

脂肪来源间充质干细胞移植干预系统性红斑狼疮模型小鼠的免疫功能

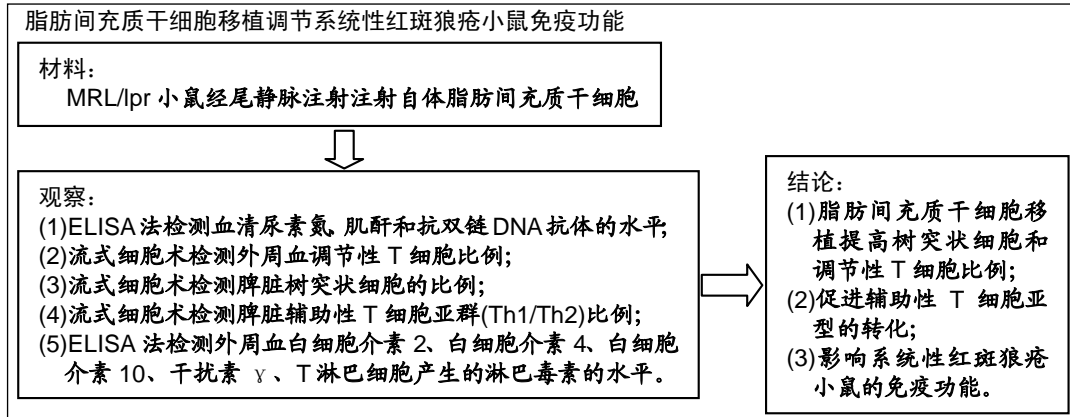
· 研究原著 ·

叶玲^{1,2}, 朱静², 何成松¹ (西南医科大学附属医院风湿免疫科, 四川省泸州市 646000; ²四川省医学科学院·四川省人民医院风湿免疫科, 四川省成都市 610000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1708

ORCID: 0000-0002-6678-2397(叶玲)

文章快速阅读:



叶玲, 女, 1987年生, 河南省开封市人, 汉族, 2010年成都医学院毕业, 主治医师, 主要从事风湿免疫方面的研究。

通讯作者: 何成松, 硕士, 教授、硕士生导师, 西南医科大学附属医院风湿免疫科, 四川省泸州市 646000

文献标识码: B

稿件接受: 2019-01-17



文题释义:

间充质干细胞的免疫调节: 间充质干细胞具有免疫调节的生物学特性, 通过可溶性介质或直接与细胞接触发挥免疫调节作用。由于这些免疫调节特性, 间充质干细胞治疗的安全性和临床疗效已经在许多自身免疫性疾病中得到测试, 例如克罗恩病、系统性红斑狼疮和类风湿性关节炎等。基础与临床研究均证实间充质干细胞在系统性红斑狼疮疾病治疗中发挥有效的免疫调节作用。然而, 其在体内发挥的免疫调节作用的机制尚不明确, 需要进一步研究间充质干细胞移植的内源性免疫调节功能以阐明治疗性作用的机制。

系统性红斑狼疮: 是一种伴有多系统损害的慢性自身免疫性疾病, 临床表现多样, 几乎全身所有器官都可以受到损伤。特别是继发肺动脉高压的患者, 临床预后差, 患者1年生存率低于80%。目前, 临床上针对系统性红斑狼疮的治疗多采用非特异性免疫抑制, 存在免疫抑制后易感染和复发率高等问题。系统性红斑狼疮的发病机制较复杂, 尚未完全明确, 与其他自身免疫性疾病相似的是免疫调节失衡和在体内形成大量循环免疫复合物, 引起全身多器官病变。因此, 免疫调节是治疗系统性红斑狼疮的主要探讨方向。

摘要

背景: 虽然间充质干细胞治疗系统性红斑狼疮已取得临床疗效, 但其免疫调节的内源性功能及作用机制有待深入研究。

目的: 探讨来源的脂肪间充质干细胞对系统性红斑狼疮小鼠(MRL/lpr小鼠)免疫功能的影响及其可能机制。

方法: 将36只MRL/lpr小鼠随机分为3组: 模型对照组不进行干预、磷酸盐缓冲液对照组尾静脉注射磷酸盐缓冲液、干细胞移植组尾静脉注射脂肪间充质干细胞; 另取12只C57BL/6小鼠作为正常对照组。

结果与结论: ①分离MRL/lpr小鼠脂肪组织获得的细胞具有脂肪间充质干细胞特性; ②模型对照组、磷酸盐缓冲液对照组和干细胞移植组的血清尿素氮、肌酐和抗双链DNA抗体水平均高于正常对照组($P < 0.01$); 干细胞移植组的血清尿素氮、肌酐和抗双链DNA抗体水平低于模型对照组和磷酸盐缓冲液对照组($P < 0.05$); ③模型对照组和磷酸盐缓冲液对照组的外周血调节性T细胞阳性率低于正常对照组和干细胞移植组, 干细胞移植组外周血调节性T细胞阳性率低于正常对照组($P < 0.01$); ④模型对照组和磷酸盐缓冲液对照组的脾脏树突状细胞阳性率低于正常对照组和干细胞移植组($P < 0.01$); ⑤模型对照组、磷酸盐缓冲液对照组和干细胞移植组的Th2比例高于正常对照组($P < 0.05$); 模型对照组和磷酸盐缓冲液对照组的Th1比例和Th1/Th2比值低于正常对照组和干细胞移植组($P < 0.05$); ⑥与正常对照组比较, 模型对照组和磷酸盐缓冲液对照组外周血中白细胞介素2、干扰素 γ 、白细胞介素10和T淋巴细胞产生的淋巴毒素水平降低, 白细胞介素4水平升高($P < 0.05$); 与模型对照组和磷酸盐缓冲液对照组比较, 干细胞移植组外周血中白细胞介素2、白细胞介素10、干扰素 γ 和T淋巴细胞产生的淋巴毒素水平升高, 白细胞介素4水平降低($P < 0.05$)。结果表明脂肪间充质干细胞移植可通过提高树突状细胞和调节性T细胞比例、促进辅助性T细胞亚型的转化对系统性红斑狼疮小鼠免疫功能产生影响。

关键词:

脂肪间充质干细胞; 系统性红斑狼疮; 干细胞移植; 尾静脉注射; 组织工程; 小鼠; 脾脏; 调节性T细胞; 树突状细胞; 辅助性T细胞

中图分类号: R457; R363

Ye Ling, Attending physician, Department of Rheumatology and Immunology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; Department of Rheumatology and Immunology, Sichuan Provincial People's Hospital, Sichuan Academy of Medical Sciences, Chengdu 610000, Sichuan Province, China

Corresponding author: He Chengsong, Master, Professor, Master's supervisor, Department of Rheumatology and Immunology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Intervention with autologous adipose-derived mesenchymal stem cells for immune function in mice with systemic lupus erythematosus

Ye Ling^{1,2}, Zhu Jing², He Chengsong¹ (¹Department of Rheumatology and Immunology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; ²Department of Rheumatology and Immunology, Sichuan Provincial People's Hospital, Sichuan Academy of Medical Sciences, Chengdu 610000, Sichuan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Although mesenchymal stem cells have achieved clinical efficacy in the treatment of systemic lupus erythematosus, the endogenous function and immunomodulatory mechanism of the cells need to be further studied.

OBJECTIVE: To investigate the effect of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells on immune function in mice with systemic lupus erythematosus and its possible mechanism.

METHODS: Thirty-six MRL/lpr mice were randomly divided into three groups: model control group without treatment, PBS control group with tail vein injection of PBS, and stem cell transplantation group with tail vein injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells. Another 12 C57BL/6 mice were taken as normal control group.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The cells obtained from autologous adipose tissue of MRL/lpr mice had the characteristics of adipose-derived mesenchymal stem cells. (2) The levels of serum urea nitrogen, creatinine and anti-double-stranded DNA antibodies in the model control group, PBS control group and stem cell transplantation group were higher than those in the normal control group ($P < 0.01$). The levels of serum urea nitrogen, creatinine and anti-double-stranded DNA antibody in the stem cell transplantation group were lower than those in the model control group and PBS control group ($P < 0.05$). (3) The positive rates of peripheral blood regulatory T cells in the model control group and PBS control group were lower than those in the normal control group and stem cell transplantation group, and the positive rate of peripheral blood regulatory T cells in the stem cell transplantation group was lower than that in the normal control group ($P < 0.01$). (4) The positive rates of splenic dendritic cells in the model control group and PBS control group were lower than those in the normal control group and stem cell transplantation group ($P < 0.01$). (5) Th2 ratio in the model control group, PBS control group and stem cell transplantation group was higher than that in the normal control group ($P < 0.05$). Th1 ratio and Th1/Th2 ratio in the model control group and PBS control group were lower than those in the normal control group and stem cell transplantation group ($P < 0.05$). (6) Compared with the normal control group, the levels of interleukin-2, interferon- γ , interleukin-10 and lymphotoxin in the peripheral blood of model control group and PBS control group decreased, while the level of interleukin-4 increased ($P < 0.05$). Compared with the model control group and PBS control group, the levels of interleukin-2, interleukin-10, interferon- γ and lymphotoxin in the peripheral blood of the stem cell transplantation group increased, while the level of interleukin-4 decreased ($P < 0.05$). In conclusion, adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation can exert effects on the immune function of mice with systemic lupus erythematosus by increasing the proportions of dendritic cells and regulatory T cells and promoting the transformation of helper T lymphocyte subsets.

Key words: adipose-derived mesenchymal stem cells; systemic lupus erythematosus; stem cell transplantation; tail vein injection; tissue engineering; mouse; spleen; regulatory T cells; dendritic cells; helper T cells

0 引言 Introduction

系统性红斑狼疮是一种经典的慢性多系统自身免疫性疾病,在不进行免疫抑制治疗时,死亡率较高,且其发病机制复杂,一般认为由遗传、免疫调节失衡和其他因素相互作用而引起^[1-2]。目前,免疫抑制药物和皮质类固醇等对系统性红斑狼疮的治疗作用存在较大争议,疗效不一,因而急需开发新的治疗策略或替代疗法^[3]。

间充质干细胞是一种具有自我更新和多向分化能力的成体干细胞,在分化、转分化、归巢活性、免疫调节和免疫抑制等方面具有一定优势^[4]。近来的研究表明,间充质干细胞对免疫细胞具有免疫调节作用,在急性移植抗宿主病、炎症性肠病等各种免疫性疾病的治疗中受到广泛关注^[5]。既往研究已经证实人骨髓间充质干细胞和人脐带来源的间充质干细胞的同种异体移植对难治性系统性红斑狼疮患者的病情控制效果显著^[6-7]。尽管临床研究表明,骨髓间充质干细胞治疗系统性红斑狼疮是安全有效的,但潜在机制仍不清楚^[8]。而且,也有研究报道,系统性红斑狼疮患者自体骨髓间充质干细胞的增殖能力和免疫调节功能受损,且自体骨髓间充质干细胞在迁移中不能到达受损部位,更容易发生死亡,并且不能抑制淋巴细胞的活性,因而自体骨髓间充质干细胞也认为不是细胞治疗的合适来源^[9-10]。

脂肪组织来源的间充质干细胞由于其丰富的来源、广泛的适用性和非免疫原性而被认为是用于细胞治疗的理想

干细胞来源^[11]。与骨髓间充质干细胞相比,脂肪间充质干细胞的增殖与诱导分化能力不易受到衰老和自身疾病的影响^[12]。既往研究显示脂肪间充质干细胞移植可降低系统性红斑狼疮肾病患者血清中抗双链DNA抗体的浓度,提高外周血和脾脏中调节性T淋巴细胞的比例,减少肾小球系膜区免疫复合物的沉积,降低尿蛋白的浓度,将小鼠的存活率提高了42%,还能防止狼疮皮炎的发展^[13]。然而,疾病状态的脂肪间充质干细胞对系统性红斑狼疮患者免疫功能的影响及其潜在机制尚不明确,需要更多的动物模型实验研究为临床前研究提供基础。

目前,系统性红斑狼疮的几种小鼠模型已被用于发病机制及治疗有效性的研究,其中MRL/lpr小鼠是应用较为广泛的人系统性红斑狼疮疾病的模型,其临床表现包括寿命短、自身抗体产生多和自我耐受破坏等^[14]。近年来的研究不仅证实,MRL/lpr小鼠模型的发病机制与系统性红斑狼疮相似,可用于评估系统性红斑狼疮的治疗效果^[15];也证实全身移植人源间充质干细胞,可改善MRL/lpr小鼠的原发性自身免疫紊乱,其可能原因为抑制T淋巴细胞的增殖与活化,上调调节性T细胞比例,促进T细胞分泌干扰素 γ 和抑制白细胞介素4的分泌而发挥免疫调节作用^[16]。因此,作者拟采用MRL/lpr小鼠探讨系统性红斑狼疮模型小鼠脂肪间充质干细胞移植的免疫调节作用及其可能机制,为自身免疫性疾病的治疗寻找新思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于2017年10月到2018年6月在西南医科大学实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 ①SPF级雌性MRL/lpr小鼠(红斑狼疮小鼠)40只, 鼠龄15周, 体质量(23±3) g, 购于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心, 动物许可证号: SCXK-(军)2007-004; ②SPF级雌性C57BL/6小鼠12只, 鼠龄15周, 体质量(21±2) g, 购于西南医科大学实验动物中心, 动物许可证号: SCXK(川)2018-17。

1.3.2 实验用主要试剂及仪器 I型胶原酶、胰蛋白酶、IV型胶原酶购自美国Sigma公司; 胎牛血清、DMEM/F12培养基购自美国Hyclone公司; 脂肪间充质干细胞完全培养基购自苏州赛业生物科技公司; 兔抗小鼠CD90-PE、CD34-PE和CD44-FITC单克隆抗体及同型对照、CD4-FITC、CD25-PE、Foxp3-PE-Cy5、CD80-PE、CD86-PE和MHC II-FITC、干扰素 γ -PE和白细胞介素4-APC购自美国Abcam公司; 成脂诱导分化培养基、成骨诱导分化培养基、成软骨诱导分化培养基购自苏州赛业生物科技公司; 小鼠抗双链DNA抗体ELISA检测试剂盒、小鼠血清尿素氮酶联免疫吸附法检测试剂盒和小鼠血清肌酐酶联免疫吸附法检测试剂盒购自南京金益柏生物科技公司; 全自动酶标仪(型号DR200Bs)购自北京普天新桥公司; 小鼠调节性T细胞检测试剂盒购自北京嘉美公司; 流式细胞仪购自德国Partec公司; 光学显微镜购自德国徕卡公司。

1.4 实验方法

1.4.1 MRL/lpr小鼠脂肪间充质干细胞的分离、培养与鉴定 参照文献[17-19]报道的方法并改良。使用流式细胞仪检测细胞浓度为 $1 \times 10^7 L^{-1}$ 细胞悬液中的CD90, CD34和CD44表达情况。用成脂诱导分化培养基诱导脂肪间充质干细胞成脂分化, 并以油红O染色观察; 以成骨诱导分化培养基诱导脂肪间充质干细胞成骨分化, 茜素红S染色观察; 以成软骨诱导分化培养基诱导向软骨细胞分化, 以阿利新蓝染色观察。

MRL/lpr小鼠脂肪间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	从MRL/lpr小鼠腹部皮下的脂肪组织中分离并培养获得
培养基介绍:	DMEM/F12培养基
添加材料:	体积分数10%胎牛血清
培养时间:	培养四五天, 贴壁细胞汇合度达85%以上
细胞传代:	0.25%胰蛋白酶消化传代
细胞鉴定:	①流式细胞仪检测CD90、CD34和CD44; ②具有向脂肪细胞、成骨细胞以及软骨细胞分化的能力
伦理学批准:	经西南医科大学动物伦理学委员会批准, 批准号: 20170100325

1.4.2 动物分组与干预 以随机数字表法将36只MRL/lpr小鼠分为模型对照组、磷酸盐缓冲液对照组和干细胞移植组, 每组12只。另取12只与MRL/lpr小鼠同源的同龄

C57BL/6小鼠作为正常对照组。模型组不给予处理; 磷酸盐缓冲液对照组经尾静脉注射200 μL 磷酸盐缓冲液, 每周一、四注射1次, 连续注射4周, 共8次; 干细胞移植组经尾静脉注射浓度为 $1 \times 10^9 L^{-1}$ 的脂肪间充质干细胞磷酸盐缓冲液悬液200 μL , 每周一、四注射1次, 连续注射4周, 共8次。

1.4.3 血清尿素氮、肌酐和抗双链DNA抗体的测定 参照文献[20], 在最后一次注射完成后的14 d, 每组取6只小鼠, 行内眦取血200 μL , 离心收集血清, 应用酶联免疫吸附法检测血尿素氮、肌酐和放射免疫分析法检测抗双链DNA抗体, 剩余血清样品-80 $^{\circ}C$ 保存备用。按照小鼠血清尿素氮酶联免疫吸附法检测试剂盒和小鼠血清肌酐酶联免疫吸附法检测试剂盒说明书的步骤, 分别采用酶偶联速率法和苦味酸速率法在全自动酶标仪上检测血清尿素氮和肌酐水平。按小鼠抗双链DNA抗体ELISA检测试剂盒说明书采用固相夹心法检测各组血清抗双链DNA抗体水平。

1.4.4 外周血调节性T细胞比例的检测 按照小鼠调节性T细胞检测试剂盒方法, 每组各取6只小鼠, 断尾取血50 μL , 加入CD4-FITC与CD25-PE, 室温孵育30 min, 随后加入1.5 mL破膜剂, 室温孵育15 min, 1 500 r/min离心5 min, 轻轻吸去上清液后加入100 μL 流式缓冲液混匀, 加入Foxp3-PE-Cy5, 室温避光孵育45 min后, 用流式细胞仪上机检测CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞百分比^[21]。

1.4.5 小鼠脾脏树突状细胞比例的检测 根据文献[22]报道的方法, 在最后一次注射完成后的14 d, 每组取6只小鼠处死, 切取30 mg脾脏剪碎, 用IV型胶原酶消化过滤后, 用淋巴细胞分离液制备单细胞悬液, 加入CD80-PE、CD86-PE和MHC II-FITC各3 μL , 室温避光孵育15 min, 流式细胞仪检测CD80⁺CD86⁺MHC II⁺细胞比例。

1.4.6 脾脏辅助性T细胞亚群(Th1/Th2)比例的检测 根据文献[23]报道的方法, 取1.4.7中处死的6只小鼠, 同样切取30 mg脾脏剪碎, 用IV型胶原酶消化过滤后, 用淋巴细胞分离液制备单细胞悬液, 加入CD4-FITC进行表面染色, 加入干扰素 γ -PE和白细胞介素4-APC进行细胞内染色, 室温避光孵育20 min, 流式细胞仪检测CD4⁺干扰素 γ ⁺细胞(Th1)和CD4⁺白细胞介素4⁺细胞(Th2)在CD4⁺细胞比例, 计算Th1/Th2的比值。

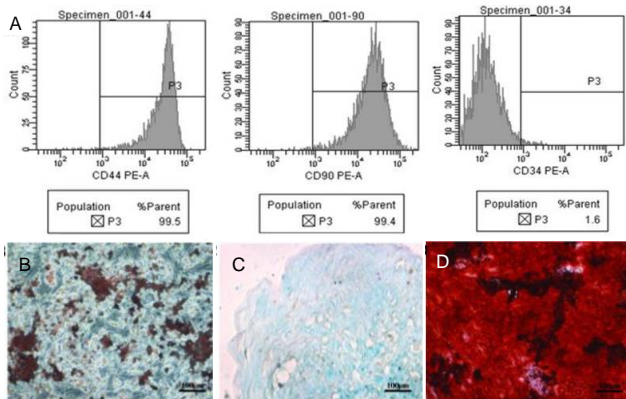
1.4.7 外周血白细胞介素2、白细胞介素4、白细胞介素10、干扰素 γ 、T淋巴细胞产生的淋巴毒素的水平检测 根据文献[24]报道, 取1.4.5中离心收集的剩余血清, 应用酶联免疫吸附实验法, 按照酶联免疫吸附检测试剂盒的说明操作进行检测。

1.5 主要观察指标 ①血清尿素氮、肌酐和抗双链DNA抗体的水平; ②外周血调节性T细胞比例; ③脾脏树突状细胞的比例; ④脾脏辅助性T细胞亚群(Th1/Th2)比例; ⑤外周血白细胞介素2、白细胞介素4、白细胞介素10、干扰素 γ 、T淋巴细胞产生的淋巴毒素的水平。

1.6 统计学分析 采用SPSS 23.0软件对数据进行分析, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较用SNK-q检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 MRL/lpr小鼠脂肪间充质干细胞的鉴定 流式细胞术检测脂肪间充质干细胞表面标志物,结果显示细胞表面标志物CD44和CD90的阳性率分别为99.5%和99.4%,造血干细胞标志物CD34阳性率为1.6%,见图1A;多向分化能力检测结果显示,油红O染色的脂肪间充质干细胞的胞质内有橘红色脂滴,见图1B,阿利新蓝染色的脂肪间充质干细胞间的致密块状组织呈浅蓝色,见图1C,茜素红S染色的脂肪间充质干细胞间结节呈深红色,见图1D。以上结果提示,分离的MRL/lpr小鼠的细胞具有间充质干细胞的特性。



图注:图中A为第3代MRL/lpr小鼠脂肪间充质干细胞表面标志物的流式细胞术检测结果,阳性表达CD44和CD90;B为分离细胞的油红O染色结果,胞质内可见脂滴,标尺长100 μm;C为分离细胞的阿利新蓝染色结果,细胞间分布蓝色块状组织,标尺长100 μm;D为分离细胞的茜素红S染色结果,细胞间分布暗红色结节。标尺长100 μm。

图1 MRL/lpr小鼠脂肪间充质干细胞的鉴定

Figure 1 Identification of adipose-derived mesenchymal stem cells from MRL/lpr mice

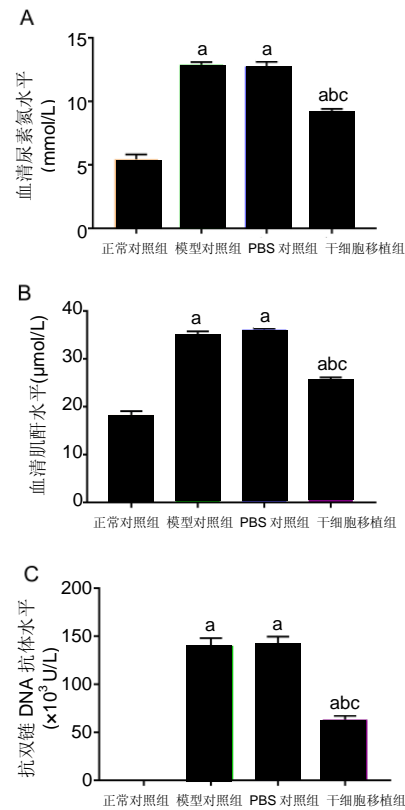
2.2 实验小鼠数量分析 实验共使用36只MRL/lpr小鼠和12只与MRL/lpr小鼠同源的同龄C57BL/6小鼠。整个实验过程顺利,无小鼠死亡,所有小鼠数据均计入结果的统计分析。

2.3 脂肪间充质干细胞移植对血清尿素氮、肌酐和抗双链DNA抗体水平的影响 血清学检测结果显示,模型对照组、磷酸盐缓冲液对照组和干细胞移植组的血清尿素氮、肌酐和抗双链DNA抗体水平均高于正常对照组($P < 0.01$);干细胞移植组的血清尿素氮、肌酐和抗双链DNA抗体水平低于模型对照组和磷酸盐缓冲液对照组($P < 0.05$),见图2;提示脂肪间充质干细胞移植可降低血清尿素氮、肌酐和抗双链DNA抗体水平。

2.4 脂肪间充质干细胞移植对外周血调节性T细胞比例的影响 流式细胞仪检测结果显示,模型对照组和磷酸盐缓冲液对照组的CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞阳性率低于正常对照组和干细胞移植组,干细胞移植组CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞阳性率低于正常对照组($P < 0.01$),见图3,提示脂肪间充质干细胞移植可提高调节性T细胞的比例。

2.5 脂肪间充质干细胞移植对脾脏树突状细胞比例的影响 流式细胞仪检测结果显示,模型对照组和磷酸盐缓冲液

对照组的CD80⁺CD86⁺MHC II⁺细胞阳性率低于正常对照组和干细胞移植组($P < 0.01$);干细胞移植组CD80⁺CD86⁺MHC II⁺细胞阳性率低于正常对照组($P > 0.05$),见图4,提示脂肪间充质干细胞移植可提高脾脏树突状细胞的比例。



图注:图中A为尿素氮水平;B为肌酐水平;C为抗双链DNA抗体水平。与正常对照组相比,^a $P < 0.01$;与模型对照组相比,^b $P < 0.05$;与磷酸盐缓冲液对照组相比,^c $P < 0.05$ 。

图2 脂肪间充质干细胞移植对血清尿素氮、肌酐和抗双链DNA抗体水平的影响

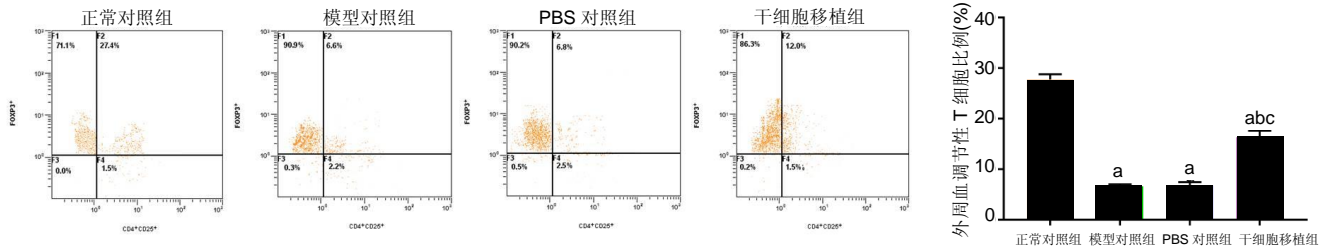
Figure 2 Effects of adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation on serum urea nitrogen, creatinine and anti-double-stranded DNA antibody levels

2.6 脂肪间充质干细胞移植对脾脏辅助性T细胞亚群(Th1/Th2)比例的影响 模型对照组、磷酸盐缓冲液对照组和干细胞移植组的Th2比例高于正常对照组($P < 0.05$);模型对照组和磷酸盐缓冲液对照组的Th1比例和Th1/Th2比值低于正常对照组和干细胞移植组($P < 0.05$),见图5。提示脂肪间充质干细胞移植可提高脾脏中Th1细胞比例、降低Th1/Th2比值。

2.7 脂肪间充质干细胞移植对外周血白细胞介素2、白细胞介素4、白细胞介素10、干扰素γ、T淋巴细胞产生的淋巴毒素的水平的影响 与正常对照组相比,模型对照组和磷酸盐缓冲液对照组外周血中白细胞介素2、干扰素γ、白细胞介素10和T淋巴细胞产生的淋巴毒素水平降低,白细胞介素4水平升高($P < 0.05$);与模型对照组和磷酸盐缓冲液对照组相比,干细胞移植组外周血中白细胞介素2、白细胞介素10、干扰素γ和T淋巴细胞产生的淋巴毒素水平升

高, 白细胞介素4水平降低($P < 0.05$); 干细胞移植组外周血中白细胞介素2、干扰素 γ 、白细胞介素4和T淋巴细胞产生的淋巴毒素水平与正常对照组接近($P > 0.05$), 见图6。

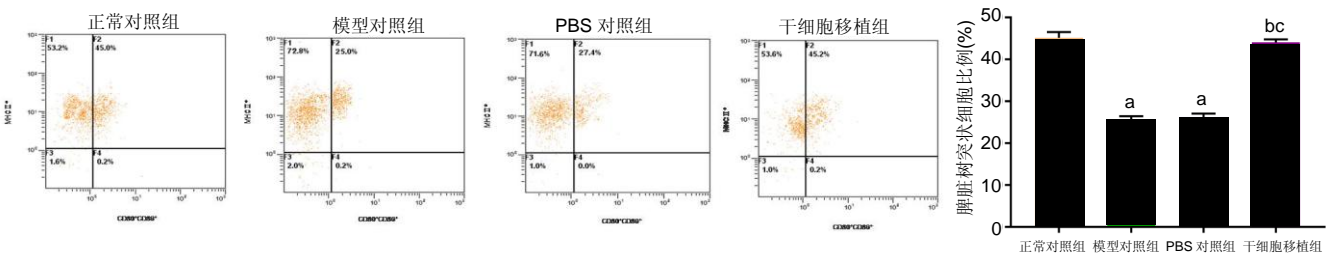
提示脂肪间充质干细胞移植可提高外周血白细胞介素2、白细胞介素10、干扰素 γ 和T淋巴细胞产生的淋巴毒素水平, 降低白细胞介素4水平。



图注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与模型对照组相比, ^b $P < 0.01$; 与 PBS 对照组相比, ^c $P < 0.01$ 。

图 3 脂肪间充质干细胞移植对调节性 T 细胞比例的影响

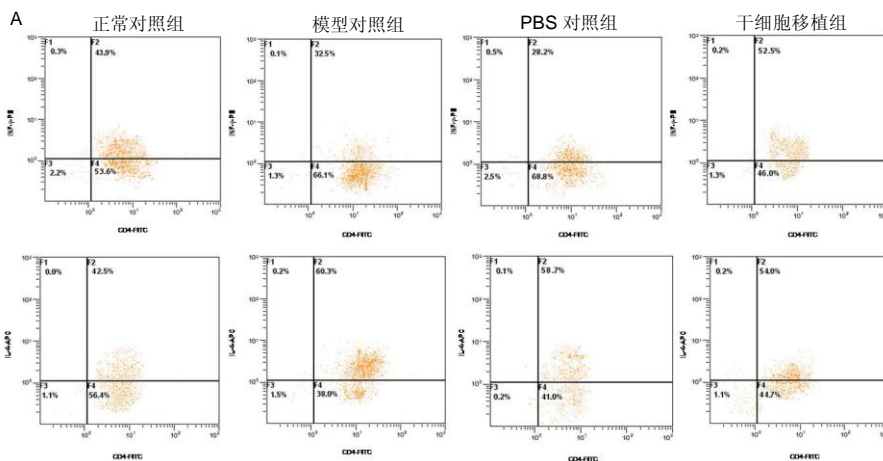
Figure 3 Effect of adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation on the proportion of regulatory T cells



图注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与模型对照组相比, ^b $P < 0.01$; 与 PBS 对照组相比, ^c $P < 0.01$ 。

图 4 脂肪间充质干细胞移植对脾脏树突状细胞比例的影响

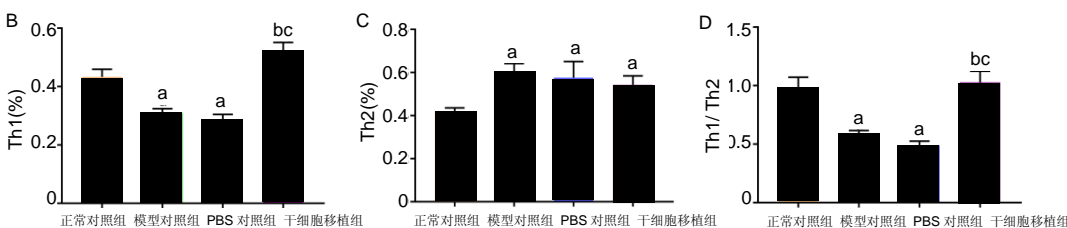
Figure 4 Effect of adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation on the proportion of splenic dendritic cells

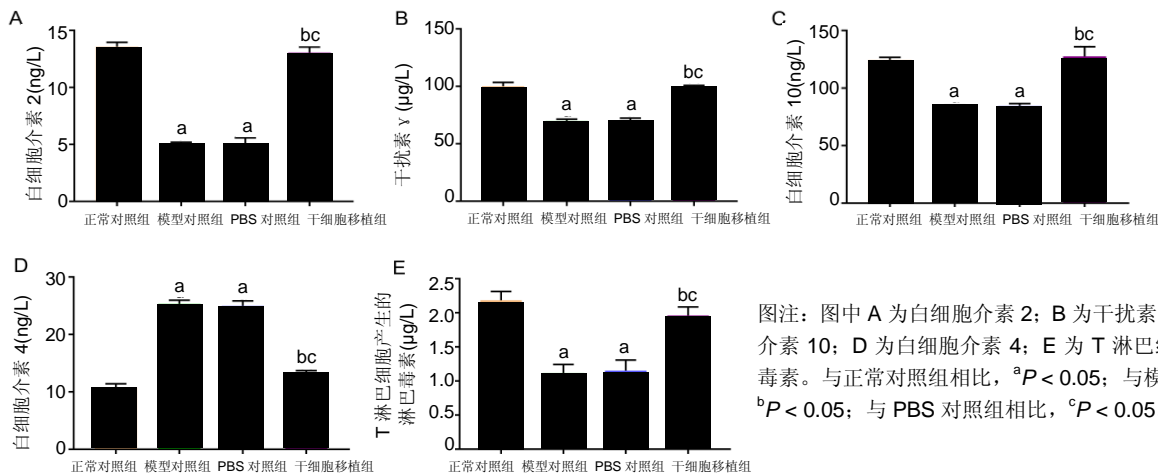


图注: 图中 A 为流式细胞术检测结果; B 为 $CD4^+$ 干扰素 γ^+ 细胞(Th1)比例; C 为 $CD4^+$ 白细胞介素 4⁺细胞(Th2)比例; D 为 Th1/Th2 比值。与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型对照组相比, ^b $P < 0.05$; 与 PBS 对照组相比, ^c $P < 0.05$ 。

图 5 脂肪间充质干细胞移植对脾脏辅助性 T 细胞亚群(Th1/Th2)比例的影响

Figure 5 Effect of adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation on the proportion of helper T lymphocyte subsets (Th1/Th2) in the spleen





图注：图中 A 为白细胞介素 2；B 为干扰素 γ ；C 为白细胞介素 10；D 为白细胞介素 4；E 为 T 淋巴细胞产生的淋巴毒素。与正常对照组相比，^a $P < 0.05$ ；与模型对照组相比，^b $P < 0.05$ ；与 PBS 对照组相比，^c $P < 0.05$ 。

图 6 脂肪间充质干细胞移植对外周血白细胞介素 2、白细胞介素 4、白细胞介素 10、干扰素 γ 、T 淋巴细胞产生的淋巴毒素的水平的影响
Figure 6 Effects of adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation on levels of peripheral blood interleukin-2, interleukin-4, interleukin-10, interferon- γ and lymphotoxin produced by T lymphocytes

3 讨论 Discussion

系统性红斑狼疮的发生由机体的免疫系统紊乱和自身耐受丧失引起，这使得研究系统性红斑狼疮的免疫调节成为探讨其发病机制和治疗方法的核心之一^[25]。系统性红斑狼疮的免疫学特征是包括 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和细胞因子等在内的免疫系统的紊乱，发生异常的 T 淋巴细胞可产生大量刺激 B 淋巴细胞活化的细胞因子，导致自身抗体大量产生^[26]。间充质干细胞是具有强大的免疫调节功能的多潜能干细胞，兼具多种免疫细胞亚型^[27]。既往研究表明，间充质干细胞可以抑制 T 淋巴细胞、淋巴细胞、自然杀伤细胞和树突状细胞的增殖^[28]。此次实验从与人系统性红斑狼疮极其类似的自发性狼疮小鼠的脂肪组织中提取间充质干细胞，经尾静脉注射移植到小鼠体内，不仅能有效降低小鼠血清中抗双链 DNA 抗体水平，还能降低狼疮小鼠血肌酐和尿素氮水平，说明脂肪间充质干细胞移植降低了系统性红斑狼疮小鼠体内产生的自身抗体，也对肾脏功能的损伤具有一定的保护作用。同时，脂肪间充质干细胞移植也对小鼠免疫功能产生积极影响。

树突状细胞是机体内广泛分布且功能最强的抗原呈递细胞，在维持人体内环境稳定和免疫调节中发挥着极为重要的作用，可调节免疫应答和诱导免疫耐受，通过参与体液免疫，促进 B 淋巴细胞的活化，也通过将抗原呈递给 T 淋巴细胞，促进 T 淋巴细胞的活化和增殖，抑制 h1 型辅助 T 淋巴细胞向 h2 型转化，在免疫平衡的调节中发挥决定性作用^[29-31]。在系统性红斑狼疮的病情发展过程中，树突状细胞存在功能障碍，介导 T 淋巴细胞增殖的活性降低，并向 h2 型 T 淋巴细胞 (Th2) 转化^[32]。作者检测了小鼠脾脏树突状细胞的比例，结果显示，脂肪间充质干细胞移植可提高狼疮小鼠脾脏中成熟树突状细胞的比例。为了进一步研究增加的树突状细胞能否发挥正常功能，又检测了外周血调节性 T 细胞以及脾脏辅助性 T 细胞亚群的比例，以探讨树突状细胞的作用。T 淋巴细胞应答是免疫应答的关键环节，静止状态的 T 淋巴细胞经成熟树突状细胞诱导后产生辅助性 T 细胞 Th1 和 Th2。研究结

果显示，干细胞移植组小鼠外周血调节性 T 细胞比例增加、脾脏中 Th1 细胞比例增高、Th2 细胞比例降低、Th1/Th2 比值升高，提示脂肪间充质干细胞移植能够改善树突状细胞的功能，促进了调节性 T 淋巴细胞增殖与活化，促进 Th1 细胞的增殖，并促进 Th2 细胞转化为 Th1 细胞，改变免疫应答的类型，对狼疮小鼠的免疫紊乱起调节作用。

Th1 细胞主要分泌白细胞介素 2、干扰素 γ 和 T 淋巴细胞产生的淋巴毒素等因子，主要介导与细胞毒和炎症有关的免疫应答反应，辅助抗体的生成，介导细胞免疫^[33]。Th2 细胞主要分泌白细胞介素 4 和白细胞介素 10 等细胞因子，介导体液免疫^[34]。干扰素 γ 是细胞免疫应答的关键因子，刺激 T 淋巴细胞的增殖，还能够增强树突状细胞与 T 淋巴细胞间的相互作用，使辅助性 T 淋巴细胞的数量显著增加，减少免疫复合物的沉积^[35]。白细胞介素 2 具有多种生物活性，发挥广谱的免疫增强作用，促进肿瘤坏死因子和干扰素等因子的分泌，促进 T 淋巴细胞的活化与增殖^[36]。白细胞介素 4 能够增强树突状细胞的分泌功能，维持 Th1 细胞和 Th2 细胞的平衡^[37]。血清学检测结果显示，狼疮小鼠外周血中白细胞介素 2、干扰素 γ 、白细胞介素 10 和 T 淋巴细胞产生的淋巴毒素水平降低，白细胞介素 4 水平升高，说明系统性红斑狼疮小鼠确实存在免疫紊乱；而干细胞移植组外周血中白细胞介素 2、白细胞介素 10、干扰素 γ 和 T 淋巴细胞产生的淋巴毒素水平升高，白细胞介素 4 水平降低，说明脂肪间充质干细胞移植可影响 T 淋巴细胞分泌细胞因子，也能够促进 T 淋巴细胞向 Th1 细胞漂移，抑制 Th2 细胞的转化，改变辅助性 T 细胞亚群的比例。此结果与流式细胞术检测的 Th1/Th2 比例结果一致。

综上所述，实验发现脂肪间充质干细胞移植可通过提高树突状细胞的活性而上调调节性 T 细胞的比例，并抑制辅助性 T 细胞向 Th2 亚型的转化，抑制 Th1 向 Th2 分化偏移，对系统性红斑狼疮小鼠免疫功能产生影响，改善免疫紊乱。在今后的研究中，将对移植的干细胞进行标记，深入探讨干细胞在免疫器官中的分布及免疫调节作用。

作者贡献: 实验设计为叶玲、何成松, 实验实施为叶玲、朱静, 实验评估为叶玲、何成松, 资料收集为叶玲、朱静。

经费支持: 该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经西南医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 20170100325。实验动物在戊巴妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经西南医科大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容进行编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Lee YJ, Park JA, Kwon H, et al. Role of Stem Cell-Like Memory T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2018;70(9):1459-1469.
- [2] Wang D, Wang S, Huang S, et al. Serum IFN- γ Predicts the Therapeutic Effect of Mesenchymal Stem Cells Transplantation in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(9):1777-1785.
- [3] Gao L, Bird AK, Meednu N, et al. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells From Patients With Systemic Lupus Erythematosus Have a Senescence-Associated Secretory Phenotype Mediated by a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein-Interferon- β Feedback Loop. *Arthritis Rheumatol.* 2017;69(8):1623-1635.
- [4] Ji J, Wu Y, Meng Y, et al. JAK-STAT signaling mediates the senescence of bone marrow-mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2017;49(3):208-215.
- [5] Deng W, Chen W, Zhang Z, et al. Mesenchymal stem cells promote CD206 expression and phagocytic activity of macrophages through IL-6 in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2015;161(2):209-216.
- [6] Wang D, Huang S, Yuan X, et al. The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(5):423-431.
- [7] 阮光萍,王金祥,杨建勇,等. 系统性红斑狼疮小鼠骨髓间充质干细胞的成骨、成脂分化能力下降[J]. 中国组织工程研究, 2014,18(1):1-6.
- [8] 罗利梅,骆辑,周晓泉,等. 间充质干细胞对系统性红斑狼疮T淋巴细胞的免疫调节作用[J]. 免疫学杂志, 2016,32(8):681-686.
- [9] Wang Q, Qian S, Li J, et al. Combined transplantation of autologous hematopoietic stem cells and allogeneic mesenchymal stem cells increases T regulatory cells in systemic lupus erythematosus with refractory lupus nephritis and leukopenia. *Lupus.* 2015;24(11):1221-1226.
- [10] Gu Z, Meng Y, Tao T, et al. Endoplasmic reticulum stress participates in the progress of senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Cell Tissue Res.* 2015;361(2):497-508.
- [11] Choi EW, Lee HW, Shin IS, et al. Comparative Efficacies of Long-Term Serial Transplantation of Syngeneic, Allogeneic, Xenogeneic, or CTLA4Ig-Overproducing Xenogeneic Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells on Murine Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Transplant.* 2016;25(6):1193-1206.
- [12] He X, Zhang Y, Zhu A, et al. Suppression of interleukin 17 contributes to the immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Immunol Res.* 2016;64(5-6):1157-1167.
- [13] Park MJ, Kwok SK, Lee SH, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce expansion of interleukin-10-producing regulatory B cells and ameliorate autoimmunity in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Cell Transplant.* 2015;24(11):2367-2377.
- [14] Gu Z, Tan W, Ji J, et al. Rapamycin reverses the senescent phenotype and improves immunoregulation of mesenchymal stem cells from MRL/lpr mice and systemic lupus erythematosus patients through inhibition of the mTOR signaling pathway. *Aging (Albany NY).* 2016;8(5):1102-1114.
- [15] Zhao W, Wu C, Li LJ, et al. RNAi Silencing of HIF-1 α Ameliorates Lupus Development in MRL/lpr Mice. *Inflammation.* 2018;41(5):1717-1730.
- [16] Zhang Z, Liu D, Zhang X, et al. Erythropoietin Treatment Ameliorates Lupus Nephritis of MRL/lpr Mice. *Inflammation.* 2018;41(5):1888-1899.
- [17] 张伟,庞春艳,王永福. 脂肪间充质干细胞对MRL/lpr小鼠的治疗效果及对脾脏Th17/Treg细胞平衡的影响[J]. 北京大学学报(医学版), 2017,49(6):974-978.
- [18] 王艳,胡翰青,邢红艳,等. 小鼠骨髓干细胞的分离培养鉴定及诱导分化的研究[J]. 西南国防医药, 2013,1(1):8-11.
- [19] 岳永莉,张祥,张丽春,等. 大鼠脂肪间充质干细胞的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38(11):1309-1316.
- [20] Liang J, Sun L. Mesenchymal stem cells transplantation for systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis.* 2015;18(2):164-171.
- [21] 王照娟,陈龙华. 丹皮提取物对系统性红斑狼疮模型小鼠的免疫调节作用及其机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2015,31(13):1279-1282.
- [22] Liu RH, Li YQ, Zhou WJ, et al. Supplementing mesenchymal stem cells improves the therapeutic effect of hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of murine systemic lupus erythematosus. *Transplant Proc.* 2014;46(5):1621-1627.
- [23] Li LY, Zhang HR, Jiang ZL, et al. Overexpression of Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Nonintegrin in Dendritic Cells Protecting against Aspergillosis. *Chin Med J (Engl).* 2018;131(21):2575-2582.
- [24] 马晓蕾,高那,刘政邑,等. 苯烯莫德对特异性皮炎患者外周血单个核细胞白细胞介素4和10、 γ 干扰素、T细胞转化因子 β 水平的的影响[J]. 中华皮肤科杂志, 2017,50(1):26-28.
- [25] 孙铀,张凤山,张志毅. 骨髓间充质干细胞对系统性红斑狼疮患者调节性T细胞的免疫调节作用[J]. 中华内科杂志, 2007,46(12):1018-1021.
- [26] Kasumagić-Halilović E, Cavaljuga S, Ovcina-Kurtović N, et al. Serum Levels of Interleukin-2 in Patients with Alopecia Areata: Relationship with Clinical Type and Duration of the Disease. *Skin Appendage Disord.* 2018;4(4):286-290.
- [27] 翟国丽,王兴强,徐红,等. 系统性红斑狼疮异常T细胞信号及其靶向治疗研究进展[J]. 实用医学杂志, 2016,32(19):3274-3276.
- [28] 郭子宽,王立生,吴祖泽. 间充质干细胞在组织再生和免疫调节治疗中的应用[J]. 中国医药生物技术, 2006,1(1):58-61.
- [29] Gotoh K, Morisaki T, Setoyama D, et al. Mitochondrial p32/C1qbp Is a Critical Regulator of Dendritic Cell Metabolism and Maturation. *Cell Rep.* 2018;25(7):1800-1815.e4.
- [30] Mizumoto Y, Katsuda M, Miyazawa M, et al. In Vivo Antigen Delivery to Dendritic Cells-A Novel Peptide Vaccine for Cancer Therapy. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2018;45(10):1469-1471.
- [31] Jan RH, Chen CJ, Hong YR, et al. A surface antigen of Orientia tsutsugamushi activates human monocyte-derived dendritic cells via nuclear factor-kB & p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *Indian J Med Res.* 2018;148(2):215-224.
- [32] Ng S, Bennett NJ, Schulze J, et al. Genetically-encoded fragment-based discovery of glycopeptide ligands for DC-SIGN. *Bioorg Med Chem.* 2018;26(19):5368-5377.
- [33] 顾卫军,张庆国,朱伟,等. 系统性红斑狼疮外周血Tc与Th细胞漂移的变化及意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2016,24(5):1533-1538.
- [34] 郝慧琴,张少然,李小峰,等. Th1及Th2型细胞因子与系统性红斑狼疮的相关研究[J]. 中国药物与临床, 2018,18(1):7-9.
- [35] Zhang JF, Li Y, Zhang AZ, et al. Expression and pathological significance of CC chemokine receptor 7 and its ligands in the airway of asthmatic rats exposed to cigarette smoke. *J Thorac Dis.* 2018;10(9):5459-5467.
- [36] Jin RM, Warunek J, Wohlfert EA. Therapeutic administration of IL-10 and amphiregulin alleviates chronic skeletal muscle inflammation and damage induced by infection. *Immunohorizons.* 2018;2(5):142-154.
- [37] Wang D, Niu L, Feng X, et al. Long-term safety of umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation for systemic lupus erythematosus: a 6-year follow-up study. *Clin Exp Med.* 2017;17(3):333-340.