

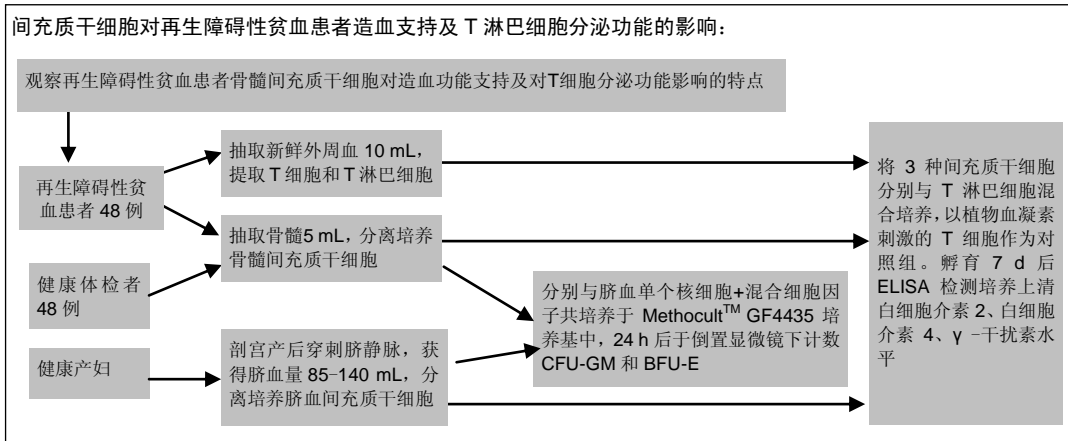
间充质干细胞对再生障碍性贫血患者造血支持及T淋巴细胞分泌功能的影响

李罡灿, 宋艳萍, 张韵洁, 李光, 王浩, 谢佳(西安市中心医院西安市血液病研究所, 陕西省西安市 710003)

引用本文: 李罡灿, 宋艳萍, 张韵洁, 李光, 王浩, 谢佳. 间充质干细胞对再生障碍性贫血患者造血支持及T淋巴细胞分泌功能的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(1):107-112.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.01.019 ORCID: 0000-0002-3540-1344(谢佳)

文章快速阅读:



李罡灿, 男, 1966 年生, 河南省许昌市人, 1997 年郑州大学医学院毕业, 硕士, 主任医师, 主要从事造血干细胞移植和细胞治疗方面的研究。

通讯作者: 谢佳, 硕士, 副主任医师, 西安市中心医院西安市血液病研究所, 陕西省西安市 710003

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)01-00107-06

稿件接受: 2015-11-30

http://www.crter.org

文题释义:

T 淋巴细胞: T 淋巴细胞是具有迟发型过敏反应和移植免疫等细胞免疫功能的细胞, 对产生抗体前体细胞(B 细胞)起促进作用、对免疫细胞起抑制调整作用的细胞所组成的细胞群。在实验动物小鼠和大鼠或在人体中, 骨髓干细胞迁移到胸腺, 并经过特殊的分化而成为 T 淋巴细胞, 是胸腺产生细胞和胸腺依赖细胞, 可与抗原进行反应, 但不产生抗体, 所以被称为抗原反应性细胞。

造血微环境: 机体内造血过程中造血细胞周围所必须的特殊环境, 包括基质细胞、细胞外基质和多种造血调节因子, 以及神经和血管。造血干细胞必须黏附于基质细胞上才能存活, 而基质细胞分泌的胶原、纤维连接蛋白、层素、造血连接蛋白及蛋白多糖等都与造血细胞的黏附有关。因此, 造血细胞必须在造血微环境中才能定居、存活、增殖、分化与成熟。

摘要

背景: 近年来, 间充质干细胞在再生障碍性贫血中的作用受到广泛关注, 但是其作用机制尚不清楚。

目的: 观察脐血间充质干细胞和骨髓间充质干细胞对再生障碍性贫血患者造血支持及T淋巴细胞分泌功能的影响。

方法: 收集 48 例再生障碍性贫血患者和 48 例健康者的骨髓和健康产妇脐血, 采用流式细胞法分离骨髓间充质干细胞和脐血间充质干细胞; 将 2 种间充质干细胞分别与脐血单个核细胞共培养, 计数红系爆式集落形成单位和粒-巨噬细胞集落形成单位数目; 将间充质干细胞与植物血凝素刺激的再生障碍性贫血患者 T 淋巴细胞共培养, ELISA 检测 T 细胞分泌的白细胞介素 2、白细胞介素 4 和 γ -干扰素水平。

结果与结论: ①正常骨髓间充质干细胞和脐血间充质干细胞与脐血单个核细胞共培养后, 其红系爆式集落形成单位和粒-巨噬细胞集落形成单位数目明显增多 ($P < 0.05$)。②再生障碍性贫血患者骨髓间充质干细胞与脐血单个核细胞共培养后, 其刺激红系爆式集落形成单位和粒-巨噬细胞集落形成单位形成的能力明显减弱 ($P < 0.05$)。③与植物血凝素诱导的 T 细胞对照组相比, 正常骨髓间充质干细胞共培养可明显抑制 T 细胞分泌白细胞介素 2、白细胞介素 4 和 γ -干扰素 ($P < 0.05$)。正常脐血干细胞共培养组也显示出了相似的抑制效果。④与正常骨髓间充质干细胞和脐血间充质干细胞共培养组相比, 再生障碍性贫血患者骨髓间充质干细胞共培养组抑制 T 细胞分泌白细胞介素 2、白细胞介素 4 和 γ -干扰素的能力明显降低 ($P < 0.05$)。⑤结果表明再生障碍性贫血患者骨髓间充质干细胞存在功能缺陷, 且对造血功能支持及对 T 细胞分泌功能的抑制作用明显弱于正常的骨髓间充质干细胞和脐血间充质干细胞, 提示再生障碍性贫血患者间充质干细胞可能通过减弱其造血支持及抑制 T 细胞的功能来影响病理进程。

关键词:

干细胞; 培养; 再生障碍性贫血; 脐血; 骨髓; 间充质干细胞; T 淋巴细胞

主题词:

胎血; 骨髓; 间质干细胞; 贫血, 再生障碍性; T 淋巴细胞; 组织工程

基金资助:

西安市科技计划项目(SF1021(2))

Li Gang-can, Song Yan-ping,
Zhang Yun-jie, Li Guang,
Wang Hao, Xie Jia (Xi'an
Institute of Hematology, Xi'an
Central Hospital, Xi'an
710003, Shaanxi Province,
China)

Li Gang-can, Master, Chief
physician, Xi'an Institute of
Hematology, Xi'an Central
Hospital, Xi'an 710003,
Shaanxi Province, China

Corresponding author: Xie
Jia, Master, Associate chief
physician, Xi'an Institute of
Hematology, Xi'an Central
Hospital, Xi'an 710003,
Shaanxi Province, China

Subject headings: Fetal
Blood; Bone Marrow;
Mesenchymal Stem Cells;
Anemia, Aplastic;
T-Lymphocytes; Tissue
Engineering

Funding: the Science and
Technology Plan of Xi'an, No.
SF1021(2)

Effects of mesenchymal stem cells on hematopoietic support and secretory function of T lymphocytes in patients with aplastic anemia

Abstract

BACKGROUND: Recently, the role of mesenchymal stem cells in aplastic anemia has been widely explored. However, its underlying mechanism remains unclearly.

OBJECTIVE: To study the effect of umbilical cord blood and bone marrow mesenchymal stem cells on hematopoietic support and secretory function of T lymphocytes in patients with aplastic anemia.

METHODS: Cord blood and bone marrow samples from 48 cases of aplastic anemia and 48 healthy lying-in women to isolate mesenchymal stem cells using flow cytometry. Mesenchymal stem cells from the cord blood and bone marrow were respectively co-cultured with cord blood mononuclear cells to count burst forming units-erythroid and colony forming units-granulocyte/macrophage. Mesenchymal stem cells were co-cultured with T lymphocytes from aplastic anemia patients undergoing phytohemagglutinin stimulation, and ELISA was used to detect interleukin-2, interleukin-4 and interferon- γ levels secreted from T lymphocytes.

RESULTS AND CONCLUSION: The number of burst forming units-erythroid and colony forming units-granulocyte/macrophage significantly increased in normal bone marrow or umbilical cord blood mesenchymal stem cells co-cultured with cord blood mononuclear cells ($P < 0.05$), but reduced remarkably in umbilical cord blood mesenchymal stem cells from aplastic anemia patients co-cultured with cord blood mononuclear cells ($P < 0.05$). Levels of interleukin-2, interleukin-4 and interferon- γ from T lymphocytes were inhibited significantly after co-culture with normal bone marrow mesenchymal stem cells compared with phytohemagglutinin-induced T lymphocytes ($P < 0.05$). There was a similar inhibitory effect after co-culture with normal umbilical cord blood mesenchymal stem cells. There was a significantly reduction in the capacity of inhibiting interleukin-2, interleukin-4 and interferon- γ levels from T lymphocytes after co-culture with bone marrow mesenchymal stem cells from aplastic anemia patients ($P < 0.05$). Aplastic anemia patients show some functional defects in their bone marrow mesenchymal stem cells that have a weaker inhibitory role than normal bone marrow or umbilical cord blood mesenchymal stem cells in the hematopoietic support and secretory function of T lymphocytes. These findings indicate that mesenchymal stem cells from aplastic anemia patients can influence the pathological progress through weakening hematopoietic support and secretory function of T lymphocytes.

Cite this article: Li GC, Song YP, Zhang YJ, Li G, Wang H, Xie J. Effects of mesenchymal stem cells on hematopoietic support and secretory function of T lymphocytes in patients with aplastic anemia. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(1):107-112.

0 引言 Introduction

再生障碍性贫血(简称再障)是以骨髓造血衰竭为主要特征的疾病,临床以贫血、出血为主要病理特征,其发病机制比较复杂,主要涉及造血微环境异常、免疫功能紊乱及造血祖细胞功能紊乱等^[1-2]。近年来,对再障的治疗手段主要集中在免疫抑制剂及造血干细胞移植方面,虽然取得了一定进展和疗效,但是由于造血干细胞来源的局限性及移植后产生的慢性移植物抗宿主病明显影响了治疗效果^[3]。因此,寻求新型的治疗途径成为再障治疗的关键。

间充质干细胞是一群具有自我更新及多向分化潜能的细胞,主要来源于中胚层,是已知的骨髓造血微环境的重要组成部分,可通过调控造血干细胞及骨髓造血微环境来发挥造血支持作用^[4]。近年来研究发现,间充质干细胞不仅存在于骨髓中,还存在于胎儿肝脏、胎血、脐血及胎盘等组织中^[5-7]。研究表明,骨髓来源间充质干细胞除了具有自我更新及多向分化潜能外,还能够为造血祖细胞体外扩增提供合适的微环境,从而产生许多造血细胞因子,发挥造血支持作用^[4],但其数量会随着标本来源人群年龄的增长而下降。脐血来源的间充质干细胞除了具有收集过程简单、细胞增殖分化能力更强的优点外,脐血免疫系统的原始性也能够降低移植后的排斥反应,因此近年来成为许

多疾病治疗的研究热点^[8]。除了具有造血支持作用外,多项研究也证实间充质干细胞在免疫调节中具有重要作用^[9]。与间充质干细胞共培养后,T淋巴细胞的增殖能力降低,同时抗原递呈细胞的活性明显受到抑制^[10-11]。此外,间充质干细胞与造血干细胞共移植后可明显减少模型动物移植物抗宿主病的发生^[12-13]。但是,间充质干细胞在再障发病中的作用及其机制尚不清楚。此次研究旨在分析骨髓来源间充质干细胞及脐血来源间充质干细胞对体外造血支持和T细胞分泌功能的影响,从而为进一步评估其在再障免疫发病机制中的作用奠定基础。

1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 随机分组设计。

1.2 时间及地点 于2013年4月至2015年5月在西安市中心医院完成。

1.3 对象 选择2013年4月至2014年5月西安市中心医院收治的再障患者48例,其中男29例,女19例,年龄5-46岁。所有患者均经诊断确定为再生障碍性贫血,其中急性再障患者32例,慢性再障患者16例。选择同期进行健康体检者48例,其中男30例,女18例,年龄为3-45岁。整个研究均在患者及其家属知情同意下进行,并经西安市中心医院伦理委员会批准实施。

诊断标准: 以张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》为诊断标准^[14]。

纳入标准: ①患者的临床诊断符合再生障碍性贫血的相关诊断标准。②年龄在3-46岁之间, 不限性别。③所有患者均自愿参加此次试验, 并签署知情同意书。

排除标准: ①哺乳或妊娠期女性患者。②合并肾、肝及免疫系统严重原发性疾病患者。③患者在3个月期间接受过免疫抑制剂治疗。

1.4 材料 Ficoll淋巴细胞分离液(天津灏洋生物有限公司), 胎牛血清(Invitrogen公司), 鼠抗人CD3-PECY5/CD4-FITC/CD8-PE三色标记、鼠抗人IgG1-PECY5/IgG1-FITC/IgG1-PE(Immunotech公司), 人 γ -干扰素ELISA试剂盒(上海润裕生物科技有限公司), 人白细胞介素2、白细胞介素4 ELISA试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司), 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司), 24孔细胞培养板(Costar公司), 酶标仪(Tecan Sunrise公司)。

1.5 方法

1.5.1 T淋巴细胞的提取 取再生障碍性贫血患者与正常人新鲜外周血10 mL, 加入Ficoll淋巴细胞分离液之中, 提取单个核细胞。将尼龙毛柱进行灭菌并呈垂直固定状态置于超净台中, 尼龙毛柱内加入细胞悬液, 当流出的培养液处于不透明状态时, 此时其中含有T细胞, 收集这一部分培养液。流出的非黏附细胞即为T淋巴细胞, 离心之后重悬于上述培养液中。

取1 mL细胞悬液, 于测定管中加入20 μ L CD3-PECY5/CD4-FITC/CD8-PE, 每份标本设置同型对照, 于对照管中加入20 μ L鼠抗人IgG1-PECY5/IgG1-FITC/IgG1-PE, 混匀, 室温避光反应20 min, 进行上机检测。

1.5.2 骨髓间充质干细胞培养 健康及再障骨髓捐献者经过骨髓穿刺术得到5 mL肝素抗凝骨髓, 加入Ficoll细胞分离液, 密度梯度离心法提取单个核细胞, 由低糖DMEM培养液进行洗涤, 重悬后进行计数, 确认有核细胞数达到 $10^5/\text{cm}^2$ 之后进行原代细胞接种培养。培养48 h后首次全量换液, 去除未贴壁的细胞, 每3 d换液1次。待细胞达到80%以上融合时, 按照1:2比例进行传代培养, 记为第1代, 每3 d换液1次, 实现细胞有效扩增。传到第3代时, 分别取100 μ L细胞与鼠抗人CD29、CD105、CD44、CD34以及HLA-DR抗体在室温下反应30 min。流式细胞仪进行骨髓间充质干细胞表型鉴定。

1.5.3 脐血间充质干细胞培养 健康产妇行剖宫产, 于胎儿娩出之后穿刺脐静脉, 获得脐血量85-140 mL。培养脐血间充质干细胞的方法同骨髓间充质干细胞, 培养2周后收获细胞数量为 $(1.1-4.9)\times 10^7$ 个。流式细胞仪进行脐血间充质干细胞表型鉴定。

1.5.4 体外造血支持实验 向收集到的脐血中加入羟乙基淀粉沉降红细胞, 随后离心15 min。收集细胞后, 密度梯度离心法分离出脐血单个核细胞。将 1×10^6 细胞接种于

24孔培养板中, 加入20 μ g/L白细胞介素3、白细胞介素6、血小板生成素和干细胞因子的混合细胞因子, 随后加入患者骨髓间充质干细胞、正常骨髓间充质干细胞和正常脐血间充质干细胞($2\times 10^5/\text{孔}$)。所有细胞置于37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数为5%CO₂培养箱中培养1周。采用甲基纤维素半固体培养法将上述细胞置于Methocult™GF4435培养基中, 24 h后于倒置显微镜下计数CFU-GM和BFU-E。

1.5.5 间充质干细胞与异体T淋巴细胞共培养 将第3代骨髓间充质干细胞和脐血间充质干细胞铺于24孔板中, 待细胞生长达90%融合之后, 为去除其过度增殖以及分化能力, 对这两种间充质干细胞进行照射, 选择浓度以及形态较为适合的间充质干细胞接种于12孔培养板中, 加入RPMI1640培养基悬浮的再障患者T淋巴细胞, 用50 mg/L的植物血凝素刺激T淋巴细胞的转换增殖。以植物血凝素刺激的T细胞作为对照组, 同时设置再障患者骨髓间充质干细胞+T淋巴细胞组、正常骨髓间充质干细胞+T淋巴细胞组、正常脐血间充质干细胞+T淋巴细胞组。所有细胞均置于37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数为5%CO₂培养箱中孵育, 7 d后提取上清1 mL, 待测。

1.5.6 ELISA检测白细胞介素2、白细胞介素4、 γ -干扰素水平 ①样品的准备: 将准备测定的样品放在离心机中, 以1 000 r/min速度离心5 min, 取1 mL上清液进行冰浴。②于反应板孔中加入100 μ L样品以及标准品, 混匀30 s, 封住板孔, 放置在37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中1 h, 洗涤反应板, 去除水滴, 甩尽板内液体。③每孔加入100 μ L×Biotin, 混匀30 s, 放置在37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中1 h, 洗涤反应板, 去除水滴, 甩尽板内液体。④每孔加入100 μ L×HRP, 混匀30 s, 放置在37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中1 h, 洗涤反应板, 去除水滴, 甩尽板内液体。⑤每孔加入100 μ L TMB显色液, 混匀15 s, 在暗处温浴20 min。⑥每孔加入100 μ L终止液, 混匀30 s, 用酶标仪在492 nm波长处测定吸光度值。⑦绘制标准曲线, 依据标准曲线计算出白细胞介素2、白细胞介素4、 γ -干扰素水平。

1.6 主要观察指标 ①骨髓间充质干细胞培养形态和流式鉴定结果。②脐血间充质干细胞培养形态和流式鉴定结果。③间充质干细胞对再生障碍性贫血患者体外造血的支持作用。④间充质干细胞对再生障碍性贫血患者T细胞分泌功能的影响。

1.7 统计学分析 选择SPSS 18.0进行数据统计, 数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 计量资料的比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞培养形态和流式鉴定结果 刚接种时细胞呈圆形, 折光性较好, 培养瓶内混杂有红细胞、造血细胞等。接种48 h后更换培养液, 除去未贴壁生长的细胞, 其余细胞绝大多数贴壁生长, 形态为短梭形(图1A)。

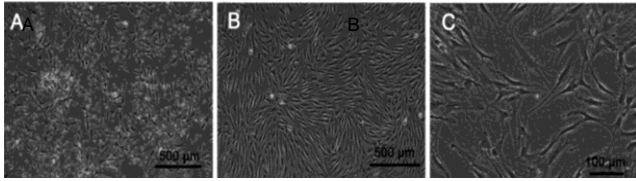


图 1 骨髓间充质干细胞培养形态

Figure 1 Morphology of human bone marrow mesenchymal stem cells

图注: 图中 A 为原代培养第 3 天, 细胞多数贴壁生长, 形态多为短梭形; B 为第 3 代培养第 3 天, 细胞呈较均一的长梭形、短梭形及多角形等; C 为第 5 代培养第 3 天, 细胞呈长梭形、短梭形。

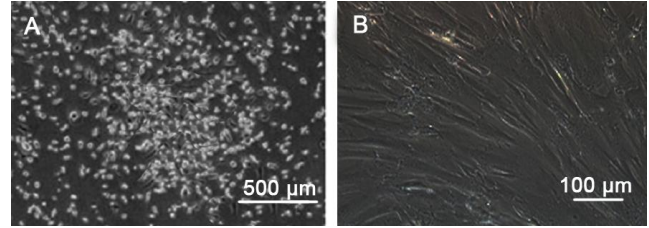


图 3 脐血间充质干细胞培养形态

Figure 3 Morphology of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells

图注: 图中 A 为原代培养第 3 天, 细胞多数贴壁生长, 细胞有的表现为破骨样细胞, 有的表现为间充质样细胞; B 为第 3 代培养第 3 天, 细胞呈形态均一的长梭形。

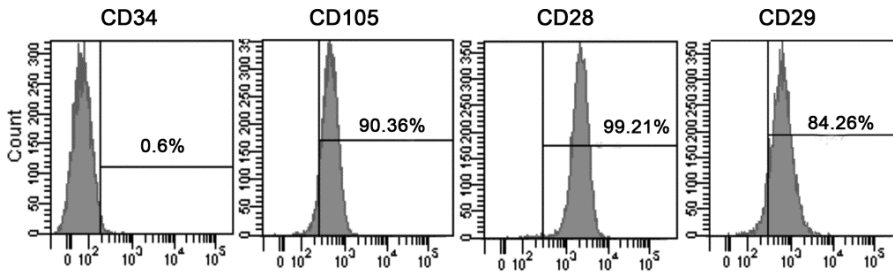


图 2 骨髓间充质干细胞免疫表型鉴定

Figure 2 Immunophenotyping of human bone marrow mesenchymal stem cells using flow cytometry

图注: 传代至第 3 代时应用流式细胞技术进行免疫表型鉴定, 结果显示 CD34 表达阴性, CD105, CD28 和 CD29 表达阳性。

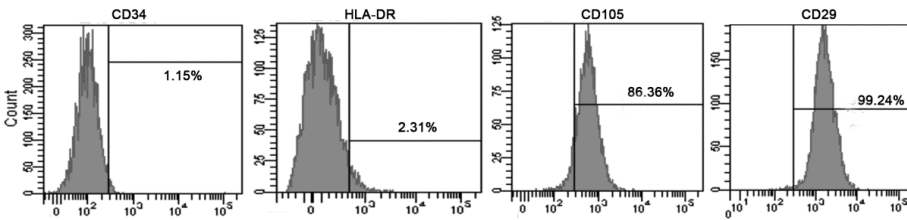


图 4 脐血间充质干细胞免疫表型鉴定

Figure 4 Immunophenotyping of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells using flow cytometry

图注: 传代至第 3 代时应用流式细胞技术进行免疫表型鉴定, 结果显示 CD34 和 HLA-DR 表达阴性, CD105 和 CD29 表达阳性。

表 1 间充质干细胞对再生障碍性贫血患者体外造血的支持作用

($\bar{x} \pm s, n=48$)

Table 1 Effect of mesenchymal stem cells from aplastic anemia patients on the hematopoietic support *in vitro*

组别	BFU-E	CFU-GM
对照组	20.53±3.41	25.11±10.21
正常骨髓间充质干细胞组	60.42±5.11 ^a	65.32±11.47 ^a
正常脐血间充质干细胞组	68.76±6.43 ^a	70.41±10.81 ^a
再生障碍性贫血骨髓间充质干细胞组	36.42±4.12 ^{abc}	39.18±7.12 ^{abc}

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与正常骨髓间充质干细胞组相比, ^b $P < 0.05$; 与正常脐血间充质干细胞组相比, ^c $P < 0.05$ 。

细胞传代后贴壁生长, 细胞呈现均一的长梭形、短梭形及多角形, 细胞紧密平行排列, 呈涡旋状或辐射状, 生长速度明显加快(图1B和1C)。

传代至第3代时, 流式细胞技术检测发现骨髓间充质干细胞表现为CD34阴性, CD105, CD28和CD29阳性(图2), 提示获得的细胞为骨髓间充质干细胞。

2.2 脐血间充质干细胞培养形态和流式鉴定结果 从脐血中分离出的单个核细胞接种于低糖DMEM培养基上, 培养48-72 h后细胞开始贴壁生长, 此时细胞为破骨样细胞或

表 2 各组细胞因子测定结果

($\bar{x} \pm s, n=48, \text{ng/L}$)

Table 2 Expression of cytokines in different groups

组别	白细胞介素 2	白细胞介素 4	γ -干扰素
对照组	80.21±3.97	68.92±11.21	103.24±13.02
正常骨髓间充质干细胞组	25.11±3.95 ^a	15.25±9.22 ^a	66.72±10.46 ^a
正常脐血间充质干细胞组	22.31±4.01 ^a	13.02±8.31 ^a	65.31±10.94 ^a
再生障碍性贫血骨髓间充质干细胞组	45.47±6.12 ^{abc}	30.04±7.29 ^{abc}	82.44±11.15 ^{abc}

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与正常骨髓间充质干细胞组相比, ^b $P < 0.05$; 与正常脐血间充质干细胞组相比, ^c $P < 0.05$ 。

间充质样细胞(图3A)。细胞传代后, 一两周可达到融合, 并表现出较强的生长能力, 此时细胞呈较均一的长梭形(图3B)。传代至第3代时应用流式细胞技术进行免疫表型鉴定, 结果显示: CD34和HLA-DR表达阴性, CD105和CD29表达阳性(图4), 符合脐血间充质干细胞的表型特征。

2.3 间充质干细胞对再生障碍性贫血患者体外造血的支持作用 与对照组相比, 正常骨髓间充质干细胞和脐血间充质干细胞与脐血单个核细胞共培养后, 其BFU-E、CFU-GM数目明显增高($P < 0.05$)。再生障碍性贫血患者骨

髓间充质干细胞与脐血单个核细胞共培养后, 其刺激BFU-E、CFU-GM形成的能力明显减弱($P < 0.05$), 见表1。

2.4 各组细胞因子测定结果 ELISA分析显示, 与植物血凝素诱导的T细胞对照组相比, 正常骨髓间充质干细胞共培养可明显抑制植物血凝素作用下T细胞分泌的白细胞介素2、白细胞介素4和 γ -干扰素水平($P < 0.05$)。正常脐血间充质干细胞共培养组也显示出了相似的抑制效果。而与正常骨髓间充质干细胞和脐血间充质干细胞共培养组相比, 再生障碍性贫血患者骨髓间充质干细胞共培养组抑制T细胞分泌白细胞介素2、白细胞介素4和 γ -干扰素的能力明显降低($P < 0.05$), 见表2。

3 讨论 Discussion

再障发病机制比较复杂, 以骨髓造血功能障碍、造血细胞增殖降低及外周血细胞减少为主要特征, 临床表现为贫血、出血^[1-15]。该病主要发生于青壮年, 可根据严重程度及病理进程分为急性和慢性再生障碍性贫血^[1-16]。间充质干细胞是由中胚层分化而来的一种成体干细胞, 是已知的骨髓造血微环境的重要前体细胞。近期研究表明, 间充质干细胞除了骨髓来源外, 在脂肪组织、胎血、胎盘和脐血等组织中也成功分离到了间充质干细胞^[6-7]。近年来, 越来越多研究证实骨髓间充质干细胞在骨髓移植后的造血重建及损伤修复等过程中具有潜在的应用价值^[17-19]。但是间充质干细胞在再障患者中的作用及其机制尚不清楚。

研究表明, 再障患者中存在严重的造血微环境缺陷^[3]。此研究初步探讨了再障患者来源的骨髓间充质干细胞和脐血间充质干细胞对体外造血支持的影响。结果表明, 与混合因子处理的对照组相比, 正常健康人的骨髓间充质干细胞支持脐血单个核细胞体外扩增的能力明显增强。而正常脐血间充质干细胞也明显诱导大量BFU-E、CFU-GM的生成。而与再障患者来源的骨髓间充质干细胞共培养后, 其诱导脐血单个核细胞体外扩增的能力明显降低。研究证实了再障患者来源的间充质干细胞体外造血支持的能力明显受到抑制, 提示再障患者体内造血微环境存在异常, 其间充质干细胞造血支持异常可能与患者的病理发展进程有关。

再障患者病因比较复杂, 其中免疫功能紊乱在再障的发病进程中起重要调控作用^[1]。近年来也有研究提出, 再障是一种自身免疫性疾病^[14]。T淋巴细胞属于细胞免疫反应里的重要效应细胞, 大量研究证实, 再障患者的骨髓造血障碍与T淋巴细胞数量异常、功能以及表型变化、比例失调和细胞因子的分泌失调密切相关^[20-22]。也有相关研究者认为, 再障患者体内中的T淋巴细胞功能亢进, 血浆、外周血CD3⁺、CD8⁺细胞高表达 γ -干扰素及肿瘤坏死因子 α 等造血负性因子, 从而引起T淋巴细胞分泌功能失衡, 出现过造血抑制性淋巴因子, 这是再障发病中的重要触发因素^[23-24]。因此, 该研究分析了间充质干细胞对T细胞分泌功能的影响。

T淋巴细胞分泌功能失调主要是由于T淋巴细胞分泌过多白细胞介素2, 从而对骨髓的造血功能产生抑制作用, 进而引发再生障碍性贫血现象^[25-26]。此外, 再障患者的骨髓以及外周血中淋巴细胞的活化会导致 γ -干扰素大量产生, 从而对骨髓造血产生抑制性作用^[27]。脐血间充质干细胞会使白细胞介素4的表达降低, 进而对再障患者的免疫紊乱起着调节的作用, 为患者的造血功能起到支持作用。研究也证实, 与对照组相比, 正常患者骨髓和脐血分离的间充质干细胞可明显抑制T细胞分泌白细胞介素4。再障患者来源间充质干细胞抑制T细胞分泌白细胞介素4的能力明显弱于健康对照组。此外, 结果显示, 与植物血凝素刺激的T细胞对照组相比, 正常骨髓来源和脐血来源的间充质干细胞均可明显抑制T细胞分泌的白细胞介素2和 γ -干扰素水平。再障患者来源的骨髓间充质干细胞抑制T细胞分泌的能力较健康对照组明显降低, 结果表明, 再障患者间充质干细胞能够明显抑制T淋巴细胞分泌。

综上所述, 再障患者自身骨髓间充质干细胞存在功能缺陷, 对造血功能支持及对T细胞分泌抑制功能的作用明显低于健康人, 提示再障患者间充质干细胞可能通过减弱其造血支持及抑制T细胞的功能来影响再障患者的病理进程。因此, 改善或修复间充质干细胞的功能缺陷有可能是再障患者治疗的研究靶点。

作者贡献: 实验设计为李罡灿, 实验实施为宋艳萍和张韵洁, 实验评估为李光, 资料收集为李罡灿、王浩和谢佳。

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: 所有患者及家属均知情同意, 并签署了知情同意书, 试验方案经西安市中心医院伦理委员会批准, 批准号为SFZX-013。西安市中心医院是中华骨髓库认定的定点移植医院。

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: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。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] 刘海芸, 刘婷婷. 再生障碍性贫血发病机制研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(4): 1216-1220.
- [2] Zeng Y, Katsanis E. The complex pathophysiology of acquired aplastic anaemia. Clin Exp Immunol. 2015; 180(3): 361-370.
- [3] Young NS. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2013; 2013: 76-81.

- [4] Fajardo-Orduña GR, Mayani H, Montesinos JJ. Hematopoietic Support Capacity of Mesenchymal Stem Cells: Biology and Clinical Potential. *Arch Med Res*. 2015 Oct 29. [Epub ahead of print]
- [5] Sahraneshin Samani F, Ebrahimi M, Zandieh T, et al. In Vitro Differentiation of Human Umbilical Cord Blood CD133(+) Cells into Insulin Producing Cells in Co-Culture with Rat Pancreatic Mesenchymal Stem Cells. *Cell J*. 2015;17(2):211-220.
- [6] Larijani B, Aghayan HR, Goodarzi P, et al. GMP-grade human fetal liver-derived mesenchymal stem cells for clinical transplantation. *Methods Mol Biol*. 2015;1283:123-136.
- [7] Yin T, He S, Su C, et al. Genetically modified human placenta-derived mesenchymal stem cells with FGF-2 and PDGF-BB enhance neovascularization in a model of hindlimb ischemia. *Mol Med Rep*. 2015;12(4):5093-5099.
- [8] 李启明,程天民,李宁,等.脐血间充质干细胞分离,培养与鉴定[J].*重庆医学*,2005,34(6): 879-881.
- [9] Liao L, Zhao RC. Mesenchymal Stem Cells and Their Immunomodulatory Properties. In: *Stem Cells: Basics and Clinical Translation*. Springer, 2015:67-83.
- [10] van den Berk LC, Jansen BJ, Snowden S, et al. Cord blood mesenchymal stem cells suppress DC-T Cell proliferation via prostaglandin B2. *Stem Cells Dev*. 2014;23(14):1582-1593.
- [11] Lee HJ, Ko JH, Ko AY, et al. Intravenous infusion of mesenchymal stem/stromal cells decreased CCR7(+) antigen presenting cells in mice with corneal allotransplantation. *Curr Eye Res*. 2014;39(8):780-789.
- [12] Plock JA, Schnider JT, Zhang W, et al. Adipose- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Prolong Graft Survival in Vascularized Composite Allotransplantation. *Transplantation*. 2015;99(9):1765-1773.
- [13] 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. *Stem Cell Res*. 2014;12(1):132-138.
- [14] 张之南,沈悌.血液病诊断及疗效标准[M].北京:科学出版社,2007.
- [15] Qin X, Baumann I, Chen J, et al. Refractory cytopenia of children and acquired aplastic anemia: a clinical and pathological study of 130 cases. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2014;35(8):713-718.
- [16] Dolberg OJ, Levy Y. Idiopathic aplastic anemia: diagnosis and classification. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):569-573.
- [17] Qian D, Gong J, He Z, et al. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Repair Necrotic Pancreatic Tissue and Promote Angiogenesis by Secreting Cellular Growth Factors Involved in the SDF-1 α /CXCR4 Axis in Rats. *Stem Cells Int*. 2015;2015:306836.
- [18] Luan Y, Ding W, Ju ZY, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against lung injury in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Mol Med Rep*. 2015;11(3):1945-1950.
- [19] Zhu F, Wang J, Qiu X, et al. Smoke inhalation injury repaired by a bone marrow-derived mesenchymal stem cell paracrine mechanism: Angiogenesis involving the Notch signaling pathway. *J Trauma Acute Care Surg*. 2015;78(3):565-572.
- [20] 唐旭东,张姗姗,许勇钢,等.T 细胞亚群在重型再生障碍性贫血治疗中的疗效预测价值[J].*中医杂志*,2013,54(20): 1755-1758.
- [21] 郭鹏,刘传方,赵雯.人脐带沃顿胶间充质干细胞对重型再生障碍性贫血调节性T细胞及Foxp3基因的影响[J].*山东大学学报:医学版*,2011,49(9): 71-76.
- [22] Wu Q, Zhang J, Shi J, et al. Increased bone marrow (BM) plasma level of soluble CD30 and correlations with BM plasma level of interferon (IFN)- γ , CD4/CD8 T-cell ratio and disease severity in aplastic anemia. *PLoS One*. 2014;9(11): e110787.
- [23] 蒋白丽,李建平,李文倩,等. CD8+T细胞及其分泌的细胞因子在再生障碍性贫血发病机制中的作用[J].*中国实验血液学杂志*, 2014, 22(2): 569-572.
- [24] 张婧瑶,许洪志,尹冬梅,等.再生障碍性贫血、骨髓增生异常综合征、急性髓系白血病患者CD8+T细胞亚群的变化及临床意义[J].*中国实验血液学杂志*,2013,21(1): 203-208.
- [25] Desalpine M, Bagga PK, Gupta PK, et al. To evaluate the role of bone marrow aspiration and bone marrow biopsy in pancytopenia. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(11):FC11-15.
- [26] Desmond R, Townsley DM, Dunbar C, et al. Eltrombopag in aplastic anemia. *Semin Hematol*. 2015;52(1):31-37.
- [27] 向永胜,王龙.环孢素A对慢性再生障碍性贫血患者血清 γ 干扰素及一氧化氮、一氧化氮合酶的影响[J].*中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(3):220-222.