

不同浓度骨髓间充质干细胞对大鼠 Treg/Th17 平衡的影响

王凯¹ 李亚光¹ 周春雷² 刘伟³ 吴斌¹ 高伟¹

¹天津市第一中心医院移植外科,天津市器官移植重点实验室,天津市器官移植临床医学研究中心 300192; ²天津市第一中心医院检验科 300192; ³天津市第一中心医院输血科 300192
通信作者:高伟, Email: gao-wei@medmail.com.cn

【摘要】 目的 探讨不同浓度骨髓间充质干细胞(BMSCs)对调节性T细胞/辅助性T细胞17(Treg/Th17)的影响。方法 SPF级雄性Wistar大鼠,选择3周龄、体重约50g大鼠体外分离培养BMSCs,待细胞传代培养至第4代时进行鉴定;另选择6周龄、体重约200g大鼠分离CD4⁺T淋巴细胞,用流式细胞仪检测细胞纯度。按BMSCs细胞浓度分为0.5倍浓度组、基础浓度组、2倍浓度组和4倍浓度组,细胞浓度分别为每孔 1×10^5 、 2×10^5 、 4×10^5 、 8×10^5 个,分别与CD4⁺T淋巴细胞混合培养72h。用流式细胞仪检测各组Treg和Th17细胞比例,用流式微球分析技术检测相关细胞因子含量。结果 BMSCs和CD4⁺T淋巴细胞的纯度均在95%以上。不同浓度BMSCs与CD4⁺T淋巴细胞共培养后,Treg细胞比例在不同浓度BMSCs组间差异有统计学意义($F=10.071, P=0.001$),以2倍浓度组BMSCs对Treg细胞的促增殖作用最强,Treg细胞比例明显高于0.5倍浓度、基础浓度和4倍浓度组[(9.24 ± 2.68)%比(3.87 ± 0.38)%、(5.16 ± 1.69)%、(3.86 ± 0.36)%,均 $P<0.01$]。Treg相关因子白细胞介素-10(IL-10)水平在0.5倍浓度组最低,且明显低于基础浓度、2倍浓度和4倍浓度组(ng/L: 39.80 ± 14.48 比 148.43 ± 64.49 、 156.40 ± 59.27 、 126.92 ± 42.95 ,均 $P<0.05$);转化生长因子- β (TGF- β)水平在基础浓度组最高,且明显高于0.5倍浓度、2倍浓度和4倍浓度组[ng/L: $3.17(1.88, 5.74)$ 比 $0.71(0.32, 1.38)$ 、 $1.22(0.47, 2.97)$ 、 $0.52(0.37, 1.23)$,均 $P<0.05$]。Th17细胞比例在不同浓度组间差异有统计学意义($F=21.069, P=0.000$),以基础浓度组Th17细胞比例最高,且明显高于0.5倍浓度和4倍浓度组[(0.89 ± 0.08)%比(0.64 ± 0.15)%、(0.37 ± 0.10)%,均 $P<0.01$],而与2倍浓度组[(0.83 ± 0.06)%]比较差异无统计学意义($P>0.05$)。Th17相关因子IL-17、IL-6水平在不同浓度组间差异均无统计学意义(IL-17: $\chi^2=0.550, P=0.760$; IL-6: $\chi^2=0.010, P=0.995$)。结论 适中浓度的BMSCs[($2 \sim 4$) $\times 10^5$ 个]对大鼠Treg、Th17细胞均有促进作用,但浓度过高(8×10^5 个)对二者的促进作用则消失;Treg/Th17平衡相关细胞因子与细胞比例的变化是不同步的。

【关键词】 间充质干细胞; 调节性T细胞; 辅助性T细胞17; 大鼠; 细胞因子

基金项目:国家自然科学基金(81570592);天津市自然科学基金(17JCYBJC27500)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.03.006

Role of bone marrow mesenchymal stem cells in different concentrations on regulatory T cell/T-helper cell 17 balance in rats

Wang Kai¹, Li Yaguang¹, Zhou Chunlei², Liu Wei³, Wu Bin¹, Gao Wei¹

¹Department of Transplantation, Tianjin First Center Hospital, Key Laboratory of Organ Transplantation of Tianjin, Tianjin Clinical Research Center for Organ Transplantation, Tianjin 300192, China; ²Department of Clinical Laboratory, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China; ³Department of Blood Transfusion, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Gao Wei, Email: gao-wei@medmail.com.cn

【Abstract】 **Objective** To explore the effects of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in different concentrations on the balance of regulatory T cell/T-helper cell 17 (Treg/Th17). **Methods** BMSCs were isolated from SPF grade male Wistar rats with age of 3 weeks old and weight of 50 g. BMSCs were cultured and identified when they were expanded to the 4th generation. CD4⁺T lymphocytes were isolated from SPF grade male Wistar rat with age of 6 weeks old and weight of 200 g and assayed for cell purity by flow cytometry. BMSCs were divided into 0.5-fold concentration group, basal concentration group, 2-fold concentration group and 4-fold concentration group by their concentrations of 1×10^5 /well, 2×10^5 /well, 4×10^5 /well and 8×10^5 /well, which were cultured with CD4⁺T lymphocytes for 72 hours, respectively. Then the proportion of Treg cells and Th17 cells in each group was detected by flow cytometry, and cytokines were detected by cytometric bead array. **Results** The purities of BMSCs and CD4⁺T lymphocytes were both higher than 95%. In the co-culture of BMSCs and CD4⁺T lymphocytes, the proportions of Treg cells were statistically different among different concentration groups of BMSCs ($F=10.071, P=0.001$), in which BMSCs in 2-fold concentration group had the strongest ability to promote the Treg cells proliferation. The proportion of Treg cells in 2-fold concentration group was significantly higher than that in 0.5-fold concentration group, basal concentration group and 4-fold concentration group [(9.24 ± 2.68)% vs. (3.87 ± 0.38)%, (5.16 ± 1.69)%, (3.86 ± 0.36)%, all $P<0.01$]. The level of interleukin-10 (IL-10) was lowest in 0.5-fold concentration group, and it was significantly lower than that in basal concentration group,

2-fold concentration group and 4-fold concentration group (ng/L: 39.80 ± 14.48 vs. 148.43 ± 64.49 , 156.40 ± 59.27 , 126.92 ± 42.95 , all $P < 0.05$). Transforming growth factor- β (TGF- β) was the highest in basal concentration group, and it was significantly higher than that in 0.5-fold concentration group, 2-fold concentration group and 4-fold concentration group [ng/L: 3.17 (1.88, 5.74) vs. 0.71 (0.32, 1.38), 1.22 (0.47, 2.97), 0.52 (0.37, 1.23), all $P < 0.05$]. The proportions of Th17 cells were statistically different among the different concentration groups ($F = 21.069$, $P = 0.000$), with the highest proportion in basal concentration group which was significantly higher than that in 0.5-fold concentration group or 4-fold concentration group [(0.89 ± 0.08)% vs. (0.64 ± 0.15)%, (0.37 ± 0.10)%, both $P < 0.01$], but no significant difference was found as compared with 2-fold concentration group [(0.83 ± 0.06)%, $P > 0.05$]. However, the expressions of IL-17 and IL-6 were not different among the different concentration groups respectively (IL-17: $\chi^2 = 0.550$, $P = 0.760$; IL-6: $\chi^2 = 0.010$, $P = 0.995$). **Conclusions** BMSCs in moderate concentrations [(2-4) $\times 10^5$ /well] could promote proliferation both in Treg cells and Th17 cells, but no change could be found in higher concentrations of BMSCs (8×10^5 /well). However, the changes in related cytokines were not synchronized with Treg/Th17 cells.

[Key words] Mesenchymal stem cell; Regulatory T cell; T-helper cell 17; Rat; Cytokine

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81570592); Tianjin Municipal Natural Science Foundation (17JCYBJC27500)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.03.006

间充质干细胞(MSCs)是一类具有多向分化潜能的细胞,对幼稚T细胞、树突细胞等免疫细胞的成熟与分化、细胞因子的分泌和表面受体的表达有重要的调节作用^[1]。在幼稚T细胞的分化中,有两类细胞近年来受到了较多的关注,一类是具有抑制炎症免疫应答作用的调节性T细胞(Treg);另一类是具有促炎性作用、可分泌炎症细胞因子的辅助性T细胞17(Th17)。Treg/Th17平衡向Treg细胞倾斜可逃避受者的免疫攻击^[2],维持Treg/Th17平衡有助于维持移植稳态、诱导免疫耐受。本研究拟通过骨髓间充质干细胞(BMSCs)与CD4⁺T淋巴细胞混合培养,探讨BMSCs对Treg/Th17平衡的影响,为MSCs在不同临床条件下的应用提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物:SPF级雄性Wistar大鼠由解放军军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号:SCXK(军)2012-0004。3周龄、体重50g左右的个体用于MSCs的分离和培养;6周龄、体重200g左右的个体用于分离CD4⁺T淋巴细胞。本研究涉及内容及操作均符合动物伦理学标准,并通过天津市第一中心医院医学伦理委员会审批(审批号:2016N062KY)。

1.2 主要实验材料:DMEM/F12培养液、RPMI1640培养液、胎牛血清购自美国Gibco公司,青霉素链霉素双抗购自美国Hyclone公司,大鼠重组白细胞介素-2(IL-2)购自美国PeproTech公司,Von Kossa染色试剂盒购自美国Genmed Scientifics公司,叉头状蛋白3(FoxP3)转录因子染色缓冲试剂盒、IL-17胞内染色缓冲试剂盒、抗大鼠CD4异硫氰酸荧光素(FITC)荧光抗体、抗大鼠CD25多甲藻黄素-叶绿素-蛋白质复合物(PerCP)荧光抗体、抗大鼠FoxP3藻红蛋白(PE)荧光抗体、抗大鼠IL-17 PE荧光抗

体和IL-10、IL-6、IL-17、转化生长因子- β (TGF- β)检测试剂盒均购自美国eBioscience公司,仓鼠抗小鼠CD29 PE荧光抗体、小鼠抗大鼠CD45 PE-Cy7荧光抗体、小鼠抗大鼠CD90别藻蓝蛋白(APC)荧光抗体购自美国BD公司。

1.3 研究方法

1.3.1 BMSCs的提取、培养与鉴定:取50g左右大鼠,颈椎脱臼处死后置于75%乙醇中消毒10min。在超净台中无菌操作得到大鼠股骨和胫骨,以手术剪分别从股骨颈和胫骨踝部将骨剪断,暴露骨髓腔后,以5mL无菌注射器吸取DMEM/F12完全培养液(含有10%胎牛血清和1%青霉素链霉素双抗的DMEM/F12培养液),由关节面进针,将骨髓细胞冲入离心管内,反复冲洗骨髓腔4次后,得到骨髓细胞悬液。然后将细胞悬液转移至75cm²培养瓶中,再加入5mL DMEM/F12完全培养液使培养瓶内骨髓悬液达到20mL,标记培养瓶后置于37℃、5%CO₂、100%湿度的细胞培养箱中培养。72h后首次换液,此后每48h换液1次。当细胞融合至90%时进行传代,传至第4代时标记抗CD29、CD45、CD90抗体,用流式细胞仪检测BMSCs细胞纯度。对同批次细胞用Von Kossa试剂盒染色评估成骨诱导能力,用油红O染色评估成脂肪诱导能力。

1.3.2 CD4⁺T淋巴细胞的提取:取200g左右大鼠,取脾脏,经研磨、离心、获取脾单个核细胞悬液。计数后按比例加入CD4⁺T淋巴细胞磁珠,混匀,避光孵育后,将细胞悬液缓慢加入预先以缓冲液冲洗过的MS分选柱磁柱中。待磁柱内液体即将流尽时,加入缓冲液重复冲洗磁柱3次。取下磁柱以缓冲液冲刷磁柱,即得到所需的CD4⁺T淋巴细胞,计数并应用流式细胞仪检测其细胞纯度。

1.3.3 分组标准:以初始加入6孔板中BMSCs为标准,分别将每孔 1×10^5 、 2×10^5 、 4×10^5 、 8×10^5 个的细胞浓度设置为0.5倍浓度组、基础浓度组、2倍浓度组和4倍浓度组。

1.3.4 BMSCs与CD4⁺T淋巴细胞混合培养:将此获取的BMSCs以不同浓度接种于6孔板,加入培养液后培养48 h。将提取的CD4⁺T淋巴细胞按每孔 2×10^6 个加入含BMSCs的6孔培养板中,并加入5 g/L植物血凝素(PHA)、50 mg/L的IL-2,置于37℃、5% CO₂、100%湿度条件下共同培养72 h。收集培养液,离心取上清液,置于-80℃冰箱低温保存,用于细胞因子检测;离心得到的细胞标记荧光抗体用于流式细胞仪检测。每组细胞另设2个复孔。

1.3.5 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞检测:将收集到的细胞以磷酸盐缓冲液(PBS)重悬后分别加入抗CD4单克隆抗体(mAb)、抗CD25 mAb,避光孵育30 min。离心弃上清液,加入专用破膜固定液1 mL,避光孵育30 min;再次离心后加入Treg固定破膜缓冲液1 mL,离心后加入抗FoxP3 mAb,避光孵育30 min,离心弃上清液,加入PBS,用流式细胞仪检测细胞比例。

1.3.6 CD4⁺IL-17⁺Th17细胞检测:将收集到的细胞以PBS重悬后,加入RPMI1640培养基100 μL与淋巴细胞刺激阻断剂1 μL,混匀后置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中培养6 h。培养结束后加入抗CD4 mAb,避光孵育30 min后,离心弃上清液,分别加入1×PBS缓冲液100 μL、破膜固定液100 μL,避光孵育30 min;加入Th17细胞破膜缓冲液1 μL,离心后加入抗IL-17A mAb 5 μL,避光孵育30 min;经2次离心,加入PBS,用流式细胞仪检测细胞比例。

1.3.7 细胞因子检测:将抗体磁珠稀释后,以每孔50 μL加至96孔板并置于磁力板架上,2 min后弃上清液,以专用洗液清洗1次。将试剂盒中标准品溶解后加入96孔板,按浓度梯度稀释,最后一孔以DMEM/F12完全培养液作为空白对照,6个复孔为一组,设2组以作标准曲线。将样本以每孔50 μL加入剩余复孔内,同时加入25 μL专用缓冲液,孵育2 h使磁珠与相应细胞因子充分结合。孵育完毕后,以专用洗液冲洗3次,加入相应细胞因子抗体的稀释液25 μL,室温避光孵育30 min后,以专用洗液清洗1次,加入50 μL PE染料,置于振荡器孵育30 min;以专用洗液清洗1次,每孔加入120 μL缓冲液,振荡5 min使溶液充分混匀,应用流式微球分析技术检测IL-10、IL-6、IL-17、TGF-β含量。

1.4 统计学处理:用SPSS 19.0软件统计数据。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析。非正态分布计量资料以中位数(四分位数)[$M(Q_L, Q_U)$]表示,多组间比较采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs及CD4⁺T淋巴细胞的鉴定

2.1.1 BMSCs的鉴定:MSCs传至第4代时,细胞呈梭形、排列紧密、形态均一(图1A),在形态学上符合实验要求;BMSCs在成骨诱导2周后,经Von Kossa染色可见黑色钙盐结节(图1B);成脂诱导2周后,经油红O染色可见橘红色的脂滴(图1C)。经流式细胞仪检测,BMSCs细胞表面CD90、CD29、CD45阳性率分别为 $(99.83 \pm 0.01)\%$ 、 $(97.50 \pm 0.10)\%$ 和 $(4.06 \pm 0.47)\%$ 。

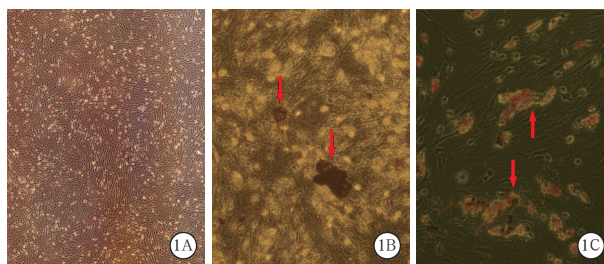
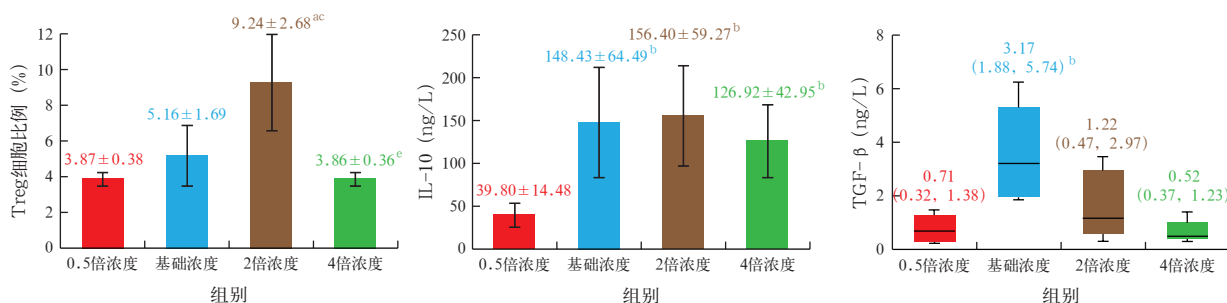


图1 倒置相差显微镜下观察大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)形态学改变 A为细胞传代培养至第4代时,未经染色的BMSCs细胞呈梭形,排列紧密,形态均一,融合情况好,符合BMSCs增殖正常的形态学表现(低倍放大);B为BMSCs在成骨诱导2周后,经Von Kossa染色可见钙盐结节(箭头所示,中倍放大);C为BMSCs在成脂诱导2周后,经油红O染色可见橘红色的脂滴(箭头所示,中倍放大)

2.1.2 CD4⁺T淋巴细胞的鉴定:提取的CD4⁺T淋巴细胞数量约为 $(5.7 \pm 0.3) \times 10^9/L$,细胞纯度在95%以上。表明磁珠提取法符合本实验的技术要求,高纯度的CD4⁺T淋巴细胞可满足实验需求。

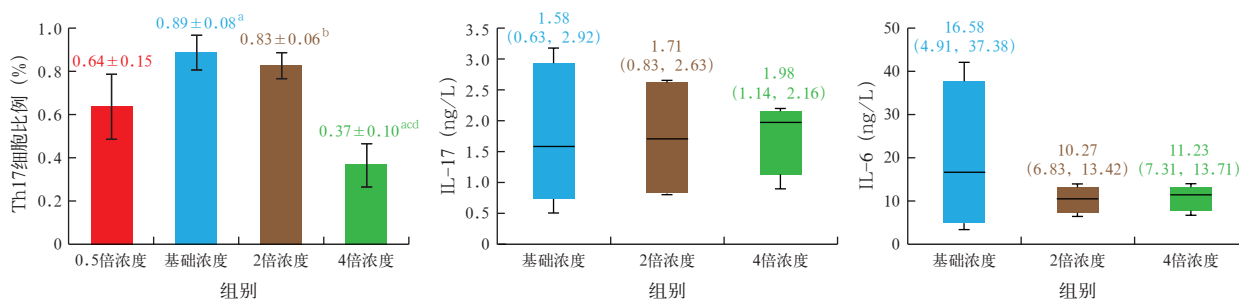
2.2 BMSCs对Treg细胞增殖及相关细胞因子的影响(图2):经混合淋巴细胞培养,不同浓度BMSCs组间Treg细胞比例差异有统计学意义($F=10.071$, $P=0.001$)。2倍浓度组Treg细胞比例最高,与其他3组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),而其他3个浓度组间Treg细胞比例两两比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。说明2倍浓度的BMSCs对Treg细胞的促增殖作用最强。

IL-10水平在不同浓度组间差异有统计学意义($F=4.713$, $P=0.021$)。0.5倍浓度组IL-10水平明显低于其他3个浓度组(均 $P < 0.05$),而其他3个浓度组间两两比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。



注:0.5倍浓度组、基础浓度组、2倍浓度组、4倍浓度组骨髓间充质干细胞(BMSCs)浓度分别为每孔 1×10^5 、 2×10^5 、 4×10^5 和 8×10^5 个; Treg 为调节性 T 细胞, IL-10 为白细胞介素-10, TGF- β 为转化生长因子- β ; 与 0.5 倍浓度组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与基础浓度组比较, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$; 与 2 倍浓度组比较, ^e $P < 0.01$

图 2 不同浓度大鼠 BMSCs 与 CD4⁺T 淋巴细胞共培养各组 Treg 细胞比例及相关细胞因子水平比较



注:0.5倍浓度组、基础浓度组、2倍浓度组、4倍浓度组骨髓间充质干细胞(BMSCs)浓度分别为每孔 1×10^5 、 2×10^5 、 4×10^5 和 8×10^5 个; Th17 为调节性 T 细胞, IL-17 为白细胞介素-17, IL-6 为白细胞介素-6; 与 0.5 倍浓度组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与基础浓度组比较, ^c $P < 0.01$; 与 2 倍浓度组比较, ^d $P < 0.01$; 0.5 倍浓度组 IL-17、IL-6 水平未测出

图 3 不同浓度大鼠 BMSCs 与 CD4⁺T 淋巴细胞共培养各组 Th17 细胞比例及相关细胞因子水平比较

TGF- β 水平在不同浓度组间差异亦有统计学意义 ($\chi^2=8.280, P=0.041$)。0.5 倍浓度组 TGF- β 水平明显低于基础浓度组 ($P < 0.05$), 但与其他组间两两比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。4 倍浓度组 TGF- β 水平最低, 但仅与基础浓度组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 BMSCs 对 Th17 细胞分化及相关细胞因子的影响 (图 3): 经混合淋巴细胞培养, Th17 细胞比例在不同浓度 BMSCs 组间差异有统计学意义 ($F=21.069, P=0.000$)。基础浓度组 Th17 细胞比例最高, 且明显高于 0.5 倍浓度组和 4 倍浓度组 (均 $P < 0.01$), 但与 2 倍浓度组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。0.5 倍浓度组 Th17 细胞比例明显低于 2 倍浓度组 ($P < 0.05$), 但明显高于 4 倍浓度组 ($P < 0.01$)。IL-17、IL-6 水平在各浓度组间比较差异均无统计学意义 (IL-17: $\chi^2=0.550, P=0.760$; IL-6: $\chi^2=0.010, P=0.995$)。

3 讨论

MSCs 是一类具有强大增殖能力与多向分化潜能的干细胞, 可从骨髓、脂肪组织、胎盘、羊水中获得, 一般在细胞表面阳性表达 CD29、CD73、CD90、CD105、CD146 等, 弱表达 CD34、CD45、CD14^[3]。

MSCs 可通过细胞间的相互作用、产生的细胞

因子抑制 T 细胞的增殖及其免疫反应。在大鼠肝移植中, 研究者发现他克莫司联合 MSCs 治疗组大鼠存活时间、肝功能恢复情况均优于未使用免疫抑制剂组和标准剂量他克莫司治疗组, 且 TGF- β 、IL-10 的表达也增高^[4]。表明 MSCs 具有强大的免疫抑制和免疫调节功能。在移植免疫中, 维持 Treg/Th17 平衡有助于维持移植稳态, 甚至诱导免疫耐受。以 Th17 细胞为主的 Treg/Th17 失衡及 IL-17 可能是移植排斥反应机制之一^[5]。因此, MSCs 的免疫特性对 Treg/Th17 平衡的影响及其程度成为研究热点之一。

MSCs 通过多种机制发挥对 Treg/Th17 细胞的调节作用。MSCs 可通过 Toll 样受体 (TLR) 诱导 CD4⁺T 淋巴细胞分化为 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg。Rashedi 等^[6]预先使用聚肌苷酸胞苷酸激活 TLR, 发现 MSCs 与 CD4⁺T 淋巴细胞共培养后 Treg 比例较未激活 TLR 的细胞显著升高; 敲除 TLR 基因亦无法表现其对 Treg 增殖和分泌功能的促进作用。致炎细胞因子对 MSCs 的活化作用主要是通过激活 TLR3 实现, 从而使 MSCs 转化为免疫抑制性的表型, 抑制 T 细胞活化与增殖, 因此在体内炎症环境中, MSCs 受到炎症相关细胞因子活化后, 通过分泌 IL-10、半乳凝素-1 等抗炎因子来发挥其对 T 细胞活化与增殖的抑制作

用^[7]。此外, MSCs 还可通过分泌 TGF-β、前列腺素、IL-10 等抗炎细胞因子来促进 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg 增殖和分化,使 Treg 比例升高^[8]。TGF-β/Smad 信号通路也是调控 Treg/Th17 失衡的途径之一^[9]。IL-10 是 MSCs 影响 Th17 分化的重要细胞因子,通过阻断 MSCs 与 Th0 细胞培养中的 IL-10 信号通路可使 Th17 细胞比例上升,这一过程通过细胞因子信号抑制物-3(SOCS-3)、信号转导及转录激活因子 3(STAT3)及孤儿核受体 γt(ROR γt)实现^[10-11]。

MSCs 对 Treg/Th17 平衡的影响主要是促进 Treg 细胞增殖与转化、抑制 Th17 细胞增生及相关细胞因子分泌。Liu 等^[12]发现,在 BMSCs 与 T 细胞的体外培养中, BMSCs 可显著提高 Treg 比例,诱导 CD4⁺CD25⁻细胞向 Treg 分化,增加 FoxP3 表达。将 MSCs 与大鼠 T 细胞共培养时, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg 细胞水平升高,并伴有 Th17 水平降低^[13]。在人牙髓 MSCs 与 CD4⁺T 细胞共培养时, Th17 细胞比例显著降低,并伴有细胞因子 IL-17a 显著降低,而 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg 细胞比例明显升高,提示 MSCs 不仅可以抑制 Th17 细胞增殖、促进 T 细胞向 Treg 细胞分化,同时也可抑制 Th17 细胞的分泌功能^[14]。

但在既往研究中也存在相反观点。乔淑凯等^[15]研究发现,不同浓度 BMSCs 对 Treg 的诱导作用无差异。Rozenberg 等^[16]在对人 MSCs 与外周血单核细胞的共同培养中发现, MSCs 促进了 Th17 的应答水平, Th17 水平出现升高。

本研究显示, BMSCs 浓度对 Treg/Th17 平衡影响较大,对二者均有一定促进作用,但 BMSCs 浓度与 Treg、Th17 细胞比例不存在正相关。在较低 BMSCs 浓度(1×10⁵个)时, Th17 即可出现增殖加速,而 Treg 细胞增殖高峰则稍迟于 Th17 细胞。但在 BMSCs 浓度过高(8×10⁵个)时, Treg、Th17 细胞比例均明显下降。在 BMSCs 作用下, Treg/Th17 平衡中相关细胞因子变化并不明显,且与 Treg、Th17 细胞比例的变化是不同步的,可能与 MSCs 在调节过程中自身分泌 TGF-β、IL-10 等因子有关。

综上, BMSCs 对 Treg 细胞与 Th17 细胞的增殖均有一定促进作用,但高浓度 BMSCs 则对二者产生抑制作用。BMSCs 对于 Th17 细胞的作用在较低浓度即可出现,而对 Treg 细胞的促进作用则需稍高浓度。掌握合适的浓度、调控 Treg/Th17 平衡向有利于移植耐受的方向发展,是我们今后需完善的内容。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Mohammadpour H, Pourfathollah AA, Zarif MN, et al. TNF-α modulates the immunosuppressive effects of MSCs on dendritic cells and T cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28 (2): 1009-1017. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.07.045.

[2] 吐尔洪江·吐逊,单骄宇,李涛,等. Th17 细胞和调节性 T 细胞在肝包虫病免疫逃避中的作用 [J]. *中华消化外科杂志*, 2010, 9 (4): 283-286. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2010.04.015.

Turgun TS, Shan JY, Li T, et al. Effect of Th17 cells and Treg cells on immune evasion in patients with hepatic hydatid disease [J]. *Chin J Dig Surg*, 2010, 9 (4): 283-286. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2010.04.015.

[3] Saeed H, Ahsan M, Saleem Z, et al. Mesenchymal stem cells (MSCs) as skeletal therapeutics: an update [J]. *J Biomed Sci*, 2016, 23: 41. DOI: 10.1186/s12929-016-0254-3.

[4] Sun Z, Li T, Wen H, et al. Immunological effect induced by mesenchymal stem cells in a rat liver transplantation model [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10 (2): 401-406. DOI: 10.3892/etm.2015.2551.

[5] Zhou Y, Yang X, Zhang H, et al. The roles of T helper type 17 regulatory T cells in acute rejection after liver transplantation in rats [J]. *Transplantation*, 2015, 99 (6): 1126-1131. DOI: 10.1097/TP.0000000000000666.

[6] Rashedi I, Gómez-Aristizábal A, Wang XH, et al. TLR3 or TLR4 activation enhances mesenchymal stromal cell-mediated Treg induction via Notch signaling [J]. *Stem Cells*, 2017, 35 (1): 265-275. DOI: 10.1002/stem.2485.

[7] Sioud M, Mobergslie A, Boudabous A, et al. Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation [J]. *Scand J Immunol*, 2010, 71 (4): 267-274. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2010.02378.x.

[8] Chen W, Huang Y, Han J, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome [J]. *Immunol Res*, 2016, 64 (4): 831-840. DOI: 10.1007/s12026-016-8798-6.

[9] 孙宏,刘显东,吕迪宇,等. 转化生长因子-β/Smad 信号通路对急性肺损伤小鼠免疫平衡的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28 (11): 967-972. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.11.004.

Sun H, Liu XD, Lyu DY, et al. Regulatory role of transforming growth factor-β/Smad pathway on immune imbalance in a mouse model of acute lung injury [J]. *Chin Crit Care Med*, 2016, 28 (11): 967-972. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.11.004.

[10] Qu X, Liu X, Cheng K, et al. Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion [J]. *Exp Hematol*, 2012, 40 (9): 761-770. DOI: 10.1016/j.exphem.2012.05.006.

[11] 王成阳,刘向国,彭青和,等. Foxp3/Treg 与 ROR γt/Th17 细胞失衡在慢性阻塞性肺疾病大鼠中的作用 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (12): 860-864. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.12.003.

Wang CY, Liu XG, Peng QH, et al. Role of Foxp3/Treg and ROR γt/Th17 cell imbalance in rat model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin Crit Care Med*, 2014, 26 (12): 860-864. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.12.003.

[12] Liu X, Ren S, Qu X, et al. Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cells differentiation via IFN-γ-mediated SOCS3 activation [J]. *Immunol Res*, 2015, 61 (3): 219-229. DOI: 10.1007/s12026-014-8612-2.

[13] Tang J, Yang R, Lv L, et al. Transforming growth factor-β-expressing mesenchymal stem cells induce local tolerance in a rat liver transplantation model of acute rejection [J]. *Stem Cells*, 2016, 34 (11): 2681-2692. DOI: 10.1002/stem.2437.

[14] Özdemir AT, Özgül Özdemir RB, Kırmaz C, et al. The paracrine immunomodulatory interactions between the human dental pulp derived mesenchymal stem cells and CD4 T cell subsets [J]. *Cell Immunol*, 2016, 310: 108-115. DOI: 10.1016/j.cellimm.2016.08.008.

[15] 乔淑凯,郭晓楠,任金海,等. 骨密度来源间充质干细胞对小鼠 T 细胞增殖、分化及其表面趋化因子受体表达的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32 (1): 37-41. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2016.01.008.

Qiao SK, Guo XN, Ren JH, et al. Effects of allogeneic compact bone derived-mesenchymal stem cell on proliferation, differentiation and chemokine receptor expression of T cells [J]. *Chin J Immunol*, 2016, 32 (1): 37-41. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2016.01.008.

[16] Rozenberg A, Rezk A, Boivin MN, et al. Human mesenchymal stem cells impact Th17 and Th1 responses through a prostaglandin E₂ and myeloid-dependent mechanism [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5 (11): 1506-1514. DOI: 10.5966/sctm.2015-0243.

(收稿日期: 2018-11-05)