文章编号:1000-5404(2007)08-0663-03

论著

间充质干细胞成骨诱导后免疫原性的研究

郭书权,谢 肇,吴雪晖,许建中,梁文杰,罗 飞 (第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)成骨诱导后的免疫原性。**方法** 小型猪骨髓MSCs体外分离培养,成骨诱导1、7、14、21 d后,行流式检测MHC-Ⅱ,单向混合淋巴细胞培养(mixed lymphocyte culture, MLC)测定刺激指数(stimulation index,SI),并测定混和培养上清IL-2和IL-10的变化。**结果** MSCs诱导后1、7、14、21 d均未检测到MHC-Ⅱ表达,MLC未测到细胞明显增殖,上清IL-2和IL-10无显著变化($P>0.05$)。**结论** MSCs体外成骨诱导后的免疫原性低。

关键词: 间充质干细胞;诱导;混合淋巴培养;免疫原性
中图法分类号: R322.71;R329.21;R392.1 **文献标识码:** A

Research on immunogenicity of MSCs after osteoinduction

GUO Shu-quan, XIE Zhao, WU Xue-hui, XU Jian-zhong, LIANG Wen-jie, LUO Fei (Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the the immunogenicity of MSCs after differentiation into osteocytes. Methods MSCs isolated from pig bone barrow were cultured and induced into differentiate into osteocytes. Before induction and on day 1, 7, 14 and 21 after induction, MHC-Ⅱ was detected with flow cytometer (FCM), stimulation index was examined by One-way MLC, and IL-2 and IL-10 levels in supernatant was determined. Results MSCs after osteoinduction did not express MHC-Ⅱ, and there were no significant changes of stimulation index, IL-2 and IL-10 levels. Conclusion The immunogenicity of MSCs after differentiation into bone is low.

Key words: mesenchymal stem cells; induction; mixed lymphocyte culture; immunogenicity

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在体外能大量扩增并向成骨分化,是目前骨组织工程最常用的种子细胞[1]。以自体MSCs构建组织工程骨存在来源不足,体外等待时间长等缺点,因此异基因MSCs被认为是未来组织工程骨种子细胞的发展方向[2]。目前研究显示MSCs的免疫原性较低甚至没有,但成骨诱导后免疫原性如何还不清楚。本研究就猪骨髓MSCs进行体外培养并诱导培养使其向成骨分化,了解MSCs经成骨诱导不同时间后的免疫原性变化。

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)重大专项(2006AA02A122);重庆市科技攻关项目(2003-13-6)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2006AA02A122) and the Foundation for the Sci & Tech Research Project of Chongqing (2003-13-6)

作者简介: 郭书权(1974-),男,四川省营山县人,博士研究生,主治医师,主要从事骨组织工程及脊柱外科方面的研究。电话:13983895664,E-mail: gsq05@yahoo.com.cn
通讯作者: 许建中,电话:(023)68754164

收稿日期: 2006-12-21;**修回日期:** 2007-02-21

1 材料与方法

1.1 材料

健康成年猪20只(第三军医大学实验动物中心),雌雄各半、12~14月龄,体质量35~39 kg。胰酶、地塞米松、β-甘油磷酸钠、维生素C、Percoll液、丝裂霉素C(Sigma,USA),胎牛血清(FBS)、DMEM/F_{12}(Hyclone,USA);CD29、CD34、CD44、CD45、MHC-Ⅱ单抗及荧光标记二抗(联科生物),^{3}H-TdR(中国核科学院),IL-2和IL-10 ELISA试剂盒(Biosource USA)。

1.2 方法

1.2.1 MSCs分离、培养及鉴定 利多卡因局部麻醉下,抽取健康成年猪髂骨骨髓,总量约5 ml,用PBS稀释骨髓液,400×g,离心10 min,去上清和脂肪层,等量稀释后加入Percoll(密度为1.073 g/ml的Percoll液)进行分离,900×g离心30 min,吸取中间乳白色云雾状细胞层,用DMEM/F_{12}漂洗2次,加入15% FBS的DMEM/F_{12}培养液,制成单细胞悬液,以1×10^6/cm^2接种培养瓶,置37 ℃、5% CO_2饱和湿度孵箱内孵育。传代至3代时取传代培养的MSCs,调节细胞浓度至1×10^6/ml,行CD29、CD34、CD44、CD45单抗标记作流式检查进行细胞鉴定。

1.2.2 MSCs成骨诱导及鉴定 分别取第3代MSCs，接种于6孔培养板，细胞融合至70% ~80%时，加入含地塞米松(1×10^{-8}mol/L)、β-甘油磷酸钠(1×10^{-2} mol/L)、维生素C(50 mg/L)的10% FBS的$DMEM/F_{12}$培养液成骨诱导，并作成骨鉴定。

茜素红染色：分别取诱导前，诱导后1、7、14、21、28 d，取出培养板中盖玻片，用PBS洗涤3次，95%乙醇固定10 min，0.1%茜素红染色30 min，蒸馏水冲洗，甘油明胶封片。

ALP检测：细胞以1×10^5/孔密度接种，分别于诱导前，诱导后第1、7、14、21、28天收集细胞，调整细胞浓度至1×10^5/ml，取1 ml细胞悬液，400 × *g* 离心10 min，弃上清，加入TritonX-100(2 g/L)，4 ℃冰箱过夜粉碎，取50 μl接种于测定管内，按照ALP试剂盒说明测酶联免疫检测520 nm的光吸收值*D*(520)，计算出ALP活性，单位用U/L表示。

1.2.3 MHC-Ⅱ流式检查 取MSCs成骨诱导前，诱导后1、7、14、21 d的细胞，调节细胞浓度至1×10^6/ml，取100 μl细胞悬液加入1.5 ml EP管，每个测定管中加入2 μl MHC-Ⅱ单抗以及100 μl 2%的BSA，室温孵育30 min，PBS洗3次，400 × *g* 离心5 min，弃上清，然后加入相应的带FITC标记二抗以及100 μl 2%的BSA，暗区4 ℃下孵育30 min，PBS洗3次，400 × *g* 离心5 min，弃上清，加入1%的多聚甲醛固定，置空白管以及阴性对照，即日上机检测。

1.2.4 单向混合淋巴细胞培养(mixed lymphocyte culture，MLC) 取MSCs成骨诱导前，诱导后1、7、14、21 d的细胞，用10%小牛血清的完全培养基RPMI1640调节细胞浓度至1×10^5/ml，加入最终浓度为50 μg/ml的丝裂霉素C，于37 ℃水浴中作用20 min，PBS洗涤，即制成刺激细胞。取异体猪外周血，常规分离出淋巴细胞，调节细胞浓度至1×10^6 /ml，即为反应细胞。取刺激细胞和反应细胞各0.1 ml于96孔板，置37 ℃、5% CO_2饱和湿度孵箱内孵育培养5 d，设植物血凝素(PHA)阳性对照组以及空白组。上述每孔分别加入^{3}H-TdR，继续培养12 h，β-闪烁计数器测定掺入的^{3}H-TdR的放射量(CPM)，结果为刺激指数$SI=CPM_{混合组}/CPM_{空白组}$。

1.2.5 单向MLC后测定IL-2和IL-10 取MSCs成骨诱导前，诱导后1、7、14、21 d的细胞如1.2.4所述，单向培养5 d收集上清，按ELISA试剂盒操作步骤测定上清IL-2和IL-10的水平。

1.3 统计学处理

数据以$x\pm s$表示，采用SPSS 12.0统计软件进行*t*检验。

2 结果

2.1 MSCs分离、培养及鉴定

猪MSCs形态多角形，主要以长梭型为主(图1)。其细胞表面标志$CD34^-$、$CD45^-$、$CD29^+$、$CD44^+$检测显示CD29、CD44阳性表达，CD34、CD45阴性表达，符合MSCs的表型。

2.2 MSCs成骨诱导及鉴定

茜素红染色阳性为红色，结果显示成骨诱导后1、7、14、21 d细胞显色成阳性且逐渐增强(图2)。28 d较21 d显色强度区别不明显。

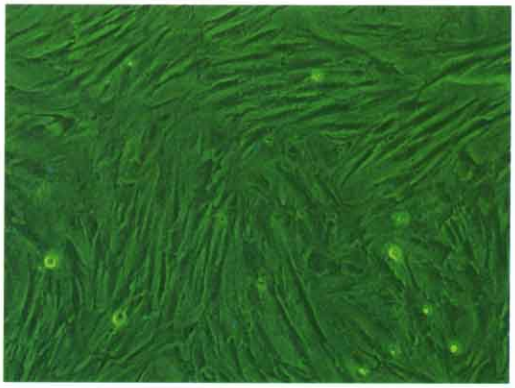


图1 猪MSCs 3代培养4 d形态观察 (CM × 100)



图2 猪MSCs成骨诱导14 d后茜素红染色结果 (CM × 100)

诱导后不同时间点ALP检测结果：诱导前为(5.3 ± 0.31) U/L，诱导后1、7、14、21、28 d分别为(10.21 ± 0.27)、(19.54 ± 0.57)、(37.43 ± 0.95)、(49.25 ± 1.26)、(50.24 ± 0.86) U/L。细胞在诱导培养至21 d时，随着培养时间的延长，ALP活性逐渐升高($P<0.05$)，显示成骨增强，之后增殖不明显($P>0.05$)。

2.3 MHC-Ⅱ流式检测

MSCs经成骨诱导前，诱导后1、7、14、21 d流式检测细胞表达MHC-Ⅱ，结果是诱导后各时间点均未测到MHC-Ⅱ表达。

2.4 MLC检测

MSCs经成骨诱导前，诱导后1、7、14、21 d混合淋巴培养，测定SI显示：经PHA刺激的淋巴细胞明显增殖($P<0.01$)，SI=(22.5 ± 0.6)，而诱导前，诱导后1、7、14、21 d细胞的SI分别为(1.15 ± 0.12)、(1.14 ± 0.19)、(1.13 ± 0.20)、(1.15 ± 0.45)和(1.16 ± 0.18)。不同时间点比较刺激细胞增殖无明显区别($P>0.05$)。

2.5 单向MLC上清IL-2和IL-10的水平

我们比较了不同时间点MLC上清IL-2和IL-10的水平(表1)，结果显示不同时间点IL-2和IL-10的水平无显著变化($P>0.05$)。

表1 单向MLC上清IL-2和IL-10水平(pg/ml，$x\pm s$)

	PHA	0 d	1 d	7 d	14 d	21 d
IL-2	459.5 ± 89.4	68.6 ± 12.6[a]	69.4 ± 10.2[a]	70.2 ± 9.8[a]	69.3 ± 11.9[a]	71.5 ± 8.8[a]
IL-10	375.2 ± 68.7	72.4 ± 11.5[a]	71.7 ± 12.4[a]	73.1 ± 9.8[a]	74.5 ± 9.1[a]	72.9 ± 12.4[a]

a：$P<0.01$，与PHA比较

3　讨论

MSCs 是中胚层来源的具有多向分化能力的干细胞，主要存在于全身结缔组织和器官间质中，以骨髓组织中含量最为丰富。MSCs 具有多向分化潜能，在一定诱导条件下具有向成骨细胞、成软骨细胞、成肌细胞、肌腱细胞、脂肪细胞以及基质细胞等中胚层细胞分化的能力；新近研究显示 MSCs 还可以向外胚层的神经元细胞和内胚层的肝卵圆性细胞分化[3-6]。MSCs 具有广阔的应用前景。由于其具有成骨分化能力，且获取相对容易，是目前组织工程种子细胞的重要来源。以自体 MSCs 构建的组织工程骨要进入临床，最大的瓶颈就是体外构制时间长，一般需 3～4 周。为适应临床“随取随用”的宗旨，目前转向研究异体 MSCs 的可能，而异体可能的障碍就是细胞的免疫原性。

目前研究显示，MSCs 的免疫原性很低或无免疫原性，流式检测表明 MSCs 仅表达 MHC-Ⅰ，不表达 MHC-Ⅱ、Fas/FasL、CD80、CD86、CD40 和 CD40L；同时体外实验：MLC 显示其并不引起异体淋巴细胞的增殖及活化，甚至发现 MSCs 有抑制异体淋巴细胞增殖活化的作用，以及抑制由分裂素 PHA、CoA 和刀豆素诱导的异体淋巴细胞增殖反应；造血干细胞（HSC）移植后往往发生严重的 GVHD，但输入同种异体 MSCs 能明显减轻 HSC 移植后的 GVHD；体内实验显示同种异体 MSCs 能在体内较长时间存在而不被识别清除[7-9]。本实验亦显示诱导前猪 MSCs 未能诱导淋巴细胞增殖，说明其免疫原性较低。

MSCs 经成骨诱导后细胞的免疫原性如何，异体 MSCs 构建组织工程骨，细胞分化为成骨细胞后免疫原性如何是异体组织工程骨的移植的关键。本研究重点是 MSCs 成骨诱导后的免疫原性。研究显示 MSCs 经地塞米松、β-甘油磷酸钠以及维生素 C 等诱导后约 1 周逐渐分化为成骨表型，约 3 周成骨表型基本稳定。通过对 MSCs 成骨诱导不同时间点进行单向 MLC，通过掺入^{3}H-TdR，检测淋巴细胞的增殖，结果显示无显著增殖。ELISA 分析 MLC 后上清 IL-2 和 IL-10 的含量，但测量结果表明 IL-2、IL-10 在诱导后没有显著变化。本实验对成骨诱导前流式未检测到 MHC-Ⅱ表达，与前报道一致；成骨诱导后不同时间点的细胞流式也未检测到 MHC-Ⅱ表达。

MLC 是目前经典的用于体外检测免疫原性的方法，通过不同个体间存在 MHC 异质性，可刺激淋巴细胞转化并增殖，检测掺入的^{3}H-TdR，即可反映免疫原性的强弱。MHC 是引起免疫排斥的主要抗原，尤其是 MHC-Ⅱ是异体排异较重要的抗原性物质，其通过抗原提呈而导致严重的排斥反应；目前一般认为 MHC-I 可能引起较轻微的免疫反应，因此通过检测 MHC-Ⅱ的表达可推测其免疫原性强弱[10]。研究显示 Th1 和 Th2 也与单向 MLC 细胞增殖相关，Th1 细胞分泌 IL-2，参与淋巴细胞的激活，而 Th2 分泌的 IL-10 则抑制排斥[11]。本实验结果显示，MSCs 经成骨诱导后并没有引起 MLC 的细胞明显增殖，诱导不同时间后均无显著变化；进一步检测 MLC 上清 IL-2 和 IL-10 无明显变化；通过流式检测未显示 MHC-Ⅱ表达。因此可以推论 MSCs 经成骨诱导后其免疫原性低。

由于 MSCs 成骨诱导后免疫原性低，因此其可能是未来异体组织工程骨的最为重要的种子细胞，是异基因组织工程骨在临床中得到广泛应用，实现组织工程的产业化的保证。

参考文献：

[1] Caplan A I. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics[J]. Tissue Eng, 2005, 11(7-8): 1198-1211.

[2] Marion N W, Mao J J. Mesenchymal stem cells and tissue engineering [J]. Methods Enzymol, 2006, 420: 339-361.

[3] Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, *et al*. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair? [J]. Bone, 2006, 39(4): 678-683.

[4] Keilhoff G, Goihl A, Langnase K, *et al*. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells[J]. Eur J Cell Biol, 2006, 8(1): 11-24.

[5] 邹丽琴，苏踊跃，孙荣距，等. 人骨髓间充质干细胞体外增殖及成骨分化的增龄变化[J]. 第三军医大学学报，2005，27(1)：59-62.

[6] 法宪恩，王利霞，侯剑峰，等. 人骨髓间充质干细胞体外培养及生物学特性观察[J]. 郑州大学学报：医学版，2005，40(3)：445-447.

[7] Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, *et al*. Mesenchymal stem cells for treatment of severe acute graft-versus-host disease[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2006, 12(2): 2.

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

[9] Frank M H, Sayegh M H. Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells[J]. Lancet, 2004, 363(9419): 1411-1412.

[10] Cotton J, Herve M, Pouvelle S, *et al*. T cell activity and MHC II binding capacity of main-chain modified peptides[J]. Immunol Lett, 1997, 56(1): 239.

[11] Danzer S G, Kirchner H, Rink L. Cytokine interactions in human mixed lymphocyte culture[J]. Transplantation, 1994, 57(11): 1638-1642.

（编辑　栾　嘉）