

# γ 干扰素联合脂多糖诱导人脐带间充质干细胞向MSC2极化

黄恬<sup>1,2</sup>, 黄欣<sup>2</sup>, 赖沛龙<sup>2</sup>, 耿素霞<sup>2</sup>, 陈晓梅<sup>2</sup>, 王玉连<sup>2</sup>, 郭礼妍<sup>2</sup>, 曾高淳<sup>2</sup>, 韩凤珍<sup>3</sup>, 李晓红<sup>4</sup>, 杜欣<sup>1,2</sup>, 翁建宇<sup>1,2</sup> (1华南理工大学医学院, 广东省广州市 510006; 2广东省人民医院血液科, 广东省医学科学院, 广东省广州市 510080; 3广东省人民医院产科, 广东省医学科学院, 广东省广州市 510080; 4广东省人民医院医学研究中心, 广东省医学科学院, 广东省广州市 510080)

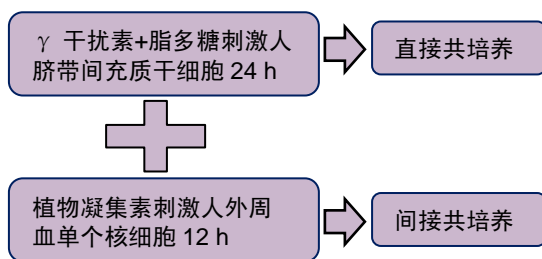
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2050

ORCID: 0000-0001-7335-2558(黄恬)

文章快速阅读:

## 文章特点一

- (1)在不同共培养方式及不同时间作用下, 观察人脐带间充质干细胞对外周血单个核细胞中调节性T细胞和Th1细胞比例的影响;
- (2)首次发现γ干扰素联合脂多糖是体外诱导人脐带间充质干细胞向MSC2极化的高效组合;
- (3)发现γ干扰素联合脂多糖刺激人脐带间充质干细胞, 可能是通过Toll样受体3的活化促进MSC2极化, 发挥免疫抑制作用。



## 检测指标:

- (1)第3, 4, 5天用流式细胞仪检测调节性T细胞和Th1细胞的比例;
- (2)qPCR检测人脐带间充质干细胞Toll样受体2, 3, 4 mRNA表达。

## 结论:

- (1)在直接与间接共培养下, 经γ干扰素联合脂多糖刺激人脐带间充质干细胞可增加调节性T细胞比例;
- (2)间接共培养下, γ干扰素联合脂多糖诱导人脐带间充质干细胞向免疫抑制型MSC2极化。

黄恬, 女, 1994年生, 广东省云浮市人, 汉族, 华南理工大学医学院在读硕士, 主要从事间充质干细胞免疫功能调控及移植抗宿主病防治的实验研究。

通讯作者: 翁建宇, 博士, 主任医师, 华南理工大学医学院, 广东省广州市 510006; 广东省人民医院血液科, 广东省医学科学院, 广东省广州市 510080

文献标识码:A

来稿日期: 2019-08-05

送审日期: 2019-08-08

采用日期: 2019-10-14

在线日期: 2019-12-21



Huang Tian, Master candidate, School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China; Department of Hematology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Corresponding author: Weng Jianyu, MD, Chief physician, School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China; Department of Hematology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

## 文题释义:

γ干扰素联合脂多糖模拟炎症微环境: 间充质干细胞的免疫抑制能力不是内在的, 而是由促炎细胞因子诱导的。间充质干细胞暴露于炎症信号可显著增强其对T细胞、单核细胞/巨噬细胞和树突状细胞的免疫抑制作用。γ干扰素由活化T细胞和NK细胞产生, 激活抗原提呈细胞, 上调转录因子T-bet而促进Th1细胞分化; 脂多糖是革兰阴性细菌细胞壁外壁的组成成分, 是免疫反应的强烈刺激剂, 具有通过信号转导途径促进各种炎性细胞因子分泌的作用。

间充质干细胞可极化为MSC1和MSC2两种类型: 间充质干细胞既可以抑制免疫应答, 也可以促进免疫应答, 不同的炎症递质会诱导间充质干细胞极化分型并表现出截然相反的免疫调节作用, 这一特性称为间充质干细胞免疫调节的可塑性。间充质干细胞可以通过下游Toll样受体信号极化成2种类型: MSC1和MSC2。文献报道Toll样受体4引发的MSC1主要发挥促炎功能, 而Toll样受体3引发的MSC2主要发挥免疫抑制功能。

## 摘要

背景: 间充质干细胞的免疫调节特性已被临床广泛应用于自身免疫性疾病和移植抗宿主病, 但其免疫调节的可塑性导致间充质干细胞临床治疗效果出现异质性和不稳定性。

目的: 探索γ干扰素联合脂多糖模拟炎症微环境诱导人脐带间充质干细胞向MSC2极化的作用。

方法: 体外分离培养人脐带间充质干细胞, 进行形态学、表面标志物、成脂及成骨诱导分化能力鉴定。分别用γ干扰素(10 μg/L)、脂多糖(100 μg/L)及二者联合刺激人脐带间充质干细胞24 h, 与植物凝集素刺激的外周血单个核细胞直接共培养或Transwell间接共培养5 d。流式细胞术检测共培养不同时间点调节性T细胞和Th1细胞比例, 荧光定量PCR检测人脐带间充质干细胞的Toll样受体2, 3, 4 mRNA表达水平。

结果与结论: ①人脐带间充质干细胞呈梭形或成纤维形, 高表达CD73、CD90、CD105, 低表达CD34、CD45、HLA-DR; ②在直接与间接共培养条件下, γ干扰素联合脂多糖刺激人脐带间充质干细胞均可增加调节性T细胞的比例, 优于γ干扰素或脂多糖单独刺激组、未刺激组及外周血单个核细胞对照组( $P < 0.05$ ); ③Th1细胞比例随共培养时间的延长呈逐渐下降的趋势; ④在间接共培养的条件下, γ干扰素联合脂多糖刺激人脐带间充质干细胞更早向免疫抑制型MSC2极化, Toll样受体3表达显著增高( $P < 0.05$ ); ⑤以上结果表明间接共培养体系下γ干扰素(10 μg/L)联合脂多糖(100 μg/L)是诱导人脐带间充质干细胞向MSC2极化的高效组合, 并且MSC2的免疫抑制作用不依赖于细胞间的直接接触, 为MSC2来源外泌体将来应用于临床研究奠定实验基础。

## 关键词:

人脐带间充质干细胞; γ干扰素; 脂多糖; 调节性T细胞; Toll样受体

中图分类号: R459.9; R392.4; R394.2

## 基金资助:

国家自然科学基金面上项目(81671585, 81370665), 项目负责人: 翁建宇

# Interferon-gamma combined with lipopolysaccharide polarizes human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells to a MSC2 phenotype

Huang Tian<sup>1,2</sup>, Huang Xin<sup>2</sup>, Lai Peilong<sup>2</sup>, Geng Suxia<sup>2</sup>, Chen Xiaomei<sup>2</sup>, Wang Yulian<sup>2</sup>, Guo Liyan<sup>2</sup>, Zeng Gaochun<sup>2</sup>, Han Fengzhen<sup>3</sup>, Li Xiaohong<sup>4</sup>, Du Xin<sup>1,2</sup>, Weng Jianyu<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Department of Hematology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; <sup>3</sup>Department of Obstetrics, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; <sup>4</sup>Medical Research Center of Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Mesenchymal stem cells have been widely applied in autoimmune diseases and graft-versus-host diseases because of their immunomodulatory capabilities. However, mesenchymal stem cells have plasticity in immunomodulation, which leads to heterogeneity and instability when used *in vivo*.

**OBJECTIVE:** To investigate the polarization of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells to an immunosuppressive phenotype (MSC2) in the inflammatory microenvironment induced by interferon- $\gamma$  and lipopolysaccharide.

**METHODS:** Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells were isolated and cultured *in vitro*, and then were identified by morphological characteristics, surface markers, adipogenesis and osteoinduction activity. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells were treated with interferon- $\gamma$  (10  $\mu\text{g/L}$ ), lipopolysaccharide (100  $\mu\text{g/L}$ ), or their combination for 24 hours, respectively, and were then co-cultured with phytohemagglutinin pre-treated peripheral blood mononuclear cells for 5 days under direct or Transwell indirect contact. The percentages of regulatory T cells and T helper 1 cells were analyzed by flow cytometry at different times. The mRNA expression levels of Toll-like receptors 2, 3 and 4 were detected by real-time fluorescence quantitative PCR.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells exhibited spindle-shaped or fibroblast-like morphology, highly expressed CD73, CD90 and CD105, and lacked expression of CD34, CD45 and HLA-DR. (2) Under direct or indirect co-culture, human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells pre-treated with interferon- $\gamma$  and lipopolysaccharide could promote the generation of regulatory T cells, which was superior to the interferon- $\gamma$ , lipopolysaccharide, un-treated and control groups ( $P < 0.05$ ). (3) The percentage of T helper 1 cells gradually decreased over time. (4) Under indirect co-culture, human umbilical cord derived mesenchymal stem cells pre-treated with interferon- $\gamma$  and lipopolysaccharide were polarized into immunosuppressive MSC2 phenotype at an earlier period and highly expressed Toll-like receptor 3 ( $P < 0.05$ ). (5) In conclusion, the combination of interferon- $\gamma$  (10  $\mu\text{g/L}$ ) and lipopolysaccharide (100  $\mu\text{g/L}$ ) results in the high-efficient polarization of mesenchymal stem cells toward the MSC2 phenotype under indirect co-culture, and the immunosuppressive capability of MSC2 is independent of intercellular contact, which provides clinical evidence for the MSC2-derived exosome therapy in the future.

**Key words:** human umbilical cord derived mesenchymal stem cells; interferon- $\gamma$ ; lipopolysaccharide; regulatory T cells; Toll-like receptors

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China (General Program), No. 81671585 and 81370665 (both to WJY)

## 0 引言 Introduction

间充质干细胞具有独特的免疫调节及组织修复特性,在免疫调控、组织损伤和再生医学领域受到广泛的关注<sup>[1-3]</sup>,已获准应用于治疗自身免疫性疾病和移植宿主病<sup>[4]</sup>,然而不同的临床试验显示出疗效的不均一性。研究发现,间充质干细胞的免疫调节具有可塑性,在不同的炎症递质诱导下可表现出抑制或促进免疫应答2种截然相反的作用<sup>[5]</sup>。在不同炎症环境下,人脐带间充质干细胞表达各种Toll样受体而被激活<sup>[6]</sup>。Toll样受体4高表达的间充质干细胞发挥促炎作用,称之为MSC1; Toll样受体3高表达的间充质干细胞发挥免疫抑制功能,称之为MSC2<sup>[7]</sup>。因此,如何诱导间充质干细胞极化为高效、稳定抑制免疫应答的MSC2,具有广阔的研发空间及临床应用前景。该研究利用 $\gamma$ 干扰素联合脂多糖体外模拟炎症微环境,优化MSC2刺激条件,通过观察其对Th1细胞和调节性T细胞的影响,验证其免疫抑制功能。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 2019年4至7月在广东省人民医院医学研究中心完成。

### 1.3 材料

1.3.1 脐带和外周血标本 足月剖宫产新生儿脐带来源于广东省人民医院产科,签署捐赠同意书。外周血来自健康志愿者,签署捐赠同意书。

1.3.2 实验试剂及实验仪器 人脐带间充质干细胞完全培养基、人脐带间充质干细胞成骨诱导分化完全培养基、人脐带间充质干细胞成脂诱导分化完全培养基(Cyagen公司); II型胶原酶、PBS、间充质干细胞无血清培养基、RPMI1640基础培养基、青链霉素、澳洲胎牛血清、胰酶(Gibco公司); Ficoll分离液(天津灏洋公司); 相关流式抗体、固定破膜剂(Ebioscience公司); 脂多糖、植物凝集素(Sigma公司); 人 $\gamma$ 干扰素重组细胞因子(Peprrotech公司); RT-PCR及qPCR相关试剂(Takara公司); 流式细胞仪(BD公司); 细胞培养箱、离心机(Thermo Scientific公司); PCR仪器(Bio-Rad公司)。

### 1.4 方法

1.4.1 人脐带间充质干细胞分离培养 取足月剖宫产新

生儿脐带10-15 cm, 在超净工作台中用含10%青链霉素的PBS冲洗脐带表面的血渍, 去除外膜和动静脉, 取华通氏胶, 剪碎, 加入II型胶原酶(100-200 U/mL), 置于37℃、体积分数为5%CO<sub>2</sub>培养箱中消化5-8 h, 收集上清并经70目细胞筛过滤, 离心后弃上清, 用人脐带间充质干细胞完全培养基重悬后接种在10 cm培养皿中培养, 24 h后换液, 以后每3 d换液。采用倒置相差显微镜镜下观察人脐带间充质干细胞的形态, 当达80%-90%融合后, 用0.25%胰蛋白酶消化传代, 取第3代细胞进行实验。

**1.4.2 人脐带间充质干细胞的鉴定** 取第3代人脐带间充质干细胞接种于6孔板中( $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ ), 成脂、成骨诱导分化按照Cyagen公司成骨成脂诱导分化完全培养基说明书进行诱导及染色, 于镜下观察染色结果。取第3代人脐带间充质干细胞, 分别加入CD73-PE、CD90-FITC、CD105-APC、CD34-PE、CD45-APC、HLA-DR-FITC流式抗体, 避光室温孵育25 min, 离心后用PBS重悬, 上机检测。

#### 人脐带间充质干细胞的培养及鉴定

<b>细胞来源:</b>	足月剖宫产新生儿脐带
<b>培养基介绍:</b>	Cyagen 公司人脐带间充质干细胞完全培养基
<b>添加材料:</b>	体积分数为10%胎牛血清, 1%青链霉素、1%谷氨酰胺
<b>培养时间:</b>	原代培养后24 h第1次换液, 之后每3 d换液1次, 培养10-14 d开始传代
<b>传代情况:</b>	细胞长至80%-90%融合后用胰酶消化, 按1:3传代, 两三天传1代, 共传3代
<b>细胞鉴定:</b>	形态学鉴定; 表面标志物流式鉴定; 成骨、成脂诱导分化鉴定
<b>伦理学批准:</b>	经广东省人民医院医学研究伦理委员会审查批准

**1.4.3 外周血单个核细胞分离** 取健康志愿者外周血10 mL, 用等量的PBS稀释, 充分混匀后, 沿管壁缓慢加到装有10 mL Ficoll分离液的离心管中, 600×g离心20 min, 取第2层白膜层, 重悬后即可得到人外周血单个核细胞。

**1.4.4 人脐带间充质干细胞与外周血单个核细胞共培养**

**间接共培养:** 在24孔Transwell板中, 取第3代人脐带间充质干细胞接种于下室( $5 \times 10^4/\text{孔}$ ), 加入脂多糖(100  $\mu\text{g}/\text{L}$ )或和 $\gamma$ 干扰素(10  $\mu\text{g}/\text{L}$ )刺激24 h, 然后在上室加入植物凝集素(2.5 mg/L)刺激后的外周血单个核细胞( $5 \times 10^5/\text{孔}$ )。

**直接共培养:** 将第3代人脐带间充质干细胞接种于24孔板中( $5 \times 10^4/\text{孔}$ ), 加入脂多糖(100  $\mu\text{g}/\text{L}$ )或和 $\gamma$ 干扰素(10  $\mu\text{g}/\text{L}$ )刺激24 h, 然后再加入植物凝集素(2.5 mg/L)刺激后的外周血单个核细胞( $5 \times 10^5/\text{孔}$ )。

**实验分组:** ①外周血单个核细胞组; ②外周血单个核细胞+人脐带间充质干细胞组; ③外周血单个核细胞+ $\gamma$ 干扰素刺激的人脐带间充质干细胞组; ④外周血单个核细胞+脂多糖刺激的人脐带间充质干细胞组; ⑤外周血单个核细

胞+ $\gamma$ 干扰素联合脂多糖刺激的人脐带间充质干细胞组。每组设置3孔, 复测3次。

**1.4.5 流式细胞仪检测调节性T细胞和Th1细胞比例**

**调节性T细胞比例检测:** 在共培养第3, 4, 5天收集各组人脐带间充质干细胞, 标记表面抗体CD4-FITC和CD25-PE, 固定、破膜后加入核内抗体Foxp3-APC和IgG2-APC同型对照抗体, 流式细胞术检测CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性T细胞的比例。

**Th1细胞比例检测:** 在共培养第3, 4, 5天收集各组人脐带间充质干细胞, 加入胞内刺激因子刺激5 h, 标记表面抗体CD3-FITC和CD8-PE, 固定、破膜后加入胞内抗体IFN- $\gamma$ -APC和IgG1-APC同型对照抗体, 流式细胞术检测CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>细胞的比例。

**1.4.6 RT-qPCR检测人脐带间充质干细胞中Toll样受体2, 3, 4的mRNA表达水平** 用Trizol试剂提取间接共培养各组人脐带间充质干细胞的总RNA。按照反转录试剂盒说明书, 取5.5  $\mu\text{L}$ 总RNA, 加入2  $\mu\text{L}$  5×的PrimeScript Buffer, 2  $\mu\text{L}$  Random 6 mers和0.5  $\mu\text{L}$  PrimeScript RT Enzyme Mix, 反转录出cDNA用于检测Toll样受体2, 3, 4 mRNA的表达水平。按照实时荧光定量PCR试剂盒说明书, 以GAPDH为内参照, 反应体系为(20  $\mu\text{L}$ 体系)上游引物0.8  $\mu\text{L}$ 、下游引物0.8  $\mu\text{L}$ 、ROX Reference Dye II (50×)0.4  $\mu\text{L}$ 、TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(2×)10  $\mu\text{L}$ 、灭菌水6  $\mu\text{L}$ 、cDNA 2  $\mu\text{L}$ 。应用Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System仪器进行PCR反应及结果分析。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 来计算Toll样受体2, 3, 4的相对表达水平。引物序列见表1<sup>[8]</sup>。

表1 qPCR引物序列

Table 1 Primer sequences for qPCR

基因	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
Toll 样受体 2	CTG GTA GTT GTG GGT TGA AGC A	GAT TGG AGG ATT CTT CCT TGG A
Toll 样受体 3	TTA AAG AGT TTT CTC CAG GGT GTT TT	AAT GCT TGT GTT TGC TAA TTC CAA
Toll 样受体 4	CCC CTT CTC AAC CAA GAA CCT	ATT GTC TGG ATT TCA CAC CTG GAT

**1.5 主要观察指标** ①人脐带间充质干细胞形态、表面标志物表达以及成骨成脂分化潜能; ② $\gamma$ 干扰素和脂多糖刺激后人脐带间充质干细胞对调节性T细胞、Th1比例的影响; ③与外周血单个核细胞共培养后, 人脐带间充质干细胞中Toll样受体2, 3, 4 mRNA的表达。

**1.6 统计学分析** 应用SPSS 25.0统计软件分析数据, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较用单因素方差分析, 进一步两组间比较采用LSD检验, 连续观察的变量采用重复测量的方差分析。统计结果均采用GraphPad Prism5作图。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 人脐带间充质干细胞的鉴定结果** 镜下观察到人脐带间充质干细胞贴壁生长,呈成纤维样或梭形,折光性好。成脂诱导分化后,脂滴经油红O染色呈红色;成骨诱导分化后,钙结节经茜素红染色后呈红色。流式细胞术结果显示第3代人脐带间充质干细胞高表达CD73、CD90、CD105,低表达CD34、CD45、HLA-DR,见图1。这些结果表明,实验分离培养的人脐带间充质干细胞纯度高,符合国际细胞治疗协会关于间充质干细胞的标准<sup>[9]</sup>。

**2.2 人脐带间充质干细胞对调节性T细胞、Th1细胞的影响**

### 2.2.1 直接共培养

(1)  $\gamma$ 干扰素、脂多糖刺激人脐带间充质干细胞对调节性T细胞比例的影响:共培养第3天,刺激组与无刺激组间的调节性T细胞比例未见明显变化( $P > 0.05$ )。共培养第4天和第5天,与单纯外周血单个核细胞组相比,刺激与无刺激人脐带间充质干细胞各组均发现调节性T细胞比例明显增加( $P < 0.05$ )。共培养第4天时,与 $\gamma$ 干扰素刺激组(10.11±0.7)%、脂多糖刺激组(9.55±0.4)%相比, $\gamma$ 干扰素联合脂多糖刺激组的调节性T细胞比例增加,为(11.6±0.8)%,差异有显著性意义( $P < 0.05$ );共培养第5天时, $\gamma$ 干扰素联合脂多糖刺激组的调节性T细胞比例亦增加,为(12.8±0.8)%,与 $\gamma$ 干扰素刺激组(11.5±0.7)%、脂多糖刺激组(8.7±0.8)%和无刺激组(10.7±1.2)%比较,差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。连续观察结果显示: $\gamma$ 干扰素联合脂多糖刺激组共培养第5天的调节性T细胞比例未见明显高于第4天( $P > 0.05$ )。

直接共培养条件下,人脐带间充质干细胞需要与外周血单个核细胞直接接触相互作用至少4 d的时间,调节性T细胞比例才发生显著性的差异, $\gamma$ 干扰素和脂多糖联合刺激提高调节性T细胞比例的作用最佳,见图2A、B。

(2)  $\gamma$ 干扰素、脂多糖刺激人脐带间充质干细胞对Th1细胞比例的影响:共培养第3天,与单纯外周血单个核细胞组相比,刺激与无刺激人脐带间充质干细胞各组的Th1细胞比例均明显升高( $P < 0.05$ )。共培养第4天,与单纯外周血单个核细胞组及无刺激人脐带间充质干细胞组相比,经 $\gamma$ 干扰素、脂多糖或 $\gamma$ 干扰素+脂多糖刺激人脐带间充质干细胞组Th1细胞比例均出现下降趋势( $P > 0.05$ )。共培养第5天,与单纯外周血单个核细胞组相比,刺激人脐带间充质干细胞各组Th1细胞比例均明显下降,单纯外周血单个核细胞组为(19.8±3.4)%、 $\gamma$ 干扰素刺激组为(13.7±1.1)%、脂多糖刺激组为(13±4)%、 $\gamma$ 干扰素联合脂多糖刺激组为(12.3±4.0)%,差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。结果表明:随着培养时间延长,单纯外周血单个核细胞组的Th1细胞比例逐步上升,人脐带间充质干细胞共培养各组的Th1细胞比例逐步下降;在共培养第5天时,刺激人脐带间充质干细胞各组抑制Th1分化的作用优于无刺激人脐带间充质干

细胞组,见图2C。 $\gamma$ 干扰素和/或脂多糖刺激后可以降低Th1细胞比例,同时也表明其发挥免疫调节作用需要四五天的时间。

### 2.2.2 间接共培养

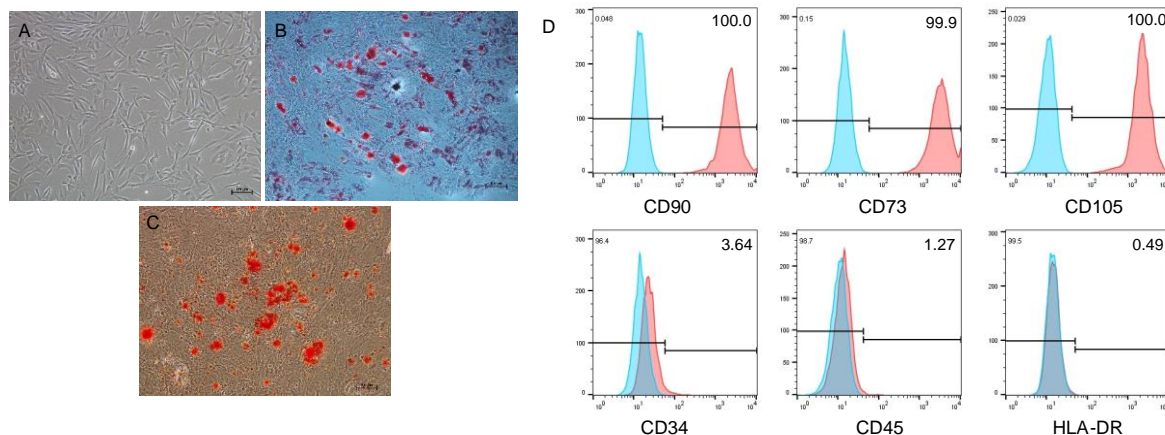
(1)  $\gamma$ 干扰素、脂多糖刺激人脐带间充质干细胞对调节性T细胞比例的影响:共培养第3天, $\gamma$ 干扰素联合脂多糖刺激组调节性T细胞比例为(15.9±1.6)%,明显高于单纯外周血单个核细胞组(9.7±0.5)%、 $\gamma$ 干扰素刺激组(12.6±1.2)%、脂多糖刺激组(11.8±1.3)%和无刺激组(10.4±0.8)%,差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ); $\gamma$ 干扰素联合脂多糖刺激组和 $\gamma$ 干扰素刺激组优于无刺激组( $P < 0.05$ ),见图3A、B。共培养第4天和第5天,与单纯外周血单个核细胞组相比,刺激与无刺激的人脐带间充质干细胞各组调节性T细胞比例均明显增加( $P < 0.05$ )。结果表明:间接共培养下,刺激后的人脐带间充质干细胞在早期(第3天)即可促进调节性T细胞比例增加,同时 $\gamma$ 干扰素单独或联合脂多糖刺激人脐带间充质干细胞均可显著增强调节性T细胞比例。

(2)  $\gamma$ 干扰素、脂多糖刺激人脐带间充质干细胞对Th1细胞比例的影响:随着培养的时间延长,单纯外周血单个核细胞组的Th1细胞比例逐步上升。共培养第4天,与外周血单个核细胞组相比,刺激与无刺激的人脐带间充质干细胞各组Th1细胞比例均开始下降,但持续时间较短;共培养第5天,仅脂多糖刺激组的Th1细胞比例仍明显下降( $P < 0.05$ ),其余各组均有回升趋势,见图3C。结果表明:在间接共培养体系下,人脐带间充质干细胞各组对Th1细胞的作用持续时间较短。

**2.3 间接共培养体系下人脐带间充质干细胞Toll样受体2, 3, 4 mRNA的表达** 间接共培养第3天, $\gamma$ 干扰素联合脂多糖刺激人脐带间充质干细胞显著上调调节性T细胞比例,检测该状态下人脐带间充质干细胞Toll样受体2, 3, 4 mRNA的表达。与无刺激组比较, $\gamma$ 干扰素刺激组和 $\gamma$ 干扰素联合脂多糖刺激组的Toll样受体3 mRNA表达水平明显增加( $P < 0.05$ );刺激各组之间相比, $\gamma$ 干扰素联合脂多糖刺激组Toll样受体3 mRNA的表达增加最显著,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),见图4;100  $\mu$ g/L脂多糖联合 $\gamma$ 干扰素有协同促进Toll样受体3表达的作用。刺激各组与无刺激组比较,Toll样受体2, 4 mRNA的表达无明显差异。

## 3 讨论 Discussion

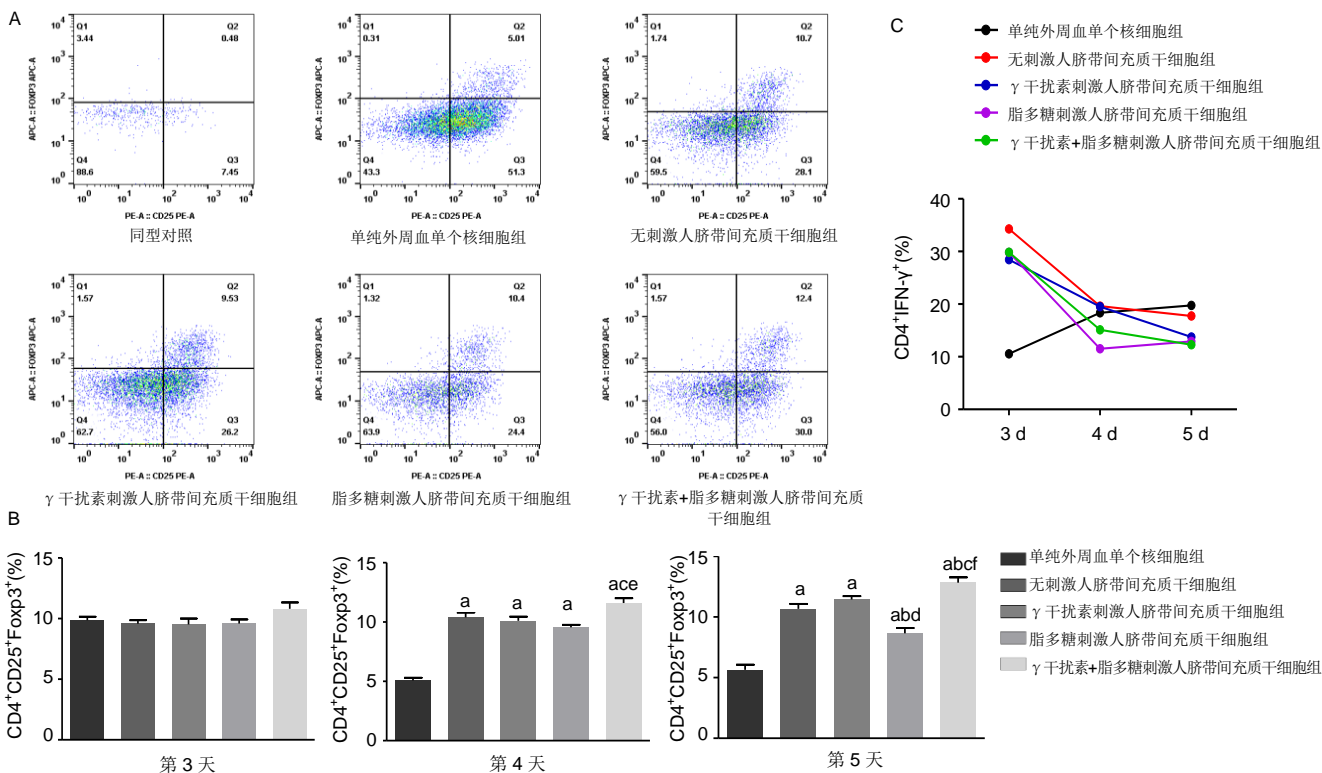
一直以来,间充质干细胞的免疫调节功能备受关注。近几年的研究表明,在炎症环境中间充质干细胞可通过释放各种递质,包括生长因子、趋化因子、补体成分和各种代谢物等,协调局部和系统的先天性和适应性免疫应答<sup>[10-14]</sup>;其免疫调节作用主要表现为抑制T细胞增殖和向Th1、Th17细胞分化,促进调节性T细胞分化、CD5<sup>+</sup>调节性B细胞增殖及巨噬细胞向M2极化等。调节性T细胞可分为天然调节性T细胞和诱导转化的调节性T细胞,是维持自



图注: 图中 A 为光学显微镜下第 3 代人脐带间充质干细胞的形态( $\times 100$ ); B 为成脂诱导分化后油红 O 染色( $\times 100$ ); C 为成骨诱导分化后茜素红染色( $\times 100$ ); D 为人脐带间充质干细胞的表面标志物表达

图 1 人脐带间充质干细胞的鉴定

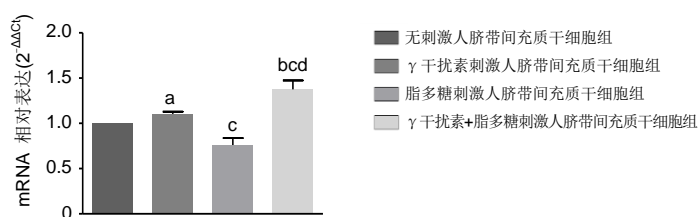
Figure 1 Identification of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells



图注: 图中 A 为共培养第 4 天各组调节性 T 细胞比例的流式图; B 为共培养第 3, 4, 5 天各组调节性 T 细胞比例的直方图; C 为共培养第 5 天各组 Th1 细胞比例的趋势图( $n=3$ ); 与单纯外周血单个核细胞组比较,  $^aP < 0.001$ ; 与无刺激人脐带间充质干细胞组比较,  $^bP < 0.01$ ; 与  $\gamma$  干扰素刺激人脐带间充质干细胞组比较,  $^cP < 0.05$ ,  $^dP < 0.001$ ; 与脂多糖刺激人脐带间充质干细胞组比较,  $^eP < 0.01$ ,  $^fP < 0.001$

图 2 直接共培养下  $\gamma$  干扰素和/或脂多糖刺激人脐带间充质干细胞对调节性 T 细胞、Th1 细胞比例的影响

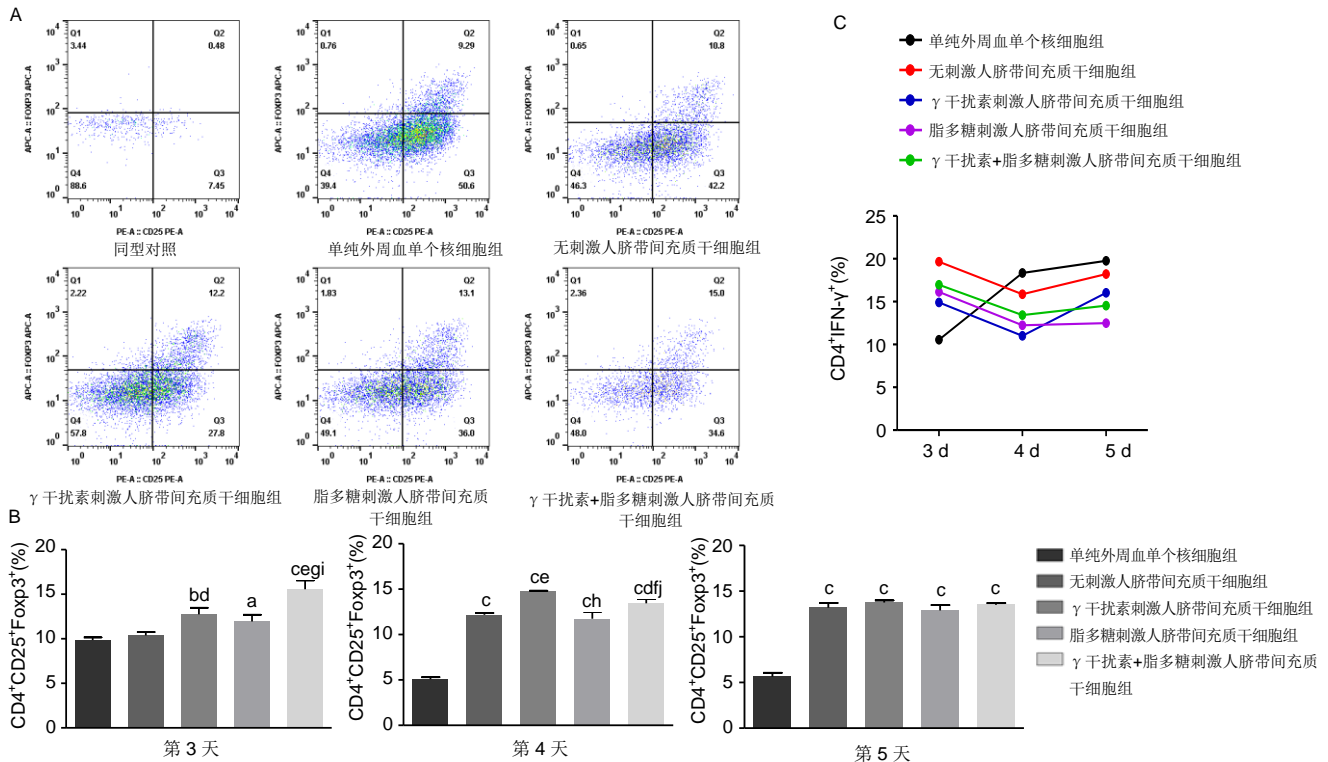
Figure 2 Effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells stimulated by interferon- $\gamma$  or lipopolysaccharide on the percentage of regulatory T cells and T helper 1 cells under direct co-culture



图注:  $\gamma$  干扰素联合脂多糖刺激人脐带间充质干细胞组 Toll 样受体 3 表达增高最明显( $n=3$ ).与无刺激人脐带间充质干细胞组比较,  $^aP < 0.05$ ,  $^bP < 0.01$ ; 与  $\gamma$  干扰素刺激人脐带间充质干细胞组比较,  $^cP < 0.01$ ; 与脂多糖刺激人脐带间充质干细胞组比较,  $^dP < 0.001$

图 4 间接共培养第 3 天人脐带间充质干细胞中 Toll 样受体 3 的 mRNA 表达

Figure 4 mRNA expression of Toll-like receptor 3 in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells at 3 days under indirect co-culture



图注：图中 A 为共培养第 3 天各组调节性 T 细胞比例的流式图；B 为共培养第 3, 4, 5 天各组调节性 T 细胞比例的直方图；C 为共培养 5 天各组 Th1 细胞比例的趋势图( $n=3$ )。与单纯外周血单个核细胞组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.001$ ; 与无刺激人脐带间充质干细胞组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ , <sup>e</sup> $P < 0.001$ ; 与 γ 干扰素刺激人脐带间充质干细胞组比较, <sup>f</sup> $P < 0.05$ , <sup>g</sup> $P < 0.01$ , <sup>h</sup> $P < 0.001$ ; 与脂多糖刺激人脐带间充质干细胞组比较, <sup>i</sup> $P < 0.05$ , <sup>j</sup> $P < 0.001$

图 3 间接共培养下 γ 干扰素和/或脂多糖刺激人脐带间充质干细胞对调节性 T 细胞、Th1 细胞比例的影响

Figure 3 Effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells stimulated by interferon-γ or lipopolysaccharide on the percentage of regulatory T cells and T helper 1 cells under indirect co-culture

身免疫耐受和平衡的关键因素<sup>[15-17]</sup>, 表现为维持 T 细胞的体内平衡<sup>[18]</sup>, 促进移植后的免疫耐受<sup>[19-20]</sup>, 防治移植宿主病<sup>[21-24]</sup>。

越来越多的证据显示, 间充质干细胞的免疫调节具有双向性, 在不同的炎症微环境下可以表现为促炎(MSC1)和抑炎(MSC2)两种模式。在低炎症环境下如低水平的肿瘤坏死因子α和 γ 干扰素, 间充质干细胞会释放一些趋化因子如 CXCL9、CXCL10、RANTES 等, 募集 T 细胞, 增强 T 细胞反应, 发挥促炎作用, 即极化为 MSC1<sup>[25]</sup>。另外, 低质量浓度短时间脂多糖(10 μg/L, 1 h)刺激可使间充质干细胞的 Toll 样受体 4 激活, 也可极化为 MSC1<sup>[7, 26]</sup>。在高质量浓度脂多糖(5 mg/L, 24 h)刺激下, 间充质干细胞则极化为 MSC2, 表现出免疫抑制作用<sup>[27]</sup>。在促炎环境下如存在着高水平的 γ 干扰素、白细胞介素 1β、肿瘤坏死因子 α, 间充质干细胞会释放较多的吲哚胺-2, 3-双加氧酶、血红素加氧酶、转化生长因子 β 等, 发挥抗炎的作用, 即极化为 MSC2<sup>[28-29]</sup>。另外, 通过 dsRNA(Toll 样受体 3 特异性配体)使间充质干细胞的 Toll 样受体 3 激活, 也可极化为 MSC2<sup>[7, 26, 30]</sup>。Toll 样受体在间充质干细胞中的活化差异引起促炎和抗炎不同的后果, 因此间充质干细胞中 Toll 样受体的激活充当了双刃剑。如何获得功能稳定的 MSC2, 以达到最佳的临床应用效果? 目前尚未见相关报道。

本研究以体外获得稳定的 MSC2 为目的, 探讨不同培养方式、炎症环境对间充质干细胞免疫调节功能的影响。在间接共培养下, 刺激后的人脐带间充质干细胞发挥免疫抑制作用更快更强, 表现为调节性 T 细胞比例在培养早期较对照组明显增加。研究报道, 间充质干细胞与外周血单个核细胞直接共培养四五天, 活化 T 细胞的增殖受抑制, 调节性 T 细胞的增殖也受抑制<sup>[31-33]</sup>; 而间充质干细胞的浓缩培养上清液对活化 T 细胞的增殖无明显影响, 并且可增加调节性 T 细胞的比例<sup>[34-35]</sup>。作者认为, 在直接培养条件下, 细胞间的直接接触可诱导间充质干细胞抑制调节性 T 细胞增殖; 而在间接共培养的条件下, 间充质干细胞不对调节性 T 细胞增殖产生抑制作用, 从而更好地发挥免疫抑制功能。另外, 间充质干细胞需要在炎症因子激活下才能获得免疫调节功能<sup>[36-37]</sup>。γ 干扰素激活后的间充质干细胞可促进 CXCL9、CXCL10、诱导型一氧化氮合酶等物质分泌, 抑制促炎因子的产生<sup>[28]</sup>, 从而发挥间充质干细胞的免疫抑制作用。该研究采用 γ 干扰素和中质量浓度脂多糖组合预刺激人脐带间充质干细胞, 能更快地发挥上调调节性 T 细胞比例的作用, 同时明显优于 γ 干扰素或脂多糖单独刺激组。该研究首次证实: γ 干扰素和中质量浓度脂多糖对于促进人脐带间充质干细胞上调调节性 T 细胞的功能具有协同作用。该研究还发现 γ 干扰素和中质量浓度脂多糖联合刺激人脐带间

充质干细胞高表达Toll样受体3, 与文献报道MSC2表型一致<sup>[38]</sup>。这些结果表明,  $\gamma$ 干扰素联合脂多糖刺激人脐带间充质干细胞可能通过活化Toll样受体3、促进MSC2极化, 上调调节性T细胞比例、降低Th1比例, 发挥免疫抑制作用。

该研究首次报道了 $\gamma$ 干扰素(10  $\mu\text{g/L}$ )联合脂多糖(100  $\mu\text{g/L}$ )是诱导人脐带间充质干细胞向MSC2极化的高效组合, 并且其免疫抑制作用不依赖于细胞间接触, 可通过其分泌的物质实现免疫调节作用。间充质干细胞主要是通过分泌哪些物质来发挥免疫调节功能呢? 具体机制又是如何? 既往文献报道, 间充质干细胞可分泌多种生长因子、趋化因子、炎症因子等来发挥作用<sup>[39-42]</sup>, 然而没有任何一个足以解释间充质干细胞的效应。有学者认为, 间充质干细胞的功能是其分泌物质的协同效应<sup>[42]</sup>, 而间充质干细胞来源的细胞外囊泡(MSC-EVs)由于包含间充质干细胞的多种分泌物质, 成为解释这种效应的理想物质。近年来越来越多研究发现, 间充质干细胞分泌的细胞外囊泡具有与母细胞相似的免疫调节功能<sup>[43-46]</sup>, 且体积小、无致瘤性、性质稳定, 具有巨大的临床应用前景<sup>[47-48]</sup>, 使之成为研究热点。因此, 进一步深入探讨间充质干细胞分泌的细胞外囊泡的免疫调节功能及其相关机制, 可更好地阐明间充质干细胞的作用机制, 也可将来临床应用MSC2来源外泌体进行无细胞治疗移植抗宿主病奠定实验基础。

**致谢:** 感谢为研究提供血液标本的志愿者。

**作者贡献:** 实验设计、评估为第一作者、第二作者及通讯作者, 实验实施及论文写作为第一作者、第二作者, 资料收集为第三、四、五、六、七、八、九作者。

**经费支持:** 该文章接受了国家自然科学基金面上项目(81671585, 81370665)的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**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:** 实验方案经广东省人民医院医学研究伦理委员会审查批准(批准号: GDREC20160142H)。

**知情同意问题:** 足月剖宫产新生儿脐带来源于广东省人民医院产科, 外周血来自健康志愿者, 均签署知情同意书。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**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华南理工大学生物统计学老师审核。

**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] WUCHTER P, BIEBACK K, SCHREZENMEIER H, et al. Standardization of Good Manufacturing Practice-compliant production of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells for immunotherapeutic applications. *Cytotherapy*. 2015;17(2):128-139.
- [2] TESSIER L, BIENZLE D, WILLIAMS LB, et al. Phenotypic and immunomodulatory properties of equine cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *PLoS One*. 2015; 10(4):e0122954.
- [3] XU AL, RODRIGUEZ LA 2ND, WALKER KP 3RD, et al. Mesenchymal Stem Cells Reconditioned in Their Own Serum Exhibit Augmented Therapeutic Properties in the Setting of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(10):1092-1106.
- [4] WENG JY, DU X, GENG SX, et al. Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(12):1732-1740.
- [5] WANG Y, CHEN X, CAO W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*. 2014;15(11):1009-1016.
- [6] TOMCHUCK SL, ZWEZDARYK KJ, COFFELT SB, et al. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells*. 2008;26(1):99-107.
- [7] WATERMAN RS, TOMCHUCK SL, HENKLE SL, et al. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010;5(4):e10088.
- [8] ROMIEU-MOUREZ R, FRANÇOIS M, BOIVIN MN, et al. Bouchentouf M, Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *J Immunol*. 2009;182(12): 7963-7973.
- [9] DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
- [10] CRAIN SK, ROBINSON SR, THANE KE, et al. Extracellular Vesicles from Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Suppress CD4 Expressing T Cells Through Transforming Growth Factor Beta and Adenosine Signaling in a Canine Model. *Stem Cells Dev*. 2019;28(3):212-226.
- [11] SHI Y, WANG Y, LI Q, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(8):493-507.
- [12] KHOSRAVI M, BIDMESHKIPOUR A, MORAVEJ A, et al. Induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells by mesenchymal stem cells is associated with RUNX complex factors. *Immunol Res*. 2018;66(1):207-218.
- [13] 陈柄全, 彭漪, 肖轶, 等. 人脐带间充质干细胞对小鼠骨髓巨噬细胞M2亚型的转化作用[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(25): 3987-3992.
- [14] PENG Y, CHEN X, LIU Q, et al. Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5+ regulatory B cells producing interleukin 10. *Leukemia*. 2015;29(3):636-646.
- [15] SAKAGUCHI S, YAMAGUCHI T, NOMURA T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5): 775-787.

- [16] WING K, SAKAGUCHI S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2010;11(1):7-13.
- [17] LIN X, CHEN M, LIU Y, et al. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(2):116-123.
- [18] CHAMBERS CA, KANG J, WU Y, et al. The lymphoproliferative defect in CTLA-4-deficient mice is ameliorated by an inhibitory NK cell receptor. *Blood*. 2002;99(12):4509-4516.
- [19] COPSEL S, WOLF D, KOMANDURI KV, et al. The promise of CD4+FoxP3+ regulatory T-cell manipulation in vivo: applications for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2019;104(7):1309-1321.
- [20] TAYLOR PA, NOELLE RJ, BLAZAR BR. CD4(+)/CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med*. 2001;193(11):1311-1318.
- [21] BERES AJ, DROBYSKI WR. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. *Front Immunol*. 2013;4:163.
- [22] ELIAS S, RUDENSKY AY. Therapeutic use of regulatory T cells for graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2019; 187(1):25-38.
- [23] BRUNSTEIN CG, MILLER JS, MCKENNA DH, et al. Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood*. 2016;127(8): 1044-1051.
- [24] BLAZAR BR, MACDONALD KPA, HILL GR. Immune regulatory cell infusion for graft-versus-host disease prevention and therapy. *Blood*. 2018;131(24):2651-2660.
- [25] CHAN JL, TANG KC, PATEL AP, et al. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*. 2006; 107(12):4817-4824.
- [26] WATERMAN RS, HENKLE SL, BETANCOURT AM. Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. *PLoS One*. 2012;7(9):e45590.
- [27] OPITZ CA, LITZENBURGER UM, LUTZ C, et al. Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. *Stem Cells*. 2009;27(4): 909-919.
- [28] REN G, ZHANG L, ZHAO X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008; 2(2):141-150.
- [29] BOLAND L, BURAND AJ, BROWN AJ, et al. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  Pre-licensing Protects Mesenchymal Stromal Cells from the Pro-inflammatory Effects of Palmitate. *Mol Ther*. 2018;26(3): 860-873.
- [30] VEGA-LETTER AM, KURTE M, FERNÁNDEZ-O'RYAN C, et al. Differential TLR activation of murine mesenchymal stem cells generates distinct immunomodulatory effects in EAE. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):150.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] DEL FATTORE A, LUCIANO R, PASCUCCI L, et al. Immunoregulatory Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on T Lymphocytes. *Cell Transplant*. 2015;24(12):2615-2627.
- [34] 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. *Stem Cell Rev Rep*. 2015;11(3):394-407.
- [35] KAY AG, LONG G, TYLER G, et al. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Reduces Disease Severity and Immune Responses in Inflammatory Arthritis. *Sci Rep*. 2017; 7(1):18019.
- [36] POLCHERT D, SOBINSKY J, DOUGLAS G, et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*. 2008;38(6):1745-1755.
- [37] DUJVESTAIN M, WILDENBERG ME, WELLING MM, et al. Pretreatment with interferon- $\gamma$  enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem Cells*. 2011;29(10):1549-1558.
- [38] CASSANO JM, SCHNABEL LV, GOODALE MB, et al. The immunomodulatory function of equine MSCs is enhanced by priming through an inflammatory microenvironment or TLR3 ligand. *Vet Immunol Immunopathol*. 2018;195:33-39.
- [39] 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. *Blood*. 2004;103(12):4619-4621.
- [40] GHANNAM S, BOUFFI C, DJOUAD F, et al. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(1):2.
- [41] KRAMPERA M, COSMI L, ANGELI 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.
- [42] LAI RC, YEO RW, LIM SK. Mesenchymal stem cell exosomes. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;40:82-88.
- [43] LIA G, BRUNELLO L, BRUNO S, et al. Extracellular vesicles as potential biomarkers of acute graft-vs-host disease. *Leukemia*. 2018;32(3):765-773.
- [44] WANG L, GU Z, ZHAO X, et al. Extracellular Vesicles Released from Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells Prevent Life-Threatening Acute Graft-Versus-Host Disease in a Mouse Model of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Stem Cells Dev*. 2016;25(24):1874-1883.
- [45] KORDELAS L, REBMANN V, LUDWIG AK, et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2014;28(4):970-973.
- [46] BRUNO S, DEREGIBUS MC, CAMUSSI G. The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation. *Immunol Lett*. 2015;168(2):154-158.
- [47] LAI P, WENG J, GUO L, et al. Novel insights into MSC-EVs therapy for immune diseases. *Biomark Res*. 2019;7:6.
- [48] LAI P, CHEN X, GUO L, et al. A potent immunomodulatory role of exosomes derived from mesenchymal stromal cells in preventing cGVHD. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):135.