评述

间充质干细胞免疫调节的可塑性

黄庆雷, 魏晓飞*

北京市脐带血造血干细胞库, 北京 100176

* 联系人, E-mail: xfw@chinacord.org

收稿日期: 2016-03-14; 接受日期: 2016-05-06; 网络版发表日期: 2016-06-28

摘要 间充质干细胞(MSCs)因其独特的免疫调节及其他生物学特性, 在组织损伤, 免疫调控和再生医学领域受到了广泛的研究, 并在临床试验中用于治疗一系列免疫相关的疾病。然而, 临床试验结果表明, MSCs 并不总是产生免疫抑制作用, 有时会得到自相矛盾的结果。最近的研究发现, MSCs 既可以抑制免疫应答, 也可以促进免疫应答, 不同的炎症介质会诱导 MSCs 极化分型并表现出截然相反的免疫调节作用, 这一特性称为 MSCs 免疫调节的可塑性。本文将重点阐述炎症微环境下不同促炎因子的浓度以及自身 TLR3 和 TLR4 激活后对 MSCs 免疫调节可塑性所起的主导作用, 特别是 NO/IDO 可能在 MSCs 从免疫抑制向免疫促进转变的过程中起到分子开关的作用。深入了解 MSCs 免疫调节的可塑性和极化分型的概念, 可以更好地指导 MSCs 在临床上的应用。

关键词 间充质干细胞, 可塑性, 免疫调节, 炎症微环境, 极化分型

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)起源于发育早期的中胚层, 是一类具有高度自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞。MSCs 具有免疫原性低、造血支持、炎症趋化、免疫调节和提供营养支持等生物学特性, 在组织损伤, 免疫调控和再生医学领域受到了广泛的研究^[1]。目前, 该细胞已在临床研究中用于造血干细胞移植后急性移植物抗宿主病(acute graft-versus-host disease, aGVHD)及自身免疫性相关疾病的治疗中^[2,3]。MSCs 既可以抑制过激的炎症反应, 又能够对损伤的组织进行修复, 得益于其特殊的免疫调节作用。

MSCs 的免疫调节作用最早由 Bartholomew 等人^[4]在 2002 年发现, 间充质干细胞表达多种黏附分

子, 例如, 血管细胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)、细胞间黏附分子(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)和淋巴细胞功能相关抗原 3(lymphocyte function-associated antigen 3, LFA-3)等与 T 细胞相互作用, 并能抑制有丝分裂原诱导的淋巴细胞增殖反应。之后, 大量文献报道了 MSCs 可以对固有免疫和适应性免疫的多种效应细胞都具有免疫调节作用。MSCs 的免疫调节作用并不是天然固有的, 它通常所表现出来的免疫抑制作用需要炎症微环境大量促炎因子的诱导^[5]。MSCs 的免疫调节能力很大程度上取决于其所处微环境中炎症介质(inflammatory mediators)的种类和浓度等。研究发现, 不同程度的炎症介质会诱导 MSCs 表现出截然相

引用格式: 黄庆雷, 魏晓飞. 间充质干细胞免疫调节的可塑性. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 799–808

Huang Q L, Wei X F. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 799–808, doi: 10.1360/N052016-00132

反的免疫调节作用, 它既可以促进也可以抑制免疫应答反应, 称之为 MSCs 免疫调节的可塑性^[6]。

MSCs 介导免疫调节作用的机制非常复杂, 目前尚未完全阐明。可能的调节机制包括细胞与细胞之间的直接接触, 旁分泌作用和产生微囊泡等对免疫细胞进行调节^[7], 并激活细胞内多条信号通路, 它们可能协同作用共同形成一个综合的调控网络^[1]。MSCs 与组织微环境的交谈(crosstalk)对于 MSCs 自身极化分型(polarization)的转变及最终治疗效果都具有非常重要的影响。为了描述得更加清晰和简洁, 本文将复杂而又相互联系的免疫应答和炎症反应等过程分开进行阐述, 介绍 MSCs 在急性和慢性炎症反应过程中免疫调节的可塑性。

1 MSCs 的免疫调节能力

MSCs 表达低水平的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) I 类分子, 免疫原性较弱, 可保护 MSCs 免受 NK 细胞对其进行杀伤^[8]。MSCs 不表达 MHC-II 类分子和 B7-1, B7-2, CD40, CD40L 等共刺激分子, 这些分子是效应性 T 细胞激活所必需的^[9]。共刺激分子的缺失, 使得 T 细胞活化的第二信号不能激活, 导致 Th 细胞的无反应性从而促成免疫耐受。虽然干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)可诱导 MSCs 表面 MHC-II 类分子的表达, 但仍不足以刺激同种异体的免疫反应^[10]。这种独特的生物学属性使得同种异体间进行 MSCs 移植不会引起免疫排斥反应。但有证据表明, MSCs 表达一系列可以激活 NK 细胞受体的配体, 如 ULBP-3(UL16 binding protein 3), nectin-2, CD54 和 CD155 等, 表达此类配体的 MSCs 易被活化的 NK 细胞识别并杀伤^[11]。

1.1 MSCs 的免疫调节作用的发挥需要被“授权”

大量临床前实验表明, MSCs 可敏感地感应局部微环境的刺激, 而且能够对不同的刺激做出应答。静息状态(quiescent state)的 MSCs 不具有免疫调节的能力, 无论是抑制免疫应答的作用还是促进免疫应答的能力都需要炎症介质(inflammatory mediators)的“授权”(license)^[5]。炎症介质包括细胞因子, 趋化因子和其他一系列参与炎症反应的化学因子等。MSCs 被 IFN- γ “授权”激活后, 因 IFN- γ 刺激诱导 MSCs 上调

人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA) I 类分子的表达, 下调 ULBP-3(NK 细胞活化性信号)的表达, 从而保护“授权”后的 MSCs 不被 NK 细胞杀伤^[11]。MSCs 被不同的炎症介质“授权”后表现出不同的免疫调节表型, 从而激活不同的信号通路调节免疫应答。这一发现对于了解 MSCs 与炎症微环境的信号交谈提供了新的视角, 也为改善 MSCs 治疗不同疾病的效果提供了理论依据。

1.2 MSCs 对免疫细胞的免疫调节作用

MSCs 可以对固有免疫系统和获得性免疫系统的多种免疫细胞进行免疫调节, MSCs 被激活后通常会对大部分的免疫细胞表现出免疫抑制的效果^[11,12]。MSCs 主要通过细胞与细胞间的直接接触和旁分泌产生细胞因子等方式共同对靶细胞进行免疫调控。MSCs 通过细胞与细胞直接作用的方式可作用于多种免疫细胞, 如自然杀伤细胞^[13]、T 细胞和 B 细胞等^[14]。MSCs 通过旁分泌的方式产生细胞因子、趋化因子和生长因子等大量生物活性物质, 参与对免疫细胞的调控。这些生物活性物质包括吲哚胺 2,3 双加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO)、前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2)、白细胞介素(IL-6, IL-10)、转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)、HLA-G 和一氧化氮(nitric oxide, NO)等^[15], 它们通过协同或拮抗作用共同形成了一个复杂的网络调控体系^[1]。此外, MSCs 可通过分泌微囊泡, 发挥免疫调节作用。微囊泡表面富含多种白细胞分化抗原标记(如 CD63, CD81 和 CD9), 内含细胞因子、生长因子、转录因子和多种 RNAs(mRNAs, miRNA, pre-miRNA 和非编码 RNAs), 在免疫调节和细胞与细胞间通讯等过程中都发挥关键作用^[16]。

1.3 不同种属之间的 MSCs 免疫调节的机制不同

MSCs 抑制淋巴细胞增殖存在多种机制, 其中产生 IDO 或 NO 是很关键的步骤, 但人和小鼠(*Mus musculus*)的 MSCs 抑制淋巴细胞增殖的机制存在明显的差异。人 MSCs 通过产生大量的 IDO(仅少量的 NO)在抑制淋巴细胞增殖和增强调节性 T 细胞的功能方面起到主要作用; 而小鼠 MSCs 通过一氧化氮合成

酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)产生大量 NO 在抑制淋巴细胞增殖方面起到主要作用^[17]. 研究发现, 大部分哺乳动物的 MSCs 都通过产生 IDO 作为主要的免疫调节分子来抑制淋巴细胞的增殖, 如猴子 (*Primates*)和猪(*Sus scrofa domestica*)等^[18]. 因此在选择动物实验疾病模型时要考虑到 MSCs 免疫调节机制在不同物种间的差异.

1.4 不同组织来源的 MSCs 免疫调节能力存在差异

到目前为止, MSCs 可以从多种组织中提取到, 如骨髓、脂肪、脐带、脐带血、牙髓、羊膜及其他器官等^[19,20]. 无论来自哪种组织, 特定条件下 MSCs 都可以表现出免疫抑制的作用^[21,22]. 对比研究发现, 不同组织来源的 MSCs 生物学特性存在一定的差异, 免疫调节能力也有差别^[23], 例如, 在所有类型的人源 MSCs 中, 只有羊膜来源的 MSCs 主要依赖 NO 来介导免疫抑制作用^[24]. 为了让不同组织来源 MSCs 的临床结果具有可比性, 疗效更加明确, 国际细胞治疗协会于 2013 年拟定了临床实验用 MSCs 免疫学特性方面通用的制备方法和指导原则建议稿, 呼吁学者在临床治疗免疫相关疾病时采用规范免疫学特性的 MSCs^[25].

2 MSCs 免疫调节的可塑性

MSCs 参与组织损伤修复主要是通过调节炎症反应来发挥作用, 对基于干细胞疗法治疗炎症性相关疾病而言具有重要意义. 炎症反应是指机体对感染、组织损伤、外来物质或其他原因(如抗原抗体复合物)所致损伤的一种重要保护机制. 适当的炎症反应可清除病原体, 有利于组织损伤的减轻和修复, 从而维持机体的稳态(homeostasis)和完整性(integrity). 随着炎症的发生和免疫应答的进行, 炎症微环境细胞因子的种类和浓度, 趋化因子及参与的免疫细胞都会发生动态的改变, MSCs 的免疫调节能力也随微环境的改变而发生变化.

2.1 MSCs 在炎症反应中的免疫调节作用

(1) MSCs 作为炎症反应的感受器. MSCs 在炎症反应过程中起到“感受器”的作用^[6], 但 MSCs 是如何敏感地感应促炎和抗炎微环境的具体机制尚不清楚^[26]. 炎症发生的早期, 可能通过 TLRs 信号通路

的激活感受微环境的变化. 炎症反应发生后的数小时内, 组织损伤产生或病原体表达的分子会被固有免疫细胞表面的 Toll 样受体(Toll like receptors, TLRs)所识别, 主要通过激活巨噬细胞和中性粒细胞等吞噬细胞启动先天性免疫应答, 提供非特异性防御的第一道防线^[27]. TLRs 不仅在吞噬细胞表面表达, 也在基质细胞(stromal cells)包括 MSCs 表面表达, TLR 通路激活后, MSCs 参与炎症微环境的形成^[28,29].

(2) MSCs 在炎症反应的早期阶段促进免疫应答. 在炎症反应发生的早期阶段, MSCs 的促炎作用有利于炎症微环境的形成. (i) MSCs 能增强中性粒细胞的促炎效果. 在急性炎症反应发生的情况下, 中性粒细胞在几分钟内迁移并聚集到炎症反应发生的部位, 主要通过吞噬功能发挥作用^[30]. 无论鼠源还是人源 MSCs 实验都表明, MSCs 通过产生生长因子和集落刺激因子等方式增强中性粒细胞的促炎效果^[31,32]. (ii) MSCs 通过产生趋化因子募集淋巴细胞到达炎症部位来增强免疫应答. MSCs 被促炎因子刺激后, 会产生 CCL2, CCL3, CXCL-9, CXCL-10 和 CXCL-11 等大量趋化因子家族成员^[33,34]. (iii) MSCs 可作为抗原提呈细胞. 研究表明, 在低剂量 IFN- γ 刺激下, MSCs 可具有部分抗原提呈细胞的作用^[35,36]. 无论体外还是体内实验均表明, 低浓度的 IFN- γ 刺激下 MSCs 会上调 MHC- I 类和 MHC- II 类分子的表达, MSCs 会表现出部分抗原提呈功能. MSCs 由 MHC- I 类分子介导的抗原提呈功能可激活抗原特异性 CD8⁺细胞毒性 T 细胞^[36].

(3) MSCs 能抑制过强的炎症反应维持组织的稳态. 当有足量的促炎因子刺激时, MSCs 会表现出免疫抑制的表型, 通过促进单核细胞转变为抗炎的 M2 型巨噬细胞, 降低炎症反应的严重程度, 维持组织的稳态. MSCs 免疫抑制作用的发挥, 依赖 MSCs 与多种免疫细胞的直接接触(cellular contact)以及产生大量生物活性物质, 包括 PGE2 和 IDO, 促进巨噬细胞向 M2 型抗炎方向的极化, 抑制效应 T 细胞的功能, 促进调节性 T 细胞的出现等多种机制^[37]. MSCs 免疫调节的可塑性对于平衡促炎和抑炎应答反应, 维持组织的稳态起到重要的作用.

2.2 MSCs 与固有免疫系统中巨噬细胞的相互作用

在固有免疫应答系统中, 巨噬细胞在炎症反应

的起始和对炎症反应的控制等过程中发挥着关键作用^[28]。巨噬细胞的生物学特性已被证明具有很大的可塑性, 不同的微环境可明显改变其生物学功能, 根据其表型和分泌的细胞因子分为两种不同的功能亚群, 经典活化的(classically activated)巨噬细胞 M1 型和旁路活化(alternatively activated)的巨噬细胞 M2 型。单核细胞到达发生炎症反应的局部微环境后, 在不同的炎症介质的刺激下, 既可以被 Th1 细胞因子刺激发育为促进炎症应答的 M1 型巨噬细胞, 也可以在 Th2 细胞因子刺激下发育为具有抗炎作用的 M2 型巨噬细胞^[28]。

不同亚群的巨噬细胞分泌的细胞因子对 MSCs 免疫调节作用的起始和调控方面也起到重要的作用(图 1)。在组织损伤部位, 急性炎症发生时局部微环境产生的炎症介质激活单核细胞转变成 M1 型巨噬细

胞。M1 型巨噬细胞产生大量促炎因子, 包括 IFN- γ 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 其主要功能是吞噬、消化死亡细胞和侵入机体的病原微生物。这些促炎因子激活静息状态的 MSCs, 诱导其产生免疫抑制的表型。激活后的 MSCs 对炎症刺激进行应答, 产生趋化因子募集淋巴细胞到达损伤部位。抗炎 MSCs 产生大量免疫抑制分子, 包括 IDO 和 NO 等。大量免疫抑制分子抑制了募集到炎症部位的淋巴细胞的杀伤效应, 从而降低了整个免疫应答反应的程度。MSCs 通过产生生长因子和其他营养因子等诱导组织损伤进行修复(图 1A)。慢性炎症微环境的炎症介质诱导单核细胞转变为 M2 型巨噬细胞, 释放相对较低水平的 IFN- γ 和 TNF- α 。MSCs 归巢到组织损伤部位后, 产生趋化因子募集淋巴细胞到达慢性炎症部位。由于低水平的 IFN- γ 和 TNF- α 不足以刺激

图 1 MSCs 在组织损伤修复过程中免疫调节的可塑性^[37](网络版彩图)

A: 急性炎症局部微环境产生的炎症介质诱导 MSCs 转变为抗炎表型。激活后的 MSCs 产生大量免疫抑制分子, 如 IDO/NO 等。大量免疫抑制分子抑制了募集的淋巴细胞的效应, 从而降低免疫应答反应的程度。MSCs 通过产生生长因子和其他营养因子等诱导组织损伤进行修复; B: 慢性炎症微环境诱导 MSCs 转变为促炎表型。MSCs 归巢到组织损伤部位后, 产生趋化因子募集淋巴细胞到达慢性炎症部位。由于低水平的 IFN- γ 和 TNF- α 不足以刺激 MSCs 产生大量免疫抑制分子, 募集的淋巴细胞加剧了慢性炎症部位的免疫应答

MSCs 产生大量免疫抑制分子, 募集到慢性炎症部位的淋巴细胞加剧了慢性炎症部位的免疫应答(图 1B).

巨噬细胞分泌不同的细胞因子对 MSCs 的极化分型具有重要作用, 此外, 激活后的 MSCs 所释放的细胞因子对于巨噬细胞的极化分型也产生重要的影响^[38]. M1 型巨噬细胞和活化的 T 细胞产生的促炎因子激活 MSCs 后, 通过释放细胞因子, 改变微环境炎症介质后, 使单核细胞朝向抗炎方向分化, 最终单核细胞极化为 M2 型巨噬细胞^[39]. 极化完成后的 M2 型巨噬细胞, 通过释放 IL-10、分泌营养因子以及加强对凋亡细胞的清除等方式促进组织修复^[40]. 在炎症反应过程中, 除 MSCs 的极化分型外, 巨噬细胞的极性转变为维持促炎和抗炎效果的平衡提供了一条补充机制. MSCs 和巨噬细胞共同形成了对炎症反应实时动态的负反馈调节网络, 从而对微环境细胞因子的变化更加敏感, 对促炎和抗炎反应转变的调节也更加精确. 免疫抑制因子 NO/IDO(小鼠依赖 NO, 人依赖 IDO)在促炎和抗炎反应转变的过程中可能起到分子开关的作用, 免疫抑制因子的浓度对于是否触发促炎型和抗炎型 MSCs 的转变起着关键作用^[41].

2.3 MSCs 与适应性免疫系统中 T 细胞的相互作用

T 细胞是适应性免疫和同种异体免疫的主要效应细胞. T 细胞并非均一的细胞群体, 根据其生物学特性, 可分为不同 T 细胞类别及其亚群, 分别发挥细胞因子分泌、细胞毒和免疫调节等功能^[42,43]. 调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)可抑制效应性 T 细胞的作用, 在降低过激的炎症反应, 维持机体自身耐受和防止自身免疫性疾病的发生等方面发挥重要作用. MSCs 对 T 细胞的免疫调节功能主要表现为对效应性 T 细胞的免疫抑制以及对 Treg 细胞数量和功能方面的调节^[19].

MSCs 对 T 细胞的免疫调节作用不是天然固有和一成不变的, 也需要炎症介质的激活(图 2). 在急性炎症状态的高水平促炎因子(如 IFN- γ , TNF- α , IL-1 和 IL-17 等)刺激下^[12], 或 TLR3 激活后^[29], 静息状态的 MSCs 会被激活转变为抗炎 MSC2 并产生大量的 NO/IDO 等细胞因子和趋化因子, 另外通过细胞与细胞之间的直接接触, 抑制效应 T 细胞的功能, 诱导调节性 T 细胞的产生等机制抑制免疫应答. 在慢性炎症微环境下, 高水平的抗炎因子, 如 TGF- β , IL-10, IL-4 和 IL-22 等刺激下^[12], 或 TLR4 激活后^[29], 静息状态

图2 MSCs 对 T 细胞免疫调节的可塑性^[12](网络版彩图)

高水平促炎因子(如 IFN- γ , TNF- α , IL-1 和 IL-17 等)刺激下, 或 TLR3 激活后, 静息状态的 MSCs 会被激活转变为抗炎 MSC2 型, 抑制效应性 T 细胞的功能, 诱导调节性 T 细胞(Treg)产生等机制抑制免疫应答. 高水平的抗炎因子(如 TGF- β , IL-10 等)刺激, 或 TLR4 激活后, 静息状态的 MSCs 会转变为促炎 MSC1 型. NO/IDO 作为 MSCs 免疫调节特性的分子开关, 控制着 MSCs 介导的对 T 细胞免疫调节的可塑性

的 MSCs 会转变为促炎 MSC1, 只能产生较低水平的 NO/IDO. 在这种情况下, 促炎 MSC1 释放的趋化因子会募集淋巴细胞到达炎症发生部位, 从而起到促进 T 细胞免疫应答的效果. 在整个调节过程中, 免疫抑制因子 NO/IDO(小鼠依赖 NO, 人依赖 IDO)在促炎和抗炎反应转变的过程中可能起到分子开关的作用^[12].

尽管可溶性细胞因子在 MSCs 介导的免疫抑制过程中发挥重要作用, 研究表明, MSCs 介导的对效应性 T 细胞抑制作用的机制还包括细胞与细胞间的直接接触和多条信号通路的参与. 细胞与细胞直接接触方面, ICAM-1 的表达对于 MSCs 发挥对效应性 T 细胞的抑制作用是不可缺少的^[44]; 程序性死亡受体 1(programmed death-1, PD-1)/PD 配体 1(PD-L1, CD274)相互作用也参与免疫抑制的过程, 发现敲除 PD-L1 基因后, 会严重降低 MSCs 的免疫抑制功能^[45]. 信号通路方面的证据包括下调 NF- κ B 信号或阻断细胞周期至 G0/G1 检验点, 均起到抑制效应性 T 细胞扩增的作用^[46]. Notch-1 信号活化可诱导 CD4⁺T 细胞分化为 Treg^[47]. 但是, 这些信号通路在 MSCs 介导的 T 细胞免疫抑制过程中发挥作用的重要性究竟有多大尚不清楚.

MSCs 的免疫调节除可直接作用于 T 细胞外, 还可通过其他方式间接作用于 T 细胞. 一方面, MSCs 可通过抑制抗原提呈细胞如树突状细胞(dendritic cells, DCs)的成熟和细胞因子的分泌, 抑制其抗原提

呈能力, 从而间接抑制效应性 T 细胞的功能^[48]. 另一方面, MSCs 可通过诱导巨噬细胞产生 IL-10 或 TGF- β , 间接地发挥抑制效应性 T 细胞的增殖, 诱导效应性 T 细胞的凋亡, 促进调节性 T 细胞产生等功能^[49].

3 影响 MSCs 免疫调节可塑性的因素

在基于 MSCs 的细胞治疗过程中, 临床前实验表明, 影响 MSCs 可塑性的因素是多方面的, 包括炎症反应的严重程度, 局部微环境炎症介质的种类和浓度, 患者免疫系统对炎症反应的应答强度, 以及患者使用免疫抑制剂的效果等. 在多种因素的综合影响下, 炎症反应的实际状态决定了 MSCs 免疫调节的方向, 是促进免疫应答或者是抑制免疫应答. 这些影响因素主要包括以下几种: 自身 TLRs 信号通路的激活, 炎症因子的刺激和局部微环境其他影响因素.

3.1 TLRs 信号的激活

体外实验表明, MSCs 可以被微生物的病原相关分子(如内毒素, 脂多糖(lipopolysaccharides, LPS), dsRNA, 热休克蛋白等)通过激活 TLRs 信号途径“授权”, 如 TLR3 和 TLR4^[50]. TLRs 在协调组织损伤部位免疫应答过程中内环境的稳态及 MSCs 与其他不同组织类型干细胞之间的相互作用过程中起到重要作用^[51]. MSCs 可根据特异性 TLRs 激活而极化为两种不同的免疫表型, 即 MSC1 和 MSC2. MSC1 具有促炎和免疫豁免的表型, MSC2 具有免疫抑制特性^[29].

TLRs 是一类重要的模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRR), 其化学本质是 I 型跨膜糖蛋白. TLRs 通过识别并结合相关的病原相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP), 可启动信号转导途径, 从而刺激免疫细胞进行应答^[52]. TLRs 与相应配体结合可启动胞内信号转导介导的多种生物学效应, 哺乳动物中至少发现 13 种 TLRs(TLR1 至 TLR13)及一系列 TLRs 的配体. TLRs 差异性表达于单核细胞、T、B 淋巴细胞、树突状细胞和 NK 细胞等多种免疫细胞表面及部分非免疫细胞表面, 在固有免疫和适应性免疫应答方面具有重要的调节作用^[53,54].

研究表明, 人 MSCs 表面可表达多种不同类型的 TLRs, 如 TLR1, 2, 3, 4, 5, 6 和 9 等^[53,55], 其中高表达

TLR3 和 TLR4 mRNAs, 此外流式细胞实验也证实体外培养的人 MSCs 有 TLR3 和 TLR4 蛋白的表达^[56]. MSCs 表面表达的 TLR3 和 TLR4 可以分别被双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)和脂多糖所激活, 活化 TLR4 信号后 MSCs 会释放增强炎症反应的细胞因子从而极化成 MSC1 型促炎细胞, MSC1 型细胞能活化 T 细胞; 然而激活 TLR3 信号后, MSCs 会产生抑制炎症反应的细胞因子极化成 MSC2 型抗炎细胞, MSC2 型细胞具有抑制淋巴细胞增殖的能力^[29,50].

提出 MSCs 极化分型这一概念, 主要是因为 TLR3 或 TLR4 激活后会导致 MSCs 分泌的细胞因子出现明显的差异, 表现出显著的抗炎或促炎的免疫表型^[57], 此外, 其分化能力, 产生趋化因子的能力和细胞外基质表达量等方面均有明显差异^[51]. 低剂量、短时间的 TLR4 激活剂可诱导 MSCs 极化为促炎的 MSC1 免疫表型, 有利于组织损伤早期的免疫应答. 相反, 急性炎症反应后期暴露于 TLR3 激活剂的环境下, MSCs 极化为抗炎的 MSC2 免疫表型, 有利于组织损伤的修复. 此外研究还发现, MSC1 型细胞能抑制肿瘤的生长和转移, MSC2 型细胞能促进肿瘤的生长和转移^[58]. 目前, TLRs 激活后诱导 MSCs 极化分型的分子机制还不清楚, 但极化分型概念的提出清晰地解读了 MSCs 在炎症反应中为何会表现出截然不同的功能, 并且为深入探讨 MSCs 在免疫调节中的功能提供了理论基础.

3.2 炎症因子的刺激

(1) 促炎因子浓度的变化产生的影响. MSCs 的免疫抑制作用的发挥需要高浓度促炎因子的“授权”, 能激活 MSCs 的促炎因子主要包括 IFN- γ , TNF- α , IL-1 α 和 IL-1 β 等^[34]. 其中 IFN- γ 是最重要的刺激因子, 在体外实验中, 加入外源性 IFN- γ 能显著增强 MSCs 分泌 IDO 等免疫调节因子的水平, 从而提高 MSCs 的免疫抑制效果^[59]. TNF- α 和 IL-1 可通过协同增效作用增强 IFN- γ 的刺激效果, 促进 MSCs 产生免疫抑制作用^[41].

对 MSCs 免疫调节可塑性的研究, 利用浓度梯度的方法观察不同浓度的促炎因子(IFN- γ 和 TNF- α)刺激 MSCs 后诱导免疫调节作用的差异^[60]. 研究结果表明, 低浓度的促炎因子能够刺激 MSCs 产生趋化因子, 但不足以诱导 MSCs 产生 NO 或 IDO. 在这种情况下, 趋化因子募集的淋巴细胞聚集到炎症发生的

部位, 因 MSCs 尚没有产生 NO 或 IDO 等免疫抑制因子, 从而加剧了炎症反应的程度.

(2) 炎症微环境细胞因子种类变化产生的影响. 除 IFN- γ , TNF- α , IL-1 α 和 IL-1 β 等可“授权”MSCs 获得免疫调节能力的细胞因子外, 其他细胞因子也可产生协同或拮抗作用. IL-17 在感染、炎症反应和自身免疫性疾病中都发挥促炎作用^[61], 其本身却没有刺激 MSCs 获得免疫调节作用的能力. 但无论体外还是体内实验中, IL-17 可显著增强 IFN- γ 和 TNF- α “授权”MSCs 的免疫抑制作用^[62]. TGF- β 以抗炎因子而著称, 能显著逆转 MSCs 的免疫抑制作用, 可能是通过依赖 SMAD3 的方式降低 MSCs 产生 NO/IDO 的表达水平而发挥作用^[63]. MSCs 本身也可产生大量的 TGF- β , 通过自分泌的方式平衡免疫调节能力^[63]. IL-10 通常与 TGF- β 一起出现并发挥抗炎作用, 体外实验中, 添加 IL-10 也可以逆转 MSCs 的免疫抑制作用^[64].

3.3 局部微环境其他影响因素

干细胞临床治疗再生修复方面的实验结果表明足够剂量的细胞对 MSCs 能否发挥治疗效果起到关键作用^[65]. MSCs 对免疫细胞的免疫抑制作用具有浓度依赖性, 有研究表明, 体外共培养实验中最佳的 MSCs/免疫细胞的比例在 1:1~1:10 时, MSCs 的免疫抑制效果较好^[66]. 在此浓度范围内, MSC 与免疫细胞相比所占的比例越高, MSCs 发挥抑制免疫应答的作用越强. 不同的疾病模型, 所需的最小剂量存在明显差异. 以仓鼠 (*Cricetidae*) 心力衰竭实验模型为例, 经过一系列药效方面的研究, 总结了最低的细胞剂量每公斤体重约为 1×10^6 个 MSCs^[67]. 在氧浓度压力方

面, 发现低氧浓度条件下, MSCs 抑制淋巴细胞增殖能力增强^[67]. 其他情况如使用免疫抑制剂(如地塞米松)同时联合移植 MSCs, 此时体内的微环境会诱导 MSCs 发挥促进免疫应答的作用^[12].

4 展望

临床试验设计的缜密与否, 直接关系到 MSCs 能否在组织损伤或免疫相关疾病中发挥治疗效果. 应特别关注以下几个因素的影响: MSCs 的培养状态和培养代次, 培养过程中氧浓度压力, 冻存 MSCs 从复苏到移植的时间间隔, MSCs 的组织来源, 移植前 MSCs 是否需要用促炎因子“授权”以增强其免疫抑制作用, 基因工程改造过与未改造过的 MSCs 的对照等. 这些因素可能会影响到 MSCs 的免疫表型. 极化分型概念的重要意义在于, MSCs 免疫调节的方向主要由宿主炎症微环境的状态决定, 因此移植时机和移植途径直接决定着病人移植后体内 MSCs 的应答情况.

MSCs 在自身免疫性疾病的临床治疗方面具有广阔的应用前景, 同种异体 MSCs 用于治疗难治性的急性 GVHD 已经取得了良好的效果, 可以明显延长患者的生存期. 但在一些病理条件下, MSCs 移植的弊大于利. 研究发现, MSCs 可以上调 IL-6 的分泌加重关节炎的发病程度^[68]. 目前尚未发现 MSCs 具有致瘤性, 但某些情况下, MSCs 通过与肿瘤微环境相互作用^[69], 可以促进肿瘤血管生成^[70], 诱导肿瘤细胞的转移等具有促瘤效果^[71]. MSCs 的临床应用要考虑个体性差异, 考虑患病的程度, 对于特殊人群特别是免疫力低下的患者, 应禁止使用.

参考文献

- 1 Najjar M, Raicevic G, Crompton E, et al. The immunomodulatory potential of mesenchymal stromal cells: a story of a regulatory network. *J Immunother*, 2016, 39: 45–59
- 2 Zhao K, Lou R, Huang F, et al. Immunomodulation effects of mesenchymal stromal cells on acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015, 21: 97–104
- 3 Munir H, McGettrick H M. Mesenchymal stem cell therapy for autoimmune disease: risks and rewards. *Stem Cells Dev*, 2015, 24: 2091–2100
- 4 Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Hematol*, 2002, 30: 42–48
- 5 Wang Y, Chen X, Cao W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*, 2014, 15: 1009–1016
- 6 Prockop D J, Oh J Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther*, 2012, 20: 14–20

- 7 Rani S, Ryan A E, Griffin M D, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications. *Mol Ther*, 2015, 23: 812–823
- 8 Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 2003, 101: 3722–3729
- 9 Majumdar M K, Keane-Moore M, Buyaner D, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*, 2003, 10: 228–241
- 10 Guo M, Sun Z, Sun Q Y, et al. A modified haploidentical nonmyeloablative transplantation without T cell depletion for high-risk acute leukemia: successful engraftment and mild GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009, 15: 930–937
- 11 Le Blanc K, Davies L C. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol Lett*, 2015, 168: 104–106
- 12 Cao W, Cao K, Cao J, et al. Mesenchymal stem cells and adaptive immune responses. *Immunol Lett*, 2015, 168: 147–153
- 13 Sotiropoulou P A, Perez S A, Gritzapis A D, et al. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem cells*, 2006, 24: 74–85
- 14 Kovach T K, Dighe A S, Lobo P I, et al. Interactions between MSCs and immune cells: implications for bone healing. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 752510
- 15 Fontaine M J, Shih H, Schafer R, et al. Unraveling the mesenchymal stromal cells' paracrine immunomodulatory effects. *Transfus Med Rev*, 2015, 30: 37–43
- 16 Konala V B, Mamidi M K, Bhonde R, et al. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: a new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*, 2016, 18: 13–24
- 17 Shi Y, Hu G, Su J, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*, 2010, 20: 510–518
- 18 Su J, Chen X, Huang Y, et al. Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. *Cell Death Differ*, 2014, 21: 388–396
- 19 Castro-Manrreza M E, Montesinos J J. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 394917
- 20 Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol*, 2012, 57: 1439–1458
- 21 Kronsteiner B, Wolbank S, Peterbauer A, et al. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue and amnion influence T-cells depending on stimulation method and presence of other immune cells. *Stem Cells Dev*, 2011, 20: 2115–2126
- 22 Carrade Holt D D, Wood J A, Granick J L, et al. Equine mesenchymal stem cells inhibit T cell proliferation through different mechanisms depending on tissue source. *Stem Cells Dev*, 2014, 23: 1258–1265
- 23 Mattar P, Bieback K. Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue mesenchymal stromal cells. *Front Immunol*, 2015, 6: 560
- 24 Yan K, Zhang R, Chen L, et al. Nitric oxide-mediated immunosuppressive effect of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells on the viability and migration of microglia. *Brain Res*, 2014, 1590: 1–9
- 25 Krampera M, Galièpeau J, Shi Y, et al. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells—The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy*, 2013, 15: 1054–1061
- 26 Coulson-Thomas V J, Coulson-Thomas Y M, Gesteira T F, et al. Extrinsic and intrinsic mechanisms by which mesenchymal stem cells suppress the immune system. *Ocul Surf*, 2016, 14: 121–134
- 27 Gordon S, Mantovani A. Diversity and plasticity of mononuclear phagocytes. *Eur J Immunol*, 2011, 41: 2470–2472
- 28 Mantovani A, Biswas S K, Galdiero M R, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*, 2013, 229: 176–185
- 29 Waterman R S, Tomchuck S L, Henkle S L, et al. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*, 2010, 5: e10088
- 30 Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13: 159–175
- 31 Brandau S, Jakob M, Hemeda H, et al. Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *J Leukoc Biol*, 2010, 88: 1005–1015
- 32 Cassatella M A, Mosna F, Micheletti A, et al. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells*, 2011, 29: 1001–1011
- 33 Chen L, Tredget E E, Wu P Y, et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*, 2008, 3: e1886
- 34 Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem*

- Cells, 2014, 6: 552–570
- 35 Chan J L, Tang K C, Patel A P, et al. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*, 2006, 107: 4817–4824
 - 36 Francois M, Romieu-Mourez R, Stock-Martineau S, et al. Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Blood*, 2009, 114: 2632–2638
 - 37 Kim N, Cho S G. Overcoming immunoregulatory plasticity of mesenchymal stem cells for accelerated clinical applications. *Int J Hematol*, 2015, 103: 129–137
 - 38 Zheng G, Ge M, Qiu G, et al. Mesenchymal stromal cells affect disease outcomes via macrophage polarization. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 989473
 - 39 Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12: 383–396
 - 40 Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *J Clin Invest*, 2012, 122: 787–795
 - 41 Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*, 2008, 2: 141–150
 - 42 Wan Y Y, Flavell R A. How diverse—CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol*, 2009, 1: 20–36
 - 43 Pianta S, Bonassi Signoroni P, Muradore I, et al. Amniotic membrane mesenchymal cells-derived factors skew T cell polarization toward Treg and downregulate Th1 and Th17 cells subsets. *Stem Cell Rev*, 2015, 11: 394–407
 - 44 Ren G, Zhao X, Zhang L, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol*, 2010, 184: 2321–2328
 - 45 Sheng H, Wang Y, Jin Y, et al. A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res*, 2008, 18: 846–857
 - 46 Jones S, Horwood N, Cope A, et al. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol*, 2007, 179: 2824–2831
 - 47 Del Papa B, Sportoletti P, Cecchini D, et al. Notch1 modulates mesenchymal stem cells mediated regulatory T-cell induction. *Eur J Immunol*, 2013, 43: 182–187
 - 48 Mohammadpour H, Pourfathollah A A, Zarif M N, et al. TNF-alpha modulates the immunosuppressive effects of MSCs on dendritic cells and T cells. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28: 1009–1017
 - 49 Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*, 2005, 105: 2214–2219
 - 50 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. *Int J Mol Med*, 2015, 35: 1003–1010
 - 51 Betancourt A M. New cell-based therapy paradigm: induction of bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells into pro-inflammatory MSC1 and anti-inflammatory MSC2 phenotypes. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2013, 130: 163–197
 - 52 West A P, Koblansky A A, Ghosh S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22: 409–437
 - 53 Hwa Cho H, Bae Y C, Jung J S. Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells*, 2006, 24: 2744–2752
 - 54 Nagai Y, Garrett K P, Ohta S, et al. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity*, 2006, 24: 801–812
 - 55 Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, et al. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*, 2007, 109: 1422–1432
 - 56 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. *Stem Cells*, 2008, 26: 279–289
 - 57 Bunnell B A, Betancourt A M, Sullivan D E. New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 2010, 1: 34
 - 58 Waterman R S, Henkle S L, Betancourt A M. Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. *PLoS One*, 2012, 7: e45590
 - 59 Krampera M, Cosmi L, Angeli R, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2006, 24: 386–398
 - 60 Li W, Ren G, Huang Y, et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ*, 2012, 19: 1505–1513

- 61 Gaffen S L, Jain R, Garg A V, et al. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14: 585–600
- 62 Han X, Yang Q, Lin L, et al. Interleukin-17 enhances immunosuppression by mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*, 2014, 21: 1758–1768
- 63 Xu C, Yu P, Han X, et al. TGF-beta promotes immune responses in the presence of mesenchymal stem cells. *J Immunol*, 2014, 192: 103–109
- 64 Renner P, Eggenhofer E, Rosenauer A, et al. Mesenchymal stem cells require a sufficient, ongoing immune response to exert their immunosuppressive function. *Transplant Proc*, 2009, 41: 2607–2611
- 65 Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, et al. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation*, 2006, 113: 1311–1325
- 66 Gornostaeva A, Andreeva E, Buravkova L. Factors governing the immunosuppressive effects of multipotent mesenchymal stromal cells *in vitro*. *Cytotechnology*, 2015, in press
- 67 Mastri M, Lin H, Lee T. Enhancing the efficacy of mesenchymal stem cell therapy. *World J Stem Cells*, 2014, 6: 82–93
- 68 Chen B, Hu J, Liao L, et al. Flk-1⁺ mesenchymal stem cells aggravate collagen-induced arthritis by up-regulating interleukin-6. *Clin Exp Immunol*, 2010, 159: 292–302
- 69 De Boeck A, Pauwels P, Hensen K, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through paracrine neuregulin 1/HER3 signalling. *Gut*, 2013, 62: 550–560
- 70 Zhang T, Lee Y W, Rui Y F, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4: 70
- 71 Tian L L, Yue W, Zhu F, et al. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Physiol*, 2011, 226: 1860–1867

Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation

HUANG QingLei & WEI XiaoFei

Beijing Cord Blood Bank, Beijing 100176, China

Because of their unique immune regulatory effects and other biological properties, mesenchymal stem cells (MSCs) have been extensively investigated in the fields of tissue repair, immunotherapy, and regenerative medicine and have been applied in the clinical studies to treat a wide variety of immune-mediated disorders. However, the immunosuppressive function of MSCs is not always observed and MSC therapies show conflicting clinical outcomes. Recent studies have found that MSCs can either suppress or promote the immune response. Stimulation by different inflammatory mediators can induce remarkably different responses and polarization of MSCs, suggesting the immunomodulatory plasticity of MSCs. In this review, we focus on the effect of different concentrations of pro-inflammatory cytokines and the ligation of TLR3 or TLR4, which play dominate roles in orchestrating the plasticity of MSCs in immunomodulation. Particularly, we highlight the central role that NO/IDO may serve as a molecular switch between the immune-suppressive to immune-enhancing effects of MSCs. A better understanding of plasticity in immune modulation and polarization of MSCs will provide fundamental information for guiding the appropriate clinical application of MSCs.

mesenchymal stem cells, plasticity, immune modulation, inflammatory microenvironment, polarization

doi: 10.1360/N052016-00132