

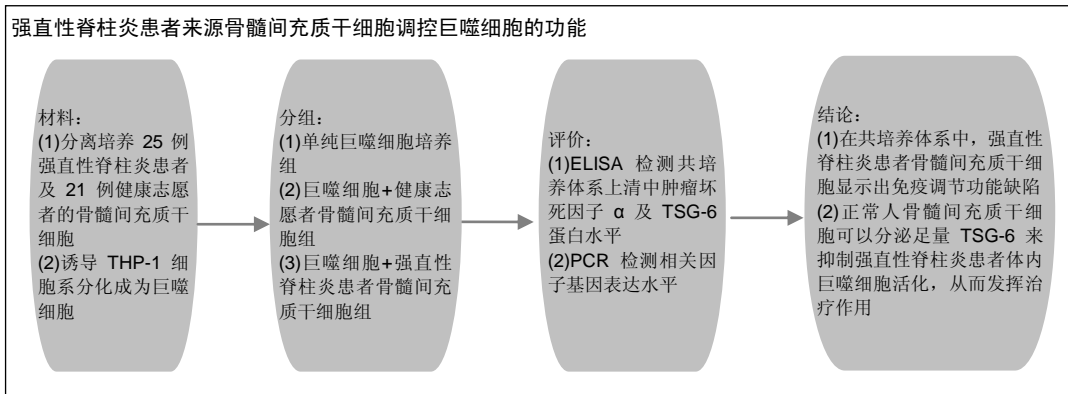
强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞调控巨噬细胞的功能异常

孙素和¹, 王鹏¹, 苏春燕², 谢中瑜¹, 李玉希¹, 李登¹, 旺姍², 苏鸿君², 伍小华², 邓雯², 吴燕峰², 沈慧勇¹(中山大学孙逸仙纪念医院, ¹骨外科, ²生物治疗中心, 广东省广州市 510120)

引用本文: 孙素和, 王鹏, 苏春燕, 谢中瑜, 李玉希, 李登, 旺姍, 苏鸿君, 伍小华, 邓雯, 吴燕峰, 沈慧勇. 强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞调控巨噬细胞的功能异常[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(1):13-19.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2016.01.003 ORCID: 0000-0002-2756-1866(孙素和)

文章快速阅读:



孙素和, 男, 1985 年生, 湖南省娄底市人, 汉族, 中山大学孙逸仙纪念医院骨外科在读硕士, 主要从事干细胞组织工程基础及临床研究。

通讯作者: 沈慧勇, 博士, 博士生导师, 主任医师, 中山大学孙逸仙纪念医院骨外科, 广东省广州市 510120

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2016)01-00013-07

稿件接受: 2015-11-15

http://www.crter.org

文题释义:

骨髓间充质干细胞免疫调节能力: 骨髓间充质干细胞具有极低的免疫原性及较强的免疫调节能力, 可被用于治疗多种自身免疫性疾病, 如 Crohn's 病、系统性红斑狼疮、多发性肌炎、风湿性关节炎等。强直性脊柱炎是一类自身免疫性疾病, 其发病可能与 HLA-B27、白细胞介素 1 α 、白细胞介素 23 受体、肿瘤坏死因子 α 受体等基因多态性有关。课题组首次证实静脉输注自体正常人骨髓间充质干细胞可以有效改善强直性脊柱炎患者的炎性状态, 或可能为强直性脊柱炎提供新的治疗策略。

TSG-6: 是一个具有保护性的炎症调控因子, 在炎症性疾病中, 多种促炎性因子如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 等均可以促使其在间充质干细胞、成纤维细胞、滑膜细胞等多种细胞中表达。TSG-6 可以反馈性抑制炎症细胞的迁移、黏附并降低其促炎性因子的分泌, 从而起到局限炎症的作用。

摘要

背景: 强直性脊柱炎是一种伴有高炎症状态的自身免疫性疾病, 但其具体发病机制不明确, 目前尚缺乏有效的治疗方案。

目的: 体外探讨强直性脊柱炎患者来源骨髓间充质干细胞调控巨噬细胞的功能及正常人骨髓间充质干细胞在强直性脊柱炎治疗中的潜在作用。

方法: 提取 25 例强直性脊柱炎患者及 21 例健康志愿者的骨髓间充质干细胞进行体外培养扩增, 以第 4 代细胞进行实验。体外诱导 THP-1 细胞系分化成为巨噬细胞。运用流式细胞术鉴定骨髓间充质干细胞及巨噬细胞的表面标志。ELISA 检测健康志愿者/强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞与巨噬细胞共培养体系上清中肿瘤坏死因子 α 及 TSG-6 蛋白水平, PCR 检测巨噬细胞及骨髓间充质干细胞相关因子基因表达水平。

结果与结论: ①两种骨髓间充质干细胞均呈现典型间充质干细胞表型, 巨噬细胞表型标志 CD68 为阳性。②强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞与巨噬细胞共培养组中巨噬细胞分泌的肿瘤坏死因子 α 蛋白水平及肿瘤坏死因子 α 转录水平均高于健康志愿者骨髓间充质干细胞 ($P < 0.05$)。③强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞组 TSG-6 基因的转录水平及蛋白分泌水平均低于健康志愿者骨髓间充质干细胞组 ($P < 0.05$)。结果提示: ①强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞抑制巨噬细胞肿瘤坏死因子 α 分泌的功能减弱, 可能是导致强直性脊柱炎免疫异常的重要原因。②正常人骨髓间充质干细胞可分泌足量的 TSG-6 抑制强直性脊柱炎患者巨噬细胞的活化, 降低其肿瘤坏死因子 α 的分泌而发挥治疗作用。

关键词:

干细胞; 骨髓间充质干细胞; 强直性脊柱炎; 骨髓间充质干细胞; 巨噬细胞; TSG-6; 肿瘤坏死因子 α ; 国家自然科学基金

主题词:

骨髓; 间充质干细胞; 脊柱炎, 强直性; 巨噬细胞; 肿瘤坏死因子 α ; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81271951, 81401850)

Sun Su-he¹, Wang Peng¹, Su Chun-yan², Xie Zhong-yu¹, Li Yu-xi¹, Li Deng¹, Wang Shan², Su Hong-jun², Wu Xiao-hua², Deng Wen², Wu Yan-feng², Shen Hui-yong¹
(¹Department of Orthopedics, ²Center for Biotherapy, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China)

Sun Su-he, Studying for master's degree, Department of Orthopedics, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Corresponding author: Shen hui-yong, M.D., Doctoral supervisor, Chief physician, Department of Orthopedics, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Subject headings: Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Spondylitis; Ankylosing; Macrophages; Tumor Necrosis Factor-alpha; Tissue Engineering
Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81271951, 81401850

Bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with ankylosing spondylitis show abnormal immunoregulation capability on macrophages

Abstract

BACKGROUND: Ankylosing spondylitis is an autoimmune disease at high inflammatory state, and its pathogenesis is still unclear. Besides, there is a lack of entirely satisfactory curative strategies.

OBJECTIVE: To explore the immunoregulation capability of bone marrow mesenchymal stem cells from ankylosing spondylitis patients on macrophages and the potential therapeutic use of bone marrow mesenchymal stem cells from healthy donors on ankylosing spondylitis.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells were extracted from 21 healthy donors and 25 ankylosing spondylitis patients respectively, and passage 4 cells were used in subsequent experiments. A human monocytic cell line was induced to differentiate into macrophages. The phenotypic markers of bone marrow mesenchymal stem cells and macrophages were detected by flow cytometry. Expressions of tumor necrosis factor- α and tumor necrosis factor- α -stimulated gene 6 (TSG-6) proteins in the supernatant of co-culture system were detected by ELISA. Quantitative real-time PCR was applied to detect the mRNA level of cytokines secreted by bone marrow mesenchymal stem cells and macrophages.

RESULTS AND CONCLUSION: The typical mesenchymal stem cell surface markers were expressed in both bone marrow mesenchymal stem cells from healthy donors and patients with ankylosing spondylitis, and CD68 was detected positively in induced macrophages. The protein and mRNA levels of tumor necrosis factor- α secreted by macrophages co-cultured with bone marrow mesenchymal stem cells from patients with ankylosing spondylitis were obviously higher than those from healthy donors ($P < 0.05$). TSG-6 secreted by bone marrow mesenchymal stem cells from patients with ankylosing spondylitis was lower than that by bone marrow mesenchymal stem cells from healthy donors in both RNA transcriptional and protein levels ($P < 0.05$). Our study demonstrates that bone marrow mesenchymal stem cells from patients with ankylosing spondylitis shows abnormal immunoregulatory function on inhibiting the tumor necrosis factor- α secretion from macrophages, which reveals a mechanism of immune disorder in ankylosing spondylitis. The therapeutic mechanism of bone marrow mesenchymal stem cells from healthy donors may work by secreting enough TSG-6 to inhibit the activation of macrophages in patients with ankylosing spondylitis, and thereby to decrease the secretion of tumor necrosis factor- α .

Cite this article: Sun SH, Wang P, Su CY, Xie ZY, Li YX, Li D, Wang S, Su HJ, Wu XH, Deng W, Wu YF, Shen HY. Bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with ankylosing spondylitis show abnormal immunoregulation capability on macrophages. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(1):13-19.

0 引言 Introduction

强直性脊柱炎是一种以炎性腰背痛、附着点炎症及中轴骨进行性骨化为临床特征的慢性自身免疫性疾病,常伴有银屑病、前葡萄膜炎、炎症性肠病等关节外炎症表现^[1-2]。强直性脊柱炎的发病机制较为复杂,尚未完全明确,目前的研究推测可能与人类白细胞抗原B27基因错误折叠^[3]、微生物感染^[4-5]、巨噬细胞活化等原因有关^[6]。自20世纪90年代以来,学者们发现炎症始终伴随着强直性脊柱炎的发生及发展,如在强直性脊柱炎发病初期,患者的骶髂关节处就已高表达肿瘤坏死因子 α ,在强直性脊柱炎患者血清中的肿瘤坏死因子 α 水平也显著高于非炎性腰背痛患者,所以肿瘤坏死因子 α 可能在强直性脊柱炎的发病及进展过程中扮演着非常重要的角色^[7]。

探索强直性脊柱炎有效的治疗方法一直是国内外学者研究的重点。传统的治疗方法如非类固醇抗炎药,改善病情抗风湿药均存在长期使用不良反应大,缓解率不高等缺点^[8-10]。而新型生物制剂肿瘤坏死因子 α 抑制剂虽然可以有效缓解强直性脊柱炎患者的临床症状,但其并不能延缓强直性脊柱炎疾病的进展^[11-12]。因此,探寻一种新的、有效的治疗强直性脊柱炎的方法具有重要的临床意义。

骨髓间充质干细胞是来源于中胚层的具有多向分化潜能的干细胞,可以从骨髓、脂肪、脐带、牙髓等组织中分

离获得。骨髓间充质干细胞具有极低的免疫原性及较强的免疫调节能力,可被用于治疗Crohn's病、系统性红斑狼疮、多发性肌炎、风湿性关节炎等多种自身免疫性疾病^[13-17]。课题组首次证实静脉输注异体正常人骨髓间充质干细胞可以有效改善强直性脊柱炎患者的炎性状态^[18],为强直性脊柱炎提供了一个全新的治疗策略。

TSG-6是一种起抑制炎症作用的糖蛋白,于1990年被Lee等^[19]首次发现。随后,Qi等^[20]在烧伤小鼠模型中发现皮下注射的间充质干细胞受到肿瘤坏死因子 α 刺激后分泌大量的TSG-6,而TSG-6可以负反馈抑制巨噬细胞肿瘤坏死因子 α 的分泌。TSG-6的抑炎特性还被其他学者在间充质干细胞静脉输注治疗小鼠腹膜炎^[21]、脑出血^[22]、神经炎性疾病等模型疾病中得到证实^[23]。同时Oh等^[24]发现敲除间充质干细胞TSG-6基因后,间充质干细胞的炎性调控作用明显减弱,提示TSG-6是间充质干细胞发挥炎性调控功能的重要因子;也有学者认为TSG-6是一个评价间充质干细胞炎性调控效能的重要指标^[25],抑制巨噬细胞的活化是TSG-6发挥免疫调节作用的主要途径。近年研究发现TSG-6除了具有抑制炎症功能外,也可以通过抑制破骨细胞活性从而减少骨质的丢失^[26],还可以通过直接结合骨形态发生蛋白2降低成骨细胞分化从而抑制成骨^[27],而这2项功能的发现对于改善强直性脊柱炎具有重要的临床意义。

为此实验将健康志愿者/强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞与巨噬细胞进行体外共培养, 构建强直性脊柱炎的细胞治疗模型, 以此来了解健康志愿者/强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞对巨噬细胞的调控作用, 从而探究强直性脊柱炎的发病机制及骨髓间充质干细胞输注治疗强直性脊柱炎的可能作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞水平体外研究。

1.2 时间及地点 2014年3月至2015年7月在中山大学孙逸仙纪念医院生物治疗中心骨科实验室完成。

1.3 材料 BD FACSVersion流式细胞仪(美国BD公司), 实时定量PCR仪(Roche公司), 多功能酶标仪(Thermo公司), 0.4 μm 6孔Transwell培养板(美国Costar公司), 佛波酯(Sigma公司), 人CD68-FITC, 小鼠抗人CD29、CD34、CD44、CD45、CD90、CD105、HLA-DR单克隆抗体, 肿瘤坏死因子α ELISA Kit (美国BD公司), Human TSG-6 ELISA Kit (加拿大Mybioscience公司), 重组人IFN-γ 干粉(PeproTech公司), 反转录试剂盒(RR037A)、SYBR Premix Ex Tap 试剂盒(Takara公司), 重组人LPS干粉(碧云天公司), THP-1细胞系(中国科学院上海生命科学研究院)。骨髓间充质干细胞库相关病例资料见表1。

表 1 骨髓间充质干细胞库相关病例资料

Table 1 Related case data included in bone marrow mesenchymal stem cell bank

项目	健康志愿者	强直性脊柱炎患者
例数	21	25
性别	男 12 例, 女 9 例	男 16 例, 女 9 例
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	26.3±4.2	24.1±5.7
HLA-B27(+)例数	0	25
C-反应蛋白($\bar{x} \pm s$, mg/L)	3.45±1.01	29.51±5.44
红细胞沉降率($\bar{x} \pm s$, mm/h)	10.22±1.51	32.60±8.56

1.4 实验方法

1.4.1 人骨髓间充质干细胞的分离培养 无菌操作抽取髂后上棘内约30 mL骨髓, 采用密度梯度离心法分离出骨髓间充质干细胞, 用含体积分数为10%胎牛血清的低糖DMEM进行培养, 每3 d换液1次, 待贴壁生长至90%瓶底后, 进行传代, 传至第4代用于实验, 剩余细胞保存于液氮罐。每次均随机抽取3例强直性脊柱炎患者及3例健康志愿者的骨髓间充质干细胞进行实验, 重复3次以上。

1.4.2 细胞培养及巨噬细胞诱导分化 骨髓间充质干细胞以 $0.5 \times 10^4/cm^2$ 细胞密度种植于培养瓶中, 用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养, 并置于恒温37 °C, 体积分数为5%的CO₂培养箱中培养。THP-1细胞则用1640培养基(含体积分数10%的胎牛血清, 青霉素、链霉素各100 U/mL)进行培养。THP-1细胞以 1×10^6 /孔的细胞浓度种植于普通6孔板/6孔Transwell板下室中, 加入浓度为320 μmol/L的佛波

酯诱导48 h后, 所有悬浮细胞均贴壁, PBS洗涤3遍, 更换1640培养基, 并加入干扰素-γ 20 μg/L+脂多糖100 μg/L再诱导24 h^[28]。THP-1巨噬细胞诱导成功后, 健康志愿者/强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞与巨噬细胞以1:10的比例进行共培养, 即把骨髓间充质干细胞以 1×10^5 /孔的数量种植在普通6孔板(共贴壁)/6孔Transwell板上室内(分离共培养)进行共培养, 时长为5 d。实验共分为3组, 单纯巨噬细胞培养组, 巨噬细胞+健康志愿者骨髓间充质干细胞组, 巨噬细胞+强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞组。

1.4.3 人骨髓间充质干细胞及巨噬细胞的流式鉴定 用0.25%胰蛋白酶消化贴壁的健康志愿者/强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞, 收集数量约 1×10^6 个用于流式细胞仪检测。选取的细胞表面抗体为小鼠抗人CD29-PE, 小鼠抗人CD34-APC, 小鼠抗人CD44-FITC, 小鼠抗人CD45-FITC, 小鼠抗人CD90-PE, 小鼠抗人CD105-FITC, 小鼠抗人HLA-DR-PE, 并以同型对照设门。收集约 5×10^5 个巨噬细胞, 破膜并孵育CD68-FITC流式抗体, 洗涤重悬, 上机检测, 以阴性对照设门。

1.4.4 酶联免疫法(ELISA) 收集骨髓间充质干细胞与巨噬细胞共培养上清标记、分装、冻存于-80 °C冰箱, 于检测前解冻。依据说明书进行肿瘤坏死因子α及TSG-6的检测, 每次实验均同时进行标准曲线的绘制及待测样品的测定。

1.4.5 半定量PCR 所有的RNA样本均使用Trizol reagent提取, 随后依据说明书用PrimeScript™ RT reagent kit反转录成cDNA, 在实时定量PCR仪上进行半定量测定, 基因相对表达量以mRNA 2^{-ΔΔCt}法计算, 选取GAPDH作为内参, 通过将目标基因与内参基因相比进行标准化统计。引物序列见表2。

表 2 各基因引物序列

Table 2 Primer sequences

基因	引物序列
肿瘤坏死因子 α(TNF-α)	Forward: 5'-CCT CTC TCT AAT CAG CCC TCT G-3' Reverse: 5'-GAG GAC CTG GGA GTA GAT GAG-3'
肿瘤坏死因子刺激基因 6(TSG-6)	Forward: 5'-TTT CTC TTG CTA TGG GAA GAC AC-3' Reverse: 5'- GAG CTT GTA TTT GCC AGA CCG-3'
吡哆胺 2, 3-双加氧酶(IDO)	Forward: 5'- GCC AGC TTC GAG AAA GAG TTG-3' Reverse: 5'- ATC CCA GAA CTA GAC GTG CAA-3'
诱生型一氧化氮合酶(iNOS)	Forward: 5'- TTC AGT ATC ACA ACC TCA GCA AG-3' Reverse: 5'- TGG ACC TGC AAG TTA AAA TCC C-3'
转化生长因子 β (TGF-β)	Forward: 5'- GGC CAG ATC CTG TCC AAG C-3' Reverse: 5'-GTG GGT TTC CAC CAT TAG CAC-3'
肝细胞生长因子(HGF)	Forward: 5'- GCT ATC GGG GTA AAG ACC TAC A-3' Reverse: 5'- CGT AGC GTA CCT CTG GAT TGC-3'
GAPDH	Forward: 5'-GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT-3' Reverse: 5'-GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG-3'

1.5 主要观察指标 ①单纯巨噬细胞培养体系及健康志愿者/强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞与巨噬细胞共培养体系中肿瘤坏死因子α的分泌水平及其基因相对表达

量。②健康志愿者/强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞中 TSG-6、吲哚胺2, 3-双加氧酶、诱生型一氧化氮合酶、转化生长因子 β 、肝细胞生长因子的基因相对表达量及 TSG-6 在培养上清液中的分泌水平。

1.6 统计学分析 用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 两种骨髓间充质干细胞形态学及呈现的表型标志无差异 健康志愿者/强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞均为长梭型的贴壁细胞, 且均匀分布于培养瓶底(图1)。

健康志愿者/强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞均表达 CD29、CD44、CD90、CD105, 而 HLA-DR、CD34、CD45 为阴性, 符合间充质干细胞鉴别表型特点(图2)。

2.2 诱导分化的巨噬细胞高表达特异性表型分子 CD68 THP-1 细胞为集落样悬浮生长的单核细胞(图3A)。诱导后 THP-1 全部变为贴壁生长、煎蛋样的巨噬细胞(图3B)。流式细胞仪检测结果表明诱导后的巨噬细胞高表达 CD68(图3C-E), 证明巨噬细胞诱导成功。

2.3 在共培养体系中, 强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞显示出免疫调节功能缺陷 巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子

α 呈时间依赖性, 第 5 天的分泌总量趋于平衡(图4A)。在分离/共贴壁共培养体系中, 两种骨髓间充质干细胞均能显著降低肿瘤坏死因子 α 的分泌(P 均 < 0.01), 健康志愿者骨髓间充质干细胞组抑制肿瘤坏死因子 α 的作用更明显, 差异有显著性意义($P < 0.05$, 图4B, C)。此外, 共贴壁培养体系中两种骨髓间充质干细胞对肿瘤坏死因子 α 的分泌抑制均比分离共培养体系更明显。在基因水平, 与单纯巨噬细胞培养组相比, 共培养组中巨噬细胞的肿瘤坏死因子 α 基因相对表达量均降低($P < 0.01$), 而强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞组中巨噬细胞的肿瘤坏死因子 α 基因相对表达量要高于健康志愿者骨髓间充质干细胞组($P < 0.05$, 图4D)。

2.4 健康志愿者/强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞分泌 TSG-6 存在差异 半定量 PCR 结果显示强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞组 TSG-6 的表达要明显低于健康志愿者骨髓间充质干细胞($P < 0.001$), 而吲哚胺 2, 3-双加氧酶、转化生长因子 β 、诱生型一氧化氮合酶, 肝细胞生长因子在二者的表达无明显差别(图5A)。收集 5 d 的共培养上清液, ELISA 检测发现单纯巨噬细胞组中不分泌 TSG-6, 强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞分泌的 TSG-6 水平明显低于健康志愿者骨髓间充质干细胞组($P < 0.05$, 图5B)。

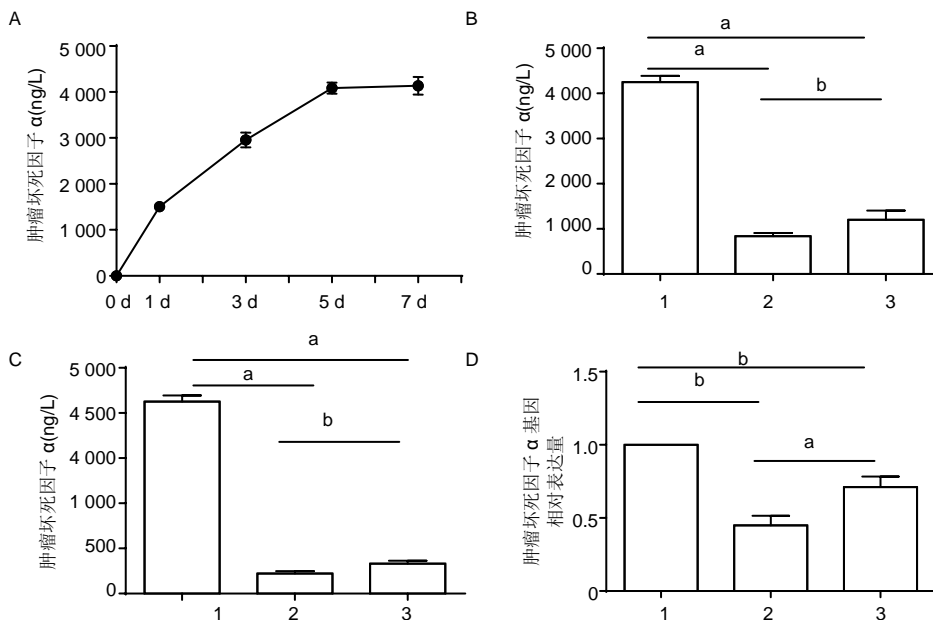


图4 共培养体系中肿瘤坏死因子 α 的分泌水平及巨噬细胞肿瘤坏死因子 α 基因相对表达量

Figure 4 The secretion of tumor necrosis factor- α and relative mRNA level of tumor necrosis factor- α from macrophages in co-culture system

图注: 1: 单纯巨噬细胞培养组; 2: 巨噬细胞+健康志愿者骨髓间充质干细胞组; 3: 巨噬细胞+强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞组。图中 A 为巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子 α 的时间曲线; B 为 3 组分离共培养体系上清中肿瘤坏死因子 α 的分泌水平, 两种骨髓间充质干细胞均能降低巨噬细胞肿瘤坏死因子 α 的分泌($P < 0.001$), 而强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞组降低肿瘤坏死因子 α 的水平较健康志愿者骨髓间充质干细胞组差($P < 0.05$); C 为 3 组共贴壁共培养体系中肿瘤坏死因子 α 的分泌水平, 两种骨髓间充质干细胞降低巨噬细胞肿瘤坏死因子 α 的分泌更为明显($P < 0.001$), 强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞组降低肿瘤坏死因子 α 的水平仍较健康志愿者骨髓间充质干细胞组差($P < 0.05$); D 为共培养体系中巨噬细胞肿瘤坏死因子 α 基因相对表达量, 可见强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞抑制巨噬细胞肿瘤坏死因子 α 基因表达的水平显著弱于健康志愿者骨髓间充质干细胞组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

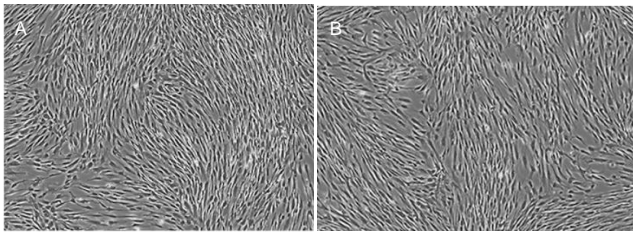


图1 骨髓间充质干细胞镜下形态(x40)
Figure 1 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells (x40)

图注: 图中 A, B 分别为健康志愿者骨髓间充质干细胞及强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞, 二者均为长梭形、平行或漩涡状生长的贴壁细胞, 融合达 95%以上。

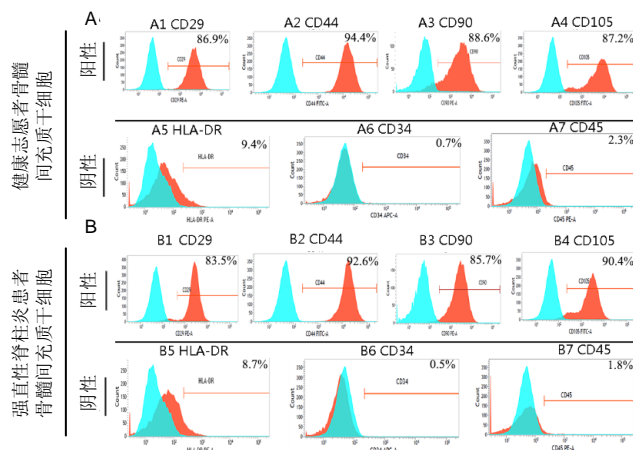


图2 骨髓间充质干细胞表面标志
Figure 2 Surface markers of bone marrow mesenchymal stem cells

图注: 图中 A, B 分别为健康志愿者骨髓间充质干细胞及强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞的流式细胞仪分析结果, 二者表面标志 CD29、CD44、CD90、CD105 均阳性, HLA-DR、CD34、CD45 阴性, 符合间充质干细胞鉴别表型特点。

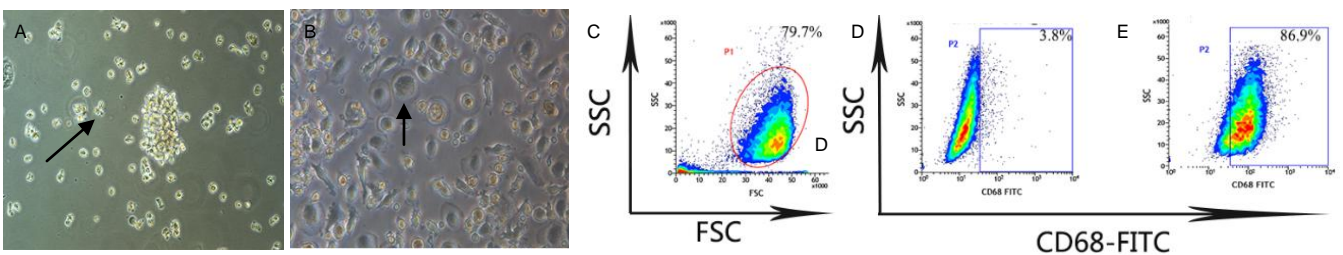


图3 巨噬细胞的镜下形态及表型标志
Figure 3 Morphology and phenotypic markers of macrophages under microscope

图注: 图中 A 为圆形、透亮、集落样悬浮生长的 THP-1 细胞(箭头所示, x100); B 为可伸出伪足呈煎蛋样、贴壁生长的巨噬细胞(箭头所示, x100); C 为流式细胞仪收取的巨噬细胞群; D 为未孵育 CD68 抗体的阴性对照; E 为巨噬细胞孵育 CD68 抗体后的流式检测结果, 阳性率为 86.9%。

3 讨论 Discussion

强直性脊柱炎是一类慢性、免疫异常的脊柱关节病, 致畸率、致残率较高, 疾病晚期常严重影响患者的生活质量^[29-30]。课题组首次进行了骨髓间充质干细胞输注治疗强直性脊柱炎的临床试验, 发现患者于治疗后其 C-反应蛋白、红细胞沉降率等炎性指标及炎性症状均得到改

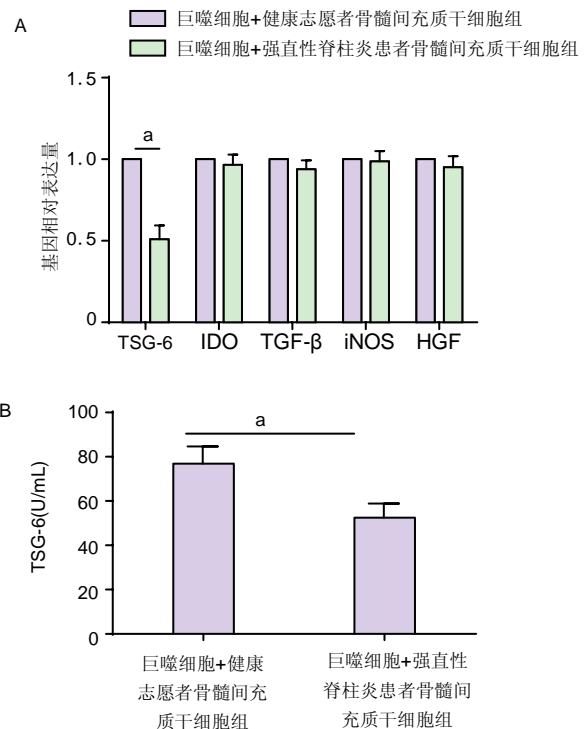


图5 共培养体系中骨髓间充质干细胞基因筛选及共培养上清中 TSG-6 检测结果

Figure 5 Gene screening of bone marrow mesenchymal stem cells and supernatant level of tumor necrosis factor- α -stimulated gene 6 in co-culture system

图注: 图中 A 为 q-PCR 筛查健康志愿者/强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞 TSG-6、吡哆胺 2,3-双加氧酶(IDO)、转化生长因子 β (TGF- β)、诱生型一氧化氮合酶(iNOS)、肝细胞生长因子(HGF)等基因的表达, 二者 TSG-6 基因表达差异最显著($^aP < 0.01$); B 为共培养上清中骨髓间充质干细胞分泌 TSG-6 的水平, 而强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞共培养体系中 TSG-6 含量亦明显低于健康志愿者骨髓间充质干细胞组($^aP < 0.01$)。

善^[18]。因此, 深入探究骨髓间充质干细胞在强直性脊柱炎发病中所起的作用对评价及推广正常人骨髓间充质干细胞输注治疗强直性脊柱炎这种治疗方式具有重要意义。

强直性脊柱炎患者体内存在巨噬细胞过度活化的现象, 其骶髂关节在疾病早期就高表达肿瘤坏死因子 α ^[31],

血清中肿瘤坏死因子 α 水平也明显升高^[32], 而巨噬细胞是肿瘤坏死因子 α 的主要来源, 可见强直性脊柱炎的高炎性状态与巨噬细胞功能异常密切相关。故实验以巨噬细胞作为主要研究对象, 用直接接触/分离的方式将健康志愿者/强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞与之进行共培养, 发现二者均可以显著降低巨噬细胞肿瘤坏死因子 α 的分泌, 而相比分离共培养的方式, 直接接触培养体系中肿瘤坏死因子 α 的分泌水平抑制得更加明显, 考虑为细胞直接接触抑制有关, 这一结果与之前的学者所发现的相符^[33-34], 然而此次实验首次发现在两种共培养模式下强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞抑制巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子 α 的能力显著弱于健康志愿者骨髓间充质干细胞, 说明强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞在调控巨噬细胞肿瘤坏死因子 α 分泌的功能上存在缺陷。

实验结果发现强直性脊柱炎患者骨髓间充质干细胞分泌TSG-6的水平显著低于健康志愿者骨髓间充质干细胞, 其分泌TSG-6的能力不足, 致使其对巨噬细胞调控功能减弱, 这可能是导致强直性脊柱炎患者炎性异常的重要原因。而正常人骨髓间充质干细胞则可以分泌足量的TSG-6, 显著抑制巨噬细胞的活化, 显著降低肿瘤坏死因子 α 水平的分泌, 这或许就是正常人骨髓间充质干细胞发挥其治疗作用的主要机制。近年研究发现TSG-6除了具有抑制炎症的功能外, 也可以通过抑制破骨细胞的活性从而减少骨质的丢失^[26], 还可以通过直接结合骨形态发生蛋白2降低成骨细胞的分化从而抑制成骨^[27], 这两项功能的发现对强直性脊柱炎的治疗具有重要的意义: 首先, 中轴骨骨质疏松伴异位骨化是强直性脊柱炎一个重要临床表现^[35], 其次脊柱不可抑制的进行性骨化也是非类固醇类抗炎药, 肿瘤坏死因子 α 抑制剂等药物目前临床应用面临的巨大难题, 而TSG-6一方面可以抑制破骨细胞的功能可以减少骨质的丢失, 另一方面也可以抑制异位成骨细胞的分化从而减少异位成骨, 那么则能够显著减少强制性脊柱炎患者脊柱关节结构的损害。因此, 作者推测正常人骨髓间充质干细胞输入强直性脊柱炎患者体内后可能通过分泌大量的TSG-6从而不仅能抑制强直性脊柱炎患者的炎症, 还可以减少其脊柱关节结构的损害, 从而发挥其即可降低强直性脊柱炎疾病严重程度, 同时也能延缓强直性脊柱炎疾病进展的双重治疗效果。

综上所述, 强直性脊柱炎患者的骨髓间充质干细胞抑制巨噬细胞活化的功能减弱, 可能致使强直性脊柱炎患者体内肿瘤坏死因子 α 升高, 从而最终导致强直性脊柱炎的发病。而异体正常人的骨髓间充质干细胞则可能通过补充分泌足量的TSG-6来抑制强直性脊柱炎患者体内巨噬细胞的活化, 降低患者体内的炎症水平, 从而发挥其治疗作用, 但是, 尚需要进一步的临床验证。TSG-6作为骨髓间充质干细胞分泌的一种重要的炎症调节因子, 有望转化成药物用于强直性脊柱炎的临床治疗。

作者贡献: 实验设计为沈慧勇、吴燕峰, 孙素和、王鹏, 李玉希, 实验实施为孙素和、李登、谢中瑜, 骨髓间充质干细胞分离培养为邓雯, 苏鸿君, 旺姍, 实验评估为沈慧勇, 吴燕峰, 资料收集为孙素和。孙素和成文, 沈慧勇审校, 沈慧勇对文章负责。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: ①健康志愿者及强直性脊柱炎患者知情同意, 并签署了《骨髓间充质干细胞捐献知情同意书》。②该试验获得中山大学附属孙逸仙纪念医院伦理委员会的批准。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Golder V, Schachna L. Ankylosing spondylitis: an update. *Aust Fam Physician*. 2013;42(11):780-784.
- [2] Singh G, Lawrence A, Agarwal V, et al. Higher prevalence of extra-articular manifestations in ankylosing spondylitis with peripheral arthritis. *J Clin Rheumatol*. 2008;14(5):264-266.
- [3] Castro-Santos P, Gutiérrez MA, Díaz-Peña R. Genetics of ankylosing spondylitis. *Rev Med Chil*. 2014;142(9):1165-1173.
- [4] Rashid T, Ebringer A. Ankylosing spondylitis is linked to Klebsiella--the evidence. *Clin Rheumatol*. 2007;26(6):858-864.
- [5] Rashid T, Wilson C, Ebringer A. The link between ankylosing spondylitis, Crohn's disease, Klebsiella, and starch consumption. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:872632.
- [6] Lou YJ, Jin J, Mai WY. Ankylosing spondylitis presenting with macrophage activation syndrome. *Clin Rheumatol*. 2007;26(11):1929-1930.
- [7] De Keyser F, Van den Bosch F, Mielants H. Anti-TNF-alpha therapy in ankylosing spondylitis. *Cytokine*. 2006;33(5):294-298.
- [8] Sari İ, Öztürk MA, Akkoç N. Treatment of ankylosing spondylitis. *Turk J Med Sci*. 2015;45(2):416-430.
- [9] van der Linden S. Issues in the treatment of ankylosing spondylitis with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Wien Med Wochenschr*. 2008;158(7-8):195-199.
- [10] Braun J, Sieper J. Therapy of ankylosing spondylitis and other spondyloarthritides: established medical treatment, anti-TNF-alpha therapy and other novel approaches. *Arthritis Res*. 2002;4(5):307-321.
- [11] Braun J, Baraliakos X, Heldmann F, et al. Tumor necrosis factor alpha antagonists in the treatment of axial spondyloarthritis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014;23(5):647-659.
- [12] Tong Q, Cai Q, de Mooij T, et al. Adverse events of anti-tumor necrosis factor α therapy in ankylosing spondylitis. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119897.

- [13] Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(5):383-396.
- [14] Chinnadurai R, Ng S, Velu V, et al. Challenges in animal modelling of mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(16):4779-4787.
- [15] 阮光萍,姚翔,刘菊芬,等.人脐带间充质干细胞移植治疗系统性红斑狼疮[J].中国组织工程研究,2015,19(14):2172-2178.
- [16] 赖勤,余莲,邱永荣,等.脐血间充质干细胞移植治疗多发性肌炎/皮肌炎:Th细胞因子的变化[J].中国组织工程研究,2015,19(14):2186-2191.
- [17] Ben-Ami E, Berrih-Aknin S, Miller A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2011;10(7):410-415.
- [18] Wang P, Li Y, Huang L, et al. Effects and safety of allogenic mesenchymal stem cell intravenous infusion in active ankylosing spondylitis patients who failed NSAIDs: a 20-week clinical trial. *Cell Transplant*. 2014;23(10):1293-303.
- [19] Lee TH, Lee GW, Ziff EB, et al. Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1990;10(5):1982-1988.
- [20] Qi Y, Jiang D, Sindrilaru A, et al. TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds. *J Invest Dermatol*. 2014;134(2):526-537.
- [21] Wang N, Li Q, Zhang L, et al. Mesenchymal stem cells attenuate peritoneal injury through secretion of TSG-6. *PLoS One*. 2012;7(8):e43768.
- [22] Chen M, Li X, Zhang X, et al. The inhibitory effect of mesenchymal stem cell on blood-brain barrier disruption following intracerebral hemorrhage in rats: contribution of TSG-6. *J Neuroinflammation*. 2015;12:61.
- [23] Liu Y, Zhang R, Yan K, et al. Mesenchymal stem cells inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses of BV2 microglial cells through TSG-6. *J Neuroinflammation*. 2014; 11:135.
- [24] Oh JY, Lee RH, Yu JM, et al. Intravenous mesenchymal stem cells prevented rejection of allogeneic corneal transplants by aborting the early inflammatory response. *Mol Ther*. 2012; 20(11):2143-2152.
- [25] Lee RH, Yu JM, Foskett AM, et al. TSG-6 as a biomarker to predict efficacy of human mesenchymal stem/progenitor cells (hMSCs) in modulating sterile inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(47):16766-16771.
- [26] Mahoney DJ, Swales C, Athanasou NA, et al. TSG-6 inhibits osteoclast activity via an autocrine mechanism and is functionally synergistic with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum*. 2011;63(4):1034-1043.
- [27] Inoue I, Ikeda R, Tsukahara S. Current topics in pharmacological research on bone metabolism: Promyelotic leukemia zinc finger (PLZF) and tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene 6 (TSG-6) identified by gene expression analysis play roles in the pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament. *J Pharmacol Sci*. 2006;100(3):205-210.
- [28] Wang H, Wang X, Li X, et al. CD68(+)HLA-DR(+) M1-like macrophages promote motility of HCC cells via NF-κB/FAK pathway. *Cancer Lett*. 2014;345(1):91-99.
- [29] Daikh DI, Chen PP. Advances in managing ankylosing spondylitis. *F1000Prime Rep*. 2014;6:78.
- [30] Märker-Hermann E. Therapy of psoriatic arthritis. *Z Rheumatol*. 2013;72(8):784-790.
- [31] François RJ, Neure L, Sieper J, et al. Immunohistological examination of open sacroiliac biopsies of patients with ankylosing spondylitis: detection of tumour necrosis factor alpha in two patients with early disease and transforming growth factor beta in three more advanced cases. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(6):713-720.
- [32] Gratacós J, Collado A, Filella X, et al. Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol*. 1994;33(10):927-931.
- [33] Yi H, Kang KY, Kim Y, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate collagen antibody-induced autoimmune arthritis by inducing expression of FCGIIB receptors. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;16:170.
- [34] Guo Z, Zhou X, Li J, et al. Mesenchymal stem cells reprogram host macrophages to attenuate obliterative bronchiolitis in murine orthotopic tracheal transplantation. *Int Immunopharmacol*. 2013;15(4):726-734.
- [35] Davey-Ransinghe N, Deodhar A. Osteoporosis and vertebral fractures in ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25(4):509-516.