

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.01.003

IL-17 对人脐带间充质干细胞体外免疫调节特性的影响 *

白喜龙^{1,2,3} 姚含秉^{1,3} 黄斯勇³ 张 蓉² 崔江霞³ 梁英民^{1,2,3Δ} 李天晴^{1,4Δ}

(1 陕西圆梦生命科学研究院有限公司 陕西 西安 710100; 2 西安高新医院 陕西 西安 710000;

3 西安国际医学中心医院血液病医院 陕西 西安 710100; 4 昆明理工大学灵长类转化医学研究院 云南 昆明 650500)

摘要 目的:研究白细胞介素 17(IL-17)对人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)的免疫调节能力的影响。**方法:**采用组织块贴壁法从健康足月胎儿脐带中分离培养 hUC-MSCs, 并对其进行鉴定。然后在培养基中加入不同浓度 IL-17, 采用 EdU 细胞增殖法检测 hUC-MSCs 增殖情况, 流式细胞术 (FCM) 检测 hUC-MSCs 表面标记及细胞周期, RT-qPCR 检测免疫调节相关基因表达水平, ELISA 检测上清中免疫调节相关因子分泌水平, 免疫学反应检测其免疫调节能力。**结果:**① 倒置显微镜下观察可见 hUC-MSCs 呈现较均一漩涡状、梭形生长, 细胞体积较小; 细胞表面表达 CD44、CD73、CD90、CD105, 不表达 CD34、CD19、CD11b、CD45、HLA-DR; 具有成脂、成骨、成软骨诱导分化能力。② FCM 检测结果显示 IL-17 处理后, hUC-MSCs 免疫表型未发生变化, 而 IFN- γ 处理后, hUC-MSCs 表面标记 HLA-DR 表达明显上调。③ 与对照组相比, IL-17 处理组的 hUC-MSCs 活性更好, 且能促进细胞增殖。④ 与空白对照组相比, IL-17 处理组 hUC-MSCs 的 TGF- β 、IL-10、IDO、PGE2、TSG-6、PD-L1 基因表达均显著上调 ($P<0.001$)。⑤ ELISA 检测结果显示, 与空白对照组相比, IL-17 处理组上清中 TGF- β 、IL-10、IDO、PGE-2、TSG-6、PD-L1 分泌水平明显增高 ($P<0.001$)。⑥ 与空白对照组相比, IL-17 处理组的 CD3⁺CD4⁺T 细胞、CD3⁺CD8⁺T 细胞、B 细胞的比例降低, Treg 细胞比例增高 ($P<0.001$)。**结论:**IL-17 在不影响 hUC-MSCs 免疫表型的条件下, 可促进细胞增殖, 上调免疫相关基因表达, 提高 TGF- β 、IL-10、PGE-2、IDO、TSG-6、PD-L1 分泌水平, 增强 hUC-MSC 免疫调节能力。因此, 本研究将为预处理的 hUC-MSCs 防治免疫炎症性疾病提供理论依据。

关键词:人脐带间充质干细胞; 干扰素- γ ; 白介素-17; 免疫调节能力; 炎症微环境

中图分类号:R-33; R331.2; R392 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)01-13-08

Effect of IL-17 on the Immunoregulatory Characteristics of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Vitro*

BAI Xi-long^{1,2,3}, YAO Han-bing^{1,3}, HUANG Si-yong³, ZHANG Rong², CUI Jiang-xia³, LIANG Ying-min^{1,2,3Δ}, LI Tian-qing^{1,4Δ}

(1 Shaanxi Yuanmeng Institute of Bioscience Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi, 710100, China; 2 Xian Gaoxin Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710000, China; 3 Blood Disease Hospital, Xian International Medical Center Hospital Xi'an, Shaanxi, 710100, China;

4 Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan, 650500, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effects of interleukin 17(IL-17) on the immunomodulatory capacity of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs). **Methods:** hUC-MSCs were isolated from the umbilical cord of healthy term fetus by tissue explants adherent method, and cultured with serum-free medium with IL-17. EdU cell proliferation method was used to detect the proliferation of hUC-MSCs, Flow cytometry was used to detect cell surface markers and cell cycle, gene expression levels related to immune regulation was detected by RT-qPCR, the secretion level of immunomodulatory factors was detected by ELISA, and the immunomodulatory ability of hUC-MSCs was detected by immunological experiment. **Results:** ① Under the inverted microscope, hUC-MSCs cultured with with serum-free medium showed more uniform vortex-like and spindle growth. hUC-MSCs were expressed CD44, CD73, CD90 and CD105, but lowly expressed CD34, CD19, CD11b, CD45, and HLA-DR. Results from the induced differentiation experiments showed that hUC-MSCs had adipogenic, osteogenic and chondrogenic abilities. ② After IL-17 pre-treatment, the immunophenotype of hUC-MSCs was not changed, however, after IFN- γ pre-treatment, the expression of HLA-DR on hUC-MSCs was significantly up-regulated. ③ As compared with control group, the cell viability and cell proliferation of hUC-MSCs were pre-treatment by IL-17 was better. ④ Compared with the blank control group, the gene expressions of TGF- β , IL-10, IDO, PGE2, TSG-6, and PD-L1 of hUC-MSCs were pre-treatment by IL-17 were significantly up-regulated ($P<0.001$). ⑤ Compared with the blank control

* 基金项目:国家重点研究发展计划项目(2018YFA0108502);陕西省自然科学基金研究计划项目(2019JQ-997);

陕西卫生健康委科研基金项目(2018E004);西安市科技计划项目(20YXYJ0007(3))

作者简介:白喜龙(1986-),男,硕士,主要研究方向:干细胞与再生医学,E-mail: xlbai0907@163.com

Δ 通讯作者:梁英民(1957-),男,教授,主要研究方向:造血干细胞移植,E-mail: liangym@fmmu.edu.cn;

李天晴(1975-),男,教授,主要研究方向:干细胞与组织工程,E-mail: litq@lpbr.cn

(收稿日期:2020-05-28 接受日期:2020-06-23)

group, the secretion levels of TGF- β , IL-10, IDO, PGE-2, TSG-6 and PD-L1 were significantly increased in the supernatant of UC-MSCs were pre-treatment by IL-17 group ($P<0.001$). ② hUC-MSCs were pre-treatment by IL-17 can reduce the proportion of CD3⁺CD4⁺T cells, CD3⁺CD8⁺T cells, and B cells in lymphocytes, but increase the proportion of Treg cells ($P<0.001$). **Conclusions:** Without affecting the immunophenotype of hUC-MSCs, IL-17 can promote cell proliferation, up-regulate the expression of immune-related genes, increase the secretion level of TGF- β , IL-10, PGE-2, IDO, TSG-6, PD-L1, and enhance immune regulation ability of hUC-MSC. Therefore, this study will provide a theoretical basis for priming hUC-MSCs to prevent and treat immune inflammatory diseases.

Key words: Human umbilical cord mesenchymal stem cells; IFN- γ ; IL-17; Immunoregulation capability; Inflammatory microenvironment

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R331.2; R392 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)01-13-08

引言

间充质干细胞(Mesenchymal Stem Cells, MSCs)是一种具有自我复制能力和多向分化潜能的成体干细胞,广泛存在于骨髓、脂肪、脐带、胎盘和牙髓等组织中^[1-4]。大量研究发现 MSCs 具有较好的组织修复再生能力;同时 MSCs 可分泌多种细胞因子,调节免疫细胞,发挥免疫调控作用。目前, MSCs 在免疫调控方面展现出了良好的临床应用前景,如糖尿病^[5]、类风湿关节炎^[6]、克罗恩病^[7]、系统性红斑狼疮^[8]、移植物抗宿主病(GvHD)^[9]。然而,在不同疾病类型中,炎症组织的免疫微环境千差万别,这在一定程度上决定了输注 MSCs 的命运和治疗效果^[10]。因此,有学者认为应将 MSCs 免疫调节能力作为其评价标准之一^[11]。

研究表明, MSCs 发挥免疫调节作用需要将其暴露在某些特定的炎症微环境中^[12],而干扰素 γ (IFN- γ),肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等炎性因子是 MSCs 发挥免疫调节作用所不可缺少的 "授权" 因子^[13,14]。白细胞介素 17(IL-17)主要由辅助性 T 细胞 17 特异性分泌,是近年来发现的 "明星" 前炎性细胞因子,其主要生物学功能为招募中性粒细胞、诱导多种细胞分泌炎症细胞因子和趋化因子等多种生物学功能^[15]。IL-17 在感染、慢性炎症反应和自身免疫性疾病中发挥重要作用,如类风湿关节炎、系统性红斑狼疮及多发性硬化等^[16]。但目前白 IL-17 对 hUC-MSCs 的免疫调节能力的影响少有报道。因此,本研究拟在 hUC-MSCs 培养基中加入不同浓度 IL-17,分析它们对 hUC-MSCs 的免疫表型、细胞增殖能力、炎性因子分泌及淋巴细胞抑制能力的影响,为免疫系统疾病的防治提供一个新策略。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 脐带组织 经西安高新医院伦理会批准,与签署知情同意书,采集正常足月剖腹产儿脐带。产妇无传染性疾病、家族病史,胎儿无先天性疾病。

1.1.2 主要试剂和设备 无血清培养基(北京友康生物),流式抗体检测试剂盒(BD),间充质干细胞成脂、成骨、成软骨诱导分化培养基(广州赛业),淋巴细胞亚群试剂盒(BD),PMA(Sigma),PHA-P(Solarbio),IFN- γ (PEPROTECH),IL-17(PEPROTECH),BeyoClick EdU-647 细胞增殖检测试剂盒(碧云天),qPCR Master Mix(Promega),TGF- β , IL-10, TSG-6, PD-L1(达科为),IDO1(FineTest),PGE2(上海哈灵),引物合成(上海生工);

FACS Canto 流式细胞仪(BD),倒置相差显微镜(Leica),生物安全柜(Thermo),二氧化碳培养箱(Thermo),酶标仪(Thermo),离心机(Thermo)。

1.2 研究方法

1.2.1 hUC-MSCs 的分离及培养^[17] 无菌条件下,用 PBS 将新鲜健康脐带清洗至无血液残余,剥离脐带动脉、静脉及外膜余华通氏胶。将脐带组织剪成 2 mm×2 mm 小组织块,平摊于培养皿中,加入无血清培养基,放置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。于接种第 2 d 补液,以后每隔 3 d 换液 1 次。在倒置显微镜下观察细胞的形态和生长情况。待贴壁细胞融合至 80%-90%时,用 TrypLE 消化传代,收集细胞。

1.2.2 hUC-MSCs 免疫表型检测 收集第 3 代细胞,100 μ m 筛网过滤细胞,去除细胞团块,用 PBS 重悬,调整细胞浓度为 1×10⁶/mL,加入抗体以及同型对照,室温避光孵育 30 min。孵育完成后,1000 rpm 离心 5 min,弃去上清。每管加入 2 mL 含 1% 血清 PBS,涡旋混匀,1000 rpm 离心 5 min。弃去上清,每管加入 0.5 mL PBS 涡旋混匀,1h 内上机检测。

1.2.3 hUC-MSCs 三系分化能力检测 收集第 3 代细胞,按 2×10⁴ 个/cm² 接种到 6 孔板,37℃、5%CO₂ 培养箱中静置培养,待细胞汇合至 60%左右时,按照试剂盒说明书进行后续操作。染色结束后,倒置显微镜下观察染色效果。

1.2.4 EdU 检测细胞增殖 将 hUC-MSCs 接种于 12 孔板,加入含不同浓度的 IFN- γ 或 IL-17 的完全培养基,空白对照组不进行任何干预,处理 24 h 后,EdU 标记 2 h,固定, Apollo 染色, DNA 染色,封固,荧光显微镜下观察并拍照,统计分析各组 EdU 阳性细胞数量。

1.2.5 细胞周期检测 分别消化收集第 3 代细胞,1000×g 离心 5 min,沉淀细胞。去上清,加入约 1 mL 冰浴预冷的 PBS 重悬细胞,再次离心沉淀细胞。去上清,加入 1 mL 冰浴预冷的 70%酒精,轻轻吹打混匀,4℃ 固定 2 h。1000×g 离心 5 min,沉淀细胞。去上清,加入约 1 mL 冰浴预冷的 PBS 重悬细胞。再次离心沉淀细胞,去上清,每管中加入 0.5 mL 碘化丙啶染色液,并缓慢并充分重悬细胞沉淀,37℃ 避光温浴 30 min,上机检测。

1.2.6 实时定量反转录 PCR(RT-qPCR)实验 取 P3 代细胞,胰酶消化收集细胞并计数,用 MSCs 培养液重悬细胞沉淀,分别将细胞浓度调整至 2×10⁵/mL,取 1 mL 加入 6 孔细胞培养板中,加入培养基 1 mL 混匀,培养过夜。吸弃培养皿中的培养液,并加入含不同浓度的 IFN- γ 或 IL-17 培养液,对照组不加。培养 24 h 后,吸弃上清,分别加入 1 mL TRIzol 裂解细胞,用无 RNA

酶枪头收集细胞裂解液至洁净 EP 管中。具体操作参考试剂说明书,所设计的引物见表 1。

1.2.7 细胞培养上清液细胞因子分析 调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$, 加入不同浓度 IFN- γ 、IL-17 的无血清培养培养 hUC-MSCs, 培养 24 h, 收集各组细胞培养上清液, ELISA 检测 TGF- β 、IL-10、PGE-2、IDO1、PD-L1 水平, 紫外分光光度法检测 OD 值, 具体操作步骤参考试剂说明书。

1.2.8 hUC-MSCs 抑制淋巴细胞亚群增殖能力检测 将 hUC-MSCs P3 代细胞以 $1 \times 10^4/\text{孔}$ (1:10)、接种于 96 孔板内, 各实验组设置 3 复孔; 待细胞贴壁后, PBS 洗涤细胞 2~3 次, 添加终浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$ Mitomycin C 置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 30 min; 将 Folico 法分离的外周血单个核细胞加入完全培养基, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 添加 PHA-P 和 PMA, 使终浓度分别为 $20 \mu\text{g/mL}$ 和 20 ng/mL , 充分混匀后, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液。培养 3 d 后, 收集各实验组细胞, 2000 rpm 离心 5 min, 收集下方细胞沉淀, 离心清洗 2 次, 用 PBS 重悬细胞, 按照淋巴细胞亚群试剂盒说明书淋巴细胞进行抗体标记, 上机检测。

1.3 统计学分析

本研究数据采用 SPSS 18.0 软件处理, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料用百分率表示, 采用单因素方差分析和 χ^2 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

表 1 RT-PCR 所需引物的序列
Table 1 Prime sequences for RT-PCR

Gene	Primer sequence(5'-3')
IDO	Forward: AGACTGCTGGTGGAGGACATG
	Reverse: AAAGGACAACTCACGGACTG
TGF- β	Forward: TGACGTCACCTGGAGTTGTACGG
	Reverse: GGTTCATGTCATGGATGGTGC
PGE2	Forward: ACCTACTTCGCTTTCGCCAT
	Reverse: CGTACTGCCCATAGTCCAGC
IL-10	Forward: GCACCCAGTCTGAGAACAGC
	Reverse: CACTCATGGCTTTGTAGATGCC
TSG-6	Forward: AGATGACCCAGGTGCTTGG
	Reverse: TGGAAACCTCCAGCTGTCAC
PD-L1	Forward: TTTACTGTACGTTTCCCAAGG
	Reverse: CCCGATGAACCCCTAAACCA
β -actin	Forward: GGCACCCAGCACAATGAAG
	Reverse: CGTCATACTCTGCTTGCTG

2 结果

2.1 hUC-MSCs 的分离、培养及鉴定结果

倒置显微镜下观察, 脐带组织块在种植后 6-8 d 可发现细胞从组织块边缘爬出, 细胞体积较小, 呈短梭形, 呈漩涡状生长。传代后细胞生长速度增快, 2-3 d 即可传下一代(图 1A)。细胞周期检测结果显示, P3 代 hUC-MSCs 处于 G2+S 细胞比例为 $(40.05 \pm 0.85)\%$, 具有较高的细胞活性及细胞增殖能力(图 1B)。三系分化结果显示, 成骨诱导后经茜素红染色, 出现大量红染的钙结节; 成脂诱导后, 经油红 O 染色, 出现红染的脂滴;

成软骨诱导后经阿利新蓝染色, 出现蓝染的软骨细胞合成的蛋白多糖(图 1C)。流式细胞仪检测结果显示 hUC-MSCs 表达 CD44 (99.5%), CD73 (99.8%), CD90 (99.1%) 和 CD105 (98.9%), 不表达 CD34、CD19、CD11b、CD45 和 HLA-DR (图 1D)。以上结果均符合国际细胞治疗协会针对间充质干细胞的鉴定标准, 说明 hUC-MSCs 的分离、培养成功。

2.2 IL-17 对 hUC-MSCs 表面标志物的影响

研究结果显示, 与对照组相比, IFN- γ 处理 hUC-MSCs 24 h 后, 其表面标记物 HLA-DR 表达量明显增高, 且随浓度增大, 呈梯度增高 ($P < 0.01$)。而不同浓度的 IL-17 处理 hUC-MSCs 后, 其表面标记物 HLA-DR 表达量无明显变化(图 2)。

2.3 IL-17 对 hUC-MSCs 增殖能力及细胞活性的影响

由图 3A 可见, 与对照组相比, 不同浓度的 IFN- γ 处理组 EdU 阳性率没有显著差异 ($P > 0.05$), 低浓度 (25 ng/mL, 50 ng/mL) IL-17 处理组 EdU 阳性率亦没有显著差异 ($P > 0.05$), 而高浓度 (75 ng/mL) IL-17 处理组 EdU 阳性率存在差异 ($P < 0.05$) (图 3A, 图 3B)。因此, 75 ng/mL IL-17 可促进 hUC-MSCs 的增殖。流式细胞仪检测结果显示, 与对照组相比, 不同浓度的 IFN- γ 处理组 G2+S 细胞比例没有显著差异 ($P > 0.05$), 低浓度 (25 ng/mL, 50 ng/mL) IL-17 处理组 G2+S 细胞比例亦没有显著差异 ($P > 0.05$), 而高浓度 (75 ng/mL) IL-17 处理组 G2+S 细胞比例存在差异 ($P < 0.05$) (图 3C)。因此, 75 ng/mL IL-17 可提高 hUC-MSCs 的细胞活性。

2.4 IL-17 对 hUC-MSCs 免疫调节相关基因表达的影响

RT-qPCR 结果显示, 与对照组相比, 不同浓度 IFN- γ 和 IL-17 培养 hUC-MSCs 时, TGF- β 、IL-10、PEG-2、PD-L1、IDO、TSG-6 基因表达水平均呈现升高趋势(图 4), 其中 50 ng/mL 和 75 ng/mL 处理组, 以上 6 类细胞因子分泌水平明显升高 ($P < 0.05$)。IFN- γ 和 IL-17 处理组, 组间无明显差异 ($P > 0.05$)。提示 IL-17 可促进 hUC-MSCs 分泌免疫调节相关基因的表达。

2.5 IL-17 对 hUC-MSCs 分泌免疫调节相关细胞因子的影响

从图 5 中可见, 与对照组相比, 不同浓度 IFN- γ 和 IL-17 培养 hUC-MSCs 时, TGF- β 、IL-10、PEG-2、PD-L1、IDO、TSG-6 分泌水平均呈现升高趋势(图 5), 其中 50 ng/mL 和 75 ng/mL 处理组, 以上 6 类细胞因子分泌水平明显升高 ($P < 0.05$)。IFN- γ 和 IL-17 处理组, 组间无明显差异 ($P > 0.05$)。提示 IL-17 可提高 hUC-MSCs 分泌免疫调节相关细胞因子的分泌水平。

2.6 IL-17 对 hUC-MSCs 免疫调节能力的影响

研究结果显示, IFN- γ 和 IL-17 处理组的 hUC-MSCs, 淋巴细胞亚群受到显著影响, 其中 $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{T}$ 细胞、 $\text{CD}3^+\text{CD}8^+\text{T}$ 细胞、B 细胞的比例显著下降, 当浓度达到 50 ng/mL 时, 抑制效果显著 ($P < 0.01$); 而起抑制作用的 Treg 细胞比例显著升高, 当浓度达到 50 ng/mL 时, 抑制效果显著 ($P < 0.01$), 随浓度增加, 效果愈加显著 ($P < 0.001$)。两种处理组间无明显差异(图 6)。提示 IL-17 可提高 hUC-MSCs 对淋巴细胞的免疫调节能力。

3 讨论

大量研究证实, MSCs 具有调节受损组织炎症微环境的作用, 这为干细胞治疗炎症疾病提供了新的治疗策略^[18]。虽然以 MSCs 细胞替代方式为基础的治理方式仍然在某些特定的疾

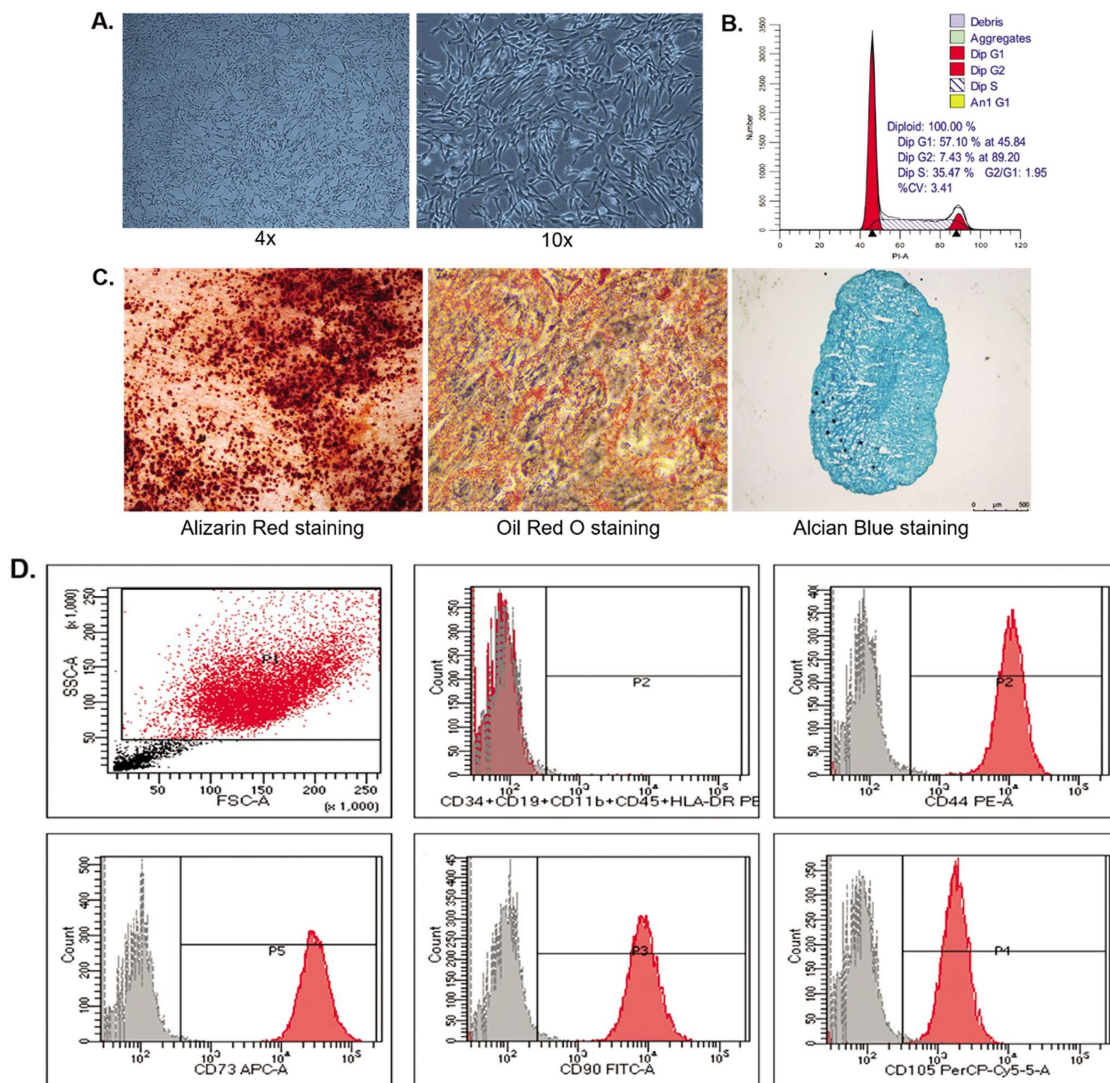


图1 hUC-MSCs 的鉴定结果

Fig.1 Identification results of human umbilical cord mesenchymal stem cells

注:图中 A 为细胞形态学观察,B 为细胞周期检测,C 为干细胞三系分化能力鉴定,D 为干细胞表面标记检测。

Note: Fig. 1A shows the observation of cell morphology, Fig.1B shows cell cycle detection, Fig.1C shows the identification of stem cell three-line differentiation ability, Fig. 1D shows the detection of stem cell surface markers.

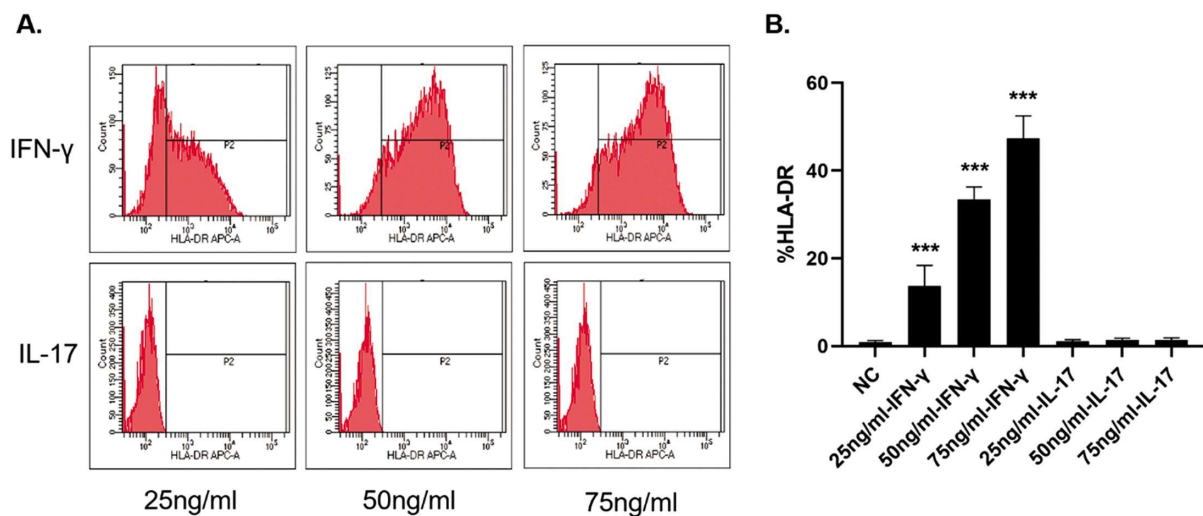


图2 hUC-MSCs 的表面标记检测结果

Fig. 2 Results of surface marker of human umbilical cord mesenchymal stem cells

注:A 图为 FCM 检测 MSCs 表面标记;B 图为 MSCs 表面标记 HLA-DR 的表达量。

Note: Fig.2A shows MSCs surface markers were detected by FCM, Fig.2B shows the expression level of HLA-DR on the surface of MSCs.

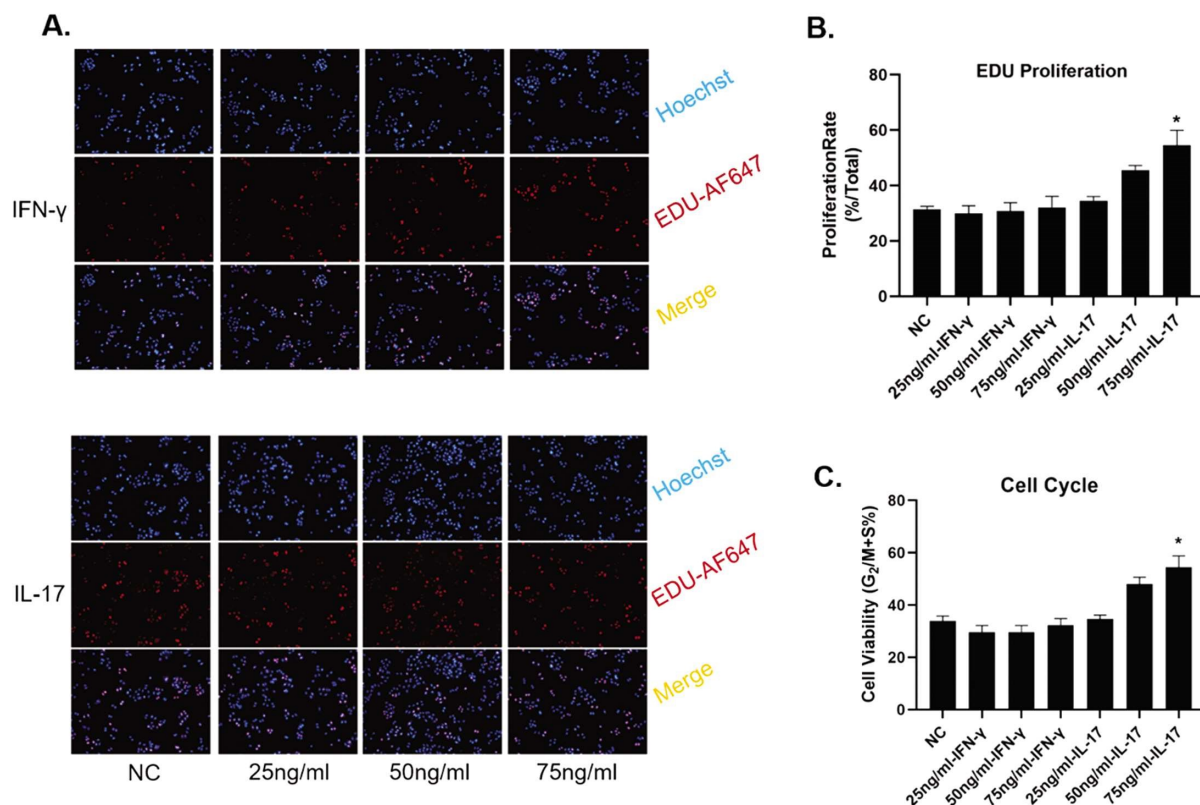


图3 hUC-MSCs 的细胞增殖能力及细胞活性检测

Fig.3 Detection of cell proliferation ability and cell activity of human umbilical cord mesenchymal stem cells

注:A 图为 EdU 增殖试验染色结果;B 图为 EdU 增殖试验统计结果;C 图为细胞周期中 G₂/M+S 期细胞比例。

Note: Fig. 3A shows the staining results of EdU proliferation, Fig. 3B shows the statistical results of the EdU proliferation,

Fig.3C shows the ratio of G₂/M+S phase cells in the cell cycle.

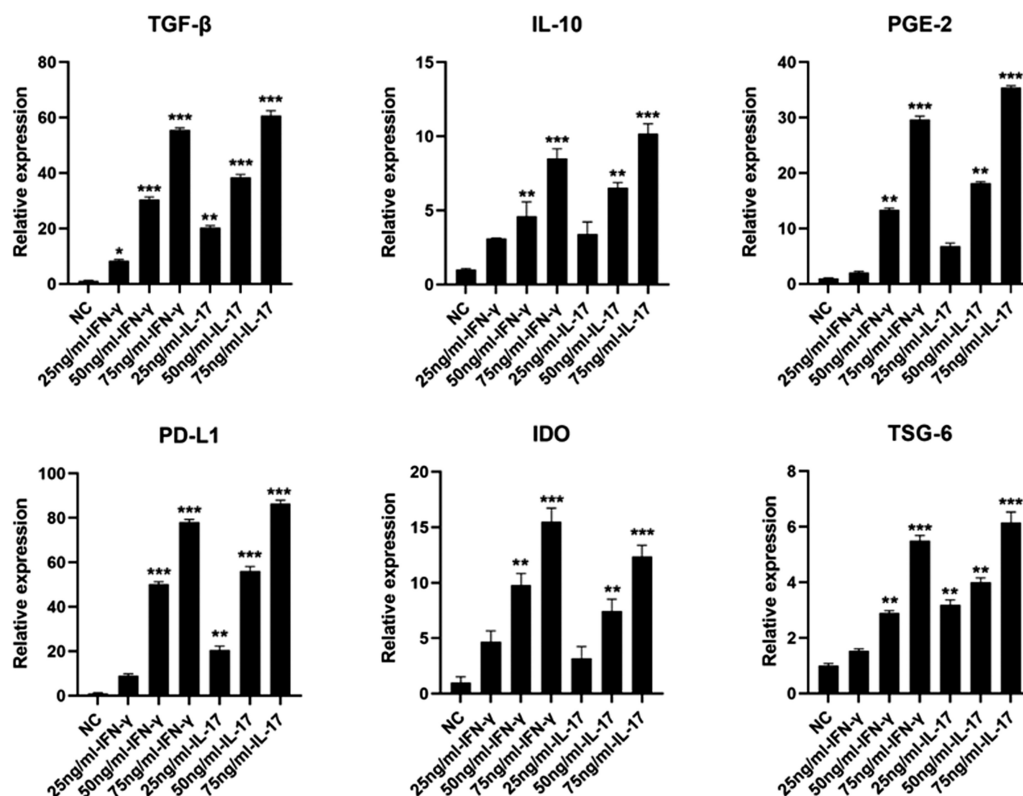


图4 IL-17 对免疫调节相关基因表达的影响

Fig.4 Effect of IL-17 on the expression of immunoregulation related genes

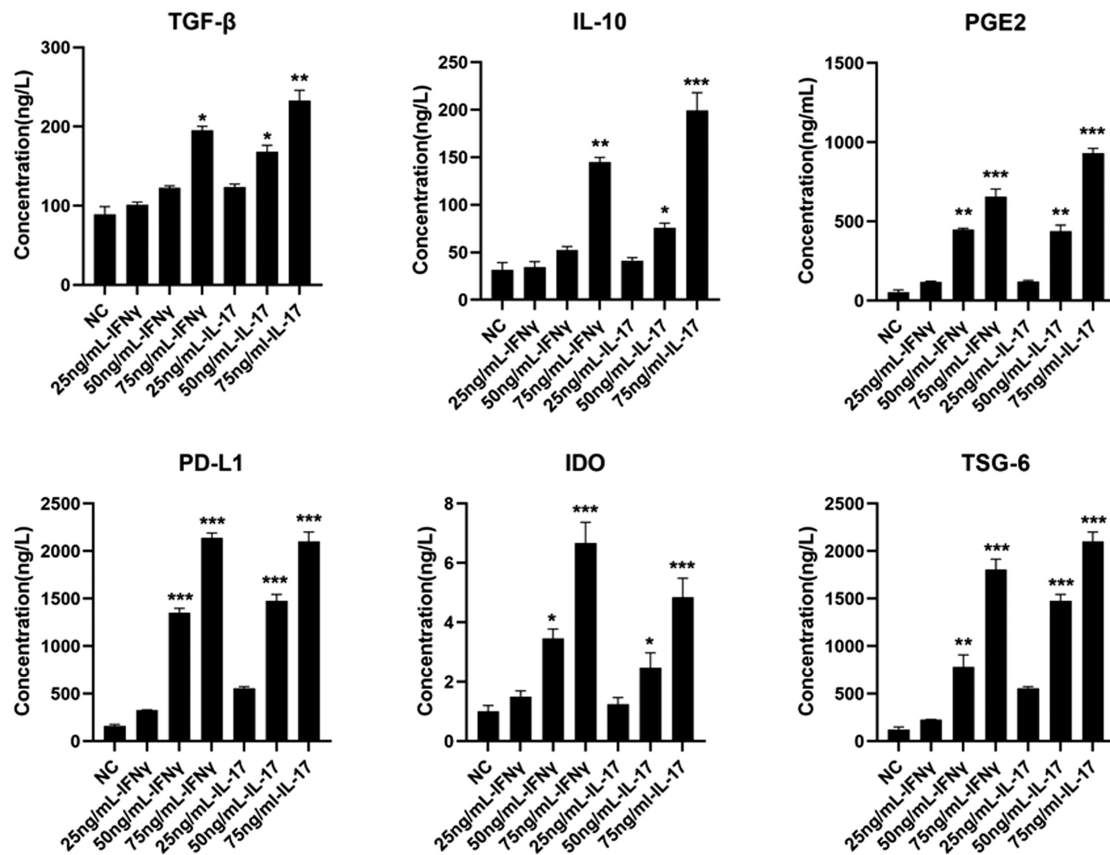


图 5 IL-17 对 hUC-MSCs 免疫调节相关细胞因子分泌水平的影响

Fig. 5 Effect of IL-17 on the secretion of cytokines related to immune regulation of human umbilical cord mesenchymal stem cells

病治疗中占具着重要位置^[19],但相关研究表明,MSCs 的治疗作用主要是通过免疫调节来发挥作用^[20],而这种免疫调节功能的发挥需要炎症微环境的“授权”激活^[21]。一般来说,在炎症因子作用下,MSCs 产生大量 MSCs 通过产生免疫抑制分子、生长因子、趋化因子、补体以及代谢产物等,调节组织免疫微环境和促进组织修复^[22]。

本研究采用间充质干细胞无血清培养体系,成功分离、培养获得 hUC-MSCs。然后利用不同浓度 IL-17 预处理 hUC-MSCs,观察其体外免疫调节能力的变化。研究结果显示,25 ng/mL 和 50 ng/mL IL-17 对 hUC-MSCs 的增殖能力及细胞活性没有明显的影响,而 75 ng/mL IL-17 可以促进细胞增殖,提高细胞活性。类似地,BIE Q 等^[23]的研究显示白细胞介素 17B 预处理脐带间充质干细胞的增殖能力明显增强,两项研究结果相吻合。另外,IL-17 预处理提高细胞活性,有利于延长 hUC-MSCs 在体内存活时间,提高治疗效果。FCM 检测结果显示不同浓度 IL-17 处理后,hUC-MSCs 表面标记均未发生变化,而低浓度 IFN- γ 处理后,hUC-MSCs 表面标记 HLA-DR 表达明显上调,且随浓度增加而表达量逐步上调。有研究显示,用 IFN- γ 预处理的脂肪间充质干细胞高表达 MHC-I、MHC-II^[24]。而间充质干细胞高表达主要组织相容性复合物(MHC),增加了其免疫原性。当利用 IFN- γ 预处理的间充质干细胞进行体内注射时,免疫排斥反应将必然增强,导致细胞存活率下降,治疗效果不佳,因而未被临床上广泛应用。MSCs 发挥免疫调节作用主要与其旁分泌的细胞因子相关,包括 TGF- β 、IL-10、

PGE2、TSG-6、IDO、PD-L1 等^[25-28]。本研究结果显示 IL-17 预处理可促进 hUC-MSCs 大量分泌 TGF- β 、IL-10、PGE2、TSG-6、IDO、PD-L1 等细胞因子。进一步研究显示,IL-17 预处理的 hUC-MSCs,可抑制 CD3⁺CD4⁺T 细胞、CD3⁺CD8⁺T 细胞及 B 细胞的增殖,而能促进具有免疫抑制作用的 Treg 细胞的增殖。提示 IL-17 可提高 hUC-MSCs 对淋巴细胞的体外免疫调节功能。

有研究报道 IL-17 预处理的骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)进行小鼠皮下注射,小鼠血清中 IL-10 和 TGF- β 增多,IFN- γ 显著降低,且发现小鼠脾脏组织中 Treg 细胞比例明显增加,表明 IL-17 预处理的 BM-MSCs 免疫抑制功能增强^[29]。这与 SIVANATHAN KN 等^[30]的研究结论相一致。另外,BAI M 等^[31]研究发现 IL-17 预处理的 MSCs 可能通过 COX-2/PGE2 途径增加 Treg 细胞百分比,从而增强 MSCs 的免疫抑制功能。该研究结果显示利用 IL-17 预处理的骨髓 MSCs 治疗急性肾缺血损伤小鼠,其血清中 IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 水平明显降低,同时脾和肾组织中 Treg 细胞百分比显著升高。

综上所述,IL-17 在不改变 hUC-MSCs 免疫表型的前提下,通过促进细胞增殖、提高细胞活性、提升免疫调节相关细胞因子分泌水平、抑制促炎性 T 细胞及 B 细胞亚群、提升免疫抑制性 Treg 细胞亚群,从而提高 hUC-MSCs 的体外免疫调节功能。因此,利用 IL-17 对 MSCs 进行预处理,是提高 MSCs 免疫调节能力的可行方法之一。该研究为临床应用 hUC-MSCs 治疗炎症性疾病提供了有效性依据。对于 IL-17 对 hUC-MSCs 的调节作用机制及相关动物实验有待后续进一步深入研究。

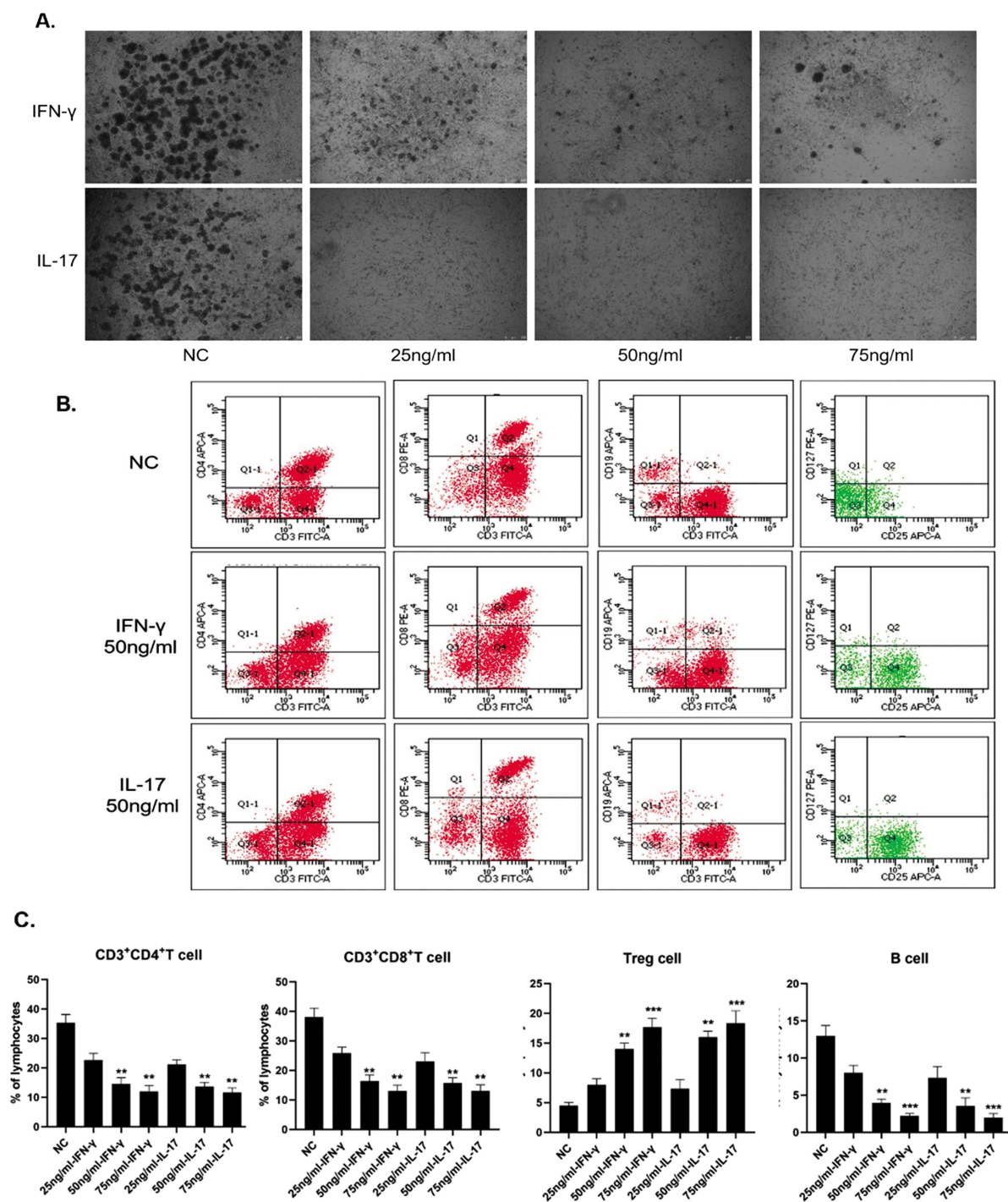


图 6 hUC-MSCs 对不同淋巴细胞亚群的影响

Fig.6 Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on different lymphocyte subsets

注:A 图为淋巴细胞抑制形态结果;B 图为 FCM 检测不同淋巴细胞亚群结果;C 图为不同淋巴细胞亚群比例统计结果。

Note: Fig. 6A shows morphological result of lymphocyte suppression, Fig. 6B shows the results different lymphocyte subsets were detected by FCM, Fig. 6C shows the statistical results of different lymphocyte subsets.

参考文献 (References)

- [1] Davies, J. E., Walker, J. T. & Keating, A. Concise review: Wharton's jelly: the rich, but enigmatic, source of mesenchymal stromal cells[J]. Stem Cells Transl Med, 2017, 6(7): 1620-1630
- [2] Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs[J]. Cell Stem Cell, 2008, 3(3): 301-13
- [3] Ankrum, J. & Karp, J. M. Mesenchymal stem cell therapy: two steps forward, one step back[J]. Trends Mol Med, 2010, 16(5): 203-9
- [4] Murray IR, West CC, Hardy WR, et al. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels[J]. Cell, Mol. Life Sci, 2014, 71(8): 1353-74
- [5] Hu J, Wang F, Sun R, et al. Effect of combined therapy of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from umbilical cord with sitagliptin in type 2 diabetic rats [J]. Endocrine, 2014, 45(2): 279-87

- [6] Shin TH, Kim HS, Kang TW, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: safety and efficacy[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 7(12): e2524
- [7] Zhang J, Lv S, Liu X, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell treatment for Crohn's disease: a randomized controlled clinical trial [J]. *Gut Liver*, 2018, 12(1): 73-78
- [8] Wang D, Zhang H, Liang J, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years of experience[J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(12): 2267-77
- [9] Zhao L, Chen S, Yang P, et al. The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: prevention and treatment of graft-versus-host disease[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 182
- [10] Li W, Ren G, Huang Y, et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19: 1505-13
- [11] Krampera M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process[J]. *Leukemia*, 2011, 25: 1408-14
- [12] Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(4): 392-402
- [13] Wang Y, Chen X, Cao W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications[J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(11): 1009-1016
- [14] Zhang L, Liu D, Pu D, et al. The role of Toll-like receptor 3 and 4 in regulating the function of mesenchymal stem cells isolated from umbilical cord[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(4): 1003-1010
- [15] KENNA T J, BROWN M A. The role of IL-17-secreting mast cells in inflammatory joint disease[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(6): 375-379
- [16] TALEB S, TEDGUI A, MALLAT Z. IL-17 and Th17 cells in atherosclerosis subtle and contextual roles [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(2): 258-264
- [17] 黄斯勇, 白喜龙, 伍艳兰, 等. 人脐带间充质干细胞分离、鉴定方法及其治疗难治性免疫性血小板减少症的有效性及安全性研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2017, 12: 16-22
- [18] Johnson V, Webb T, Norman A, et al. Activated mesenchymal stem cells interact with antibiotics and host innate immune responses to control chronic bacterial infections[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9575
- [19] Kabat M, Bobkov I, Kumar S, et al. Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004-2018: Is efficacy optimal in a narrow dose range? [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9(1): 17-27
- [20] Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation[J]. *Mol Ther*, 2012, 20: 14-20
- [21] Song L, Sun Z, Kim DS, et al. Adipose stem cells from chronic pancreatitis patients improve mouse and human islet survival and function[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 192
- [22] Shi Y, Wang Y, Li Q, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(8): 493-507
- [23] Bie Q, Zhang B, Sun C, et al. IL-17B activated mesenchymal stem cells enhance proliferation and migration of gastric cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 18914-18923
- [24] XISHAN Z, BIN Z, HAIYUE Z, et al. Jagged-2 enhances immunomodulatory activity in adipose derived mesenchymal stem cells[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14284
- [25] Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the antiinflammatory protein TSG-6[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 54-63
- [26] Shi Y, Su J, Roberts AI, et al. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses[J]. *Trends Immunol*, 2012, 33: 136-43
- [27] Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production[J]. *Nat Med*, 2009, 15: 42-9
- [28] DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, et al. Requirement of IFN- γ -mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15: 2795-806
- [29] Ma T, Wang X, Jiao Y, et al. Interleukin 17 (IL-17)-Induced Mesenchymal Stem Cells Prolong the Survival of Allogeneic Skin Grafts[J]. *Ann Transplant*, 2018, 23: 615-621
- [30] SIVANATHAN KN, ROJAS-CANALES DM, HOPE CM, et al. Interleukin-17A-Induced Human Mesenchymal Stem Cells Are Superior Modulators of Immunological Function [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(9): 2850-2863
- [31] Bai M, Zhang L, Fu B, et al. IL-17A improves the efficacy of mesenchymal stem cells in ischemic-reperfusion renal injury by increasing Treg percentages by the COX-2/PGE2 pathway[J]. *Kidney Int*, 2018, 93(4): 814-825