论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1052-02

人肺来源的间充质干细胞对T淋巴细胞增殖的影响

向明章[1], 蒋耀光[2], 王慧春[1], 林一丹[2] (第三军医大学:[1]新桥医院胸外科,重庆 400037,[2]大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心,重庆 400042)

提 要: 目的 探讨来源于人肺的间充质干细胞(MSCs)是否具有免疫调控能力。**方法** 采用流式细胞术鉴定其免疫表型,用淋巴母细胞转化实验观察其是否具有免疫调控能力。**结果** ①MSCs不表达引起免疫反应的细胞表面分子HLA-DR、CD86、CD80等;②随MSCs细胞量增多,抑制T细胞增殖能力越强。**结论** 人肺来源的间充质干细胞具有免疫调控能力。

关键词: 肺;间充质干细胞;免疫调控

中图法分类号: R322.35;R329.28;R392.12 **文献标识码**: A

Human lung-derived mesenchymal stem cells inhibit T lymphocyte proliferation

XIANG Ming-zhang[1], JIANG Yao-guang[2], WANG Hui-chun[1], LIN Yi-dan[2] ([1]Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037; [2]Thoracic and Cardiovascular Surgery Research Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the immunoregulatory ability of human lung-derived mesenchymal stem cells (MSCs) on T cells. **Methods** MSCs were isolated and cultured from human fetal lung. The immune phenotype was tested by flow cytometry and T lymphocyte proliferation assessed by [^{3}H] thymidine incorporation. **Results** HLA-DR, CD86, and CD80 were not expressed in human lung-derived mesenchymal stem cells. The proliferation of peripherial blood-derived T cells was suppressed and this suppression seemed dependent on the concentration of MSCs. **Conclusion** Human lung-derived MSCs have been proved to possess immunomodulatory ability.

Key words: lung; mesenchymal stem cell; immunomodulation

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于中胚层的一类多能干细胞。近年来的研究表明MSCs具有高度增殖、自我更新及多向分化的潜能[1],并且在体外易于分离、培养和扩增,免疫原性低。但对从肺脏来源的间充质干细胞的生物学性状及免疫调控作用尚少有报道。作者在分离和鉴定人肺组织来源的间充质干细胞的基础上[2],用淋巴母细胞转化实验观察其是否具有免疫调控能力以进一步探讨MSCs的免疫调节作用。

1 材料与方法

1.1 肺MSCs的分离纯化、培养与鉴定

按文献[2]方法,分离、纯化、培养与鉴定肺MSCs。

1.2 T淋巴细胞的分离培养

健康供者外周血,用PBS倍比稀释后,以淋巴细胞分离液(Ficoll,1.077 g/ml,上海恒信试剂有限公司)分离外周血单个核细胞,用CD3$^+$磁珠分离纯化CD3$^+$T细胞(Miltenyi, Germany)。计数后,用含20% FBS的RPMI1640培养基(Gibco公司)重悬成1×10^6/ml备用。

1.3 混合淋巴细胞反应

将纯化后的肺MSCs经^{60}Co γ射线照射(照射剂量为12.5 Gy)后,消化,计数,1×10^5/孔作为刺激细胞,刺激T细胞的增殖,其中照射后异体外周血单个核细胞(Mo)为对照刺激细胞,以检测MSCs的免疫原性。另外以50 000、10 000、2 000、1 000个细胞/孔,分别接种于96孔板,CD3$^+$T淋巴细胞悬浮于含20% FBS的RPMI1640培养基中,以1×10^5/孔接种于经^{60}Co γ射线照射MSCs上。加入照射后异体Mo以刺激T淋巴细胞增殖。以不含MSCs组为对照。将实验组与对照组细胞于37 ℃、5% CO_2孵育培养84 h,加入^{3}H标记的脱氧胸腺嘧啶单核苷酸(^{3}H-TdR,中国科学院原子能研究所),3.7×10^4 Bq/孔,标记12 h时后,收集细胞,用液体闪烁计数仪(Beckman公司)检测cpm值,并进行比较分析。

1.4 淋巴母细胞转化

将纯化后的肺MSCs经^{60}Co γ射线照射(照射剂量为12.5 Gy)后,消化,计数,以50 000、10 000、2 000、1 000个细胞/孔分别接种于96孔板。CD3$^+$T淋巴细胞悬浮于含20% FBS的RPMI1640培养基中,以1×10^5/孔接种于经^{60}Co γ射线照射

作者简介:向明章(1962-),男,湖北省仙桃市人,博士研究生,副主任医师,副教授,主要从事胸部外科基础及临床诊断治疗方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68774516,E-mail:xiangmingzhang@163.com

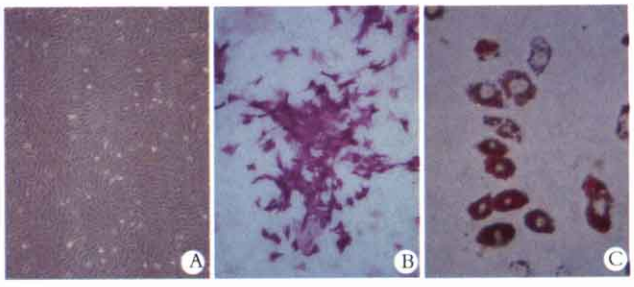
收稿日期:2006-01-23;修回日期:2006-03-23

的 MSCs 上。加入终浓度为 10 μg/ml 植物血凝素（PHA，Sigma 公司）以刺激外周血 T 淋巴细胞转化增殖。以等细胞量的 $CD3^+$ T 淋巴细胞（不含 MSCs）经 PHA 刺激转化为对照组。将实验组与对照组细胞于 37 ℃、5% CO_2 孵育培养 84 h，加入 ^3H 标记的脱氧胸腺嘧啶单核苷酸，3.7×10^4 Bq/孔，标记 12 h 后，收集细胞，用液体闪烁计数仪（Beckman 公司）检测 cpm 值，并进行比较分析。

2　结果

2.1　肺 MSCs 的基本生物学特点

应用 Percoll 液（1.073 g/ml）梯度离心（900 × *g* 离心30 min）分离的单个核细胞，接种于 10% 经筛选的 FBS 的 DMEM-LG 中，72 h 后出现贴壁的纺锤状细胞，4 d 左右形成克隆，12 d 后出现致密的贴壁细胞层，细胞有规律地排列成束状，有的呈漩涡状。流式细胞术分析显示细胞表达 CD73、CD105、CD166，不表达细胞分化相关标志 CD34、CD45 和免疫相关表型 HLA-DR、CD86、CD80。细胞能诱导分化成脂肪和成骨细胞（图 1）。

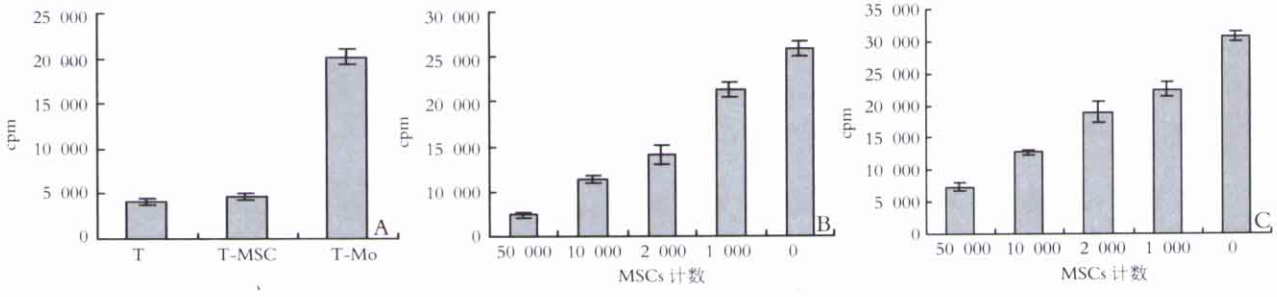


A：肺源性 MSCs 形态；B：ALP 染色的肺 MSCs 源性成骨细胞；C：油红 O 染色的肺 MSCs 源性脂肪细胞

图 1　肺源性间充质干细胞（MSCs）形态和分化能力　（×100）

2.2　肺 MSCs 具免疫调控能力

淋巴细胞反应结果显示，肺脏来源的间充质干细胞不仅不能刺激 T 淋巴细胞的增殖，而且还能抑制单个核细胞和有丝分裂原引起的 T 细胞的增殖，且随着 MSCs 数量的增加，其对 T 细胞增殖的抑制增强（图 2）。



A：各组 T 淋巴细胞增殖情况；B：外周血 T 淋巴细胞 + 外周血单个核细胞 + MSCs；C：外周血 T 淋巴细胞 + MSCs

图 2　不同培养条件下 T 淋巴细胞 ^{3}H-TdR 掺入情况

3　讨论

目前已知 MSCs 是中胚层发育的早期细胞，具有多向分化及体外扩增的潜能。在特定条件下可诱导分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、肌原细胞、神经细胞等。近几年来，随着对 MSCs 研究的广泛开展，人们对其生物学特性及生理功能逐渐认识。MSCs 的形态多为纺锤状，且细胞体积较大，不表达与分化相关的细胞表面抗原，其倍增时间约为 30 h。经过数 10 代传代和低温冷冻保存后，细胞表型和分化潜能不发生明显改变[3,4]。我们在体外分离培养了胎肺来源的 MSCs，在以低糖的 DMEM 培养条件下培养 3 代，其形态为均质性，且流式细胞术分析结果显示，细胞表达 CD73、CD105，不表达细胞分化相关标志 CD34、CD45 和免疫相关表型 HLA-DR、CD86、CD80。细胞能诱导分化成脂肪和成骨细胞。由此说明我们所分离培养的 MSCs 纯度较高。

既往研究表明骨髓 MSCs 在体外具有免疫负调节作用[1,5]，但具体机制仍不清楚。Le-Blanc 等[5] 研究发现 MSCs 的免疫负调控是非抗原特异性的，认为 MSCs 的免疫调节功能与其表型相关，且产生 MSCs 免疫抑制活性的机制部分在于诱导 $CD8^+$ 抑制细胞而起作用的。我们分离培养的胎儿肺脏间充质干细胞在免疫表型上和骨髓来源的间充质干细胞相似，具有低的免疫原性[2]。基于以上的研究，我们观察了不同量的肺 MSCs 对外周血 T 淋巴细胞转化的影响。研究结果显示，肺 MSCs 能抑制外周血 T 淋巴细胞的转化，MSCs 的量不同，其对 T 淋巴细胞转化的影响不同，随着 MSCs 细胞量的增多，其抑制 T 细胞增殖的能力越强。因此可以认为，源于肺脏的 MSCs 具有免疫调控能力，且与其细胞数量相关。但是详细机制有待进一步研究。

参考文献：

[1] DEVINE S M, HOFFMAN R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation[J]. Cur Opin Hematol, 2000, 7(6): 358 - 363.

[2] 向明章，蒋耀光，王慧春，等. 人肺组织来源的间充质干细胞的分离和鉴定[J]. 重庆医学，2006，35(6)：524 - 525.

[3] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143 - 147.

[4] DEANS R J, MOSELEY A B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses[J]. Exp Hematol, 2000, 28(8): 875 - 884.

[5] Le-BLANC K, PITTENGER M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise[J]. Cytotherapy, 2005, 7(1): 36 - 45.

（编辑　陈聪连）