

间充质干细胞在致敏受者造血干细胞移植中的作用

许吕宏, 洪冬玲, 吴燕峰, 方建培*

(中山大学孙逸仙纪念医院儿科, 广东 广州 510120)

摘要: 【目的】本实验拟研究骨髓间充质干细胞(MSC)在致敏受者造血干细胞移植中的作用。【方法】体外分离BALB/c小鼠骨髓细胞,通过贴壁培养方法获得MSC,应用流式细胞仪检测细胞表面分子标记。通过异基因脾细胞输注方法建立致敏动物模型;绿色荧光染料标记骨髓MSC,分别移植到非致敏及致敏受者体内,并于移植后不同时间点检测MSC的归巢情况。致敏BALB/c小鼠经照射预处理,联合应用同基因MSC与异基因骨髓细胞移植,每日观察小鼠的生存情况。【结果】体外培养第4代MSC表现为长梭形,阴性表达造血细胞表面分子而阳性表达粘附分子。动物体内实验发现移植后第48小时,MSC在非致敏受者体内主要归巢于骨髓,而在致敏受者体内主要归巢于脾脏。造血干细胞移植实验中,致敏小鼠接受同基因骨髓MSC与异基因骨髓细胞移植,结果发现致敏小鼠在移植后第12~16天全部死亡,生存中位数时间是14d。【结论】成功培养小鼠骨髓MSC;移植后MSC在致敏受者体内主要归巢于脾脏组织;联合应用MSC移植并不能有效促进异基因造血干/祖细胞在致敏受者体内植入。

关键词 间充质干细胞;致敏受者;造血干细胞移植

中图分类号:R332;R457.7 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2013)02-0225-05

Effects of Mesenchymal Stem Cells in Hematopoietic Stem Cells Transplantation for Sensitized Recipients

XU Lu-hong, HONG Dong-ling, WU Yan-feng, FANG Jian-pei*

(Department of Pediatrics, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】The study was aimed to study the effects of mesenchymal stem cells (MSC) in hematopoietic stem cell transplantation for sensitized recipients. 【Methods】Bone marrow cells derived from BALB/c mice were cultured in vitro. The molecular markers and the function of MSC were detected by flow cytometry. A murine model of sensitization was established by transfusion of allogeneic spleen cells. MSC labeled with green fluorescent dye were transplanted into non-sensitized and sensitized recipients, and the homing of MSC in vivo was monitored at different time points post transplantation. Additionally, sensitized BALB/c mice under irradiation were transplanted with syngeneic MSC and allogeneic bone marrow cells, and the rate of survival was monitored daily. 【Results】The results showed that the fourth passage of MSC presented typical spindle-shape morphology. The MSC were lack of expression of hematopoietic cell markers but with expression of adherent markers. Forty-eight hours post transplantation, the homing of MSC was found mainly in bone marrow of non-sensitized recipient and spleen of sensitized recipient, respectively. The hematopoietic stem cell transplantation showed that all the sensitized recipients died at 12 to 16 days after receiving syngeneic MSC and allogeneic bone marrow cells, with a median of 14 days. 【Conclusion】Successfully cultured murine MSC in vitro. The MSC mainly homed to spleen of sensitized recipient post transplantation, furthermore, MSC could not enhance engraftment of allogeneic hematopoietic stem/progenitor cells in sensitized recipients.

Key word: mesenchymal stem cells; sensitized recipients; hematopoietic stem cell transplantation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(2): 225-229]

收稿日期:2012-11-01

基金项目:广东省科技计划项目(2012B031800074)

作者简介:许吕宏,博士,研究方向:小儿血液系统疾病,*通信作者,方建培,教授,博士生导师,E-mail:jpfang2005@163.com

我们既往已建立脾细胞输注致敏的动物模型,体内示踪表明异基因供者骨髓细胞在致敏受者骨髓及脾脏等部位被清除;进一步研究发现致敏受者损伤异基因供者造血干细胞的机制主要通过补体依赖淋巴细胞毒性、抗体依赖细胞介导的细胞毒性及毒性淋巴细胞等免疫途径,说明如何克服致敏受者体内体液免疫及细胞免疫是移植成功的关键^[1]。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)在免疫调节中发挥重要作用,能抑制 T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞的增殖,并抑制抗体的产生;在临床造血干细胞移植中也证实 MSC 能抑制移植物抗宿主病,并能促进造血干/祖细胞在移植受者体内植入^[2-4]。能否应用 MSC 促进造血干/祖细胞在致敏受者体内植入?目前国内外均无此报道,值得进一步研究。本课题以小鼠骨髓 MSC 为研究靶点,探讨 MSC 在致敏受者造血干细胞移植的作用,为临床应用 MSC 治疗致敏受者移植排斥提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及主要试剂

无特定病原体(SPF 级)的 C57BL/6 及 BALB/c 小鼠,均为雄性,6~8 周,体质量 18~20 g,由中山大学实验动物中心提供并饲养。羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)购自美国 Invitrogen 公司,DMEM/F12 培养基及 RPMI-1640 培养基购自美国 Invitrogen 公司,流式细胞仪的荧光抗体购自美国 BD PharMingen 公司。

1.2 骨髓 MSC 体外培养及表型鉴定

1.2.1 骨髓 MSC 培养 分离 BALB/c 小鼠股骨和胫骨,制备单细胞悬液,应用 DMEM/F12 完全培养基进行贴壁培养。细胞体外培养扩增至第 4 代时,出现典型长梭形,分离获得小鼠骨髓 MSC 以备用。

1.2.2 骨髓 MSC 表型鉴定 体外应用 Anti-CD44-PE、Anti-CD105-PE、Anti-CD29-PE、Anti-Sca-1-FITC、Anti-CD34-FITC、Anti-CD11b-FITC 等荧光染料进行标记,流式细胞仪检测 MSC 表面分子标记。

1.3 致敏模型的建立及移植前准备

参照文献^[1]通过同种异基因脾细胞输注方法建立致敏动物模型,具体方法是取 1×10^6 C57BL/6 脾细胞通过尾静脉输注到 BALB/c 小鼠,连续两次,间隔 7 d。取正常 BALB/c 小鼠作为非致敏对照组。致敏或非致敏的 BALB/c 小鼠于移植前 5 d 开始饮用抗生素的饮用水,含庆大霉素 32×10^4 U/L 和红霉素 250 mg/L。移植前 4 h 小鼠予 ^{60}Co 进行单次照射,总剂量为 8 Gy。

1.4 骨髓 MSC 在移植受者体内归巢

1.4.1 CFSE 标记骨髓 MSC 应用 PBS 缓冲液将骨髓 MSC 浓度调整为 $(1 \sim 5) \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$,加入终浓度 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 CFSE,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 10 min 后,再与 5 倍体积含 100 mL/L 小牛血清的冷 DMEM/F12 完全培养基于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 5 min 以结束染色。应用 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次,DMEM/F12 完全培养基调整细胞浓度,然后将细胞移植到受鼠体内进行示踪检查。实验分组:非致敏组及致敏组小鼠各 9 只。

1.4.2 骨髓 MSC 在受者体内各组织归巢情况

小鼠经照射预处理后,经尾静脉输注 1×10^6 同基因骨髓 MSC。移植后第 6、24 及 48 小时分别处死小鼠各 3 只,分离小鼠脾脏、股骨细胞悬液及眼静脉血,以 Tris- NH_4Cl 溶液溶解红细胞,应用流式细胞仪检测绿色荧光的频率(激发光波长为 488 nm)。

1.5 骨髓 MSC 在致敏受者造血干细胞移植的应用

1.5.1 造血干细胞移植 取正常非致敏或致敏的 BALB/c 小鼠为移植受者,C57BL/6 小鼠骨髓细胞为异基因造血干/祖细胞。分离 C57BL/6 股骨及胫骨的骨髓细胞,洗涤后用 RPMI-1640 完全培养基将细胞浓度调为 $2 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 。移植受者经照射预处理后,经尾静脉输注 1×10^7 异基因骨髓细胞。MSC 干预组致敏小鼠经照射预处理后,联合应用 1×10^6 BALB/c 小鼠骨髓 MSC 与 1×10^7 C57BL/6 骨髓细胞进行移植。

1.5.2 实验分组 单纯照射未移植组;非致敏小鼠骨髓移植组;致敏小鼠骨髓移植组;致敏小鼠 MSC 联合骨髓细胞移植组;每组小鼠各 10 只。

1.5.3 生存分析 小鼠经照射预处理后,每日观察小鼠的生存状况,记录死亡时间,绘制生存

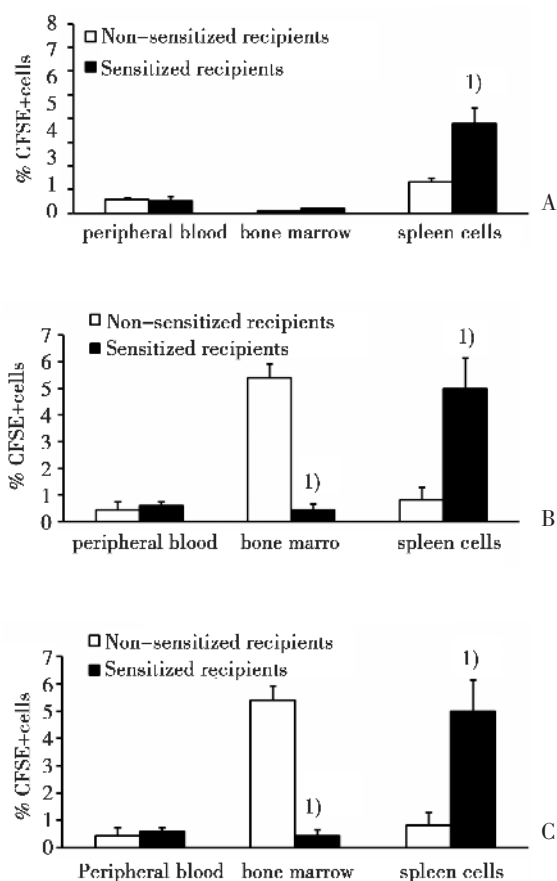


图1 MSC在各组小鼠体内归巢情况

Fig.1 Homing of MSC in recipients

1) $P < 0.05$ vs non-sensitized recipient group. A: 6 h post transplantation; B: 24 h post transplantation; C: 48 h post transplantation

曲线。

1.6 统计分析

采用 SPSS 16.0 统计软件, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 应用 t 检验或单因素方差分析; 绘制 Kaplan-Meier 生存曲线并进行 Log-rank 检验, 检验水准设 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MSC 的表型

将小鼠骨髓单个核细胞接种于培养瓶中, 24 h 后出现细胞贴壁。通过贴壁培养、换液, 骨髓 MSC 培养至第 4 代时出现典型的长梭形。取 P4 代 MSC 进行流式检测, 发现骨髓 MSC 不表达造血细

胞表面标记 CD34⁻、CD11b⁻, 而阳性表达 CD29⁺、Sca1⁺、CD44⁺、CD105⁺ 等表面分子。

2.2 MSC 在非致敏和致敏受者体内的归巢情况

正常非致敏或致敏 BALB/c 小鼠予 8 Gy ⁶⁰Co 照射预处理, 分别经尾静脉移植 1×10^6 同基因骨髓 MSC。移植前 MSC 予绿色荧光染料 CFSE 进行标记, 移植后第 6、24 及 48 小时分别取受者外周血、骨髓细胞及脾脏细胞进行流式检测。结果如图 1 所示。移植后第 6 小时, 骨髓 MSC 主要归巢于受者脾脏及外周血, 与非致敏组相比, MSC 在致敏受者脾脏的分布明显增多 ($P < 0.05$)。移植后第 24 小时, MSC 主要归巢于小鼠脾脏及骨髓, 同样, MSC 在致敏受者脾脏的分布比非致敏组的明显增多 ($P < 0.05$)。移植后第 48 小时, 在非致敏组中, MSC 主要归巢于受者骨髓, 而在致敏组中, MSC 主要归巢于脾脏。以上结果说明 MSC 在致敏受者与在非致敏受者体内归巢情况有明显差异。

2.3 MSC 在致敏受者造血干细胞移植的作用

BALB/c 小鼠经 8 Gy ⁶⁰Co 照射预处理, 结果发现单纯照射未移植组的小鼠在照射后 10 ~ 16 d 全部死亡, 说明预处理方案中 8 Gy ⁶⁰Co 照射是致死量的。非致敏受者经照射预处理后, 予 1×10^7 异基因供者骨髓细胞进行移植, 结果发现非致敏组小鼠在移植后第 28 天均能全部存活 (图 2), 说明 1×10^7 异基因供者骨髓细胞是足量的。然而致敏组小鼠经照射预处理, 再予 1×10^7 异基因供者骨髓细胞进行移植, 结果发现致敏组小鼠在移植后第 12 ~ 15 天全部死亡, 生存中位数是 13 d。另

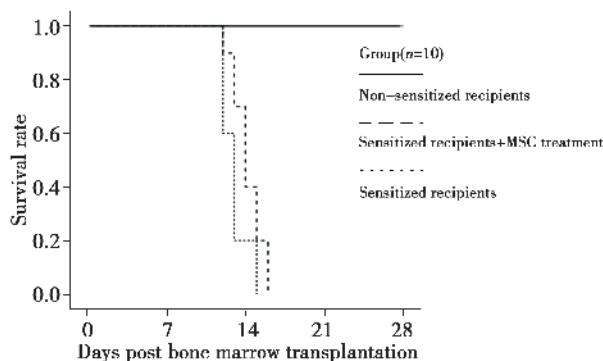


图2 各组小鼠的生存曲线

Fig.2 Survival cures of recipients post transplantation

取致敏小鼠经照射预处理,联合 1×10^6 同基因骨髓 MSC 与 1×10^7 异基因骨髓细胞进行移植,结果发现致敏小鼠在移植后第 12 ~ 16 天全部死亡,生存中位数时间是 14 d。经 Log-rank 检验,两组致敏小鼠的生存时间差异无统计学意义($P > 0.05$),说明联合 MSC 干预处理不能有效促进异基因造血干/祖细胞在致敏受者体内植入。

3 讨 论

一项大规模的临床前瞻性调查发现,致敏受者体内抗体与肾移植物的存活明显相关,致敏是影响实体器官移植失败的重要因素^[5]。如何促进造血干/祖细胞在致敏受者体内植入是目前全球亟待解决的问题。国外有学者在动物实验中发现,由抗体介导的体液免疫在造血干细胞移植排斥中占主要地位,而细胞免疫占次要地位^[6]。MSC 是一群有多向分化潜能的非造血细胞,并具有免疫调节及促进造血生成作用。研究已发现 MSC 在细胞免疫及体液免疫中发挥免疫抑制作用,提示应用 MSC 可能降低受者的致敏程度,并可能抑制致敏受者对异基因造血干细胞的免疫杀伤作用,有望成为治疗致敏受者移植排斥的新策略。

本实验体外分离 BALB/c 小鼠骨髓细胞,通过贴壁培养方法成功培养 MSC,并证实第 4 代骨髓 MSC 具强大的免疫抑制功能。我们应用异基因脾细胞输注方法建立的致敏 BALB/c 小鼠作为致敏模型,取正常 BALB/c 小鼠作为非致敏受者,荧光染料 CFSE 标记同基因骨髓 MSC 示踪其在移植受者体内归巢情况。结果发现移植后第 48 小时,在非致敏组中, MSC 主要归巢于受者骨髓,而在致敏组中, MSC 主要归巢于脾脏,说明 MSC 在受者体内归巢情况与移植受者体内微环境有关,具体的作用机制仍有待探讨。临床研究发现 MSC 能促进异基因造血干/祖细胞在移植受者体内植入,作用机制与 MSC 促进造血生成等有关。本实验拟研究 MSC 在致敏受者造血干细胞移植的作用,结果发现联合 MSC 与异基因骨髓细胞移植并不能挽救照射预处理的致敏小鼠,说明 MSC 并不能有效促进异基因造血干/祖细胞在致敏受者体

内植入。

MSC 对致敏受体造血干细胞移植作用的阴性结果可能有多方面影响因素,包括移植受者的致敏程度、MSC 输注时间、MSC 输注剂量和次数等。目前临床治疗高敏患者的措施有免疫抑制剂、单克隆抗体、免疫吸附、血浆置换等,已有研究证实联合应用以上措施能降低受者的致敏程度,促进移植物的植入,并降低移植排斥的发生率^[7]。国外有学者在致敏动物模型的移植实验中发现,增加预处理方案的强度,能有效清除致敏免疫细胞,但不能防止致敏受者体内抗体介导的移植排斥。他们研究还发现,应用免疫球蛋白、anti-CD19 及 anti-B220 单抗等均不能提高全不相合骨髓细胞在致敏模型的植入^[8]。有研究表明应用骨髓腔注射方法能减少造血干细胞在非造血组织的滞留作用并促进其植入^[9]。还有研究应用抗 CD154 单克隆抗体及 CTLA4 免疫球蛋白能阻断协同共刺激信号途径,并明显抑制细胞免疫及体液免疫^[10]。能否联合 MSC 输注和应用免疫抑制剂等途径治疗致敏受者值得进一步研究。

综上所述,我们成功培养小鼠骨髓 MSC,移植后 MSC 在致敏受者体内主要归巢于脾脏组织,本实验中联合应用 MSC 并不能有效促进异基因造血干/祖细胞在致敏受者体内植入。

参考文献:

- [1] Xu LH, Fang JP, Huang WG, et al. Marrow graft rejection by repeated transfusions of allogeneic donor spleen cells [J]. Bone Marrow Transplant, 2007, 40 (7): 691-698.
- [2] García-Gómez I, Elvira G, Zapata AG, et al. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications [J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(10):1453-1468.
- [3] 周敦华,黄科,吴燕峰,等.间充质干细胞及其培养上清与融冻产物对脐血 CD34+细胞扩增及分化的作用[J].中山大学学报:医学科学版,2010,31(1):39-44.
Zhou DH, Huang K, Wu YF, et al. Effects of Mesenchymal Stem Cells Feeder Layer, Culture Sera and Freeze-thaw Lysates on Expansion and Differentiation of Cord Blood CD34+ Cells in Vitro [J]. J

- SUN Yat-sen Univ; Med Sci, 2010, 31(1): 39-44.
- [4] Tolar J, Villeneuve P, Keating A. Mesenchymal stromal cells for graft-versus-host disease[J]. Hum Gene Ther, 2011, 22(3): 257-262.
- [5] Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival [J]. Am J Transplant, 2007, 7(2): 408-415.
- [6] Taylor PA, Ehrhardt MJ, Roforth MM, et al. Preformed antibody, not primed T cells, is the initial and major barrier to bone marrow engraftment in allosensitized recipients [J]. Blood, 2007, 109(3): 1307-1315.
- [7] Vo AA, Peng A, Toyoda M, et al. Use of intravenous immune globulin and rituximab for desensitization of highly HLA-sensitized patients awaiting kidney transplantation [J]. Transplantation, 2010, 89(9): 1095-1102.
- [8] Xu H, Chilton PM, Tanner MK, et al. Humoral immunity is the dominant barrier for allogeneic bone marrow engraftment in sensitized recipients [J]. Blood, 2006, 108(10): 3611-3619.
- [9] 蔡耘, 黄绍良, 陈凤英, 等. 同种异基因小鼠骨髓腔内脐血移植模型的建立及其对造血干细胞植入的影响 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(6): 644-650.
- [10] Cai Y, Huang SL, Chen FY, et al. Establishment of a murine model for allogeneic umbilical cord blood transplantation by intra-bone marrow injection and its effects on the engraftment of HSCs [J]. Sun Yat-sen Univ; Med Sci, 2005, 26(6): 644-650.
- [11] Gilson CR, Milas Z, Gangappa S, et al. Anti-CD40 monoclonal antibody synergizes with CTLA4-Ig in promoting long-term graft survival in murine models of transplantation [J]. J Immunol, 2009, 183(3): 1625-1635.

(编辑 张恩健)

本刊论文撤销声明

本刊2011年9月第32卷第5期第648-652页刊登的论文“增强型体外反搏治疗糖尿病视网膜膜病变的观察”因存在不实,应作者要求及单位同意,经研究决定撤销该文。

(本刊编辑部)