

· 实验研究 ·

间充质干细胞对 EAU 大鼠抗原特异性 T 细胞和抗原递呈细胞功能的抑制作用

白伶俐 张灵君 郑慧 王梅艳 东莉洁 李筱荣 张晓敏

【摘要】 背景 我们前期研究发现,间充质干细胞(MSCs)可以有效治疗大鼠实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU),减轻组织损害,但其具体作用机制仍在研究中。目的 研究 MSCs 对大鼠 EAU 模型中 T 细胞亚群和抗原递呈细胞(APCs)的影响。方法 收集 6 只清洁级 4~6 周龄 Wistar 雄性大鼠双侧股骨、胫骨骨髓,采用贴壁培养法纯化 Wistar 大鼠骨髓 MSCs。采用随机数字表法将 12 只清洁级 Lewis 雌性大鼠分为 MSCs 组和 PBS 组,每组 6 只。于 Lewis 大鼠单后足及背部皮下注射 200 μ l 含 30 μ g 光感受器间维生素 A 类结合蛋白(IRBP)1177-1191 多肽片段 R16 及完全弗氏佐剂(CFA)的乳化液以建立 EAU 模型,造模后于裂隙灯显微镜下观察大鼠眼部炎症表现。造模后 9~11 d, MSCs 组大鼠每日经尾静脉注射密度为 5×10^6 /ml 的 MSCs 悬液 1 ml; PBS 组大鼠以同样的方法注射等容积的 PBS。造模后 15 d,分离各组大鼠脾脏和引流淋巴结中的 T 细胞及 APCs,采用流式细胞仪检测各组大鼠脾脏和引流淋巴结中 γ 干扰素(IFN- γ)阳性 CD4⁺ T 细胞、白细胞介素-17(IL-17)阳性 CD4⁺ T 细胞和叉头状螺旋转录因子 p3(Foxp3)阳性 CD4⁺ T 细胞的比例,以评估辅助性 T 细胞 1(Th1)、Th17 和调节性 T 细胞(Treg)细胞亚群的作用;依据各组 T 细胞与 APCs 共培养的方式不同分为 PBS 共培养组、PBS-MSCs 交叉培养组、MSCs-PBS 培养组和 MSCs 共培养组,分别加入不同质量浓度(0.3、1.0、10.0 μ g/ml)的 R16 抗原进行刺激,无 R16 抗原刺激的细胞作为空白对照,采用 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)法测定各组大鼠 T 细胞吸光度(A)值,计算 T 细胞增生指数。结果 造模后 11、12、13 和 14 d, MSCs 组大鼠眼前节炎症评分均明显低于 PBS 组,差异均有统计学意义($t=3.825, 5.100, 4.250, 3.400$, 均 $P<0.05$)。与 PBS 组大鼠比较, MSCs 组大鼠脾脏和淋巴结中 IFN- γ ⁺CD4⁺ T 细胞比例均明显下降,差异均有统计学意义($t=5.651, 4.376$, 均 $P<0.05$); MSCs 组大鼠脾脏和引流淋巴结中 IL-17⁺CD4⁺ T 细胞比例均明显下降,差异均有统计学意义($t=3.300, 4.925$, 均 $P<0.05$), Foxp3⁺CD4⁺ T 细胞的比例均明显升高,差异均有统计学意义($t=-5.172, -2.825$, 均 $P<0.05$)。PBS 共培养组大鼠脾脏 T 细胞增生指数随着 R16 抗原质量浓度的增加而升高,在各自质量浓度(0.3、1.0 和 10.0 μ g/ml) R16 刺激条件下, MSCs 共培养组 T 细胞增生指数较 PBS 共培养组明显下降,差异均有统计学意义($P=0.027, 0.000, 0.000$); 在 R16 质量浓度为 1.0 μ g/ml 和 10.0 μ g/ml 条件下, MSCs-PBS 交叉培养组和 PBS-MSCs 交叉培养组 T 细胞增生指数均明显低于 PBS 共培养组,差异均有统计学意义(1.0 μ g/ml R16: $P=0.001, 0.000$; 10.0 μ g/ml R16: $P=0.000, 0.000$)。结论 MSCs 可通过同时抑制 EAU 大鼠体内抗原特异性 T 细胞和 APCs 的功能以及上调 Treg 细胞比例来发挥对大鼠 EAU 的治疗作用。

【关键词】 间充质干细胞; 自身免疫性疾病/化学方法诱导; 葡萄膜炎/预防和控制; 辅助性 T 细胞 1/免疫; 辅助性 T 细胞 17/免疫; 调节性 T 淋巴细胞/免疫; 抗原递呈细胞; 动物模型

Inhibitory effects of mesenchymal stem cells on antigen-specific T cells and antigen presenting cells in experimental autoimmune uveitis

Bai Lingling, Zhang Lingjun, Zheng Hui, Wang Meiyang, Dong Lijie, Li Xiaorong, Zhang Xiaomin. Eye Institute & School of Optometry and Ophthalmology, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Zhang Xiaomin, Email: xiaomzh@126.com

【Abstract】 **Background** Our previous studies found that mesenchymal stem cells (MSCs) can ameliorate

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.10.002

基金项目:国家自然科学基金项目(81371005);国家自然科学基金青年项目(31100991)

作者单位:300384 天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼科研究所 天津医科大学眼视光学院(白伶俐,现在北京市垂杨柳医院)

通信作者:张晓敏, Email: xiaomzh@126.com

experimental autoimmune uveitis (EAU) and reduce tissue impairment. Its mechanism is still pending. **Objective** This study was performed to investigate the effects of MSCs on T cell subsets and antigen presenting cells (APCs) in EAU rats. **Methods** MSCs were isolated from bone marrow of six male Wistar rats and cultured by plastic adherence method. Twelve female Lewis rats were assigned randomly into MSCs group and PBS group. EAU rat model was induced by immunization with 200 μ l emulsion containing 30 μ g interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) 1177-1191 polypeptide fragment R16 and complete Freund adjuvant (CFA). The eye manifestations of the rats were observed and scored under the slit lamp microscope after modeling. The R16-immunized rats were treated intravenously with 5×10^6 /ml MSCs for 3 consecutive days from day 9 to 11 after modeling in the MSCs group, and the equivalent volume of PBS was used with the same way in the PBS group. Fifteen days after modeling, the spleens and draining lymph nodes were collected to evaluate the proportion of interferon- γ (IFN- γ) positive CD4⁺ T cells, interleukin-17(IL-17) positive CD4⁺ T cells and forkhead helix transcription factor p3 (Foxp3) positive CD4⁺ T cells by flow cytometry. The T cells and APCs from the different groups were cocultured and divided into PBS cocultured group, MSCs cocultured group, PBS-MSCs cross-cultured group and MSCs-PBS cross-cultured group under the stimulation of R16 at the concentration of 0.3, 1.0 or 10.0 μ g/ml, and the proliferation indexes of the T cells in different groups were assayed by 5-bromodeoxyuridine (BrdU) Elisa kit. The use of experimental animals complied with the regulations on the management of experimental animals promulgated by the national science and technology commission. **Results** The ocular surface inflammatory scores of 11, 12, 13 and 14 days after modeling in the MSCs group were significantly lower than that in the PBS group ($t=3.825, 5.100, 4.250, 3.400$, all at $P<0.05$). Compared with the PBS group, the proportions of IFN- γ positive CD4⁺ T cells in spleen and draining lymph nodes were considerably decreased in the MSCs group ($t=5.651, 4.376$, both at $P<0.05$), so were the IL-17⁺CD4⁺ T cells ($t=3.300, 4.925$, both at $P<0.05$). However, the proportions of Foxp3⁺CD4⁺ T cells in spleen and draining lymph nodes were statistically raised in the MSCs group compared with the PBS group ($t=-5.172, -2.825$, both at $P<0.05$). The proliferation index of T cells increased with the rise of R16 dose in the PBS cocultured group, and the proliferation indexes were all declined in the MSCs cocultured group compared with the PBS cocultured group under the stimulation of 0.3, 1.0 and 10.0 μ g/ml of R16 ($P=0.027, 0.000, 0.000$). In addition, significant reduces of proliferation indexes of T cells were seen in the PBS-MSCs cross-cultured group and MSCs-PBS cross-cultured group in comparison with the PBS cocultured group when stimulated by 1.0 μ g/ml and 10.0 μ g/ml R16 (1.0 μ g/ml R16: $P=0.001, 0.000$; 10.0 μ g/ml R16: $P=0.000, 0.000$). **Conclusions** MSCs can ameliorate EAU by inhibiting the functions of antigen-specific T cells and APCs and up-regulating T regulatory cells in EAU rats.

[Key words] Mesenchymal stem cells; Autoimmune diseases/chemically induced; Uveitis/prevention & control; T helper cell 1/immunology; T helper cell 17/immunology; T-lymphocytes, regulatory/immunology; Antigen presenting cells; Disease models, animal

自身免疫性葡萄膜炎是常见的致盲眼病之一,尤其是慢性和复发性葡萄膜炎。传统药物,包括糖皮质激素和免疫抑制剂均有一定的毒性作用和不良反应,且对部分患者疗效欠佳。近年来各种生物制剂已用于葡萄膜炎的治疗,如多种抗肿瘤坏死因子抗体^[1],但仍存在感染等潜在不良反应,而且由于自身免疫性疾病的病理过程有多种细胞应答通路的参与,拮抗单一细胞因子的药物不具有治疗特异性。寻求更加安全、有效的治疗药物仍是葡萄膜炎治疗研究中亟待解决的问题。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于中胚层的成体干细胞,体外扩增的 MSCs 具有较强的免疫抑制作用,可以抑制自身免疫、抗肿瘤免疫以及移植免疫等多种类型的免疫应答,诱导抗炎效应和/或免疫耐受状态^[2]。与单纯拮抗单一细胞因子的

抗体剂不同, MSCs 可以同时免疫反应的多个环节发挥调节作用^[2]。此外, MSCs 还具有抗炎、促进创伤愈合、营养神经以及增强机体抗感染免疫功能等特性^[3-4],因而在治疗累及视网膜功能的葡萄膜炎方面具有传统糖皮质激素和免疫抑制剂无法比拟的优点。我们前期的研究发现, MSCs 可以有效治疗大鼠实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU),减轻组织损害^[5-7]。目前, MSCs 治疗葡萄膜炎过程中细胞免疫的具体机制仍待阐明。本研究中进一步观察 MSCs 对大鼠 EAU 模型中 T 细胞亚群和抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APCs)的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 4~6 周龄 Wistar 雄性大鼠 6 只及 6~8 周龄 Lewis 雌性大鼠 12 只,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物的使用遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养液、RPMI 1640 培养液、胎牛血清、质量分数 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液(美国 Gibco 公司); β 巯基乙醇(美国 ICN Biomedicals 公司);光感受器间维生素 A 类结合蛋白(interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP)1177-1191 多肽片段 R16(氨基酸残基 ADGSS WEGVG VVPDV)(上海生物工程股份有限公司);完全弗氏佐剂(complete Freund adjuvant, CFA)、佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(PMA)、肌霉素、布雷菲尔得菌素 A(Brefeldin A, BFA)(美国 Sigma 公司);结核分枝杆菌 H37RA(美国 Difco 公司);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的小鼠抗大鼠 CD4 抗体(FITC-CD4),藻红素(phycoerythrin, PE)标记的小鼠抗大鼠 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-17(interleukin-17, IL-17)、叉状头螺旋转录因子 p3(forkhead helix transcription factor p3, Foxp3)抗体(PE-IFN- γ 、PE-IL-17、PE-Foxp3),同型阴性对照抗体(FITC-IgG、PE-IgG),流式细胞固定剂、破膜剂(美国 eBioscience 公司);5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU) ELISA 试剂盒(瑞士 Roche 公司)。

1.2 方法

1.2.1 MSCs 的培养及鉴定 参照文献[5]的方法培养和鉴定 MSCs,取 6 只 Wistar 雄性大鼠颈椎脱臼法处死,置于体积分数 75% 乙醇中浸泡 3 min,在无菌动物手术台上剖取双侧股骨、胫骨,转移至细胞超净台。取 5 ml 注射器针头穿刺骨骺端,DMEM/F12 培养液冲洗骨髓腔,得到细胞悬液,离心半径 13 cm,800 r/min 离心 5 min 后弃上清,用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液重悬,接种至 75 cm² 培养瓶中,置于 37 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度培养箱内培养。培养后 48 h 首次换液,之后每 72 小时换液 1 次。待细胞生长至 80% 融合后,按 1:2~1:3 传代。流式细胞仪检测 CD34、CD45、CD90 和 CD29 等表面分子。选用第 3~5 代 MSCs 进行后续实验。

1.2.2 EAU 动物模型的建立及分组 采用随机数字表法将 Lewis 大鼠分为 MSCs 组和 PBS 组,每组 6 只。将 0.1 ml 含 30 μ g IRBP R16 的多肽溶液与 0.1 ml 含 2.5 mg/ml 结核分枝杆菌 H37RA 的 CFA 等容积混合,充分乳化后,每只大鼠取 200 μ l 行单后足皮下及背部

多点注射,建立 EAU 模型。MSCs 组大鼠于造模后第 9 天开始每日尾静脉注射密度为 5×10^6 /ml 的 MSCs 悬液 1 ml,连续 3 d, PBS 组注射等容积 PBS。

1.2.3 裂隙灯显微镜下观察眼部炎症分级 EAU 造模后每日用裂隙灯显微镜观察各组大鼠双眼眼部表现,并根据 Caspi 炎症分级标准进行双眼炎症评分:0 分:无炎症反应,眼底红光反射正常;0.5 分:虹膜血管轻度扩张、充血;1 分:虹膜血管中度充血,瞳孔缩小;2 分:前房轻度混浊,眼底红光反射减弱;3 分:前房中度混浊,瞳孔仍可见,眼底红光反射暗淡;4 分:前房重度混浊,瞳孔膜闭,眼底红光反射消失,眼球前突。

1.2.4 T 细胞亚群及 APCs 的分离 Lewis 大鼠于造模后 15 d 颈椎脱臼法处死,无菌条件下取出颈部引流淋巴结和脾脏,转移至细胞超净台,加入 RPMI1640 培养液进行研磨,用 150 目细胞筛网过滤,棉花柱过滤,去除结缔组织膜。分别收集脾脏、淋巴结细胞悬液,2 000 r/min 离心 8 min,弃上清,用温热 RPMI1640 完全培养液重悬,加入尼龙柱,37 °C、5% CO₂、饱和湿度细胞培养箱中孵育 1 h, RPMI1640 完全培养液冲洗尼龙柱得 T 细胞悬液。将冲洗后的尼龙柱转移至 50 ml 离心管中冰埋静置 30 min,充分涡旋 5 min,收集所得细胞悬液经 γ 射线照射 15~30 min(30 Gy),所得细胞为 APCs。

1.2.5 流式细胞仪检测不同 T 细胞亚群的比例 将上述分离好的淋巴结和脾脏 T 细胞加入到流式管中,加入含有 50 ng/ml PMA、1 μ g/ml 肌霉素和 1 μ g/ml BFA 的反应体系,37 °C 培养 4 h。过程如下:取 100 μ l 密度为 1×10^6 /ml 的细胞悬液,加入抗大鼠 FITC-CD4 抗体,4 °C 避光孵育 30 min 后洗涤重悬细胞,加入固定破膜剂 4 °C 避光过夜,然后分别加入小鼠抗大鼠 PE-IFN- γ 、PE-IL-17 和 PE-Foxp3 抗体,4 °C 避光孵育 30 min,洗涤重悬细胞,用流式细胞仪进行细胞计数。

1.2.6 BrdU 法测定 T 细胞的增生能力 将 PBS 组大鼠脾脏和淋巴结分离的 T 细胞与 APCs 混合培养作为 PBS 共培养组;将 PBS 组大鼠分离的 T 细胞与 MSCs 组大鼠分离的 APCs 共培养作为 PBS-MSCs 交叉培养组;将 MSCs 组大鼠分离的 T 细胞与 PBS 组大鼠分离的 APCs 共培养作为 MSCs-PBS 交叉培养组;将 MSCs 组大鼠分离的 T 细胞与 APCs 混合培养作为 MSCs 共培养组。将上述各组细胞接种于 96 孔板,分别加入 0.3、1.0、10.0 μ g/ml 的 R16 抗原进行刺激,48 h 后加入 BrdU,持续培养 72 h 后检测大鼠脾脏 T 细胞的吸光度(A)值,计算 T 细胞刺激增生指数,以未加入 R16 抗原的细胞作为空白对照。增生指数 = 刺激条件下 A

值/空白对照 A 值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件(美国 SPSS 公司)进行统计分析。本研究中测量指标的计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数经 Levene 检验证实方差齐。采用完全随机分组和实验前后不同时间自身比较实验设计, MSCs 组与 PBS 组大鼠造模后不同时间点眼部炎症评分的总体差异比较采用重复测量两因素方差分析,多重比较采用 SNK-*q* 检验; MSCs 组与 PBS 组间大鼠脾脏和淋巴结 IFN- γ^+ CD4 $^+$ T 细胞、IL-17 $^+$ CD4 $^+$ T 细胞和 Foxp3 $^+$ CD4 $^+$ T 细胞比例的差异比较均采用独立样本 *t* 检验; PBS 共培养组、PBS-MSCs 交叉培养组、MSCs-PBS 交叉培养组和 MSCs 共培养组在不同质量浓度 R16 刺激条件下 T 细胞增生指数的总体差异比较采用区组设计两因素方差分析,多重比较采用 SNK-*q* 检验。采用双尾检验法,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 MSCs 的形态观察及鉴定

大鼠 MSCs 培养 3~4 d 可见小的集落形成,细胞逐渐伸展呈梭形,贴壁生长的细胞克隆从中心向周边延展,培养 8~10 d 细胞集落融合达 80% 以上,克隆间出现重叠,细胞间呈旋涡状排列。细胞传至第 3 代以后,细胞形态均一,大部分呈长梭形,旋涡状生长(图 1)。

流式细胞仪检测第 3~5 代 MSCs 表面标志物,结果 CD34、CD45 阴性细胞,CD90、CD29 阳性细胞均达到 90% 以上,且细胞表面标志物的表达不会随着传代或者冻存出现明显变化。

2.2 各组大鼠眼前节炎症评分

造模后不同时间点 MSCs 组与 BPS 组眼前节炎症评分比较,差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 31.940, P =$

$0.000; F_{\text{时间}} = 118.200, P = 0.000$)。PBS 组和 MSCs 组大鼠造模后 9 d 均可见虹膜血管轻度扩张,瞳孔缩小,前房轻度混浊;造模后 10 d, PBS 组和 MSCs 组大鼠眼前节炎症评分分别为 1.667 ± 0.490 和 1.083 ± 0.470 , 差异无统计学意义 ($P > 0.05$);造模后 12 d, 2 个组炎症反应均达高峰, PBS 组大鼠表现为虹膜血管明显扩张,前房积脓,瞳孔膜闭,眼底红光反射变暗甚至消失,随后炎症逐渐消退;造模后 11、12、13 和 14 d, MSCs 组炎症评分分别为 1.500 ± 0.522 、 2.333 ± 0.492 、 2.167 ± 0.389 和 1.833 ± 0.374 , 明显低于 PBS 组的 2.250 ± 0.622 、 3.333 ± 0.651 、 3.000 ± 0.603 和 2.500 ± 0.522 , 差异均有统计学意义 ($t = 3.825$ 、 5.100 、 4.250 、 3.400 , 均 $P < 0.05$) (图 2)。

2.3 各组大鼠脾脏和引流淋巴结中 IFN- γ 、IL-17 和 Foxp3 阳性 CD4 $^+$ T 细胞的比例

建立 EAU 模型后 15 d, 流式细胞仪检测结果显示 MSCs 组脾脏和淋巴结中 IFN- γ^+ CD4 $^+$ T 细胞的比例分别为 $(4.04 \pm 0.61)\%$ 和 $(1.26 \pm 0.88)\%$, PBS 组分别为 $(7.01 \pm 1.00)\%$ 和 $(2.87 \pm 0.65)\%$, 差异均有统计学意义 ($t = 5.651$ 、 4.376 , 均 $P < 0.05$); MSCs 组脾脏和淋巴结中 IL-17 $^+$ CD4 $^+$ T 细胞的比例分别为 $(0.64 \pm 0.24)\%$ 和 $(0.64 \pm 0.13)\%$, PBS 组分别为 $(1.75 \pm 0.57)\%$ 和 $(1.38 \pm 0.28)\%$, 差异均有统计学意义 ($t = 3.300$ 、 4.925 , 均 $P < 0.05$); MSCs 组大鼠脾脏和引流淋巴结中 Foxp3 $^+$ CD4 $^+$ T 细胞的比例分别为 $(0.87 \pm 0.26)\%$ 和 $(5.01 \pm 0.99)\%$, PBS 组分别为 $(0.31 \pm 0.06)\%$ 和 $(3.73 \pm 0.49)\%$, 差异均有统计学意义 ($t = -5.172$ 、 -2.825 , 均 $P < 0.05$) (图 3)。

2.4 各组大鼠脾脏 T 细胞增生指数的比较

Lewis 大鼠造模后 15 d, PBS 共培养组 T 细胞增生指数随 R16 抗原质量浓度的升高而增高,与空白对照 ($0 \mu\text{g/ml}$ R16) 值比较, $0.3 \mu\text{g/ml}$ R16 刺激后 T 细胞增生指数明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $10.0 \mu\text{g/ml}$ R16 刺激后增加更为显著,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); PBS-MSCs 交叉培养组 $10.0 \mu\text{g/ml}$ R16 刺激后 T 细胞增生指数明显高于组内空白对照值,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); MSCs-PBS 交叉培养组和 MSCs 共培养组用 0.3 、 1.0 、 $10.0 \mu\text{g/ml}$ R16 刺激后 T 细胞增生指数虽然较空白对照值增加,但差异均无统

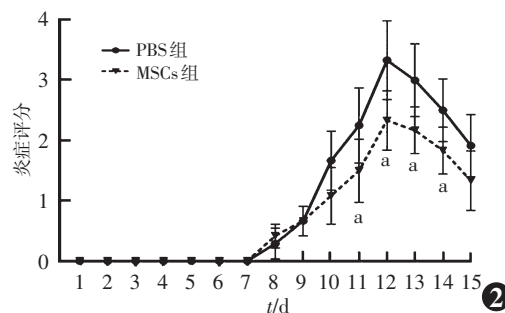
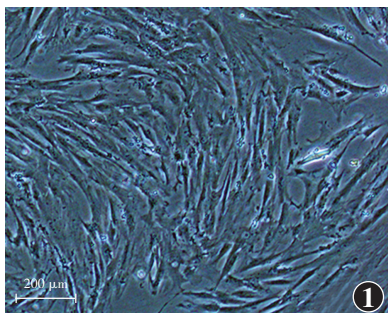


图 1 第 3 代 MSCs 细胞形态 细胞形态均一,呈长梭形,放射状排列生长 图 2 造模后不同时间点 MSCs 组与 PBS 组眼前节炎症评分比较 $F_{\text{分组}} = 31.940, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 118.200, P = 0.000$. 与各自时间点 PBS 组比较, * $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, SNK-*q* 检验, $n = 6$) MSCs: 间充质干细胞

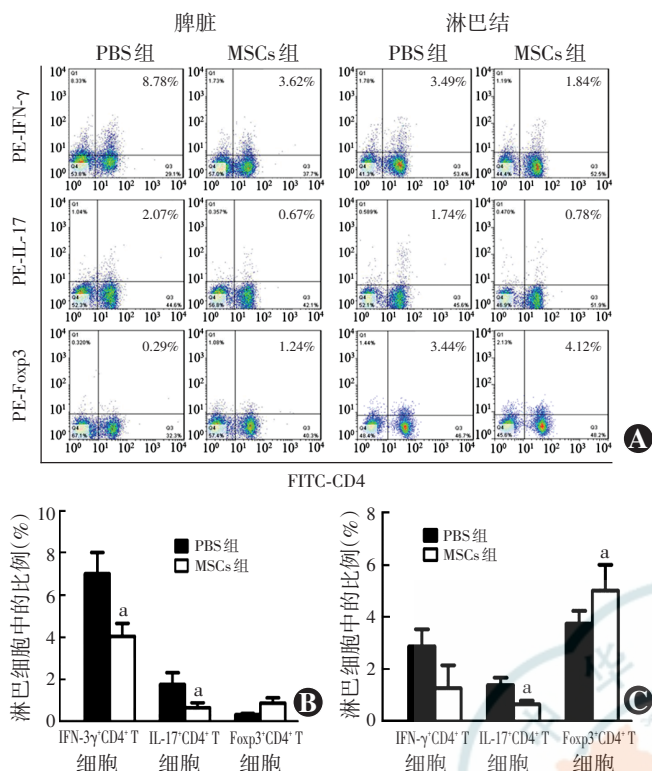


图3 EAU模型大鼠脾脏及引流淋巴结T细胞亚群流式细胞仪检测 A:流式细胞图 B:造模后15d大鼠脾脏中IFN- γ 、IL-17和Foxp3阳性CD4⁺T细胞比例比较 与PBS组比较,^a $P < 0.05$ C:造模后15d大鼠引流淋巴结中IFN- γ 、IL-17和Foxp3阳性CD4⁺T细胞比例的比较 与PBS组比较,^a $P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 6$) MSCs:间充质干细胞;PE:藻红素;IFN- γ : γ 干扰素;IL:白细胞介素;Foxp3:叉状头螺旋转录因子p3;FITC:异硫氰酸荧光素

计学意义(均 $P > 0.05$)。与PBS共培养组比较,在质量浓度为0.3、1.0和10.0 $\mu\text{g/ml}$ R16刺激下, MSCs共培养组T细胞增生指数明显下降,差异均有统计学意义($P = 0.027、0.000、0.000$);在R16质量浓度为1.0 $\mu\text{g/ml}$ 和10.0 $\mu\text{g/ml}$ 条件下, MSCs-PBS交叉培养组和PBS-MSCs交叉培养组T细胞增生指数明显下降,差异均有统计学意义(1.0 $\mu\text{g/ml}$: $P = 0.001、0.000$;10.0 $\mu\text{g/ml}$: $P = 0.000、0.000$)(表1)。

表1 各组大鼠不同质量浓度R16刺激下脾脏T细胞增生指数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同质量浓度R16刺激下T细胞增生指数			
		0 $\mu\text{g/ml}$	0.3 $\mu\text{g/ml}$	1.0 $\mu\text{g/ml}$	10.0 $\mu\text{g/ml}$
PBS共培养组	6	1.00 \pm 0.00	1.89 \pm 0.18 ^a	2.42 \pm 0.43 ^b	3.34 \pm 0.67 ^b
PBS-MSCs交叉培养组	6	1.00 \pm 0.00	1.33 \pm 0.28	1.57 \pm 0.28 ^d	1.83 \pm 0.23 ^{cd}
MSCs-PBS交叉培养组	6	1.00 \pm 0.00	1.27 \pm 0.20	1.36 \pm 0.13 ^d	1.66 \pm 0.25 ^d
MSCs共培养组	6	1.00 \pm 0.00	1.19 \pm 0.13 ^c	1.35 \pm 0.39 ^d	1.47 \pm 0.33 ^d

注: $F_{\text{分组}} = 42.296, P = 0.000; F_{\text{浓度}} = 50.954, P = 0.000$ 。与各自组内0 $\mu\text{g/ml}$ R16的测定值比较, ^a $P < 0.05, ^b P < 0.01$;与各自质量浓度R16刺激下PBS共培养组比较, ^c $P < 0.05, ^d P < 0.01$ (区组设计两因素方差分析, SNK- q 检验) MSCs:间充质干细胞

3 讨论

MSCs仅表达中等水平主要组织相容性复合体I类分子(major histocompatibility complex-I, MHC-I),不表达MHC-II和协同刺激分子,具有较低免疫原性,适合进行异体治疗。此外, MSCs易于分离和进行体外扩增,因而具有广阔的应用前景。最近在加拿大和新西兰, MSCs作为首例成品干细胞药物治疗儿童移植抗宿主病被审批通过^[8]。MSCs免疫调节所涉及的机制众多,目前认为其主要通过旁分泌或细胞之间的接触发挥免疫抑制作用。MSCs可以分泌多种具有免疫调节作用的因子,包括转化生长因子- β 、IL-10、人可溶性白细胞抗原-G、肝细胞生长因子、吲哚胺2,3双加氧酶、一氧化氮以及前列腺素 E_2 等,进而发挥抑制炎症和免疫的作用。

眼为免疫赦免器官,血-眼屏障可以有效抑制天然免疫和获得性免疫细胞的活性及功能,但也使眼部成为自身或模拟化抗原活化淋巴细胞攻击的靶器官,从而易于发生自身免疫性葡萄膜炎。EAU是近年来常用的葡萄膜炎动物模型,其发病机制为CFA/IRBP方式诱导EAU所用佐剂中的结核杆菌和抗原到达引流淋巴结被Toll-样受体所识别,激活天然免疫细胞,如单核细胞、树突状细胞(dendritic cells, DCs)、中性粒细胞、自然杀伤细胞、自然杀伤T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞上的模式识别受体并调节获得性免疫应答,激发并调控免疫器官,如脾脏和引流淋巴结中的T细胞向效应T细胞分化;产生的效应T细胞进一步活化,迁移到达效应器官,最终穿透血-眼屏障攻击视网膜而导致EAU的形成。辅助性T细胞1(T helper cell 1, Th1)、Th17和调节性T细胞(T regulatory cells, Treg)在EAU发生和发展中发挥重要作用。Th1细胞和Th17细胞在不同条件下相互拮抗或合作,分别或同时发挥致病作用^[9]。Treg细胞可以抑制Th1和Th17细胞的增生和功能,在疾病消退过程中发挥重要作用^[10-11]。我们前期研究发现, MSCs在疾病稳定前不同时间注射均可有效治疗EAU^[12];在眼球局部免疫微环境中, MSCs能通过减少CD4⁺T细胞向眼部浸润,下调眼部效应性Th1和Th17细胞以及上调具有免疫抑制功能的Treg细胞来减轻EAU的炎症表现^[9]。本研究中进一步检测免疫反应进程中脾脏和引流淋巴结中T细胞亚群的比例,结果证实MSCs对免疫反应的调控器官也有影响,可抑制脾脏和引流淋巴结中致病性效应Th1细胞(IFN- γ ⁺CD4⁺T细胞)和Th17细胞(IL-17⁺CD4⁺T细胞),上调抑制免疫反应的Treg细胞(Foxp3⁺CD4⁺T

细胞),重建免疫平衡。

APCs 是一类能够加工和处理抗原并将抗原信息递呈给 T 细胞的细胞。DCs 是机体功能最强的特异性 APCs,能够直接刺激初始 T 细胞增生,是免疫应答反应的始动者。有学者认为 Th 细胞亚群(Th1/Th2)分化状态与 DCs 细胞亚群(DC1/DC2)有关,DC1 即髓样 DCs,能分泌 IL-12,作用于 Th0,使之向 Th1 分化,发挥促炎作用;DC2 即淋巴样 DCs,作用于 Th0,使之向 Th2 分化,下调免疫反应^[13]。体外实验证明,将 MSCs 与 DC1 共培养,可将 DCs 维持在非成熟状态,减弱其向淋巴结迁移的能力^[14];将 MSCs 与 DC2 共培养,可激活 DC2 的抗炎通路,维持免疫耐受状态^[15]。功能水平的研究证实,MSCs 处理过的 DCs 可抑制体内迟发型超敏反应并丧失活化 CD4⁺ T 细胞的功能^[16-19]。此外,研究表明 MSCs 可以通过分泌细胞因子以及细胞间的接触抑制 T 细胞增生,MSCs 可使 T 细胞周期阻滞于 G₀/G₁期,即使去除 MSCs,T 细胞的增生能力也难以恢复。因此,本研究中针对 T 细胞和 APCs 设计了交叉实验,发现 MSCs 可以同时抑制 EAU 大鼠体内 T 细胞和 APCs 的功能,来自 MSCs 组的 APCs 在体外可以抑制 PBS 组 T 细胞的增生,而来自 MSCs 组的 T 细胞与 PBS 组 APCs 共培养增生能力也同样下降。本实验结果表明,MSCs 治疗可同时抑制大鼠 EAU 体内 T 细胞和 APCs 的功能,进而阻断炎症反应通路,使病情得到缓解。

临床上有多种类型葡萄膜炎为慢性复发葡萄膜炎,而本研究中采用的大鼠 EAU 模型是一种单发的自限性疾病,其眼前节炎症评分多在 21 d 后回归正常,因而具有一定局限性。为了充分证实 MSCs 对葡萄膜炎的治疗作用,我们目前正在采用小鼠慢性 EAU 模型以及大鼠复发 EAU 模型进一步研究 MSCs 对葡萄膜炎的治疗作用以及相关机制。

综上所述,MSCs 可以下调 EAU 大鼠脾脏、引流淋巴结和眼的致病性 T 细胞比例,上调 Treg 细胞比例;同时,在体内可同时抑制 T 细胞和 APCs 的功能。未来需要进一步明确 MSCs 在治疗 EAU 过程中发挥免疫抑制作用的分子机制。

参考文献

[1] Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine [J/OL]. *Exp Mol Med*, 2013, 45 : e54 [2015-03-19]. <http://www.nature.com/emmm/journal/v45/n11/full/emmm201394a.html>. doi: 10.1038/emmm.2013.94.

[2] Chen PM, Yen ML, Liu KJ, et al. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells [J/OL]. *J*

Biomed Sci, 2011, 18 : 49 [2015-02-17]. <http://www.jbiomedsci.com/content/18/1/49>. doi: 10.1186/1423-0127-18-49.

[3] Al JM, Abumaree MH. The immunomodulatory and neuroprotective effects of mesenchymal stem cells (MSCs) in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): a model of multiple sclerosis (MS) [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13 (7) : 9298-9331. doi: 10.3390/ijms13079298.

[4] Mei SH, Haitisma JJ, Dos SC, et al. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182 (8) : 1047-1057. doi: 10.1164/rccm.201001-00100C.

[5] Zhang X, Ren X, Li G, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune uveoretinitis by comprehensive modulation of systemic autoimmunity [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (6) : 3143-3152. doi: 10.1167/iov.10-6334.

[6] Li G, Yuan L, Ren X, et al. The effect of mesenchymal stem cells on dynamic changes of T cell subsets in experimental autoimmune uveoretinitis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 173 (1) : 28-37. doi: 10.1111/cei.12080.

[7] 张灵君, 张晓敏, 郑慧, 等. 间充质干细胞对实验性自身免疫性葡萄膜炎眼部 CD4⁺ T 细胞亚群浸润的影响 [J]. *中华眼底病杂志*, 2013, 29 (2) : 178-182. doi: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2013.02.014.

[8] Zhang B, Yin Y, Lai RC, et al. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23 (11) : 1233-1244. doi: 10.1089/scd.2013.0479.

[9] Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1183 : 211-221. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05133.x.

[10] Ke Y, Jiang G, Sun D, et al. Ocular regulatory T cells distinguish monophasic from recurrent autoimmune uveitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49 (9) : 3999-4007. doi: 10.1167/iov.07-1468.

[11] Sun M, Yang P, Du L, et al. Increased regulatory T cells in spleen during experimental autoimmune uveoretinitis [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2010, 18 (1) : 38-43. doi: 10.3109/09273940903414525.

[12] Zhang X, Ren X, Li G, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune uveoretinitis by comprehensive modulation of systemic autoimmunity [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (6) : 3143-3152. doi: 10.1167/iov.10-6334.

[13] Pulendran B, Banchereau J, Maraskovsky E, et al. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors [J]. *Trends Immunol*, 2001, 22 (1) : 41-47.

[14] English K, Barry FP, Mahon BP. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation [J]. *Immunol Lett*, 2008, 115 (1) : 50-58.

[15] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [J]. *Blood*, 2005, 105 (4) : 1815-1822.

[16] Zhang B, Liu R, Shi D, et al. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population [J]. *Blood*, 2009, 113 (1) : 46-57. doi: 10.1182/blood-2008-04-154138.

[17] Chiesa S, Morbelli S, Morando S, et al. Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108 (42) : 17384-17389. doi: 10.1073/pnas.1103650108.

[18] Liu X, Qu X, Chen Y, et al. Mesenchymal stem/stromal cells induce the generation of novel IL-10-dependent regulatory dendritic cells by SOCS3 activation [J]. *J Immunol*, 2012, 189 (3) : 1182-1192. doi: 10.4049/jimmunol.1102996.

[19] Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, et al. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2 [J]. *Blood*, 2009, 113 (26) : 6576-6583. doi: 10.1182/blood-2009-02-203943.

(收稿日期:2015-05-19)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)