DOI:10.16016/j.1000-5404.201906045

人脐带间充质干细胞对T细胞活化介导的肺动脉平滑肌细胞增殖抑制及机制研究

吴西军[1,2,3],刘 庆[4],刘俊峰[1,2],杨小燕[5],何志旭[1,2,5] 550004 贵阳,贵州医科大学:细胞工程生物医药技术国家地方联合工程实验室,贵州省再生医学重点实验室[1],中国医学科学院成体干细胞转化研究重点实验室[2],免疫学教研室[3],附属医院呼吸内科[4],附属医院儿童血液肿瘤科[5]

[摘要] **目的** 阐释人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells,hu-MSCs)抑制T淋巴细胞活化介导的肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells,PASMCs)增殖的作用及可能的调节机制。**方法** 复苏并培养hu-MSCs和大鼠来源的PASMCs、T细胞,将实验分为PASMCs对照组、T细胞刺激组(PASMCs+T淋巴细胞)、MSC干预组(PASMCs+T淋巴细胞+MSC)、英夫利西单抗干预组(PASMCs+T淋巴细胞+英夫利西单抗)、TNF-α刺激组(PASMCs+T淋巴细胞+MSC+TNF-α)。通过荧光分光光度计、RT-qPCR、倒置荧光显微镜观察等方法研究钙调磷酸酶、T淋巴细胞核因子的变化。**结果** T淋巴细胞刺激组TNF-α浓度明显升高($P<0.01$);MSCs与英夫利西单抗均能明显降低其TNF-α浓度($P<0.01$)。与单纯PASMCs对照组比较,T淋巴细胞刺激组PASMCs的增殖能力明显增强($P<0.01$),胞浆中游离钙离子的浓度明显升高($P<0.01$),胞内CaN的表达($P<0.01$)和活性($P<0.01$)均显著上调,NFATc2的表达和活性亦显著上调($P<0.01$);与T淋巴细胞刺激组相比,MSCs干预组、英夫利西单抗干预组PASMCs的增殖被明显抑制($P<0.01$),胞浆中游离钙离子的浓度均明显下降($P<0.01$),胞内CaN的表达($P<0.01$)和活性($P<0.01$)均显著下调,NFATc2的表达($P<0.01$)和活性亦下调;外源TNF-α可有效逆转MSC的干预作用,其作用与T淋巴细胞刺激组几乎相当。**结论** hu-MSCs可以通过改变CaN、NFATc2的表达和活化状态,抑制T淋巴细胞活化,抑制炎症因子TNF-α导致的PASMCs增殖。

[关键词] 间充质干细胞;肺动脉平滑肌细胞;细胞增殖;肿瘤坏死因子α;钙调磷酸酶;T淋巴细胞核因子

[中图法分类号] R322.121;R329.2;R363.22 [文献标志码] A

Inhibitory effect and mechanism of human umbilical cordmesenchymal stem cells on T cell activation-mediated proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells

WU Xijun[1,2,3], LIU Qing[4], LIU Junfeng[1,2], YANG Xiaoyan[5], HE Zhixu[1,2,5] [1]National Guizhou Joint Engineering Laboratory for Cell Engineering and Biomedical Technique, Guizhou Provincial Key Laboratory of Regenerative Medicine, [2]Key Laboratory of Adult Stem Cell Translational Research, [3]Department of Immunology, [4]Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, [5]Department of Hematology and Oncology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province, 550004, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the inhibitory effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hu-MSCs) on T lymphocyte activation-mediated proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) and explore the possible regulatory mechanism. **Methods** Cultured rat PASMCs were stimulated

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81871313);中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2017PT31042,2018PT31048);贵州省"十二五"计划重大科技专项[黔教合重大专项(2013-021)];贵阳市-贵州医科大学联合基金项目[筑科合同(2015)001-03]

[通信作者] 何志旭,E-mail:hzx@gmc.edu.cn

with activated T lymphocytes with subsequent exposures to hu-MSCs, infliximab, or both hu-MSCs and tumor necrosis factor-α (TNF-α). The changes in calcineurin and T lymphoid nuclear factor in the cell cultures were observed using fluorescence spectrophotometer, RT-qPCR and inverted fluorescence microscopy. **Results** Among all the treatments, stimulation with activated T lymphocytes alone resulted in the highest concentration of TNF-α in the supernatant of PASMC culture ($P<0.01$). Co-culture with Hu-MSCs and treatment with infliximab both significantly decreased TNF-α concentration in PASMCs stimulated with activated T lymphocytes ($P<0.01$). Stimulation with T lymphocytes significantly enhanced the proliferative activity of the PASMCs, increased Ca^{2+} concentration in the cytoplasm, and up-regulated the expression and activity of intracellular CaN and NFATc2. Co-culture with Hu-MSCs and treatment with infliximab significantly suppressed the proliferation of PASMCs stimulated with T lymphocytes, decreased the concentration of Ca^{2+} in the cytoplasm, and lowered both the expression and activity of intracellular CaN and NFATc2. Exogenous TNF-α obviously reversed the effects of Hu-MSC on the PASMCs, and produced responses similar to T-lymphocyte stimulation in the PASMCs. **Conclusion** Hu-MSCs can promote the proliferation of PASMCs by modulating the expression and activation of CaN and NFATc2 to inhibit the activation of T lymphocytes and the PASMCs proliferation induced by inflammatory factor TNF-α.

[**Key words**] mesenchyma stem cells; pulmonary artery smooth muscle cells; cell proliferation; tumor necrosis factor-α; calcineurin; T lymphoid nuclear factor

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81871313), the Special Funds for Fundamental Research Expenses of Central Public Welfare Research Institutions of the Chinese Academy of Medical Sciences (2017PT31042, 2018PT31048), the Major Science and Technology Project in the "Twelfth Five-year Plan" of Guizhou Province (2013-021), and the Joint Fund of Guiyang City-Guizhou Medical University (2015-001-03).
Corresponding author: HE Zhixu, E-mail: hzx@gmc.edu.cn

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是一种以肺动脉血管重构、阻力进行性增加和右心衰竭为特征的恶性肺血管性疾病。在PH患者及实验动物模型的肺组织,靠近重构的肺动脉处,均可以见到炎症的浸润,甚至可见由T淋巴细胞、B淋巴细胞和少量树突状细胞造成的三级淋巴滤泡的形成[1-2],靠近肺动脉处,均可见钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)、T细胞核因子(nuclear factor of activated T-cells, NFAT)的活化[3-4]。尽管目前尚不清楚局部的炎症反应是否为肺动脉血管重构的使动因素,抑或仅仅是在血管重构的进程中参与其中。然而至少已经明确,在PH的进程中,血管外周炎症性细胞的沉积对于肺动脉血管重构的形成至关重要[5]。恢复血管的正常结构和功能是治疗PH的关键。当前的治疗无助于解决免疫炎症调节和平滑肌细胞的增殖调控,因此,组织的免疫炎症反应及肺动脉血管平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs)的过度增殖有可能成为该疾病的重要治疗靶点。

人脐带来源的间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hu-MSCs),具有较好的免疫调节作用。MSC可以通过分泌与免疫调节相关可溶性因子转化生长因子β1(transforming growth factor beta 1, TGF-β1)和前列腺素E_2(prostaglandin E_2, PGE_2),显著抑制Th1相关炎症性细胞因子的分泌,如TNF-α和IFN-γ[6-7]。有研究表明TNF-α可以明显促进血管平滑肌细胞的增殖[8-9],本课题组前期研究发现:在大鼠肺动脉高压疾病模型,hu-MSCs可以明显改善疾病模型各项指标,同时发现也存在炎症因子TNF-α有促进PH模型PASMCs增殖的作用,且这种作用可以被hu-MSCs有效抑制[10]。但是hu-MSCs是通过什么机制来抑制TNF-α介导的PASMCs增殖?仍有待探讨。本研究拟在体外建立共培养体系,活化T淋巴细胞,使其释放含有TNF-α的炎症因子,模拟肺动脉血管周围的炎症环境,探讨MSC抑制炎症因子TNF-α介导的PASMCs增殖过程中可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 Hu-MSCs、PASMCs复苏与传代 Hu-MSCs、PASMCs细胞由本实验室分离、鉴定并保存[11]。实验时取出冻存细胞,快速融化,加入5倍以上体积的DMEM/F12完全培养基混匀并离心去上清,重悬细

胞,置于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的条件下培养;细胞铺至培养瓶底面积 80%~90%时,以 0.25%胰蛋白酶/0.01% EDTA 消化,PBS 洗涤并离心后加入 DMEM/F12 完全培养基,1∶3传代培养。本实验中 Hu-MSCs、PASMCs 均为第 4 代细胞。

1.1.2 大鼠脾脏 T 淋巴细胞分离 SPF 级雌性 SD 大鼠购自贵州医科大学实验动物中心(体质量 100 g),颈椎脱臼处死,分离脾脏,PBS 反复冲洗 5 次,放入洁净的培养皿,注射器针头反复点刺脾脏,冲洗并离心收集细胞;裂解红细胞后调整密度为 5.0×10^8/mL;过 2 遍尼龙毛柱,收集滤出的细胞悬液,离心后的细胞即为大鼠脾脏 T 淋巴细胞,调整其密度为 1.0×10^6/mL,备用。

1.2 主要实验试剂

包括:DMEM/F12 培养基(美国 GIBICO 公司)、TRIzol(美国 Invitrogen 公司)、英夫利西单抗(美国强生公司)、TNF-α(美国 Prospect Biosystems 公司)、TNF-α ELISA 试剂盒(美国 eBiscience 公司)、EZNA 总 RNA 提取试剂盒(美国 Omega 公司)、实时定量 PCR 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)、NFATc2 单克隆抗体(美国 BD 公司)、DAPI(美国 Thermo fisher 公司)、钙调神经磷酸酶(CaN)测试盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 方法

1.3.1 PASMCs、MSC 及 T 淋巴细胞组成的体外共培养体系及分组 共分为 5 组,每组设 3 个复孔。取第 4 代 PASMCs,DMEM/F12 重悬细胞,加入 24 孔板中(1.0×10^4/孔)即为 PASMCs 组;加入 700 μL 的 T 淋巴细胞悬液(1.0×10^5/孔),含 10 μg/mL 的刀豆蛋白 A(concanavalin A,ConA)即为活化 TC 刺激组;MSC 干预组:在 PASMCs+T 淋巴细胞组基础上,加入 300 μL 的 MSC 细胞悬液接种到孔径为 3 μm 的插入式培养皿,将培养皿插入 24 孔板的板孔中培养(1.0×10^4/孔);英夫利西干预组:在 PASMCs+T 淋巴细胞组基础上,加入终浓度为 1 μg/mL 的英夫利西单抗(TNF-α 单克隆抗体);TNF-α 刺激组:在 MSC 干预组基础上加入终浓度为 10 ng/mL 的重组大鼠 TNF-α。

1.3.2 TNF-α 检测 培养 3 d 后,收集 T 淋巴细胞刺激组、MSC 干预组、英夫利西单抗干预组上清,ELISA 法检测每个样本的 TNF-α 浓度。实验独立进行 3 次。

1.3.3 PASMCs 的增殖检测 采用 MTS 法对共培养体系中各组 PASMCs 的增殖进行检测。弃各孔上清,PASMCs 冲洗 3 遍。加入 300 μL/孔的 DMEM/F12、15 μL/孔的 MTS,继续培养 4 h;收集细胞,1 000 r/min 离心 5 min,加样至 96 孔板中,酶标仪检测 490 nm 处的光密度值 D(490)。实验独立进行 3 次。

1.3.4 PASMCs 细胞内钙离子浓度检测 培养 3 d 后去上清,消化细胞,Hanks 液重悬细胞并调整密度为 1.0×10^6/mL,接种至 96 孔板中(0.1 mL/孔),加入终浓度为 3 μmol/L 的 Fura-2/AM,震荡孵育 40 min;收集细胞,Hanks 液重悬细胞并调整密度为 5.0×10^4/孔,加入 96 孔板中,用荧光分光光度计检测荧光比值(R 值);每孔加入 0.1%终浓度的 TritonX-100,震荡孵育 5 min 使 Ca^{2+}完全饱和,检测荧光比值(R_{max} 值);每孔加入 5 mmol/L 终浓度的乙二醇四乙酸酯(EGTA),内震荡孵育 5 min 使 Ca^{2+}完全游离,检测其荧光比值(R_{min} 值);利用公式计算细胞内 Ca^{2+}浓度:$[Ca^{2+}]i = Kd\times[(R-R_{min})/(R_{max}-R)]\times FD/FS$。其中 Kd 为 Ca^{2+}解离常数 224 nmol/L,FD 为 Ca^{2+}完全游离状态下于 380 nm 激发波长处的荧光强度,FS 为 Ca^{2+}完全饱和状态下于 380 nm 激发波长处的荧光强度。

1.3.5 实时定量 PCR 检测 提取各组 PASMCs 细胞内总 RNA,鉴定并定量;体外将各组 PASMCs 细胞 mRNA 逆转录为 cDNA,设计并合成 RT-qPCR 引物,引物序列见表 1。采用 SYBR© Green 荧光染料法,用 20 μL 体系进行扩增,扩增条件为:50 ℃持续 2 min ,95 ℃持续 2 min,40 个循环:95 ℃,15 s ,60 ℃,30 s 扩增反应结束后,进行融解曲线分析来检测产物的特异性,以 GAPDH 作为内参对各个基因的表达量进行定量分析。

表 1 RT-qPCR 引物序列与片段长度

基因	引物序列	片段长度/bp
GAPDH	上游:5′-CCATTCTTCCACCTTTGATGCT-3′	98
	下游:5′-TGTTGCTGTAGCCATATTCATTGT-3′	
CaN	上游:5′-CAGAGGGTGCTTCGATTCTC-3′	156
	下游:5′-CCCCTAAGAAGAGGTAGCGA-3′	
NFATc2	上游:5′-CAGCAGATTTGGGAGATGGAAG-3′	180
	下游:5′-GACTGGGTGGTAAGTAAAGTGC-3′	

1.3.6 PASMCs 的 CaN 活性检测 培养 3 d 后去上清,PBS 冲洗 2 遍后,每孔加入 300 μL 细胞裂解液,10 000 r/min 离心 20 min,收集上清备用;PASMCs 的总蛋白含量进行检测,酶标仪检测 562 nm 条件下的 D(562)值,并利用公式计算总蛋白浓度,总蛋白浓度(μg/mL)=[(测定 D 值-空白 D 值)/(标准 D 值-空白 D 值)]×标准品浓度(563 μg/mL)×样品稀释倍数。采用 CaN 测试盒对 PASMCs 的 CaN 活性进行检

测。CaN 活性=[(测定 *D* 值-对照 *D* 值)/(标准 *D* 值-空白 *D* 值)]×标准品浓度(0.1 μmol/L)×反应体系稀释倍数(5 倍)×3÷待测样本蛋白浓度(mg/mL)。

1.3.7 NFATc2 免疫荧光检测 培养 3 d 后去上清,PBS 冲洗 2 遍后,每孔加入 4%多聚甲醛,室温环境下固定 1 h,洗 3 次,每次 5 min;滴加 200 μL 0.3% Triton X-100 室温孵育 10 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min;5% BSA 室温封闭 10 min,去 BAS;滴加 200 μL NFATc2 单克隆抗体(1∶100, Novus Biologicals,美国),4 ℃过夜;PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加 200 μL FITC 标记的 IgG,于 4 ℃避光孵育 2 h;PBS 洗 3 次后,加入 50 μL 1 μg/mL DAPI 瞬染 10 s,经 PBS 浸洗 3 次;4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)进行核染色,于倒置荧光显微镜下进行观察并拍照。

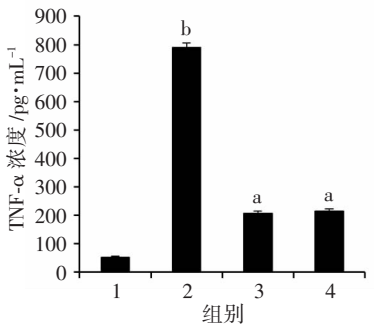
1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件,以 $\bar{x}\pm s$ 表示正态分布计量数据,组间比较采用 LSD 法。检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 各组培养上清中 TNF-α 的浓度

培养 3 d 后,T 淋巴细胞刺激组中 TNF-α 浓度较单纯 PASMCs 对照组显著升高($P<0.01$);MSC 干预组中 TNF-α 浓度较 T 淋巴细胞刺激组明显下降($P<0.01$);而英夫利西单抗干预组中 TNF-α 浓度也明显低于 T 淋巴细胞刺激组($P<0.01$,图 1)。

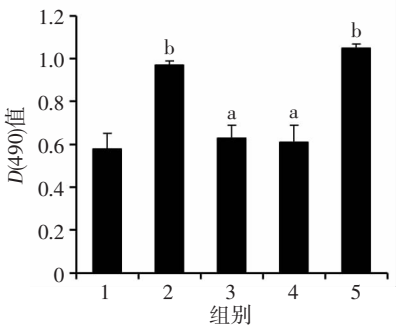


1:单纯 PASMCs 对照组;2:T 淋巴细胞刺激组;3:MSC 干预组;4:英夫利西单抗干预组;a:$P<0.01$,与 T 淋巴细胞刺激组比较;b:$P<0.01$,与单纯 PASMCs 对照组比较

图 1 ELISA 检测各组培养上清中 TNF-α 浓度

2.2 MSC 对 PASMCs 增殖的影响

与单纯 PASMCs 对照组相比,T 淋巴细胞刺激组 PASMCs 的增殖能力增强($P<0.01$);与 T 淋巴细胞刺激组比较,MSC 干预组和英夫利西单抗干预组细胞增殖被明显抑制($P<0.01$);外源重组大鼠 TNF-α 可有效促进 PASMCs 的增殖($P<0.01$,图 2)。

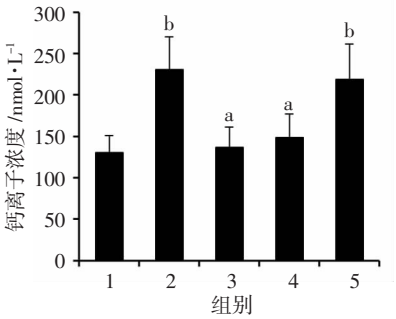


1:单纯 PASMCs 对照组;2:T 淋巴细胞刺激组;3:MSC 干预组;4:英夫利西单抗干预组;5:TNF-α 刺激组;a:$P<0.01$,与 T 淋巴细胞刺激组比较;b:$P<0.01$,与单纯 PASMCs 对照组比较

图 2 MTS 检测各组 PASMCs 增殖

2.3 MSC 对 PASMCs 细胞内钙离子浓度的影响

与单纯 PASMCs 对照组比较,T 淋巴细胞刺激组 PASMCs 胞浆中游离钙离子的浓度明显上升($P<0.01$);MSC 干预组、英夫利西单抗组 PASMCs 细胞浆内游离钙离子的浓度较 T 淋巴细胞刺激组明显下降($P<0.01$);外源重组大鼠 TNF-α 可有效促进 PASMCs 胞浆内游离钙离子浓度升高($P<0.01$,图 3)。



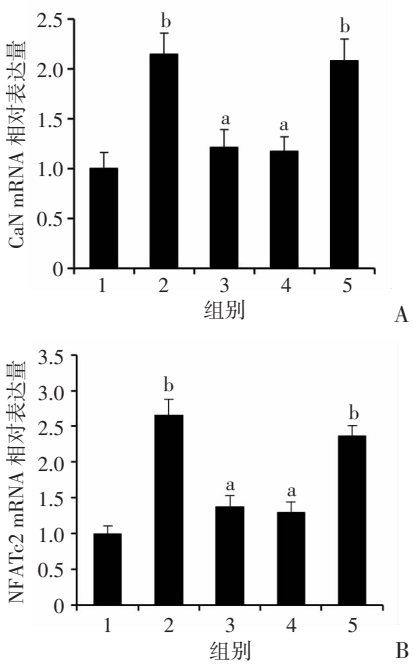
1:单纯 PASMCs 对照组;2:T 淋巴细胞刺激组;3:MSC 干预组;4:英夫利西单抗干预组;5:TNF-α 刺激组;a:$P<0.01$,与 T 淋巴细胞刺激组比较;b:$P<0.01$,与单纯 PASMCs 对照组比较

图 3 各组 PASMCs 胞浆内钙离子的浓度

2.4 MSC 对 PASMCs 胞内 CaN、NFAT 表达的影响

T 淋巴细胞刺激组 PASMCs 胞内 CaN 的表达较单纯 PASMCs 对照组明显上调($P<0.01$);MSC 干预组 CaN 表达较 T 淋巴细胞刺激组明显被抑制,与英夫利西单抗干预组抑制效应基本相当($P<0.01$),这种抑制作用可以被外源性重组大鼠 TNF-α 明显上调($P<0.01$,图 4A)。T 淋巴细胞刺激组 NFATc2 的表达较单纯 PASMCs 对照组明显上调($P<0.01$);MSC 干预组 NFATc2 表达较 T 淋巴细胞刺激组明显被抑制,与英夫利西单抗干预组抑制效应基本相当($P<0.01$),这种

抑制作用可以被外源性重组大鼠 TNF-α 逆转($P<0.01$,图 4B)。

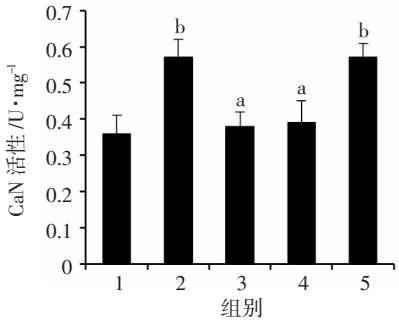


A:CaN; B:NFATc2 1:单纯 PASMCs 对照组;2:T 淋巴细胞刺激组;3:MSC 干预组;4:英夫利西单抗干预组;5:TNF-α 刺激组;a:$P<0.01$,与 T 淋巴细胞刺激组比较;b:$P<0.01$,与单纯 PASMCs 对照组比较

图 4 RT-qPCR 检测各组 PASMCs 胞内 CaN、NFATc2 mRNA 表达

2.5 MSC 对 PASMCs 胞内 CaN 活性的影响

T 淋巴细胞刺激组 CaN 的活性较单纯 PASMCs 对照组明显增强($P<0.01$);MSC 干预组、英夫利西单抗干预组 CaN 活性较 T 淋巴细胞刺激组明显被抑制($P<0.01$);外源性重组大鼠 TNF-α 可以显著增强 CaN 的活性($P<0.01$,图 5)。



1:单纯 PASMCs 对照组;2:T 淋巴细胞刺激组;3:MSC 干预组;4:英夫利西单抗干预组;5:TNF-α 刺激组;a:$P<0.01$,与 T 淋巴细胞刺激组比较;b:$P<0.01$,与单纯 PASMCs 对照组比较

图 5 各组 PASMCs 胞内 CaN 的活性

2.6 MSC 对 PASMCs 胞内 NFATc2 活化的影响

采用 FITC 荧光染料标记的 NFATc2、DAPI 染料标记细胞核,结果显示:单纯 PASMCs 对照组中 NFATc2 主要分布于细胞浆中,在活化 T 淋巴细胞的刺激下,NFATc2 在细胞核区域明显增多,重叠后显示为青色。MSC 干预组和英夫利西单抗干预组 NFATc2 在细胞核区域明显减少;外源性重组大鼠 TNF-α 可以在细胞核区域显著增强 NFATc2 活性(图 6)。

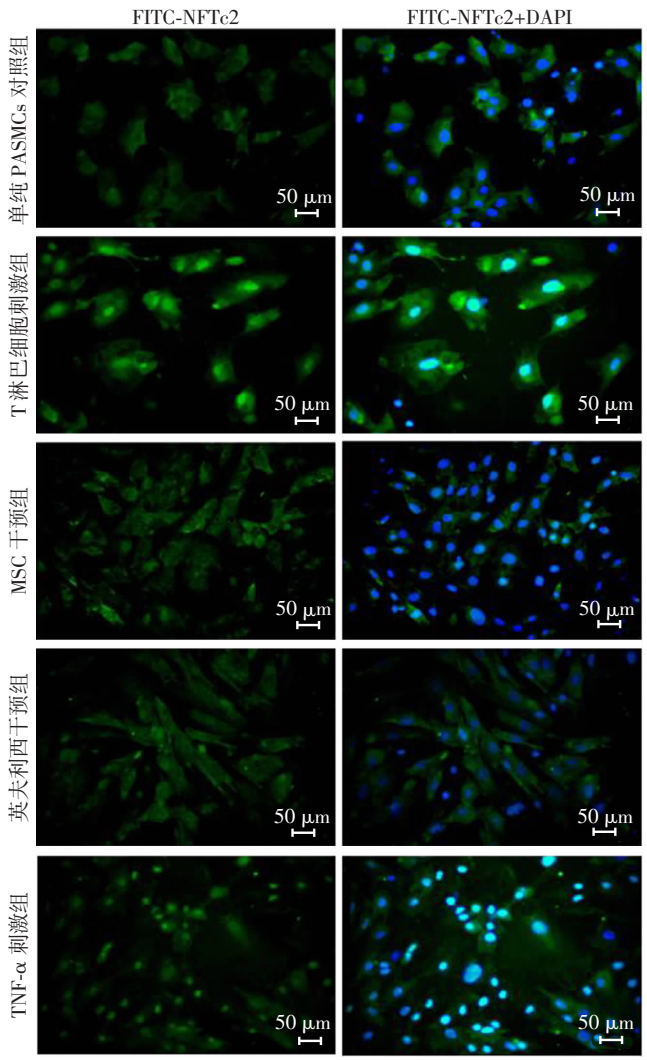


图 6 倒置荧光显微镜观察各组 PASMCs 胞内 NFATc2 的活化情况

3 讨论

PH 患者及疾病模型病理学观察均显示广泛的肺动脉血管平滑肌增厚和肺动脉血管的进行性收缩,而肺动脉血管平滑肌的增殖作用,在体内外的实验中均可以发现其可以被 hu-MSCs 抑制。可以肯定 hu-MSCs 有抑制 PASMCs 增殖和重塑血管的潜力,是 PH 极具应用前景的治疗措施。

在炎症环境中,某些因子的刺激下,细胞膜上的特异性受体能够与磷脂酶 C 发生偶联,进而导致平滑肌细胞膜表面钙离子通道的开放以及钙内流的增加,胞浆中高水平的钙离子浓度可以激活 CaN/NFAT,NFAT 去磷酸化激活后进入细胞核内,通过与相应基因的共同作用启动平滑肌细胞的增殖[12-13]。已有研究发现:TNF-α 有促进血管平滑肌细胞增殖的作用[8-9],炎症因子 TNF-α 能够通过促进细胞外钙内流以及增加线粒体等内源性钙的释放提高内皮细胞胞浆钙离子的浓度[14-15]。尽管机制尚不完全清晰,但作为细胞增殖的关键信号,胞浆钙离子浓度增高介导的 CaN/NFAT 活化在其中可能发挥一定作用。MSC 的免疫调节作用可以通过分泌免疫调节相关因子,如 PGE_2[16-17]、TGF-β1[18-19]、白介素-6(interleukin 6,IL-6)[20]等调节免疫反应,主要表现为显著抑制 Th1 相关炎症性细胞因子(如 TNF-α 和 IFN-γ)的分泌[6-7]。基于 MSC 特有的免疫调节作用,利用 MSC 对 PH 动物模型进行移植,也能够获得很好的疗效[21-22],表明炎症性细胞的浸润在肺动脉血管重构中起到了很关键的作用[23-24]。

为了进一步阐释 MSC 是如何通过其免疫调节作用抑制 T 淋巴细胞的活化和 PASMCs 增殖,进而起到阻止肺动脉血管重构的作用,本研究建立了一个由 PASMCs、T 淋巴细胞和 MSC 组成的体外共培养体系。实验结果显示:共培养体系中,在 ConA 的刺激作用下,T 淋巴细胞被活化,分泌炎症因子 TNF-α 的量显著升高,有效刺激了 PASMCs 增殖,显著增高 PASMCs 的钙离子内流及细胞浆中的钙离子浓度,CaN 磷酸化激活并进而使其下游的 NFAT 去磷酸化激活,导致 PASMCs 显著增殖;MSC 可以抑制 T 淋巴细胞的活化,T 淋巴细胞分泌 TNF-α 的量不能显著增加,从而不能有效刺激 PASMCs 增殖;TNF-α 的单抗英夫利西和活化的 T 淋巴细胞分泌的 TNF-α 结合,从而导致游离的 TNF-α 急剧下降,PASMCs 的增殖明显减低,与 MSC 干预效果基本相当;在 MSC 干预组加用外源性 TNF-α,PASMCs 的增殖明显增强。本研究在体外还观察了被含有 TNF-α 的炎症因子刺激增殖时,PASMCs 中 CaN 和 NFATc2 的活化情况,MSC 通过对 T 淋巴细胞活化和对 CaN、NFATc2 的调控,进而发挥对 PASMCs 增殖的抑制作用。该结果与 BONNET 等[3]和 CHEN 等[4]的研究互相印证,与 MSC 参与其他疾病中的免疫调节效应一致[6]。本研究揭示了 MSC 抑制 T 淋巴细胞活化,减少炎症因子 TNF-α 分泌,抑制其导致的 PASMCs 增殖,为利用 MSC 对 PH 进行移植干预提供了基础研究数据支持。

但是 PH 时炎症介导的 PASMCs 增殖作用机制是复杂的,相关炎症因子间是否存在协同作用和作用网络,目前尚不完全清楚。需分步敲除相关因子,同时给予挽救实验开展研究,是一项巨大而复杂的工程。MSC 对炎症的调节作用也是非常复杂的。本研究仅在体外利用 MSC 对活化的 T 淋巴细胞分泌 TNF-α 的抑制作用和 CaN、NFATc2 表达、活化进行了研究,实际作用过程中细胞间的接触抑制、受体介导的作用网络等均可起到非常重要的作用,仍需进一步的研究、探索。

参考文献:

[1] LOW A, GEORGE S, HOWARD L, *et al*. Lung function, inflammation, and endothelin-1 in congenital heart disease-associated pulmonary arterial hypertension[J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(4): e007249. DOI:10.1161/JAHA.117.007249.

[2] KUEBLER W M, BONNET S, TABUCHI A. Inflammation and autoimmunity in pulmonary hypertension: is there a role for endothelial adhesion molecules? (2017 Grover Conference Series)[J]. Pulm Circ, 2018, 8(2): 2045893218757596. DOI:10.1177/ 2045893218757596.

[3] BONNET S, ROCHEFORT G, SUTENDRA G, *et al*. The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(27): 11418-11423. DOI:10.1073/pnas.0610467104.

[4] CHEN R, YAN J C, LIU P J, *et al*. The role of nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension[J]. Cell Cycle, 2017, 16(6): 508-514. DOI: 10.1080/15384101.2017.1281485.

[5] TANG H Y, WU K, WANG J, *et al*. Pathogenic role of mTORC1 and mTORC2 in pulmonary hypertension[J]. JACC Basic Transl Sci, 2018, 3(6): 744-762. DOI: 10.1016/j.jacbts.2018.08.009.

[6] YANG Z X, HAN Z B, JI Y R, *et al*. CD106 identifies a subpopulation ofmesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties[J]. PLoS ONE, 2013, 8(3): e59354. DOI:10.1371/journal.pone.0059354.

[7] SAEIDI M, MASOUD A, SHAKIBA Y, *et al*. Immunomodulatory effects of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on differentiation, maturation and endocytosis of monocyte-derived dendritic cells[J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2013, 12(1): 37-49. DOI:012.01/ijaai.3749.

[8] JIANG F R, JIANG R L, ZHU X J, *et al*. Genipin inhibits TNF-α-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration *via* induction of HO-1[J]. PLoS ONE, 2013, 8(8): e74826. DOI:10.1371/journal.pone.0074826.

[9] FREISE C, QUERFELD U. Thelignan (+)-episesamin inter-

feres with TNF-α-induced activation of VSMC *via* diminished activation of NF-κB, ERK1/2 and AKT and decreased activity of gelatinases[J]. Acta Physiol (Oxf), 2015, 213(3): 642-652. DOI:10.1111/apha.12400.

[10] 吴西军, 刘俊峰, 何志旭. 间充质干细胞对肺动脉高压的治疗作用及其对肿瘤坏死因子α/活化T淋巴细胞核因子的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(13): 1018-1021. DOI: 10.3760/j.issn.2095-428X.2017.13.015.
WU X J, LIU J F, HE Z X. Theraeutic effect of mesenchymal stem cell on pulmonary hypertension and its influence on tumer necrosis factorα/nuclear factor of activated T cells[J]. Chin J Appl Clin Pediatr, 2017, 32(13): 1018-1021. DOI: 10.3760/j.issn.2095-428X.2017.13.015.

[11] 牛志浩, 刘庆, 刘俊峰, 等. 间充质干细胞条件培养基对炎症介导的肺动脉血管平滑肌细胞增殖调控的研究[J]. 贵州医科大学学报, 2018, 43(6): 641-645. DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.06.005.
NIU Z H, LIU Q, LIU J F, *et al*. Regulation of mesenchymal stem cell conditioned medium on proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells mediated by inflammation[J]. J Guizhou Med Univ, 2018, 43(6): 641-645. DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.06.005.

[12] SAID S I, HAMIDI S A, GONZALEZ BOSC L. Asthma and pulmonary arterial hypertension: do they share a key mechanism of pathogenesis?[J]. Eur Respir J, 2010, 35(4): 730-734. DOI: 10.1183/09031936.00097109.

[13] SZEMA A M, FORSYTH E, YING B, *et al*. NFATc3 and VIP in idiopathic pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease[J]. PLoS ONE, 2017, 12(1): e0170606. DOI: 10.1371/journal.pone.0170606.

[14] ROWLANDS D J, ISLAM M N, DAS S R, *et al*. Activation of TNFR1 ectodomain shedding by mitochondrial Ca^{2+} determines the severity of inflammation in mouse lung microvessels[J]. J Clin Invest, 2011, 121(5): 1986-1999. DOI: 10.1172/JCI43839.

[15] YANG W S, MOON S Y, LEE M J, *et al*. Diosgenin, an activator of 1, 25D3-MARRS receptor/ERp57, attenuates the effects of TNF-α by causing ADAM10-dependent ectodomain shedding of TNF receptor 1[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(6): 2434-2445. DOI: 10.1159/000484396.

[16] CHEN K, WANG D, DU W T, *et al*. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism[J]. Clin Immunol, 2010, 135(3): 448-458. DOI: 10.1016/j.clim.2010.01.015.

[17] WEN Y C, DU M K, LI M W, *et al*. EphA2-positive human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells exert anti-fibrosis and immunomodulatory activities *via* secretion of prostaglandin E2[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2018, 57(5): 722-725. DOI: 10.1016/j.tjog.2018.08.020.

[18] NEMETH K, KEANE-MYERS A, BROWN J M, *et al*. Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(12): 5652-5657. DOI: 10.1073/pnas.0910720107.

[19] XUAN J, FENG W, AN Z T, *et al*. Anti-TGFβ-1 receptor inhibitor mediates the efficacy of the human umbilical cord mesenchymal stem cells against liver fibrosis through TGFβ-1/Smad pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2017, 429(1/2): 113-122. DOI: 10.1007/s11010-017-2940-1.

[20] LI P, LI S H, WU J, *et al*. Interleukin-6 downregulation with mesenchymal stem cell differentiation results in loss of immunoprivilege[J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(9): 1136-1145. DOI: 10.1111/jcmm.12092.

[21] BABER S R, DENG WW, MASTER R G, *et al*. Intratracheal mesenchymal stem cell administration attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and endothelial dysfunction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(2): H1120-H1128. DOI: 10.1152/ajpheart.00173.2006.

[22] LUAN Y, ZHANG X, KONG F, *et al*. Mesenchymal stem cell prevention of vascular remodeling in high flow-induced pulmonary hypertension through a paracrine mechanism[J]. Int Immunopharmacol, 2012, 14(4): 432-437. DOI: 10.1016/j.intimp.2012.08.001.

[23] FRID M G, BRUNETTI J A, BURKE D L, *et al*. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage[J]. Am J Pathol, 2006, 168(2): 659-669. DOI: 10.2353/ajpath.2006.050599.

[24] YOUNG J M, WILLIAMS D R, THOMPSON AA R. Thin air, thick vessels: historical and current perspectives on hypoxic pulmonary hypertension[J]. Front Med (Lausanne), 2019, 6: 93. DOI: 10.3389/fmed.2019.00093.

(**收稿**:2019-06-08;**修回**:2019-09-22)

(编辑 王 红)