

# 长期传代培养人脐带间充质干细胞 免疫调节功能的比较

常铨<sup>1</sup> 刘梦婷<sup>2</sup> 张权<sup>2</sup> 饶巍<sup>2</sup> 陈恋<sup>1</sup> 贺静<sup>1</sup> 韩兵<sup>2</sup> 李长勇<sup>1</sup> 武栋成<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>武汉大学基础医学院, 武汉 430072; <sup>2</sup>武汉汉密顿生物科技股份有限公司研发中心, 武汉 430075)

**摘要** 该研究针对不同代次人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)进行系统性比较, 探索长期传代培养对其免疫调节功能的影响及可能的机制。hUC-MSCs反复传代培养至P5、P10、P15代, 对其分化潜能和表面标志物进行鉴定,  $\beta$ -半乳糖苷酶染色及流式细胞术检测其衰老与凋亡状况。通过不同条件下与人外周血淋巴细胞共培养, 比较不同代次hUC-MSCs对淋巴细胞的增殖活性、细胞周期变化及T细胞亚群的调节作用; ELISA检测共培养体系中TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6含量。Western blot检测不同代次hUC-MSCs中PD-L1、IDO的表达。结果表明, 传代培养至P15代, 其干细胞生物学特性无明显改变, 但 $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性细胞数显著升高。三个代次hUC-MSCs均能调控活化后的淋巴细胞周期, 并有效抑制其增殖及Th1/Th17细胞亚群, 影响炎症因子的表达, 且三个代次间无显著性差异。相对而言, P15代细胞表现出对Treg亚群及IL-1 $\beta$ 的调节能力下降。长期传代培养后的hUC-MSCs仍能保持其多向分化潜能和较为满意的免疫调节活性。但不可忽视高代次细胞的衰老对Treg亚群及炎症的调节作用减弱, 临床应用中宜采用P10代以内hUC-MSCs以保证治疗的安全性与有效性。

**关键词** 人脐带间充质干细胞; 长期培养; 淋巴细胞; 免疫调节

## Comparison of Immunomodulatory Functions in Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells after Long-Term Expansion

CHANG Cheng<sup>1</sup>, LIU Mengting<sup>2</sup>, ZHANG Quan<sup>2</sup>, RAO Wei<sup>2</sup>, CHEN Lian<sup>1</sup>, HE Jing<sup>1</sup>,

HAN Bing<sup>2</sup>, LI Changyong<sup>1</sup>, WU Dongcheng<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Wuhan University School of Basic Medical Sciences, Wuhan 430072, China;

<sup>2</sup>Hamilton Biotechnology-Co., LTD. R&D Centre, Wuhan 430075, China)

**Abstract** The purpose of this study was to systematically compare different passages of human umbilical cord mesenchymal stem cells, explore the effect of long-term subculture on their immune regulatory function and possible mechanisms. The cells were cultured to 5th, 10th and 15th passage, and their differentiation potential and surface markers were determined. Cell senescence and apoptosis were detected by  $\beta$ -galactosidase staining and flow cytometry. Co-cultured with each passages of umbilical cord mesenchymal stem cells under different conditions to compare lymphocytes proliferation, cell cycle changes and T cell subsets in human peripheral blood lymphocytes. ELISA was used to detect the concentration of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL- $\beta$  and IL-6 in the co-culture system. Western blot

收稿日期: 2019-10-14 接受日期: 2020-03-02

武汉市科技局科技成果转化专项(批准号: 2019030703011513)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 027-87276298, E-mail: bcdwu@hotmail.com

Received: October 14, 2019 Accepted: March 2, 2020

This work was supported by Wuhan Science and Technology Bureau Special Project for the Transfer of Scientific and Technological Achievements (Grant No.2019030703011513)

\*Corresponding author. Tel: +86-27-87276298, E-mail: bcdwu@hotmail.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5221>

was used to detect the expression of PD-L1 and IDO in hUC-MSCs at different passages. The study indicated that hUC-MSCs were cultured to the 15th passage with no significant change in biological characteristics of stem cell, but the number of  $\beta$ -galactosidase staining positive cells was significantly increased. Three passages of hUC-MSCs could regulate cell cycle in activated lymphocytes, effectively suppressed proliferation and Th1/Th17 cell subsets, affected the expression of inflammatory factors. The 15th passage cells showed deregulation of Treg subsets and IL-1 $\beta$ . hUC-MSCs could maintain their multi-directional differentiation potential and satisfactory immunomodulatory activity after long-term subculture; however, it could not be ignored that the disability on regulation of Tregs subsets and anti-inflammatory in high-passages cells which were aging. In clinical applications, hUC-MSCs within 10th passage should be used to ensure the safety and efficacy in treatment.

**Keywords** human umbilical cord mesenchymal stem cells; long-term culture; lymphocytes; immunomodulation

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类源于中胚层并具有自我更新和分化潜能的多能干细胞,广泛存在于骨髓、脂肪和围产期组织中,在体外可诱导分化为多种间充质谱系的成体细胞如成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞、神经细胞等。MSCs在治疗各类急性器官损伤中,其修复受损细胞、再生组织功能的作用受到瞩目<sup>[1]</sup>。MSCs通过旁分泌作用释放细胞因子,介导抗炎、抗凋亡和调节免疫的潜在机制,为自体免疫性疾病、糖尿病肾病、脊髓损伤、以及各类炎症与纤维化疾病提供了新的治疗思路<sup>[2-4]</sup>。

相较于其他组织来源的成体干细胞,如脂肪间充质干细胞、骨髓间充质干细胞,人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)免疫原性较低<sup>[5]</sup>、易收集培养、保存运输方便、无伦理问题,兼具更优良的增殖分化潜能<sup>[6-7]</sup>,尤其是其强大的免疫调节功能和抗炎作用<sup>[5,8-9]</sup>,具有广阔的临床应用前景。

辅助性T细胞(helper T cells, Th),又称CD4<sup>+</sup> T细胞,在人体适应性免疫中发挥重要作用。其中1型辅助性T细胞(type 1 helper T cells, Th1)、17型辅助性T细胞(type 17 helper T cells, Th17)主要通过分泌干扰素 $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )等细胞因子,发挥免疫功能,但过度的免疫应答、细胞因子的持续分泌也会加剧炎症反应,进一步导致慢性炎症及自体免疫性疾病<sup>[10]</sup>。而调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)主要通过抑制CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>效应T细胞、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)等的活性,维持

免疫稳态,抑制炎症<sup>[11-12]</sup>。

有文献报道, hUC-MSCs可以通过免疫抑制因子如吲哚胺2,3-双加氧酶1(indoleamine2,3-dioxygenase 1, IDO 1)和前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)并依赖接触机制表达程序性死亡配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)<sup>[13-16]</sup>,构建免疫调节微环境,从而抑制T细胞、B细胞和NK细胞等主要免疫细胞群的增殖和功能,诱导调节性T细胞的生成。此外, MSCs通过下调白细胞介素1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 等炎症因子的表达<sup>[17]</sup>,影响T细胞亚群Th1、Th17的分布<sup>[18]</sup>,改善人外周血淋巴细胞因子的分泌情况。

值得注意的是, MSCs需反复传代培养扩增至足够的数目以达到临床施用剂量,过度传代可能加剧hUC-MSCs的衰老<sup>[19]</sup>,其干细胞生物学特性及免疫调节能力如果发生改变,将极大影响临床应用的安全性及有效性,目前关于这一论题尚缺乏深入研究。因此系统地比较不同代次hUC-MSCs的免疫调节功能与细胞综合质量,既能满足细胞剂量的需求,又能保证最佳的生物学活性,对于脐带间充质干细胞的新药研发和临床转化具有重要指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

试剂与仪器包括:无血清干细胞培养液(瑞士Lonza公司),DMEM/F12、RPMI 1640培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25%胰酶、PBS(美国Thermo公司),Ficoll(美国GE Healthcare公司),CFSE染色剂、红细胞裂解液、流式抗体、Leukocyte Activation Cocktail with BD Golgi Plug、

Th1/Th17和Treg细胞检测试剂盒(美国BD公司), DMSO(美国AMRESCO公司), 植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA, 美国Sigma-Aldrich公司), 丝裂霉素C(上海爱必信生物科技有限公司), 重组人白介素-2(IL-2, 北京远策药业有限责任公司), 干细胞成脂、成骨诱导培养基、青霉素、链霉素、油红O染液、茜素红染液(深圳伟通生物科技有限公司), 人源TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  ELISA试剂盒、细胞周期检测试剂盒、细胞衰老 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司), 人源IL-1 $\beta$ 、IL-6 ELISA试剂盒(美国R&D Systems公司), IDO、PD-L1、Caspase-3、Bax WB抗体(美国CST公司), 倒置相差显微镜(日本Olympus公司), CytoFLEX流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司), 生物安全柜、CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo公司), 离心机(德国Eppendorf公司), 酶标仪(上海科华生物工程股份有限公司)。

## 1.2 hUC-MSCs的分离、传代培养与生物学特性鉴定

1.2.1 hUC-MSCs细胞的分离与传代培养 经筛查无家族遗传病史, 无传染病史, 传染免疫四项(HBV、HCV、HIV、梅毒标志物)检测阴性的产妇签署自愿捐献知情同意书。脐带由产科医生在无菌条件下断脐后采集于健康足月剖腹产新生儿。采用自主研发的人脐带间充质干细胞分离培养方法<sup>[20]</sup>, 对细胞进行传代培养至P5、P10、P15代后建库, 液氮冻存备用。所有人脐带间充质干细胞的分离制备与质量检测均按照GMP标准进行。

1.2.2 hUC-MSCs表面标志物与诱导分化能力鉴定于无血清干细胞培养液中培养P5、P10、P15代次的hUC-MSCs, 光学显微镜观察形态, 流式细胞仪检测其表面标志物CD105、CD90、CD44、CD73、CD19、CD34、CD45和HLA-DR的表达<sup>[21]</sup>。

将P5、P10、P15代hUC-MSCs, 以 $1 \times 10^3$ 个/cm<sup>2</sup>的密度接种到24孔板中。待细胞完全贴壁后每3天更换1次成脂及成骨诱导培养基, 成脂诱导培养14天及成骨诱导21天后, 使用PBS润洗细胞, 4%多聚甲醛固定30 min, 分别加入油红O工作液或0.1%茜素红染色, 镜检观察。

1.2.3 不同代次hUC-MSCs细胞衰老的检测 按细胞衰老 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒的方法对P5、P10、P15代hUC-MSCs进行 $\beta$ -半乳糖苷酶活性检测以确定细胞衰老情况。显微镜下随机选取5个200倍视野计

数蓝色深染的衰老细胞。

收取三个代次细胞, 70%乙醇固定PI染色, 流式细胞仪检测细胞周期变化, 计算G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>期的比例。

1.2.4 细胞增殖与凋亡检测 将不同代次hUC-MSCs, 以 $2 \times 10^3$ 个/cm<sup>2</sup>的密度接种到6孔板中, 待细胞完全贴壁后, 分别在培养24 h、48 h、72 h、96 h、120 h时收取细胞并进行计数, 绘制不同代次hUC-MSCs细胞增殖曲线。

收取细胞, 蛋白免疫印迹检测不同代次hUC-MSCs中凋亡相关蛋白Bax、Caspase-3表达。

## 1.3 不同代次hUC-MSCs对T淋巴细胞的调节

1.3.1 人外周血单个核细胞的分离培养与CFSE荧光标记 采集5位健康志愿者外周血50 mL, 常规Ficoll分离法分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。PBS离心洗涤后, 重悬PBMCs于10% FBS-RPMI 1640培养基中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下培养。

1.3.2 hUC-MSCs共培养对淋巴细胞增殖的影响 复苏P5、P10、P15代次的hUC-MSCs, 重悬于10% FBS-DMEM/F2培养液中。按 $1 \times 10^5$ /孔接种于12孔板, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度培养至80%~90%细胞汇合度。加入丝裂霉素C(终浓度为10  $\mu$ g/mL), 灭活10 min, PBS洗涤2次。为检测细胞增殖, 将PBMCs按试剂说明书进行CFSE荧光标记后重悬于10% FBS-RPMI 1640培养基( $1 \times 10^6$ 个/mL每孔), 单独(不含hUC-MSCs)或分别与不同代次hUC-MSCs共培养, 加入PHA(5  $\mu$ g/mL)、IL-2(200 IU/mL)培养72 h后。流式细胞仪检测各组PBMCs的荧光强度, 计算淋巴细胞增殖率。

采用未经CFSE标记的PBMCs按上述步骤培养处理后, 70%乙醇固定PI染色, 流式细胞仪各组PBMCs细胞周期变化, 计算G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>期的比例。

1.3.3 hUC-MSCs共培养对Th1/Th17细胞亚群的影响 将PBMCs悬液( $1 \times 10^6$ /mL每孔)加入到12孔板中, 单独(不含hUC-MSCs)或分别与经丝裂霉素处理的不同代次hUC-MSCs共培养48 h后, 加入2  $\mu$ L的Leukocyte Activation Cocktail with BD Golgi Plug, 继续培养5 h。收集悬浮的PBMCs, 按照Th1/Th17检测试剂盒操作, 流式细胞仪分析检测各组间Th1/Th17细胞比率。

1.3.4 hUC-MSCs共培养对Treg细胞亚群的调节 按3.3的分组与步骤, 将PBMCs单独或与不同代次hUC-MSCs共培养, 并添加200 IU/mL的IL-2培养5天

后,使用Treg检测试剂盒操作,流式细胞仪分析检测各组Treg细胞比率。

1.3.5 酶联免疫吸附测定共培养体系中的炎症因子按1.3.2的分组PMBCs单独或与不同代次hUC-MSCs共培养72 h,收集细胞培养上清液,酶联免疫吸附试剂盒检测TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6含量。

#### 1.4 免疫调节相关蛋白检测

将P5、P10、P15代次的hUC-MSCs细胞分别接种于6孔板中培养至50%细胞融合度,刺激组添加200 IU/mL的IFN- $\gamma$ 培养72 h后,收集细胞,蛋白质免疫印迹检测IDO、PD-L1蛋白表达。

#### 1.5 数据采集与统计学分析

实验数据均经过3次独立重复实验获得,采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析,统计结果用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,对两组间数据比较采用 $t$ 检验分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。使用Verity Software House, ModFit LT 4.1软件对流式结果进行分析,Graph Pad Prism 5进行统计绘图。

## 2 结果

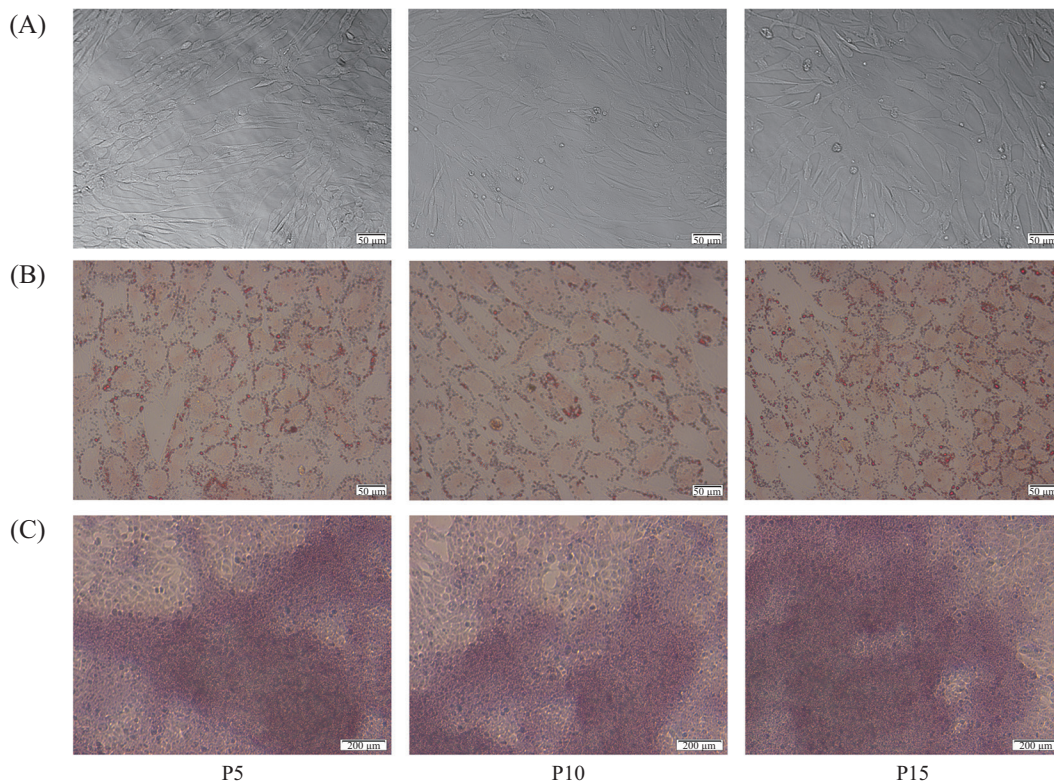
### 2.1 细胞经反复传代仍具备间充质干细胞特征

与P5代hUC-MSCs相比较,细胞经过连续传代培养至P10、P15代后镜下形态未见显著改变,三个代次的hUC-MSCs均呈成纤维细胞样贴壁生长,细长螺旋状排列。P15代细胞较为肥大且由胞质向外伸出数个突起(图1A)。

经成脂条件诱导14天、成骨条件诱导21天后,三个代次的hUC-MSCs均呈现成脂和成骨分化表征(图1B和图1C)。流式细胞仪检测结果显示,三个不同代次(P5、P10、P15)hUC-MSCs的表面抗原CD105、CD90、CD44与CD73表达均呈阳性( $>98\%$ ),而CD19、CD34、CD45及HLA-DR均为阴性( $<2\%$ )(图2)。结果表明,hUC-MSCs经体外长期传代培养至P15代,其细胞形态及表面标记表达未发生显著改变,依然维持间充质干细胞的基本生物学特征。

### 2.2 hUC-MSCs反复传代培养加剧细胞衰老与凋亡

培养过程中我们观察到,随着传代次数增加细

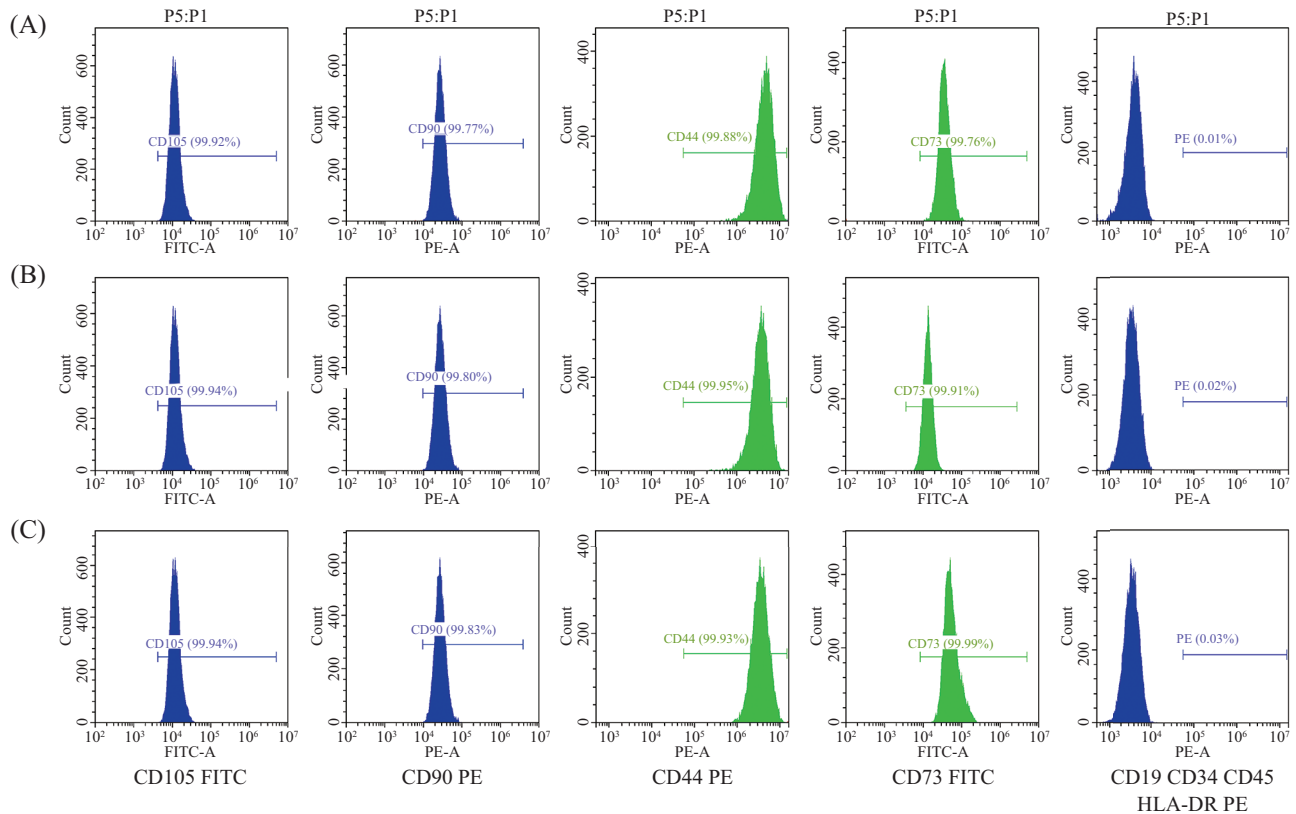


A: 显微镜下观察P5、P10和P15三个代次hUC-MSCs均为正常间充质干细胞形态。B、C: 经过14天成脂诱导分化与21天成骨诱导分化。油红O染色显示细胞内脂肪滴聚集,茜素红染色显示细胞内钙沉积。

A: the three passages of hUC-MSCs showed normal morphology under microscope. B,C: cells were induced for adipogenic (14 d) and osteogenic (21 d) differentiation, oil red O staining and alizarin red staining showed intracellular fat droplet aggregation and calcium deposition.

图1 不同代次hUC-MSCs细胞形态与诱导分化能力鉴定

Fig.1 Identification of cell morphology and differentiation ability in hUC-MSCs at different passages



A~C: P5、P10和P15三个代次hUC-MSCs进行流式细胞表型分析, 结果显示细胞表面抗原CD105、CD90、CD44或CD73单染均呈阳性表达(>98%), CD19、CD34、CD45和HLA-DR共染结果均为阴性(<2%)。

A~C: the flow cytometry analysis in 5th, 10th and 15th passage hUC-MSCs, and the results demonstrated that the cell surface antigens CD105, CD90, CD44 or CD73 were positively stained. >98%, CD19, CD34, CD45 and HLA-DR co-staining results were negative (<2%).

图2 不同代次hUC-MSCs的细胞表型鉴定

Fig.2 Cell phenotype identification of hUC-MSCs at different passages

胞增殖逐渐变缓, hUC-MSCs的生长曲线也反映出P15代细胞增殖速率相较于P5代及P10代细胞更低(图3A)。因此, 为了验证hUC-MSCs是否在数次传代后发生衰老, 引发细胞生长阻滞, 我们使用流式细胞术检测了hUC-MSCs的细胞周期进程, 使用ModFit LT 4.1软件分别对不同代次细胞G<sub>1</sub>期、S期、G<sub>2</sub>期进行拟合(图3B), 统计各周期所占比例, 结果显示, 相对于P5代、P10代细胞, P15代hUC-MSCs中处于G<sub>1</sub>期的细胞比率显著升高(图3C,  $P < 0.01$ )。

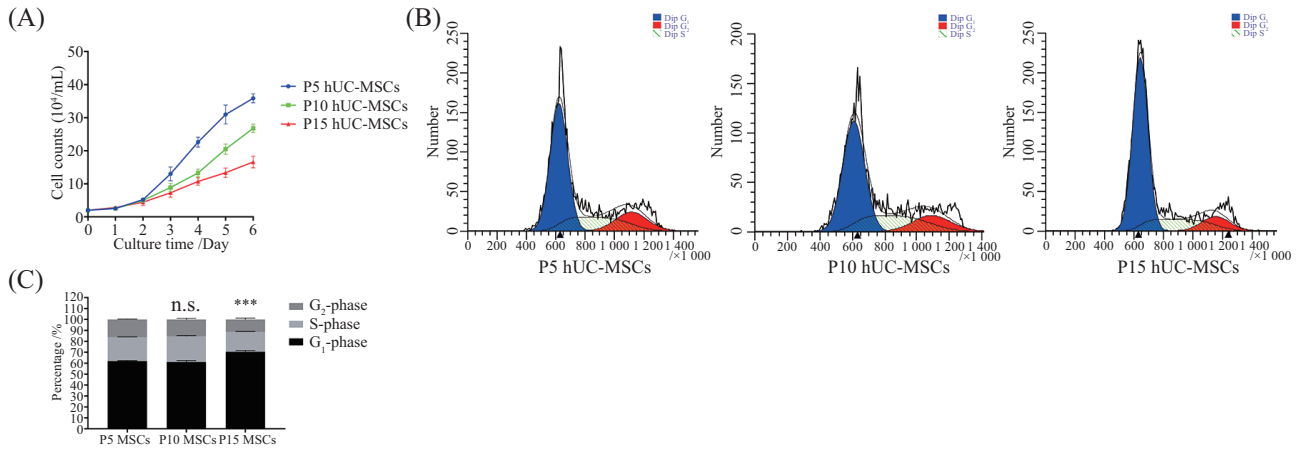
$\beta$ -半乳糖苷酶染色也揭示了较高代次hUC-MSCs衰老细胞数目剧增。P5代hUC-MSCs中可见少量衰老细胞, P10代细胞中衰老细胞有所增加但无显著性差异, 至P15代时细胞衰老率则显著增高(图4A和图4B,  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ )。

之后, 为了验证发生衰老的hUC-MSCs是否引起凋亡反应, 我们分别对不同代次细胞凋亡相关蛋白进行检测, 结果表明, P10、P15代细胞均能够通过上调Bax并活化Caspase-3切割介导凋亡进展(图4C)。

### 2.3 不同代次hUC-MSCs对淋巴细胞增殖及其细胞生长周期的影响

根据报道, hUC-MSCs能够抑制有丝分裂原刺激的T淋巴细胞增殖<sup>[22]</sup>。在本研究中, 通过软件拟合淋巴细胞增殖, 可见PHA刺激后PBMCs显著增殖并呈现出连续代次的“五指峰图”(图5B), 而hUC-MSCs的存在则抑制了增殖峰的形成(图5C~图5E)。统计分析PBMCs的细胞增殖率, 结果显示, 三个代次hUC-MSCs均能显著性抑制PBMCs增殖(图5F,  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ), 来自不同个体的细胞实验表明, 相对于P10、P15代细胞( $P < 0.05$ ), P5代hUC-MSCs对T细胞增殖的抑制作用较为稳定( $P < 0.01$ )。

PBMCs的细胞周期变化采用PI染色后进行流式细胞术检测, 统计分析细胞位于各周期的比例。结果显示, 在与hUC-MSCs共培养条件下, PHA刺激后细胞S期和G<sub>2</sub>期被完全抑制, 绝大多数细胞仍停留在静息状态的G<sub>1</sub>期(表1和图6)。不同代次hUC-MSCs对淋巴细胞增殖周期的抑制效果无显著性差

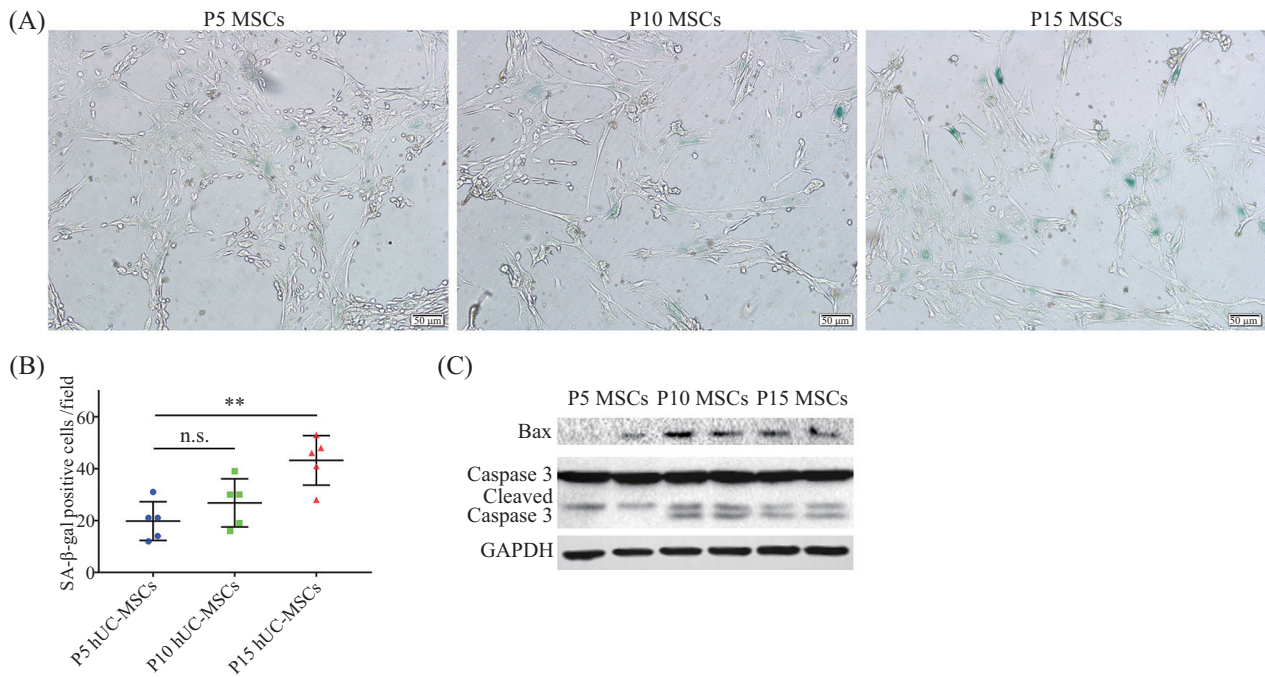


A: 连续一周对三个代次细胞进行计数并绘制增殖曲线。B、C: 流式细胞术检测3个代次hUC-MSCs细胞周期分布, 软件拟合结果可见G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>期变化, 并对细胞周期分布结果进行统计学分析。\*\*\* $P < 0.001$ , 与P5代hUC-MSCs相比较, n.s.: 无显著性差异。

A: three passages of cells were counted continuously in 7 days and a proliferation curve was plotted; B,C: flow cytometry was used to detect the cell cycle of hUC-MSCs in three passages. The fitting results by software indicated changes in G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> phases and statistical analysis of cell cycle distribution. \*\*\* $P < 0.001$  compared with 5th passage hUC-MSCs, n.s.: no significant difference.

图3 不同代次hUC-MSCs的增殖与细胞周期检测

Fig.3 Proliferation and cell cycle of hUC-MSCs at different passages



A、B: 不同代次hUC-MSCs经过β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)染色后结果, 衰老细胞呈蓝色深染。随机选取5个视野, 计数SA-β-gal染色阳性细胞并做统计分析。C: 不同代次hUC-MSCs凋亡相关蛋白Bax、Caspase-3表达。结果显示为 $\bar{x} \pm s$ 。\*\*\* $P < 0.01$ ; n.s.: 无显著性差异。

A、B: the senescent cells were stained with β-galactosidase in 5th, 10th, 15th passage of hUC-MSCs and positive cells were counted and statistically analyzed in five fields randomly selected; C: the expression of apoptosis-related proteins Bax and Caspase-3 in hUC-MSCs at different passages. The results were shown as  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.01$ , n.s.: no significant difference.

图4 不同代次hUC-MSCs细胞衰老与凋亡检测

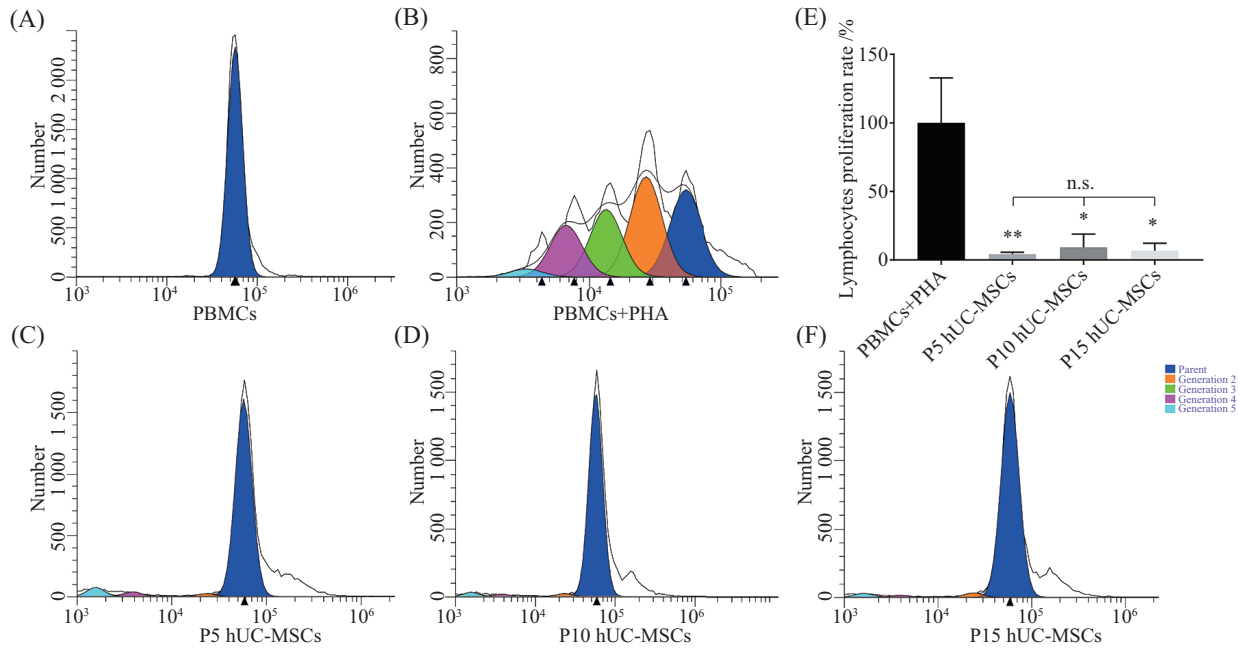
Fig.4 Senescence and apoptosis of hUC-MSCs at different passages

异(表1)。

## 2.4 不同代次hUC-MSCs对T细胞亚群的调节作用比较

对Th1/Th17淋巴细胞亚群的抑制和对Tregs的

促进作用是MSCs免疫调节功能的重要体现。流式细胞术检测显示, 三个不同代次的hUC-MSCs均能够显著性降低CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞中的Th1或Th17比例(图7A和图7B)。然而, 通过检测CD4<sup>+</sup> T细胞中



A~E: PBMCs单独培养或PHA刺激后分别与P5、P10、P15代hUC-MSCs共培养条件下, 流式细胞术检测PBMCs的增殖, 使用不同颜色区分增殖峰。蓝色峰表示未发生增殖的细胞(parent), 其他峰图(橙色、绿色、紫色、青色)分别表示经过多次增殖后的PBMCs(Generation2~5)。F: 对不同培养条件下PBMCs的增殖率进行统计分析, 定义PHA刺激条件下PBMCs的增殖率为100%, 结果显示为3次独立实验的 $\bar{x}\pm s$ , \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与PHA刺激后的PBMCs比较, n.s.: 无显著性差异。

A-E: PBMCs were cultured individually or PHA stimulated and co-cultured with 5th, 10th, and 15th passage of the hUC-MSCs respectively, flow cytometry was used to detect the proliferation of lymphocytes, the proliferative fitting peaks of PBMCs were distinguished with different colors, the blue peak indicated cells without proliferation (parent), and the other peaks (orange, green, purple, and cyan) indicated PBMCs that have proliferated several times, respectively(Generation2~5). F: the proliferation rate of PBMCs in co-culture system. The rate of PBMCs under PHA stimulation was defined as 100%. The results were shown as  $\bar{x}\pm s$  of 3 independent experiments. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with PBMCs stimulated by PHA, n.s.: no significant difference.

图5 不同代次hUC-MSCs对淋巴细胞增殖抑制作用

Fig.5 Inhibition of lymphocytes proliferation by different passages of hUC-MSCs

表1 T淋巴细胞在hUC-MSCs作用下细胞周期的比例

Table 1 Proportion of cell cycle in T lymphocytes treated with hUC-MSCs

| 组别            | S期/%         | G <sub>1</sub> 期/%       | G <sub>2</sub> 期/%       |
|---------------|--------------|--------------------------|--------------------------|
| Group         | S period /%  | G <sub>1</sub> period /% | G <sub>2</sub> period /% |
| PBMCs         | 1.25 ± 0.78  | 97.24 ± 1.35             | 1.51 ± 0.62              |
| PBMCs+PHA     | 31.39 ± 1.44 | 64.10 ± 0.72             | 4.51 ± 0.72              |
| +P5 hUC-MSCs  | 2.16 ± 1.89  | 96.24 ± 0.78             | 1.61 ± 1.12              |
| +P10 hUC-MSCs | 2.76 ± 0.45  | 96.32 ± 0.11             | 1.06 ± 0.13              |
| +P15 hUC-MSCs | 2.59 ± 0.25  | 95.86 ± 0.53             | 1.56 ± 0.28              |

Treg(CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>)细胞发现, 与P5和P10代hUC-MSCs共培养能够显著性增加Treg细胞的比例, 而P15代hUC-MSCs则对Treg细胞的分化无影响(图7C)。

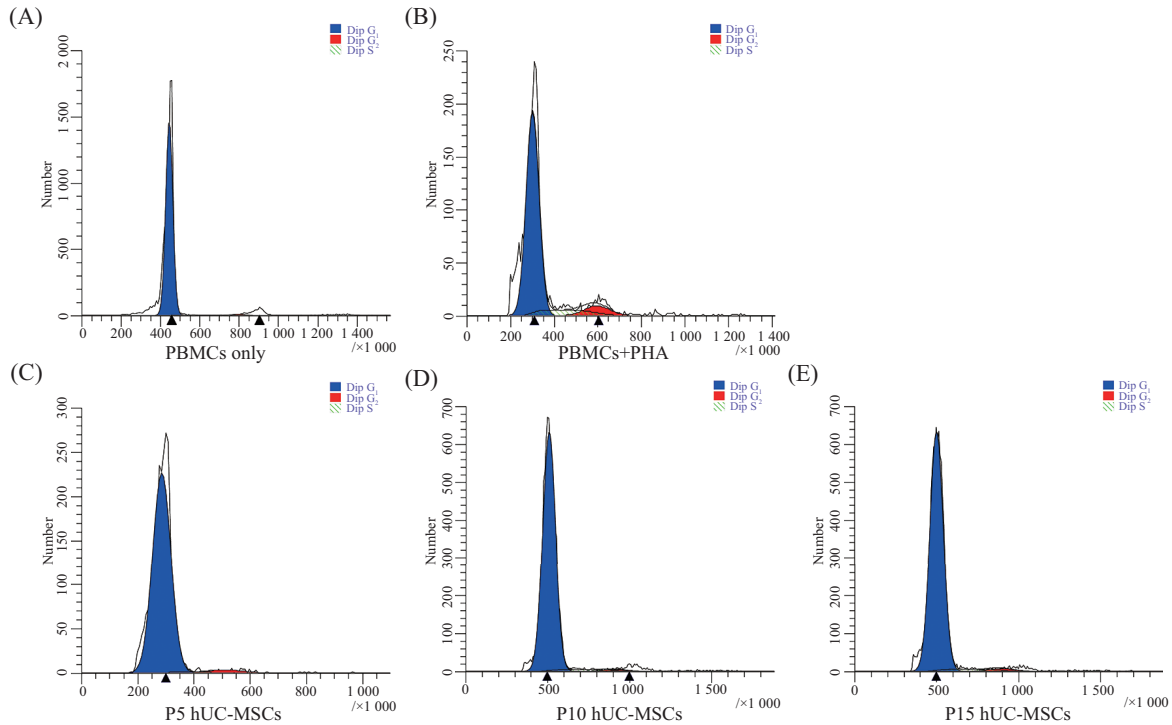
### 2.5 hUC-MSCs抑制PBMCs炎症因子的分泌

MSCs的另一重要功能是能够抑制炎症因子的表达与分泌, 从而发挥免疫抑制与抗炎效应。因此, 我们采用ELISA法检测共培养后上清液中相关炎症因子TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-6的表达水平。结果

显示, 三个代次hUC-MSCs均能够显著抑制PBMCs活化后TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 及IL-6的分泌水平( $P<0.01$ )且无显著差异(图8A、图8B和图8D); 而P15代细胞则表现出对IL-1 $\beta$ 的调节能力降低, 相对而言P5、P10代细胞对共培养体系中IL-1 $\beta$ 的表达仍具有显著抑制作用( $P<0.01$ )(图8C)。

### 2.6 不同代次hUC-MSCs中IDO、PD-L1的表达比较

有文献报道, IDO和PD-L1在介导MSCs对淋

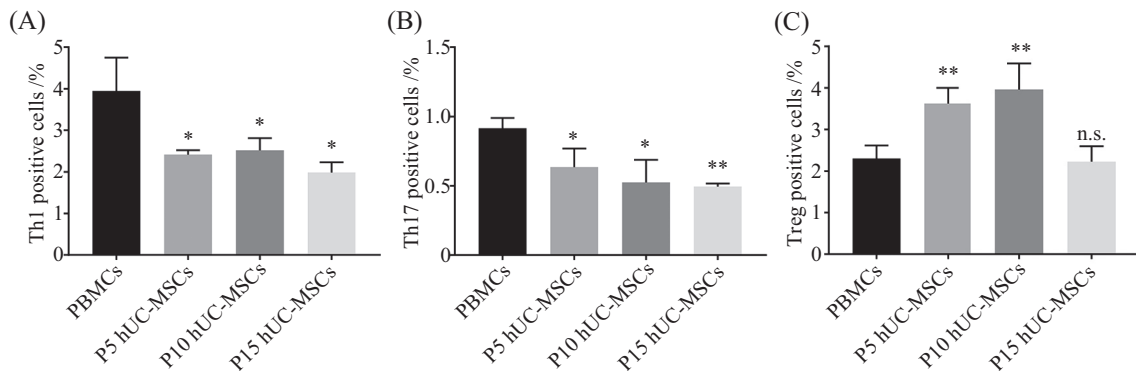


PBMCs静息状态(A)及PHA刺激下(B)单独培养,或分别与P5、P10、P15代hUC-MSCs共培养(C~E)后的细胞周期变化拟合图。不同代次hUC-MSCs均能抑制PHA刺激的淋巴细胞细胞周期向G<sub>2</sub>、S期进展。

PBMCs were fitted without any treatment (A), PHA stimulation (B), or cell cycle changes after co-culture with 5th, 10th, 15th generation hUC-MSCs (C-E). Different passages of hUC-MSCs could inhibit the cell cycle progression of PHA-stimulated lymphocytes to G<sub>2</sub> and S phase.

图6 不同代次hUC-MSCs对T淋巴细胞生长周期的影响

Fig.6 Effects of hUC-MSCs at different passages on T-lymphocytes cell cycle



PBMCs单独培养或与不同代次hUC-MSCs共培养后,流式细胞术分别检测其对CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞中的(A)Th1(CD4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>)细胞亚群、(B)Th17(CD4<sup>+</sup>/Th17A<sup>+</sup>)细胞亚群和(C)Treg(CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>)细胞亚群的调节作用。结果显示为3次独立实验的 $\bar{x}\pm s$ 。\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,与PBMCs单独培养比较,n.s.:无显著性差异。

PBMCs were co-cultured with different passages of hUC-MSCs, and flow cytometry was applied to detect subsets of Th1(CD4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) cells (A), Th17(CD4<sup>+</sup>/Th17A<sup>+</sup>) cells (B) and Treg (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>) cells (C) in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. The results were shown as  $\bar{x}\pm s$  in 3 independent experiments. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with PBMCs only, n.s.: no significant difference.

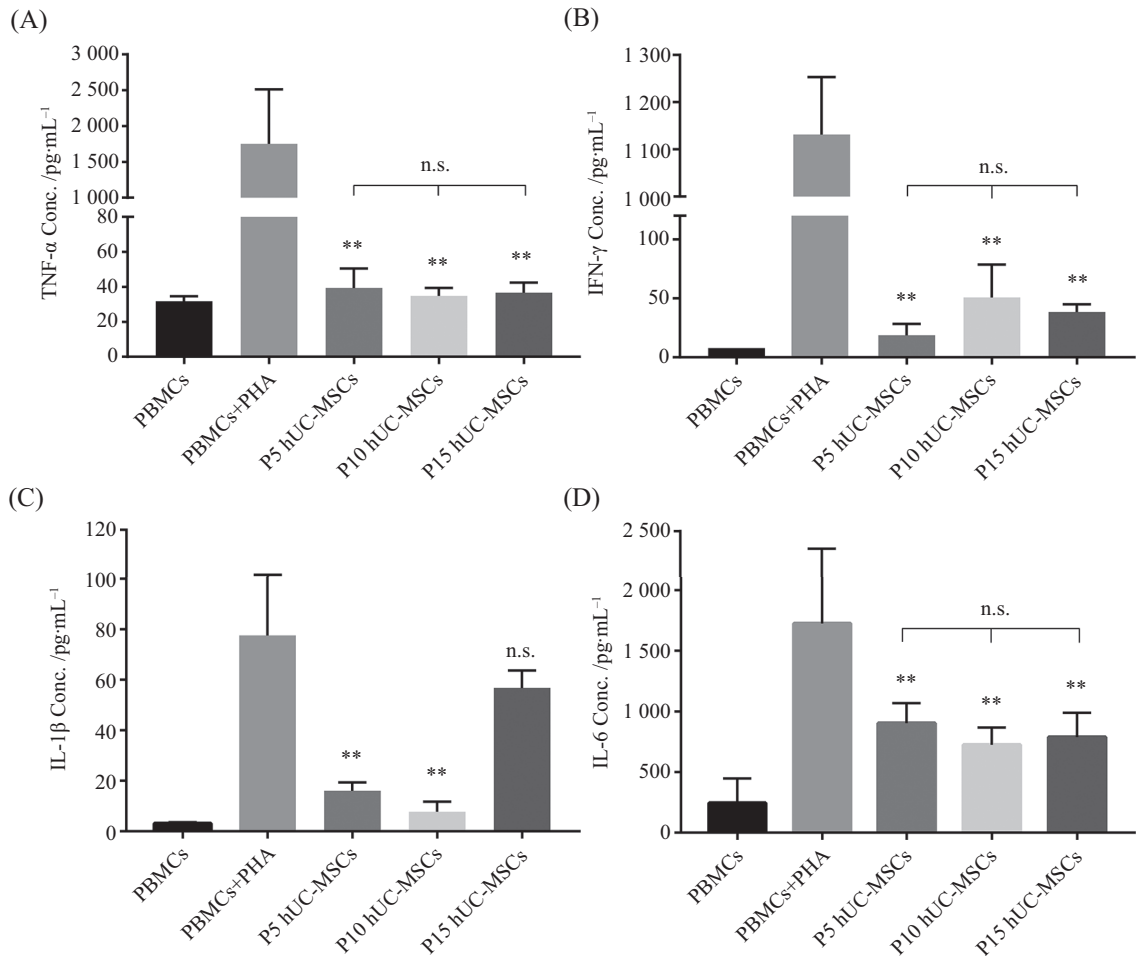
图7 不同代次hUC-MSCs对T淋巴细胞亚群的调节作用比较

Fig.7 Regulation of T lymphocytes subsets by hUC-MSCs at different passages

巴细胞增殖的抑制及T细胞亚群的分化调节中发挥关键性作用<sup>[14,16,23-24]</sup>,我们进一步检测了这两种蛋白在不同代次hUC-MSCs的表达水平。通过向hUC-MSCs培养体系中添加IFN- $\gamma$ 以模拟炎症微环

境下细胞的分泌作用,Western blot结果显示,IFN- $\gamma$ 刺激条件下,hUC-MSCs中IDO的表达显著升高,但对PD-L1无明显影响。IDO和PD-L1的基础表达水平及其对IFN- $\gamma$ 刺激的反应在三个不同代次的hUC-





不同代次hUC-MSCs对PBMCs分泌炎症因子的影响。与PHA活化后的PBMCs相比,三个代次hUC-MSCs均能显著抑制炎症因子TNF- $\alpha$ (A)、IFN- $\gamma$ (B)、IL-6(D)的分泌,且三个代次细胞间的作用效果无显著差异,但P15代细胞表现出对IL-1 $\beta$ 的调节能力下降(C)。结果显示为3次独立实验的 $\bar{x}\pm s$ 。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,与PHA刺激后的PBMCs比较,n.s.:无显著性差异。

Different passages of hUC-MSCs effected on the secretion of inflammatory factors by PBMCs. Compared with PHA-activated PBMCs, hUC-MSCs could significantly inhibit the secretion of inflammatory factors such as TNF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B), and IL-6 (D) without significant difference between 3 passages cells, but the 15th passage cells demonstrated reduced ability to regulate of IL-1 $\beta$  (C).The results were shown as  $\bar{x}\pm s$  in three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with PBMCs stimulated by PHA, n.s.: no significant difference.

图8 不同代次hUC-MSC对炎症因子分泌的影响

Fig.8 hUC-MSCs at different passages affect the secretion of inflammatory factors

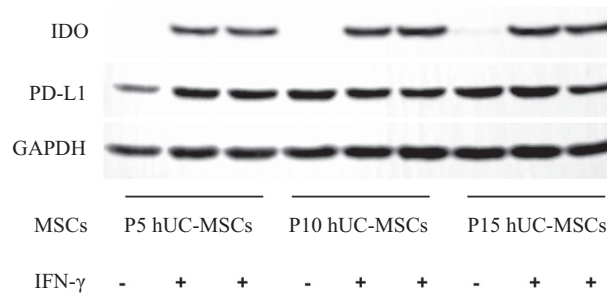
MSCs中均未见明显变化(图9)。

### 3 讨论

间充质干细胞作为一种独特的组织工程产品,兼具药物、生物制品等复合属性,其独特的免疫调节能力为解决众多传统医学难治性疾病带来新的希望。鉴于其自身多样性、复杂性,国际细胞治疗协会(ISCT)于2013年提出,在评价MSC的生物学效应时,需要将其免疫调控功能列于质量控制体系进行规范客观评价<sup>[25]</sup>。本文立足于长期传代培养的间充质干细胞具有稳定的生物学效应的基础上,从淋巴细胞增殖、T淋巴细胞亚群调节以及功能性因子的

表达等方面,对不同代次hUC-MSCs的免疫调节特性进行了系统的比较研究。

尽管有文献报道,间充质干细胞经历长期传代培养后,伴随着衰老细胞数量显著增加,MSCs对同种异体T淋巴细胞的免疫抑制作用显著减弱,细胞因子的表达也有所降低<sup>[22]</sup>。在前期的工作中,我们也关注到较高代次的hUC-MSCs表现出衰老及凋亡特性,且增殖活性有所降低,本研究中,P15代细胞相较于P5和P10代,在抑制淋巴细胞增殖和调节Th1/Th17细胞亚群的免疫活性中并没有表现出显著性差异。值得关注的是,较低代次hUC-MSCs对于淋巴细胞增殖的抑制作用可能更为优异,在多次重复实验中,



蛋白免疫印迹检测到不同代次hUC-MSCs在IFN- $\gamma$ 刺激状态下非组成型表达IDO, 而PD-L1的表达不受IFN- $\gamma$ 影响。-: 未添加IFN- $\gamma$ , +: 培养基中加入IFN- $\gamma$ 对hUC-MSCs进行刺激。

Western Blot showed that different passages of hUC-MSCs expressed non-constitutive IDO under the IFN- $\gamma$  treatment, while PD-L1 was not affected.-: No IFN- $\gamma$  added, +: IFN- $\gamma$  was added to the medium to stimulate hUC-MSCs.

图9 IDO、PD-L1在不同代次hUC-MSCs中的表达

Fig.9 IDO and PD-L1 expression in hUC-MSCs at different passages

我们发现, P5代细胞对来自于不同个体的T淋巴细胞的免疫抑制效果相对较为稳定。

MSCs在体外诱导调节性T细胞的作用机制尚不明确, 目前认为, MSCs通过接触机制衍生的TGF- $\beta$ 、IL-10和PGE2等关键因子<sup>[11]</sup>, 启动和维持FOXP3表达, 诱导CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup>幼稚T细胞转化为CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>调节性T细胞<sup>[23]</sup>。同时有文献表明, 白细胞介素1 $\beta$ 在鼠中过表达进一步导致Treg细胞失调, 且IL-1受体拮抗剂基因敲除鼠来源的MSCs不能促进Tregs的分化<sup>[24,26]</sup>。在本研究中, 相对于P5和P10代次hUC-MSCs, P15代细胞则不能改变初始状态Treg亚群的分布情况, 且表现出对IL-1 $\beta$ 的调节活性减弱, 这提示我们, 长期传代培养所致细胞衰老可能影响hUC-MSCs对IL-1 $\beta$ 的调节并介导Treg细胞亚群调节能力的降低。

研究表明, 由T细胞及其他炎症细胞类型分泌的细胞因子可以活化MSCs, 而活化后的MSCs又通过其免疫调节功能介导TNF- $\alpha$ 及IFN- $\gamma$ 等炎症因子的抑制<sup>[27]</sup>, 在机体发挥抗炎作用。我们的研究结果显示, 三个代次hUC-MSCs均能显著性抑制淋巴细胞TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 及IL-6表达且调节效应上并无显著性差异, 亦符合淋巴细胞增殖的抑制结果。

T淋巴细胞在有丝分裂原刺激下高表达IFN- $\gamma$ , 从而诱导MSCs分泌IDO并介导共培养体系的色氨酸剥夺, 促使T细胞无法合成增殖分化所需要的蛋白, 而色氨酸的代谢产物犬尿氨酸也会进一步诱导T淋巴细胞凋亡<sup>[28]</sup>。我们试图了解不同代次hUC-MSCs在IDO表达上是否有差异。研究结果表明, IFN- $\gamma$ 刺激条件下, 三个代次细胞均能稳定表达IDO,

不受细胞衰老影响, 为不同代次hUC-MSCs均具有良好的淋巴细胞增殖抑制效果提供了依据。而在IFN- $\gamma$ 作用下PD-L1表达并无显著变化, 故其在人脐带间充质干细胞调节中的作用有待进一步研究。

综上所述, 为满足大规模临床应用需要, 人脐带间充质干细胞反复传代培养可能导致细胞衰老, 而我们开展的几项研究验证了hUC-MSCs体外长期培养至P15代时, 其干细胞特性与主要免疫调节功能均未发生显著性改变。鉴于P15代hUC-MSCs的衰老细胞数目明显增多, 且失去对Treg细胞亚群及部分炎症因子的调节作用, 为兼顾细胞扩增需求与保持其稳定免疫调节能力, 我们建议在临床应用中使用较早代次(P10代之前)的间充质干细胞作为工作细胞, 以保证细胞治疗的安全性与有效性。

### 参考文献 (References)

- [1] MONSEL A, ZHU Y G, GENNAI S, et al. Cell-based therapy for acute organ injury: preclinical evidence and ongoing clinical trials using mesenchymal stem cells [J]. *Anesthesiology*, 2014, 121(5): 1099-121.
- [2] SHI Y, WANG Y, LI Q, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(8): 493-507.
- [3] GALIPEAU J, SENSEBE L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(6): 824-33.
- [4] SARGENT A, MILLER R H. MSC Therapeutics in chronic inflammation [J]. *Curr Stem Cell Rep*, 2016, 2(2): 168-73.
- [5] BARCIA R N, SANTOS J M, FILIPE M, et al. What makes umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells superior immunomodulators when compared to bone marrow derived mesenchymal stromal cells [J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 583984.
- [6] YOO K H, JANG I K, LEE M W, et al. Comparison of immuno-

- modulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues [J]. *Cell Immunol*, 2009, 259(2): 150-6.
- [7] BAKSH D, YAO R, TUAN R S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(6): 1384-92.
- [8] WANG Q, YANG Q, WANG Z, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Warton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2016, 12(1): 85-96.
- [9] ISLAM A, URBAROVA I, BRUUN J A, et al. Large-scale secretome analyses unveil the superior immunosuppressive phenotype of umbilical cord stromal cells as compared to other adult mesenchymal stromal cells [J]. *Eur Cell Mater*, 2019, 37: 153-74.
- [10] CHISTIakov D A, KASHIRSKIKH D A, KHOTINA V A, et al. Immune-inflammatory responses in atherosclerosis: the role of myeloid cells [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(11): 1798.
- [11] ENGELA A U, BAAN C C, DOR F J, et al. On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation [J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 126.
- [12] LITTRINGER K, MORESI C, RAKEBRANDT N, et al. Common features of regulatory T cell specialization during Th1 responses [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1344.
- [13] MARINO L, CASTALDI M A, ROSAMILIO R, et al. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: biological properties and therapeutic potential [J]. *Int J Stem Cells*, 2019, 12(2): 218-26.
- [14] CORSELLO T, AMICO G, CORRAO S, et al. Wharton's jelly mesenchymal stromal cells from human umbilical cord: a close-up on immunomodulatory molecules featured *in situ* and *in vitro* [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2019, 15(6): 900-18.
- [15] ZHANG Z, HUANG S, WU S, et al. Clearance of apoptotic cells by mesenchymal stem cells contributes to immunosuppression via PGE2 [J]. *EBioMedicine*, 2019, 45: 341-50.
- [16] DAVIES L C, HELDRING N, KADRI N, et al. Mesenchymal stromal cell secretion of programmed death-1 ligands regulates t cell mediated immunosuppression [J]. *Stem Cells*, 2017, 35(3): 766-76.
- [17] ZHOU C, YANG B, TIAN Y, et al. Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes [J]. *Cell Immunol*, 2011, 272(1): 33-8.
- [18] LARANJEIRA P, PEDROSA M, PEDREIRO S, et al. Effect of human bone marrow mesenchymal stromal cells on cytokine production by peripheral blood naive, memory, and effector T cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 3.
- [19] 张权, 张亚奇, 饶巍, 等. 长期传代培养对人脐带间充质干细胞生物学特性的影响[J]. *中国细胞生物学学报*(ZHANG Q, ZHANG Y Q, RAO W, et al. Characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells after long-term expansion [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2019, 41(1): 42-52.
- [20] 姚惟琦, 武栋成. 一种人脐带间充质干细胞分离培养方法. 中国[P]. 201110261543.5, 2016-12-14.
- [21] DOMINICI M, Le BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-7.
- [22] LI X Y, DING J, ZHENG Z H, et al. Long-term culture *in vitro* impairs the immunosuppressive activity of mesenchymal stem cells on T cells [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(5): 1183-9.
- [23] FU S, ZHANG N, YOPP A C, et al. TGF-beta induces Foxp3<sup>+</sup> T-regulatory cells from CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> precursors [J]. *Am J Transplant*, 2004, 4(10): 1614-27.
- [24] LUZ-CRAWFORD P, DJOUAD F, TOUPET K, et al. Mesenchymal stem cell-derived interleukin 1 receptor antagonist promotes macrophage polarization and inhibits B cell differentiation [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(2): 483-92.
- [25] KRAMPERA M, GALIPEAU J, SHI Y, et al. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells-the International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(9): 1054-61.
- [26] BERTIN-MAGHIT S, PANG D, O'SULLIVAN B, et al. Interleukin-1beta produced in response to islet autoantigen presentation differentiates T-helper 17 cells at the expense of regulatory T-cells: implications for the timing of tolerizing immunotherapy [J]. *Diabetes*, 2011, 60(1): 248-57.
- [27] ANKRUM J A, ONG J F, KARP J M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 252-60.
- [28] LI X, XU Z, BAI J, et al. Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells induce T lymphocyte apoptosis and cell cycle arrest by expression of indoleamine 2,3-dioxygenase [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 7495135.