基础研究 文章编号:0253-3626(2009)03-0260-05

特发性血小板减少性紫癜患儿骨髓 MSC TGF-β1 和 HGF 的表达及对免疫的调节作用的研究

吴 艳,于 洁,张 磊,罗 庆,肖剑文,刘筱梅,宪 莹,戴碧涛,徐百华,苏庸春
(重庆医科大学附属儿童医院血液科,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究特发性血小板减少性紫癜(Idiopathic thrombocytopenic purpura ,ITP)患儿骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSC)体外的免疫抑制能力。方法:采集 ITP 患儿和对照儿童的骨髓标本,分离、培养和扩增 MSC,观察细胞形态及增殖能力,计数分析骨髓 MSC 成纤维细胞集落形成单位(Colony forming unit-fibroblast,CFU-F);采用混合淋巴细胞反应检测骨髓 MSC 体外对淋巴细胞的免疫抑制能力;采用 RT-PCR 和 ELISA 方法检测骨髓 MSC 细胞内转化生长因子-β1 (Transforming growth factor-β1,TGF-β1)和肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor,HGF)mRNA 的表达水平和细胞培养上清中因子的浓度。结果:(1)ITP 患儿的骨髓 MSC 呈典型的成纤维样细胞形态,CFU-F 计数(21.29±5.25)与对照组骨髓 MSC 的 CFU-F 计数(22.33±5.33)无显著差异($P>0.05$);(2)ITP 患儿骨髓 MSC 免疫抑制率[(74.93±8.01)%]与对照组骨髓 MSC 免疫抑制率[(76.42±8.80)%]比较无显著性差异($P>0.05$);(3)ITP 患儿骨髓 MSC 细胞内 TGF-β1、HGF mRNA 的表达水平与对照组比较均无显著性差($P>0.05$);(4)ITP 患儿骨髓 MSC 培养上清中 TGF-β1 的浓度[(617.88±81.89)pg/ml]与对照组骨髓 MSC 培养上清中 TGF-β1 的浓度[(632.40±126.90)pg/ml]比较无显著性差异($P>0.05$);ITP 患儿骨髓 MSC 培养上清中 HGF 浓度[(520.20±30.67)pg/ml]与对照组骨髓 MSC 培养上清中 HGF 的浓度[(521.56±36.72)pg/ml]比较无显著性差异($P>0.05$)。结论:ITP 患儿骨髓 MSC TGF-β1 和 HGF 的表达水平及免疫抑制能力与对照组比较无显著性差异。

【关键词】特发性血小板减少性紫癜;间充质干细胞;免疫抑制;转化生长因子-β1;肝细胞生长因子
【中国图书分类法分类号】R556.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-08

作者介绍:吴 艳(1982-),女,硕士,
研究方向:儿童血液系统疾病(现工作于重庆市妇幼保健院儿科)。
通讯作者:于 洁,女,教授,E-mail:yujie167@yahoo.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100095)。

用;另一方面利用该重组疫苗中BCG与结核分枝杆菌具有共同属特异性抗原可激发宿主针对结核杆菌的属特异性细胞免疫,而两者共同作用使机体的免疫状态以Th1细胞免疫为主,有利于清除体内的结核杆菌。重组BCG对结核病的免疫治疗作用避开了化疗药物的耐药形成问题,这给结核病的治疗带来了光明的前景。

参 考 文 献

[1] Dye C, Williams B G, Espinal M A, et al. Erasing the World's Slow Stain: Strategies to Beat Multidrug-Resistant Tuberculosis[J]. Science, 2002, 295(5562):2042-2046.

[2] Leander G, Peter S, Sven B, et al. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin[J]. J Clin Invest, 2005, 115(9): 2472-2479.

[3] Ottenhoff T H, Verreck F A, Lichtenauer Kaligis E G, et al. Genetics, cytokines and human infectious disease: Lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae[J]. Nature Genetics, 2002, 32(1): 97-105.

[4] 伊正君,朱道银,陈 全,等.人颗粒溶素与小鼠单链 IL-12 真核共表达质粒的构建及其在 RAW264.7 细胞中的表达[J]. 中国人兽共患病杂志,2005,21(11):936-939.

[5] Flynn J L, Chan J. Immunology of tuberculosis[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19:93-129.

[6] Pollock K G, McNeil K S. The Leishmania mexicana cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses[J]. J Immunol, 2003, 170(4): 1746-1751.

[7] Seder R A, Hill Adrian V S. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity[J]. Nature, 2000, 406: 793-798.

[8] Shigehara K, Kobori Y, Amano T, et al. Bilateral tuberculous epididymitis after intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy[J]. Hinyokiyo, 2005, 51(120):839-842.

[9] Eto M, Koga H, Noma H, et al. Importance of urinary interleukin-18 in intravesical immunotherapy with bacillus calmette-guerin for superficial bladder tumors[J]. Urol Int Urol, 2005, 75(2):114-118.

(责任编辑:冉明会)

Immunoregulation of mesenchymal stem cells from the patients with idiopathic thrombocytopenic purpura

WU Yan, et al

(*Department of Hematology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Idiopathic thrombocytopenic purpura(ITP) is characterized by a low platelet count and mucocutaneous bleeding. The immunity abnormality plays important role in the pathophysiology of idiopathic thrombocytopenic purpura. Mesenchymal stem cells (MSC) have been shown to possess immunosuppressive activity, preventing lymphocytes activiation. The aim of the study was to compare the immunosuppressive activity of MSC from controls and patients with ITP in vitro. *Methods*: Bone marrow samples were collected from patients with ITP at diagnosis(n=19), and the patients whose findings of bone marrow aspiration showed normal were established as the controls(n=11). MSCs from bone marrow samples were isolated, cultured and expanded. Morphology, proliferative activity and colony forming unit-fibroblast (CFU-F) were measured and analyzed. MSC were assayed for the activity of lymphocytes suppression by mixed lymphocyte reaction(MLR). The hepatocyte growth factor, transforming growth factor-β1 mRNA expression was detected by RT-PCR. HGF, TGF-β1 release of MSC was tested by ELISA. *Results*: (1) The culture cells from the patients with ITP presented a typical fibroblast-like morphology. The numbers of CFU-F from the patients with ITP (21.29 ± 5.25) showed no difference from the controls (22.33 ± 5.33), P>0.05. (2) The inhibition ratio of MSC in patients with ITP [(74.93 ± 8.01)%] showed no difference from that in the controls[(76.42 ± 8.80)%], P>0.05; (3) The TGF-β1, HGF mRNA expression in MSC in patients with ITP were similar to those in the controls, P>0.05; (4)The concentration of TGF-β1 in MSC supernatants in the patients with ITP[(617.88 ± 81.89)pg/ml] was similar to that in the controls [(632.40 ± 126.90)pg/ml], P>0.05; the concentration of HGF in MSC supernatants in the patients with ITP [(520.20 ± 60.67) pg/ml] was similar to that in the controls [(521.56 ± 36.72)pg/ml], P>0.05. *Conclusion*: The suppressive effect of MSC on patients with ITP in vitro showed no difference from that on the controls.

【Key words】Idiopathic thrombocytopenic purpura; Mesenchymal stem cells; Immunosuppression; Trans forming growth factor-β1; Hepatocyte growth factor

间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSC)是骨髓造血微环境的主要组成部分,具有造血支持作用[1,2],近年来的实验研究证实 MSC 还具有免疫抑制作用[3-5];Di Nicola M 等[5]研究进一步发现肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)和转化生长因子-β1(Transforming growth factor, TGF-β1)是 MSC 发挥免疫抑制作用的效应因子。特发性血小板减少性紫癜(Idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)又称免疫性血小板减少性紫癜,是小儿最常见的出血性疾病。其主要临床特点是:皮肤、黏膜自发性出血、血小板减少、出血时间延长和血块收缩不良,骨髓巨核细胞发育受到抑制。近年来的研究表明 ITP 患者体内血小板减少不但由于外周血液循环中有抗体存在,同时骨髓内也存在巨核细胞被免疫破坏[6-8]。对于ITP 患者的骨髓 MSC 的免疫抑制功能与 ITP 的发病机制的关系,尚未见相关报道。本研究由此立题,初步探讨 ITP 患儿骨髓 MSC 的免疫抑制能力是否存在异常,是否参与了 ITP 的免疫发病过程。

1 对象和方法

1.1 研究对象

ITP 组:19 例,男 12 例,女 7 例,年龄 2~6 岁,中位年龄 4 岁。骨髓标本取自重庆医科大学附属儿童医院血液科。患儿的临床表现、外周血象与骨穿结果都符合急性 ITP 诊断标准[9]。

对照组:11 例,男 6 例,女 5 例,年龄 2~11 岁,中位年龄 8 岁。骨髓标本同样取自重庆医科大学附属儿童医院血液科。骨穿结果呈正常的增生性骨髓象。

本研究得到重庆医科大学附属儿童医院伦理道德委员会批准,并获取受试对象家长的知情同意。

1.2 实验方法

1.2.1 主要试剂和仪器 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium)培养基、1640 培养基(Hyclone 公司),优级胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, PITP 公司),24 孔、96 孔细胞培养板(Coster 公司),四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)(Sigama 公司),丝裂霉素(Roche 公司),HGF、TGF-β1 ELISA 试剂盒(北京尚柏公司),总 RNA 提取试剂盒(Genemegga 公司),RNA PCR Kit(AMV) Ver 3.0 试剂盒(TaKaRa 公司),HGF、TGF-β1、三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物(上海鼎安生物科技有限公司合成)。酶标仪(TECAN SUNRISE 公司),电

泳仪、凝胶成像系统（BIO-RAD 公司），梯度 PCR 仪（Biometra 公司）。

1.2.2 骨髓 MSC 的体外分离、纯化和扩增培养 无菌条件下采集骨髓 1~2 ml，采用密度梯度离心法，反复贴壁纯化分离 MSC[10]。抗凝骨髓标本置于 Percoll 分离液（比重 1.073 g/ml）梯度离心（400 g × 20 min），吸取中间单个核细胞（Mononuclear cell，MNC）白膜层，1 × 10^6 个 /ml 密度接种于培养瓶，培养体系为含 10%FBS 的 DMDM 培养基，于 37℃、5%CO_2 饱和湿度条件下培养。48 h 后去除未贴壁细胞，每 3~4 d 换液，当瓶底贴壁细胞达到 90%以上融合时，以 0.25%胰酶消化进行 1∶2 传代，传至 3~4 代，观察细胞形态均一，细胞中骨髓 MSC 的纯度可达 90%，即进行试验。

1.2.3 成纤维细胞集落形成单位（Colony forming unit-fibroblast，CFU-F）分析 分离骨髓中的MNC 以 5 × 10^5 量接种于 35 mm 培养皿中，放入 37℃、5%CO_2 饱和湿度培养箱内进行培养。24 h 后移去悬浮细胞，换置新鲜培养基，3~4 d 更换 1 次培养基，第 14 d 结束培养，行瑞氏染色，计数 CFU-F（>20 个细胞为 1 个克隆）。

1.2.4 混合淋巴细胞培养（Mixed lymphocyte reaction，MLR）采用 MLR 检测骨髓 MSC 免疫抑制活性[11]。96 孔板中加入经过丝裂霉素（10 μg/ml）处理的 MSC104/ 孔，待其板底形成融合层达 80%时备用。取外周血 5 ~ 10 ml，置于人淋巴细胞分离液（比重 1.077 g/ml）分离外周血 MNC，经 PBS 离心（200 g × 10 min）洗 3 次，计数，并用含 20%FBS 的 1640 培养基调整细胞浓度至 1 × 10^6 个 /ml，效应细胞加入丝裂霉素 C（25 μg/ml）处理，37℃温育 30 m，靶细胞不处理。96 孔板中每孔加入效应细胞和靶细胞悬液各 50 ul，混合培养 6 d，结束培养后每孔加入 MTT 溶液（5 mg/ml）20 μl，37℃培养 4 h。终止培养，小心吸弃孔内培养上清液，每孔加入 150 μl DMSO，振荡 10 m，选择 492 nm 波长，在酶标仪上测定各孔吸光度（A）值。同时设立仅含骨髓 MSC 的调控孔和含两种淋巴细胞的空白对照孔。用以下公式计算其免疫调控活性：

抑制率 = 1-（试验孔 A- 调控孔 A）/ 空白对照孔 A

1.2.5 酶联免疫吸附实验（Enzyme linked immunosorbent assay，ELISA） 采用 ELISA 双抗体夹心法对骨髓 MSC 分泌到培养液中的 HGF、TGF-β 水平进行定量分析。待第三代骨髓 MSC 瓶底融合达 80%，传代前收集培养上清，-20℃冻存待测。操作步骤严格按照按试剂盒内说明书进行。选择 492 nm 波长，在酶标仪上测定 A 值，以标准品 A 值绘制标准曲线。

1.2.6 RT-PCR（Reverse transcription PCR） 收集第三代骨髓 MSC，使用总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA，采用 RNA PCR Kit（AMV）Ver 3.0 试剂盒进行逆转录和 PCR 反应，检测基因 HGF、TGF-β 1 在骨髓 MSC 中的表达情况。TGF-β 1、HGF、内参 GAHPD 所用引物序列（见表 1），TGF-β 1、HGF、GAPDH 扩增反应条件：预变性，94℃，2 min，1 个循环；变性，94℃，30 s；退火温度分别为 60℃、64℃、55℃，30 s；延伸，72℃，2 min，30 个循环。经紫外凝胶图像分析仪进行数据分析，以 TGF-β 1 和 HGF mRNA 扩增后产物的光密度值与 GAPDH mRNA 扩增后产物光密度值的比值作为目的基因 mRNA 表达的相对值，进行半定量分析。

1.2.7 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用统计软件 SPSS12.0 进行多个样本均数间方差分析（LSD-t 检验）和两独立样本 t 检验，P<0.05 有显著的统计学意义。

表 1 TGF-β、HGF、GAPDH 引物及目的片段大小

	上游引物	下游引物	目的片段大小
TGF-β 1	5'-TAA AAG TGG AGC AGC ACG TG-3'	5'-GAA CCC GTT GAT GTC CAC TT-3'	233 bp
HGF	5'-CAG CAT GTC CTC CTG CAT CTC C -3'	5'-TCG TGT GGT ATC ATG GAA CTC C-3'	418 bp
内参 GAPDH	5'-TCG GAG TCA ACG GAT TTG GTC GTA-3'	5'-ATG GAC TGT GGT CAT GAG TCC TTC -3'	520 bp

2 结 果

2.1 细胞形态学观察

骨髓中分离 MNC 接种于培养瓶中，24 h 后即可观察到少量贴壁细胞生长，48 h 后去除悬浮细胞，贴壁细胞表现为成纤维细胞样，原代细胞形态不均一，第三代细胞铺满瓶底后呈长梭形、漩涡状分布，形态均一。收集 19 例 ITP 患儿骨髓标本，与对照组 11 例标本都能成功培养出骨髓 MSC。两组的骨髓 MSC 比较前三代形态均无明显差异，即使传代至第 8 代后仍能保持均一的细胞形态和 7~10 d 的传代时间。

2.2 CFU-F 集落形成分析

14 d 后对骨髓 MSC 形成的 CFU-F 进行计数，ITP 组（n=17）骨髓 MSC CFU-F 计数（21.29±5.25）与对照组（n=10）骨髓 MSC CFU-F 计数（22.33±5.33）比较无显著差别，t=-0.52，P=0.61。

2.3 骨髓 MSC 免疫抑制作用

ITP 组（n=16）骨髓 MSC 抑制淋巴细胞增殖的

免疫抑制率[(74.93±8.01)%]与对照组(n=8)的免疫抑制率[(76.42±8.80)%]比较差异无统计学意义(t=0.42,P=0.68)。

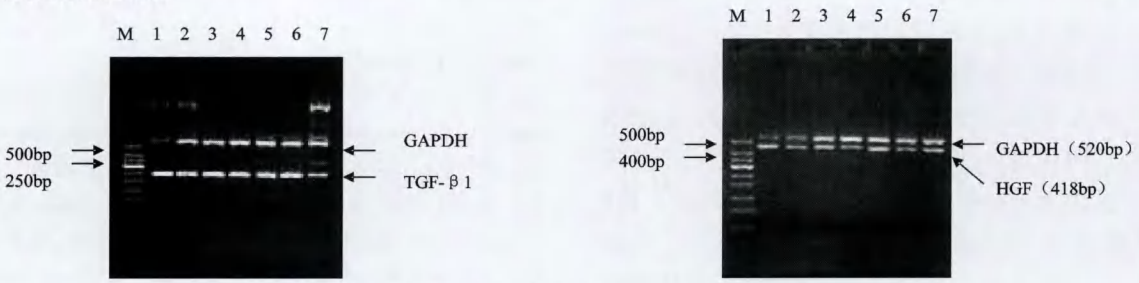
2.4 骨髓 MSC 细胞内 HGF、TGF-β1 mRNA 表达水平的检测

ITP 组与对照组比较,骨髓 MSC 细胞内 TGF-β1、HGF mRNA 表达无显著差别。见表 2、图 1。

表 2 骨髓 MSC 内 TGF-β1 和 HGF mRNA 表达情况比较($\bar{x}$±s)

组别	n	TGF-β 1mRNA/GAPDH mRNA	HGF mRNA/GAPDH mRNA
对照组	6	0.85 ± 0.20*	0.66 ± 0.07**
ITP 组	16	0.81 ± 0.09	0.66 ± 0.06
t 值(P 值)		0.73(P=0.47)	0.01(P=0.99)

注:* 表示 TGF-β 1mRNA 与 GAPDH mRNA 扩增后产物的光密度值之比;** 表示 HGF mRNA and the GAPDH mRNA 扩增后产物的光密度值之比。



M. DNA 标准;1~5. ITP 组 PCR 产物;6、7. 对照组 PCR 产物

图 1 骨髓 MSC 内 TGF-β1 和 HGF 基因表达电泳图

2.5 骨髓 MSC 分泌 TGF-β1、HGF 能力的检测

ITP 组与对照组间骨髓 MSC 细胞培养上清 TGF-β1、HGF 浓度无显著差别,骨髓 MSC 培养上清中 TGF-β1 的浓度[(617.88±81.89)pg/ml]与对照组骨髓 MSC 培养上清中 TGF-β1 的浓度[(632.40±126.90)pg/ml],t=0.16, P=0.87;ITP 组骨髓 MSC 培养上清中 HGF 浓度[(520.20±30.67)pg/ml]显著低于对照组骨髓 MSC 培养上清中 HGF 的浓度[(521.56±36.72)pg/ml],t=0.02,P=0.98,详见表 3。

表 3 骨髓 MSC 细胞培养上清 TGF-β1 和 HGF 浓度水平($\bar{x}$±s,pg/ml)

组别	TGF-β 1	HGF
ITP 组	617.88 ± 81.89 (n=16)	520.20 ± 30.67 (n=16)
对照组	632.40 ± 126.90 (n=10)	521.56 ± 36.72 (n=10)
t 值(P 值)	0.16(P=0.87)	0.02(P=0.98)

3 讨 论

ITP 自 1950 年,由 Harrington - Hollingsworth 的经典试验证实了是一种免疫介导的疾病,并且证实了血小板的破坏是由外周循环中的抗体所导致[6]。近年的研究表明,在 ITP 患者血小板减少的过程中,不但外周循环中存在抗体对血小板进行破坏,同时骨髓微环境中也存在着异常活化的免疫反应[7,8]。近年来对于 ITP 发病机制中细胞免疫领域的研究证实,ITP 患者体内存在有自身反应性 T 淋巴细胞的激活、抗原提呈过程的异常、T 细胞凋亡的异常等[12]。MSC 是骨髓中存在的一类不同于 HSC 的干细胞,是骨髓造血微环境的主要组成部分,通过介导细胞间的粘附和分泌细胞因子调节 HSC 的分化、成熟和增殖支持造血[1,2]。同时,目前已有大量的研究结果证实 MSC 具有免疫抑制作用,主要通过抑制 T 淋巴细胞的增殖,减少抗原提呈细胞(Antigen present cell, APC)的活性,抑制 CTL 的形成,增加调节性 T 细胞比例等多种途径发挥作用[3-5]。

本研究首先从形态学上比较 ITP 患儿骨髓 MSC 与对照儿童骨髓 MSC 没有明显差异。ITP 患儿骨髓 MSC 与对照骨髓 MSC 的 CFU-F 计数比较无显著差异,提示 ITP 患儿骨髓 MSC 的增殖能力并无明显改变,将不会影响骨髓 MSC 的免疫抑制活性。

Di Nicola M 等[5]发现健康人类的 MSC 在体外能够抑制 T 细胞的活性,不论自体还是异体的 MSC均对 T 细胞扩增有很强的抑制作用,其抑制率可达 60%~98%。本研究通过将 ITP 患儿骨髓 MSC 与淋

巴细胞共培养,检测发现 ITP 患儿骨髓 MSC 对淋巴细胞增殖的免疫抑制率 [(75.70±9.15)%] 与对照组 [(76.42±8.80)%]相当,提示 ITP 患儿的骨髓造血微环境中 MSC 拥有与对照相当的免疫抑制能力。

已有研究证实骨髓 MSC 发挥免疫抑制作用的效应因子是 TGF-β1 和 HGF。本研究通过检测该两种免疫抑制因子的表达情况进一步探讨 ITP 患儿骨髓 MSC 的免疫抑制作用是否存在异常。

TGF-β1 可由淋巴细胞、巨噬细胞、树突状细胞分泌,国外的研究和本研究也表明骨髓 MSC 能够分泌 TGF-β1[5]。TGF-β1 广泛参与免疫系统细胞因子间的调节,通过直接或间接影响 IL-1、IL-2、IFN-γ 发挥以"负调节"为主的免疫平衡作用。本研究显示,ITP 患儿骨髓 MSC 细胞内表达 TGF-β1mRNA 表达水平和骨髓 MSC 分泌到细胞培养上清中的 TGF-β1 的浓度与对照比较无显著差异,也提示了 ITP 患儿骨髓 MSC 的免疫调节作用与对照相当。但是 TGF-β1 不但具有免疫调节作用,同时对于巨核细胞的生成也起到重要的作用。在 ITP 患儿体内骨髓 MSC 分泌的 TGF-β1 的水平是否会受到巨核细胞分泌的 TGF-β1 水平的影响,还未可知,有待于我们进一步的研究。

HGF 是间充质来源的多能生长因子,骨髓中主要由 MSC 产生。HGF 通过与其配体 c-met 结合,发挥多种生物作用,与多种器官组织的发生和形态构成有关;通过调节造血微环境中的其他造血生长因子的分泌支持造血[13];同时 HGF 还具有免疫抑制作用[5,14,15]。研究发现 HGF 是通过与树突状细胞 (Dendritic cells,DC 细胞)表面的 c-met 结合,抑制 DC 细胞的抗原提呈作用, 起到调节免疫的作用[14]。本研究显示,ITP 患儿骨髓 MSC 细胞内表达HGF mRNA 表达水平和骨髓 MSC 分泌到细胞培养上清中的 HGF 的浓度与对照比较无显著差异,提示通过 HGF 发挥的骨髓 MSC 的免疫抑制能力在 ITP 患者体内并未受损。

综上所述,本研究结果初步显示,ITP 患儿骨髓 MSC 具有与对照相当的体外免疫抑制能力:其对于异体淋巴细胞的免疫抑制率、细胞内表达 TGF-β1、HGF mRNA 的水平和分泌到细胞培养上清中的 TGF-β1、HGF 的浓度与对照比较都没有显著性差异。在 ITP 患儿骨髓微环境中激活的淋巴细胞破坏巨核细胞,造成血小板的减少,而其微环境中的骨髓 MSC 对于淋巴细胞的抑制作用仍处于正常水平,无法抑制激活的骨髓淋巴细胞的作用,参与 ITP 的免疫发病过程。

参 考 文 献

[1] Majumdar M K,Thiede M A,Haynesworth S E,et al. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages[J]. J Hematother Stem Cell Res,2000,9(6): 841-848.

[2] Zhao Z G,Tang X Q,Li W M,et al. Biological characteristics and ability of supporting hematopoiesis of bone marrow mesenchymal stem cells pre-and post-cryop-reservation[J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi,2006,14(2):304-307.

[3] Krampera M,Glennie S,Dyaon J,et al. Bone marrow mesenchymal stem cell inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide[J]. Blood,2003,101(9): 3722-3729.

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

[5] Di Nicola M,Carlo-Stella C,Magni M,et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli[J]. Blood,2002,99(10): 3838-3843.

[6] Robert S,Schwartz M D. Immune thrombocytopenic purpura — from agony to agonist[J]. N Engl J Med,2007,357(22): 2299—2301.

[7] McMillan R,Wang L,Tomer A,et al. Suppression of in vitro egakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP[J]. Blood,2004,103(4):1364-1369.

[8] Houwerzijl E J,Blom N R,van der Want J J,et al. Ultrastructural study shows orphologic features of apoptosis and parITPpoptosisin megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Blood,2004,103(2):500-506.

[9] 张之南,沈 悌.血液病诊断及疗效标准[M]. 第 2 版.北京:科学出版社,1999.245-249.

[10] 裴雪涛. 干细胞技术 [M]. 第 1 版. 北京: 化学工业出版社, 2002.38-39.

[11] Bacigalupo A,Valle M,Podesta M,et al. T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia[J]. Exp Hematol,2005,33(7):819-827.

[12] 赵春红,侯 明.特发性血小板减少性紫癜的细胞免疫异常研究新进展[J]. 中国实验血液学杂志,2006,14(5):1045-1048.

[13 Takai K,Hara J,Matsumoto K,et al. Hepatocyte growth factor is constitutively produced by human bone marrow Stromal cells and indirectly promotes hematopoiesis[J]. Blood,1997,89(5): 178-183.

[14] Okunishi K,Dohi M,Nagome K,et al. A novel role of hepatocyte growth factor as an immune regulator through suppressing dendritic cell function1[J]. J Immunol,2005,175(7): 4745-4753.

[15] 边 莉,郭子宽,艾辉胜,等.HGF 基因修饰增强间充质干细胞的免疫抑制作用[J]. 军事医学科学院院刊,2006,30(4):323-328.

(责任编辑:冉明会)