

冻存前后人脐带间充质干细胞对 T 和 B 淋巴细胞免疫抑制能力的差异比较

曾伟杰¹ 廖延² 胡越² 胡隽源² 曾桂芳² 傅泽钦² 伍世铨² 梁晓^{1,2} 谢长峰²
刘沐芸^{1,2}

【摘要】 目的 探讨冻存前和复苏后人脐带间充质干细胞(hUCMSCs)对 T 和 B 淋巴细胞免疫抑制能力的差异。方法 分离健康人外周血单个核细胞,使用 Anti-CD3 和 Anti-CD28 单克隆抗体体外激活 T 淋巴细胞,使用 ODN2395, hCD40L, 羊抗人 IgM 抗体和白介素 2 体外刺激经过分选的 B 淋巴细胞,通过冻存前后 hUCMSCs 进行干预处理,与活化后的 T 和 B 淋巴细胞进行共培养,分为单独刺激组(激活后的 T 或 B 淋巴细胞单独培养)与 hUCMSCs 共培养组(激活后的 T 或 B 淋巴细胞分别与 hUCMSCs 共培养),分析 hUCMSCs 对激活的 T 和 B 淋巴细胞的免疫抑制作用,探究冻存前后 hUCMSCs 免疫调节作用的差异。两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用重复测量设计方差分析。结果 与冻存前 hUCMSCs 对比,冻存后 hUCMSCs 在抑制 CD3⁺T 细胞 (37.60 % ± 0.54 % 比 39.40 % ± 1.57 %), CD4⁺T 细胞 (36.87 % ± 0.54 % 比 38.63 % ± 1.39 %) 和 CD8⁺T 细胞增殖能力 (40.37 % ± 1.14 % 比 42.47 % ± 1.90 %) 比较,差异无统计学意义 (*P* 均 > 0.05); 在促进 CD3⁺T (18.07 % ± 0.66 % 比 16.77 % ± 1.15 %), CD4⁺T (26.47 % ± 1.13 % 比 24.60 % ± 1.47 %) 和 CD8⁺T 细胞凋亡能力 (3.52 % ± 0.22 % 比 2.72 % ± 0.06 %), 差异无统计学意义 (*P* 均 > 0.05); 增加 Treg 细胞群比例能力 (5.51 % ± 0.71 % 比 6.87 % ± 0.27 %), 差异无统计学意义 (*P* > 0.05); 降低 Th1 亚群 (0.47 % ± 0.09 % 比 0.33 % ± 0.04 %) 和 Th17 亚群比例能力 (0.21 % ± 0.04 % 比 0.22 % ± 0.03 %), 差异无统计学意义 (*P* 均 > 0.05); 在对 B 淋巴细胞增殖能力 (38.83 % ± 0.25 % 比 34.23 % ± 4.12 %), 促进 B 淋巴细胞的凋亡能力 (54.95 % ± 1.45 % 比 55.10 % ± 3.80 %), 减少 IgA [(1045.09 ± 99.24) ng/mL 比 (1014.31 ± 102.55) ng/mL] 和 IgG 抗体的分泌能力 [(120.51 ± 4.94) ng/mL 比 (127.77 ± 7.94) ng/mL], 差异无统计学意义 (*P* 均 > 0.05)。而在降低 Th2 细胞亚群比例 (0.73 % ± 0.07 % 比 0.49 % ± 0.06 %) 和降低 IgM 抗体分泌 [(739.70 ± 28.39) ng/mL 比 (560.21 ± 3.81) ng/mL] 的能力上,冻存前 hUCMSCs 的作用能力弱于复苏后 hUCMSCs, 差异具有统计学意义 (*P* 均 < 0.05)。结论 冻存后 hUCMSCs 在降低 Th2 细胞亚群比例和降低 IgM 抗体分泌的能力上强于冻存前 hUCMSCs, 但整体的免疫调节能力相当,因此冻存前后的 hUCMSCs 均具有很高的临床应用价值。

【关键词】 人脐带间充质干细胞; T 淋巴细胞; B 淋巴细胞; 免疫调节

Comparison of immunosuppressive ability of human umbilical cord mesenchymal stem cells against T and B lymphocytes before and after cryopreservation Zeng Weijie¹, Liao Yan², Hu Yue², Hu Juanyuan², Zeng Guifang², Fu Zeqin², Wu Shiduo², Liang Xiao^{1,2}, Xie Changfeng¹, Liu Muyun^{1,2}.

¹Department of National-local Associated Engineering Laboratory for Personalized Cellular Therapy, Shenzhen 518000, China; ²Shenzhen Beike Biotechnology Company Limited, Shenzhen 518000, China

Corresponding author: Liu Muyun, Email: muyun@nlpct.com

【Abstract】 Objective To explore the immunosuppressive ability of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) on T and B lymphocytes before and after cryopreservation

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2021.04.002

基金项目:“科技助力经济 2020”重点专项《间充质干细胞治疗新型冠状病毒肺炎的药物研发》深圳市北科生物科技有限公司

作者单位: 518000 深圳, 个性化细胞治疗技术国家地方联合工程实验室(深圳)¹; 518000 深圳, 深圳市北科生物科技有限公司²

通信作者: 刘沐芸, Email: muyun@nlpct.com

and provide future for using the clinical application of hUCMSCs. **Methods** Human peripheral blood mononuclear cells were isolated from healthy human peripheral blood. Anti-CD3 and anti-CD8 monoclonal antibodies were used to activate T lymphocytes *in vitro*. Selected B lymphocytes were stimulated by ODN2395, human CD40 ligand, goat anti-human IgM antibodies and interleukin 2 *in vitro*. The cells were co-cultured with activated T and B lymphocytes, divided into a single stimulation group and hUCMSCs co-culture group (before and after cryopreservation). The immunosuppressive ability of hUCMSCs on activated T and B lymphocytes were analyzed. In addition, the differences immunosuppressive ability of hUCMSCs before and after cryopreservation were also studied. The differences between groups were compared by *t*-test, and the differences among groups were compared by repeated measures design analysis of variance. **Results** Compared with hUCMSCs before cytopreservation, the proliferation of CD3⁺T cells (37.60% ± 0.54% vs 39.40% ± 1.57%), CD4⁺T cells (36.87% ± 0.54% vs 38.63% ± 1.39%) and CD8⁺T cells (40.37% ± 1.14% vs 42.47% ± 1.90%) ($P > 0.05$) were not significantly inhibited after cryopreservation. The apoptosis of CD3⁺T cells (18.07% ± 0.66% vs 16.77% ± 1.15%), CD4⁺T cells (26.47% ± 1.13% vs 24.60% ± 1.47%) and CD8⁺T cells (3.52% ± 0.22% vs 2.72% ± 0.06%) had no significant difference ($P > 0.05$). The proportion of regulatory cells (Treg) subsets (5.51% ± 0.71% vs 6.87% ± 0.27%) had also no significant difference ($P > 0.05$). hUCMSCs did not reduce the proportion of helper T cell (Th) subsets, especially the proportion of Th1 subsets (0.47% ± 0.09% vs 0.33% ± 0.04%) and Th17 subsets (0.21% ± 0.04% vs 0.22% ± 0.03%) ($P > 0.05$). For B lymphocytes, hUCMSCs reduced the proportion of Th2 cell subsets (0.73% ± 0.07% vs 0.49% ± 0.06%) and IgM antibody secretion [(739.70 ± 28.39) ng/mL vs (560.21 ± 3.81) ng/mL] after cryopreservation ($P < 0.05$). There was no significant difference in proliferation and apoptosis of B lymphocytes, and reduced secretion of IgA and IgG antibodies before and after hUCMSCs cytopreservation ($P > 0.05$). **Conclusion** After cryopreservation, hUCMSCs were more powerful than those before cryopreservation in reducing the proportion of Th2 cell subsets and the secretion of IgM antibodies. However, the immunosuppressive abilities was same. Both hUCMSCs before and after cryopreservation have high clinical application value.

【Key words】 Human Umbilical cord mesenchymal stem cells; T lymphocytes; B lymphocytes; Immunoregulation

间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 是再生医学领域研究的热点对象,因其具有自我更新和多向分化能力,具有很好的临床应用价值^[1]。人脐带来源间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs) 来源广泛,易获取,在许多疾病治疗中展现出很好的应用前景,例如在多发性硬化症、心力衰竭和骨关节炎等疾病^[2-4]。hUCMSCs 分离自脐带华通氏胶,来源明确,易于采集、分离和制备,同时 hUCMSCs 表达中等水平的主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) I 类分子,低表达 MHC II 类分子,因此 hUCMSCs 具有很低的免疫原性,能够进行同种异体的干细胞移植,临床上表现出很高的安全性^[5]。hUCMSCs 不仅具有干细胞的自我再生和多向分化能力,还具有很强的免疫调节能力,能分泌多种细胞因子,例如白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-10、转化生长因子 (transforming growth factor, TGF) 和前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 等^[6], 因此, hUCMSCs 也尝试对许多疾病进行治疗,如系

统性红斑狼疮^[7] 和风湿性关节炎^[8] 等。

由于 hUCMSCs 的分离和制备目前还未有标准的操作规程,组织的分离方式、细胞培养的工艺、培养基的使用和细胞的冻存复苏等因素都可能影响 hUCMSCs 的生物学功能。虽然一些报道已经证实冻存不影响 hUCMSCs 成脂、成骨和成软骨等的能力^[9]。而对 hUCMSCs 进行冻存后应用,可以灵活 hUCMSCs 在临床中的使用。

hUCMSCs 在临床应用前往往需要在实验室进行细胞的制备和大量扩增,并进行液氮冻存后转运到医院进行细胞输注,冻存操作是否对 MSCs 的免疫调节能力产生影响,即冻存前后的 hUCMSCs 其免疫调节能力是否发生变化,是决定其输注患者体内后,能否继续发挥作用的关键因素。因此,为了明确冻存前后 hUCMSCs 免疫调节能力是否存在差异,本文中利用新鲜制备的并连续传代至 3 代 (passage 3, P3) 的 hUCMSCs, 以及经过冻存复苏后 P3 代,并利用刺激剂体外激活正常人外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),

以激活外周血中 T 和 B 淋巴细胞,通过冻存前后的 hUCMSCs 和 T 或 B 淋巴细胞共培养,检测冻存前后 hUCMSC 对 T 和 B 淋巴细胞增殖、活力、亚群和分泌抗体的变化,了解冻存对 hUCMSCs 免疫调节能力的影响,为冻存前后的 hUCMSCs 在临床应用中提供理论基础。

材料与amp;方法

一、材料

1. 健康人外周血: 采集 3 份健康人外周血,采集前获得 3 名捐赠者的知情和同意,并签订知情同意书,详细询问捐赠者的病史及遗传病史,捐赠年龄不低于 18 周岁,不高于 40 周岁,性别不限;无传染性疾病、血液系统疾病和肿瘤相关疾病等;对采集的外周血进行人类免疫缺陷病毒、梅毒、乙肝表面抗原及丙型肝炎病毒检测;凡是不符合以上条件的捐赠者外周血均不予以采集。

2. hUCMSCs: hUCMSCs 由深圳市北科生物科技有限公司区域细胞制备中心提供,从 P0 代开始培养,培养传代至 P3,将 P3 代细胞消化后,一部分用于后续的体外细胞学实验,另一部分进行细胞 -196 °C 深低温冻存,然后复苏后进行后续体外细胞学实验。

3. 主要仪器和试剂: 离心机(日本 Kubota 久保田公司);全血分析仪(上海希森美康医用电子有限公司);Aria II 流式细胞仪(美国 BD 公司);人外周血淋巴细胞分离液(天津灏洋生物科技有限公司);MSC 完全培养基(深圳市北科生物科技有限公司);CellTace CFSE, Anti-CD3 单克隆抗体;Anti-CD28 单克隆抗体,白细胞介素 2(北京同立海源生物科技有限公司);7-AAD 和人 Th1/Th2/Th17 表型检测试剂盒(美国 BD 公司);人 B 淋巴细胞分选试剂盒(德国美天旎生物科技有限公司);Class C CpG ODN2395(法国 Invivo Gen 公司);hCD40L(上海 Biologend 生物科技有限公司);羊抗人 IgM 抗体(美国 R&D Systems 公司);EdU 细胞增殖检测试剂(美国 Thermo Fisher 公司)。

二、方法

1. hUCMSCs 培养: 取新鲜制备的 P3 代和冻存复苏后 P3 代 hUCMSCs 重悬于 MSC 完全培养基,以 1.3×10^5 个 /mL 接种于 24 孔培养皿,于 37 °C、5 % CO₂ 培养箱中培养。

2. 分离 PBMCs: 人外周血淋巴细胞分离液分别分离 3 份健康人外周血 PBMCs,根据人外周血淋巴

细胞分离液说明书进行操作,RPMI-1640 完全培养基调整 PBMCs 细胞密度约为 4×10^6 个 /mL。

3. 实验分组: 共 3 份 PBMCs 样本,将分离的 3 人份 PBMCs 样本均分成 3 组,每个捐赠者的 PBMCs 均分为: PBMCs 接受细胞因子刺激的单独刺激组, PBMCs 接受细胞因子刺激后与 P3 代 hUCMSCs 共培养的 hUCMSCs 共培养组(P3),以及 PBMCs 接受细胞因子刺激后与冻存后 P3 代 hUCMSCs 共培养的 hUCMSCs 共培养组(冻存后 P3)。均进行后续的实验。

4. 检测 T 淋巴细胞增殖: PBMCs 与终浓度 5 μmol/L Cell TraceCFSE 于 37 °C 避光孵育 10 min 染色,接种于 24 孔板中,0.5 mL/孔,为单独刺激组。MSC 经培养贴壁后取已染色 PBMCs 加入到 MSCs 孔中,0.5 mL/孔,为 hUCMSCs 共培养组。单独刺激组和 hUCMSCs 共培养组每孔加入终浓度 1 μg/mL Anti-CD3 和 1 μg/mL Anti-CD28 单克隆抗体进行 T 细胞刺激。37 °C、5 % CO₂ 培养箱中避光培养 4 d。流式分析 T 细胞亚群 CFSE 荧光分布,计算 T 细胞扩增百分比。实验重复 3 次,每组 3 个复孔。

5. 检测 T 淋巴细胞凋亡和 Treg 亚群: 接种 hUCMSCs 于 24 孔板,贴壁 6 h 后分离外周血 PBMCs 接种于 24 孔板,分单独刺激组和 hUCMSCs 共培养组,刺激组和 hUCMSCs 共培养组每孔加入终浓度 1 μg/mL Anti-CD3 和 1 μg/mL Anti-CD28 单克隆抗体进行 T 细胞刺激。37 °C、5 % CO₂ 培养箱中培养 3 d。收集各孔 PBMCs,流式分析 T 细胞及其 CD3⁺ 和 CD4⁺ 细胞亚群 7-AAD 阳性率,检测 CD4⁺T 细胞亚群中的 CD25⁺Foxp3⁺ 双阳细胞的百分比。实验进行 3 份 PBMCs 样本的重复,每组 3 个复孔。

6. 检测 Th 亚群: 细胞接种和分组方式根据上述所述,培养 2 d 后,单独刺激组和 hUCMSCs 共培养组均加入 1 μg/mL Ionomycin, 50 ng/mL PMA 和 0.67 μL Golgistop 活化 Th 细胞,作用 6 h。收集每孔 PBMCs,按照 BD 公司的人 Th1/Th2/Th17 表型检测试剂盒的说明方法进行流式检测。实验进行 3 份 PBMCs 样本的重复,每组 3 个复孔。

7. 检测 B 淋巴细胞的增殖: 根据利用美天旎人 B 淋巴细胞磁珠分选试剂盒说明书进行 B 淋巴细胞分选,收集 B 淋巴细胞,以 RPMI-1640 完全培养基重悬细胞,细胞密度约为 3.2×10^6 个 /mL,接种于 24 孔板,为单独刺激组。hUCMSCs 贴壁 6 h 后,弃上清,另取分选的 B 淋巴细胞加入 MSC 培养孔中,为 hUCMSCs 共培养组。单独刺激组

和 hUCMSCs 共培养组每孔加入终浓度 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ODN2395, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hCD40L, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 羊抗人 IgM 抗体和 50 U/mL 人重组 IL-2 对 B 淋巴细胞进行刺激, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 2 d。每孔加入终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ EdU 进行细胞 DNA 标记, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中再培养 1 d。收集培养上清的细胞, 流式检测 APC 标记的增殖信号。实验进行 3 份 PBMCs 样本的重复, 每组 3 个复孔。

8. 检测 B 淋巴细胞凋亡和抗体分泌: 以上述方式接种 hUCMSCs 和分选活化后的 B 淋巴细胞, 分为单独刺激组和 hUCMSCs 共培养组, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 3 d, 收集培养上清的细胞, 以 CD19-FITC 标记 B 细胞, 7-AAD 分别标记凋亡细胞。另接种同样的两组共培养细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 7 d, 轻轻吹打培养基, 收集细胞悬液, 离心后收集上清液, CBA 试剂盒检测上清中 IgG、IgM 和 IgA 的浓度。实验进行 3 份 PBMCs 样本的重复, 每组 3 个复孔。

三、统计学分析方法

采用 Graphpad prism 7.0 软件进行统计学分析。冻存前后 hUCMSCs 对 T 细胞亚群的增殖和凋亡能力、Treg 细胞亚群增殖能力、辅助性 T 细胞亚群抑制能力、B 细胞增殖、凋亡和抗体分泌能力等数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 因每个受试者的 PBMCs 样本均分成 3 份, 分别接受 3 种不同的处理, 分组中构成特殊的重复测量因素, 故多组间比较采用重复测量设计方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、冻存前后 P3 代 hUCMSCs 对 T 细胞亚群增殖的影响

与单独刺激组比较, 冻存前和冻存后 P3 代 hUCMSCs 共培养组 $\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}4^+$ 和 $\text{CD}8^+$ 的 T 细胞增殖能力均降低 ($P < 0.05$); 但冻存前后 hUCMSCs 抑制 $\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}8^+$ 和 $\text{CD}4^+$ 的 T 细胞增殖能力比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。(表 1)

二、冻存前后 P3 代 hUCMSCs 对 T 细胞亚群凋亡的影响

与单独刺激组比较, 冻存前 P3 代 hUCMSCs 组 $\text{CD}3^+$ 和 $\text{CD}4^+$ T 淋巴细胞的凋亡率均升高 (P 均 < 0.05); 冻存后 P3 代 hUCMSCs 组 $\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}4^+$ T 和 $\text{CD}8^+$ T 淋巴细胞凋亡率均升高 (P 均 < 0.05); 但冻存前后 hUCMSCs 组 $\text{CD}3^+$ T、 $\text{CD}4^+$ T 和 $\text{CD}8^+$ T 淋巴细胞凋亡率比较, 差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。(表 2)

三、冻存前后 P3 代 hUCMSCs 对 Treg 细胞亚群的影响

与单独刺激组比较, 冻存前 P3 代 hUCMSCs 共培养组对 Treg 细胞亚群的影响比例 [(4.68 \pm 0.41)% 比 (5.51 \pm 0.71)%] 之间比较差异无统计学意义 ($t = 1.539$, $P = 0.553$); 而冻存后 P3 代 hUCMSCs 共培养组 Treg 细胞亚群的比例 [(4.68 \pm 0.41)% 比 (6.87 \pm 0.27)%] 升高, 差异具有统计学意义 ($t = 4.575$, $P = 0.018$); 但两组 hUCMSCs 共培养组之间比较, 差异无统计学意义 ($t = 2.553$, $P = 0.153$)。

表 1 冻存前后 P3 代 hUCMSCs 与 PBMC 共培养对 T 细胞亚群增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, %)

分组	实验次数	$\text{CD}3^+$	$\text{CD}4^+$	$\text{CD}8^+$
单独刺激	3	80.00 \pm 1.58	79.63 \pm 1.51	81.55 \pm 1.30
hUCMSCs 共培养(P3)	3	37.60 \pm 0.54 ^a	36.87 \pm 0.54 ^a	40.37 \pm 1.14 ^a
hUCMSCs 共培养(冻存后 P3)	3	39.40 \pm 1.57 ^a	38.63 \pm 1.39 ^a	42.47 \pm 1.90 ^a
F 值		1002.000	1168.000	877.700
P 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: 与单独刺激组比较, ^a $P < 0.05$

表 2 冻存前后 P3 代 hUCMSCs 与 PBMC 共培养对 T 细胞亚群凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, %)

分组	实验次数	$\text{CD}3^+$	$\text{CD}4^+$	$\text{CD}8^+$
单独刺激	3	8.25 \pm 0.96	14.05 \pm 1.31	4.03 \pm 0.72
hUCMSCs 共培养(P3)	3	18.07 \pm 0.66 ^a	26.47 \pm 1.13 ^a	3.52 \pm 0.22
hUCMSCs 共培养(冻存后 P3)	3	16.77 \pm 1.15 ^a	24.60 \pm 1.47 ^a	2.72 \pm 0.06 ^a
F 值		106.700	87.550	4.735
P 值		< 0.001	< 0.001	0.039

注: 与单独刺激组比较, ^a $P < 0.05$

四、冻存前后 P3 代 hUCMSCs 共培养对 T 细胞亚群 Th1、Th2 和 Th17 的影响

根据流式数据分析,冻存前后 P3 代 hUCMSCs 共培养组均能减低刺激后 PBMCs 中 Th1 亚群和 Th17 亚群的比例,两组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。以 CD4⁺IL4⁺ 划分的 Th2 细胞亚群, hUCMSCs 共培养组中 Th2 细胞亚群比例较单独刺激组有下降趋势,但无统计学意义 ($P > 0.05$),而冻存后 P3 代 hUCMSCs 共培养组刺激后 Th2 细胞亚群比例对比刺激组下降 ($P < 0.05$),共培养组间对比,冻存后 P3 代 hUCMSCs 较冻存前的 hUCMSCs 对刺激后 Th2 细胞亚群抑制能力更强,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。(表 3)

五、冻存前后 P3 代 hUCMSCs 共培养对 B 细胞增殖和凋亡的影响

结果显示,与单独刺激组比较, hUCMSCs 共培养组 (34.03±6.46) % 比 (38.83±0.25) % 和冻存后 P3 代 hUCMSCs 共培养组 (34.03±6.46) % 比 (34.23±4.12) %, 均不影响 B 淋巴细胞的增殖,差异无统计学意义 ($t = 1.084, 0.045, P$ 均 > 0.05),且两组共培养组间也无统计学意义 ($P > 0.05$)。在 B 细胞凋亡中,与单独刺激组比较, hUCMSCs 共培养组 (30.45±1.75) % 比 (54.95±1.45) % 和冻存前后 P3 代 hUCMSCs 共培养组 (30.45±1.75) % 比 (55.10±3.80) % 均增加 B 淋巴细胞凋亡的比例,差异具有统计学意义 ($t = 6.777, 6.818, P < 0.05$),但两组共培养组间差异无统计学意义 ($t = 0.041, P$ 均 > 0.05)。

六、冻存前后 P3 代 hUCMSCs 共培养对 B 淋巴细胞活化后抗体分泌的影响

在 IgA 和 IgG 浓度检测中,与单独刺激组比较,冻存前后 P3 代 hUCMSCs 共培养组 IgA 和 IgG 抗体分泌的能力均降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),但共培养组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在 IgM 浓度检测中,与单独刺激组比较,冻存后 P3 代 hUCMSCs 共培养组 IgM 的浓度下降,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),与冻存前 P3 代 hUCMSCs 共培养组比较,冻存后 P3 代 hUCMSCs 共培养组 IgM 分泌能力降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。(表 4)

讨 论

MSC 的自我更新和组织修复能力使其在再生医学得到广泛应用,而 MSC 强大的免疫调节作用,已证实其对减缓某些自身免疫性疾病、移植物抗宿主疾病和代谢综合征等疾病发展具有积极治疗作用^[10-12]。最近报道 hUCMSCs 甚至能对新型冠状病毒 (COVID-2019) 引起的重症肺炎患者具有良好的治疗效果^[13],可降低机体内炎症因子的含量,使患者由重症向轻症转变。随着 MSC 的临床研究不断进行, MSC 需要大量制备及冻存转运后复苏应用的情况屡见不鲜,虽然冻存并不会改变 MSC 的特性,但某些报道称冻存复苏后的 MSC 相比新鲜制备使用的 MSC 在临床响应率中出现较大差异,这就提示冻存可能直接影响 MSC 的免疫调节能力^[14-15]。利

表 3 冻存前后 P3 代 hUCMSCs 与 PBMC 共培养后对 Th1、Th2 和 Th17 亚群的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	实验次数	Th1	Th2	Th17
单独刺激	3	4.64±0.27	0.91±0.09	0.55±0.03
hUCMSCs 共培养(P3)	3	0.47±0.09 ^a	0.73±0.07	0.21±0.04 ^a
hUCMSCs 共培养(冻存后 P3)	3	0.33±0.04 ^a	0.49±0.06 ^{ab}	0.22±0.03 ^a
F 值		399.500	18.540	68.980
P 值		< 0.001	0.003	< 0.001

注:与单独刺激组比较,^a $P < 0.05$;与 hUCMSCs 共培养组 (P3) 比较,^b $P < 0.05$

表 4 冻存前后 P3 代 hUCMSCs 与 B 淋巴细胞共培养后对 B 细胞分泌 Ig 抗体的影响 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

分组	实验次数	IgA	IgM	IgG
单独刺激	3	2183.35±273.70	859.16±45.56	161.64±5.87
hUCMSCs 共培养(P3)	3	1045.09±99.24 ^a	739.70±28.39	120.51±4.94 ^a
hUCMSCs 共培养(冻存后 P3)	3	1014.31±102.55 ^a	560.21±3.81 ^{ab}	127.77±7.94 ^a
F 值		27.950	27.260	23.710
P 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:与单独刺激组比较,^a $P < 0.05$;与 hUCMSCs 共培养组 (P3) 比较,^b $P < 0.05$

用冻存前后的 P3 代 hUCMSCs, 通过体外用活化的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞, 将 hUCMSCs 与淋巴细胞共培养, 明确冻存前后 hUCMSCs 对 T 和 B 淋巴细胞增殖、活化及 B 淋巴细胞抗体分泌的影响, 同时了解冻存前后 P3 代 hUCMSCs 在免疫调节的能力上是否存在差异, 为冻存前后 hUCMSCs 在临床中的应用提供理论基础。

结果显示, 冻存前后的 hUCMSCs 均可抑制 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞亚群的增殖, 而且可以增加 CD3⁺CD4⁺T 细胞的凋亡率来降低 T 淋巴细胞的数量。但对 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞凋亡的影响冻存前的 hUCMSCs 略低于冻存后的 hUCMSCs, 这可能与激活后 PBMCs 对冻存复苏后的 hUCMSCs 具有裂解作用有关^[16]。冻存前后的 hUCMSCs 均能发挥提高 Treg 细胞比例, 降低 Th1、Th2 和 Th17 细胞的比例发挥免疫调节作用, 冻存复苏后的细胞对 Th2 细胞抑制更显著, 说明冻存未明显影响 hUCMSCs 对 Treg 和 Th 细胞调控作用。

在活化的 B 淋巴细胞共培养实验中同样显示, 冻存前后的 hUCMSCs 虽然均不影响 B 淋巴细胞的增殖, 但均可通过增加 B 淋巴细胞的凋亡, 抑制 B 淋巴细胞, 并且降低活化的 B 淋巴细胞分泌 IgA、IgM 和 IgG 抗体的能力。一项骨髓来源 MSC 与 B 细胞富集的 PBMCs 共培养 (MSCs : PBMCs = 1:4 或 1:20) 的研究显示了类似的结果, 其中共培养组的 IgA、IgM 和 IgG 较刺激组均显著下降^[17]。另一项骨髓来源 MSC 与磁珠分选的 B 细胞共培养实验中, 共培养组的 IgA、IgM 和 IgG 仅在 MSC : B 细胞为 1:1 时显著下降, 而低比例 MSC 共培养组未见下降^[18]。以上骨髓来源 MSC 均在高 MSC 比例下方可抑制 B 细胞分泌抗体; 但实验结果表示, 脐带来源 MSC 可在极低 MSC 比例下(1:10)抑制 B 细胞分泌抗体。

虽然冻存前后的 hUCMSCs 对 T 和 B 淋巴细胞的抑制能力整体差异不大, 但是仍具有某些差异。冻存复苏后的 hUCMSCs 能降低 Th2 细胞的百分比和大量抑制 B 淋巴细胞分泌 IgM, 这区别于冻存前的 hUCMSCs, 这显示了冻存复苏后的 hUCMSCs 在这两方面具有更佳的免疫调节作用。这可能与深低温冻存改变了 hUCMSCs 的内部结构有关, 不同的冻存液、冻存手法以及复苏细胞手法, 均可能影响到复苏后细胞的状态, 冻存复苏后的干细胞的状态差异, 直接影响着细胞的功能, 包括细胞的自我更新能力, 以及改变免疫调节因子的分泌能力, 直接导致干细胞的分泌作用受影响。因此, 在对影响 Th2 细胞

比例和 B 淋巴细胞分泌 IgM 抗体的免疫调节作用上, 冻存复苏后的 hUCMSCs 可表现出一点点优势, 说明冻存过程对 hUCMSCs 的免疫调节功能的作用是正面的, 减少对冻存复苏细胞临床使用的担心。

综上所述, 冻存前后的 hUCMSCs 均具有抑制 T 淋巴细胞增殖和 B 淋巴细胞活化的能力, 冻存前后 P3 代 hUCMSCs 在抑制 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞增殖能力; 促进 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞; 增加 Treg 细胞比例的能力; 降低 Th2 和 Th17 细胞亚群比例的能力; 影响 B 淋巴细胞增殖和凋亡的能力; 降低 IgA 和 IgG 抗体分泌的能力等整体免疫调节功能上差异均无统计学意义。而仅仅在降低 Th2 细胞亚群比例和降低 IgM 抗体分泌的能力上, 冻存复苏后 hUCMSCs 相比冻存前的 hUCMSCs 作用能力更强。提示冻存对 hUCMSCs 免疫调节功能影响较小, 可为临床中应用经过液氮冻存的 hUCMSCs 治疗以系统性红斑狼疮为代表的自身免疫性疾病患者提供理论基础。

参 考 文 献

- 1 单佳柔, 尼贝贝, 李翠平, 等. 人脐带间充质干细胞通过线粒体转移减轻肝细胞缺血-再灌注损伤的机制研究[J]. 器官移植, 2021, 12(3):294-301.
- 2 Riordan NH, Morales I, Fernandez G, et al. Clinical feasibility of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells in the treatment of multiple sclerosis[J]. J Transl Med, 2018, 16(1):57.
- 3 Bartolucci J, Verdugo FJ, Gonzalez PL, et al. Safety and efficacy of the intravenous infusion of umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with heart failure: a phase 1/2 randomized controlled trial (RIMECARD Trial [Randomized Clinical Trial of Intravenous Infusion Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Cardiopathy])[J]. Circ Res, 2017, 121(10):1192-1204.
- 4 Matas J, Orrego M, Amenabar D, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) for knee osteoarthritis: repeated MSC dosing is superior to a single MSC dose and to hyaluronic acid in a controlled randomized phase I/II trial[J]. Stem Cells Transl Med, 2019, 8(3):215-224.
- 5 Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex[J]. Scand J Immunol, 2003, 57(1):11-20.
- 6 Naji A, Eitoku M, Favier B, et al. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(17):3323-3348.
- 7 Zhou T, Li H, Liao C, et al. Clinical efficacy and safety of mesenchymal stem cells for systemic lupus erythematosus[J]. Stem Cells Int, 2020, 2020:6518508. doi: 10.1155/2020/6518508.
- 8 Wang L, Huang S, Li S, et al. Efficacy and safety of umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for rheumatoid arthritis patients: a prospective phase I/II study[J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13:4331-4340.

- 9 Dulugiac M, Moldovan L, Zarnescu O. Comparative studies of mesenchymal stem cells derived from different cord tissue compartments-the influence of cryopreservation and growth media[J]. *Placenta*, 2015, 36(10):1192-1203.
- 10 Chen Y, Yu Q, Hu Y, et al. Current research and use of mesenchymal stem cells in the therapy of autoimmune diseases[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2019, 14(7):579-582.
- 11 Boberg E, von Bahr L, Afram G, et al. Treatment of chronic GvHD with mesenchymal stromal cells induces durable responses: a phase II study[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9(10):1190-1202.
- 12 Matsushita K. Mesenchymal stem cells and metabolic syndrome: current understanding and potential clinical implications[J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016:2892840. doi: 10.1155/2016/2892840.
- 13 Atluri S, Manchikanti L, Hirsch JA. Expanded umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) as a therapeutic strategy in managing critically ill COVID-19 patients: the case for compassionate use[J]. *Pain physician*, 2020, 23(2):E71-E83.
- 14 Luetzkendorf J, Nerger K, Hering J, et al. Cryopreservation does not alter main characteristics of good manufacturing process-grade human multipotent mesenchymal stromal cells including immunomodulating potential and lack of malignant transformation[J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(2):186-198.
- 15 Moll G, Alm J J, Davies L C, et al. Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties?[J]. *Stem cells*, 2014, 32(9):2430-2442.
- 16 Chinnadurai R, Copland IB, Garcia MA, et al. Cryopreserved mesenchymal stromal cells are susceptible to T-cell mediated apoptosis which is partly rescued by IFN γ licensing[J]. *Stem cells*, 2016, 34(9):2429-2442.
- 17 Comoli P, Ginevri F, Maccario R, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced *in vitro* by allostimulation[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(4):1196-1202.
- 18 Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions[J]. *Blood*, 2006, 107(1):367-372.

(收稿日期:2020-07-14)

(本文编辑:陈媛媛)

曾伟杰, 廖延, 胡樾, 等. 冻存前后人脐带间充质干细胞对 T 和 B 淋巴细胞免疫抑制能力的差异比较 [J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2021, 11 (4):200-206.