



过表达 TGF-β1 间充质干细胞对 T 细胞分化的作用研究

朱磊^{1,3}, 赵晨野¹, 黄宸宸¹, 赵清丽², 赵振林^{1*}, 朱洪^{1,3*}

(1. 深圳市瑞普逊干细胞再生医学研究院, 广东 深圳 518038; 2. 山西医科大学第二医院, 山西 太原 030001; 3. 昆明医科大学第二附属医院, 云南 昆明 650106)

摘要:目的 转化生长因子-β1 (Transforming Growth Factor-β1, TGF-β1) 和间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 在器官移植术后的免疫调节过程中起到重要作用。二者可通过多种途径并相互协同发挥免疫抑制作用, 而通过调控T淋巴细胞的分化和免疫活性是其发挥免疫调节的重要途径。本研究试图探索过表达TGF-β1的犬间充质干细胞对T淋巴细胞分化的作用。**方法** 我们已经在过去的研究中提取分离出犬骨髓间充质干细胞, 并通过慢病毒转染技术成功构建过表达TGF-β1的犬间充质干细胞 (cMSC-TGF-β1), 本研究将cMSC-TGF-β1与T淋巴细胞共培养并通过Western blot、CCK-8、流式细胞术检测等方法探究cMSC-TGF-β1对T淋巴细胞分化影响。**结果** cMSC-TGFβ1相比未经处理的cMSC具有更高水平的TGFβ1表达, 适当比例的cMSC-TGFβ1与T淋巴细胞共培养能够上调CD4+CD25+调节性T细胞的分化。**结论** 我们的研究结果一定程度上证实了在体外细胞实验环境中cMSC-TGF-β1能够通过调控T淋巴细胞的分化, 可能影响其免疫抑制作用。

关键词: 转化生长因子-β1; 间充质干细胞; 调节性T淋巴细胞; 免疫抑制; 器官移植

中图分类号: R593

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1671-3141.2022.97.007

本文引用格式: 朱磊,赵晨野,黄宸宸,等.过表达TGF-β1间充质干细胞对T细胞分化的作用研究[J].世界最新医学信息文摘,2022,22(097):38-43,49.

The Role of cMSC-TGF-β1 on T Cell Differentiation

ZHU Lei^{1,3}, ZHAO Chen-ye¹, HUANG Chen-chen¹, ZHAO Qing-li², ZHAO Zhen-lin^{1*}, ZHU Hong^{1,3*}

(1. Shenzhen Ripson Stem Cell Regeneration Medical Research Institute, Shenzhen Guangdong 518038; 2. The Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan Shanxi 030001; 3. The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650106)

ABSTRACT: Objective Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1) and mesenchymal stem cells (MSCs) play important roles in immunomodulation after organ transplantation. Both can exert immunosuppressive effects through multiple pathways and synergize with each other, and regulation of T-lymphocyte differentiation and immune activity is an important way for them to exert immunomodulation. In this study, we sought to explore the role of canine MSCs overexpressing TGF-β1 on T lymphocyte differentiation. **Methods** We have extracted and isolated canine bone marrow MSCs in our past studies and successfully constructed canine MSCs overexpressing TGF-β1 (cMSC-TGF-β1) by lentiviral transfection technique. cMSC-TGF-β1 was co-cultured with T lymphocytes in this study and detected by Western blot, CCK-8, and flow cytometry. The effect of cMSC-TGF-β1 on T-lymphocyte differentiation was investigated. **Results** cMSC-TGFβ1 had higher levels of TGFβ1 expression compared with untreated cMSC, and the appropriate ratio of cMSC-TGFβ1 co-cultured with T lymphocytes was able to upregulate the differentiation of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Conclusion** Our results confirm to some extent that cMSC-TGF-β1 is able to influence the immunosuppressive effects of cMSC-TGFβ1 by regulating the differentiation of T lymphocytes in an in vitro cellular experimental setting.

KEY WORDS: transforming growth factor- β1; mesenchymal stem cell Regulatory T lymphocytes; immunosuppression; organ transplant

基金项目: 深圳市科技厅 - 基础研究专项 (JCYJ20190807103605679)。

作者简介: 共同通信作者*: 赵振林, 朱洪。

0 引言

随着现代医学技术的发展进步,器官移植已成为治疗许多终末期疾病的有效方法,器官移植规模的扩大和移植数量的快速增长这一治疗手段也愈发成熟^[1]。但器官移植仍然面临着供体短缺、费用高昂及术后严重的并发症等问题,移植术后的排斥反应、机会性感染、移植物功能衰竭、移植术后新发肿瘤等各种并发症尚未完全解决^[2]。同种异体移植后常见的急性和慢性排斥反应在危害移植术后患者生命安全,目前已有的强效免疫抑制药物往往会引起其他的并发症,且患者需要长期服药并承担额外的经济负担,因此寻找其他抗排斥替代疗法的需求始终存在^[3-5]。

间充质干细胞是一种具有自我更新、多向分化潜能和免疫调节作用的成体多能干细胞,利用MSCs自身特性在治疗组织损伤、免疫疾病、血液疾病、肿瘤等多种疾病上取得进展,近年来MSCs也因其免疫耐性和免疫调节特性而在器官移植后的免疫抑制治疗中得到广泛运用。如在一项针对203名急性移植物抗宿主病(aGVHD)患者的研究中,研究结果表明在原有二线治疗药物的基础上联用MSCs治疗可以提高治疗效果延长患者生存期,并且降低二线药物的毒性和副作用^[6]。Zhao等^[7]的研究结果则显示静脉输注MSCs治疗还可以有效降低移植术后慢性移植物抗宿主病(cGVHD)的发生率。MSCs表达中等水平的I类主要组织相容性复合体(MHC)但不表达II类MHC和其他多种共刺激因子^[8-10],这使得MSC具有较好的免疫耐性,让MSC在运用于治疗时避免诱发机体的免疫反应并减少免疫反应对MSCs的损伤,MSCs还能分泌TGF- β 1、白介素(IL)-10、IL-4等免疫抑制因子、促进Treg细胞分化、抑制效应性T细胞活性等方式来起到免疫抑制的作用^[11-12],这些特性使得MSCs成为多种临床细胞疗法研究的有力候选。

TGF- β 1是一种重要的免疫抑制细胞因子,参与调节多种免疫相关细胞的增殖、分化

和免疫活性,在免疫稳态中起着重要作用。较早期的研究认为TGF- β 1对胸腺Treg细胞的发育成熟过程不是必需的^[13-14],但随着研究的深入发现TGF- β 1对外周Treg的分化至关重要,并且TGF- β 1介导了Treg抑制辅助性T细胞而发挥免疫抑制的作用^[15-16]。MSCs和TGF- β 1可共同调节移植术后的免疫排斥反应,且它们对Treg细胞分化的调控是免疫调节中的关键一环。

本研究将过表达TGF- β 1的cMSC(cMSC-TGF- β 1)与T淋巴细胞共培养,探究其对T淋巴细胞分化的影响,为后续TGF- β 1/MSCs相关的研究和应用提供理论依据与数据支持。

1 材料与方法

1.1 MSCs的成脂诱导鉴定

细胞接种到6孔板, 6×10^3 /孔,待细胞培养至汇合度90%左右,吸去原来培养基,成脂诱导组加入成脂诱导液,每3天换一次液,分别培养9天,12天。诱导培养完成后,小心吸去培养液,用PBS洗两次,加ORO Fixative固定液固定20-30min;弃去固定液,用蒸馏水洗2次;加入60%异丙醇浸洗5min;弃去60%异丙醇后加入新配制好的ORO Stain,浸染10-20min;弃去染色液,水洗2-5次,直到无多余染液;加入苏木素染色1-2min,弃去染色液,水洗2-5次;加入ORO Buffer 1min,弃去;加入蒸馏水覆盖并在显微镜下观察。

1.2 流式细胞仪对MSCs细胞表面标志物进行鉴定

收集cMSC-TGF- β 1细胞,胰蛋白酶消化后用PBS重悬并计数(1×10^6 /mL),按照说明书加入相应体积荧光标记的抗体(抗CD29、抗CD34、抗CD90、抗CD105抗体),避光冰浴孵育半小时,期间轻轻混匀几次,后使用流式细胞仪进行检测分析。

1.3 Western blot法检测cMSC-TGF- β 1的TGF- β 1蛋白表达情况

收集培养中的cMSC-TGF- β 1和cMSC,提

取细胞总蛋白并测定蛋白浓度，根据变性后浓度确定上样量 β -actin (200 μ g)，目的蛋白 (200 μ g) 进行蛋白电泳、转膜、封闭，按说明书加入稀释一抗 (抗 β -actin、抗TGF- β 1) 孵育后加入相应二抗再次孵育并处理后检测灰度值，以 β -actin作为内参计算TGF- β 1的相对表达量。

1.4 MTT实验检测TGF- β 1转染对cMSC-TGF β 1增殖的影响。

将cMSC-TGF β 1、cMSC、转染空载体的MSC (NC/MSC) 分组铺板并设副孔，分别在培养后1、2、3、4、5、6、7天按照CCK8试剂盒说明方法添加CCK8溶液并孵育2小时使用酶标仪对各组吸光度值进行检测以评估增殖情况。

1.5 流式细胞仪检测与MSC共培养后T淋巴细胞的分化

分组将T淋巴细胞单独培养作为对照，T淋巴细胞与不同比例cMSC、cMSC-TGF β 1作为实验分组，在共培养2天后收集细胞，每份样品中加入适量荧光标记的抗CD4、抗CD25抗体，避光环境下冰浴孵育半小时，PBS重悬后通过流式细胞仪进行检测分析。

1.6 统计分析

采用SPSS 18.0统计实验过程中所得结果并分析，GraphPad Prism 9 也用于初步数据分析和作图，所有数据均表示为单个值的平均值 \pm 标准差。使用单因素方差分析比较各组间差异。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 cMSC-TGF β 1的鉴定

构建的cMSC-TGF β 1在培养经镜下观察，随着细胞的增殖生长，贴壁细胞形态呈梭形或纺锤形，集落状生长。在成脂诱导实验中，cMSC-TGF β 1在成脂诱导培养12天后，经染色显示出很多脂滴，呈深红色，见图1、2。在流式细胞鉴定中显示细胞CD44、CD90阳性表达，CD105、CD34呈阴性表达，符合MSC细胞表面标记物特点，见图3。上述结果与MSC的特征一致，符合MSC标准。

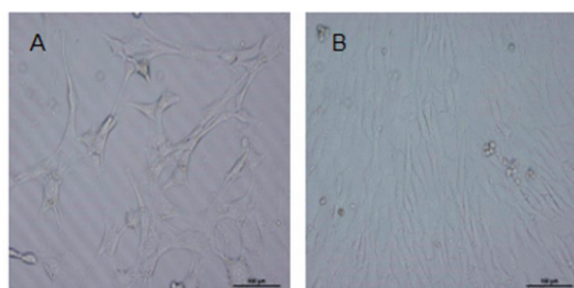


图1 cMSC-TGF- β 1 接种培养后1天(A)，培养5天后(B)

MSC-Control MSC-adipogenic differ

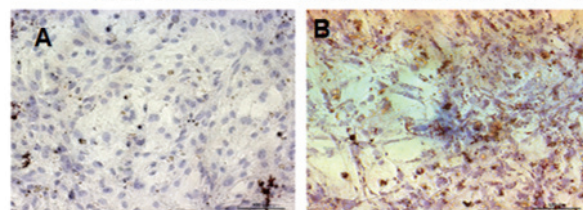


图2 cMSC-TGF- β 1 成脂诱导培养后第12天，经红油O染色。A: 对照组，未加成脂诱导剂；B: 加入成脂诱导剂的实验组

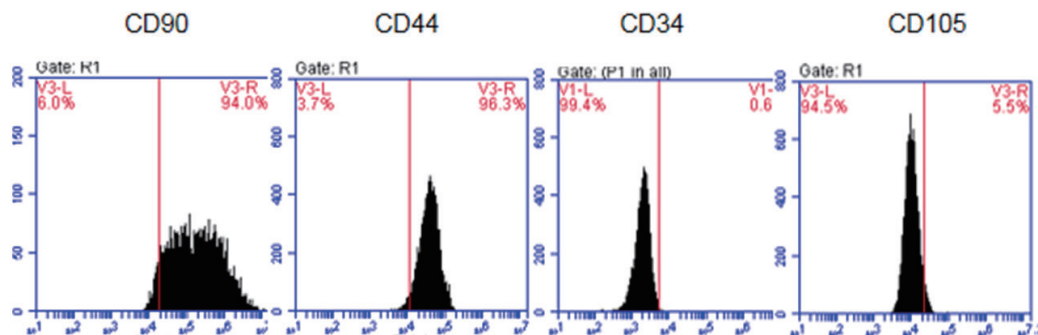


图3 cMSC-TGF- β 1 通过流式细胞仪表面标记物

2.2 cMSC-TGFβ1表达TGF-β1蛋白的能力

通过Western blot法对cMSC和cMSC-TGFβ1的总蛋白中TGF-β1表达量进行检测,结果显示相较于正常的cMSC, cMSC-TGFβ1拥有更强的TGF-β1表达能力,见图4、5。

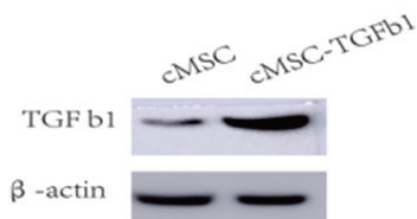


图4 Western blot 检测 cMSC-TGF-β1 和 cMSC 中的 TGF-β1 蛋白表达

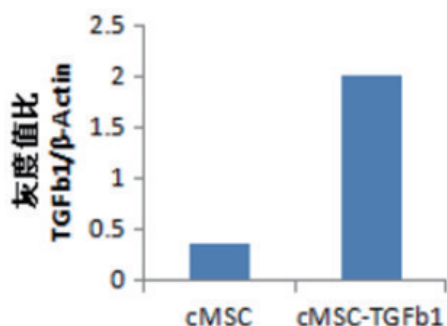


图5 以B-actin为内参,计算 cMSC-TGF-β1 和 cMSC 中 TGF-β1 的相对表达量

2.3 TGFβ1转染对cMSC-TGFβ1增殖的影响

为了排除经慢病毒转染处理可能会影响到cMSC-TGFβ1的增殖,该影响可能造成共培养过程中cMSC-TGFβ1和cMSC细胞数量的差异而对后续研究结果的准确性造成干扰,因此进行CCK-8测定,实验结果显示,在细胞传代后培养的前5天中,各组间细胞增殖情况无明显差异,而在第6天 ($P < 0.05$) 和第7天 ($P < 0.01$) cMSC-TGFβ1增殖相较其他组出现抑制,其余两组间无明显差异,且实验中加入了转染空载体的cMSC作为对照,进一步表明cMSC-TGFβ1的增殖抑制可能是由于TGF-β1的过表达导致的。这一结果提示我们在MSC传代后重新铺板与T淋巴细胞共培养的实验,前5天内MSC细胞增殖的差异带来的干扰应该是可控的,见图6。

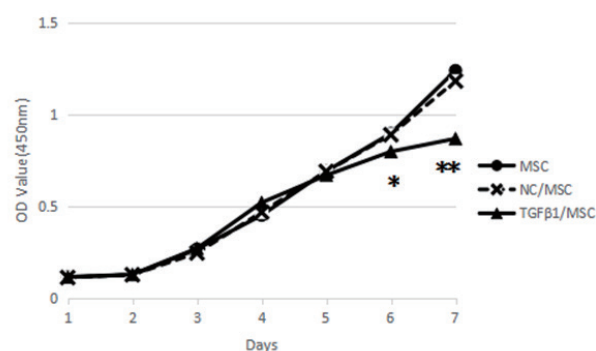
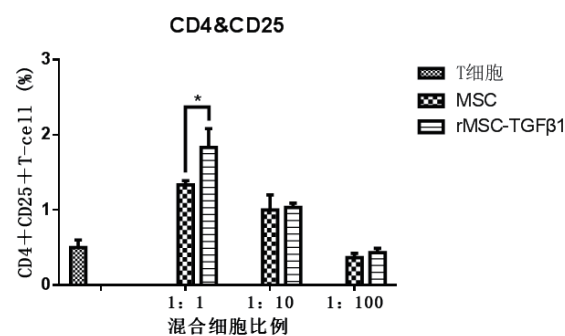


图6 MTT 法检测 MSC 增殖变化

2.4 cMSC-TGFβ1对T细胞分化的作用

本研究将T淋巴细胞与不同比例 (MSC : T 比例分别为1 : 1、1 : 10、1 : 100) cMSC-TGFβ1和cMSC进行共培养后通过流式细胞术检测分析T细胞向CD4⁺ CD25⁺调节性T细胞分化的差异, T细胞单独培养为对照组。实验结果表明相较于对照组, MSC : T=1 : 1 ($P < 0.01$) 和1 : 10 ($P < 0.05$) 时, cMSC-TGFβ1和cMSC组中CD4⁺CD25⁺调节性T细胞所占比例都有所增加,且这一差异在MSC : T=1 : 1时最为显著,该细胞比例条件下cMSC-TGFβ1和cMSC两组间实验结果也存在差异, cMSC-TGFβ1组表现出对CD4⁺CD25⁺调节性T细胞分化更强的促进作用 ($P < 0.05$)。且随着共培养MSC所占比例的降低,两个实验组对CD4⁺ CD25⁺调节性T细胞的上调也逐渐减弱。见图7、8。



* $P < 0.05$

图8 T细胞与不同比例 cMSC-TGF-β1 或 cMSC 共培养后, CD4+CD25+ 调节性 T 细胞的分化的影响

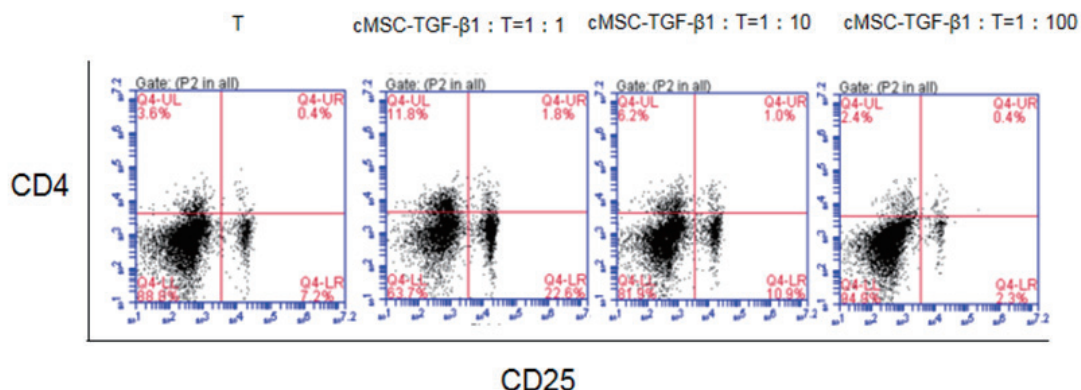


图7 流式细胞仪检测 cMSC-TGF-β1 对 CD4+CD25+ 调节性 T 细胞分化的影响

3 讨论

现有的传统免疫抑制剂虽然对器官移植术后患者的短期结果有一定改善，但长期预后效果依然不佳，且长期使用免疫抑制剂会引发感染、肿瘤和其他代谢性疾病，为了实现移植术后患者的长期存活应探寻新的免疫抑制和免疫耐受方案^[17]。MSC能够抑制多种免疫相关细胞的激活并调控免疫相关细胞的分化，并分泌多种细胞因子通过不同途径抑制免疫排斥反应，是一种颇具前景的细胞疗法^[18]。有研究表明联合运用MSC静脉输注和低剂量免疫抑制剂治疗可以达到传统全剂量免疫抑制剂相似水平的治疗效果，从而在保证疗效的前提下降低了传统免疫抑制剂方案的副作用^[19-20]。有学者在研究中发现MSC还可以降低机体对移植物的炎症反应损伤^[21]，并能明显改善移植术后因缺血再灌注引发的过氧化反应导致的损伤，从而保护移植物的功能恢复和存活^[22]。

MSC细胞疗法已经在肝、肺、肾等器官移植的I期临床研究中进行测试，这些研究表明了MSC细胞疗法的安全性和有效性^[23-25]。MSC可从骨髓、脐带血、胎盘、羊水等多种来源获取，目前已具有较为成熟的体外增殖与保存技术，又因MSC具有多向分化、免疫调节、自我更新等特性和较高的可塑性，利用基因修饰技术及衍生外泌体等来扩展或增强MSC应用的相

关研究也在迅速发展，我们在之前的研究中构建了过表达TGF-β1的cMSC细胞，现有的研究认为Treg细胞在MSC发挥免疫抑制中起到重要的作用，而TGF-β1信号转导又与Treg细胞的分化发育、功能活性及生理稳定性密切相关，因此本研究对通过过表达TGF-β1来增强MSC的免疫调节作用进行初步的探索，实验结果表明cMSC-TGFβ1相较于正常cMSC在体外环境中能够更显著的促进T细胞向Treg细胞分化，展现出更强的免疫抑制潜能，但本研究并未解明此调控过程的具体机制且研究限于体外细胞实验水平，而关于过表达TGF-β1对Treg细胞的表型、稳定性影响及T细胞向其他亚型分化的影响还需更进一步的实验研究加以探明。

MSC细胞疗法在成为器官移植的标准疗法之前还有很多问题有待解决，MSC细胞疗法的发展需要更多深入研究以了解其复杂的作用机制和与其他免疫相关细胞的相互作用，但不可否认MSC细胞疗法是一种发展迅速且极具潜力的免疫抑制治疗方法。

4 结论

研究表明，通过慢病毒转染技术构建的cMSC-TGFβ1细胞株较处理前的cMSC有更强的TGF-β1表达能力，且能够更显著的促进T细胞向Treg细胞分化。

参考文献

- [1] Shi BY, Liu ZJ, Yu T. Development of the organ donation and transplantation system in China[J]. *Chin Med J (Engl)*,2020,133(7):760–765.
- [2] Huo Z, Li C, Xu X, et al. Cancer Risks in Solid Organ Transplant Recipients: Results from a Comprehensive Analysis of 72 Cohort Studies[J]. *Oncoimmunology*,2020,9(1):1848068.
- [3] Lodhi SA, Lamb KE, Meier-Kriesche HU. Solid organ allograft survival improvement in the United States: the long-term does not mirror the dramatic short-term success[J]. *Am J Transplant*,2011,11(6):1226–1235.
- [4] Kim SI. Bacterial infection after liver transplantation[J]. *World J Gastroenterol*, 2014,20(20):6211–6220.
- [5] Rama I, Grinyó JM. Malignancy after renal transplantation: the role of immunosuppression[J]. *Nat Rev Nephrol*,2010,6(9):511–519.
- [6] Zhao K, Lin R, Fan Z, et al. Mesenchymal stromal cells plus basiliximab, calcineurin inhibitor as treatment of steroid-resistant acute graft-versus-host disease: a multicenter, randomized, phase 3, open-label trial[J]. *J Hematol Oncol*,2022,15(1):22.
- [7] 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.
- [8] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*,1999,284(5411):143–147.
- [9] Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses[J]. *Exp Hematol*,2000,28(8):875–884.
- [10] Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation[J]. *Transplantation*,2003,75(3):389–397.
- [11] Gao S, Mao F, Zhang B, et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor- κ B and signal transducer and activator of transcription 3 pathways[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*,2014,239(3):366–375.
- [12] Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease[J]. *Stem Cells*,2006,24(11):2582–2591.
- [13] Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms[J]. *Immunity*,2006,25(3):455–471.
- [14] Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor[J]. *Immunity*, 2006,25(3):441–454.
- [15] Gutcher I, Donkor MK, Ma Q, et al. Autocrine transforming growth factor- β 1 promotes in vivo Th17 cell differentiation[J]. *Immunity*,2011,34(3):396–408.
- [16] Konkel JE, Zhang D, Zanvit P, et al. Transforming Growth Factor- β Signaling in Regulatory T Cells Controls T Helper-17 Cells and Tissue-Specific Immune Responses[J]. *Immunity*,2017,46(4):660–674.
- [17] Deo D, Marchioni M, Rao P. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Organ Transplantation[J]. *Pharmacuetics*,2022,14(4):791.
- [18] Pistoia V, Raffaghello L. Mesenchymal stromal cells and autoimmunity[J]. *Int Immunol*, 2017,29(2):49–58.
- [19] Perico N, Casiraghi F, Gotti E, et al. Mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: pretransplant infusion protects from graft dysfunction while fostering immunoregulation[J]. *Transpl Int*,2013,26(9):867–878.

(下转 49 页)

Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014, 133: 657–662.

- [14] Brugués A P, Naveros B C, Calpena Campmany A C, et al. Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped in stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions[J]. *Nanomedicine*, 2015, 10(2): 227–240.
- [15] Delanois R E, Mistry J B, Gwam C U, et al. Current epidemiology of revision total knee arthroplasty in the United States[J]. *The Journal of arthroplasty*, 2017, 32(9): 2663–2668.
- [16] Haenle M, Skripitz C, Mittelmeier W, et al. Economic impact of infected total knee arthroplasty[J]. *The Scientific World Journal*, 2012,(6):196515.
- [17] Sanz–Ruiz P, Matas–Diez J A, Villanueva–Martínez M, et al. Is dual antibiotic-loaded bone cement more effective and cost-efficient than a single antibiotic-loaded bone cement to reduce the risk of prosthetic joint infection in aseptic revision knee arthroplasty?[J]. *The Journal of Arthroplasty*, 2020, 35(12): 3724–3729.
- [18] Hope P G, Kristinsson K G, Norman P, et al. Deep infection of cemented total hip arthroplasties caused by coagulase-negative staphylococci[J]. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 1989, 71(5): 851–855.
- [19] Nichol T, Smith T J, Townsend R, et al. Analysis of linezolid and tigecycline as candidates for local prophylaxis via antibiotic-loaded bone cement[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016: dkw410.
- [20] Kreis C A, Raschke M J, Roßlenbroich S B, et al. Therapy of intracellular *Staphylococcus aureus* by tigecyclin[J]. *BMC infectious diseases*, 2013, 13(1): 1–6.

(上接 43 页)

- [20] Pan GH, Chen Z, Xu L, et al. Low-dose tacrolimus combined with donor-derived mesenchymal stem cells after renal transplantation: a prospective, non-randomized study[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(11): 12089–12101.
- [21] Miceli V, Bertani A, Chinnici CM, et al. Conditioned Medium from Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Attenuating the Effects of Cold Ischemia-Reperfusion Injury in an In Vitro Model Using Human Alveolar Epithelial Cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 510.
- [22] Mohr A, Zwacka R. The future of mesenchymal stem cell-based therapeutic approaches for cancer – From cells to ghosts[J]. *Cancer Lett*, 2018, 414: 239–249.
- [23] Perico N, Casiraghi F, Inrona M, et al. Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011, 6(2): 412–422.
- [24] Detry O, Vandermeulen M, Delbouille MH, et al. Infusion of mesenchymal stromal cells after deceased liver transplantation: A phase I–II, open-label, clinical study[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(1): 47–55.
- [25] Keller CA, Gonwa TA, Hodge DO, et al. Feasibility, Safety, and Tolerance of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Obstructive Chronic Lung Allograft Dysfunction[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(2): 161–167.