·基础研究·

慢性粒细胞白血病骨髓来源的间充质干细胞免疫调节功能的研究

朱希山 宋雨光 张红梅 安广宇

摘要 **目的**:研究慢性粒细胞白血病骨髓来源的间充质干细胞的免疫学特征,比较其与正常人来源的间充质干细胞是否存在免疫功能的差异。**方法**:分离正常人和慢性粒细胞白血病患者的骨髓间充质干细胞,分别检测它们对T细胞周期、活化、抑制和增殖的作用。**结果**:CML和正常志愿者骨髓来源的MSC的细胞形态和表型没有差异,CML患者来源的MSC抑制T细胞增殖的作用减弱,抑制T细胞周期的作用减弱,抑制T细胞活化的能力减弱,抑制T细胞凋亡的作用增强。**结论**:CML患者骨髓来源的MSC存在明显的免疫调节功能缺陷,使用CML患者自体的MSC移植治疗可能不是一种很好的选择,对于CML患者最好选用异基因的MSC移植治疗。

关键词 慢性粒细胞白血病 间充质干细胞 免疫调节

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2010.16.008

Research on the Immunomodulatory Function of Mesenchymal Stem Cells from Chronic Myeloid Leukemia Patients

ZHU Xishan, SONG Yuguang, ZHANG Hongmei, AN Guangyu

Corresponding author: AN Guangyu, E-mail: bibek2010@163.com

Institute of Medical Oncology, Beijing Shijitan Hospital (The 9th Hospital of Peking University), Beijing 100038, China

Abstract **Objective:** Mesenchymal stem cells (MSCs) are low-immunogenic cells with immunomodulatory capacity, which show promise in the treatment of immune system related diseases. However, whether MSCs maintain immunomodulatory function in a pathological environment is not clear. The aim of this study was to investigate the immunomodulatory function of MSCs derived from bone marrow of CML patients and to compare it with that of MSCs from normal donors. **Methods:** MSCs were isolated from CML and normal donors, then the T lymphocyte activation, proliferation and suppression were compared. **Results:** Compared with those of MSCs from normal bone marrow, the capacity of suppressing T cell proliferation and activation of MSCs derived from bone marrow of CML patients were weakened. The inhibitory effect on apoptosis was increased. MSCs derived from bone marrow of CML patients persistently displayed fibroblast-like morphology and isotype analysis indicated that they were all persistently negative for CD34 and CD31 but positive for Flk1, CD29, CD44 and CD105. They could inhibit T lymphocyte activation and the percentages of CD25, CD69 and CD44 in PHA induced T lymphocytes were (12.3±3.5)%, (34.5±5.9)% and (29.4±7.0)%, respectively, but when co-cultured with normal MSCs were (3.1±2.3)%, (6.4±3.2)% and (2.1±1.7)% and when co-cultured with CML MSCs were (5.4±2.3)%, (31.5±6.8)% and (24.5±3.6)%, respectively. **Conclusion:** CML hemangioblasts can inhibit T lymphocyte proliferation and activation and promote T lymphocyte apoptosis, indicating immuno-defects of CML hemangioblasts. MSCs from the pathological environment should not be used for autologous transplantation.

Keywords Chronic myeloid leukemia; Mesenchymal stem cells; Immunoregulation

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia,CML)是一种异常干细胞克隆性疾病,最近的研究发现从CML患者体内分离出来的T淋巴细胞在体外能抑制粒单系集落形成单位(colony forming unit-granulocyte and macrophage,CFU-GM)和红系集落形成单位(colony forming unit-erythroid,CFU-E)的生成,这种抑制作用可以被CsA(环孢菌素A,cyclosporine A)阻断,表明CML患者可能不只存在造血干细胞(hematopoietic stem cell,HSC)异常,同时也可能存在免疫异常,即CML患者的T细胞处于异常激活的状态,导致自身组织受到攻击。骨髓中的干细胞除了HSC外,还有一种基质来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cell,MSC),MSC是一种具有多系分化能力的细胞,可以分化为组成造血微环境的各种基质细

作者单位:北京世纪坛医院(北京大学第九医院)肿瘤内科 (北京市100038)

通信作者:安广宇 bibek2010@163.com

胞，同时这种细胞还具有免疫调节功能，虽然这种细胞在骨髓中存在的数量很少，但是以前的研究认为MSC可能是骨髓造血微环境的免疫保护位点[1]，由于CML患者存在造血微环境异常和免疫异常，我们推测MSC可能在CML的病理过程中扮演重要角色，但是目前还没有研究结果发现CML患者的MSC存在免疫调节功能异常。

$Flk1^+CD31^-CD34^-$ MSCs是我们从骨髓分离出来的一种间充质干细胞亚群，是一种较造血干细胞更为原始的干细胞[1-3]。由此我们设计了如下实验来研究CML骨髓来源的$Flk1^+CD31^-CD34^-$ MSCs和正常骨髓来源的$Flk1^+CD31^-CD34^-$ MSCs的差异，看其是否有免疫调节能力异常。

1　材料与方法

1.1　临床资料

骨髓样品来源于15例成年的CML患者（均存在染色体异常），男8例，女7例，年龄40～84岁（从解放军总医院附属第二医院血液科获取），经医院伦理委员会同意，并签署了知情同意书，这些患者在近3个月内未经过细胞毒性药物治疗，正常的骨髓来源于12例健康志愿者。

1.2　方法

1.2.1　正常志愿者和CML患者骨髓来源的间充质干细胞的培养　无菌采集健康志愿者的骨髓5～10mL于无菌的肝素管中，取一无菌的离心管，用D-Hank′s液适当稀释骨髓，取一新的离心管，分别加入恢复至室温的淋巴细胞分离液和上述稀释的骨髓，二者的比例为1∶1；将上述离心管配平后放入常温台式离心机中，20℃以1 800转/min的速度离心20min，仔细吸取白膜层即获得单个核细胞，将单个核细胞用D-Hank′s液洗涤两次并计数，以$1\times10^6/cm^2$的密度接种于$25cm^2$的培养瓶中，用含58%DMEM/F12加40% MCDB-201（Gibco），5%的胎牛血清（Hyclone），20ng/mL EGF，100U/mL链霉素和100U/mL青霉素的培养基培养间充质干细胞，24h后，去除悬浮细胞，补充培养基，细胞每隔3天换液一次，待细胞长至70%～80%融合时，用0.05%胰蛋白酶-0.01%EDTA消化传代，3～6代的间充质干细胞冻存于液氮罐备用。

1.2.2　流式细胞仪检测正常志愿者和CML患者骨髓来源的间充质干细胞的表型　用间接免疫荧光法检测细胞的表型，间充质干细胞经胰酶消化后，洗涤两次，再用洗液（含0.5%的牛血清白蛋白的PBS）洗涤一次，为检测细胞内抗原Flk-1，将细胞用4%多聚甲醛4℃固定15min，并在室温下用0.1%的皂角素透膜1h，再加入Flk-1单抗，其他不需要破膜的，则加入一抗4℃孵育30min（一抗为小鼠抗人的单克隆抗体CD105、CD34、CD45、CD29、CD44、HLA-DR），用洗液洗涤两次后，加入FITC标记的羊抗鼠二抗4℃孵育30min。孵育结束后，洗涤细胞3次，并悬浮在500μL的PBS中，置于冰上待流式细胞仪检测。

1.2.3　有丝分裂原刺激的T细胞增殖　采集正常人外周血，用淋巴细胞分离液梯度离心分离单个核细胞，用10%胎牛血清、RPMI 1640完全培养基培养2h，收获悬浮细胞，加入96孔板，每孔加入0.1mL含50mg/L PHA的RPMI 1640培养基，含T细胞1×10^5个。分为4组：1）空白对照组：只加T细胞，不加PHA刺激；2）反应组：加入PHA刺激的T细胞；3）正常MSC组：加入PHA刺激的T细胞和正常志愿者的MSC（MSC∶T细胞=1∶10）；4）MDS-RA患者MSC组：加入PHA刺激的T细胞和CML患者的MSC（MSC∶T细胞=1∶10）。每组设3个平行孔，在5% CO_2饱和湿度条件下培养2天后，加入37×10^3Bq/孔的^{3}H-TdR（上海放射医学研究所），18h后收获，用闪烁计数器计数，结果用counts/min（cpm）表示。

1.2.4　混合淋巴细胞反应（MLR）　共分为4组：1）空白对照组：只加反应T细胞，不加刺激T细胞；2）反应组：加入反应T细胞和刺激T细胞；3）正常MSC组：加入反应T细胞和刺激T细胞，同时加入经过30Gy照射的正常志愿者MSC（MSC∶反应T细胞=1∶10）；4）CML患者MSC组：加入反应T细胞和刺激T细胞，同时加入经过30Gy照射的MDS-RA患者MSC（MSC∶反应T细胞=1∶10）。按上文所述的方法检测。

1.2.5　MSC对T细胞周期的影响　前期实验中我们发现正常MSC和T细胞的比例为1∶10时，就有很好的抑制作用，因此在本次实验中我们采用的MSC和T细胞的比例均为1∶10。用3T3细胞（30Gy照射）加PHA（50μg/mL）刺激的T细胞增殖实验作为对照组，同样加入终浓度50mg/L的PHA，刺激培养3天后收获细胞，用70%冰乙醇4℃固定30min，用PBS洗2次，50μg/mL碘化丙啶在室温染色5min后用流式细胞仪测定，细胞周期用ModFIT软件分析。

1.2.6　MSC对T细胞活化的影响　MSC和外周血的单个核细胞的培养和前面相同，PHA（50μg/mL）刺激的外周血单个核细胞单独培养或者和不同来源的MSC（正常志愿者的和CML患者的）共培养，MSC和MNCS的比例为1∶10，然后用流式仪在12h后检测CD69的表达，24h后检测CD25的表达，72h后检测CD44的表达。

1.2.7　MSC对T细胞凋亡的影响　MSC和外周血的单个核细胞的培养和前面相同，PHA（50μg/mL）刺激的外周血单个核细胞单独培养或者和不同来源的MSC（正常志愿者和CML患者）共培养，3天后，用An-

nexin-V检测T细胞凋亡。1)收集细胞,用预冷的PBS洗2遍,用1×binding buffer重悬细胞,调整细胞浓度为1×10^6/mL;2)取100μL细胞悬液(1×10^5个细胞),加入5μL Annexin V~FITC和5μL PI;3)轻轻混匀,避光室温孵育15min;4)加400μL 1×binding buffer,1h内上流式检测。

1.3 统计学分析

所有数值均用$\bar{x}\pm s$表示,用SPSS 11.5软件进行成组的t检验。

2 结果

2.1 细胞形态和表型

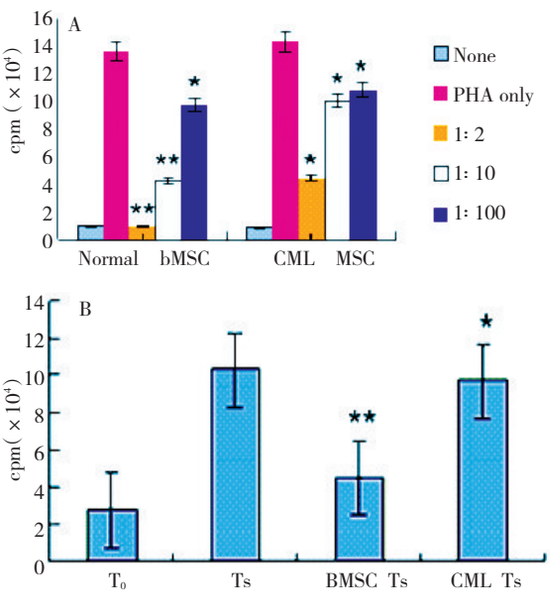
CML和正常志愿者骨髓来源的MSC在光镜下均呈成纤维细胞样贴壁生长,形态未见明显区别。CML和正常志愿者骨髓来源的MSC的细胞表型,未见明显区别,两组MSC均高表达Flk-1,同时高表达粘附分子CD29、CD44、CD105、CD106;但造血细胞的标记CD34、CD45均为阴性,同时也不表达MHC-Ⅱ类分子。上述结果显示CML患者来源的MSC在形态和细胞表型方面和正常骨髓来源的MSC没有明显区别。

2.2 CML患者来源MSC抑制T细胞增殖的作用减弱

以前的研究发现来源于正常骨髓的MSC能明显抑制T细胞增殖,且这种抑制作用是剂量依赖的,本实验结果中来源于健康志愿者的MSC和T细胞共培养时结果与之类似,但是CML患者来源的MSC的这种抑制T细胞增殖的作用明显减弱了。分为三组:None:没有刺激的T细胞;Ts:PHA刺激的T细胞;PHA刺激的T细胞分别和正常骨髓和CML患者的骨髓来源的MSC(MSC:Ts的比例分别为1:2,1:10,1:100)($P<0.05$,$P<0.005$)来源于正常志愿者的BMSC与PHA刺激的MNCs比例是1:2时,T细胞增殖可以被抑制到无MSC时的1%,但是在CML的MSC和T细胞共培养时,仅被抑制到无MSC时的37%,而在1:10的情况下,结果类似(图1A)。MLR的结果和PHA刺激的T细胞增殖结果相似,MSC与T细胞的比例为1:10,分为四组,包括不加刺激细胞的效应T细胞;加刺激细胞的效应T细胞,正常骨髓来源的MSC加刺激细胞和效应T细胞;CML患者骨髓来源的MSC加刺激细胞和效应T细胞,见图1B所示。从而我们可以得出结论,CML患者的BMSC抑制T细胞增殖的能力减弱。

2.3 CML患者抑制T细胞周期的作用减弱

前期研究发现正常的MSC在与T细胞共培养时,可以使更多的PHA刺激活化的T细胞抑制在G_0/G_1期,这可能就是MSC抑制T细胞增殖的机制,但是CML患者的MSC这种作用是减弱的,PHA刺激时的T细胞仅有(67.3±3.7)%在G_0/G_1期,而(28.4±2.9)%在S期,在和正常的MSC共培养时,G_0/G_1期的T细胞占(94.0±1.9)%,S期(3.1±1.9)%。而和MDS患者骨髓来源的MSC共培养时,T细胞在G_0/G_1期和S期的分别是(74.5±1.2)%和(22.1±2.4)%。3T3细胞系作为对照,而它是不影响T细胞周期的,T细胞和3T3共培养时(70.3±3.1)%在G_0/G_1期,(27.3±5.1)%在S期(图2)。



A:不同剂量的正常骨髓和CML患者的骨髓来源的MSC对有丝分裂原刺激的T细胞增殖的抑制作用;B:正常骨髓和CML患者的骨髓来源的MSC对MLR的抑制作用

图1 正常骨髓和CML患者骨髓来源的MSC对T细胞增殖的抑制作用

Figure 1 Inhibitory effect of MSC from CML patients and normal donors on T cell proliferation

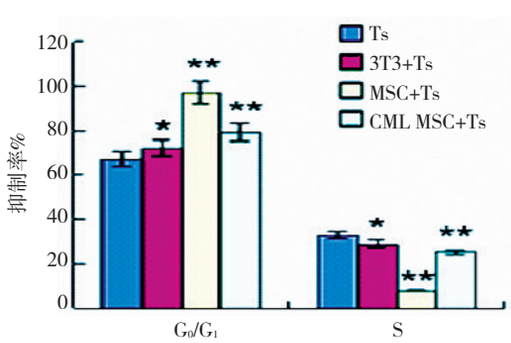


图2 正常骨髓和CML患者的骨髓来源的MSC对T细胞周期的抑制作用

Figure 2 Suppressing effect of MSC from CML patients and normal donors on cell cycle of T cells

2.4 CML患者来源的MSC抑制T细胞活化能力减弱

MSC具有抑制T细胞活化的作用,在研究中发现与MSC共培养可以抑制T细胞活化标志的表达,MNCs被PHA刺激后CD25,CD69和CD44的表达率分别是(2.3±3.5)%,(34.5±5.9)%和(29.4±7.0)%,而在和正常骨髓来源的MSC共培养时上述表面分子的表达率分别是(3.1±

2.3)%,(6.4±3.2)%和(2.1±1.7)%,MDS患者来源的MSC抑制T细胞活化的作用减弱,分别为(5.4±2.3)%,(31.5±6.8)%和(24.5±3.6)%。

3　讨论

从不同组织分离出来的MSC在体内外均具有免疫调节作用[4-7]。MSC由于其来源丰富,并且具有免疫调节功能,在治疗免疫异常的疾病方面有广阔的应用前景[8-10]。在正常组织中,MSC的数量是很少的,在骨髓中的比例为1MSC/10 000～100 000MNC,所以在一般情况下,MSC可能不影响对外来抗原的免疫反应,这和体外的研究结果是一致的,在PHA刺激的T细胞增殖和MLR中当MSC和T细胞的比例为1∶100时,免疫调节作用并不存在。但是,当大量的MSC输注用于免疫治疗时,MSC能够非特异性地抑制免疫系统。由于MSC不仅具有免疫调节作用,而且具有支持造血、修复损伤的造血微环境等功能,所以MSC移植治疗在存在免疫异常和造血微环境异常的血液系统疾病中很有优势。例如MSC可以用来治疗移植物抗宿主病(graft-versus-host disease,GVHD),这种治疗已经应用于临床[9]。

有报道证实AA(再生障碍性贫血,aplastic anemia)患者骨髓来源的MSC的免疫调节能力异常[7,8]。AA的发病机制可能是造血干细胞异常、造血微环境异常或者免疫异常,这和CML的发病机制有类似之处。目前对CML的治疗手段主要是对症治疗贫血和刺激造血,但是治疗效果并不理想,人们认识到CML发病机制中存在免疫功能异常[10-12],部分CML患者T细胞处于异常激活的状态,部分CML患者用免疫抑制剂治疗有效,同时研究者发现部分CML患者合并有自身免疫性疾病,由此推测MSC作为一种免疫调节剂可能对CML治疗有效,MSC移植不仅可以改善骨髓微环境,还可以调节体内异常的免疫状态。

本实验为了研究CML患者自体MSC移植是否安全有效,检测了CML的形态和表型,发现CML患者来源的MSC和正常MSC没有区别,检测CML患者来源的MSC的免疫调节功能,发现患者来源的骨髓MSC抑制T细胞增殖的能力下降,这种抑制作用的降低也表现在CML患者的BMSC抑制T细胞周期的能力下降,CML患者来源的MSC不能使T细胞抑制在G_0/G_1期。而CML患者来源的细胞免疫调节能力下降的另一方面表现在抑制T细胞活化的能力下降,正常骨髓来源的MSC可以同时抑制T细胞早期活化标志如CD69、CD25的表达和晚期活化标志CD44的表达[12],而CML患者的BMSC这种抑制能力则明显减弱。另外有研究者报道正常骨髓来源的MSC可以抑制T细胞凋亡[13],我们在研究中发现CML患者骨髓MSC抑制T细胞凋亡的能力是增强的。

总之,CML患者骨髓来源的MSC存在明显的免疫调节功能缺陷,可能存在免疫异常,使用CML患者自体的MSC移植治疗可能不是一种很好的选择,最好是选用异基因的MSC移植。

参考文献

1　Stefanidakis M, Koivunen E. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression[J]. Blood, 2006, 108(5): 1441-1450.

2　Paupert J, Mansat-De Mas V, Demur C, et al. Cell-surface MMP-9 regulates the invasive capacity of leukemia blast cells with monocytic features[J]. Cell Cycle, 2008, 7(8): 1047-1053.

3　张继红.全髓白血病特点分析(附5例病历报告)[J].中国肿瘤临床,2009,36(5):245.

4　曹　岚,孙爱宁.CD38 ZAP-70在B慢性淋巴细胞白血病中表达及其临床意义的研究)[J].中国肿瘤临床,2009,36(8):222.

5　Shishodia S, Sethi G, Konopleva M, et al. A synthetic triterpenoid, CDDO-Me, inhibits IkappaBalpha kinase and enhances apoptosis induced by TNF and chemotherapeutic agents through down-regulation of expression of nuclear factor kappaB-regulated gene products in human leukemic cells[J]. Clin Cancer Res, 2008, 12(6): 1828-1838.

6　Kaneta Y, Kagami Y, Tsunoda T, et al. Genome-wide analysis of gene-expression profiles in chronic myeloid leukemia cells using a cDNA microarray[J]. Int J Oncol, 2003, 23(3): 681-691.

7　Ries C, Loher F, Zang C, et al. Matrix metalloproteinase production by bone marrow mononuclear cells from normal individuals and patients with acute and chronic myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes[J]. Clin Cancer Res,1999, 5(5): 1115-1124.

8　Kim JG, Sohn SK, Kim DH, et al. Clinical implications of angiogenic factors in patients with acute or chronic leukemia: hepatocyte growth factor levels have prognostic impact, especially in patients with acute myeloid leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 2009, 46(6): 885-891.

9　Karanes C, Nelson GO, Chitphakdithai P, et al. Twenty years of unrelated donor hematopoietic cell transplantation for adult recipients facilitated by the National Marrow Donor Program[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2008, 14(9 Suppl): 8-15.

10　Anand P, Sundaram C, Jhurani S, et al. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution[J]. Cancer Lett, 2008, 267(1): 133-164.

11　Zhang B, Liu R, Shi D, et al. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell production[J]. Blood, 2009, 113(1): 46-57.

12　Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells[J]. Blood, 2001, 98(9): 2615-2625.

13　Jamieson CH. Chronic myeloid leukemia stem cells[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2008: 436-442.

（2009-12-23收稿）
（2010-05-20修回）
（杨红欣校对）