

人脐带间充质干细胞食蟹猴连续静脉输注后 免疫毒性与免疫调节作用研究

乐茜^{1,2} 张亚奇^{1,2} 周端鹏² 张权² 饶巍² 王尉² 肖翠红² 石亮² 韩兵² 武栋成^{1,2*}

(¹武汉大学基础医学院, 武汉 430072; ²武汉汉密顿生物科技股份有限公司, 武汉 430075)

摘要 该文旨在研究人脐带间充质干细胞在食蟹猴体内的免疫毒性与免疫调节特性。连续14天给予食蟹猴不同剂量(2.0×10^6 个 $\cdot$ kg⁻¹和 2.0×10^7 个 $\cdot$ kg⁻¹)的人脐带间充质干细胞静脉滴注, 检测食蟹猴血清IgG浓度、抗人脐带间充质干细胞抗体、淋巴细胞活化增殖和T细胞亚群的变化, 以及胸腺和脾脏组织学变化。结果显示, 连续14天静脉给予人脐带间充质干细胞对食蟹猴血清IgG浓度无影响, 不刺激动物产生抗人脐带间充质干细胞抗体。人脐带间充质干细胞显著抑制食蟹猴淋巴细胞的活化增殖, 降低CD3⁺T细胞比例, 刺激Treg细胞的增殖分化。组织学检查发现, 部分动物出现与给药相关的胸腺皮质萎缩和脾脏淋巴生发中心增多增大。该研究得出, 人脐带间充质干细胞的免疫毒性极低, 静脉输注后不引起食蟹猴体内免疫排斥等异常反应, 提示其在临床上异体应用的安全性。

关键词 人脐带间充质干细胞; 食蟹猴; 免疫原性; 免疫毒性; 免疫调节

Immunotoxicity and Immunomodulatory Effects of Continuous Intravenous Infusion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Cynomolgus Monkeys

LE Xi^{1,2}, ZHANG Yaqi^{1,2}, ZHOU Duanpeng², ZHANG Quan², RAO Wei², WANG Wei², XIAO Cuihong²,
SHI Liang², HAN Bing², WU Dongcheng^{1,2*}

(¹Wuhan University School of Basic Medical Sciences, Wuhan 430072, China;

²Wuhan Hamilton Biotechnology-Co., LTD, Wuhan 430075, China)

Abstract This article studies the immunotoxicity and immunomodulatory properties of hUC-MSCs (human umbilical cord mesenchymal stem cells) in cynomolgus monkeys. The different doses of hUC-MSCs (2.0×10^6 cells $\cdot$ kg⁻¹ and 2.0×10^7 cells $\cdot$ kg⁻¹) were intravenously administered to cynomolgus monkeys for 14 consecutive days. And then, serum IgG concentration was detected in cynomolgus monkeys, anti-hUC-MSCs antibodies, lymphocyte activation and proliferation, changes in T cell subsets, and histological changes in thymus and spleen. The results showed that intravenous administration of hUC-MSCs for 14 consecutive days had no effects on serum IgG concentration in cynomolgus monkeys, and did not stimulate animals to produce anti-hUC-MSCs antibodies. hUC-MSCs significantly inhibited the activation and proliferation of cynomolgus lymphocytes, decreasing the proportion of CD3⁺T

收稿日期: 2019-12-11 接受日期: 2020-03-16

武汉市科技局前资助项目科技成果转化专项(批准号: 2019030703011513)和武汉市“3551光谷人才计划”资助项目(批准号: 武新管人才(2019)5号)资助的课题

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

Received: December 11, 2019 Accepted: March 16, 2020

This work was supported by Wuhan Science and Technology Bureau's Former Funded Project Special Project for Scientific and Technological Achievement Transformation (Grant No.2019030703011513) and Wuhan City's "3551 Optics Valley Talent Program" Funded Project (Grant No.Wuxinguan Talent (2019) No. 5)

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

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5227>

cells, and stimulated the proliferation and differentiation of Treg cells. Histological examination revealed that some animals developed thymic cortical atrophy and increased spleen lymphagenic center associated with drug administration. The study concludes that the immunotoxicity of hUC-MSCs is extremely low. After intravenous infusion, it does not cause abnormal reactions such as immune rejection in cynomolgus monkeys, suggesting the safety of allogeneic application clinically.

Keywords human umbilical cord mesenchymal stem cells; cynomolgus monkey; immunogenicity; immunotoxicity; immune regulation

间充质干细胞(mesenchymal stem/stromal cells, MSCs)是一类起源于中胚层、具有自我更新增殖与多向分化潜能的成体干细胞,广泛存在于体内多种组织器官,如骨髓、脂肪、皮肤、牙髓等组织中^[1-2]。研究表明, MSCs能够通过向损伤组织器官迁移归巢、定植分化以及旁分泌机制发挥抑制炎症反应、保护损伤组织及促进再生修复作用,成为当前细胞疗法中研究应用最为广泛的一类干细胞^[3-5]。

除了组织损伤保护与再生修复作用外, MSCs的另一重要的生物学特性是其对机体免疫功能的调节作用^[6]。体外研究表明, MSCs能够抑制活化的淋巴细胞增殖,抑制T淋巴细胞Th1、Th17亚群的增殖分化,提升调节性Treg细胞(regulatory T cell, Treg)的比例,并降低免疫细胞的炎症因子,如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)的分泌^[6,7-9],呈现抑制性免疫调节作用。MSCs的这一重要的生物学效应已被应用于治疗与免疫异常相关疾病,如移植物抗宿主病^[10]、系统性红斑狼疮及其并发症^[11-12]、类风湿关节炎^[13]等难治性疾病的临床研究中,并取得一定疗效。然而,对MSCs在活体内,尤其是大剂量反复应用时的免疫毒性反应以及免疫调节作用均尚不十分清楚。

与其他组织(如骨髓、脂肪)来源的MSCs相比,人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)具有更低的免疫原性、更强的多向分化潜能与旁分泌能力^[14-15]。hUC-MSCs分离于产后的脐带“废弃物”,不会对新生儿与产妇有任何伤害,分离培养的细胞产出率高、增殖能力强、速率快,非常适宜于标准化规模化制备与储存,从而成为可随时用于临床治疗的干细胞“药物”^[16]。

我们及其他实验室的体外研究证实,人脐带间充质干细胞同样具有很强的免疫调节作用^[6,7-9]。为进一步了解其在活体内的免疫调节作用与特性,我

们采用不同剂量的人脐带间充质干细胞对非人灵长类动物食蟹猴连续静脉输注,观察其对食蟹猴体液与细胞免疫的影响、可能的免疫毒性反应与活体内的免疫调节作用,为其临床应用的安全性及有效性提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料、试剂

体重2.5~3.5 kg食蟹猴18只,雌雄各半,购于广州悦源动物养殖有限公司(实验动物生产许可证号: SCXK(粤)2015-0038,实验动物使用许可证号码: SYXK(鄂)2016-0090)。本实验所涉及的动物管理、使用和相关操作已得到湖北天勤生物科技有限公司武汉分公司实验动物管理和使用委员会(IACUC)批准。

实验试剂包括:无血清干细胞培养基(美国Lonza公司), RPMI-1640培养液、青-链霉素(美国Hyclone公司),磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)、胎牛血清(美国Gibco公司),不同荧光标记的人干细胞标志CD44、CD73、CD90、CD105、CD19、CD34、CD45、HLA-DR和淋巴细胞表面标志CD3、CD4、CD8、CD25抗体(美国BioLegend公司),成脂、成骨及成软骨诱导培养基(深圳伟通生物科技有限公司), PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser逆转录试剂盒(日本TaKaRa公司),戊巴比妥钠(美国Merck公司),氯化钠注射液(武汉福星生物药业有限公司),植物凝血素(phytohaemagglutinin, PHA)、锥虫蓝(美国Sigma公司)、噻唑蓝(MTT)(德国BioFroxx公司)、淋巴细胞分离液(上海爱必信生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 hUC-MSCs的分离、培养与鉴定 新鲜脐带采集于足月健康剖腹产新生儿,由产妇自愿捐赠并签署知情同意书。脐带采集前产妇经筛选无家族遗传病史,无传染病史并且HBV、HCV、HIV、梅毒

检测阴性。脐带采集后于4℃保存,6 h内完成华通氏胶分离,收集原代hUC-MSCs培养于无血清干细胞培养基中,反复传代至第五代建立工作细胞库^[16-17]。

hUC-MSCs的形态观察与表面标志物鉴定: 将培养的hUC-MSCs置于倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。将收集的hUC-MSCs按每管 1.0×10^6 个 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 重悬于PBS中,分别各加入10 μL 不同荧光素标记的CD19、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105或HLA-DR抗体,避光孵育30 min,流式细胞仪检测各标志物阳性率。

hUC-MSCs的多向分化潜能鉴定^[17]: 将hUC-MSCs常规培养至80%细胞融合度,分别更换成脂肪、成骨或成软骨诱导培养基,每3天更换1次培养基。成脂诱导培养2周、成骨和成软骨诱导3~4周后,分别进行油红O、茜素红及阿利辛兰染色,镜检观察诱导分化。

1.2.2 实验分组和方法 将18只食蟹猴,按体重随机分为3组,每组6只雌雄各半,分别给予低剂量(2.0×10^6 个 $\cdot \text{kg}^{-1}$)、高剂量(2.0×10^7 个 $\cdot \text{kg}^{-1}$) hUC-MSCs,或等体积0.9%氯化钠注射液(10 mL $\cdot \text{kg}^{-1}$ 溶媒对照)静脉滴注,每天1次,连续14天。给药结束后解剖动物。

1.2.3 免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)和抗hUC-MSCs抗体检测 分别于设定的时间采取食蟹猴静脉血,分离血清。采用全自动模块式血液体液分析仪(希森美康XN-1000IV)测定血清中IgG含量。将动物血清依次与hUC-MSCs(1×10^6)和FITC标记兔抗猴IgG(1:200稀释)共孵育后,以未加动物血清的hUC-MSCs为阴性对照,流式细胞仪检测动物血清中是否存在抗hUC-MSCs抗体及抗体滴度。

1.2.4 淋巴细胞分离及增殖实验 采用淋巴细胞分离液从食蟹猴静脉血中分离淋巴细胞,生理盐水洗涤后,重悬计数。以 5×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞浓度加入到96孔培养板,100 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,每组设3个复孔。增殖组加PHA 1 μL (终浓度5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),对照组不加PHA。置5% CO_2 ,37℃培养68 h后加入0.5% MTT溶液20 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,继续培养4 h。轻轻吸取上清液,加入DMSO 150 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,振荡混匀,室温5 min,测定490 nm处的(D)值,计算细胞增殖指数(proliferation index, PI)。

1.2.5 T淋巴细胞亚群检测 每管加入100 μL 抗凝血,分别加入5 μL 不同荧光素标记的CD3、CD4、CD8或CD25单克隆抗体,混匀,室温避光孵育30 min。

每管加入1 mL红细胞裂解液,漩涡混匀,室温避光孵育10 min。每管加入PBS 1 mL,1 200 r/min离心5 min洗涤2次。重悬细胞于0.3 mL PBS,流式细胞仪测定CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺和CD4⁺ CD25⁺细胞百分率(所有比率均表示占总体淋巴细胞的百分比)。

1.2.6 病理学检查 所有动物处死后行系统解剖,肉眼观察各器官和组织有无异常变化,记录病变情况;取胸腺和脾脏标本10%福尔马林固定,常规石蜡包埋、3~5 μm 切片, H&E染色,显微镜下进行组织病理学检查。

1.3 统计学方法

应用SPSS 20.0软件对不同组别动物进行统计学分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,假设检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 hUC-MSCs的鉴定

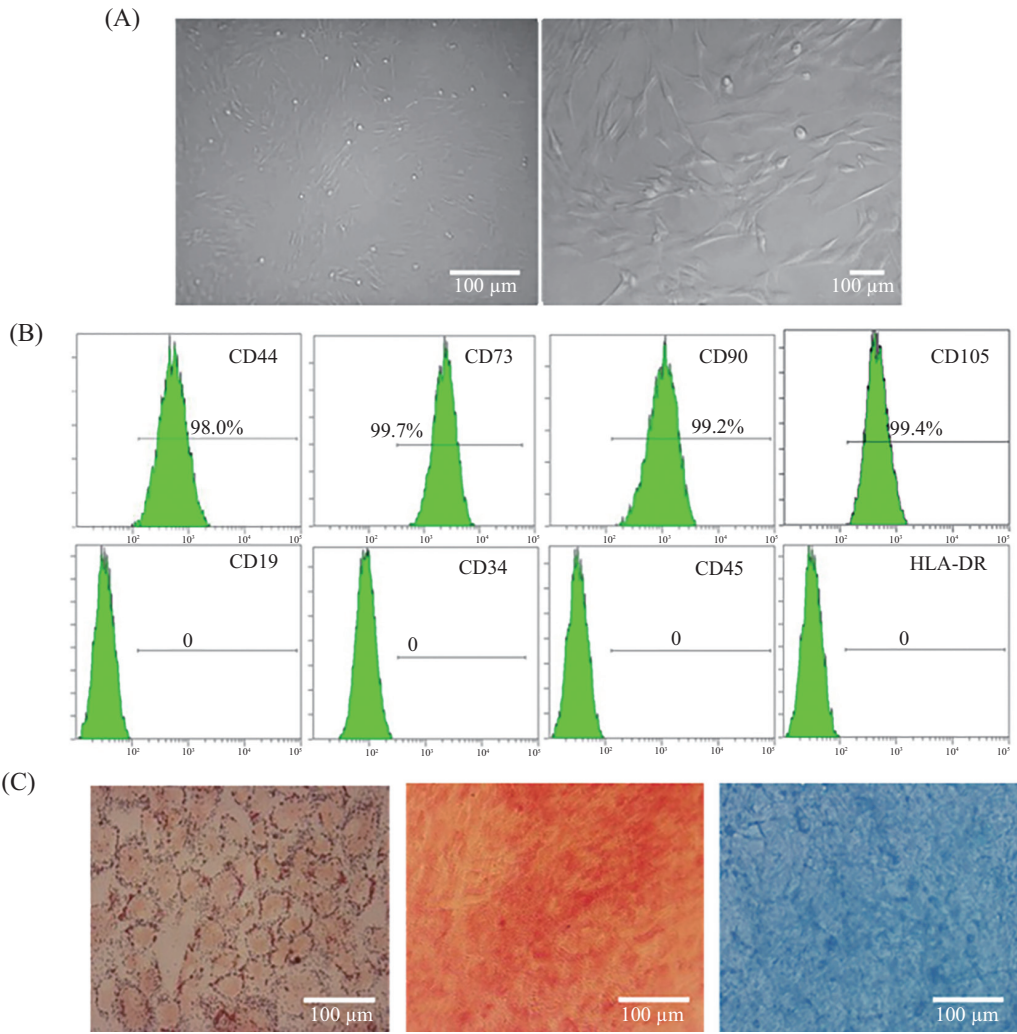
从新鲜脐带分离的hUC-MSCs经过体外培养传代后,具有典型的间充质干细胞形态特征,呈长梭形贴壁生长,轻微涡旋排列(图1A)。流式细胞仪检测显示,细胞表面标物CD44、CD73、CD90和CD105阳性率大于98%,CD19、CD34、CD45以及HLA-DR阳性率小于2%(图1B)。hUC-MSCs经不同的诱导分化培养后分化为脂肪、骨以及软骨,具备成脂肪、成骨以及成软骨能力(图1C)。所有鉴定检测结果与我们既往对hUC-MSCs进行的全面质量检测与生物学鉴定结果相同^[17],符合国际细胞疗法协会规定的间充质干细胞鉴定标准^[18]。

2.2 hUC-MSCs对食蟹猴体液免疫反应的影响

实验用食蟹猴分为3组,分别连续14天静脉给予低剂量(2.0×10^6 个 $\cdot \text{kg}^{-1}$)、高剂量(2.0×10^7 个 $\cdot \text{kg}^{-1}$) hUC-MSCs或溶媒对照。给药前及给药结束,分别留取动物血液样本,检测血清中IgG浓度。结果显示,各组动物给药前后血清IgG浓度无变化,与溶媒对照组比较无差异(图2)。免疫荧光法检测发现,连续14天给药结束时,各组食蟹猴抗hUC-MSCs抗体检测均为阴性(表1)。这些结果提示, hUC-MSCs的免疫原性极低,即使在大剂量连续应用的条件下亦不会引起食蟹猴的急性免疫反应。

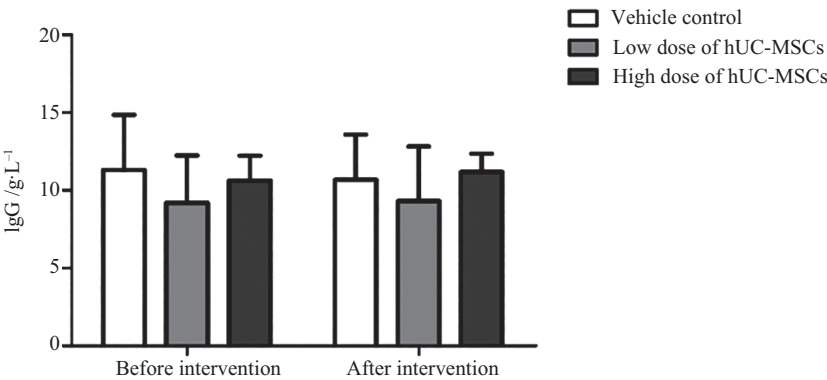
2.3 hUC-MSCs对食蟹猴淋巴细胞增殖及其T细胞亚群的调节作用

为观察hUC-MSCs对非人灵长类动物细胞免疫



A: 分离得到的hUC-MSCs呈长梭形贴壁生长; B: 流式细胞仪检测hUC-MSCs的细胞表面标志物, CD44、CD73、CD90和CD105阳性率均大于98%, CD19、CD34、CD45和HLA-DR阳性率小于2%; C: hUC-MSCs的多种分化潜能(从左至右): 成脂、成骨、成软骨。
A: the isolated hUC-MSCs were observed as long spindle-like fibroblasts and adherently growing; B: flow cytometry was used to detect the cell surface markers of hUC-MSCs, and the positive rates of CD44, CD73, CD90 and CD105 more than 98%. The positive rates of CD19, CD34, CD45 and HLA-DR less than 2%; C: multipotential differentiation potential of hUC-MSCs (from left to right): adipogenic, osteogenesis, cartilage.

图1 hUC-MSCs的生物特性鉴定
Fig.1 Biocharacteristics of hUC-MSCs



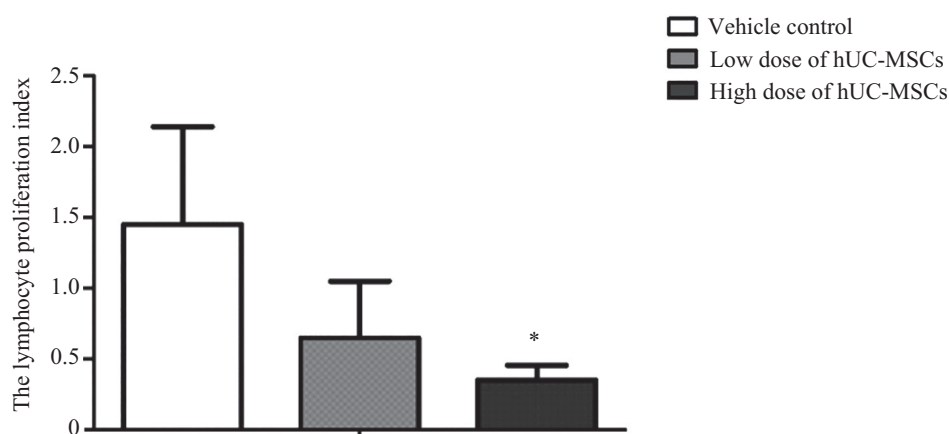
食蟹猴静脉内连续14天输注不同剂量的hUC-MSCs, 对其血清IgG浓度无明显影响。
Different doses of hUC-MSCs administered intravenously for 14 days had no effect on serum IgG concentration in cynomolgus monkeys.

图2 食蟹猴血清IgG浓度检测
Fig.2 Detection of serum IgG concentration in cynomolgus monkeys

表1 食蟹猴抗hUC-MSCs抗体发生率

Table 1 Incidence of anti-hUC-MSCs antibodies in cynomolgus monkeys

检测时间 Time	组别 Group	抗体发生率/% Incidence of anti-hUC-MSCs antibodies /%
4 days after intervention	Vehicle control	0 (n=6)
	Low dose of hUC-MSCs	0 (n=6)
	High dose of hUC-MSCs	0 (n=6)
10 days after intervention	Vehicle control	0 (n=6)
	Low dose of hUC-MSCs	0 (n=6)
	High dose of hUC-MSCs	0 (n=6)
14 days after intervention	Vehicle control	0 (n=6)
	Low dose of hUC-MSCs	0 (n=6)
	High dose of hUC-MSCs	0 (n=6)



hUC-MSC连续静脉输注14天后, 相较于对照组, 低剂量组食蟹猴的淋巴细胞增殖表现出抑制趋势, 而高剂量组表现出明显的抑制作用。
* $P < 0.05$, 与对照组相比。

After administration of hUC-MSCs for 14 consecutive days, compared with the control group, the lymphocyte proliferation of cynomolgus monkeys showed a trend of inhibition in the low-dose group and a significant inhibition in the high-dose group. * $P < 0.05$ compared with control group.

图3 hUC-MSCs抑制食蟹猴淋巴细胞增殖

Fig.3 hUC-MSCs inhibit lymphocyte proliferation in cynomolgus monkeys

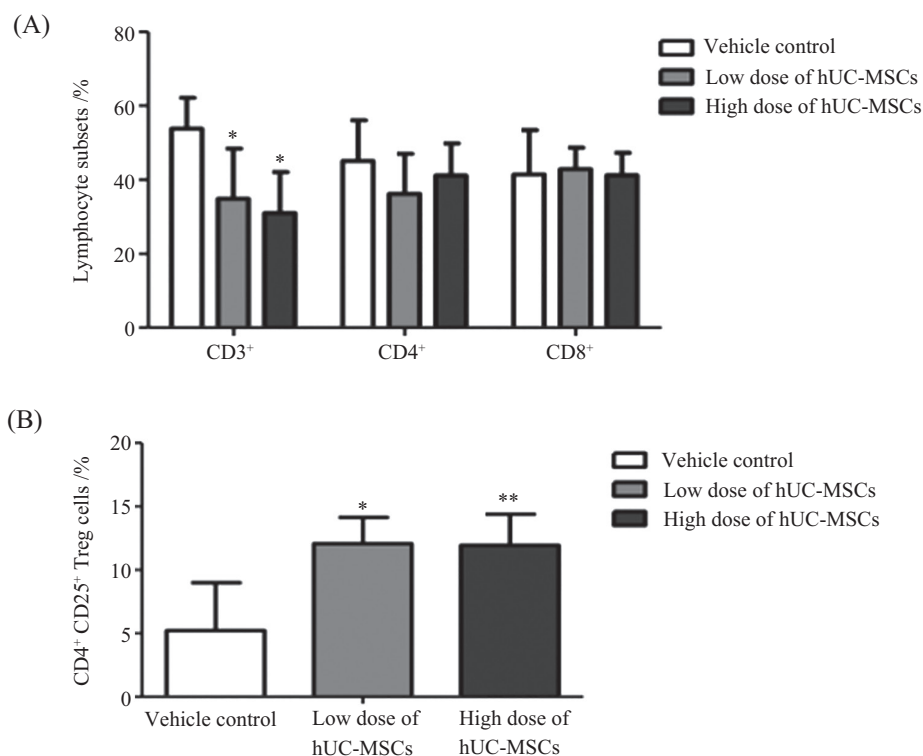
的调节作用, 我们检测了给药后食蟹猴淋巴细胞的增殖能力及其T细胞亚群的比例。采用MTT法检测hUC-MSC对PHA活化的淋巴细胞增殖的影响发现, 与溶媒对照组比较, 给药结束时低剂量组的淋巴细胞增殖能力明显降低, 但差异尚不具备统计学意义($P > 0.05$); 高剂量组的淋巴细胞增殖呈显著性抑制($P < 0.05$)(图3)。

流式细胞检测显示, 连续14天静脉给予hUC-MSCs后, 低剂量组和高剂量组食蟹猴外周血CD3⁺ T淋巴细胞比例均较溶媒对照组显著性降低(分别为 $P < 0.05$); 各组间CD4⁺和CD8⁺ T淋巴细胞比例以及CD4⁺/CD8⁺细胞比值均无显著性差异, 不受hUC-MSCs的影响(图4A)。与溶媒对照组比较, hUC-MSCs低、高剂量组的CD4⁺ CD25⁺ Treg淋巴细胞比

例均呈非常显著性升高($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)(图4)。上述结果提示, hUC-MSCs抑制T淋巴细胞增殖并提升CD4⁺ CD25⁺ Treg淋巴细胞比例, 对食蟹猴的细胞免疫呈抑制性调节作用。

2.4 hUC-MSCs对食蟹猴免疫器官组织的影响

由于hUC-MSCs抑制食蟹猴淋巴细胞的增殖, 降低外周血CD3⁺ T淋巴细胞比例, 我们对接受hUC-MSCs移植的食蟹猴胸腺和脾脏进行了病理组织学检查。结果发现, 连续14天静脉输注hUC-MSCs给药导致低剂量组和高剂量组各有两只动物的胸腺和一只动物的脾脏出现与给药相关的病理改变。胸腺的主要表现为皮质轻微至轻度萎缩、淋巴细胞密度降低、髓质比例增加; 脾脏则呈现白髓淋巴滤泡增多、生发中心增大, 或伴有边缘区或者动脉周围淋



A: hUC-MSCs连续静脉输注14天后, 低剂量和高剂量hUC-MSCs组中CD3⁺ T细胞的比例显著低于对照组。* $P < 0.05$, 与对照组相比; B: 低剂量和高剂量hUC-MSCs组中CD4⁺ CD25⁺ Treg细胞的比例显著高于对照组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组相比。

A: after intravenous administration for 14 consecutive days, the proportion of CD3⁺ T cells in low- and high-dose hUC-MSCs group was significantly lower than that in the control group. * $P < 0.05$ compared with control group; B: while the proportion of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells was significantly higher than that in the control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

图4 hUC-MSCs对食蟹猴T淋巴细胞亚群的调节作用

Fig.4 Regulation of hUC-MSCs on Treg in cynomolgus monkeys

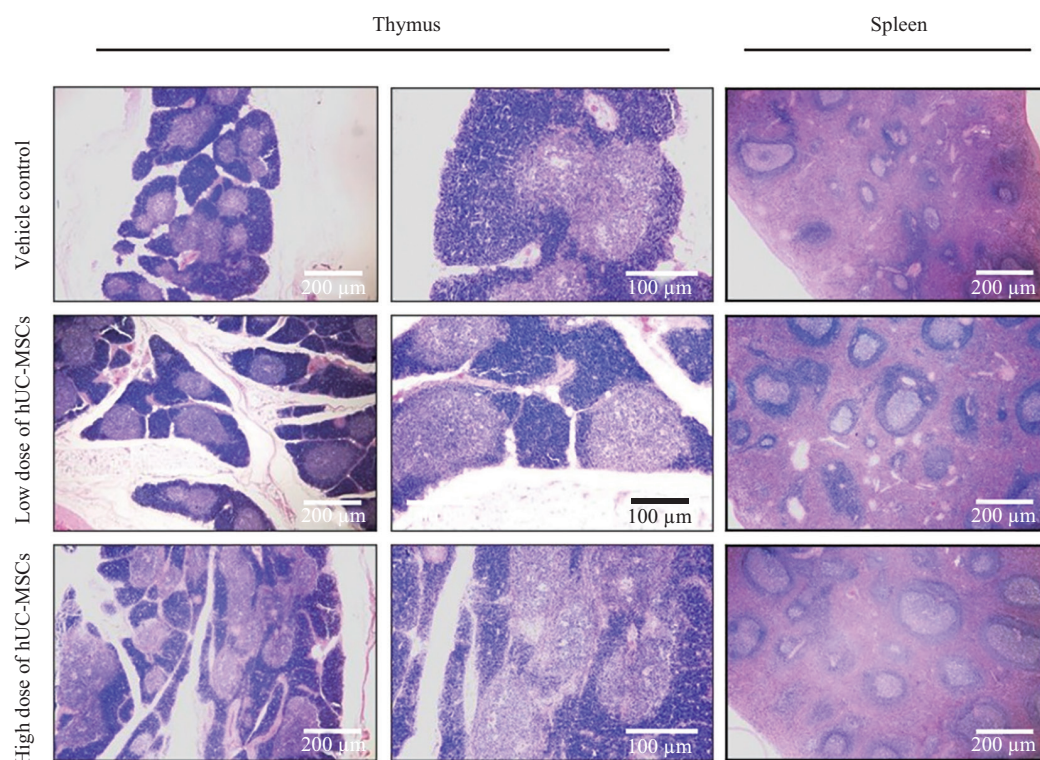
巴鞘淋巴细胞轻微增生(图5)。

3 讨论

本研究中, 我们采用非人灵长类动物食蟹猴给予不同剂量的人脐带间充质干细胞连续14天静脉输注, 以研究其在动物体内的免疫毒性与免疫调节作用。我们的结果显示: (1)人脐带间充质干细胞具有极低的免疫原性。食蟹猴大剂量连续静脉给药动物耐受良好, 对其血清IgG浓度无影响, 未检测到抗hUC-MSCs抗体产生。(2)人脐带间充质干细胞在食蟹猴体内具有较强的抑制性免疫调节作用。连续给予hUC-MSCs显著抑制食蟹猴外周血淋巴细胞的活化增殖, 降低CD3⁺ T淋巴细胞的比例, 提升Treg细胞的比例, 高剂量组CD3⁺ T淋巴细胞比例较低剂量组有下降趋势, 但无统计学差异。(3)人脐带间充质干细胞对食蟹猴淋巴器官组织的影响。连续静脉给药后, 部分动物出现胸腺皮质萎缩、脾脏淋巴滤泡增多生发中心增大。我们的结果显示, 人脐带间充质

干细胞的免疫原性极低, 不会引起异种动物机体的免疫排斥或常免疫反应; 对动物体内的免疫细胞具有很强的抑制性调节作用, 是干细胞疗法临床应用的优选细胞。

人脐带间充质干细胞的免疫调节作用已在体外研究中得到较为充分的证实。与其他组织(如骨髓和脂肪)来源的MSCs相似, 我们和其他实验室采用体外共培养的方法均证实, 人脐带间充质干细胞对包括异体或异种外周血和脾脏细胞在内的免疫细胞增殖具有很强的抑制作用, 抑制率依实验方法的不同从25%到大于50%不等^[9,19]。hUC-MSCs的免疫调节作用还表现在其抑制促炎性淋巴细胞Th1/Th17亚群的增殖与分化^[20], 抑制树突状细胞^[21]、自然杀伤细胞^[22]和巨噬细胞^[23]等免疫细胞的成熟、分化或极化, 抑制其炎症因子的产生与分泌^[24], 同时促进调节性T淋巴细胞Treg的增殖分化^[25]。MSCs的抑制性免疫调节作用已应用于免疫异常相关的疾病, 如移植植物抗宿主病等疾病的动物疾病模型与临床治疗研



在给药结束时收集食蟹猴的胸腺和脾脏标本,并包埋在石蜡包埋的切片中。H&E染色在组织学上进行。与对照组相比,hUC-MSCs组的胸腺皮质萎缩、髓质比例增加。脾脏白髓滤泡增加、生发中心增加,特别是在高剂量组。

The thymus and spleen specimens of cynomolgus monkeys were collected at the end of the administration, and embedded in paraffin-embedded sections. H&E staining was performed histologically. Compared with the control group, the thymus cortex of the hUC-MSCs group was atrophied, and the proportion of medulla was increased; the spleen white pulp follicles increased, and the germinal center increased, especially in the high dose group.

图5 食蟹猴胸腺和脾脏的组织学观察

Fig.5 Histological observation of thymus and spleen of cynomolgus monkeys

究^[10-13],但hUC-MSCs对正常健康动物免疫功能的调节影响鲜见报道。本研究中,我们证实hUC-MSCs对正常健康食蟹猴的免疫功能同样具有很强抑制性调节作用,与体外研究结果一致,支持其应用于临床治疗免疫及炎症相关疾病的有效性。

干细胞疗法的安全性对其是否能够应用于临床治疗至关重要。干细胞,尤其是异体或异种来源的干细胞如hUC-MSCs,体内输注/移植后是否具有免疫毒性或引起免疫排斥反应,是影响其临床应用安全性的关键性因素之一。体内外研究显示,hUC-MSCs具有抑制性免疫调节作用,不刺激免疫细胞的增殖,亦不表达与免疫排斥反应相关的细胞表面分子如MHC II,或共刺激分子如CD80、CD86或CD40等,但表达与抑制免疫排斥相关的组织相容性抗原亚型HLA-G^[9],支持hUC-MSCs能够应用于异体甚至异种个体体内而不会引起免疫排斥或其他异常免疫反应。一项多中心1 000余例MSCs(包括hUC-MSCs)的临床应用安全性荟萃研究显示,无论采用

自体或异体MSCs治疗多种疾病均未发现明显的免疫排斥或其他异常免疫反应^[26]。人源性MSCs被广泛应用于众多的疾病动物模型研究中,但人脐带间充质干细胞在活体内究竟能否引起异常免疫反应尚缺乏深入细致的研究。PONCELET等^[27]发现,异体猪骨髓MSCs在体外无免疫原性,但体内应用时仍能引起机体的免疫反应。CHO^[28]和BEGGS^[29]分别报道,多次大剂量给予猪和狒狒异体MSCs能够诱导动物产生抗异体MSCs抗体,但并不引起受体动物异常的免疫反应,也不影响MSCs的免疫调节作用。本研究中,我们给予食蟹猴常规剂量(2×10^6 个 $\cdot$ kg⁻¹)和10倍于常规剂量(2×10^7 个 $\cdot$ kg⁻¹)的hUC-MSCs连续静脉输注14天,结果发现不同剂量的hUC-MSCs均不引起动物的血清IgG浓度变化,所有动物抗hUC-MSCs抗体检测全部阴性。结合其体内较强的抑制性免疫调节作用,我们的结果证实,人脐带间充质干细胞不会引起异体动物的免疫排斥或异常免疫反应。

鉴于其较强的免疫抑制作用,临床应用hUC-

MSCs时是否会导致机体免疫反应的过度抑制, 进而增加机体的易感性或导致某些疾病, 如肿瘤、白血病的复发也成为干细胞疗法的重要考量因素。曾有报道, MSCs能够增加白血病骨髓移植患者病毒感染的易感性和白血病复发率^[30-32]。然而, 大宗病例的临床试验荟萃分析显示, MSCs(包括hUC-MSCs)治疗组的感染率与对照组无差别, 亦未发现与MSCs治疗相关的肿瘤复发或新发^[29]。本研究中, 我们观察到部分动物出现与连续给予hUC-MSCs相关的胸腺皮质萎缩和脾脏淋巴滤泡增多生发中心增大, 尤以高剂量组为明显。虽然其意义有待进一步的研究阐明, 但推测这些组织变化可能与超常规的大剂量长时间连续静脉给药相关。因此, hUC-MSCs临床应用时有必要依据不同的适应症采用合适的治疗剂量、给药途径与疗程, 并有计划的进行长期随访。

综上所述, 我们的结果证实人脐带间充质干细胞非人灵长类食蟹猴静脉输注后, 不具备免疫毒性, 动物耐受良好, 并在体内发挥抑制性免疫调节作用, 能够安全有效地应用于免疫炎症性疾病的临床治疗。

参考文献 (References)

- PIERDOMENICO L, BONSI L, CALVITTI M, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp [J]. *Transplantation*, 2005, 80: 836-42.
- PUISSANT B, BARREAU C, BOURIN P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Br J Haematol*, 2005, 129: 118-29.
- ELDEMERDASH R F, HAMMAD L N, KAMAL M M, et al. A comparison of Wharton's jelly and cord blood as a source of mesenchymal stem cells for diabetes cell therapy [J]. *Regen Med*, 2015, 10(7): 841-55.
- WONG S P, ROWLEY J E, REDPATH A N, et al. Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 151: 107-20.
- VOLAREVIC V, GAZDIC M, SIMOVIC MARKOVIC B, et al. Mesenchymal stem cell-derived factors: Immunomodulatory effects and therapeutic potential [J]. *Biofactors*, 2017, 43(5): 633-44.
- WANG M, YUAN Q, XIE L. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: Properties and clinical application [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 3057624.
- REN G, ZHANG L, ZHAO X, et al. Mesenchymal stem cell mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2): 141-50.
- AGGARWAL S, PITTENGER M F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [J]. *Blood*, 2005, 105(4): 1815-22.
- WEISS M L, ANDERSON C, MEDICETTY S, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(11): 2865-74.
- FUJII S, MIURA Y, FUJISHIRO A, et al. Graft-versus-host disease amelioration by human bone marrow mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles is associated with peripheral preservation of naive T cell populations [J]. *Stem Cells*, 2018, 36(3): 434-45.
- CHEN C, LIANG J, YAO G, et al. Mesenchymal stem cells up-regulate Treg cells via sHLA-G in SLE patients [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 44: 234-41.
- FATHOLLAHI A, GABALOU N B, ASLANI S. Mesenchymal stem cell transplantation in systemic lupus erythematosus, a mesenchymal stem cell disorder [J]. *Lupus*, 2018, 27(7): 1053-64.
- TYNDALL A, VAN LAAR J M. Stem cell transplantation and mesenchymal cells to treat autoimmune diseases [J]. *Presse Med*, 2016, 45(6 Pt 2): e159-69.
- LIU S, JIA Y, YUAN M, Et al. Repair of osteochondral defects using human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 8760383.
- EL OMAR R, BEROUD J, STOLTZ J F, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014, 20(5): 523-44.
- 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.
- 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.
- 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.
- DI NICOLA M, CARLO-STELLA C, MAGNI M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli [J]. *Blood*, 2002, 99(10): 3838-43.
- LIM J Y, PARK M J, IM K I, et al. Combination cell therapy using mesenchymal stem cells and regulatory T-cells provides a synergistic immunomodulatory effect associated with reciprocal regulation of TH1/TH2 and th17/treg cells in a murine acute graft-versus-host disease model [J]. *Cell Transplant*, 2014, 23(6): 703-14.
- JIANG X X, ZHANG Y, LIU B, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells [J]. *Blood*, 2005, 105(10): 4120-6.
- SOTIROPOULOU P A, PEREZ S A, Gritzapis A D, et al. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(1): 74-85.
- Selleri S, Bifsha P, Civini S, et al. Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by

- metabolic reprogramming [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(21): 30193-210.
- [24] BERNARDO M E, FIBBE W E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(4): 392-402.
- [25] PROCKOP D J. Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(10): 2042-6.
- [26] LALU M M, MCINTYRE L, PUGLIESE C, et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47559.
- [27] PONCELET A J, VERCRUYSE J, SALIEZ A, et al. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response *in vivo* [J]. *Transplantation*, 2007, 83(6): 783-90.
- [28] CHO P S, MESSINA D J, HIRSH E L, et al. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells [J]. *Blood*, 2008, 111(1): 430-8.
- [29] BEGGS K J, LYUBIMOV A, BORNEMAN J N, et al. Immunologic consequences of multiple, high-dose administration of allogeneic mesenchymal stem cells to baboons [J]. *Cell Transplant*, 2006, 15(8/9): 711-21.
- [30] SUNDIN M, ORVELL C, RASMUSSEN I, et al. Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2006, 37(11): 1051-9.
- [31] NING H, YANG F, JIANG M, et al. The correlation between co-transplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: out-come of a pilot clinical study [J]. *Leukemia*, 2008, 22(3): 593-9.
- [32] VIANELLO F, DAZZI F. Mesenchymal stem cells for graft versus host disease: a double-edged sword [J]. *Leukemia*, 2008, 22(3): 463-5.