

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00034

间充质干细胞治疗实验性自身免疫性脑脊髓炎的疗效和免疫调节机制

张俊华, 郑配国, 马雪涵, 刘红春*, 明亮*

郑州大学第一附属医院检验科, 郑州 450052

[摘要] 目的 观察间充质干细胞(MSC)对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的疗效并探讨其免疫调节机制。

方法 用髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG₃₅₋₅₅)和弗氏完全佐剂诱导建立 C57BL/6 小鼠 EAE 模型, 随机分为 MSC 治疗组和 EAE 组。分离纯化培养 GFP-C57BL/6 小鼠骨髓 MSC 细胞。在 EAE 诱导后的第 15 天, MSC 治疗组以每只 $1 \times 10^6 / 400 \mu\text{L}$ 的量经尾静脉注射 MSC 细胞, EAE 组尾静脉注射 $400 \mu\text{L}$ PBS。采用临床评分和脊髓组织切片评估小鼠的发病情况, ELISA 检测小鼠外周血细胞因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)、白介素 4(IL-4)和转化生长因子 β (TGF- β)的含量, 流式细胞术分析小鼠脾脏细胞中 CD4⁺ Foxp3⁺ T 细胞(Treg)的比例变化和 GFP⁺ 细胞在受体小鼠体内的比例变化。

结果 与 EAE 组相比, MSC 治疗组小鼠的临床评分降低($P < 0.05$); 脊髓组织切片中 T 细胞浸润减少; 血浆中细胞因子 IL-4 和 TGF- β 的含量升高, 而 IFN- γ 和 TNF- α 降低; 脾脏细胞中 CD4⁺ Foxp3⁺ T 细胞(Treg)的比例明显升高。移植 10 d 后 MSC 消失。

结论 MSC 移植对小鼠 EAE 疗效显著。MSC 通过增加血浆中抗炎因子 IL-4 和 TGF- β 的含量, 降低促炎因子 IFN- γ 和 TNF- α 的含量, 从而促使原始 T 细胞向 Treg 细胞分化, 发挥免疫调节作用, 且 MSC 消失后一段时间仍对 EAE 有一定治疗作用。

[关键词] 间质干细胞; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 调节性 T 淋巴细胞; 免疫调节

[中图分类号] R 744.51; R 392.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)01-0034-05

Mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis and the immunoregulation mechanism

ZHANG Jun-hua, ZHENG Pei-guo, MA Xue-han, LIU Hong-chun*, MING Liang*

Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China

[Abstract] Objective To observe the efficacy of mesenchymal stem cells (MSC) for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and the related immunoregulation mechanism. **Methods** EAE models of C57BL/6 mice were established with MOG₃₅₋₅₅/CFA emulsion and the EAE mice were randomly divided into MSC treatment group and EAE model group. MSCs were purified and cultured from the bone marrow of GFP-C57BL/6 mice. On the 15th day of EAE model establishment, MSCs ($1 \times 10^6 / 400 \mu\text{L}$) were injected via the tail vein for the MSC treated group, and $400 \mu\text{L}$ PBS were injected for the EAE model mice. Then we recorded the clinical scores and analyzed the pathological changes of spinal cord so as to evaluate the state of EAE in each group. The peripheral blood tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-4 (IL-4) and transforming growth factor- β (TGF- β) cytokines were evaluated by ELISA. The percent of CD4⁺ Foxp3⁺ Treg cells and GFP⁺ cells were analyzed by Flow cytometry. **Results** Compared with EAE model group, the MSC treated group had significantly decreased clinical score ($P < 0.05$) and less T-cell infiltration in the spinal cord. MSC treated group had increased peripheral blood IL-4, TGF- β and decreased IFN- γ , TNF- α levels. Moreover, the MSC treated group also had greatly increased ratio of CD4⁺ Foxp3⁺ T cells (Treg). The MSC cells almost disappeared 10 days after transplantation. **Conclusion** Mesenchymal stem cell transplantation can effectively treat experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. MSC may exert immunoregulation effect through increasing blood anti-inflammatory cytokines (IL-4, TGF- β) and decreasing proinflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α), which can prompt the naive cell differentiation into Treg cells. The effect of MSC remains even after disappearing for a certain time period.

[收稿日期] 2014-05-28 **[接受日期]** 2014-10-30

[基金项目] 国家自然科学基金(81172835). Supported by National Natural Science Foundation of China(81172835).

[作者简介] 张俊华, 硕士生. E-mail: zjhfc520@163.com

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 0371-67966309, E-mail: xingyuerliu@163.com; Tel: 0371-66913118, E-mail: jykmingliang@163.com

[Key words] mesenchymal stem cells; experimental autoimmune encephalomyelitis; regulatory T-lymphocytes; immunoregulation
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(1): 34-38]

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是具有自我复制、自我更新和多分化潜能的成体干细胞,在体外特定的诱导条件下,可分化为脂肪、软骨、骨、肌肉、肌腱、神经、肝、心肌、胰岛 β 细胞和内皮等多种组织细胞,连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能^[1]。不论是自体还是同种异源的MSC,一般都不会引起宿主的免疫反应,即MSC具有低免疫原性。MSC抑制同种异体T细胞活化和增殖的免疫调节作用也被不断证实^[2-5]。

多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)是髓鞘特异性T细胞介导的自身免疫性疾病,机体产生自身反应性T细胞是MS发病的主要原因^[6]。实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是MS的理想动物模型。本研究将分离纯化的MSC移植至EAE小鼠模型,观察MSC对EAE的疗效,探讨其免疫调节机制,为MSC治疗自身免疫病的机制研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 胎牛血清(FBS)为Gibco公司产品;DMEM培养基为Invitrogen产品;髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG₃₅₋₅₅;肽序列:Met-Glu-Val-Gly-Trp-Tyr-Arg-Ser-Pro-Phe-Ser-Arg-Val-Val-His-Leu-Tyr-Arg-Asn-Gly-Lys),纯度98%,购于上海吉尔生化公司;弗氏完全佐剂(CFA,灭活结核分枝杆菌含量5 mg/mL)购于上海三踏生物科技有限公司;百日咳毒素(PT)购于北京联立信生物技术有限公司;大鼠抗小鼠抗体 anti-CD4-FITC 和 anti-Foxp3-Flu647 均购于 eBioscience 公司;ELISA 试剂盒购于上海科兴生化试剂有限公司;BD FACS Calibur 流式细胞仪为美国 BD 公司产品;石蜡切片机为德国 SLEE 公司产品;ELISA 酶标仪为 Bio-Tek 公司产品。

1.2 实验动物及分组 6~8 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠和 GFP-C57BL/6 小鼠,体质量 20~25 g[北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001],饲养在河南省实验动物中心 SPF 级环境中。选用 30 只 C57BL/6 小鼠进行 EAE 诱导,至发病高峰期即诱导后第 15 天,除去 2 只死亡的小鼠,随机分为 EAE 组和 MSC 治疗组。

1.3 小鼠 EAE 模型的建立及临床评分标准 小鼠背部皮下多点免疫 CFA 和 MOG₃₅₋₅₅ 的乳化剂

(5 mg/mL 的 CFA 与 1.5 mg/mL 的 MOG₃₅₋₅₅ 溶液按等体积混合,使用注射器反复推拉成油包水的乳剂),200 μ L/只,在免疫后第 0 天和第 2 天尾静脉注射 PT 试剂(稀释在 200 μ L PBS 中),2 μ L/只。按照如下标准对小鼠进行临床评分:0 分,正常小鼠;0.5 分,尾部无力;1.0 分,尾部完全瘫痪;1.5 分,一后肢无力;2.0 分,两后肢均无力;2.5 分,一后肢瘫痪,另一后肢无力;3.0 分,两后肢均瘫痪;3.5 分,部分前肢瘫痪;4.0 分,前肢完全瘫痪;5.0 分,死亡。

1.4 MSC 的分离纯化和移植 颈椎脱臼处死 20 只正常 GFP-C57BL/6 小鼠,在无菌条件下剥离小鼠胫骨和股骨,暴露骨髓腔,使用 PBS 冲洗出骨髓腔中的细胞,394.2 \times g 离心 5 min 收集细胞,使用含 15% FBS 的 DMEM 培养液重悬细胞,调整细胞密度为 1×10^6 /mL,放置在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中进行培养。4 h 后换液,去除未贴壁的细胞,之后每 12 h 换液 1 次,3 d 后显微镜下观察贴壁细胞的铺满率,若 >80% 就用胰酶消化进行传代培养。MSC 传代培养至第 5 代,镜下观察 MSC 纯度达 95%。EAE 诱导后的第 15 天,使用胰酶消化重悬 MSC,调整 MSC 悬液的浓度,以每只 1×10^6 /400 μ L 的量经尾静脉注射至 MSC 治疗组小鼠体内。同时 EAE 组小鼠经尾静脉注射 400 μ L PBS 作为对照。

1.5 脊髓组织病理切片分析 MSC 移植后第 15 天,随机选取 EAE 组和 MSC 治疗组小鼠各 3 只。用 20 g/L 戊巴比妥钠 0.1 mL 麻醉小鼠,用 40 g/L 多聚甲醛进行心脏灌注,解剖取出小鼠的脊髓。置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后,送至郑州大学第一附属医院病理科进行切片及 H-E 染色。

1.6 ELISA 检测血浆细胞因子的含量 MSC 移植后第 15 天,各组小鼠取 5 只进行尾静脉取血,按照 ELISA 试剂盒说明书的要求检测血浆中细胞因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)、白介素 4(IL-4)和转化生长因子 β (TGF- β)的含量。

1.7 流式细胞术分析 Treg 和 MSC 在受体小鼠体内的变化 MSC 移植后第 2 天和第 10 天,分别颈椎脱臼处死小鼠 3 只,取出脑和脊髓,使用 Ficoll 分离液提取单个核细胞,采用流式细胞术检测 GFP⁺ 细胞的比例。MSC 移植后第 15 天,处死小鼠并获取脾脏细胞悬液,计数脾脏细胞数 1.5×10^6 ,标记抗小鼠流式抗体 CD4-FITC、Foxp3-Flu647,用 FlowJo 软件分析两组小鼠脾脏 CD4⁺ Foxp3⁺ T 细胞(Treg)的比例变化。

1.8 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,采用 GraphPad Prism 5 作为作图工具和辅助统计分析工具。计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间各指标的比较采用单因素方差分析和 t 检验,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 MSC 移植后对 EAE 小鼠的治疗效果 EAE

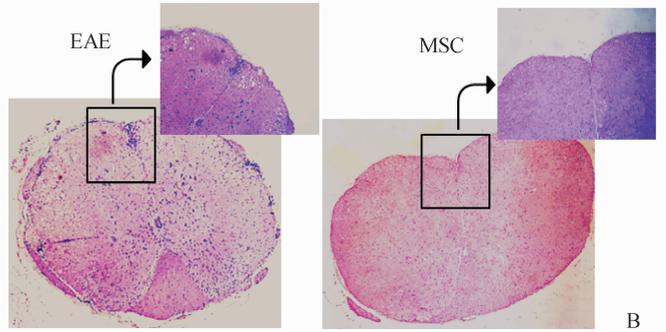
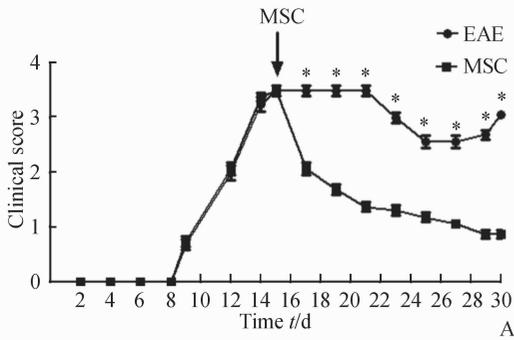


图 1 间充质干细胞(MSC)对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的疗效

Fig 1 Effect of mesenchymal stem cells (MSC) for treating experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)

A: The clinical score of the two groups (* $P < 0.05$ vs MSC treated group, $n=8$, $\bar{x} \pm s$); B: The spinal pathology at 15 d after MSC transplantation (H-E staining, original magnification: $\times 50$, $\times 100$ [inclusion])

2.2 MSC 移植后对外周血中细胞因子的影响

ELISA 结果显示,EAE 组小鼠炎症细胞因子 TNF- α 和 IFN- γ 的含量高于正常小鼠($P < 0.05$);抗炎因子 IL-4 和 TGF- β 的表达则明显低于正常小鼠($P < 0.05$);与 EAE 组小鼠相比,MSC 治疗组小鼠炎症细胞因子 TNF- α 和 IFN- γ 的表达降低($P < 0.05$),而抗炎因子 IL-4 和 TGF- β 的表达升高($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 MSC 移植后 Treg 细胞的比例变化

对小鼠脾脏细胞进行流式细胞术分析,结果显示,与正常小鼠[(11.2 \pm 0.4)%]相比,MSC 治疗组小鼠脾脏细胞中 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞的比例[(19.08 \pm 0.33)%]升高($P < 0.05$),而 EAE 组 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 的比例[(6.32 \pm 0.19)%]稍有下降但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。

2.4 MSC 移植后 MSC 在受体小鼠脊髓中的变化

MSC 移植 2 d 后小鼠脊髓单个核细胞中 GFP⁺ 细胞的比例为(1.82 \pm 0.08)%,而 10 d 后发现 GFP⁺ MSC 细胞基本消失(图 4)。

3 讨论

MS 是一种以中枢神经系统(central nervous system, CNS)脱髓鞘为特征、CD4⁺ T 细胞介导的自身免疫性疾病^[7-8]。目前临床上对 MS 还没有一种有效的治疗方法,主要原因是在对患者进行髓鞘

诱导后,对 EAE 组和 MSC 治疗组小鼠进行临床评分,可见 MSC 治疗组小鼠的临床评分在 MSC 移植后的第 2 天就开始明显降低($P < 0.05$),之后开始缓慢降低(图 1A)。

在 MSC 移植后第 15 天,两组小鼠的脊髓组织病理切片结果显示:EAE 组小鼠脊髓组织有大量的 T 细胞浸润,MSC 治疗组 T 细胞浸润情况明显改善(图 1B)。

再生和修复的过程中,不能够有效地抑制患者体内自体反应性 T 细胞的产生^[9]。所以研究在治疗 MS 过程中免疫调节的作用就显得尤为重要。MSC 移植是一种潜在的治疗 MS 患者髓鞘再生和修复的有效手段。有研究发现来源于成人组织的 MSC 可通过抑制 T 淋巴细胞浸润 CNS,有效地促使神经髓鞘

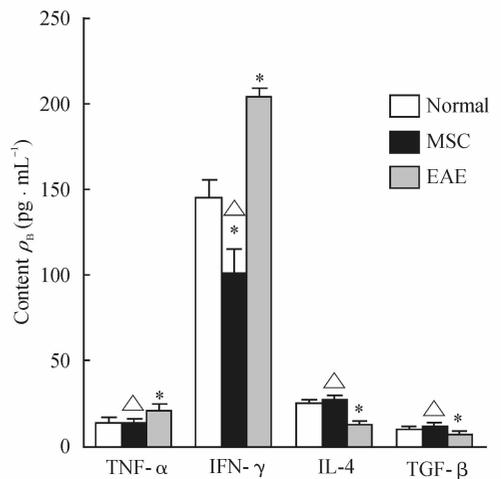
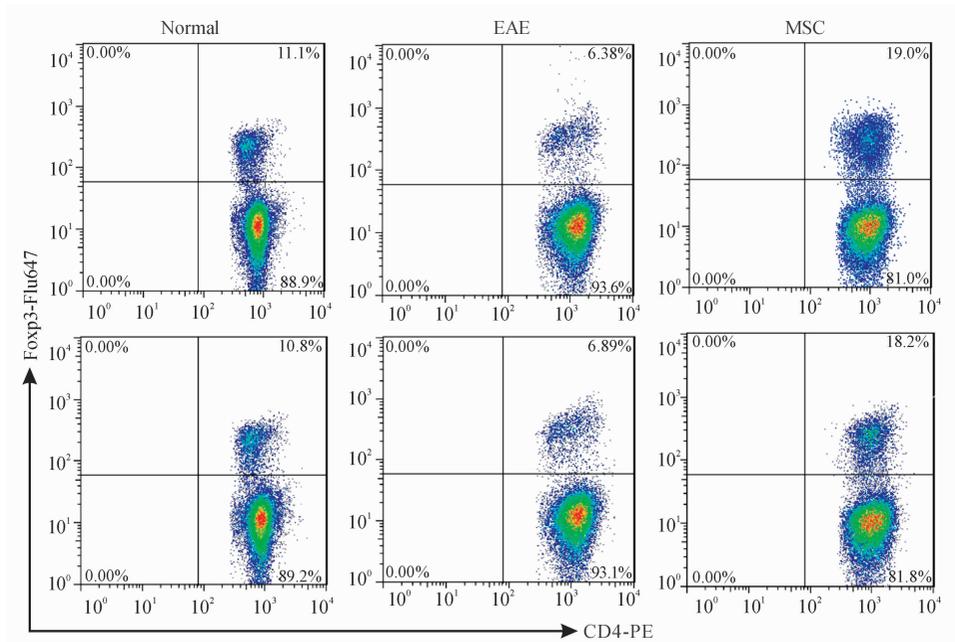


图 2 ELISA 检测间充质干细胞(MSC)移植后 15 d 实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)小鼠外周血中细胞因子的含量

Fig 2 Cytokine contents in peripheral blood of experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE) mice at 15 d after mesenchymal stem cells (MSC) transplantation by ELISA

* $P < 0.05$ vs normal group; $\Delta P < 0.05$ vs EAE group. $n=5$, $\bar{x} \pm s$

图 3 流式细胞术分析脾脏细胞中 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞的比例Fig 3 Ratio of CD4⁺ Foxp3⁺ Treg cells in splenic cells as determined by Flow cytometry

MSC: Mesenchymal stem cells treated group; EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis group

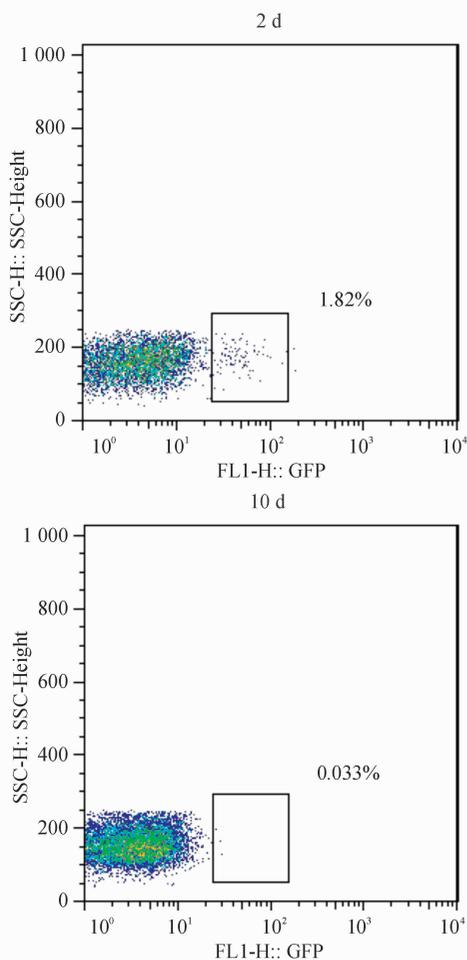


图 4 流式细胞术分析间充质干细胞 (MSC) 移植 2 d 和

10 d 后 C57BL/6 小鼠脊髓中 GFP⁺ 细胞的比例

Fig 4 Ratio of GFP⁺ cells at 2 d and 10 d after mesenchymal stem cell (MSC) transplantation

细胞再生, 并调节患者的神经炎症和损伤^[10]。MSC 可通过依赖 CCL-2 的途径抑制 CD4 Th17 细胞的生成而发挥对 EAE 的治疗作用^[11]。有学者在研究原始细胞向 Th1 和 Th17 细胞分化的过程中, 发现 MSC 通过抑制促炎性 T 细胞的生成和促使调节性细胞表型的表达, 给细胞提供一个免疫反应受抑的生长环境^[12]。人类脂肪组织来源的 MSC 可通过分泌 IL-10 来抑制 APC 细胞的功能, 缓解 CNS 的自身免疫性疾病^[13]。另外, 近几年 MSC 的神经再生和神经营养作用机制也被学者不断阐述^[14]。

本研究通过建立 EAE 模型, 并在 EAE 小鼠发病高峰期进行 GFP⁺ MSC 移植, 观察 EAE 组小鼠和 MSC 治疗组小鼠的发病情况。数据显示在 MSC 治疗后第 2 天小鼠的临床症状明显减轻, 之后仍旧以平缓的趋势改善。这些现象与前期报道^[15]一致。MSC 移植后第 15 天, MSC 治疗组小鼠血浆中促炎因子 TNF- α 和 IFN- γ 的含量明显降低, 而抗炎因子 IL-4 和 TGF- β 的含量升高 ($P < 0.05$)。原始 T 细胞的分化受到细胞因子的影响, TNF- α 和 IFN- γ 可以促使原始 T 细胞分化为 Th1 和 Th17 等致病细胞; IL-4 可促使原始 T 细胞分化为 Th2; TGF- β 是促使向 Treg 细胞分化的主要细胞因子^[16-17]。通过流式细胞术分析发现, EAE 组小鼠脾脏细胞中 Treg 细胞在 CD4⁺ T 细胞中的比例由正常小鼠的 $(11.2 \pm 0.37)\%$ 下降至 $(6.32 \pm 0.19)\%$; 而 MSC 治疗组小鼠脾脏细胞中 Treg 的比例升高至 $(19.08 \pm$

0.33)%。但是关于 TGF- β 升高是引起 Treg 细胞升高的原因还是结果,仍需进一步探讨。另外,本研究还发现,在 MSC 移植后第 2 天,小鼠 CNS 中仍存在 GFP⁺ 细胞,但是 10 d 后,GFP⁺ 细胞基本消失,初步推测 MSC 在小鼠体内会随着时间的推移逐渐被吞噬掉,详细机制需要进一步研究。但是,我们继续观察至 MSC 移植后 15 d,发现 MSC 治疗组小鼠的疾病症状仍旧在缓慢改善。对于这一现象,我们认为可作如下解释:MSC 可以促使小鼠分泌细胞因子,而这些细胞因子本身就有抗炎作用,另外也可以促使原始细胞向免疫抑制细胞即 Treg 分化,从而发挥免疫抑制和调节作用;同时 MSC 的神经营养作用使小鼠受损神经再生和恢复,所以,MSC 细胞在体内被吞噬消失后一定时间内,在部分恢复的血脑屏障的保护下致病细胞 Th1/Th17 不能大量进入 CNS。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, Jaiswal R K, Douglas R, Mosca J D, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999,284:143-147.
- [2] Di N M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni P D, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli[J]. *Blood*, 2002,99:3838-3843.
- [3] Augello A, Tasso R, Negrini S M, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway[J]. *Eur J Immunol*, 2005,35:1482-1490.
- [4] Glennie S, Soeiro I, Dyson P J, Lam E W, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells[J]. *Blood*, 2005, 105:2821-2827.
- [5] Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy [J]. *Blood*, 2005, 106: 1755-1761.
- [6] O'Connor R A, Prendergast C T, Sabatos C A, Lau C W, Leech M D, Wraith D C, et al. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Immunol*, 2008,181:3750-3754.
- [7] Noseworthy J H, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker B G. Multiple sclerosis [J]. *N Engl J Med*, 2000,343:938-952.
- [8] Anderson A C, Chandwaskar R, Lee D H, Sullivan J M, Solomon A, Rodriguez-Manzanet R, et al. A transgenic model of central nervous system autoimmunity mediated by CD4⁺ and CD8⁺ T and B cells[J]. *J Immunol*, 2012,188:2084-2092.
- [9] Karussis D, Grigoriadis S, Polyzoidou E, Grigoriadis N, Slavin S, Abramsky O. Neuroprotection in multiple sclerosis [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2006, 108: 250-254.
- [10] Matysiak M, Orłowski W, Fortak-Michalska M, Jurawicz A, Selmaj K. Immunoregulatory function of bone marrow mesenchymal stem cells in EAE depends on their differentiation state and secretion of PGE2[J]. *J Neuroimmunol*, 2011,233:106-111.
- [11] Rafei M, Campeau P M, Aguilar-Mahecha A, Buchanan M, Williams P, Birman E, et al. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4⁺ Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner[J]. *J Immunol*, 2009, 182:5994-6002.
- [12] Luz-Crawford P, Kurte M, Bravo-Alegria J, Contreras R, Nova-Lamperti E, Tejedor G, et al. Mesenchymal stem cells generate a CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells[J]. *Stem Cell Res Ther*. 2013,4:65.
- [13] Payne N L, Sun G, McDonald C, Moussa L, Emerson-Webber A, Loisel-Meyer S, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells engineered to secrete IL-10 inhibit APC function and limit CNS autoimmunity[J]. *Brain Behav Immun*, 2013,30:103-114.
- [14] Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells[J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2011,24:59-64.
- [15] Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Stem Cells*, 2009, 27: 2624-2635.
- [16] Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology [J]. *Science*, 2007, 317:627-629.
- [17] Ryu C H, Park K Y, Hou Y, Jeong C H, Kim S M, Jeun S S. Gene therapy of multiple sclerosis using interferon beta-secreting human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 696738.