



姜尔烈, 主任医师, 博士生导师, 主要研究方向为造血干细胞移植基础与临床, 包括移植物抗宿主病的免疫机制、免疫耐受和骨髓造血微环境研究等。中华医学会血液学分会造血干细胞应用学组副组长, 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会委员, 造血干细胞移植与细胞治疗学组副组长, 中国医疗保健国际交流促进会血液学分会委员, 中国老年医学会血液学分会移植感染学术工作委员会委员。天津市血液与再生医学学会副理事长, 天津市抗衰老学会血液病学专业委员会常务委员, 天津市医学会、中西医结合学会血液学分会委员, 天津市医师协会血液内科医师分会委员, 天津市医学会器官移植学分会委员。现担任《中华血液学杂志》、《中国综合临床》、《白血病·淋巴瘤》、《中国感染控制杂志》编委。主持、完成多项国家级课题。



庞爱明, 主任医师, 硕士生导师。现为中国医学科学院血液病医院(血液学研究所)造血干细胞移植中心主任医师, 实验血液学国家重点实验室红系/巨核发育及相关疾病研究团队核心成员。中国抗癌协会医学伦理专业委员会青年委员、天津市血液与再生医学学会理事、北京癌症防治学会止血与血栓专业委员会常委、北京肿瘤学会临床用血专业委员会委员、天津市抗衰老学会心身医学专业委员会委员、嗜血细胞综合征中国专家联盟天津专家协作组组长。Frontier in Medicine-Hematology编委、《生理科学进展》审稿人。现主持多项国家级、市级重点项目。

调节性T细胞及间充质干细胞在急性移植物抗宿主病中的研究进展

郭雯雯 庞爱明* 姜尔烈*

(中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 细胞生态海河实验室, 天津 300020)

摘要 急性移植物抗宿主病(acute graft versus host disease, aGVHD)的一线治疗方案为糖皮质激素, 但药物治疗特异性差, 会增加异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)后感染和复发的风险, 而且激素耐药性移植物抗宿主病的治疗效果欠佳, 目前尚缺乏标准的二线治疗方案。近年来, 随着对具有免疫调节活性细胞的认识, 人们发现此类细胞在aGVHD的防治中可能具有独特的作用, 因而应用免疫调节性细胞治疗aGVHD引起了广泛关注, 其中以调节性T细胞(regulatory T lymphocyte, Treg)和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的研究最为广泛。为更好地了解免疫调节性细胞调控aGVHD的机制以及其临床应用的可行性和有效性, 该文主要就Treg和MSCs生物学特性以及Treg和MSCs在预防与治疗aGVHD中的作用作一综述。

收稿日期: 2021-11-05 接受日期: 2021-12-06

国家自然科学基金(批准号: 82070192)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23909163, E-mail: pangaiming@ihcams.ac.cn; E-mail: jiangerlie@ihcams.ac.cn

Received: November 5, 2021 Accepted: December 6, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82070192)

*Corresponding authors. Tel: +86-22-23909163, E-mail: pangaiming@ihcams.ac.cn; E-mail: jiangerlie@ihcams.ac.cn

关键词 移植抗宿主病; 调节性T细胞; 间充质干细胞; 异基因造血干细胞移植; 细胞疗法

Progress of Regulatory T Lymphocytes and Mesenchymal Stem Cells in Acute Graft Versus Host Disease

GUO Wenwen, PANG Aiming*, JIANG Erjie*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract The first-line treatment of aGVHD (acute graft-versus-host disease) is glucocorticoid, but the specificity of drug therapy is poor, which will increase the risk of infection and relapse after allo-HSCT (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation). Moreover, the outcome of glucocorticoid-resistant GVHD (graft-versus-host disease) is not good, and there is still a lack of standard second-line treatment of aGVHD. Recently, with the understanding of immunomodulatory cells, it has been found that these cells might play a unique role in the prevention and treatment of aGVHD. Therefore, the application of immune cells in the treatment of GVHD has attracted extensive attention. Treg and MSCs are the most widely studied. To better understand the mechanisms of immune regulatory cells regulating GVHD and the feasibility and effectiveness of clinical application, this review mainly reviews the biological characteristics of Treg and MSCs, as well as the research of Treg and MSCs in the therapy of GVHD.

Keywords graft versus host disease; regulatory T lymphocyte; mesenchymal stem cells; allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; adoptive cellular therapy

急性移植抗宿主病(acute graft versus host disease, aGVHD)是异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)后常见的并发症,也是造成移植后患者死亡的主要原因之一^[1]。aGVHD是由于供受者主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)或次要组织相容性复合物(minor histocompatibility antigens, mHAs)之间的差异,供者淋巴细胞攻击受者组织引发的过度的炎症反应。aGVHD通常发生在allo-HSCT后100天内,常见的靶器官为皮肤、肝脏和胃肠道。FERRARA等^[2]将其发病机制归纳为连续的三个阶段:①抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APCs)的活化;②供者T细胞的活化、增殖、分化与迁移;③靶组织的损伤。糖皮质激素作为aGVHD的一线治疗方案,长期使用会造成感染、复发等风险的增加,而且激素难治性aGVHD患者的预后不佳,生存率明显下降^[1]。

具有免疫调节活性的T细胞是一群异质性很高的细胞。其中基于CD4⁺ Foxp3⁺调节性T细胞(regu-

latory T lymphocytes, Treg)的研究最为广泛。除此之外,存在一种T细胞亚群,以表达高水平白介素-10(interleukin-10, IL-10),但转录因子叉头框蛋白3(forkhead box protein 3, Foxp3)表达阴性为特点,此细胞亚群称为1型调节性T细胞(type-1 regulatory T cell, Tr1)^[3]。有研究认为,Tr1是aGVHD中发挥免疫调节功能的重要细胞,aGVHD会因Tr1缺乏而加速发展^[3]。除CD4⁺ Treg之外,CD8⁺ Treg也可抑制过度的炎症反应,调控aGVHD^[4];但关于CD8⁺ Treg的研究相对较少,尚缺乏特异性分子标志物以区分该类细胞,因此不同实验室之间的结果可能存在差异^[4]。同样地,γδ T细胞中也存在具有免疫调节特性的亚群,称为调节性γδ T细胞(regulatory γδ T cells, γδ Treg),以表达γδ T细胞受体(T cell receptors, TCRs)和Foxp3为特点,可在粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)诱导下,发挥免疫抑制功能,降低aGVHD的发生率^[5]。本文主要介绍的是CD4⁺ Foxp3⁺调节性T细胞。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)

是一类起源于中胚层、具有自我更新和多向分化潜能的多能干细胞,可分化为脂肪、骨、软骨、肌肉、肌腱等多种组织细胞。MSCs最先在骨髓中被发现,后经证实几乎在所有组织,如胎盘、脐带、脂肪、肝脏、肾脏等^[6]中都存在MSCs。MSCs具有低免疫原性、免疫调节、促进造血重建及血管再生等功能^[7]。低免疫原性及抑制炎症反应是MSCs应用于GVHD的重要特性。

研究发现,Treg与MSCs在降低aGVHD发生率的同时,复发或感染的风险并未显著增加,移植植物抗白血病效应(graft versus leukemia, GVL)仍然存在^[8-9],这一优势在一定程度上克服了当前药物治疗的缺陷。尽管细胞来源、数量、获取技术等难题需要被解决,以及安全性与有效性需要进一步被验证,但Treg及MSCs在aGVHD的临床应用中仍充满前景。

1 Treg的生物学特性

1.1 Treg的分类

CD4⁺ Treg仅占外周血CD4⁺ T细胞的5%~10%,但在维持外周免疫耐受中发挥重要的作用。根据细胞来源可将Treg分为两类。一是胸腺来源性Treg(thymic Treg, tTreg),又称天然型Treg(natural Treg, nTreg),是CD4⁺胸腺细胞在胸腺发育过程中受到自身抗原刺激产生的;tTreg上表达的TCRs主要识别自身抗原,因此,tTreg在预防自身免疫疾病中有独特的优势。二是外周来源性Treg(peripheral Treg, pTreg)或者诱导型Treg(induced Treg, iTreg),此类细胞是外周血中的naïve CD4⁺ T细胞在细胞因子如转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)和IL-2的参与下,受到抗原刺激分化发育而来,当此过程发生在体内的时,生成的此类细胞称为pTreg;当发生在体外时,其通常称为iTreg。同样地,pTreg上表达的TCRs可特异性识别外来抗原,因此pTreg在针对外来抗原的反应,如黏膜免疫反应中发挥重要的作用。在小鼠中,神经纤毛蛋白1(neuropilin-1, NRP1)特异性表达于nTreg中,因此可用以区分nTreg和pTreg^[10]。通过对NRP1的分析发现,NRP-1^{lo} Treg和NRP-1^{hi} Treg均具有抑制免疫反应的特性,但是NRP-1^{lo} Treg在炎症和淋巴细胞缺乏的环境下,其功能容易受损^[10]。这可能与炎症条件下pTreg中Foxp3表达不稳定有关。但是,目前尚缺乏区分人nTreg和pTreg的特异性分子。Treg特异性去甲基化区域

(Treg-specific demethylated region, TSDR)是Foxp3位点中相对保守的富含CpG的区域,TSDR的去甲基化程度与Foxp3稳定性呈正相关,在nTreg中TSDR完全去甲基化,而在pTreg中TSDR甲基化程度不完全^[11]。目前,针对TSDR的分析是实验室中区分这两类细胞的主要方法。

1.2 Foxp3在Treg中的稳定性

Foxp3特异性表达于Treg中,发挥调控细胞发育、维持细胞稳定性及免疫调节功能的重要作用。缺失性突变或特异性删除Foxp3基因,会导致Treg的缺乏,进而引起严重的自身免疫性疾病^[12]。维持Foxp3基因的稳定表达是Treg发挥免疫调节功能的先决条件。近期的动物实验发现,肝激酶B1(liver kinase b1, LKB1)可抑制STAT4介导的TSDR甲基化,从而促进Foxp3的稳定性表达,维持Treg的免疫抑制功能^[13]。而且,敲除人Treg中的LKB1基因,也可造成Foxp3表达的显著下降^[14]。COBB等^[15]发现在Treg和常规CD4⁺ T细胞(conventional T cells, Tcons)中微小RNAs(microRNAs, miRNAs)表达谱不同,并进一步证实清除miRNAs可以影响Treg在胸腺中的发育,减少外周血中Treg的数量并下调Foxp3的表达。miR-4281可直接与Foxp3启动子中的TATA-盒基序相互作用,显著增加Foxp3表达水平^[16]。

在炎症性微环境下,Treg中Foxp3的表达不稳定,尤其是在iTreg中,Treg失去免疫调节功能甚至转化成效应性T细胞类细胞^[17]。但是目前调控Foxp3稳定性的上游分子尚不清楚,仍然需要更多的研究。

1.3 Treg免疫抑制机制

Treg可通过抑制多种细胞,如T细胞、NK细胞、树突状细胞(dendritic-cells, DCs)等的功能,发挥免疫调节的作用(图1)^[11]。除分泌抑制性细胞因子如IL-10、TGF- β 等抑制效应T细胞(effector T cells, Teffs)的功能外,Treg还可通过分泌穿孔素、颗粒酶等来直接杀伤Teffs^[11]。Teffs的充分活化需要表面分子CD28与抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APCs),主要是与DCs上的CD80/86结合,从而产生刺激信号。Treg组成型表达细胞毒性T淋巴细胞抗原4(cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA-4),一方面CTLA-4对APCs上的CD80/86的亲和力更高,两者的结合可阻碍CD28与CD80/86的识别,影响Teffs的完全活化;另一方面CTLA-4可通过反式内吞作用捕获APCs中的CD80/86至CTLA-4⁺细胞内进行降解,进

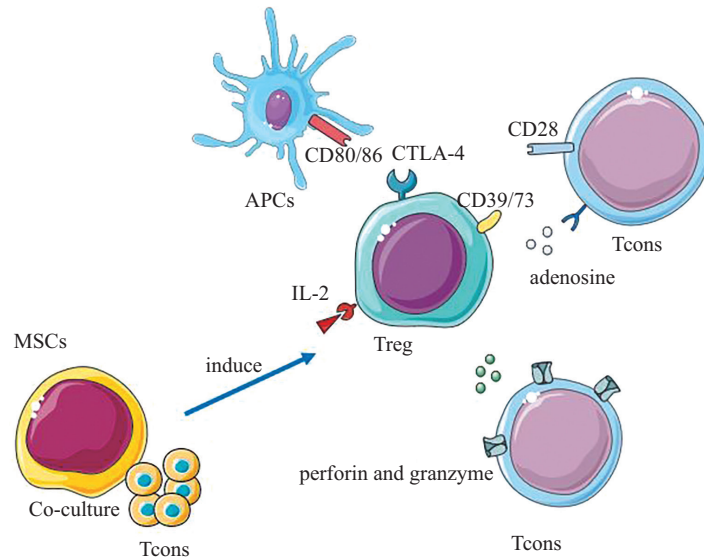


图1 Treg的免疫调节机制图

Fig.1 The immunomodulatory mechanisms of Treg

一步阻碍APCs对Teffs的激活作用^[18]。IL-2对Teffs和Treg的生存和功能都非常重要,由于高表达IL-2受体 α 链(CD25),且Treg对IL-2的反应敏感,因此可大量地消耗IL-2,从而造成局部环境中IL-2的耗竭,导致Teffs的功能因IL-2的缺乏而受到影响^[19]。Treg表达的细胞外酶CD39和CD73,在联合作用下可将促炎介质腺苷三磷酸(adenosine-triphosphate, ATP)转化为抗炎介质腺苷,而腺苷可抑制T细胞的功能,缓解GVHD小鼠的症状^[20]。Treg可增强DCs中吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)的活性,促进色氨酸的分解代谢,而色氨酸是Teffs存活所必需的氨基酸,它的耗竭或其代谢产物犬尿氨酸的积聚,均可加速T细胞的凋亡^[21]。通过对GVHD小鼠模型分析发现,结肠中IDO水平的上调,可降低局部组织中T细胞的生存与增殖能力,减轻GVHD的症状^[21]。Treg的免疫抑制机制复杂,目前尚未阐释清楚,它可能通过多种途径影响GVHD的发生及发展。

2 Treg在GVHD中的应用

1995年SAKAGUCHI等^[22]首次在BALB/cnu⁺小鼠淋巴结和脾脏中发现Treg,可保护胸腺切除小鼠免于出现自身免疫性疾病,维持外周免疫耐受。除自身免疫耐受外,研究发现过继转移Treg至受鼠体内,可降低移植物排斥的发生率,说明Treg在诱导移植耐受中也发挥着重要作用。COHEN等^[23]进一步发现,去除移植物中的Treg可加速aGVHD的发生,

而补充Treg则能延缓甚至避免aGVHD的出现。正是由于Treg的免疫抑制特性,过继输注Treg以减轻allo-HSCT后GVHD的症状及降低其发病率成为该领域研究的热点。表1总结了近几年Treg在allo-HSCT应用中的相关临床试验^[11]。2009年,在第1例过继输注供者来源Treg治疗激素难治性GVHD的临床试验中发现,输注Treg可明显改善慢性GVHD患者预后,但重度aGVHD患者的症状未见明显改善^[24]。随后,一项临床试验发现,过继输注供者来源的Treg可有效预防aGVHD的发生,并且促进移植后免疫重建过程^[25]。目前,关于Treg治疗aGVHD的有效性安全性尚缺乏大规模的临床试验,但动物实验发现,过继输注的Treg可迁移至aGVHD的靶器官及组织,尤其是肠道,发挥免疫抑制的作用,减轻aGVHD造成的组织损伤,进而延长小鼠的生存期^[26]。这表明,过继输注Treg在治疗aGVHD方面仍然具有独特的价值。

除供者来源外,来源于第三方脐带血的Treg也能够明显减轻GVHD小鼠的症状,延长生存期^[27];同样地,临床试验也发现,第三方脐血来源的Treg可有效降低aGVHD的发病率,并且未增加感染或复发的风险^[8]。在此试验中,23例接受双份脐血移植的患者在移植后第1天输注 $0.1 \times 10^5 \sim 30 \times 10^5$ UCB Tregs/kg,同时另有一组患者在移植后第15天接受第2剂量 30×10^5 Tregs/kg,与108例历史对照组相比,输注Treg者,II~IV度aGVHD的发病率下降(43% vs 61%, $P=0.05$)^[8]。

除过继输注Treg外,促进Treg在受者体内增殖,

表1 Treg在造血干细胞移植中应用的主要临床试验(根据参考文献[11]修改)

Table 1 Main clinical trials with Treg in stem cell transplantation (modified from references [11])

序号 Serial number	病例数 Number of patients	分期 Phase	移植类型 Type of transplantation	Treg来源 Sources of Treg	Treg的剂量 Dosage of Treg	目的 Indication	试验编号 Trial ID
1	28	II	Haplo-HSCT	Donor Treg	2×10^6 /kg or 4×10^6 /kg	GVHD prevention	NCT03977103
2	23	I	UCBT	UCB Treg	0.1×10^5 - 30×10^5 /kg	GVHD prevention	NCT00602693
3	43	II	Haplo-HSCT	Donor Treg	Mean 2.5×10^6 /kg	GVHD prevention	NCT03977103
4	33	I	UCBT	UCB Treg	3×10^6 - 100×10^6 /kg	GVHD prevention	NCT00602693
5	12	I/II	MSD allo-HSCT	Donor Treg	1×10^6 /kg- 3×10^6 /kg	GVHD prevention	NCT01660607
6	16	I	MSD allo-HSCT	iTreg	3×10^6 /kg- 10×10^8 /kg	GVHD prevention	NCT01634217
7	50	II	Haplo-HSCT	Donor Treg	2×10^6 /kg	GVHD prevention	NCT03977103
8	35	II	allo-HSCT	Donor Treg	$\geq 0.5 \times 10^6$ /kg	Steroid refractory cGVHD	NCT01903473
9	20	I/II	allo-HSCT	Donor Treg	5×10^5 /kg, 1×10^6 /kg, 2×10^6 /kg	Steroid refractory cGVHD	NCT02749084

Haplo-HSCT: 单倍体相合造血干细胞移植; UCBT: 脐带血移植; MSD: 匹配的同胞捐赠者; cGVHD: 慢性移植抗宿主病。

Haplo-HSCT: haploidentical hematopoietic stem cell transplantation; UCBT: umbilical cord blood transplantation; MSD: matched sibling donor; cGVHD: chronic graft versus host disease.

或许也可解决临床用Treg数量稀少这一问题。在Treg中高表达的CD25对IL-2的亲合力高,低浓度IL-2即可引起Treg的反应。一项纳入16例allo-HSCT患者的临床试验发现,在移植后通过注射超低剂量IL-2(每周3次,皮下注射 1×10^5 单位,持续6~12周),患者体内Treg的百分比从均值4.8%上升至11.1%,而且试验组未观察到II~IV度aGVHD的发生;与之相比,没有接受IL-2的患者,II~IV级aGVHD的发生率为12%(4/33)^[28]。因为IL-2是T细胞生存发育、增殖活化的重要细胞因子,除Treg之外,Tcons也可因IL-2的刺激而发生活化和增殖。TROTTA等^[29]设计出一种靶向IL-2的抗体,与抗体结合后IL-2的构型发生改变,IL-2-抗体复合物在体内可优先选择性扩增Treg,而不是Tcons,降低了小鼠aGVHD的发生率。如何优先扩增体内Treg,增加其在受者体内的数量,延缓aGVHD的发生或发展,可能是将来的研究热点。

3 Treg的其他来源

3.1 第三方来源Treg

目前,Treg常见的来源是健康供者外周血。除外周血Treg数量稀少之外,寻找HLA匹配的健康供者也存在一定的难度。如前所述,动物实验及前期临床试验均表明,第三方来源的脐带血Treg可降低GVHD的发生率^[8,27]。除此之外,儿童心脏手术后,可从废弃的胸腺中分离出大量的Treg,并且此类

Treg稳定地表达Foxp3,即使在炎症环境下胸腺来源Treg仍然具有免疫抑制活性;与从外周血分离、扩增来的Treg相比,能更有效地改善小鼠的aGVHD相关症状^[30]。第三方来源Treg的出现,将为Treg治疗商品化提供新机遇。

3.2 基因工程Treg

嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)技术可跨越HLA分子屏障,使得Treg具有特异性识别细胞中表达蛋白的特性。MACDONALD等^[18]利用CAR技术创造出针对HLA-A2的异基因特异性Treg,即A2-CAR Treg。通过异基因GVHD小鼠模型发现,A2-CAR Treg与多克隆Treg相比,能够显著延缓aGVHD的进展,提高小鼠的生存率^[31]。由于循环中细胞数量多且增殖速率快,CD4⁺ T细胞可被诱导表达A2-CAR和Foxp3,成为A2-CAR Treg的“前体”细胞,进一步解决了Treg需求问题^[32]。通过CRISPR-Cas9技术敲除经典HLA分子,包括HLA I类或HLA II类分子,或使Treg异位表达非典型HLA分子如HLA-E或HLA-G,可减轻Treg的免疫原性,抑制NK细胞的杀伤作用,以逃脱宿主免疫系统的识别;诱导性多能造血干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)可通过基因编辑技术获得最佳的免疫抑制功能,这使得其可能成为普适性Treg的最佳来源^[33]。随着基因工程等技术的发展,生产普适性Treg,即人人都可用的Treg,或许可成为现实。

4 MSCs的生物学特点

4.1 MSCs的功能亚群

MSCs是一群异质性的细胞, 不同来源MSCs的生物学特性有相似性, 但也存在差异性, 主要表现在增殖、分化及生物学功能方面^[34]。血管细胞黏附因子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)即CD106, 可参与T细胞的活化, 促进白细胞募集至炎症部位, 在MSCs发挥其免疫抑制功能的过程中起着重要的作用^[34]。YANG等^[34]发现, CD106在胎盘来源的MSCs表达水平最高, 其次是骨髓来源的MSCs; CD106⁺胎盘MSCs与CD106⁻胎盘MSCs相比, 表达更高水平的与免疫调节和血管生成相关的细胞因子, 对辅助性T细胞亚群的调节更为有效, 可促进其分化为Treg^[34]。

4.2 MSCs的免疫抑制机制

MSCs可通过分泌细胞因子、细胞-细胞接触、分泌外泌体等方式作用于多种免疫细胞, 既能影响固有免疫又能干预适应性免疫。MSCs可直接抑制免疫效应细胞的增殖与功能, 发挥免疫调节作用。MSCs可通过分泌前列腺素E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)和IDO抑制NK细胞增殖, 减少细胞因子产生并且降低其细胞毒性^[35]; 同样地, MSCs也可通过PGE₂抑制T细胞增殖及细胞因子产生, 但并未显著降低其细胞毒性, 这可能与MSCs降低了GVHD发生率, 但保留了GVL效应有关^[9]。除此之外, MSCs也可通过上调程序性死亡受体1(programmed death legend 1, PDL1)的方式抑制T细胞增殖; B细胞的增殖及抗体IgM、IgG和IgA的生成也可被MSCs所抑制, 但B细胞所表达的共刺激分子, 如CD80/CD86、人白细胞DR抗原(human leukocyte antigen DR, HLADR)以及其分泌的细胞因子, 如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、 γ 干扰素(interferon γ , IFN γ)等并未受到明显影响^[35]。

MSCs调控免疫细胞的分化方向, 间接抑制效应细胞的功能, 也是MSCs发挥免疫抑制功能的重要机制。MSCs可上调单核细胞CD206、IL-10和TGF- β 的表达, 增强其吞噬功能, 使其向M2型巨噬细胞方向分化; 并且MSCs可抑制单核细胞向DCs分化^[35]。与MSC共培养后的DCs多低表达CD83, 且处于不成熟状态; 除此之外, DCs中抗原提呈分子(如HLA-DR)与共刺激分子(如CD80和CD86)的表达降低, 倾向于具有免疫耐受性, 降低了抗原提呈功能^[35]。MSCs通过

一氧化氮合成酶2(nitric oxide synthase 2, NOS-2)依赖途径, 诱导骨髓髓系祖细胞分化为具有免疫抑制活性的CD11b⁺髓系细胞, 加快移植后免疫重建速度^[36]。MSCs可减少辅助性T细胞17(T helper 17, Th17)的数量, 调节Th17与Tr1比例的平衡, 抑制T细胞分化所造成的严重的炎症反应, 减轻GVHD的症状^[37]。

MSCs具有诱导Treg生成、促进Treg扩增、增强Treg功能等作用^[38]。Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs), 尤其是TLR3和TLR4在MSCs中表达水平较高。TLR3或TLR4的活化, 可通过Notch信号通路途径, 增强MSCs诱导Treg生成的能力^[39]。经MSCs诱导生成的Treg, 与nTreg相比, 两者有相似的细胞表型、DNA甲基化特征和免疫抑制功能^[40]。MSCs可分泌IL-10、PGE₂和TGF- β 等多种细胞因子促进Treg的生成, 但外泌体在诱导Treg生成方面可能发挥关键性的作用^[41]。其中, MSCs外泌体中miR-21表达的增加, 可促进Treg中Foxp3的表达, 增强Treg稳定性^[42]。向小鼠异种GVHD模型中输注MSCs外泌体, 可增加Treg的数量, 减轻小鼠GVHD的严重程度, 降低其死亡率, 有观点认为MSCs发挥调控GVHD作用, 主要是通过Treg介导的^[41]。近期有研究发现MSCs联合Treg的治疗方案, 比起MSCs或Treg的单一疗法, 抑制创伤性脑损伤后出现的炎症反应的作用更强^[43]。

5 MSCs在GVHD的应用

MSC能够促进组织修复及抑制炎症反应, 是其应用于GVHD重要的理论基础; MSCs的低免疫原性以及骨髓、胎盘、脐带等多种组织中均含有MSCs, 为其作为细胞产品商业化提供了重要条件。2004年, LE BLANC等^[44]用第三方来源的骨髓MSCs治疗了1例儿童激素难治性IV度aGVHD, 结果令人振奋, 患儿的aGVHD症状得以明显改善。一项纳入55例激素难治性、重度aGVHD的II期临床试验发现, 54.5%(30/55)的患者对MSCs治疗反应明显, 且反应者与未反应者相比, 移植相关死亡率明显下降(37% vs 72%, $P=0.002$), 总体生存率显著改善(53% vs 16%, $P=0.018$)。但是, 一项比较了人骨髓MSCs的商品化产品remestemcel-L对激素难治性aGVHD疗效的III期临床试验发现, 与安慰剂组相比, 使用remestemcel-L并未使患者获得更高的GVHD完全缓解率(30% vs 35%, $P=0.42$)^[45]。与骨髓来源的MSCs

相比,脐带血来源的MSCs易获得,且收集方便和扩增能力强,是临床应用的理想来源^[46]。一项纳入21例接受allo-HSCT的重症再生障碍性贫血的临床研究发现,输注脐带血来源的MSCs,重度aGVHD发生率并未增加且所有患者均实现造血干细胞的成功植入^[7]。

目前,最常见的MSCs来源是骨髓和脐带血,但其他组织来源的MSCs也有其功能特点。研究发现,牙龈组织来源的MSCs也具有调节Treg稳定性、减轻GVHD症状的作用,与输注成纤维细胞的小鼠相比,输注MSCs的GVHD小鼠生存率明显提高(87% vs 0%, $P < 0.0001$),并且通过淋巴细胞增殖抑制实验发现,与骨髓来源MSCs和脂肪来源MSCs相比,牙龈组织来源的MSCs在免疫抑制功能和增殖能力方面更有优势^[47]。除分离免疫抑制功能更强的MSCs亚群之外,近年来,能否通过预先处理MSCs,使其功能也得以提高,进而在GVHD防治中发挥更有效的作用,引起了研究者的关注。研究发现,经炎症细胞因子(如IFN γ 、IL-17、IL-1 β 等)处理活化的脐带血来源的MSCs的糖酵解功能及免疫抑制功能明显增强,其能有效缓解GVHD小鼠的症状^[48]。

MSCs从1995年首次作为临床药物应用于人体以来,经过缜密的临床试验设计,最终在加拿大、新西兰、日本等国家被批准作为细胞产品应用于GVHD和其他疾病的治疗^[49],虽经批准,但受多种因素影响,目前MSCs鲜少用于临床试验之外的情况。多个国家III期临床试验的展开,将为MSCs能否作为细胞产品应用于GVHD的防治中提供更多的数据支持。

6 总结与展望

aGVHD是allo-HSCT后常见的并发症,是造成移植后死亡的重要危险因素。糖皮质激素是aGVHD的一线治疗方案,但激素耐药的aGVHD患者预后差,死亡率高。近年来随着对免疫细胞认识的逐渐成熟,细胞疗法在aGVHD中的应用引起了广泛关注。在动物实验与临床试验中均发现, MSCs与Treg在控制aGVHD症状的同时,并未显著增加复发、感染等风险,保留了GVL效应。Treg是一群具有免疫抑制活性的细胞,在维持免疫稳态中发挥重要的作用。其中nTreg稳定性高,免疫抑制功能强,是过继输注的理想产品,但nTreg在外周血中数量稀少,分离扩增

技术复杂且昂贵,一直是阻碍Treg应用于临床的难题之一。iTreg可在体外经诱导产生,因此可克服数量不足的问题,且可诱导出针对特定抗原的iTreg,相比于多克隆Treg,抗原特异性iTreg在发挥免疫抑制功能方面可能更有效。但由于在炎症环境下, Foxp3表达的不稳定性,输注iTreg至受者体内的有效性值得商榷。近年来, CAR Treg的出现,可进一步提高Treg的免疫抑制功能,为解决临床用Treg数量不足提供新的思路。由于MSCs具有低免疫原性、抑炎促修复等特性,因此MSCs一直是国际上“干细胞产品”的研究热点。但是MSCs针对aGVHD治疗的有效性尚需更多的临床数据支持。

参考文献 (References)

- [1] ZEISER R, BLAZAR B R. Acute graft-versus-host disease-bio-logic process, prevention, and therapy [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(22): 2167-79.
- [2] FERRARA J L M, LEVINE J E, REDDY P, et al. Graft-versus-host disease [J]. *Lancet*, 2009, 373(9674): 1550-61.
- [3] ZHANG P, LEE J S, GARTLAN K H, et al. Eomesodermin promotes the development of type 1 regulatory T (T(R)1) cells [J]. *Sci Immunol*, 2017, 2(10): eaah7152.
- [4] BÉZIE S, ANEGON I, GUILLONNEAU C. Advances on CD8⁺ Treg cells and their potential in transplantation [J]. *Transplantation*, 2018, 102(9): 1467-78.
- [5] PETERS C, OBERG H H, KABELITZ D, et al. Phenotype and regulation of immunosuppressive V δ 2-expressing $\gamma\delta$ T cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(10): 1943-60.
- [6] CHENG H Y, ANGELIA M R, LIN C H, et al. Preconditioned mesenchymal stromal cells to improve allotransplantation outcome [J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2325.
- [7] WU Y, CAO Y, LI X, et al. Cotransplantation of haploidentical hematopoietic and umbilical cord mesenchymal stem cells for severe aplastic anemia: successful engraftment and mild GVHD [J]. *Stem Cell Res*, 2014, 12(1): 132-8.
- [8] BRUNSTEIN C G, MILLER J S, CAO Q, et al. Infusion of *ex vivo* expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics [J]. *Blood*, 2011, 117(3): 1061-70.
- [9] AULETTA J J, EID S K, WUTTISARNWATTANA P, et al. Human mesenchymal stromal cells attenuate graft-versus-host disease and maintain graft-versus-leukemia activity following experimental allogeneic bone marrow transplantation [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(2): 601-14.
- [10] YADAV M, LOUVET C, DAVINI D, et al. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 2012, 209(10): 1713-22, s1-19.
- [11] GUO W W, SU X H, WANG M Y, et al. Regulatory T cells in GVHD therapy [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 697854.
- [12] DOMINGUEZ-VILLAR M, HAFLE D A. Regulatory T cells in autoimmune disease [J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(7): 665-73.

- [13] WU D, LUO Y, GUO W, et al. Lkb1 maintains T(reg) cell lineage identity [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15876.
- [14] SU X, WANG Q, GUO W, et al. Loss of Lkb1 impairs Treg function and stability to aggravate graft-versus-host disease after bone marrow transplantation [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(5): 483-95.
- [15] COBB B S, HERTWECK A, SMITH J, et al. A role for Dicer in immune regulation [J]. *J Experiment Med*, 2006, 203(11): 2519-27.
- [16] ZHANG Y, LIU W, CHEN Y, et al. A Cellular microRNA facilitates regulatory T lymphocyte development by targeting the FOXP3 promoter TATA-box motif [J]. *J Immunol*, 2018, 200(3): 1053-63.
- [17] HEFAZI M, BOLIVAR-WAGERS S, BLAZAR B R. Regulatory T cell therapy of graft-versus-host disease: advances and challenges [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9676.
- [18] OVCINNIKOV V, ROSS E M, PETERSON L, et al. CTLA-4-mediated transendocytosis of costimulatory molecules primarily targets migratory dendritic cells [J]. *Sci Immunol*, 2019, 4(35): eaaw0902.
- [19] HEINRICHS J, BASTIAN D, VEERAPATHRAN A, et al. Regulatory T-cell therapy for graft-versus-host disease [J]. *J Immunol Res Ther*, 2016, 1(1): 1-14.
- [20] GERAGHTY N J, WATSON D, SLUYTER R. Pharmacological blockade of the CD39/CD73 pathway but not adenosine receptors augments disease in a humanized mouse model of graft-versus-host disease [J]. *Immunol Cell Biol*, 2019, 97(6): 597-610.
- [21] JASPERSON L K, BUCHER C, PANOSKALTSIS-MORTARI A, et al. Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality [J]. *Blood*, 2009, 114(24): 5062-70.
- [22] SAKAGUCHI S, SAKAGUCHI N, ASANO M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [J]. *J Immunol*, 1995, 155(3): 1151-64.
- [23] COHEN J L, TRENADO A, VASEY D, et al. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: new therapeutics for graft-versus-host disease [J]. *J Experiment Med*, 2002, 196(3): 401-6.
- [24] TRZONKOWSKI P, BIENIASZEWSKA M, JUŚCIŃSKA J, et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human *ex vivo* expanded CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T regulatory cells [J]. *Clin Immunol*, 2009, 133(1): 22-6.
- [25] DI IANNI M, FALZETTI F, CAROTTI A, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation [J]. *Blood*, 2011, 117(14): 3921-8.
- [26] RIEGEL C, BOELD T J, DOSER K, et al. Efficient treatment of murine acute GVHD by *in vitro* expanded donor regulatory T cells [J]. *Leukemia*, 2020, 34(3): 895-908.
- [27] PARMAR S, LIU X, TUNG S S, et al. Third-party umbilical cord blood-derived regulatory T cells prevent xenogenic graft-versus-host disease [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(1): 90-100.
- [28] KENNEDY-NASSER A A, KU S, CASTILLO-CARO P, et al. Ultra low-dose IL-2 for GVHD prophylaxis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation mediates expansion of regulatory T cells without diminishing antiviral and antileukemic activity [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(8): 2215-25.
- [29] TROTTA E, BESSETTE P H, SILVERIA S L, et al. A human anti-IL-2 antibody that potentiates regulatory T cells by a structure-based mechanism [J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 1005-14.
- [30] DIJKE I E, HOEPPLI R E, ELLIS T, et al. Discarded human thymus is a novel source of stable and long-lived therapeutic regulatory t cells [J]. *Am J Transplant*, 2016, 16(1): 58-71.
- [31] MACDONALD K G, HOEPPLI R E, HUANG Q, et al. Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1413-24.
- [32] MARTIN A, DARIS M, JOHNSTON J A, et al. HLA-A*02:01-directed chimeric antigen receptor/forkhead box P3-engineered CD4⁺ T cells adopt a regulatory phenotype and suppress established graft-versus-host disease [J]. *Cytotherapy*, 2021, 23(2): 131-6.
- [33] RAFFIN C, VO L T, BLUESTONE J A. T(reg) cell-based therapies: challenges and perspectives [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(3): 158-72.
- [34] YANG Z X, HAN Z B, JI Y R, et al. CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59354.
- [35] CHEUNG T S, BERTOLINO G M, GIACOMINI C, et al. Mesenchymal stromal cells for graft versus host disease: mechanism-based biomarkers [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1338.
- [36] TRENTO C, MARIGO I, PIEVANI A, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells induce nitric oxide synthase-dependent differentiation of CD11b⁺ cells that expedite hematopoietic recovery [J]. *Haematologica*, 2017, 102(5): 818-25.
- [37] MA Y, WANG Z, ZHANG A, et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells ameliorate GVHD by modulating Th17/Tr1 balance via expression of PD-L2 [J]. *Life Sci*, 2018, 214: 98-105.
- [38] NEGI N, GRIFFIN M D. Effects of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells: current understanding and clinical relevance [J]. *Stem Cells*, 2020, 38(5): 596-605.
- [39] RASHEDI I, GÓMEZ-ARISTIZÁBAL A, WANG X H, et al. TLR3 or TLR4 activation enhances mesenchymal stromal cell-mediated treg induction via notch signaling [J]. *Stem Cells*, 2017, 35(1): 265-75.
- [40] AZEVEDO R I, MINSKAIA E, FERNANDES-PLATZGUMMER A, et al. Mesenchymal stromal cells induce regulatory T cells via epigenetic conversion of human conventional CD4 T cells *in vitro* [J]. *Stem Cells*, 2020, 38(8): 1007-19.
- [41] ZHANG B, YEO R W Y, LAI R C, et al. Mesenchymal stromal cell exosome-enhanced regulatory T-cell production through an antigen-presenting cell-mediated pathway [J]. *Cytotherapy*, 2018, 20(5): 687-96.
- [42] ZHU H, LAN L, ZHANG Y, et al. Epidermal growth factor stimulates exosomal microRNA-21 derived from mesenchymal stem cells to ameliorate aGVHD by modulating regulatory T cells [J]. *FASEB J*, 2020, 34(6): 7372-86.
- [43] CAPLAN H W, PRABHAKARA K S, TOLEDANO FURMAN N E, et al. Combination therapy with Treg and mesenchymal stromal cells enhances potency and attenuation of inflammation after traumatic brain injury compared to monotherapy [J]. *Stem Cells*, 2021, 39(3): 358-70.
- [44] LE BLANC K, RASMUSSEN I, SUNDBERG B, et al. Treat-

- ment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells [J]. *Lancet*, 2004, 363(9419): 1439-41.
- [45] KEBRIAIEI P, HAYES J, DALY A, et al. A phase 3 randomized study of remestemcel-L versus placebo added to second-line therapy in patients with steroid-refractory acute graft-versus-host disease [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2020, 26(5): 835-44.
- [46] YIP H K, FANG W F, LI Y C, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for acute respiratory distress syndrome [J]. *Crit Care Med*, 2020, 48(5): e391-9.
- [47] NI X, XIA Y, ZHOU S, et al. Reduction in murine acute GVHD severity by human gingival tissue-derived mesenchymal stem cells via the CD39 pathways [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(1): 13.
- [48] MENDT M, DAHER M, BASAR R, et al. Metabolic reprogramming of GMP grade cord tissue derived mesenchymal stem cells enhances their suppressive potential in GVHD [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 631353.
- [49] GALIPEAU J, SENSÉBÉ L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(6): 824-33.