

大鼠脂肪和骨髓来源间充质干细胞的生物学特性比较***

杨中萌¹, 尹震宇¹, 叶志坚¹, 张琼², 赵文秀¹, 王效民¹

Biological characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow versus adipose tissue in rats

Yang Zhong-meng¹, Yin Zhen-yu¹, Ye Zhi-jian¹, Zhang Qiong², Zhao Wen-xiu¹, Wang Xiao-min¹

Abstract

BACKGROUND: Except bone marrow, people have collected mesenchymal stem cells (MSCs) from placenta tissue, cord blood muscle tissue and adipose tissue.

OBJECTIVE: To compare the difference in biological characteristics and immunoregulation of rat adipose-derived MSCs (ADSCs) and bone marrow MSCs (BMSCs).

METHODS: ADSCs and BMSCs were obtained respectively from adipose and bone marrow of BN rats. ADSCs and BMSCs were isolated and purified *in vitro* to determine cell morphology, surface marker, growth kinetics and differentiation potential. Immunoregulation of ADSCs and BMSCs was compared in mixed lymphocyte response

RESULTS AND CONCLUSION: Morphology was similar between ADSCs and BMSCs under an optical microscope and transmission electron microscope. ADSCs and BMSCs at passage 3 highly expressed CD29 and CD90, weakly expressed CD34, CD45 and CD11b. The proliferation speed of ADSCs at passages 3, 4 and 5 was obviously faster than BMSCs. Both ADSCs and BMSCs possessed low immunogenicity, could suppress allogenic antigen-induced T lymphocyte proliferation. Moreover, this inhibitory effect was positively associated with cell number. There were no significant differences in inhibitory effects of an equal volume of ADSCs and BMSCs. Results verified that ADSCs had the same low immunogenicity and immunoregulation as BMSCs.

Yang ZM, Yin ZY, Ye ZJ, Zhang Q, Zhao WX, Wang XM. Biological characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow versus adipose tissue in rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(23): 4211-4216. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 除骨髓外, 人们已从胎盘组织、脐带肌肉组织、脂肪组织中分离到了间充质干细胞。

目的: 比较大鼠脂肪和骨髓间充质干细胞生物学特性和免疫调节功能的差异。

方法: 脂肪间充质干细胞和骨髓间充质干细胞分别来自 BN 大鼠的脂肪和骨髓。体外分离、纯化脂肪和骨髓来源间充质干细胞, 进行细胞形态、表面标志、生长动力学、分化潜能鉴定; 混合淋巴细胞反应比较两种细胞的免疫调节特性。

结果与结论: 脂肪间充质干细胞与骨髓间充质干细胞光镜和透射电镜下形态相似, 第 3 代的脂肪间充质干细胞和骨髓间充质干细胞均高表达 CD29, CD90, 低表达 CD34, CD45, CD11b; 第 3, 4, 5 代脂肪间充质干细胞增殖速度明显快于骨髓间充质干细胞; 两者都具有低免疫原性, 可以抑制异基因抗原引起的 T 淋巴细胞增殖, 且这种抑制作用与细胞数目成正比, 等量脂肪间充质干细胞和骨髓间充质干细胞抑制作用差异无显著性意义。结果证实脂肪间充质干细胞具有和骨髓间充质干细胞同样的低免疫原性和免疫调节功能。

关键词: 脂肪间充质干细胞; 脂肪组织; 骨髓间充质干细胞; 免疫调节; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.23.008

杨中萌, 尹震宇, 叶志坚, 张琼, 赵文秀, 王效民. 大鼠脂肪和骨髓来源间充质干细胞的生物学特性比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(23):4211-4216. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

骨髓来源间充质干细胞是目前研究最多、最为深入的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有低免疫原性, 不引起异基因淋巴细胞增殖, 自体、异体或第3方来源的BMSCs均可明显抑制异基因抗原引起的淋巴细胞增殖, 这些特性为诱导器官移植免疫耐受提供了实验和临床依据。但将MSCs用于细胞治疗或

协同移植均需要大量的细胞。骨髓中只含有少量的MSCs, 仅占骨髓细胞的0.01%~1%, 并随年龄的增加而减少^[1-2]。脂肪来源间充质干细胞最早由Zuk等^[3]从抽脂术中取得的脂肪组织分离培养获得, 称为adipose-derived stem cells (ADSCs), 在适当诱导条件下可将其向成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞、肝细胞、神经组织定向分化。脂肪组织来源丰富, 可反复取材, 较少涉及医学伦理学问题^[4]。若ADSCs与BMSCs有相似的生物学特性, 在移植免疫细胞治疗领域, ADSCs将会有更为广阔的应用空间。

¹Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China; ²School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China

Yang Zhong-meng★, Master, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China jyyoung525@126.com

Correspondence to: Wang Xiao-min, Professor, Doctoral supervisor, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Supported by: the Science Research Foundation of Ministry of Health & the Key Program of Fujian Provincial Health and Education United Project, No. WKJ2005-2-020*; the Social Development Program of Science and Technology Project of Xiamen City, No. 3502Z20064020*

Received: 2010-01-02
Accepted: 2010-02-25

¹ 厦门大学附属中山医院肝胆外科, 福建省厦门市 361004; ² 厦门大学生命科学院, 福建省厦门市 361005

杨中萌★, 男, 1982年生, 山东省济宁市人, 汉族, 2010年厦门大学毕业, 硕士, 主要从事器官移植免疫耐受研究。joyyoung525@126.com

通讯作者: 王效民, 教授, 博士生导师, 厦门大学附属中山医院肝胆外科, 福建省厦门市 361004

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)23-04211-06

收稿日期: 2010-01-02
修回日期: 2010-02-25
(20100102006/W·Q)

1 材料和方法

设计: 细胞水平, 对比观察实验。

时间及地点: 于2009-03/10月在厦门大学附属中山医院肝胆外科实验室完成。

材料: SPF级8周龄雄性BN大鼠10只、Lewis大鼠10只, 体质量100~150 g; 购自北京维通利华实验动物中心, 许可证号: SCXK(京)2007-001。实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[5]。

主要试剂:

主要试剂及仪器	来源
I型胶原酶	Sigma公司
CD34-PE	Santa Cruz biotechnology公司
CD11b-PE、CD11c-PE、CD29-PE、CD90-FITC、CD45-FITC、CD3-FITC	Invitrogen公司
尼龙毛柱	Express公司
重组白细胞介素4、GM-CSF	Peptotech公司
CCK8检测试剂盒	江苏碧云天公司
成骨、成脂诱导试剂盒	Cyagen公司
BrdU细胞增殖检测试剂盒	Millipore公司
透射电镜(JEM2100HC)	日本电子株式会社

实验方法

细胞分离、培养ADSCs分离、培养: 无菌条件下取BN大鼠腹股沟部皮下脂肪垫, 剔除肉眼可见血管组织, PBS冲洗1遍, 将脂肪组织充分剪碎, 加入2倍体积0.75 g/L I型胶原酶, 37℃摇床消化60 min, 等体积10%FCS低糖DMEM培养基中和胶原酶, 120 g/min离心5 min, 弃上清, 重悬后200目筛网过滤, PBS洗2遍, 10%FCS低糖DMEM培养基重悬, 细胞以 2×10^8 L⁻¹接种培养皿, 48 h后更换培养基, 洗去未贴壁细胞, 以后隔日半定量换液, 7~10 d细胞90%融合, 2.5 g/L胰酶消化以1:3传代。

BMSCs分离、培养: 取脂肪后, 无菌条件下取BN大鼠股骨、胫骨, 纱布擦除附着肌肉, 体积分数10%FCS低糖DMEM充分冲洗骨髓腔, 细胞悬液200目筛网过滤, 调整细胞浓度为 1×10^{10} L⁻¹接种培养皿, 24 h后更换培养基, 洗去未贴壁和贴壁不牢细胞, 以后隔日半定量换液, 10~14d细胞90%融合, 2.5 g/L胰酶消化以1:3传代。

T淋巴细胞、树突状细胞分离、培养: 机械研磨

法获取Lewis大鼠脾脏单核细胞, 尼龙毛柱纯化T淋巴细胞, 流式细胞仪检测CD3表达率为(93±2)%。树突状细胞来源于BN大鼠骨髓。骨髓细胞悬液裂解红细胞后, 加入重组白细胞介素4、巨噬细胞集落刺激因子, 9 d后收获细胞, 流式细胞仪检测CD11c表达率为(85±4)%。

大鼠肺成纤维细胞分离、培养: 无菌条件下取BN大鼠肺组织, 眼科剪剪成3 mm³组织块, 贴附于培养皿, 体积分数10%FCS低糖DMEM培养72 h后可见成纤维细胞爬出组织块, 待细胞90%融合, 2.5g/L胰酶消化以1:3传代至第3代待用。

MSCs的鉴定、比较:

细胞形态观察: 倒置相差显微镜逐日观察原代及传代细胞生长情况和形态特征。

透射电镜观察: 收获ADSCs和BMSCs各 5×10^6 个, 制成细胞团块, 轻轻加入2.5%戊二醛, 4℃固定2 h或更长时间, 送厦门大学生命科学院电镜室进一步处理, 行透射电镜观察。

细胞表型检测: 流式细胞仪检测CD34、CD45、CD11b、CD29、CD90在ADSCs、BMSCs的表达情况, 以相应小鼠IgG1作同型对照。

生长动力学: 取 2×10^7 L⁻¹ ADSCs或BMSCs细胞悬液接种96孔板, 200 μL/孔, 测第1~9天的生长情况。每天每种细胞随机选5个复孔, 加入20 μLCCK8试剂, 37℃避光孵育1 h后于酶标仪在450 nm测吸光度值。A值为纵轴, 培养时间为横轴绘制生长曲线。倍增时间按公式: $TD = t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$ (TD为细胞倍增时间, t为培养时间, N_t为培养t小时候A值, N₀为接种后A值)^[6]。

成脂、成骨诱导分化: 根据Cyagen公司说明书进行诱导培养, 成脂诱导结束后进行油红O染色, 核苏木精复染; 成骨诱导结束后进行Von Kossa染色, 核中性红复染。

混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR): ①单向混合淋巴细胞反应(one-way MLR)检测ADSCs、BMSCs免疫原性。反应细胞为Lewis大鼠来源T淋巴细胞, 刺激细胞分别为BN大鼠来源树突状细胞、ADSCs、BMSCs。96孔板接种反应细胞 2×10^5 /孔, 然后分别接种40 Gy ⁶⁰Co照射后的树突状细胞、ADSCs、BMSCs各 2×10^4 /孔; 对照组仅有反应细胞; 每组设5个复孔。②双向混合淋巴细胞反应(two-way MLR)检测ADSCs、BMSCs免疫调节功能。反应细胞为Lewis大鼠来源T淋巴细胞, 刺激细胞为BN大鼠来源树突

状细胞, 调节细胞分别为40Gy ⁶⁰Co照射后的ADSCs、BMSCs、PFBs。96孔板接种反应细胞2×10⁵/孔、刺激细胞2×10⁴/孔, 然后接种照射后的ADSCs或BMSCs, 数量分别为5×10³/孔、1×10⁴/孔、2×10⁴/孔; 对照组不接种间充质干细胞或接种PFBs; 每组设5个复孔。共培养96 h后加入20 μL Brdu, 37 °C 孵育12 h后按Brdu试剂盒说明分别加入一抗、二抗, 酶标仪检测每组细胞A值。

主要观察指标: 细胞形态, 细胞表型, 生长动力学, 诱导成脂、成骨分化, 混合淋巴细胞反应。

设计、实施、评估者: 设计、实施、评估者均为文章作者, 经过系统培训, 未使用盲法评估。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计软件进行数据处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 各组间两两比较采用LSD-t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 细胞形态

光镜观察: ADSCs接种48 h后换液除去非贴壁细胞, ADSCs呈梭形或三角形, 3~5个细胞克隆成簇散在分布, 3 d后形成漩涡样集落, 细胞呈梭形, 形态较均一, 10 d左右90%融合, 传至第3代, 细胞形态均一, 呈螺旋状生长, 见图1a,b。BMSCs接种24 h后换液除去非贴壁细胞, BMSCs呈长梭形, 两三个细胞克隆散在分布在以圆形贴壁细胞为主的培养皿中, 经换液, 圆形细胞逐渐减少, BMSCs形成生长优势, 呈长梭形, 平行或螺旋生长, 14 d左右细胞90%融合, 但仍混杂少许其他细胞, 经换液、传代后细胞逐渐纯化, 传至第3代, 细胞形态均一, 螺旋状生长, 见图1c,d。

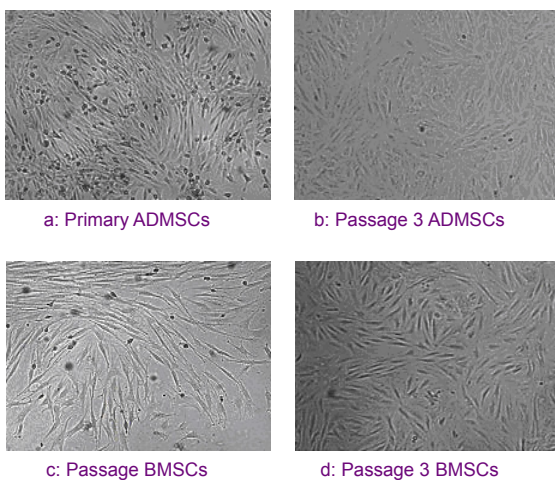


Figure 1 Morphology of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) under an optical microscope (×40)
图1 光镜观察(ADSCs)和 BMSCs 形态 (×40)

透射电镜观察: 处于相对静止状态的ADSCs、BMSCs电镜下均可观察到较大的椭圆形细胞核, 核质比大; 细胞内线粒体、粗面内质网、高尔基体等细胞器处于幼稚状态, 见图2。

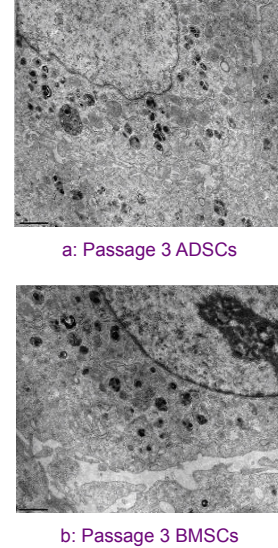


Figure 2 Morphology of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) under an electron microscope (×5 000)
图2 电镜观察(ADSCs)和 BMSCs 结构(×5 000)

2.2 细胞表型 见图3。

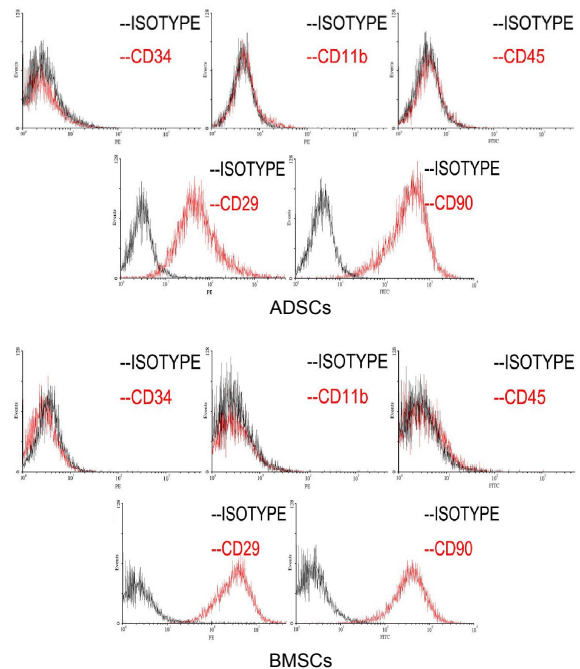


Figure 3 Surface phenotype of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs)
图3 ADSCs 和 BMSCs 的表面表型

图3可见, 流式细胞术检测第3代ADSCs、BMSCs均高表达CD29、CD90; 低表达造血干细胞表面标志CD34, CD11b, CD45, 与文献报道相符^[7]。

2.3 生长动力学 分别绘制第3, 4, 5代ADSCs、BMSCs的生长曲线。培养24 h后, ADSCs增殖速度超过BMSCs, 第6天后进入平台期, 第3代ADSCs倍增时间为(47±3)h, BMSCs为(59±2)h。第3, 4, 5代ADSCs增殖速度明显快于BMSCs, 见图4。

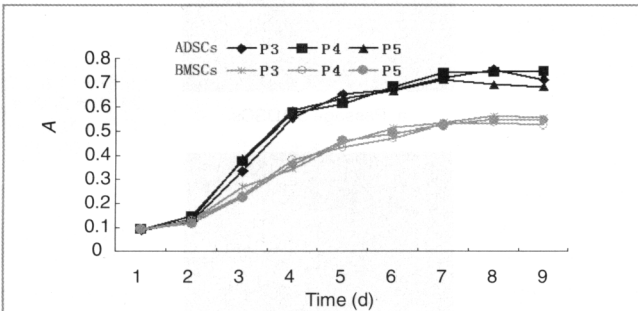
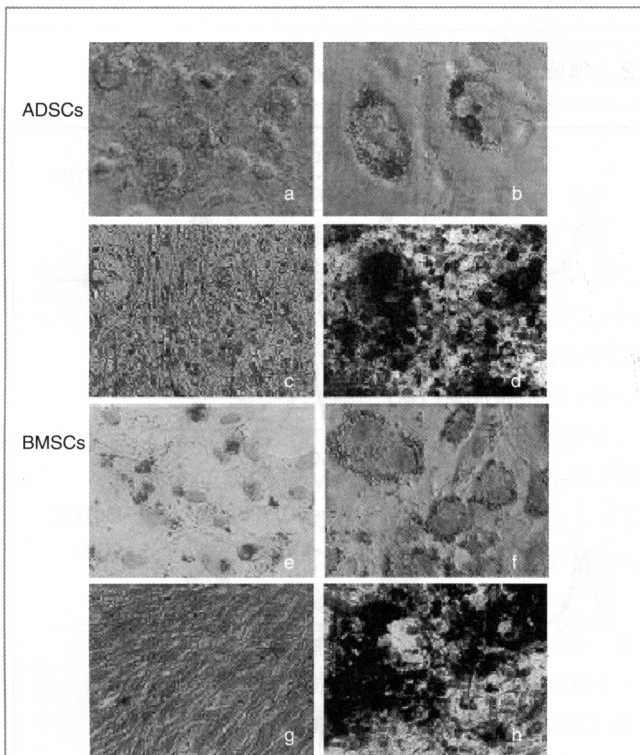


Figure 4 Growth curve of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs)

图4 ADSCs 和 BMSCs 生长曲线

2.4 诱导成脂、成骨分化 见图5。



a, c: Control group; b: Oilred O staining; d: Von Kossa staining; e, g: Control group; f: Oil O staining; h: Von Kossa staining

Figure 5 Osteoblast induction and adipocyte induction of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs)

图5 ADSCs、BMSCs 的成脂诱导和成骨诱导

ADSCs成脂诱导3 d后光镜下可见细胞浆内有透亮脂滴出现, 逐日增多, 第14天结束诱导时, 大多数细胞胞浆都充满透明脂滴, 油红O染色脂滴呈鲜红色(图5b); BMSCs成脂诱导5 d后光镜下可观察到透亮脂滴, 与ADSCs相比脂滴体积较小但数目多, 第14天结束诱导时, 90%细胞胞浆都充满脂滴, 油红O染色脂滴呈鲜红色(图5f); 诱导成骨3 d后, ADSCs、BMSCs体积增大, 形态变为不规则, 7 d后可以观察到晶莹类似钙结节的物质出现, 细胞逐渐融合, 重叠生长。

诱导结束后Von Kossa染色, 细胞周围有明显钙沉积(图5d,h)。

2.5 混合淋巴细胞反应

One-way MLR评估ADSCs和BMSCs免疫原性: 阴性对照组为单纯T淋巴细胞培养。

与加入树突状细胞组相比, ADSCs组和BMSCs组均不能刺激MLR中异基因T淋巴细胞增殖($P < 0.05$), ADSCs组、BMSCs组、阴性对照组之间差异无显著性意义($P > 0.1$), 见图6。

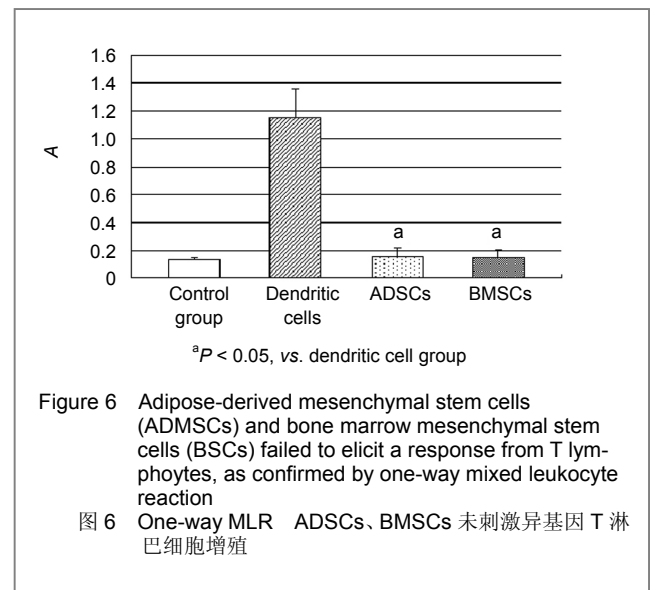
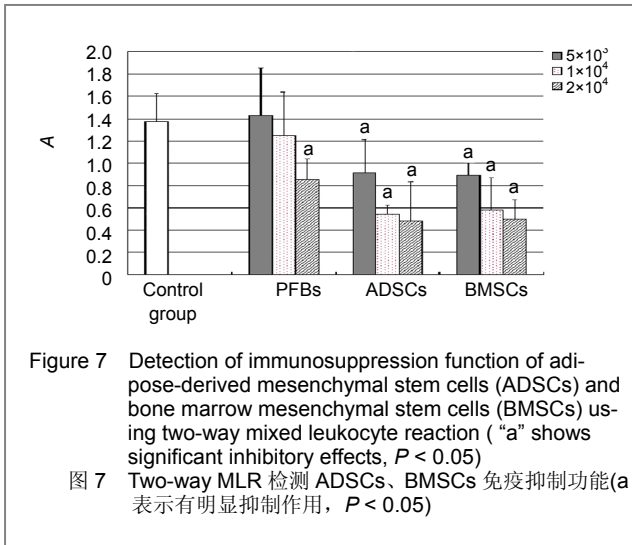


Figure 6 Adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) and bone marrow mesenchymal stem cells (BSCs) failed to elicit a response from T lymphocytes, as confirmed by one-way mixed leukocyte reaction

图6 One-way MLR ADSCs、BMSCs 未刺激异基因 T 淋巴细胞增殖

Two-way MLR检测ADSCs、BMSCs免疫抑制功能: 对照组不接种MSCs或接种相应数量大鼠肺成纤维细胞以评估由于细胞拥挤造成的细胞生长抑制。与不接种MSCs组相比, 数量分别为 5×10^3 /孔、 1×10^4 /孔、 2×10^4 /孔的ADSCs、BMSCs均对树突状细胞介导的T淋巴细胞增殖有抑制作用($P < 0.05$); 而加入大鼠肺成纤维细胞的对照组中只有当细胞数目最高时(2×10^4 /孔)才表现出对MLR的抑制作用, 而 5×10^3 /孔、 1×10^4 /孔时对T淋巴细胞增殖无抑制作用。

ADSCs和BMSCs对T淋巴细胞增殖抑制作用与其数量呈正相关, 随着调节细胞数量增多, 抑制作用相应增强; 而等量ADSCs和BMSCs之间抑制作用差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图7。



3 讨论

BMSCs的免疫学特性提示其可以促成骨髓和实质器官的移植免疫耐受。骨髓是MSCs的可靠来源,但BMSCs的取得过程是有创的,常需要多次穿刺;而且BMSCs的获取量很低(大约 1×10^5 个间质细胞中含有一个MSC)^[6],并随年龄增加数量逐渐减少,这些都使它在临床上广泛应用受到限制。除骨髓外,人们已从胎盘组织、肌肉组织、脂肪组织、脐带血中分离到了MSCs^[9],其中ADSCs以获取方便,来源充分,创伤较小,涉及医学伦理学问题少,分离简单,增殖快速等优点成为众多实验室研究的重点。

本实验将取材于同一只BN大鼠的ADSCs和BMSCs进行比较,保持了细胞来源和其内在因素的同质性。两种组织来源的细胞均表现出MSCs的生物学特性:细胞形态均一,呈长梭形,有成纤维细胞样集落(fibroblastoid colony-forming units, CFU-F)形成;均一表达MSCs代表性的表面标志;具有多向分化潜能。这些特性符合国际细胞治疗协会制定的最新MSCs鉴定标准^[10]。培养过程中发现,ADSCs比BMSCs更易于分离获得,ADSCs贴壁3 d后即有明显集落形成,而BMSCs则需要5~7 d;原代ADSCs经3次换液后细胞形态逐渐均一,而BMSCs需多次换液,1次传代后杂质细胞才逐渐去除。两种细胞传至第3代均可获得形态均一的成纤维样细胞,透射电镜下可观察到幼稚细胞器形态。第3代ADSCs倍增时间为 (47 ± 3) h, BMSCs为 (59 ± 2) h;从生长曲线上可看出第3, 4, 5代ADSCs生长速度明显快于BMSCs;这为短时间内大量扩增MSCs用于细胞治疗提供了实验依据。MSCs与成熟细胞表面标志物之间常有交叉性,目前还没有明确的表面标志蛋白可以鉴定^[11],因此常需用多种表面标志物的阴性及阳性组合来鉴定。ADSCs与BMSCs低表达造血干细胞和内皮

细胞表面标志CD34, CD45, CD11b, CD14, CD31;高表达CD29, CD44, CD73, CD90, CD105。多向分化潜能方面,ADSCs、BMSCs均可向成脂、成骨诱导,但实验同时发现ADSCs比BMSCs更易向成脂诱导,即脂滴出现早、体积大;成骨诱导中两种细胞无明显差异。

McIntosh等^[12]研究发现,原代ADSCs可以刺激异基因淋巴细胞增殖,但随着细胞的传代培养,ADSCs的免疫原性逐渐降低。本实验中,用第3代ADSCs和BMSCs分别与异基因T淋巴细胞共培养,均不能引起T淋巴细胞增殖,说明第3代ADSCs和BMSCs有着较低的免疫原性。在Two-way MLR中, 5×10^3 /孔、 1×10^4 /孔、 2×10^4 /孔的ADSCs和BMSCs均能有效抑制树突状细胞介导的T淋巴细胞增殖,且这种抑制作用与其细胞数量呈正相关,而相同数量的ADSCs和BMSCs抑制作用无差别,说明ADSCs与BMSCs具有相类似的免疫调节作用,与文献报道相符^[13]。体外实验还证实BMSCs向成脂、成骨、成软骨诱导后仍保持着原有的免疫抑制能力^[14]。为评估因细胞拥挤造成的T细胞增殖抑制,对照组中接种了PFBs与T淋巴细胞共培养,只有在 2×10^4 /孔一组中T淋巴细胞增殖受到抑制,这一现象可以推断为在高密度的培养体系中,体积相对较大的成纤维细胞消耗了大量营养物质并造成了一定的接触抑制,从而导致了淋巴细胞增殖受到影响。

对BMSCs的研究表明,抗原递呈细胞(antigen-presenting cells, APC)在介导这种作用中扮演着重要角色^[15],而是否产生调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)则不是必要的因素^[16]。Puissant^[13]将ADSCs与T淋巴细胞间接共培养时,ADSCs的调节作用有所减弱,但并不能完全消除,说明多种可溶性细胞因子在这种调节机制中发挥了作用,如转化生长因子 $\beta 1$ ^[17]、肝细胞生长因子^[18]、前列腺素E2^[19]、白细胞介素10和一氧化氮^[20-21]。同时,封闭以上任何一个可溶性因子都不能完全逆转MSCs的抑制功能^[22],说明多种细胞因子在这个微环境中共同发挥着作用。

综上所述,ADSCs具有与BMSCs类似的低免疫原性和免疫调节功能,并且它来源广泛,取材简便,易于扩增的优点使其成为同种异体移植和移植免疫细胞治疗的理想选择。

4 参考文献

- [1] Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, et al. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res.* 2008;332: 415-426.
- [2] Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, et al. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol.* 2007;179: 1595-1604.
- [3] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13: 4279-4295.

- [4] He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells*.2007;25: 69-77.
- [5] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [6] 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.
- [7] Crop M, Baan C, Weimar W, et al. Potential of mesenchymal stem cells as immune therapy in solid-organ transplantation. *Transpl Int*.2009;22: 365-376.
- [8] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multi lineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7: 211-228.
- [9] Martinez C, Hofmann T.J, Marino R, et al. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2:a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood*.2007; 109: 4245-4248.
- [10] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*.2006;8: 315-317.
- [11] Traggiai E, Volpi S, Schena F, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells*.2008;26: 562-569.
- [12] McIntosh K, Zvonc S, Garrett S, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: Temporal changes in vitro. *Stem Cells*.2006;24:1246-1253.
- [13] Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*.2005;129: 118-129.
- [14] 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.
- [15] Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*.2007;110: 2764-2767.
- [16] 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.
- [17] Ning H, Yang F, Jiang M, et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia*.2008;22: 593-599.
- [18] Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, et al. IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur. J. Immunol*.2008;38:1745-1755.
- [19] Augello A, Tasso R, Negrini SM, et al. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*.2007;56: 1175-1186.
- [20] 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.
- [21] Sato K, Ozaki K, Oh I, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*.2007;109: 228-234.
- [22] Gieseke F, Schütt B, Viebahn S, et al. Human multipotent mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of PBMCs independently of IFN- γ R1 signaling and IDO expression. *Blood*. 2007;110: 2197-2200.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 课题由卫生部科学研究基金——福建省卫生教育联合攻关计划资助 (WKJ2005-2-020), 厦门市科技计划社会发展项目 (3502Z20064020) 资助。课题名称: 外周血干细胞移植诱导肝移植术后免疫耐受的实验研究。

致谢: 感谢厦门大学附属中山医院检验科刘莉莉老师在流式细胞术方面给予的指导。感谢殷莉波、马全明、李敏在细胞分离、培养中给予的帮助。

利益冲突: 无其他利益冲突。

课题的创新点: 实验将取自同体大鼠的骨髓和脂肪来源间充质干细胞进行生物学特性比较, 保持了细胞来源和其内在因素的相同性。在双向混合淋巴细胞反应实验的对照组中接种了大鼠肺成纤维细胞与 T 淋巴细胞共培养作对照组, 从而排除了因共培养细胞密度过大而造成 T 细胞增殖受影响的干扰。

课题评估的“金标准”: 目前尚未明确间充质干细胞的特异性抗原标志, 通常以细胞形态、流式细胞仪检测结果、多向分化潜能作为判断标准。根据国际细胞治疗协会制定的最新 MSCs 鉴定标准, 可以认为本实验从骨髓和脂肪分离纯化得到的细胞即是间充质干细胞。

设计或课题的偏倚与不足: 试验中未对原代和第 1 代细胞进行表面标志鉴定, 未对扩增细胞进行成软骨诱导。在电镜观察时出现较多高密度点, 未能进行进一步探讨。

提供临床借鉴的价值: 实验建立了一套体外稳定培养脂肪和骨髓间充质干细胞的方法, 所培养的细胞生物学性状稳定, 并能使其在体外诱导向成骨、脂肪细胞分化。将两者的免疫调节功能进行了比较, 脂肪间充质干细胞具有与骨髓间充质干细胞类似的低免疫原性和免疫调节功能, 并且它来源广泛, 取材简便, 易于扩增的优点使其成为同种异体移植和移植免疫细胞治疗的理想选择。

有关干细胞的学术争鸣: 本刊学术部

内容简介	网站击更多
美国研究人员宣布创造了世界首例由人造基因控制的细胞。科学家克雷格·文特尔表示, 他们合成了全新的基因组, 将其植入一个内部被掏空遗传物质的单细胞细菌 (山羊支原体), 使这个受体细菌“起死回生”, 并开始实验室的培养皿中繁殖。消息一出, 有人喝彩, 甚至称“世界首例人造生命诞生”; 也有人担忧, 认为这无异于“打开潘多拉魔盒”, 会引起生物伦理、生物安全等问题。人造生命离我们还有多远?	http://cn.zglckf.com/html/2010_06_08/2_65650_2010_06_08_117756.html
美国私立科研机构克雷格·文特尔研究所研究人员报告, 他们培育出第一个由人工合成基因组控制的细胞, 从而向人造生命形式迈出了关键一步。人造生命相关技术的应用前景固然广阔, 但其双刃剑效应绝不可忽视。	http://cn.zglckf.com/html/2010_06_08/2_65650_2010_06_08_117762.html
世界首个“人造生命”在美国诞生, 现在人类的能力已经拓展到可以“操纵”自然界。不过这一科技突破也引来不少诟病, 批评人士说人类怎能堪当“造物主”之职, 美国总统奥巴马也下令举行听证会, 讨论这一问题。	http://cn.zglckf.com/html/2010_06_08/2_65650_2010_06_08_117766.html