轻移植宿主病^[14]。体外研究提示BMSC可抑制淋巴细胞增殖反应。

研究发现, 在同种异体的混合淋巴细胞培养体系中加入BMSC, 可使T细胞增殖几乎被完全抑制, 且该抑制作用是非MHC限制性的, 第三方的BMSC也可产生类似抑制作用^[7-8]。Le Blanc等^[5]亦报道了BMSC可抑制CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞的增殖, 并能降低其活化标记CD25(IL-2 receptor)和CD38的表达。体外研究认为BMSC可通过细胞-细胞接触方式或分泌特定细胞因子来抑制T细胞的增殖^[4,15-16], 与本研究结果一致, 在BMSC抑制T淋巴细胞增殖中, 直接接触方式发挥主要作用。此外, 实验中用Transwell小室将BMSC与T细胞隔开, 仍可见到T淋巴细胞增殖受到抑制, 提示BMSC可能分泌某些细胞因子发挥抑制作用。既往研究认为BMSC分泌的抑制T淋巴细胞的细胞因子主要包括肝细胞生长因子、转化生长因子 β 1、前列腺素E2、 γ -干扰素及人白细胞抗原G5等^[4,17-18]。

目前, 骨髓移植是治疗AA的首选措施, 但由于来源有限、费用高昂等问题, 免疫抑制剂仍是治疗AA的主要手段, 因存在不良反应大、复发率高、有效率低的问题, 尚需寻找治疗AA的其他途径。BMSC就治疗AA而言至少可在两方面发挥作用, 一是促进骨髓造血; 二是抑制活化T细胞的增殖。此外, BMSC尚具有不良反应小、安全、有效等优势, 因此BMSC在AA治疗中具有良好的临床应用前景。本研究显示, BMSC在体外可以抑制T淋巴细胞增殖转化, 表现出免疫调控作用, 为BMSC在治疗AA中的临床应用提供了实验依据。

4 参考文献

- [1] He GS, Shao ZH, He H, et al. Zhonghua Xueyexue Zazhi. 2004;25(10):613-616.
何广胜, 邵宗鸿, 和虹, 等. 重型再生障碍性贫血患者骨髓中辅助性T细胞亚群数量及功能的变化[J]. 中华血液学杂志, 2004,25(10):613-616.
- [2] Kaito K, Otsubo H, Usui N, et al. Th1/Th2 lymphocyte balance in patients with aplastic anemia. Rinsho Byori. 2004;52(7):569-573.
- [3] 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. Blood. 2002;99(10):3838-3843.
- [4] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp Hematol. 2002;30(1):42-48.
- [5] Le Blanc K, Rasmusson I, Götherström C, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohemagglutinin-activated lymphocytes. Scand J Immunol. 2004;60(3):307-315.
- [6] Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. Transplantation. 2003;75(3):389-397.
- [7] 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. Scand J Immunol. 2003;57(1):11-20.
- [8] Klyushnendova ES, Mosca J. Human mesenchymal stem cells induce unresponsiveness in preactivated but not native alloantigen specific T cells. Exp Hematol. 1999;27:122.
- [9] Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2005;11(5):321-334.
- [10] Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. Blood. 2005;105(7):2821-2827.
- [11] Hamada H, Kobune M, Nakamura K, et al. Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. Cancer Sci. 2005;96(3):149-156.
- [12] Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. Cytotherapy. 2003;5(6):485-489.
- [13] Frank MH, Sayegh MH. Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells. Lancet. 2004;363(9419):1411-1412.
- [14] Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. Biol Blood Marrow Transplant. 2005;11(5):389-398.
- [15] Krampera 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. Blood. 2003;101(9):3722-3729.
- [16] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 2005;105(4):1815-1822.
- [17] Krampera M, Cosmi L, Angelini R, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2006;24(2):386-398.
- [18] 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. Stem Cells. 2008;26(1):212-222.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 实验设计为刘增慧、肖扬、王耀春, 实验实施为刘增慧、邝丽萍, 实验评估为刘增慧、肖扬、蒋祖军, 李力, 高颀, 李勇华, 李利, 王耀春, 资料收集为刘增慧。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 研究方案获医院伦理委员会批准, 纳入的再生障碍性贫血患者及志愿者已获知情同意, 志愿提供血样及骨髓。