

脐带间充质干细胞对干燥综合征患者外周血的免疫调控研究*

王思博, 吴涛, 庞春艳, 王慧

(包头医学院第一附属医院, 内蒙古 包头 014010)

[摘要] 目的: 研究脐带间充质干细胞(UC-MSCs)对干燥综合征(SS)患者外周血的免疫调节作用。方法: 取新生儿脐带组织分离并培养UC-MSCs, 流式细胞术检测UC-MSCs的细胞表面标记; 选取20例疾病活动期的SS患者, 收集静脉血提取外周血单个核细胞(PBMC), 将SS患者的PBMC与UC-MSCs共培养, CCK-8法检测细胞存活率, 筛选最优共培养细胞比例进行后续实验; 流式细胞术检测共培养后SS患者PBMC中淋巴细胞亚群的变化情况。结果: UC-MSCs可降低SS患者PBMC中的外周血CD3⁺T细胞、CD3⁺CD8⁺T细胞以及CD19⁺B细胞的比例, 而CD16⁺CD56⁺NK细胞比例、CD3⁺CD4⁺T细胞比例、CD4⁺/CD8⁺无明显变化。结论: UC-MSCs可以调节SS患者的免疫功能, 从而对SS有一定的治疗作用。

[关键词] 干燥综合征; 脐带间充质干细胞; T淋巴细胞亚群; 免疫功能

DOI: 10.16833/j.cnki.jbmc.2024.02.005

Study on immune regulation of umbilical cord mesenchymal stem cells in peripheral blood of patients with Sjogren's syndrome

WANG Sibao, WU Tao, PANG Chunyan, WANG Hui

(The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014010, China)

ABSTRACT Objective: To study the immunoregulatory effect of umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) on peripheral blood of patients with Sjogren's syndrome (SS). **Methods:** UC-MSCs were isolated and cultured from umbilical cord tissue of newborns, and the cell surface markers of UC-MSCs were detected by flow cytometry. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from 20 SS patients in the active phase of the disease. Co-cultures of PBMCs from SS patients with UC-MSCs were established, and cell viability was assessed using the CCK-8 assay. The optimal ratio of co-cultured cells was determined for subsequent experiments. Flow cytometry was used to analyze the changes in lymphocyte subsets in SS patient PBMCs after co-culture. **Results:** UC-MSCs reduced the proportions of peripheral blood CD3⁺T cells, CD3⁺CD8⁺T cells, and CD19⁺B cells in PBMC of SS patients, while the proportions of CD16⁺CD56⁺NK cells, CD3⁺CD4⁺T cells, and CD4⁺/CD8⁺ ratio were not significantly affected. **Conclusion:** UC-MSCs can modulate the immune function of SS patients, thereby exerting a certain therapeutic effect on SS.

KEY WORDS Sjögren's Syndrome; Umbilical cord mesenchymal stem cell; T lymphocyte subsets; Immune function

干燥综合征(Sjögren's syndrome, SS)是一种自身免疫性的弥漫性结缔组织病。常见表现有泪腺和唾液腺受累、分泌物减少、组织淋巴细胞浸润、免疫系统异常等^[1]。临床的典型症状是干燥性角结膜炎和口干干燥症,发展严重后可累及多种脏器,甚至累及全身器官^[2]。目前SS的发病原因和作用机制仍不是十分清楚。有研究发现SS是免疫介导的炎性外分泌病,以外周血T细胞减少、B细胞过度增殖为特征^[3]。目前临床上针对脏器尚未受损的病患常辅以代替或对症治疗,而较为严重的患者如脏器已有损害的,可配合免疫调节治疗以减缓病情。总的来说,目前本病尚无具体根治手段。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)除在特定情况下具有自我更新特性和潜在分化能力外,也具备一定免疫调节的作用,被普遍认为是一种治疗各种免疫疾病的潜在药物^[4]。现已有实验证实骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stromal cells, BM-MSCs)可以用于治疗多种自身免疫性疾病,其中就包括BM-MSCs用于SS的治疗^[5-6]。而脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)具备来源丰富,且较容易获取和被大众接受的特点,将来可能成为BM-MSCs的替代物,用作自身免疫性疾病的治疗研究。但目前UC-MSCs在SS中是否发挥以及怎样发挥控制作用尚不完全清楚,故本研究将提取SS患者外周血的单核细胞与UC-MSCs进行共培养,观察其对SS治疗的作用和机制。

1 对象与方法

1.1 对象 经过初筛比对2018年1月至2018年12月内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院风湿免疫科就医患者的检查记录,选取20例疾病活动期的SS患者作为试验对象,试验对象满足:(1)对照美国风湿病学会/欧洲抗风湿病联盟(ACR/EULAR)^[7]联合发起的原发性干燥综合征分类新标准(2016版)合格。未见其他免疫系统疾病,且被诊断

为pSS的;(2)EULAR干燥综合征疾病活动指数(ESSDAI)评分>8分;(3)年龄在20~70岁;(4)能配合完成检测,临床资料记录完整有效。实验组研究对象排除标准如下:具有头颈部放射病史、PCR检测确诊丙肝病毒感染(活动性)的;患良性淋巴肉芽肿病和AIDS的;以及确诊GVHD、苔藓样和皮疹淀粉样变、IgG4相关性疾病的。征求待产妇及家属知情同意后,由包头医学院第一附属医院妇产科提供足月顺产或剖宫产的健康产妇新生儿脐带。无菌条件下取脐带15~20 cm。HBV、HCV、HIV及EB化验结果全部阴性。新生儿脐带离体后放置在50 mL的无菌PBS缓冲液中浸泡。

1.2 材料与试剂 DMEM/F12培养基、双抗、胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)、磷酸盐缓冲液(PBS)采购自Gibco公司(美国);人外周血淋巴细胞分离液购于灏洋华科生物科技有限责任公司(天津);CD11C-PE、CD34-PE、CD44-PE、CD45-FITC、CD90-FITC、CD105-FITC以及同型对照均购自BD公司(美国);CCK-8试剂盒购于碧云天生物技术有限公司(上海);6-color TBNK Reagent试剂盒购自BD公司(美国);PMA购自联科生物技术股份有限公司(杭州);流式细胞仪BD FACSCanto™ II型购自BD公司(美国);酶标仪购自雷杜公司(美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 UC-MSCs的分离与培养 在无菌环境下操作取出新生儿脐带组织,放置在超净台内用含有青链霉素的PBS缓冲液洗涤至无残血。剔除组织上脐动静脉,并剥离出凝胶状的华通氏胶,用组织剪将其分解成1 mm³的样块备用。将分解好的样块接种到DMEM/F12培养基(内含体积分数为10%胎牛血清和体积分数为1%双抗)的培养皿中,37℃的孵箱(体积分数5% CO₂)中培育,培养液3~4 d置换1次。细胞培育至80%~90%,胰蛋白酶消化传代培养,取第2代UC-MSCs进行后续实验。

1.3.2 流式细胞术鉴定 UC-MSCs 将培养获得

的第2代 UC - MSCs 消化制备成单细胞悬液,取鼠抗人 CD11C、CD34、CD44、CD45、CD90、CD105 单克隆抗体各 5 μ L 加入细胞悬液。室温避光孵育 0.5 h。PBS 洗涤并重悬,之后上流式细胞仪检测 UC - MSCs 表面蛋白表达。

1.3.3 密度梯度离心法提取 SS 患者的 PBMCs 取全血和 PBS 各 2 mL 等体积混匀缓慢加入到淋巴细胞分离液上层,淋巴细胞分离液与被分离液体积为 1:2,2 000 r/min 离心 20 min,用吸管取出离心后位于中间的白膜层,加入 PBS 吹打至完全混合;1 500 r/min 离心 7 min,倒掉上层液体,加入 PBS 重复吹打至完全混匀;1 500 r/min 离心 7 min,弃去上清液,细胞沉淀备用。

1.3.4 CCK - 8 筛选 UC - MSCs 与 PBMC 共培养的最佳比值 取 2 代 UC - MSCs,消化计数接种 96 孔板,待细胞完全贴壁后弃上清,加入 PBMC,UC - MSCs 与 PBMC 的比例分别为 $10^5:10^3$ 、 $10^4:10^3$ 、 $10^3:10^2$ 、 $10^2:10^2$ 、 $10^1:10^2$ 、 $10^2:10^3$ 、 $10^3:10^4$ 、 $10^3:10^5$,分别加入终浓度为(1 μ M)的刺激因子 PMA,共培养 24 h 后,每孔加入 10 μ L CCK - 8 试剂,37 $^{\circ}$ C 恒温下孵育 2 h,450 nm 处后测量吸光度(A)值,计算出细胞存活率,公式如下:存活率 = (实验组 A 值 - 空白孔 A 值)/(对照组 A 值 - 空白孔 A 值) \times 100%。每组 5 个复孔。

1.3.5 UC - MSCs 与 PBMCs 共培养及淋巴细胞亚群的检测 UC - MSCs 与 PBMC 两者的细胞浓度比为 $10^3:10^2$,接种 6 孔板。实验分为 2 组:PBMC + 刺激因子 PMA 组(P + P)、PBMC + UC - MSCs + PMA 组(P + P + M),共培养 24 h、48 h,流式细胞术检测 CD3⁺、CD3⁺ CD4⁺、CD3⁺ CD8⁺、CD19⁺、CD16⁺ CD56⁺ 淋巴细胞亚群的比例。

1.4 统计学分析 采用 GraphPad prism 8.0 版软件对所有数据进行统计学分析并作图。本研究中测量指标数据资料经 W 检验呈正态分布,计量数据用($\bar{x} \pm s$)描述,结果均以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。UC - MSCs 细胞存活率数据和淋巴细胞亚群数据的组间比较均采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 UC - MSCs 的形态以及 UC - MSCs 表面标志物的表达

2.1.1 UC - MSCs 的形态 贴壁培育法培养初代组织,细胞呈梭形或三角形,分散于整个培养皿中,平铺生长。间充质干细胞在经过 2 代培养后,细胞为长梭形,整体为旋涡状,显微镜下观察细胞纯净均一,数量丰富。见图 1。

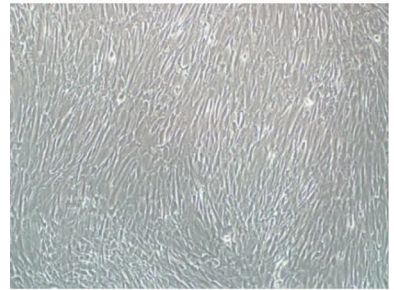


图 1 UC - MSCs 生物显微镜下细胞形态学观察

2.1.2 UC - MSCs 表面标志物的表达 标志物 CD105 表达率 96.90%、CD90 表达率 99.80%、CD44 表达率为 91.30%;阴性标志物 CD34、CD45 及 CD11C 的表达率为 0.10%、0.10%、0.00%。见图 2。

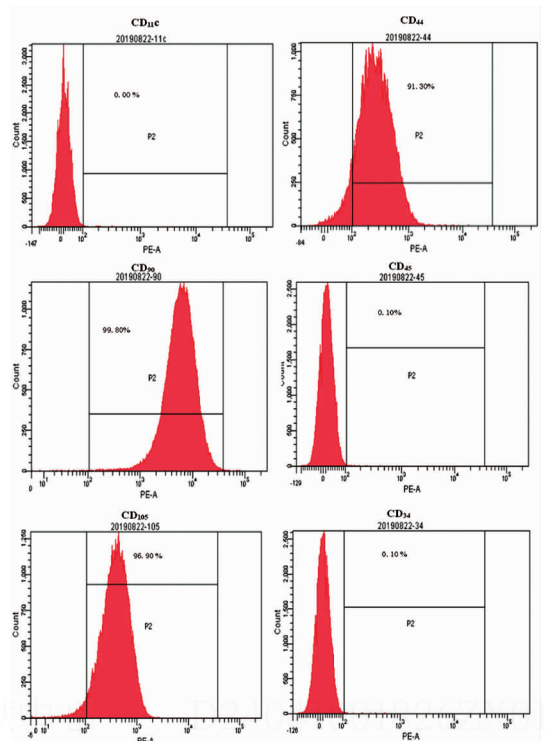


图 2 UC - MSCs 流式细胞仪检测细胞表型结果

2.2 CCK-8 法检测 UC-MSCs 与 PBMC 共培养后, PBMC 的增殖情况 UC-MSCs: PBMC 按比例 为 $10^5:10^3$ 、 $10^4:10^3$ 、 $10^3:10^2$ 、 $10^2:10^2$ 、 $10^1:10^2$ 、 $10^2:10^3$ 、 $10^3:10^4$ 、 $10^3:10^5$ 分别共培养 24 h 后, 细胞存活率分别为 32.50%、39.59%、68.30%、24.84%、15.67%、24.26%、23.99%、68.30%。与 $10^3:10^5$ 比较, $10^3:10^2$ 细胞存活率最高, 用作后续实验培养, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 3。

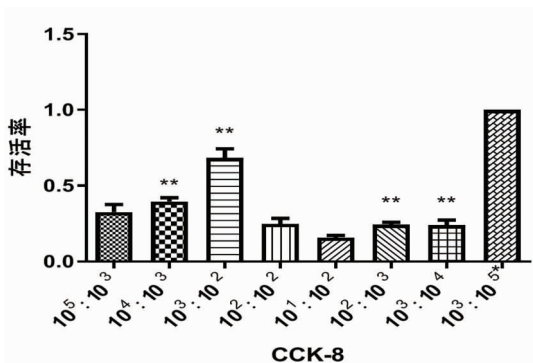


图3 CCK-8 法筛选 UC-MSCs 生长的最适浓度

注:与对照组 ($10^3:10^5$ 比例) 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 流式细胞术检测 UC-MSCs 和 PBMCs 共培养后淋巴细胞亚群的变化 记录流式细胞术检测 UC-MSCs 和 PBMCs 共培养后淋巴细胞亚群比例。CD3⁺T 细胞、CD3⁺CD8⁺T 细胞、CD19⁺B 细胞的比例减少 ($P < 0.05$), CD16⁺CD56⁺NK 细胞的比例、CD3⁺CD4⁺T 细胞的比例、CD4⁺/CD8⁺ 无明显变化 ($P > 0.05$)。见图 4。

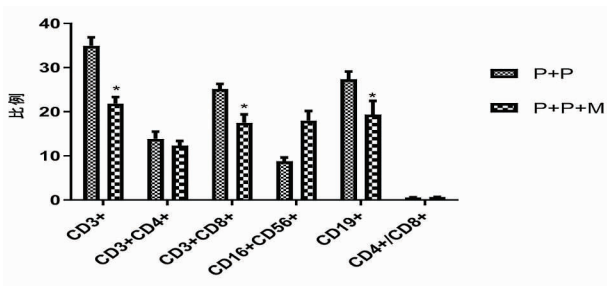


图4 流式细胞仪检测 UC-MSCs 和 PBMCs 共培养后淋巴细胞的亚群变化

注:两组中的第一个 P 代表 PBMCs, 第二个 P 代表 PMA (佛波酯), M 代表 UC-MSCs; P+P 为对照组, P+P+M 为实验组;与对照组相比, * $P < 0.05$

3 讨论

目前 SS 的发病机制尚不完全明确,近年来多项

研究表明 SS 的发病与 T 细胞亚群相关。在 SS 患者的唾液腺中有大量 CD4⁺T 和 B 细胞浸润,早期大部分为 CD4⁺T 细胞,而 B 细胞的积累发生在疾病后期^[8]。活化的 T 细胞通过产生促炎细胞因子和诱导 B 细胞活化介导了疾病的发生发展^[9]。有研究显示,与健康人相比,SS 患者 CD8⁺T 细胞比例升高,CD3⁺T 细胞和 CD4⁺T 细胞比例降低^[10]。本实验将 SS 患者外周血 T 细胞与 UC-MSCs 共培养后,患者外周血杀伤性 T 淋巴细胞和抑制性 T 细胞百分比降低,而辅助性 T 细胞变化无意义。杀伤性 T 细胞和抑制性 T 细胞可积极参与到调节 SS 患者的自身免疫过程中,能够改变 SS 患者唾液腺组织病理的表达^[11]。我们的研究发现 UC-MSCs 细胞对 SS 患者免疫 T 细胞的作用体现于 UC-MSCs 能够抑制 T 细胞的表达,本实验结果补充证实了 UC-MSCs 通过调节 T 细胞的百分比,或可发挥缓解 SS 患者疾病进展的作用。

SS 患者存在的 B 淋巴细胞过度活化情况,可作为诊断疾病的特殊标志^[12]。B 细胞表面抗原标记物表达量和表型产生改变,导致其作用能力发生偏移,从而引起免疫异常反应^[13]。本实验还观察到经过共培养处理的 SS 患者外周血 CD19⁺表达量回归正常,这表明 UC-MSCs 可以抑制 SS 患者外周 B 细胞功能。后续研究可继续深入探究 UC-MSCs 对其它表型 B 细胞的激励反馈过程。

虽然 MSCs 的免疫抑制能力已在几种自身免疫性疾病中得到证实,如 RA、SLE 和 EAE^[14-15],但距离真正将 UC-MSCs 的免疫调节能力应用在临床上还有很长的路要走。本研究结果证实了人体 UC-MSCs 可抑制 SS 患者外周血杀伤性 T 淋巴细胞和抑制性 T 淋巴细胞,并降低 CD19⁺表达量,可在强化治疗中起到应用。但是 UC-MSCs 在体外对 SS 患者的具体作用机制还不明确,也没有得到动物实验验证,UC-MSCs 对不同表型的 T 细胞产生的抑制能力差异仍不清楚。这些疑问将在后续研究中进一步分析。

(下转第 48 页)

- sis[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 242(2):496 – 503.
- [13] Zhang W, Zhang XA. Prognostic value of serum lipoprotein(a) levels in patients with acute ischemic stroke [J]. *Neuroreport*, 2014, 25(4):262 – 266.
- [14] 高爽. 脂蛋白(a)在评估急性冠状动脉综合征患者冠状动脉狭窄严重程度及经皮冠状动脉介入治疗后远期预后中的价值[D]. 济宁:济宁医学院, 2022.
- [15] Chen Z, He Y, Su Y, et al. Association of inflammatory and platelet volume markers with clinical outcome in patients with anterior circulation ischaemic stroke after endovascular thrombectomy[J]. *Neurol Res*, 2021, 43(6):503 – 510.
- [16] Tsimikas S, Witztum JL. The role of oxidized phospholipids in mediating lipoprotein(a) atherogenicity[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2008, 19(4):369 – 377.
- [17] Enas EA, Varkey B, Dharmarajan TS, et al. Lipoprotein(a): An independent, genetic, and causal factor for cardiovascular disease and acute myocardial infarction [J]. *Indian Heart J*, 2019, 71(2):99 – 112.
- [18] Ugovsek S, Sebestjen M. Lipoprotein(a) – the crossroads of atherosclerosis, atherothrombosis and inflammation[J]. *Biomolecules*, 2021, 12(1).
- [19] Lin J, Guan M, Liao Y, et al. An old thrombus may potentially identify patients at higher risk of poor outcome in anterior circulation stroke undergoing thrombectomy [J]. *Neuroradiology*, 2023, 65(2):381 – 390.
- [20] Dong S, Yu C, Wu Q, et al. Predictors of symptomatic intracranial hemorrhage after endovascular thrombectomy in acute ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2022, 0(0):1 – 13.

(收稿日期:2023-07-14)

(上接第31页)

参考文献

- [1] Tian Y, Yang HY, Liu N. Advances in pathogenesis of Sjögren's syndrome [J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 5928232.
- [2] Shen L, He J, Kramer JM, et al. Sjögren's syndrome: animal models, etiology, pathogenesis, clinical subtypes, and diagnosis [J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 8101503.
- [3] Goules AV, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG. Insight into pathogenesis of Sjögren's syndrome: Dissection on autoimmune infiltrates and epithelial cells [J]. *Clin Immunol*, 2017, 182:30 – 40.
- [4] Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(13): 2345 – 2360.
- [5] Ben-Ami E, Berrih-Aknin S, Miller A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2011, 10(7): 410 – 415.
- [6] Xu J, Wang D, Liu D, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjögren's syndrome [J]. *Blood*, 2012, 120(15): 3142 – 3151.
- [7] Fiona André, Barbara C Böckle. Sjögren's syndrome [J]. *J Immunol Res*, 2022, 20(7): 980 – 1002.
- [8] Verstappen Gwenny M, Kroese Frans GM, Bootsma Hendrika. T cells in primary Sjögren's syndrome: targets for early intervention [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2019, 60:3088 – 3098.
- [9] Yoko Ogawa, Tsutomu Takeuchi, Kazuo Tsubota. Autoimmune epithelitis and chronic inflammation in sjögren's syndrome – related dry eye disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11820.
- [10] 李学平. 干燥综合征患者外周血 T 淋巴细胞亚群及 Th 类细胞因子表达的变化观察 [J]. *中国医学创新*, 2021, 18(16): 117 – 120.
- [11] Liu Y, Li C, Wang S, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells confer potent immunosuppressive effects in Sjögren's syndrome by inducing regulatory T cells [J]. *Mod Rheumatol*, 2021, 31(1): 186 – 196.
- [12] Rivière E, Pascaud J, Tchitchek N, et al. Salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome induce B – lymphocyte survival and activation [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(11): 1468 – 1477.
- [13] Du WH, Han M, Zhu XX. The Multiple roles of B cells in the pathogenesis of Sjögren's syndrome [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 684999.
- [14] El-jawhari JJ, El-sherbiny YM, Jones EA, et al. Mesenchymal stem cells, autoimmunity and rheumatoid arthritis [J]. *Qjm*, 2014, 107(7): 505 – 514.
- [15] Fayhollahi A, Gabalou NB, Aslani S. Mesenchymal stem cell transplantation in systemic lupus erythematosus, a mesenchymal stem cell disorder [J]. *Lupus*, 2018, 27(7): 1053 – 1064.

(收稿日期:2023-06-09)