

活化的淋巴细胞对人骨髓间质干细胞的细胞毒性研究

杜晶春,李雪燕,吴玉,徐霞*

(广州医学院第一临床学院检验科,广东 广州 510182)

【摘要】 目的 利用体外混合培养方法深入研究间质干细胞和免疫细胞的相互作用,为间质干细胞的合理应用提供理论依据。**方法** 分别利用贴壁培养和密度梯度离心的方法获得人骨髓间质干细胞和外周血单核细胞,利用体外混合培养的方法研究间质干细胞和淋巴细胞的相互作用。**结果** 人骨髓来源的间质干细胞能够抑制淋巴细胞的增殖,但是也很容易遭到活化淋巴细胞的毒性攻击。活化淋巴细胞分泌的炎症因子能够驱使淋巴细胞向间质干细胞周围移动从而加强彼此间的相互作用。作为一种反应机制,间质干细胞在炎症因子刺激后能够获得一定程度上的对活化淋巴细胞的细胞毒性抗性。间质干细胞最终能否发挥免疫调节作用将取决于双方力量的平衡。**结论** 体外研究结果提示人骨髓间质干细胞对活化淋巴细胞的细胞毒性敏感,该结果可能反映了间质干细胞输入体内后的情况,为间质干细胞的临床应用提供了新的思考和借鉴。

【关键词】 人源骨髓间质干细胞;淋巴细胞;免疫调节;细胞毒性

【中图分类号】 R331.1⁴ **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2012)23—001—04

Cytotoxicity of activated lymphocytes on human bone marrow mesenchymal stem cells. DU Jing-chun, LI Xue-yan, WU Yu, XU Xia. Department of Laboratory Medicine, the First Clinical School of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the reciprocal interaction between mesenchymal stem cells (MSCs) and immune cells, and to provide a reference for the application of mesenchymal stem cells. **Methods** MSCs and peripheral blood mononuclear cells were collected by adherent culture and density gradient centrifugation. Then mixed culture was performed to investigate the interaction between MSCs and immune cells. **Results** MSCs were prone to be attacked by activated lymphocytes, though they also inhibited the proliferation of lymphocytes. Lymphocytes could converge to the vicinity of hMSCs after hMSCs were stimulated by supernatant media derived from activated lymphocytes. This proximity provide hMSCs and activated lymphocytes the opportunity of close contact and interaction. Correspondingly, hMSCs also acquired some degree of resistance to the attack of activated lymphocytes after they were stimulated by inflammatory factors. Whether hMSCs could ultimately exert immunoregulatory function would depend on mutual competition of hMSCs and immune cells. **Conclusion** MSCs are sensitive to the cytotoxicity of activated lymphocytes. This study describes what's happening after hMSCs are infused into body, which provides some consideration during the clinical application of hMSCs.

【Key words】 Human bone marrow mesenchymal stem cells; Lymphocytes; Immunomodulation; Cytotoxicity

间质干细胞的一个显著特点就是低表达 I 型主要组织相容性抗原,不表达 II 型主要组织相容性抗原和共刺激分子^[1-2]。因此,间质干细胞具有低免疫原性和不能激活同源异体淋巴细胞增殖的特点^[3]。同时,间质干细胞还能够通过分泌可溶性细胞因子和细胞接触依赖的方式发挥广泛的免疫调节功能^[3-5]。目前间质干细胞在免疫相关性疾病的治疗方面显示了极大的应用前景^[6]。然而,针对间质干细胞的临床应用也存在一些疑虑和担忧,例如对输入体内间质干细胞的存在形式和生存时间等问题并不完全清楚^[7]。本研究利用体外混合培养方法深入研究间质干细胞和免疫细胞的相互作用,为间质干细胞的合理应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 人骨髓间质干细胞的分离,扩增和分化鉴

定 肝素抗凝的骨髓标本 20 ml 与等体积的低糖 DMEM 完全培养基(含 10%FBS)混合后,小心叠加到密度为 1.077 g/ml 的 Ficoll-Hypaque 分离液上。在 800 g 条件下离心 20 min 后,收集分离液上层的单核细胞,经重悬,洗涤后种于培养瓶中,置于 37℃ 和 5% CO₂ 条件下培养箱中。每 3 d 换一次培养基(含 10% FBS 的低糖 DMEM),待细胞融合度达 95% 以上时,用 0.25% 胰酶消化处理并按 1:3 的比例扩增培养。本实验所用到的间质干细胞均在 10 代以内。

骨髓间质干细胞的体外成骨成脂肪分化鉴定按相关文献报道进行^[8]。简述如下,在细胞融合度达到 95% 以上后,分别将普通培养基换为成骨/成脂诱导液,每隔 3 d 换一次新鲜的诱导液。待诱导 12 d 后,诱导的成脂细胞用 10% 甲醛中性液固定 30 min 后用新

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(编号:81101730)、广州医学院第一附属医院院级课题(编号:Y201013)

作者简介:杜晶春(1979—),男,河南省信阳市人,讲师,硕士。

*通讯作者:徐霞(1962—),女,教授。E-mail:xuxia503@126.com

鲜配置的0.6%油红O染液染色。待诱导20 d后,诱导的成骨细胞用10%甲醛中性液固定30 min后用0.5%茜素红-S染液染色。

1.2 流式分析 制成单细胞悬液后的骨髓间质干细胞分别用PE或者FITC荧光染料标记的抗-CD₃₄, CD₇₃, CD₁₀₅, CD₁₀₆, CD₁₆₆ (BD试剂)标记后,用BD FACSCalibur流式细胞仪分析。

1.3 免疫抑制能力鉴定 利用Ficoll淋巴细胞分离液分选人外周血单核细胞(PBMC)后重悬于RPMI 1640完全培养基中(含10%FBS)。首先将不同数量的间质干细胞(1×10⁴, 2×10⁴)铺于96孔平底培养板中,12 h后加入含5 μg/ml PHA (Sigma-Aldrich)的PBMC (1×10⁵),无间质干细胞的体系做为对照,同时每种细胞密度重复5次。3 d后,收集每孔中的悬浮细胞后,每孔加入10 μl CCK-8 (Dojindo)溶液用以检测PBMC的增殖,或者直接将CCK-8加入混合培养体系中用以检测两种细胞的增殖情况。按相同比例在6孔培养板中扩大上述混合培养体系,2 d后用普通光学显微镜观察细胞增殖和间质干细胞的数量和状态。

1.4 条件培养基的制备 2 ml的PBMC (1×10⁶)于6孔培养板中在5 μg/ml PHA条件下刺激增殖2 d后,收集上清并经离心和过滤后制备成条件培养基。

1.5 细胞迁移鉴定 1×10⁵的间质干细胞铺于6孔培养板上,待贴壁12 h后用上述1.4步骤中获得的条件培养基(浓度为50%)再刺激12 h。待吸去条件培养基后,每孔加入新鲜分离的PBMC 2 ml (含细胞1×10⁶)共培养48 h后,用普通光学显微镜观察和记录PBMC在间质干细胞周围的聚集和迁移情况,未经条件培养基刺激的间质干细胞设为对照组。

1.6 PBMC的细胞毒性和间质干细胞抗细胞毒性鉴定 首先将1×10⁵的间质干细胞铺于6孔型的Transwell小孔板的下槽中,12 h后于上槽中加入1×10⁶的PBMC,其中PHA的浓度为5 μg/ml。培养2 d后,观察和记录位于下槽中的间质干细胞的数量和形态,同样数量的普通6孔培养板体系设为对照组。首先将1×10⁵的间质干细胞铺于6孔培养中,12 h后再用1.4步骤中获得的条件培养基刺激10 h。吸去条件培养基后,加入4×10⁶提前单独用5 μg/ml的PHA刺激了3 d的PBMC,共孵育2 d后,观察和记录间质干细胞的数量和状态,并用CCK-8试剂检测混合培养体系中细胞的增殖情况,同时将未经条件培养基刺激的间质干细胞设为对照组。

1.7 统计学方法 所有实验数据用SPSSV.11.0版本软件分析,数据表示为均数±标准差($\bar{x} \pm s$), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人骨髓间质干细胞的特征 如图1A~图1C所示,人骨髓来源的间质干细胞呈典型的长梭形,在体

外能够被诱导分化为成骨细胞和成脂肪细胞。另外,流式分析结果显示人骨髓间质干细胞表达CD₇₃、CD₁₀₅、CD₁₀₆和CD₁₆₆,不表达造血干细胞标志物CD₃₄(图1D)。

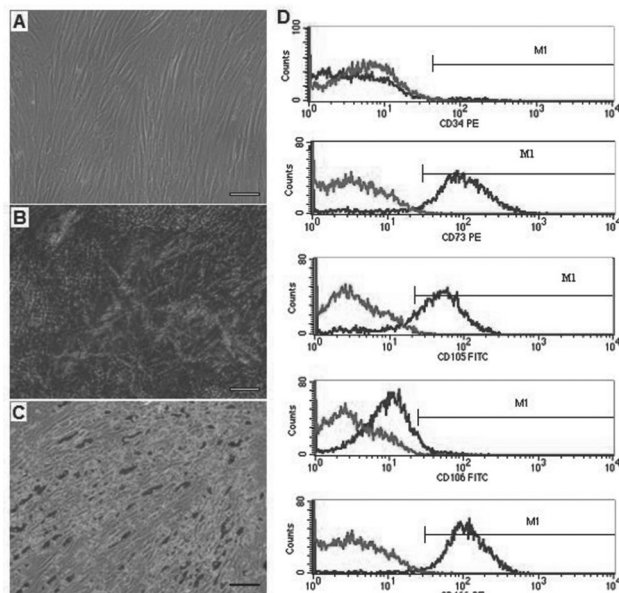


图1 人骨髓间质干细胞的特征分析

注:A:普通光学显微镜下人骨髓间质干细胞的形态;B:成骨细胞诱导分化;C:成脂肪细胞诱导分化;D:细胞表面标志物分析。

2.2 人骨髓间质干细胞对活化淋巴细胞的细胞毒性敏感 如图2A所示,人骨髓间质干细胞能够以一种剂量依赖的方式抑制PHA刺激的T淋巴细胞的增殖。但是,图2B提示经PHA刺激的T淋巴细胞和间质干细胞混合组的细胞增殖情况明显低于非PHA刺激组和无间质干细胞组。图2C~图2D显示,与非PHA刺激组相比,有大约70%的间质干细胞被活化的T淋巴细胞裂解。

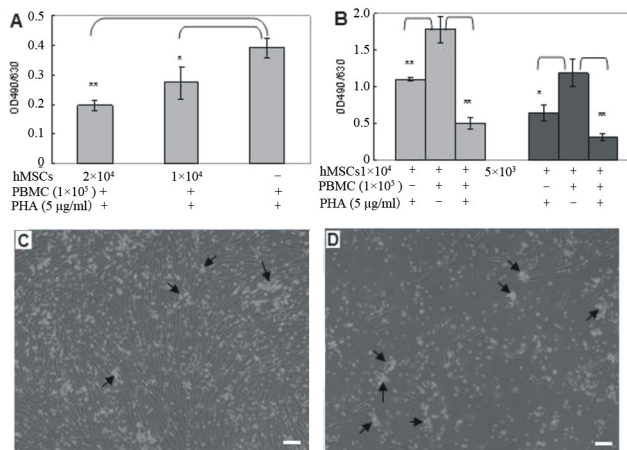


图2 人骨髓间质干细胞对活化淋巴细胞的细胞毒性敏感

注:人骨髓间质干细胞抑制PHA刺激的淋巴细胞的增殖,但同时也被活化的淋巴细胞裂解。(A)经混合共培养后,单独检测淋巴细胞的增殖情况;(B)经混合共培养后,检测各组培养体系内所有细胞的增殖情况;分别在无PHA刺激(C)和有PHA刺激(D)的情况下,间质干细胞和淋巴细胞共培养2 d后两种细胞的形态和数量分布。

2.3 炎症因子促进 PBMC 向间质干细胞聚集 如图3所示,经来自PBMC所分泌的炎症因子刺激后的间质干细胞能够明显召集PBMC向其周围聚集和迁移,同时PBMC在未经炎症因子刺激的间质干细胞中的分布则较为随机和无序。

2.4 活化淋巴细胞的细胞毒性依赖于细胞间的彼此接触 如图4所示,细胞间的相互接触是淋巴细胞发挥细胞毒性作用所必须的,一旦淋巴细胞和间质干细胞被 Transwell 小室分隔开来,活化的淋巴细胞就失去了对间质干细胞的细胞毒性作用。

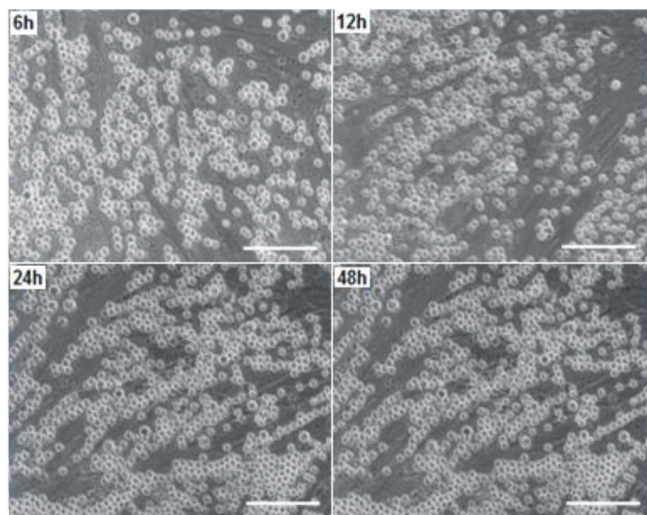


图3 外周血单核细胞(PBMC)向条件培养基刺激的人骨髓间质干细胞周围迁移

注:PBMC分别与对照hMSCs(A)和经条件培养基刺激的hMSCs(B)共培养,在不同培养时间点观察和记录PBMC的分布状态。

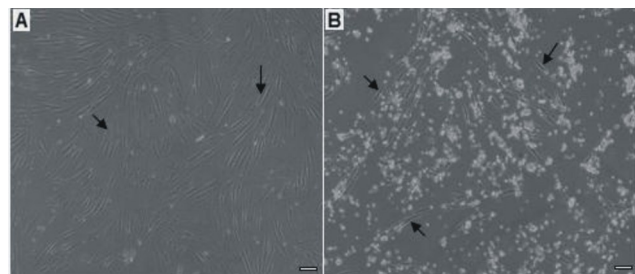


图4 淋巴细胞对人骨髓间质干细胞的细胞毒性依赖细胞间相互接触 注:A:在两种细胞被 Transwell 系统分隔开的情况下,PHA活化的淋巴细胞失去对hMSCs的细胞毒性;B:在未被分隔开的情况下,PHA活化的淋巴细胞对hMSCs具有细胞毒性。

2.5 炎症因子增强间质干细胞的抗淋巴细胞细胞毒性作用 如图5所示,条件培养基刺激后的间质干细胞能够明显增强对抗活化的淋巴细胞的细胞毒性,与对照组相比,至少有三倍以上的间质干细胞逃过了淋巴细胞的攻击而存活了下来。

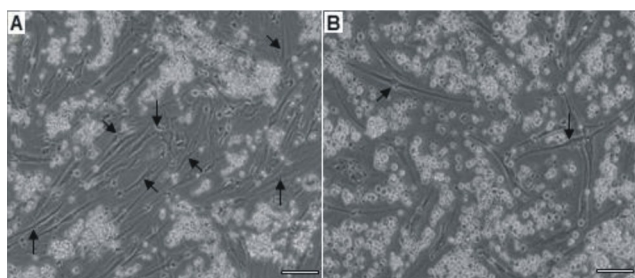


图5 条件培养基的刺激能增强hMSCs抵抗淋巴细胞毒性的能力 注:A:条件培养基刺激组;B:未经条件培养基刺激组

3 讨论

间质干细胞由于具有免疫调节作用和基质支持功能,因此目前关于间质干细胞的临床应用研究主要集中在它们的促进造血干细胞移植和免疫相关性疾病如移植物抗宿主疾病(GVHD)、多发性硬化(Multiple sclerosis)及类风湿性关节炎(RA)等的治疗方面^[9-10]。相关报道提示间质干细胞治疗GVHD的临床效果跟输入间质干细胞的数量和时间有关^[11-12]。如结果部分所示,笔者经体外培养获得的人骨髓间质干细胞能够抑制淋巴细胞的增殖,同时这种抑制强度跟间质干细胞的数量多少成正相关。

尽管目前大多数的研究报道显示间质干细胞能够有效治疗严重的激素抵抗型急性GVHD,但是也有部分报道显示间质干细胞只能轻微的降低GVHD的严重程度甚至完全不能预防GVHD的发生^[13-14]。另外一个令人困扰的问题是目前还不清楚为什么输入体内的间质干细胞很快就会消失^[7]。体外研究显示间质干细胞不能激活细胞毒性T淋巴细胞的效应功能,同时NK细胞也不能有效杀死间质干细胞^[15-16]。然而,在本研究中我们发现尽管间质干细胞能够抑制T细胞的增殖,但是同时也被活化的淋巴细胞杀死。

一般情况下,细胞毒性T淋巴细胞(CTL)主要通过两种途径执行细胞毒性功能。第一种途径首先要

靠CTL表面的T细胞受体和靶细胞表面的主要组织相容性抗原复合物(MHC)之间的相互识别,接着CTL将其胞内的细胞毒性分子如颗粒酶和穿孔素等释放入靶细胞内并杀死靶细胞。第二种途径有赖于炎症因子如IFN- γ 和TNF- α 帮助下的肿瘤坏死因子家族成员如FasL介导的细胞毒作用^[17]。目前的报道显示即使间质干细胞经过特异的肽-MHC复合物和共刺激分子B7-1/2修饰的情况下也不能激活CTL^[2, 15-16]。另外有文献报道间质干细胞表达肿瘤坏死因子受体Fas^[18]。这些结果提示活化的淋巴细胞可能通过FasL-Fas途径攻击间质干细胞。FasL-Fas途径发挥作用的前提是效应细胞和靶细胞必须能够紧密地相互接触。那么淋巴细胞为了发挥毒性功能又是如何靠近间质干细胞的呢?如我们在结果中显示的那样,淋巴细胞通过其自身分泌的炎症因子的帮助能够主动的向间质干细胞周围聚集。通过这种主动迁移,淋巴细胞能够和间质干细胞发生紧密接触并通过FasL-Fas途径发挥杀伤功能。另外,在这一接触过程中细胞毒性颗粒如颗粒酶和穿孔素可能也发挥了一定作用。

另外一个值得关注的问题是间质干细胞在炎症因子刺激后其抗细胞毒性和免疫调节功能是否也发生某种程度的变化呢?我们的结果提示炎症因子刺激后的间质干细胞能够明显地增强其抗淋巴细胞毒性。我们推测间质干细胞在炎症因子的环境下能够觉察到这种潜在的危险信号,从而积极主动地采取对应措施。这些结果提示间质干细胞和淋巴细胞间应当存在一定程度地相互作用和竞争,最终间质干细胞能否发挥免疫调节功能将取决于双方力量的平衡。

总的来讲,本研究发现人骨髓间质干细胞不仅能够抑制淋巴细胞的增殖,同时对淋巴细胞的细胞毒性敏感,并且人骨髓间质干细胞的抗淋巴细胞毒性受炎症因子调节。我们的结果可能部分解释为什么间质干细胞在抑制GVHD发病上存在着两种相互矛盾的结果。希望这些结果可以对间质干细胞的临床应用提供一些帮助和思考。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression [J]. *J Biomed Sci*, 2005, 12(1): 47-57.
- [3] Batten P, Sarathchandra P, Antoniw JW, et al. Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: Relevance to tissue engineering human heart valves [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(8): 2263-2273.
- [4] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [J]. *Blood*, 2005, 105(4): 1815-1822.
- [5] Selmani Z, Naji A, Favier B, 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 [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(1): 212-222.
- [6] 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.
- [7] Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease [J]. *Transplant*, 2006, 81(10): 1390-1397.
- [8] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [9] Djouad F, Fritz V, Apparailly F, et al. Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(5): 1595-1603.
- [10] Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T cell anergy [J]. *Blood*, 2005, 106(5): 1755-1761.
- [11] Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, et al. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease [J]. *Leukemia*, 2007, 21(9): 1992-1999.
- [12] Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment of graft versus host disease [J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(6): 1745-1755.
- [13] 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 [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, 11(5): 389-398.
- [14] Ning H, Yang F, Jiang M, et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study [J]. *Leukemia*, 2008, 22(3): 593-599.
- [15] Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells [J]. *Transplantation*, 2003, 76(8): 1208-1213.
- [16] Rasmusson I, Uhlén M, Blanc KL, et al. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes [J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 82(4): 887-893.
- [17] Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 323-370.
- [18] Delorme B, Ringe J, Gallay N, et al. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Blood*, 2008, 111(5): 2631-2635.

(收稿日期:2012-07-05)