

Toll 样受体激活对间充质干细胞免疫调节功能的影响

孙 玥 耿林玉 黄赛赛 王 红 丁从珠

摘 要 **目的** 探讨 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 激活对骨髓和脐带两种不同来源间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 免疫调节功能的影响, 同时比较骨髓 MSC 与脐带 MSC 中 TLR 的表达情况。**方法** 从关节置换术患者废弃的关节中取得骨髓, 分离培养骨髓 MSC。从健康产妇废弃的脐带中分离培养脐带 MSC。采用 TLR4 激动剂脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、TLR3 激动剂聚肌胞苷酸 [polyinosinic-polycytidylic acid, Poly(I:C)] 分别预处理骨髓 MSC 或脐带 MSC, 然后与健康志愿者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 共培养, 共培养结束后流式细胞术检测 PBMC 增殖情况。以实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测骨髓 MSC 和脐带 MSC 中 TLR4、TLR3 的基因表达水平。流式细胞术检测骨髓 MSC 和脐带 MSC 中 TLR4、TLR3 的蛋白表达水平。**结果** 骨髓 MSC 与 PBMC 共培养实验结果显示, LPS 预处理可以明显降低骨髓 MSC 对 PBMC 增殖的抑制效应, Poly(I:C) 预处理对骨髓 MSC 免疫调节功能无显著影响。脐带 MSC 与 PBMC 共培养实验结果显示, LPS 或 Poly(I:C) 预处理对脐带 MSC 抑制 PBMC 增殖的影响均不显著。与骨髓 MSC 比较, 脐带 MSC 中 TLR4、TLR3 的基因和蛋白表达水平均明显更低。**结论** TLR4 激活可以干扰骨髓 MSC 的免疫调节功能, 但是 TLR4 或 TLR3 激活对脐带 MSC 免疫调节功能的影响并不显著, 可能与脐带 MSC 中 TLR4、TLR3 的基础表达量低有关。

关键词 脐带间充质干细胞 骨髓间充质干细胞 Toll 样受体 免疫调节

中图分类号 R593

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.07.009

Effect of Toll-like Receptor Activation on Immunomodulatory Function of Mesenchymal Stem Cells. SUN Yue, GENG Linyu, HUANG Saisai, et al. Department of Rheumatology and Immunology, The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Jiangsu 210008, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of Toll-like receptor (TLR) activation on the immunomodulatory function of mesenchymal stem cells (MSC) from bone marrow and umbilical cord, and to compare the expression of TLR in bone marrow MSC and umbilical cord MSC. **Methods** Bone marrow was obtained from the abandoned joints of patients undergoing joint replacement, and bone marrow MSC were isolated and cultured. Umbilical cord MSC were isolated and cultured from the abandoned umbilical cord of healthy pregnant women. Bone marrow MSC or umbilical cord MSC were pretreated with TLR4 ligand lipopolysaccharide (LPS) and TLR3 ligand polyinosinic-polycytidylic acid [poly(I:C)] respectively, and then co-cultured with peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy volunteers. After co-culture, the proliferation of PBMC was detected by flow cytometry. The gene expression levels of TLR4 and TLR3 in bone marrow MSC and umbilical cord MSC were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The protein expression levels of TLR4 and TLR3 were detected by flow cytometry. **Results** The co-culture experiment of bone marrow MSC and PBMC showed that LPS pretreatment could significantly reduce the inhibitory effect of bone marrow MSC on the proliferation of PBMC, and poly(I:C) pretreatment had no significant effect on the immunomodulatory function of bone marrow MSC. The co-culture experiment of umbilical cord MSC and PBMC showed that LPS or poly(I:C) pretreatment had no significant effect on the inhibition of PBMC proliferation by umbilical cord MSC. Compared with bone marrow MSC, the gene and protein expression levels of TLR4 and TLR3 in umbilical cord MSC were significantly lower. **Conclusion** TLR4 activation can interfere with the immunomodulatory function of bone marrow MSC. However, TLR4 or TLR3 activation has no significant effect on the immunomodulatory function of umbilical cord MSC, which may be related to the low expression of TLR4 and TLR3 in umbilical cord MSC.

Key words Umbilical cord mesenchymal stem cells; Bone marrow mesenchymal stem cells; Toll-like receptor; Immunomodulatory function

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81601365); 国家自然科学基金资助项目 (面上项目) (81971522)
作者单位: 210008 南京大学医学院附属鼓楼医院风湿免疫科
通信作者: 丁从珠, 电子信箱: dingcongzh@126.com

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 是中胚层系的起源细胞, 具有自我更新、多向分化、支持造血和组织修复的潜能。同时, MSC 具有强大的免疫抑制功能, 可以对体内多种免疫细胞发挥调节作

用^[1]。因此,在自身免疫性疾病的治疗方面, MSC 具有潜在的治疗价值与广阔的应用前景。

许多体内外实验均证实 MSC 的免疫调节功能受外源性刺激的影响^[2]。在某些情况下,由于机体内环境因子的不适刺激, MSC 可能并不能有效发挥免疫调节功能。在机体内环境中, Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 刺激信号会影响 MSC 的免疫调节功能^[3]。MSC 表达多种功能性的 TLR, 很多研究证实 TLR 及其配体可以影响 MSC 的多种细胞功能包括细胞增殖、分化、迁移和免疫调节等^[4]。有研究显示, TLR4 或 TLR3 的激活通过下调 Jagged1 表达, 降低骨髓 MSC 对淋巴细胞增殖的免疫调节作用^[5]。但是也有研究发现, 通过诱导吲哚胺-2,3-双加氧酶 (indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO) 产生, TLR3 或 TLR4 激活增强了骨髓 MSC 的免疫调节功能^[6]。

近年来研究显示, 与骨髓 MSC 比较, 脐带来源的 MSC 在临床治疗方面可能更有优势^[7]。本研究观察了 TLR4 或 TLR3 激活对脐带、骨髓两种不同来源 MSC 免疫调节功能的影响, 同时分析了两种 MSC 中 TLR4 和 TLR3 的基础表达情况。

材料与方法

1. 试剂及仪器: DMEM-F12 培养基、RPMI 1640 培养基与胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司。人外周血淋巴细胞分离液购自挪威 Axis-Shield 公司。TLR4、TLR3 流式抗体与荧光染料 CFSE 购自美国 eBioscience 公司。TLR4 激动剂脂多糖 (LPS)、TLR3 激动剂聚肌胞苷酸 [polyinosinic-polycytidylic acid, Poly(I:C)] 购自美国 Sigma 公司。抗人 CD3、CD28 抗体购自美国 eBioscience 公司。Trizol、PrimeScript™ RT 与 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。CO₂ 培养箱购自美国 Sheldon 公司。CIMO 超净工作台购自上海新苗医疗器械制造有限公司。倒置显微镜 (CKX53) 购自日本 Olympus 公司。FACSCalibur 型流式细胞仪购自美国 BD 公司。Step-one Plus™ 荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

2. MSC 分离培养: 实验中骨髓来自南京大学医学院附属鼓楼医院骨科关节置换术患者, 脐带来自南京大学医学院附属鼓楼医院妇产科健康产妇。实验中所需外周血来自于健康志愿者。所有实验均得到南京大学医学院附属鼓楼医院医学伦理学委员会批准 (伦理学审批号: 2021-544-01), 本研究获得研究对象的知情同意。将关节置换术中所得松质骨碎

片及骨髓液, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 充分冲洗, 离心后用红细胞裂解液裂解, 裂解充分后加入 PBS 混匀, 有效离心半径 15cm, 1500r/min 离心 5min, 弃上清, PBS 重复洗涤 1 次, 完毕后将细胞用含 10% FBS 的 DMEM-F12 完全培养基混匀, 以 10⁵ 个/毫升的密度种植。细胞放置于 37℃ 的 5% CO₂ 培养箱培养, 待细胞长到 80% 左右融合时传代。实验中所用 3 例骨髓 MSC 为 P3 代。脐带无菌采集后, 于 DMEM-F12 完全培养基 4℃ 保存, 在 24h 内处理。无菌状态下, 采用无菌器械去除静脉及动脉, 分离剥取脐带中的华通氏胶。采用贴壁法, 将胶组织剪成约 1mm³ 的小块接种入 10cm 培养皿中, 静置 5min 至组织块黏合培养瓶/皿壁充分时, 缓慢加入 DMEM-F12 完全培养基, 置于温度 37℃、5% CO₂ 的孵箱中。倒置显微镜下观察细胞生长至 80% 融合时传代。实验中所用 3 例脐带 MSC 为 P3 代。

3. 细胞处理: 本实验中, 将脐带或者骨髓 MSC 以每孔 5 × 10⁴ 个的密度种植于 24 孔板, 培养上清均为 500μl, 细胞贴壁后分别加入 LPS、Poly(I:C) 刺激处理, LPS 刺激浓度为 10ng/ml, Poly(I:C) 刺激浓度为 1μg/ml, 处理时间为 24h, 同时留取未刺激处理的 MSC 组。细胞实验分组为: ①外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 单独组 (PBMC); ②MSC 与 PBMC 共培养组 (+ MSC); ③LPS 预处理 MSC 与 PBMC 共培养组 (+ LPS 预处理 MSC); ④Poly(I:C) 预处理 MSC 与 PBMC 共培养组 [+ Poly(I:C) 预处理 MSC]。

4. MSC 调节 PBMC 增殖实验: LPS、Poly(I:C) 刺激实验结束后 PBS 洗涤 MSC, 然后接种 PBMC 细胞悬液共培养。人淋巴细胞分离液 (1.077g/ml) 分离健康志愿者外周血 PBMC, 5μmol/L CFSE 37℃ 染色 10min 后, 用 4℃ 的 RPMI 1640 完全培养基终止反应 5min, 1500r/min 离心 10min, 弃上清。RPMI 1640 完全培养基混匀 PBMC, 加入 2μg/ml 的抗 CD3/CD28 抗体刺激淋巴细胞增殖, PBMC 以每孔 5 × 10⁵ 个的细胞数量与 MSC 共培养。共培养 4 天后收集 PBMC, 流式细胞术检测 CFSE 荧光衰减的百分率, 即为细胞增殖百分率。

5. PCR 检测 TLR4、TLR3 基因水平: 将脐带 MSC、骨髓 MSC 接种到 6 孔板, 待细胞 80% 融合, 胰酶消化, PBS 洗涤收集细胞。用 Trizol 裂解液提取 RNA 后, 用日本 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT 试剂盒进行反转录。在 Step-one Plus™ 荧光定量 PCR 仪

上进行实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)。计算标准化后的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示 mRNA 的相对表达量。

6. 流式细胞术检测 TLR4、TLR3 蛋白水平: 将脐带 MSC、骨髓 MSC 接种到 6 孔板, 待细胞 80% 融合, 胰酶消化, PBS 洗涤收集细胞。流式细胞术检测 TLR4、TLR3 的蛋白水平, 以几何平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 分析统计。

7. 统计学方法: 应用 GraphPad Prism5 统计学软件对数据进行统计分析 & 做图。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 其中组间两两比较采用

Tukey 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. LPS 或 Poly(I:C) 预处理对骨髓 MSC 免疫调节功能的影响: 分别以 TLR4 激动剂 LPS、TLR3 激动剂 Poly(I:C) 预处理骨髓 MSC 24h, 观察 TLR 激活对骨髓 MSC 调节 PBMC 增殖的影响。结果显示, 与单独培养的 PBMC 增殖情况比较, 未处理的骨髓 MSC、Poly(I:C) 预处理的骨髓 MSC 均可以显著抑制 PBMC 增殖 ($P < 0.05$), 但是 LPS 预处理的骨髓 MSC 并不能有效抑制 PBMC 增殖 ($P > 0.05$)。与未处理的骨髓 MSC 比较, LPS 预处理的骨髓 MSC 抑制 PBMC 增殖的能力显著下降 ($P < 0.05$), 详见图 1。

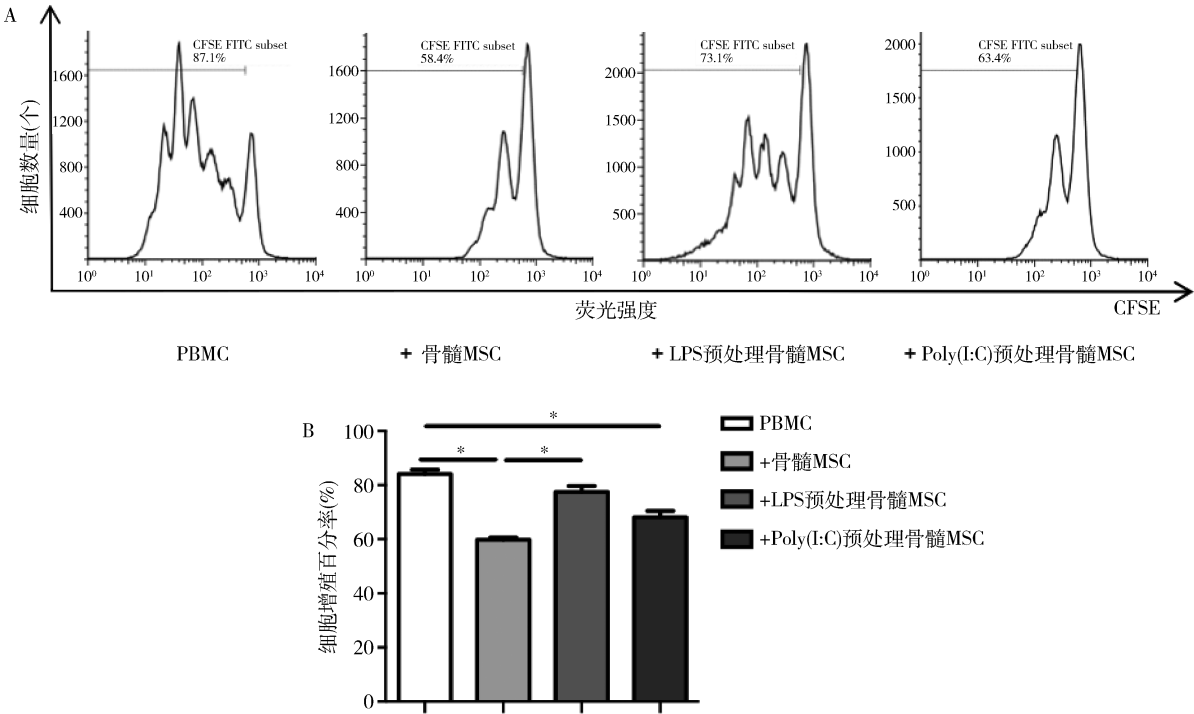


图 1 LPS 或 Poly(I:C) 预处理对骨髓 MSC 免疫调节功能的影响
A. 各组 PBMC 增殖的流式图; B. 各组 PBMC 增殖百分率比较。* $P < 0.05$, $n = 3$

2. LPS 或 Poly(I:C) 预处理对脐带 MSC 免疫调节功能的影响: 除了骨髓来源的 MSC, 脐带来源的 MSC 也具有强大的免疫调节功能, 可以抑制淋巴细胞增殖。本实验以脐带 MSC 为研究对象, 继续观察 LPS、Poly(I:C) 激活 TLR 对脐带 MSC 调节 PBMC 增殖的影响。结果显示, 与单独培养的 PBMC 比较, 未处理的脐带 MSC、LPS 预处理的脐带 MSC 与 Poly(I:C) 预处理的脐带 MSC 均可以显著抑制 PBMC 增殖 ($P < 0.05$)。同时, 与未处理的脐带 MSC 比较, LPS 或者 Poly(I:C) 预处理的骨髓 MSC 抑制 PBMC 增殖的能力比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 详见

图 2。
3. 脐带 MSC 与骨髓 MSC 的 TLR 表达水平: 本研究进一步比较了骨髓和脐带两种不同来源 MSC 中 TLR4 和 TLR3 的基础表达量。RT-qPCR 检测结果显示, 与骨髓 MSC 比较, 脐带 MSC 中 TLR4、TLR3 的基因相对表达量较低 ($P < 0.05$), 详见图 3 中 A、B。本研究通过流式细胞术检测 MFI, 分析脐带 MSC 与骨髓 MSC 中 TLR4、TLR3 的蛋白表达水平。与基因检测结果一致, 流式细胞术检测结果显示, 与骨髓 MSC 比较, 脐带 MSC 中 TLR4、TLR3 的蛋白表达水平明显更低 ($P < 0.05$), 详见图 3 中 C、D。

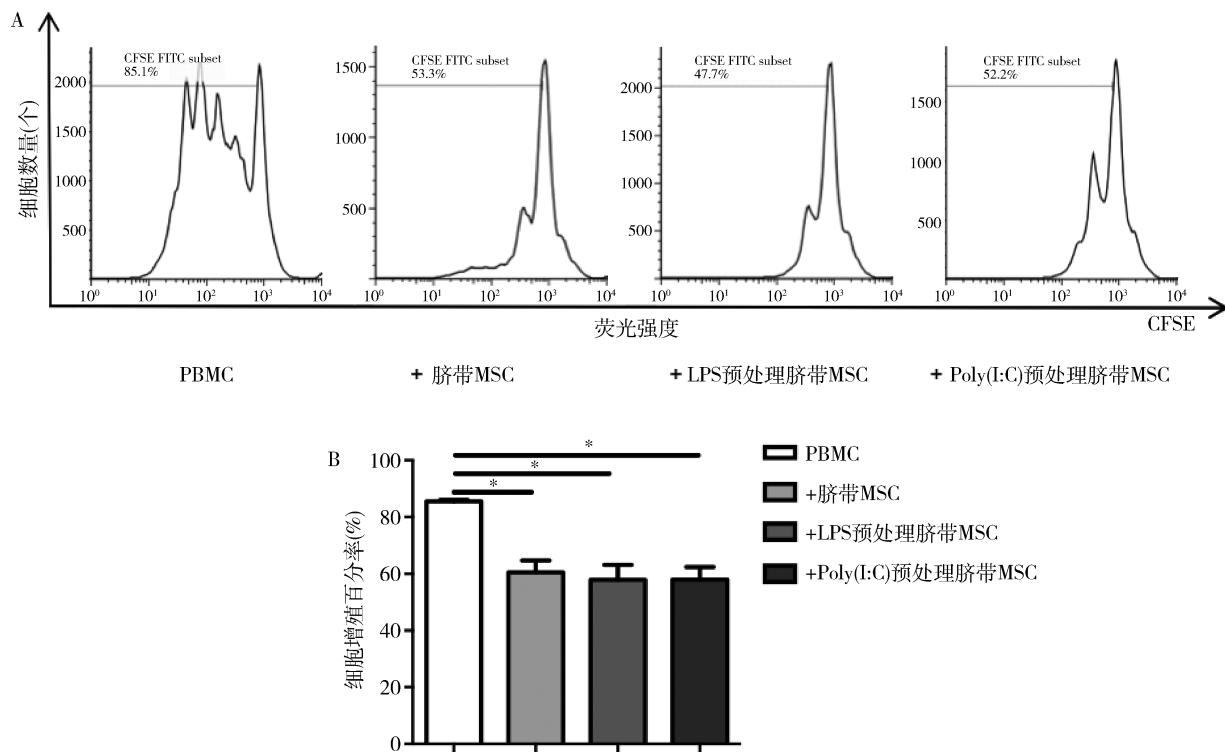


图2 LPS 或 Poly(I:C) 预处理对脐带 MSC 免疫调节功能的影响

A. 各组 PBMC 增殖的流式图; B. 各组 PBMC 增殖百分率比较。* $P < 0.05$, $n = 3$

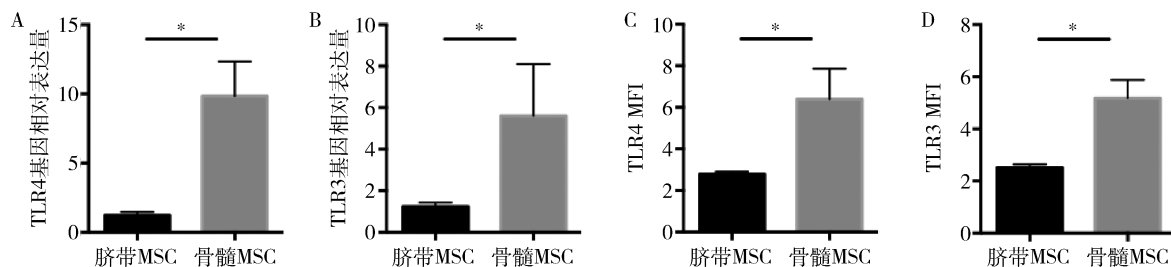


图3 脐带 MSC 与骨髓 MSC 的 TLR 表达水平

A. TLR4 基因表达; B. TLR3 基因表达; C. TLR4 蛋白表达; D. TLR3 蛋白表达。* $P < 0.05$, $n = 3$

讨 论

MSC 具有多种特征, 这些特征使其成为免疫治疗的理想候选细胞^[8]。MSC 表达低水平的人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA) I 类分子, 不表达 HLA II 类分子和共刺激分子, 因此, MSC 适用于异基因移植治疗, 大大拓宽了 MSC 的应用范围。MSC 的另一个主要特征是其具有强大的免疫调节作用, 因而很多研究将 MSC 用于移植物抗宿主病、多发性硬化、系统性红斑狼疮和类风湿关节炎等免疫相关疾病的治疗^[9]。

MSC 可作用于固有免疫系统和适应性免疫系统, 可抑制丝裂原(如植物凝集素、刀豆蛋白)或抗体

(如抗 CD2、抗 CD3、抗 CD28) 刺激的淋巴细胞增殖^[10]。MSC 能够通过直接细胞接触或旁分泌效应释放可溶性因子, 如肝细胞生长因子、前列腺素 E_2 、转化生长因子、吡啶胺-2,3-双加氧酶、一氧化氮、jagged1 和白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)等, 抑制淋巴细胞增殖^[11]。

研究显示, TLR 刺激信号包括病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)和损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMP), 可能会极大地影响 MSC 的免疫调节特性, 从而影响 MSC 的治疗结果^[4]。TLR 是机体固有免疫系统的重要识别受体, 是激活机体免疫反应的

第一线,它可存在于细胞表面和细胞内部,识别 PAMP 或 DAMP,引发后续的适应性免疫反应。MSC 表达多种功能性的 TLR 亚型包括 TLR1 ~ TLR10,其中 TLR3 和 TLR4 在人类 MSC 中表达量相对较高^[12]。研究发现,在实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)模型中,TLR4 激活后的骨髓 MSC 产生一氧化氮的能力降低,从而影响了骨髓 MSC 对 EAE 的治疗效果^[13]。另有文献报道,LPS 刺激骨髓 MSC 可增加其产生 IL-6、IL-8 等,并减弱骨髓 MSC 对淋巴细胞的抑制效应,但是 Poly(I:C)刺激骨髓 MSC 却可使其免疫抑制效应增强^[14]。

与骨髓来源的 MSC 比较,脐带 MSC 更容易获得,并表现出更高的增殖效率,所以脐带 MSC 已被越来越多的研究人员考虑使用。本研究评估了 TLR 激动剂 LPS 或 Poly(I:C)预处理,是否会导致骨髓或脐带 MSC 免疫调节功能的异常,同时还评估了脐带 MSC 和骨髓 MSC 之间 TLR3 和 TLR4 的表达是否存在显著差异。实验结果表明,与骨髓 MSC 比较,脐带 MSC 对 LPS 或 Poly(I:C)的刺激存在明显的“抗性”,即 LPS 或 Poly(I:C)刺激后对脐带 MSC 抑制淋巴细胞增殖的影响并不显著。本研究进一步分析显示,脐带 MSC 中,TLR3、TLR4 的基因和蛋白表达水平均明显低于骨髓 MSC。这一结果与之前文献报道的一致^[15]。这部分解释了两种 MSC 对 TLR 刺激信号的不同反应。

既往文献报道,骨髓 MSC 在骨髓细胞总量中占有的比例极低(0.001% ~ 0.010%),并且骨髓 MSC 的细胞数量和增殖能力受年龄因素影响很大,随着年龄增长其增殖能力明显降低。脐带 MSC 与骨髓 MSC 类似,同样具有多向分化和免疫调节的功能,但是脐带易于获取而且资源丰富,细胞数量大,属于医疗废弃物,规避创伤性操作和伦理的束缚。目前 MSC 在动物实验和临床试验中未达到稳定的免疫治疗效果,可能与选取移植的 MSC 细胞来源相关。有些个案报道脐带 MSC 的免疫调节功能可能优于同一个体的骨髓 MSC^[16]。临床试验也证实,在造血干细胞移植时合并脐带 MSC 移植,与合并骨髓 MSC 移植比较,移植排斥事件的发生率更低。

综上所述,本研究表明,与脐带 MSC 比较,骨髓 MSC 的免疫调节功能更容易受到 TLR 激动剂刺激的影响,并且脐带 MSC 中 TLR 的基础表达量明显低于骨髓 MSC。因此,笔者团队推测在 MSC 的免疫治疗方面,脐带 MSC 可能较骨髓 MSC 更有优势,但仍然

需要大规模的临床试验以进一步证实,从而优化 MSC 移植治疗免疫相关疾病的策略。

参考文献

- Galipeau J, Sensebe L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(6): 824-833
- Hu C, Li L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(3): 1428-1442
- Jafari M, Asghari A, Delbandi AA, *et al.* Priming TLR3 and TLR4 in human adipose- and olfactory mucosa-derived mesenchymal stromal cells and comparison of their cytokine secretions[J]. *Cytotechnology*, 2020, 72(1): 57-68
- Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, *et al.* Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions[J]. *Blood*, 2007, 109(4): 1422-1432
- Liotta F, Angeli R, Cosmi L, *et al.* Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(1): 279-289
- Lim JY, Kim BS, Ryu DB, *et al.* The therapeutic efficacy of mesenchymal stromal cells on experimental colitis was improved by the IFN- γ and poly(I:C) priming through promoting the expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 37
- Ding DC, Chang YH, Shyu WC, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy[J]. *Cell Transplant*, 2015, 24(3): 339-347
- Fu X, Liu G, Halim A, *et al.* Mesenchymal stem cell migration and tissue repair[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 784
- Delarosa O, Dalemans W, Lombardo E. Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23(6): 978-983
- Wu X, Jiang J, Gu Z, *et al.* Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 345
- Castro L, Lopes-Pacheco M, Weiss D, *et al.* Current understanding of the immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2019, 97(5): 605-618
- Shirjang S, Mansoori B, Solali S, *et al.* Toll-like receptors as a key regulator of mesenchymal stem cell function: an up-to-date review[J]. *Cell Immunol*, 2017, 315: 1-10
- Kurte M, Vega-Letter AM, Luz-Crawford P, *et al.* Time-dependent LPS exposure commands MSC immunoplasticity through TLR4 activation leading to opposite therapeutic outcome in EAE[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 416
- Betancourt AM. New cell-based therapy paradigm: induction of bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells into pro-inflammatory MSC1 and anti-inflammatory MSC2 phenotypes[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2013, 130: 163-197
- Raicevic G, Najar M, Stamatopoulos B, *et al.* The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties[J]. *Cell Immunol*, 2011, 270(2): 207-216
- Liu KJ, Wang CJ, Chang CJ, *et al.* Surface expression of HLA-G is involved in mediating immunomodulatory effects of placenta-derived multipotent cells (PDMCs) towards natural killer lymphocytes[J]. *Cell Transplant*, 2011, 20(11-12): 1721-1730

(收稿日期: 2022-07-08)

(修回日期: 2023-05-14)