

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.10.005

TGF- β 与 IL-6 介导的骨髓基质干细胞对 EAE 的双向调节作用研究 *刘希君¹ 沈亚琪² 秦虹³ 胡瑞雪¹ 王广友¹ 李呼伦^{1Δ}

(1 黑龙江省基础医学研究所 哈尔滨医科大学神经生物学教研室 黑龙江 哈尔滨 150081;

2 中南大学 营养与食品卫生学教研室 湖南 长沙 410006; 3 复旦大学 药理学教研室 上海 200433)

摘要 目的:探讨在实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)治疗中 TGF- β 与 IL-6 介导的骨髓基质干细胞(BMSCs)的双向调节作用与机制。**方法:**分离纯化 BMSCs,并与 EAE 大鼠动物模型淋巴细胞共培养,应用抗 TGF- β 和 IL-6 单克隆抗体封闭 TGF- β 或 IL-6 通路,ELISA 检测不同比例 MSC 与淋巴细胞共培养中对细胞因子的作用,流式细胞仪检测 MSC 对 Th 细胞亚群分化的影响,过继免疫临床评分检测 BMSC 治疗中的关键通路。**结果:**1:10 比例 BMSCs 共培养组与对照组相比,IL-17 分泌量下降($P<0.05$),Treg 细胞显著增高($P<0.05$)而 Th17 细胞显著降低($P<0.05$),共培养后的淋巴细胞进行过继免疫回输后,1:10 干细胞共培养组临床评分显著降低($P<0.05$),而 1:100 比例共培养组与上述结果相反,中和 TGF- β 和 IL-6 抗体可以调节此免疫作用。**结论:**BMSCs 通过 TGF- β 和 IL-6 通路调节免疫系统调节性 T 细胞(Treg)和 Th17 的细胞平衡,此过程与 BMSCs 剂量密切相关,本研究可为干细胞更好的临床应用提供理论基础。

关键词:实验性自身免疫性脑脊髓炎;骨髓基质干细胞;调节性 T 细胞;Th17

中图分类号:R-33;R331.2;R744.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)10-1823-05

Study on the Reciprocal Effect of Mesenchymal Stem Cell on EAE Mediated by TGF- β and IL-6*LIU Xi-jun¹, SHEN Ya-qí², QIN Hong³, HU Rui-xue¹, WANG Guang-you¹, LI Hu-lun^{1Δ}

(1 Department of Neurobiology, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China;

2 Department of nutrition and food hygiene, Central South University, Changsha, Hunan, 410006, China;

3 Department of pharmacology, Fudan University, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism and reciprocal effect of mesenchymal stem cell on EAE via TGF- β and IL-6 pathway. **Methods:** BMSCs were purified and co-cultured with lymphocytes harvested from the lymph nodes of rats with EAE after the immunization at different concentrations. Neutralizing anti-TGF- β or anti-rat IL-6 monoclonal antibodies were added to the culture system. Cell culture supernatant cytokine concentrations were determined by ELISA test and Flow cytometry test was used to examine the Th cells differentiation. The effect of msc was determined by clinical scores of adoptive transferred EAE. **Results:** More Treg cells and fewer Th17 cells were observed at the 1:10 BMSC: lymphocyte co-culture ratio. At this ratio, TGF- β neutralizing antibodies reversed the stimulatory effects of MSCs on the proportion of Tregs. However, more Th17 cells were observed in the 1:100 MSC: lymphocyte co-culture group and TGF- β and IL-6 neutralizing antibodies reversed this effect. **Conclusions:** In this report we demonstrate that BMSCs have the capacity for modulating antigen-stimulated T cells to differentiate into either Th17 or Treg cells in a dose-dependent manner, respectively via pathways involving TGF- β and IL-6. These results may lead better utility of BMSCs as a treatment for autoimmune disease.

Key words: Experimental autoimmune encephalomyelitis; Bone marrow stromal cells; Treg; Th17

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R331.2; R744.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)10-1823-05

前言

骨髓间充质干细胞(BMSCs)是一种可以进行自我更新的干细胞,它能够分化成多种类型的细胞,包括成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和神经元细胞^[1-4]。此外,在一些研究中表明间充质干细胞对于同种异体免疫反应具有保护作用,并且可以通过产生 TGF- β , HGF(人体生长因子)^[5,6], IL-10, NO, PGE2 (前列腺素

E2) 以及 IDO (吡啶胺 2,3- 双加氧酶)来调节机体免疫抑制能力^[7]。因此,间充质干细胞常常在组织修复和治疗遗传性、自身免疫性疾病的模型中用做实验材料。然而,间充质干细胞介导的免疫抑制作用并不总能起效。在某些情况下,例如在混合淋巴细胞反应和抗-CD3 ϵ 刺激的情况下,骨髓来源的间充质干细胞能够刺激淋巴细胞的增殖。在 IL-2 和 IL-15^[8-10]存在的条件下,间充质干细胞与淋巴细胞的比率较低时能够刺激淋巴细胞

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(J2541268)

作者简介:刘希君(1981-),硕士生导师,副研究员,主要研究方向:神经生物学,E-mail: liu_xi_jun@yeah.net

Δ 通讯作者:李呼伦(1957-),博士生导师,教授,主要研究方向:神经生物学,E-mail: hulunli@aliyun.com,电话:0451-86662943

(收稿日期:2018-01-10 接受日期:2018-02-03)

的增殖。目前为止,间充质干细胞介导的免疫抑制功能的机制尚不明确。

实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE),即人类多发性硬化 (MS)的小鼠模型,主要是由 Th1 介导的疾病。然而,最近的研究发现产生促炎因子 IL-17 的 T 细胞即 Th17 细胞才是在 EAE 和 MS 中起到关键作用的细胞。Tregs(调节性 T 细胞)是控制自身免疫和组织损伤的关键,也是 Th17 的拮抗剂。这两种相互拮抗的细胞分别受到 TGF- β 或 TGF- β 协同 IL-6 的调节^[11,12]。在本篇报告中,我们主要讲述了间充质干细胞介导的对髓鞘碱性蛋白特异性 T 淋巴细胞增殖的抑制或增强的双重调节作用,这种调节作用主要取决于间充质干细胞和淋巴细胞的比率以及相应可溶性因子的分泌。

1 材料与方法

1.1 材料

① 动物:雌性路易斯大鼠,体重 160~180 g,购自北京实验动物有限公司。在此次研究中使用的所有大鼠饲养和维护方法均与中国研究院发表的善待实验动物与健康的规定一致。② 主要试剂和材料:MBP68-86 (YGSLPQKSQRSQDENPV) 采用由生物技术有限公司公司(上海,中国)的固相合成技术和高效液相色谱法纯化。从圣克鲁斯生物公司(Santa Cruz, CA)购买抗鼠 TGF- β 和抗鼠 IL-6 单克隆抗体。大鼠血清购于杰克逊免疫研究所,美国,MEM 购于美国 Hyclone 公司。

1.2 方法

1.2.1 MSC 分离培养 采取脊髓离断处死大鼠。胫骨和股骨解剖后用 23 号针头抽入 MSC 培养液进行骨髓冲洗^[13]。冰上收集骨髓碎片,然后反复用 18 号针头通过 70 μ m 滤膜去除骨针和碎片。将数量约 5×10^6 的骨髓细胞放在 100 mm² 的组织培养皿中,培养基(基本细胞培养液与间充质干细胞刺激剂混合)中加入青霉素(100 U/mL),链霉素(100 mg/mL)。然后放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 饱和湿度的细胞培养箱中培养 3 天,使其在培养基中充分贴壁生长。第 3 天首次换液去除悬浮细胞,4-10 天后细胞长满单层,采用胰蛋白酶消化法(使用 0.1%胰蛋白酶和 0.1% EDTA)传代,密度调整为 5×10^3 个/cm²。

1.2.2 EAE 动物模型的建立 应用 MBP₆₈₋₈₆(25 μ g)与完全弗氏佐剂(CFA)混合后小鼠尾静脉注射法诱导产生。每隔一天进行大鼠称重和评估临床症状。临床评分是根据以下标准进行:0)、无症状;1)、尾巴瘫痪;2)、正向反射消失,有或无部分后肢瘫痪;3)、完全后肢瘫痪;4)、濒死状态;5)、死亡^[14]。

1.2.3 淋巴细胞悬液的制备 免疫后 14 天从 EAE 大鼠淋巴结中提取淋巴细胞。细胞在 RPMI 1640 培养液中清洗 3 次,然后在淋巴细胞培养基培养。RPMI 1640 培养液成分包括:1%正常大鼠血清、1%(V/V)的最低浓度基础培养基(MEM),2 mM 谷氨酰胺,1 mM 丙酮酸钠,50 mM 的 2-ME,100 U/mL 青霉素,100 mg/mL 链霉素,10 mg/mL 的 MBP。然后将淋巴结单细胞悬液密度调整为 2×10^6 / mL 备用。

1.2.4 TGF- β 和 IL-6 中和封闭后细胞因子浓度检测 不同浓度的骨髓间充质干细胞与免疫后第 14 天提取的大鼠颈淋巴结淋巴细胞共培养。在培养基中加入抗 TGF- β (10 mg/mL)或抗大鼠 IL-6 单克隆抗体(mAb)(10 mg/mL),与细胞共培养在 37

$^{\circ}$ C, 5% CO₂, 饱和湿度的孵箱中。共培养后 48 小时收集上清液,测定可溶性细胞因子。细胞培养上清液中细胞因子浓度根据厂家指示使用市售的 ELISA 试剂盒测定。干扰素 IFN- γ , IL-4, IL-17, TGF- β 和 IL-6 ELISA 试剂盒购自 R&D 公司。结果以 pg/mL 表示。

1.2.5 流式细胞仪检测 标准的细胞内细胞因子染色使用流式细胞仪和 CellQuest Pro 软件进行检测。布雷菲德菌素 A(蛋白转运抑制剂,抑制细胞因子的分泌)与细胞孵育 5 h。染色缓冲液洗两遍后,染色的样品细胞与异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗 CD4 固定后,再与藻红蛋白(PE)标记抗 IL-17 或 PE 标记的抗 Foxp3 进行细胞内染色。

1.2.6 过继免疫 EAE 过继免疫 EAE(AT-EAE)通过注入新鲜活性的 MBP 特异性 T 细胞进行过继性免疫。供体大鼠皮下接种 MBP 与 CFA 混合乳剂进行免疫。免疫后十四天,淋巴结取材制作淋巴细胞悬浮液,培养基中加入 MSC 和 20 μ g/mL MBP68-86,共培养。加入中和抗 TGF- β 抗体(10 mg/mL)或抗大鼠 IL-6 抗体(10 mg/mL)并设置对照组。48 小时后,用 0.5 毫升 PBS 收集细胞经尾静脉过继转移注射进路易斯大鼠体内并用 500 rad 照射诱导 AT-EAE。

1.3 统计学分析

数据处理采用 SPSS 18.0 软件,用未配对学生 T- 检验进行正态分布分析。临床评分采用非参数 Mann-Whitney U 检验分析。 $P < 0.05$ 表示具有显著性差异且有统计学意义。结果以平均数标准差表示。

2 结果

2.1 不同比例 MSCs 共培养对各种细胞因子表达量的影响

我们选择了 MSC: 淋巴细胞比例 1:10 或 1:100 来探讨哪些因素影响 T 淋巴细胞各种细胞因子的影响。检测淋巴细胞上清液 IFN- γ , IL-4, TGF- β , IL-6 和 IL-17 的表达量。研究发现,在 MSC: 淋巴细胞比例为 1:10 中 IFN- γ , IL-17 含量降低, IL-4, TGF- β 和 IL-6 含量增加。相反,在 MSC:淋巴细胞比例为 1:100 中发现 IFN- γ 水平降低, IL-6 和 IL-17 水平升高(IL-4 和 TGF- β 无明显变化)(图 1,表 1)。

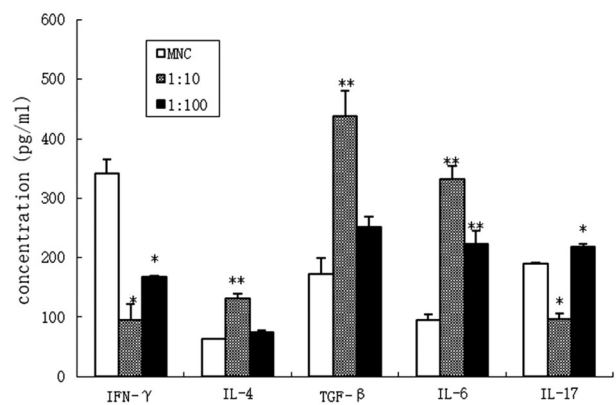


图 1 共培养上清液中细胞因子的表达

Fig.1 Cytokine expression in MLR supernatants

Note: MSC to PBMC ratios are indicated as 1:10 or 1:100. Data are expressed as the means $\pm$ SD of 3 independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the MNC group for each cytokine tested.

表 1 上清中 IFN- γ 、IL-4、TGF- β 、IL-6 及 IL-17 分泌水平(pg/mL)
Table 1 Secretion of IFN- γ , IL-4, TGF- β , IL-6 and IL-17 in supernatant (pg/mL)

	Lymphocyte group	1:10 coculture group	1:100 coculture group
IFN- γ	341.4 $\pm$ 24.26	95.25 $\pm$ 26.5*	167.25 $\pm$ 1.9*
IL-4	64.0 $\pm$ 0.10	130.7 $\pm$ 8.10**	74.55 $\pm$ 2.80
TGF- β	172.35 $\pm$ 27.8	438.75 $\pm$ 42.30**	251.5 $\pm$ 17.60
IL-6	95.3 $\pm$ 9.50	331.8 $\pm$ 22.20**	223.75 $\pm$ 21.60**
IL-17	189.5 $\pm$ 1.69	97.26 $\pm$ 9.09*	218.06 $\pm$ 5.81*

Note: 1:10 coculture group and 1:100 coculture group compared with lymphocyte group *P<0.05, **P<0.01.

2.2 TGF- β 和 IL-6 在 MSC 与淋巴细胞共培养中的作用

我们分别用抗 TGF- β 和 IL-6 单克隆抗体来研究 MSC 来源的 TGF- β 和 IL-6 对 MBP 特异性 T 细胞的相互作用。从 EAE 大鼠中提取并提纯淋巴细胞后,分别与有 MSC 或无 MSC (1:10 或 1:100 的比例), 以及存在或不存在抗 IL-6 或 TGF- β 的培养基中共培养 48 h。IL-17 含量在 MSC:淋巴细胞比例为 1:10,存在抗 TGF- β 中是增加的。相反,IL-17 含量在 MSC:淋巴细胞比例为 1:100,存在抗 TGF- β 或 IL-6 中是降低的(图 2, 表 2)。

培养组织也在 PE 标记的抗 Foxp3 或 PE 标记的抗 IL-17 与 FITC 标记的抗 CD4 进行双染色。在 1:10 的 MSC:淋巴细胞共培养比例中观察到较多的 Treg 细胞和较少的 Th17 细胞。在这个比例,TGF- β 中和抗体逆转了 MSCs 对 CD4+Foxp3+T 细胞(Treg)的刺激作用。然而,在 1:100 组中,我们观察到更多的 Th17 细胞,是 TGF- β 和 IL-6 中和抗体产生了这种逆转效果。

在 1:100 的 MSC:淋巴细胞比例组中,间充质干细胞的存在对 CD4+Foxp3+T 细胞亚群的影响不显著(图 3,表 3)。

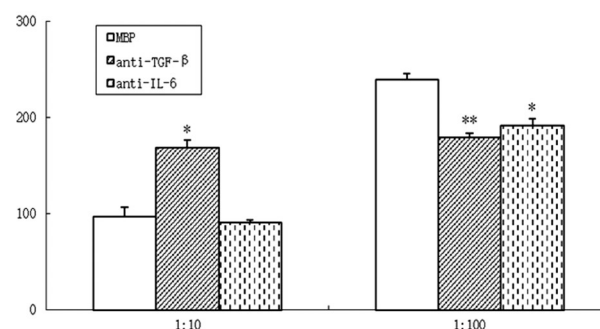


图 2 共培养上清液中 IL-17 的表达变化

Fig.2 IL-17 levels in MLR supernatant

Note: Data are expressed as the mean $\pm$ SE of 3 independent experiments.

* P<0.05, ** P<0.01 vs. the MBP group.

表 2 TGF- β 、IL-6 抗体封闭后对 IL-17 表达量的影响(pg/mL)
Table 2 Secretion of IL-17 in co-culture supernatant (pg/mL)

	MBP group	Anti-TGF- β group	Anti-IL-6 group
1:10 coculture group	97.26 $\pm$ 9.08	168.95 $\pm$ 7.99*	91.10 $\pm$ 1.98
1:100 coculture group	239.56 $\pm$ 5.81	178.85 $\pm$ 4.88**	191.7 $\pm$ 7.35*

Note: coculture groups with anti-TGF- β or anti-IL-6 compared with MBP group *P<0.05 **P<0.01.

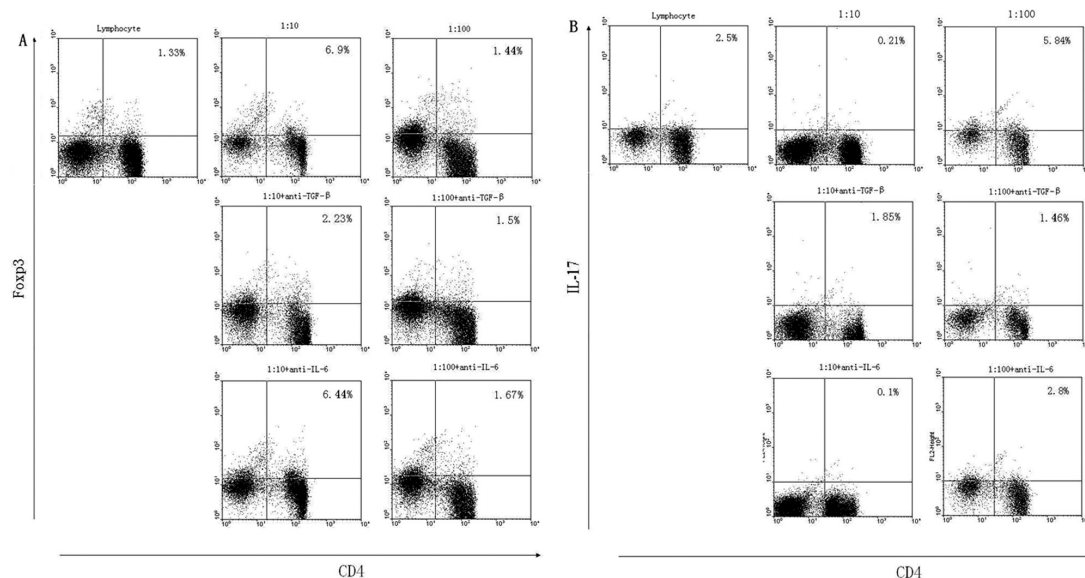


图 3 MSC 介导的 T 细胞亚群变化

Fig.3 MSC-mediated T cell subset distribution

Note: Three independent experiments were carried out and the representative profiles are shown.

表 3 BMSC 对 EAE 大鼠 T 淋巴细胞亚群的影响
Table 3 Proportion of CD4+Foxp3+Tregs and CD4+IL-17+ Th17 cells

	CD4+Foxp3+Treg cells %	CD4+IL-17+ Th17 cells %
lymphocyte group	1.33± 0.06	2.5± 0.13
1:10 coculture group	6.9± 0.76*	0.21± 0.03*
1:10 anti-TGF-β group	2.23± 0.22	1.85± 0.02
1:10 anti-IL-6 group	11.94± 0.94	0.1± 0.01
1:100 coculture group	1.44± 0.16	5.94± 0.43*
1:100 anti-TGF-β group	1.5± 0.05	1.46± 0.08
1:100 anti-IL-6 group	1.67± 0.08	2.8± 0.10

Note: compare with lymphocyte group *P<0.01.

2.3 骨髓间充质干细胞对 AT-EAE 的双重调节作用

过继免疫 EAE(AT-EAE)由注射 MSC 刺激的 MBP 特异性 T 细胞注入大鼠尾静脉诱导产生。注射前,细胞与存在或缺失骨髓间充质干细胞共培养 48 小时,然后应用抗 TGF-β 或抗 IL-6 单克隆抗体治疗。我们发现,T 细胞在 1:100 的 MSC:淋巴细胞的比例受刺激中会产生比治疗组动物更严重的 EAE 临床表现。应用抗 TGF-β 或抗 IL-6 治疗可以缓解 EAE 病情(图 4)。

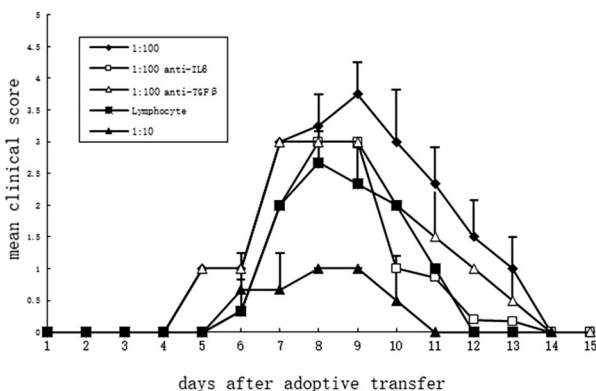


图 4 不同 MSC 比例对过继免疫 EAE 的作用

Fig.4 Effect of low MSC ratios on the development of AT-EAE

Note: Results are expressed as the mean of quadruplicate samples in three independent experiments.

3 讨论

近期出现了许多关于间充质干细胞介导的免疫调节的资料,尽管这些实验结果并不一定都可以得到验证。有研究报道称,在 IL-2 和 IL-15^[10]存在的条件下,间充质干细胞与淋巴细胞的比率较低时,它对淋巴细胞的增殖在混合淋巴细胞反应 (MLR)中存在免疫刺激特性。在本篇文章中,我们主要研究了间充质干细胞对淋巴细胞的影响并证实了间充质干细胞通过调节 Treg 和 Th17 平衡来介导增殖或增强作用。除此之外, TGF-β 和 IL-6 是调节这些过程的关键细胞因子。

有报道表明间充质干细胞在混合淋巴细胞反应中对淋巴细胞增殖有多效性作用^[15]。显著的混合淋巴细胞抑制反应可以在间充质干细胞与淋巴细胞的比率为 1:1 或 1:2 时观察得到。然而,这些比率在体内是很难实现的,而且这两种细胞的比率

差异对间充质干细胞的影响仍不清楚。研究者报道称,与 T 淋巴细胞的比例较低时,间充质干细胞不太可能发挥抑制作用而有时候产生了刺激异体淋巴细胞增殖的作用^[16]。

本篇研究报告的数据显示在不同间充质干细胞与淋巴细胞的比率下,间充质干细胞对 T 淋巴细胞增殖的不同影响。在较高的间充质干细胞与淋巴细胞比率(即 1:10)条件下,我们发现了明显的增殖减少的现象以及在比率为 1:100 时增殖增强的现象(P<0.05)。这些发现可能有助于解释在给病人体内注射相对较低数量的骨髓间充质干细胞后引起的 T 淋巴细胞数量有所改变的现象。

整合现在所有的研究数据表明,间充质干细胞介导的免疫抑制作用实际上是通过分泌可溶性因子来实现的^[17-19]。在我们的研究结果中,不同的间充质干细胞与淋巴细胞的比率中都存在高表达的 IL-6 和低表达的 IFN-γ,而 IL-17 表达量的增加存在于间充质干细胞与淋巴细胞的低比率中。此外,在间充质干细胞和淋巴细胞共培养的上清液中发现的 IL-6 表达量增加与近期的观察结果相一致。IL-6 的生成量与间充质干细胞的数量成正比,但即使在低间充质干细胞与淋巴细胞比率中,IL-6 的表达水平也明显高于对照组。TGF-β 的生成量与间充质干细胞的数量成反比,在 1:100 组中两者无明显差异。据最近研究报道出的 Th17 能够增强 EAE 发病的严重程度和利用抗 IL-17 来抑制疾病发展的治疗方法表明 IL-17 是 EAE 自身免疫性疾病过程中的关键炎症因子^[17]。

IFN-γ,主要由 Th1 细胞产生,存在于 EAE 或胶原诱导的关节炎(CIA)的病变中。这提示了 IFN-γ 可能在这类自身免疫性疾病的发病机理中起到一定的作用。然而,采取了中和抗 IFN-γ 抗体的措施后反而使这些疾病的表现加重,表明实际上 IFN-γ 对于减轻 EAE 的病变程度是有益的^[20]。近期研究报道称利用 IL-23 可以刺激细胞产生 IL-17,而 IL-12/IFN-γ 可以抑制细胞产生 IL-17,阻断 IFN-γ 或 IL-4 信号通路后可以诱导产生 IL-17 的 T 细胞的分化^[27]。因此,在低的间充质干细胞与淋巴细胞比率中上调 IL-17 可能与实验结果观察到的高表达的 TGF-β、IL-6 和低表达的 IFN-γ 有关^[28,29]。

中和 TGF-β 和 IL-6 是作为评估这些细胞因子在反应中作用的一种手段。在间充质干细胞与淋巴细胞比率为 1:10 的组中,中和 TGF-β 使 IL-17 的抑制作用发生了逆转。在 1:100 组中,中和 TGF-β 或 IL-6 后,IL-17 的表达量明显下降。在平行试

验的 1:10 共培养组中, 利用流式分析仪测出 Tregs 和 Th17 的比例增高, 在这一组中, 中和 TGF- β 抗体使免疫调节作用发生了逆转(抗 IL-6 抗体没有这个作用)。然而, 在 1:100 共培养组发现 Tregs 和 Th17 的比例降低, 中和 TGF- β 和 IL-6 抗体均使免疫调节作用发生了逆转。目前已被证实 TGF- β 和 IL-6 的组合可以有有效的诱导 Th17 的分化。

未成熟的 CD4⁺T 细胞在 TGF- β 的刺激下可以分化为 CD4⁺Foxp3⁺ 细胞, 但是加入 TGF- β 和 IL-6 后可以完全抑制其 Foxp3 的表达而刺激 IL-17 的生成。据推测, TGF- β 不仅可以诱导调节性 T 细胞也可以诱导促炎性 T 细胞, 这取决于是否存在促炎性细胞因子如 IL-6。以上数据表明, Th17 细胞与诱导调节性 T 细胞(iTreg)之间存在着相互调节的关系。近期, 研究报道称 TGF- β 以一种浓度依赖的方式精密的调控着 Th17 细胞的分化。我们推断在间充质干细胞含量较低的情况下, TGF- β 协同 IL-6 共同促进 Th17 的分化, 而在间充质干细胞含量较高时, 高浓度的 TGF- β 抑制了 Th17 的分化而有利于 Foxp3⁺ Treg 细胞的分化。因此, 诱导抗原刺激细胞分化为 Th17 细胞或者 Treg 细胞的关键取决于 TGF- β 和 IL-6 的平衡。

参考文献(References)

- [1] Nemoto A, Chosa N, Kyakumoto S, et al. Water-soluble factors eluted from surface pre-reacted glass-ionomer filler promote osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. Molecular Medicine Report, 2017[Epub ahead of print]
- [2] Kolakshyapati P, Li X, Chen C, et al. Gene-activated matrix/bone marrow-derived mesenchymal stem cells constructs regenerate sweat glands-like structure in vivo[J]. Science Report, 2017, 7(1): 17630
- [3] Kim JA, Yun HS, Choi YA, et al. Magnesium phosphate ceramics incorporating a novel indene compound promote osteoblast differentiation in vitro and bone regeneration in vivo [J]. Biomaterials, 2017, 157: 51-61
- [4] Gupta D, Grant DM, Zakir Hossain KM, et al. Role of geometrical cues in bone marrow-derived mesenchymal stem cell survival, growth and osteogenic differentiation [J]. Journal of Biomaterials Applications, 2017, 1: 885328217745699
- [5] Özdemir AT, Özgül Özdemir RB, Kırmaz C, et al. The paracrine immunomodulatory interactions between the human dental pulp derived mesenchymal stem cells and CD4 T cell subsets[J]. Cell Immunology, 2016, 310: 108-115
- [6] Wang H, Zheng R, Chen Q, et al. Mesenchymal stem cells microvesicles stabilize endothelial barrier function partly mediated by hepatocyte growth factor (HGF)[J]. Stem Cell Research and Therapy, 2017, 8(1): 211
- [7] Parys M, Kruger JM, Yuzbasiyan-Gurkan V. Evaluation of Immunomodulatory Properties of Feline Mesenchymal Stem Cells[J]. Stem Cells Development, 2017, 26(10): 776-785
- [8] Blanco B, Herrero-Sánchez MD, Rodríguez-Serrano C, et al. Immunomodulatory effects of bone marrow versus adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells on NK cells: implications in the transplantation setting [J]. European Journal of Haematology, 2016, 97(6): 528-537
- [9] Luk F, Carreras-Planella L, Korevaar SS, et al. Inflammatory Conditions Dictate the Effect of Mesenchymal Stem or Stromal Cells on B Cell Function[J]. Front Immunology, 2017, 8: 1042
- [10] Bocelli-Tyndall C, Bracci L, Schaeren S, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the in vitro proliferation of lymphocytes stimulated with the cytokines IL 2, IL 7 and IL 15[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2008
- [11] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells[J]. Nature, 2006, 441: 235-238
- [12] Wang H, Zhang H, Huang B, et al. Mesenchymal stem cells reverse high fat diet induced non alcoholic fatty liver disease through suppression of CD4⁺ T lymphocytes in mice[J]. Molecular Medicine Reports, 2017[Epub ahead of print]
- [13] Shin-Yeu Onga, Hui Daia, Kam W. Leonga,b, Inducing hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture [J]. Biomaterials, 2006: 4087-4097
- [14] Contarini G, Giusti P, Skaper SD. Active Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in C57BL/6 Mice [J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1727: 353-360
- [15] Cassano JM, Schnabel LV, Goodale MB, et al. The immunomodulatory function of equine MSCs is enhanced by priming through an inflammatory microenvironment or TLR3 ligand [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2018, 195: 33-39
- [16] Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. scandinavian journal of immunology [J]. Scand J Immunol, 2003, 57: 11-20
- [17] Gonçalves RSG, Pereira MC, Dantas AT, et al. IL-17 and related cytokines involved in systemic sclerosis: Perspectives[J]. Autoimmunity, 2017, 19: 1-9
- [18] Hossain MM, Murali MR, Kamarul T. Genetically modified mesenchymal stem/stromal cells transfected with adiponectin gene can stably secrete adiponectin[J]. Life Science, 2017, 182: 50-56
- [19] Park JH, Ryu CH, Kim MJ, et al. Combination Therapy for Gliomas Using Temozolomide and Interferon-Beta Secreting Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells[J]. Journal of Korean Neurosurgical Society, 2015, 57(5): 323-328
- [20] Zhang J, Hou L, Zhao D, et al. Inhibitory effect and mechanism of mesenchymal stem cells on melanoma cells. Clinical and Translational [J]. Oncology, 2017, 19(11): 1358-1374
- [21] Shi SJ, Ding ML, Wang LJ, et al. CD4⁺T cell specific B7-H1 selectively inhibits proliferation of naïve T cells and Th17 differentiation in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Oncotarget, 2017, 8(52): 90028-90036
- [22] Hu D, Notarbartolo S, Croonenborghs T, et al. Transcriptional signature of human pro-inflammatory TH17 cells identifies reduced IL10 gene expression in multiple sclerosis [J]. Nature Communication, 2017, 8(1): 1600
- [23] Zhao Q, Cheng W, Xi Y, et al. IFN- β regulates Th17 differentiation partly through the inhibition of osteopontin in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Molecular Immunology, 2018, 93: 20-30

- medicine, 2013, 10(19): 1281-1287
- [12] Coldwell K E, Lee S J, Kean J, et al. Effects of obstetric factors and storage temperatures on the yield of endothelial colony forming cells from umbilical cord blood[J]. *Angiogenesis*, 2011, 14(3): 381-392
- [13] Denecke B, Horsch L D, Radtke S, et al. Human endothelial colony-forming cells expanded with an improved protocol are a useful endothelial cell source for scaffold-based tissue engineering [J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2015, 9 (11): E84-E97
- [14] Huang L, Critser P J, Grimes B R, et al. Human umbilical cord blood plasma can replace fetal bovine serum for in vitro expansion of functional human endothelial colony-forming cells[J]. *Cytotherapy*, 2011, 13(6): 712-721
- [15] Zeisberger S M, Zoller S, Riegel M, et al. Optimization of the culturing conditions of human umbilical cord blood-derived endothelial colony-forming cells under xeno-free conditions applying a transcriptional approach[J]. *Genes to Cells*, 2010, 15(7): 671-687
- [16] Vassallo P F, Simoncini S, Ligi I, et al. Accelerated senescence of cord blood endothelial progenitor cells in premature neonates is driven by SIRT1 decreased expression[J]. *Blood*, 2014, 123(13): 2116-2126
- [17] Rafael Moreno-Luna R M N R. Maternal Body-Mass Index and Cord Blood Circulating Endothelial Colony-Forming Cells[J]. *The Journal Of Pediatrics*, 2014, 3(164): 566-571
- [18] Frauke Von Versen-Hoynck L B R D. Vitamin D Antagonizes Negative Effects of Preeclampsia on Fetal Endothelial Colony Forming Cell Number and Function[J]. *Plos one*, 2014, 6(9): e98990
- [19] Reid E, Guduric-Fuchs J, O'Neill C L, et al. Preclinical Evaluation and Optimization of a Cell Therapy Using Human Cord Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cells for Ischemic Retinopathies [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(1): 59-67
- [20] Grandvilllemin I, Garrigue P, Ramdani A, et al. Long-Term Recovery After Endothelial Colony-Forming Cells or Human Umbilical Cord Blood Cells Administration in a Rat Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(11): 1987-1996
- [21] Xin-tao Huang Y Z S L. Intracerebroventricular Transplantation of ex vivo Expanded Endothelial Colony-Forming Cells Restores Blood Brain Barrier Integrity and Promotes Angiogenesis of Mice with Traumatic Brain Injury[J]. *J Neurotrauma*, 2013, 24(30): 2080-2088
- [22] Naima Souidi M S J R. Stromal Cells Act as Guardians for Endothelial Progenitors by Reducing their Immunogenicity after Co-transplantation[J]. *StemCells*, 2016, 5(35): 1233-1245
- [23] Burger D, Viñas J L, Akbari S, et al. Human Endothelial Colony-Forming Cells Protect against Acute Kidney Injury [J]. *The American Journal of Pathology*, 2015, 185(8): 2309-2323
- [24] As J V, Burger D, Zimpelmann J, et al. Transfer of microRNA-486-5p from human endothelial colony forming cell-derived exosomes reduces ischemic kidney injury[J]. *Kidney International*, 2016, 6(90): 1238-1250
- [25] Lee J H, Lee S H, Choi S H, et al. The Sulfated Polysaccharide Fucoidan Rescues Senescence of Endothelial Colony-Forming Cells for Ischemic Repair[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(6): 1939-1951
- [26] Gremmels H, de Jong O G, Hazenbrink D H, et al. The Transcription Factor Nrf2 Protects Angiogenic Capacity of Endothelial Colony-Forming Cells in High-Oxygen Radical Stress Conditions[J]. *Stem Cells International*, 2017, 2017: 1-11
- [27] Mena H A, Lokajczyk A, Dizier B, et al. Acidic preconditioning improves the proangiogenic responses of endothelial colony forming cells[J]. *Angiogenesis*, 2014, 17(4): 867-879

(上接第 1827 页)

- [24] Ksiazek-Winiarek D, Szpakowski P, Turniak M, et al. IL-17 Exerts Anti-Apoptotic Effect via miR-155-5p Downregulation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis [J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2017, 63(3-4): 320-332
- [25] Saitoh K, Kon S, Nakatsuru T, et al. Anti-IL-17A blocking antibody reduces cyclosporin A-induced relapse in experimental autoimmune encephalomyelitis mice [J]. *Biochemical and Biophysical Report*, 2016, 8: 139-145
- [26] Gonçalves RSG, Pereira MC, Dantas AT, et al. IL-17 and related cytokines involved in systemic sclerosis: Perspectives[J]. *Autoimmunity*, 2017, 19: 1-9
- [27] Pidala J, Beato F, Kim J, Betts B, et al. In vivo IL-12/IL-23p40 neutralization blocks Th1/Th17 response after allogeneic hematopoietic cell transplantation[J]. *Haematologica*, 2017[Epub ahead of print]
- [28] Krasimirova E, Velikova T, Ivanova-Todorova E, et al. Treg/Th17 cell balance and phytohaemagglutinin activation of T lymphocytes in peripheral blood of systemic sclerosis patients [J]. *World Journal of Experiment Medicine*, 2017, 7(3): 84-96
- [29] Kumar P, Misra P, Thakur CP, et al. T cell suppression in the bone marrow of visceral leishmaniasis patients: impact of parasite load[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2017[Epub ahead of print]