

间充质干细胞联合 NK 细胞输注抑制 DC 减轻 aGVHD

赵一俏¹, 曹东林^{2*}, 陈 伟³

(广东省第二人民医院 1.心血管内科, 2.检验科, 3.血液科, 广东 广州 510317)

摘 要: 【目的】观察骨髓 MSC 联合 NK 细胞输注对小鼠异基因骨髓移植后 aGVHD 的影响, 初步探讨其作用机制。【方法】分离 C57BL/6 小鼠骨髓细胞, 体外培养 MSC; 取 C57BL/6 小鼠脾脏细胞, 磁珠分选 NK 细胞; 建立 C57BL/6→BALB/c 小鼠异基因骨髓移植模型, 接受移植小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只小鼠, MSC 和 NK 细胞移植组, MSC 移植组, NK 细胞移植组和培养基对照组。根据 aGVHD 分值, 肝、脾、小肠 aGVHD 病理损害和平均存活时间, 评价 aGVHD 的程度。ELISA 法检测小鼠血清中 IFN γ 和 IL-12 的含量。流式细胞术检测受鼠脾脏细胞 CD11c 和 CD86 的表达情况。【结果】根据 GVHD 分值, 肝、脾、小肠 aGVHD 病理损害和平均存活时间综合评价, 与培养基对照组比较, MSC 联合 NK 细胞移植组, MSC 移植组和 NK 细胞移植组, 发生 aGVHD 的程度均减轻, 以 MSC 联合 NK 细胞移植组减轻最为明显。IFN γ 的含量, NK 细胞组明显高于 MSC 联合 NK 细胞移植组, MSC 移植组和培养基对照组。IL-12 的含量, MSC 联合 NK 细胞移植组低于 NK 细胞移植组和培养基对照组, MSC 移植组低于培养基对照组。脾脏 DC 细胞的含量, MSC 联合 NK 细胞移植组未成熟 DC(CD11c⁺CD86⁻) 和成熟 DC(CD11c⁺CD86⁺) 均低于 MSC 移植组, NK 细胞组和培养基对照组。【结论】MSC 联合 NK 细胞输注降低 DC 细胞数量, 减轻 aGVHD, 延长小鼠生存时间。

关键词: 间充质干细胞; 自然杀伤细胞; 异基因骨髓移植; 急性移植物抗宿主病

中图分类号: R3921

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2013)02-0200-07

Alleviation of Graft-versus-host Disease after Infusion of Mesenchymal Stem Cells Combined with Natural Killer Cells by Reducing Dendritic Cells in Mice

ZHAO Yi-qiao¹, CAO Dong-lin², CHEN wei³

(1.Department of Cardiology, Guangdong No.2 Provincial People's Hospital; 2.Department of Clinical Laboratory, Guangdong No.2 Provincial People's Hospital, Guangzhou 510317, China; 3.Department of Hematology, Guangdong No.2 Provincial People's Hospital, Guangzhou 510317, China)

Abstract: 【Objective】To observe the effect of infusion of bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) combined with natural killer cells (NK) on acute graft versus host disease (aGVHD) after allogeneic bone marrow transplantation (allo-BMT) in mice and investigate the preliminary mechanism. 【Methods】Bone marrow cells isolated from C57BL/6 mice were cultured to MSC in vitro. NK cells were separated from spleen cells in C57BL/6 mice through magnetic beads. Allogeneic bone marrow transplantation models were established with BALB/c mice as recipients and C57BL/6 mice as donors. Forty BALB/c mice were divided into 4 groups at random i.e.: MSC combined with NK group, MSC group, NK group and medium control group. According to GVHD scores, GVHD pathological changes in the liver, spleen and gut, and average survival time, aGVHD were valued. The concentrations of IFN γ and IL-12 in the serum were detected through ELISA assay. The expression rates of CD11c and CD86 on the surface of spleen cells were detected through flow cytometry. 【Results】According to GVHD scores, GVHD pathological changes in the liver, spleen and gut, and

收稿日期: 2012-10-19

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B031800301)

作者简介: 赵一俏, 博士, 主任医师, 研究方向: 细胞治疗, E-mail: zhaoyiqiao@21cn.com, * 通信作者: 曹东林, E-mail: caodl@126.com

average survival time, compared to blank control group, the aGVHD manifestations of MSC combined with NK group, MSC group and NK group were alleviated, especially in MSC combined with NK group. The IFN γ concentration of NK group was higher than that of MSC combined with NK group, MSC group and medium control group. The IL-12 concentration of MSC combined with NK group was lower than that of NK group and medium control group respectively, and MSC group was lower than medium control group. The numbers of both immature dendritic cells (CD11c⁺CD86⁻) and mature dendritic cells (CD11c⁺CD86⁺) of spleen in MSC combined with NK group were lower than those of MSC group, NK group and medium control group. 【Conclusion】 Infusion of bone marrow mesenchymal stem cells combined with natural killer cells decreased the number of dendritic cells, alleviated acute graft versus host disease and prolonged survival time in mice.

Key words: mesenchymal stem cells; natural killer cells; allogeneic bone marrow transplantation; acute graft versus host disease

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(2):200-206]

异基因骨髓移植 (allogeneic bone marrow transplantation, allo-BMT) 是治疗高危白血病的有効手段。但移植后的急性移植物抗宿主病 (acute graft versus host disease, aGVHD) 仍是导致患者死亡的主要原因之一^[1]。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 是骨髓中具有自我更新和多向分化潜能的一种非造血干细胞, 其免疫原性低, 能抑制丝裂原或同种异基因抗原刺激的 T 细胞增殖, 因而具有较强的免疫调节作用^[2], 能显著抑制 aGVHD 的发生而提高移植的成功率^[3], 但同时也抑制了供者 T 淋巴细胞的移植物抗肿瘤效应 (graft versus leukemia, GVL)^[4], 使移植后的复发率上升。因此寻找有效治疗 aGVHD, 同时又能保持 GVL 的新方法对提高异基因骨髓移植的疗效, 减少移植并发症和病死率至关重要。自然杀伤细胞 (natural killer cells, NK) 是产生 GVL 的另一重要效应细胞^[5], 如将 MSC 和 NK 细胞联合输注, 则能在减轻 aGVHD 的同时保留 GVL。但是 NK 细胞能否与 MSC 相互作用而影响 aGVHD 呢? 因此, 本文拟分离 C57BL/6 小鼠骨髓细胞, 体外培养 MSC; 取 C57BL/6 小鼠脾脏细胞, 磁珠分选 NK 细胞; 建立 C57BL/6 $\rightarrow$ BALB/c 小鼠异基因骨髓移植模型, 观察骨髓 MSC 联合 NK 细胞输注对小鼠异基因骨髓移植后 aGVHD 的影响, 并对其作用机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级 C57/B6 和 BALB/c 小鼠各 40 只, 体质

量 18 ~ 22 g, 8 ~ 10 周龄, 雌雄各半, 购自南方医科大学实验动物中心。饲养条件符合 SPF 标准。小鼠饲料和垫料均经 ⁶⁰Co 辐照处理, 饮用水经高压灭菌处理。

1.2 试剂

小鼠 NK 细胞分选试剂盒 (Mouse NK Cell Isolation Kit) 购自德国美天旎生物技术公司; 小鼠 IFN γ 和 IL-12 ELISA 检测试剂盒购于达科为生物公司; FITC anti-mouse CD11c 和 PE anti-mouse CD86 流式单抗购于中晶生物公司; DMEM 高糖培养基, RPMI1640 培养基和胰蛋白酶购于 Gibco 公司, 胎牛血清购于 Hyclone 公司。

1.3 MSC 的分离和培养

将 C57BL/6 供鼠断椎处死后, 无菌条件下取双侧胫、股骨, 剪去两端, 用 RPMI1640 培养液冲出骨髓, 制成骨髓细胞悬液, 调整细胞数为 2×10^8 /mL, 用含 200 mL/L 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 加青链霉素各 100 U/mL, 放在 37 $^{\circ}$ C, 体积分数 5% CO₂, 饱和湿度条件下培养, 48 h 后去除悬浮细胞上清, 换液。此后每 3 ~ 4 d 换液, 3 ~ 4 周后当贴壁细胞层达到 90% 以上融合时, 以 2.5 g/L 胰酶消化、传代, 收集传至第 3 代以后的细胞, 调整浓度为 1×10^7 /mL, 待用。

1.4 小鼠自然杀伤细胞分离纯化及活力检测

参照文献[6]断颈处死小鼠后无菌条件取下脾脏, 在 200 目金属网中边研磨边滴加预冷的 PBS 液, 直至研磨完全后收集细胞悬液。按 Mouse NK Cell Isolation Kit 说明书分选 NK 细胞, 流式细胞术检测分选前后的 NK 细胞纯度。细胞悬液经 0.4% 台盼蓝染色液测定细胞活力。

1.5 小鼠 allo-BMT 模型的建立

6~8 周龄清洁级 BALB/c 健康雌性小鼠共 40 只作为受鼠,体质量 18~22 g。allo-BMT 模型制备参照文献[7]移植预处理方案:受鼠受 X 线直线加速器全身照射,总剂量 9.5Gy,剂量率 0.5 Gy/min,照射源与动物之间距离 50 cm。照射后即在空气层流房中无菌饲养。选择 C57BL/6 雄性小鼠为供鼠,无菌取小鼠股骨和胫骨骨髓,制成骨髓单个核细胞悬液,用 RPMI1640 培养液调整细胞数为 $1 \times 10^8/\text{mL}$,同时取供鼠脾脏,制备脾细胞悬液,以 RPMI 1640 培养液调整细胞数为 $2 \times 10^8/\text{mL}$ 。40 只 BALB/c 受鼠照射后 4 h,尾静脉注射供鼠骨髓和脾细胞混和液 0.1 mL (含 1×10^7 骨髓细胞和 2×10^6 脾细胞),随机分为 4 组,每组 10 只进行后续实验。

1.6 MSC 和 NK 细胞输注

BALB/c 受鼠分为 4 组,每组 10 只小鼠:① MSC 联合 NK 细胞移植组(MSC+NK),② MSC 移植组(MSC),③ NK 细胞移植组(NK)和④培养基对照组(control)。移植后 1 d,①组和②组每只小鼠尾静脉输注 3×10^6 MSC 悬液。移植后第 4、7、10、13 和 16 天,①组和③组每只小鼠尾静脉输注 2×10^6 NK 细胞悬液。④组均以 RPMI1640 培养基尾静脉注射。

1.7 移植后小鼠 GVHD 的评估、相关病理学检查及生存情况观察

1.7.1 监测指标 ①大体及实验室检测指标:外周血白细胞计数,生存期,体质量,食欲,外观,腹泻,出血或粘膜炎症等;②病理学检查:取移植后 30 d(濒死前)各组小鼠肝、脾、小肠等组织,用 4% 中性甲醛液固定,石蜡包埋切片,HE 染色,光镜观察。

1.7.2 GVHD 的判定标准 外周血白细胞计数 $> 1 \times 10^9/\text{L}$,且伴有食欲下降,体质量下降,脱毛,弓背,嗜睡或活动减少,脱毛,腹泻,出血或粘膜炎症等表现。病理检查可见肝、肠、皮肤等组织淋巴细胞浸润,正常组织结构破坏,伴有局灶性出血等改变。长期生存标准:生存期大于 30 d,体质量、饮食和活动正常。

1.8 ELISA 检测

在移植后第 20 天,取存活的各组小鼠眼眶血 1 mL,注入肝素抗凝的试管内,离心取上清。按试剂盒操作步骤进行。以 ELISA 双抗夹心法测定各样品中 IFN γ 和 IL-12 的 OD 值,通过标准曲线求出样品中各细胞因子的浓度。每组取 5 个样本,每个样本复 3 孔进行检测。

1.9 流式细胞术检测

在移植后第 20 天,取各组小鼠脾脏,制备脾

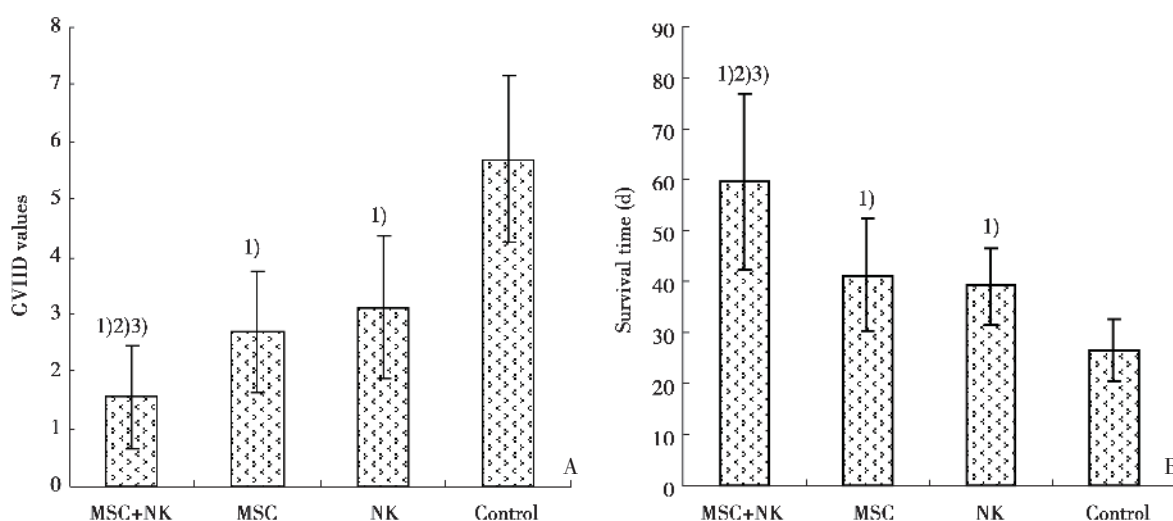


图 1 各组小鼠 aGVHD 评分值和平均生存时间

Fig.1 aGVHD values and mean survival times in groups with aGVHD

1) $P < 0.05$, compared with Control group; 2) $P < 0.05$, compared with NK group; 3) $P < 0.05$, compared with MSC group). A: aGVHD values;

B: meaning survival time

细胞悬液,以 PBS 调整细胞数,每份标本各加 FITC anti-mouse CD11c 和 PE anti-mouse CD86 流式单抗各 10 μ L,避光,在 4 $^{\circ}$ C 条件下反应 20 min,流式细胞仪检测 50 000 个细胞。每组取 5 个样本进行检测。

1.10 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS13.0 统计软件行 One-Way ANOVA 分析及采用 LSD 法两两比较。

2 结 果

2.1 MSC 的形态

培养第 2 天出现形态不均一的贴壁细胞,1 周后可看到散在的形态均一,呈长梭形的细胞克隆,传至第 3 代后,细胞大小一致,具有明显的方向性。

2.2 NK 细胞纯度及细胞活力

小鼠脾细胞中 NK 细胞含量为 $(7.25 \pm 2.37)\%$,经磁珠分选后 NK 细胞纯度可达 $(91.80 \pm 2.15)\%$ 。细胞活力检测结果为 $(97.58 \pm 1.23)\%$,直接用于后续实验。

2.3 aGVHD 评估

2.3.1 aGVHD 评分和平均生存时间 小鼠在移植后在 14 d 均出现不同程度进食差、体质量减

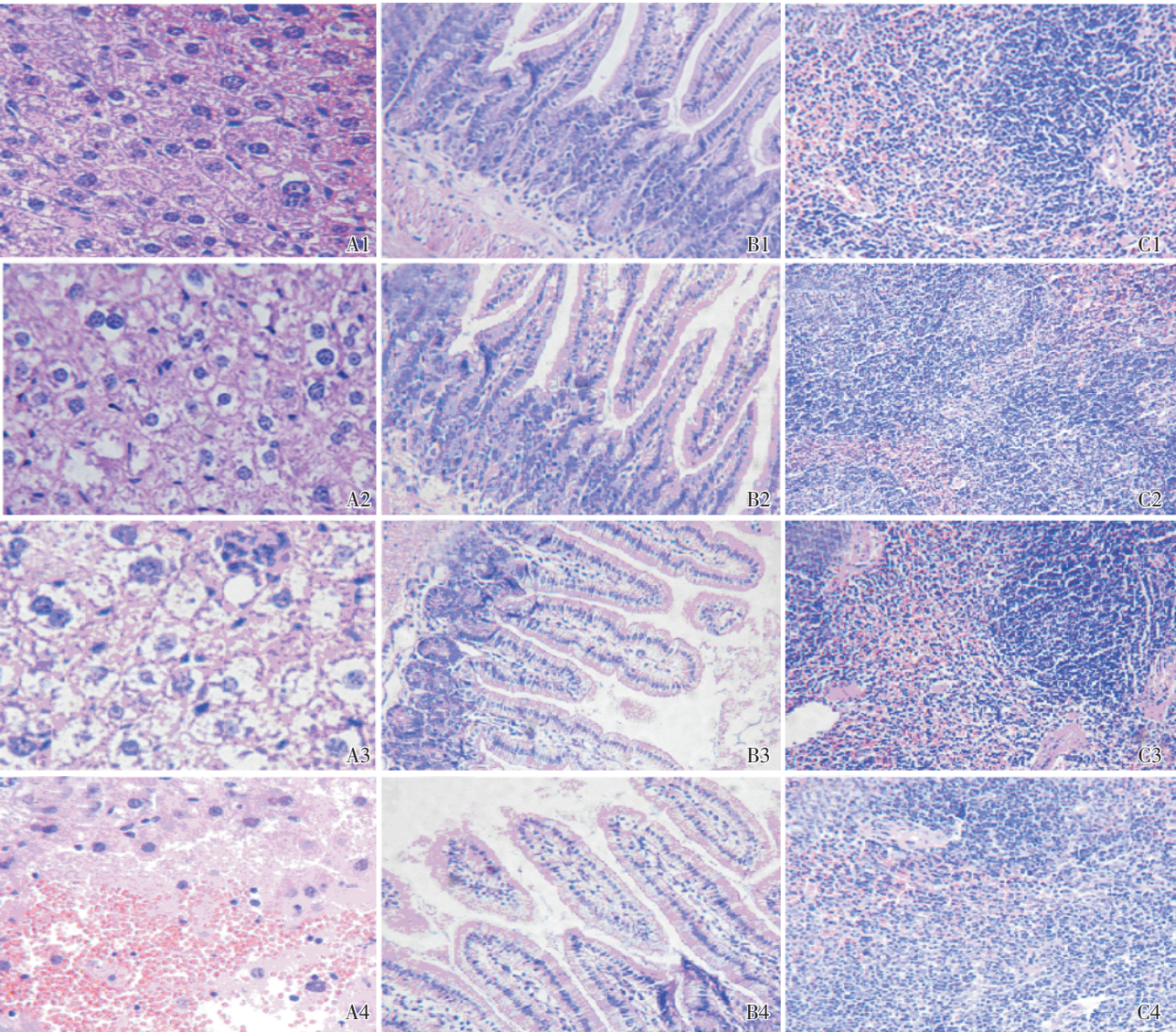
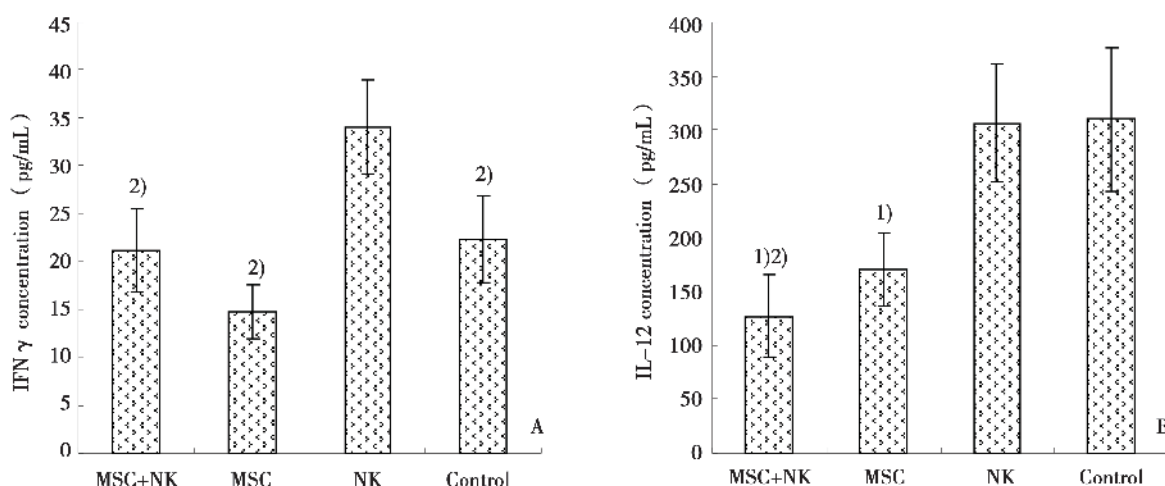


图 2 aGVHD 小鼠肝脏、脾脏和小肠的病理变化

Fig.2 Pathological manifestations in the liver, spleen, and gut in different groups with aGVHD

A: liver; B: intestine; C: spleen; 1: MSC+NK group; 2: MSC group; 3: NK group; 4: medium control group $\times$ 400

图 3 各组小鼠血浆 IFN γ 和 IL-12 的浓度Fig.3 IFN γ and IL-12 concentration in plasma of mice with aGVHD

Five replicates in each group; 1) $P < 0.05$, compared with Control group; 2) $P < 0.05$, compared with NK group). A: IFN γ concentration; B: IL-12 concentration.

轻、呈弓背体位等 GVHD 表现。按文献 GVHD 评分标准对每组小鼠在 30 d 内 GVHD 评分指数进行比较, MSC 联合 NK 细胞移植组, MSC 移植组, NK 细胞移植组均低于培养基对照组, 以 MSC 联合 NK 细胞移植组为最低, 差异有统计学意义 ($F = 22.198, P = 0.000$; 图 1A)。MSC 联合 NK 细胞移植组, MSC 移植组, NK 细胞移植组的平均生存时间均高于培养基对照组, 其中 MSC 联合 NK 细胞移植组平均生存时间最长, 差异有统计学意义 ($F = 14.757, P = 0.000$; 图 1B)。

2.3.2 aGVHD 小鼠肝、脾和小肠病理改变 MSC 移植组, NK 细胞移植组与培养基对照组肝小叶结构不规则, 汇管区中央静脉扩张, 肝窦淤血, 部分有淋巴细胞浸润, 肝细胞肿大, 甚至出现变性和坏死; 脾脏的脾小梁结构破坏, 伴有巨噬细胞和淋巴细胞浸润, 脾细胞出现变性和坏死; 小肠绒毛坏死脱落, 结构破坏, 粘膜及粘膜下层充血水肿, 伴淋巴细胞浸润。而 MSC 联合 NK 细胞移植组小鼠肝脏结构基本正常, 但汇管区伴少量炎性细胞浸润; 脾小梁结构基本完整, 伴有少量巨噬细胞浸润; 小肠绒毛未见明显坏死脱落, 粘膜下层少量炎性细胞浸润(图 2)。

2.4 血浆 IFN γ 和 IL-12 的含量

IFN γ 的含量, NK 细胞组明显高于 MSC 联合

NK 细胞移植组, MSC 移植组和培养基对照组, 差异有统计学意义 ($F = 18.303, P = 0.000$; 图 3A)。IL-12 的含量, MSC 联合 NK 细胞移植组低于 NK 细胞移植组和培养基对照组, MSC 移植组低于培养基对照组, 差异有统计学意义 ($F = 19.858, P = 0.000$; 图 3B)。

2.5 脾脏 DC 细胞的含量

流式细胞术检测脾脏细胞 CD11c 和 CD86 的表达, CD11c⁺ 细胞则为 DC 细胞, 其中不表达 CD86 的为未成熟 DC, 表达 CD86 的为成熟 DC 细胞。MSC 联合 NK 细胞移植组 DC 细胞数均低于 MSC 移植组, NK 细胞组和培养基对照组, 差异有统计学意义 ($F = 3.443, P = 0.042$)。MSC 移植组未成熟 DC 均高于其它 3 组, 差异有统计学意义 ($F = 21.516, P = 0.000$)。MSC 联合 NK 细胞移植组和 MSC 移植组成熟 DC 均低于 NK 细胞移植组和培养基对照组, 差异有统计学意义 ($F = 6.678, P = 0.000$), 而 NK 细胞移植组和培养基对照组在未成熟 DC 和成熟 DC 的数量上均无明显差异(表 1)。

3 讨论

MSC 具有独特的低免疫源性, 不表达 MHC-II 分子和 FasL, 不表达或极低表达 MHC-I 分子, 也

表 1 各组 aGVHD 小鼠脾脏 DC 的比例

Table 1 DC percentage in spleen of mice with aGVHD (%)

	CD11c ⁺	CD11c ⁺ CD86 ⁻	CD11c ⁺ CD86 ⁺
MSCs+NK	2.38 ± 1.25 ¹⁾²⁾³⁾	0.82 ± 0.26 ³⁾	1.56 ± 1.10 ¹⁾²⁾
MSCs	4.72 ± 14.0	3.22 ± 1.50	1.50 ± 0.47 ¹⁾²⁾
NK	4.60 ± 1.54	0.74 ± 0.26 ³⁾	3.86 ± 1.40
Control	4.96 ± 1.54	0.94 ± 0.21 ³⁾	4.02 ± 1.53
F	3.443	21.516	6.678
P	0.042	0.000	0.004

1) $P < 0.05$, compared with medium control group; 2) $P < 0.05$, compared with NK group; 3) $P < 0.05$, compared with MSC group

不表达共刺激分子 B7-1, B7-2, CD 40, CD 40L, 很难被免疫系统识别^[2]。体内外实验已证实 MSC 能抑制同种异体 T 淋巴细胞增殖, 避免同种异体排斥反应, 诱导免疫耐受^[8]。因此, 将 MSC 运用于 aGVHD 的预防和治疗已取得了较好的临床疗效^[9]。这与本研究结果一致, 即发生 aGVHD 的小鼠输注供者来源的骨髓 MSC, 能够减轻 aGVHD 的症状和延长生存时间。

NK 细胞作为免疫监视体系之一, 可快速有效地分泌细胞因子, 是机体防御体系中的第一道防线, 也是 GVL 中重要的效应细胞。研究发现, NK 细胞能预防无关供者产生的 aGVHD^[10]。本研究结果显示, NK 细胞输注能够减轻 aGVHD 的症状和延长生存时间, 并且能增强 MSC 的效果, 即 MSC 联合 NK 细胞输注的效果最佳。有研究表明, MSC 和 NK 细胞在体内能相互作用^[11]。MSC 能影响 NK 细胞的增殖、细胞毒作用、细胞因子的分泌和同种抗原诱导的 NK 细胞的扩增, 且这种抑制作用为浓度依赖性^[12]; Spaggiari 等^[13]进一步研究表明, MSC 不仅能抑制 NK 细胞的增殖及其细胞因子 IFN γ 等的产生, 还能通过抑制 NK 细胞表面的活化受体 NKP30 和 NKG2D 数量抑制 NK 细胞的细胞毒活性, 通过 MSC 表面的 HLA1 类分子限制 NKP30 和 NKG2D 相应配体的数量抑制 NK 细胞溶解细胞的功能。本研究结果显示, 与单纯 NK 细胞输注比较, MSC 联合 NK 细胞输注后 IFN γ 的浓度降低, 提示 MSC 能抑制 NK 细胞的功能, 但具体机制还有待进一步研究。Gotherstrom 等^[14]研究发现, MSC 能上调 NK 细胞表面 HLA1 类分子, 从而

抑制 NK 细胞对 MSC 的杀伤, 保留 MSC 的功能, 这与本研究结果相似, 即与单纯 MSC 输注比较, MSC 联合 NK 细胞输注后 aGVHD 评分值降低, 病理改变减轻, 平均生存时间延长, 甚至 IL-12 的浓度也降低, 提示 NK 细胞并不影响 MSC 的功能。

在研究 MSC 减轻 aGVHD 时, MSC 对功能最强大的抗原提呈细胞 (APC)——树突状细胞 (dendritic cells, DC) 的影响值得关注。DC 启动免疫排斥还是维持免疫耐受取决于它们的起源以及成熟状态, 成熟 DC 可启动 GVHD 反应^[15]。有研究发现 MSC 能对 DC 发挥强烈的抑制作用, 在 MSC 比例较高时, 能完全抑制骨髓有核细胞向 DC 的转化。MSC 也能抑制外周血单核细胞及 CD34⁺ 细胞向 DC 的分化成熟, 使其表面粘附分子 CD40 和 CD86 的表达降低, 并影响其功能^[16]。本研究结果也显示, 与培养基对照组比较, 单纯 MSC 输注后, 表达 CD11c 和 CD86 的成熟 DC 细胞减少, 而表达 CD11c 和不表达 CD86 的未成熟 DC 细胞增多, 提示 MSC 能阻止 DC 细胞的分化成熟。此外, 有学者发现, MSC 能抑制 DC 的分化和成熟, 减少树突状细胞 IL-12 的分泌^[17]。这也与本研究结果相似, MSC 输注后 IL-12 的含量降低, 提示 MSC 对 DC 具有抑制作用。然而, 本研究结果也发现, MSC 联合 NK 细胞输注后, 表达 CD11c 和不表达 CD86 的未成熟 DC 细胞减少。NK 细胞能选择性杀伤未成熟 DC 细胞, 间接降低体内 DC 细胞的含量, 减低刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖的能力, 从而达到降低 aGVHD 的效果。虽然未成熟 DC 可诱导免疫耐受, 但目前发现并不是所有未成熟 DC 都能诱导免疫耐受, Amarnath 等^[18]认为只有在抑制性 T 淋巴细胞的协同作用下, 未成熟 DC 细胞才能发挥免疫耐受的功能。因此, NK 细胞降低体内未成熟 DC 细胞的含量, 是否会降低机体的免疫耐受能力和未成熟 DC 在 aGVHD 中的作用机制还有待进一步研究。

综上所述, MSC 联合 NK 细胞输注能通过杀伤未成熟 DC, 减少成熟 DC 含量, 减轻 aGVHD 效应。虽然 MSC 联合 NK 细胞输注能最大限度减轻 aGVHD, 但能否真正保留 GVL 效应, 还需下一步研究证实。

参考文献:

- [1] Liu YC, Gau JP, Hong YC, et al. Large pericardial effusion as a life-threatening complication after hematopoietic stem cell transplantation—association with chronic GVHD in late-onset adult patients [J]. *Ann Hematol*, 2012, 91(12):1953–1958.
- [2] Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells [J]. *Clin Exp Immunol*, 2011, 164(1): 1–8.
- [3] Tolar J, Villeneuve P, Keating A. Mesenchymal stromal cells for graft-versus-host disease [J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(3): 257–262.
- [4] Sato K, Ozaki K, Mori M, et al. Mesenchymal stromal cells for graft-versus-host disease: basic aspects and clinical outcomes [J]. *J Clin Exp Hematop*, 2010, 50(2): 79–89.
- [5] Pegram HJ, Ritchie DS, Smyth MJ, et al. Alloreactive natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Leuk Res*, 2011, 35(1): 14–21.
- [6] Smith HR, Chuang HH, Wang LL, et al. Nonstochastic coexpression of activation receptors on murine natural killer cells [J]. *J Exp Med*, 2000, 191(8): 1341–1354.
- [7] Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, et al. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation I. The roles of minor H antigens and endotoxin [J]. *Blood*, 1996, 8(8): 3230–3239.
- [8] Pistoia V, Raffaghello L. Potential of mesenchymal stem cells for the therapy of autoimmune diseases [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2010, 6(2): 211–218.
- [9] Lin Y, Hogan WJ. Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment and Prevention of Graft-versus-Host Disease [J]. *Adv Hematol*, 2011, 2011: 427863.
- [10] Tanaka M, Kobayashi S, Numata A, et al. The impact of the dose of natural killer cells in the graft on severe acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation [J]. *Leuk Res*, 2012, 36(6): 699–703.
- [11] Lankester AC, Ball LM, Lang P, et al. Immunotherapy in the context of hematopoietic stem cell transplantation: the emerging role of natural killer cells and mesenchymal stromal cells [J]. *Pediatr Clin North Am*, 2010, 57(1): 97–121.
- [12] Li Y, Qu YH, Wu YF, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells reduce the antitumor activity of cytokine-induced killer/natural killer cells in K562 NOD/SCID mice [J]. *Ann Hematol*, 2011, 90(8): 873–885.
- [13] Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, et al. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2 [J]. *Blood*, 2008, 111: 1327–1333.
- [14] Gotherstrom C, Lundqvist A, Duprez IR, et al. Fetal and adult multipotent mesenchymal stromal cells are killed by different pathways [J]. *Cytotherapy*, 2011, 13: 269–278.
- [15] Stenger EO, Turnquist HR, Mapara MY, et al. Dendritic cells and regulation of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia activity [J]. *Blood*, 2012, 119(22): 5088–5103.
- [16] Ramasamy R, Fazekasova H, Lame W, et al. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle [J]. *Transplantation*, 2007, 83(1): 71–76.
- [17] van den Berk LC, Roelofs H, Huijs T, et al. Cord blood mesenchymal stem cells propel human dendritic cells to an intermediate maturation state and boost interleukin-12 production by mature dendritic cells [J]. *Immunology*, 2009, 128(4): 564–572.
- [18] Amarnath S, Costanzo CM, Mariotti J, et al. Regulatory T cells and human myeloid dendritic cells promote tolerance via programmed death ligand-1 [J]. *PLoS Biol*, 2010, 8(2): e1000302.

(编辑 孙慧兰)