

小鼠骨髓间充质干细胞输注抑制同种异体皮片移植排斥反应的实验研究

徐成峰^{1,2}, 迟云飞², 刘甜², 曲毅睿², 周惠¹, 姚咏明^{1,3}

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院第四医学中心门诊部, 北京 100048; ³解放军总医院医学创新研究部, 北京 100853

摘要: **背景** 异体皮片移植是大面积烧伤早期的重要治疗方法, 骨髓间充质干细胞可降低移植排斥反应, 有望为烧伤患者异体皮片排斥反应的治疗提供有益参考。**目的** 探究对异体皮片移植的受体小鼠输注供体来源的骨髓间充质干细胞, 以抑制同种异体皮片移植排斥反应的可行性。**方法** 体外分离培养小鼠骨髓间充质干细胞, 通过流式细胞术验证其表面标志物 CD34、CD45、CD105 和 CD106 的表达情况, 通过 CCK-8 法和 CTV 法检测骨髓间充质干细胞抑制 T 淋巴细胞增殖的能力。C57BL/6J 小鼠作为受体鼠, 随机分为空白对照组、同基因移植组、对照组(异体移植)、骨髓间充质干细胞组(异体移植+骨髓间充质干细胞), 观察皮片存活时间, 检测淋巴结和脾内调节性 T 细胞的比例变化, 以验证骨髓间充质干细胞抑制同种异体移植排斥反应的能力。**结果** 通过原代培养获得的骨髓间充质干细胞, 低表达 CD45 和 CD34, 高表达 CD105 和 CD106, 符合骨髓间充质干细胞的标志物表达。在 T 细胞增殖抑制培养体系中, 骨髓间充质干细胞能够有效抑制 T 细胞增殖, 且骨髓间充质干细胞比例越高, 对 T 细胞增殖的抑制作用越强。预先给予骨髓间充质干细胞注射的小鼠, 皮片存活时间长于单纯异体皮片移植的小鼠。注射骨髓间充质干细胞的移植受体小鼠, 术后淋巴结和脾中调节性 T 细胞的比例较单纯皮片移植组小鼠更高。**结论** 成功分离并培养小鼠骨髓间充质干细胞, 通过体外实验证明骨髓间充质干细胞可抑制 T 细胞增殖, 动物实验证实骨髓间充质干细胞可延长异体皮片存活时间, 并提高移植受体淋巴结和脾中调节性 T 细胞的比例。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 异体皮片移植; 调节性 T 细胞; 免疫排斥反应; 免疫治疗

中图分类号: R644

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2025)04-0329-08

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.25012401

引用本文: 徐成峰, 迟云飞, 刘甜, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞输注抑制同种异体皮片移植排斥反应的实验研究 [J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (4): 329-336.

Experimental study on suppression of skin allograft rejection by bone marrow mesenchymal stem cells infusion in mice

XU Chengfeng^{1,2}, CHI Yunfei², LIU Tian², QU Yirui², ZHOU Hui¹, YAO Yongming^{1,3}

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Outpatient Department, the Fourth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China; ³Medical Innovation Research Department of PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: YAO Yongming. Email: c_ff@sina.com

Abstract: Background Allogeneic skin graft is an important treatment in the early stage of large area burn. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) can reduce transplant rejection and may provide new therapeutic ideas for the treatment of allogeneic skin graft rejection in burn patients. **Objective** To investigate the feasibility of infusing donor-derived BMSCs into recipient mice with skin allograft transplantation to inhibit allograft rejection. **Methods** Mouse BMSCs were isolated and cultured in vitro to verify the expression of surface markers. The ability of BMSCs to inhibit the proliferation of T lymphocytes was detected by CCK8 and CTV assays. C57BL/6J mice were randomly divided into blank group, autograft group, control group (allograft) and BMSCs group (allograft + BMSCs) to verify the ability of BMSCs to inhibit allogeneic allograft rejection. The survival time of skin grafts was observed, and the proportion of regulatory T cells in lymph nodes and spleens was detected. **Results** In this study, BMSCs obtained by primary culture showed low expression of CD45 and CD34, and high expression of CD105 and CD106, which was consistent with the marker expression of BMSCs. In the T cell proliferation suppression culture system, mesenchymal stem cells

收稿日期: 2025-01-24

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(82130062)

第一作者: 徐成峰, 硕士, 主治医师. Email: fred_xu@163.com

通信作者: 姚咏明, 博士, 研究员, 教授. Email: c_ff@sina.com

can effectively suppressive T cell proliferation, and the higher the proportion of mesenchymal stem cells, the stronger the inhibitory effect on T cell proliferation. Mice injected with mesenchymal stem cells showed longer skin graft survival than mice transplanted with allogeneic skin grafts alone. Skin allograft recipients injected with mesenchymal stem cells showed higher regulatory T cells proportion in the lymph nodes and spleens after surgery than mice in the skin graft alone group. **Conclusion** BMSCs have been successfully isolated and cultured in this study, the results demonstrates that BMSCs can effectively inhibit the proliferation of T lymphocytes in vitro, prolong the survival time of grafts, and increase the proportion of regulatory T cells in lymph nodes and spleens after infusion into mice.

Keywords: bone marrow mesenchymal stem cells; skin allograft; regulatory T cells; allograft rejection; immune therapy

Cited as: Xu CHF, Chi YF, Liu T, et al. Experimental study on suppression of skin allograft rejection by bone marrow mesenchymal stem cells infusion in mice[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(4): 329-336.

在大面积烧伤患者的救治过程中, 异体皮片联合微粒皮移植是降低患者病死率的重要方法^[1]。但免疫排斥反应导致异体皮片只能暂时起到覆盖创面的作用, 难以长期存活。降低异体皮片移植排斥反应并延长其在患者体表的存活时间, 可为大面积烧伤患者的救治争取宝贵的时间^[2]。近年来一些研究发现, 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)能够有效降低移植排斥反应, 甚至有望诱导受体产生特异性免疫耐受^[3]。

近年来研究发现BMSCs具有很强的免疫调节作用^[4-5]。一些临床试验中, 已经成功将间充质干细胞应用于难治性移植抗宿主病的治疗^[6-7], 并取得了显著疗效。因此, 我们设想通过对受体输注供体来源的BMSCs, 降低受体对同种异体皮片的移植排斥反应, 从而延长异体皮片的存活时间, 甚至诱导受体对异体皮片产生免疫耐受。本研究通过体外分离培养供体鼠来源的BMSCs, 在体外检测其免疫抑制功能, 建立小鼠异体皮片移植模型, 预先给予受体输注供体来源的骨髓间充质干细胞, 然后观察异体皮片存活时间, 同时检测受体免疫状态的变化, 以期寻求一种低毒性的免疫抑制方案并探索相关机制, 为临床救治大面积烧伤患者提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物、主要试剂及实验仪器

SPF级Balb/c小鼠和C57BL/6J小鼠, 雌雄不限, 6~8周龄, 体质量20~25g, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。实验动物操作由解放军总医院动物管理和使用委员会批准并监督(伦理号2022-X18-84)。实验动物及实验、饲养环境符合国家技术委员会的《实验动物管理条例》。DMEM/F12培养基、RPMI 1640培养基、胎牛血清、青链霉素双抗、Foxp3破膜/固定缓冲液、CellTrace Violet

(CTV)细胞增殖试剂盒均购自美国Thermo Fisher公司, CCK-8试剂盒购自美国Sigma公司, 刀豆蛋白(concanavalin, ConA)、丝裂霉素(mitomycin, MMC)、CD3抗体、CD28抗体、CD34-BV421、CD45-PerCP、CD105-APC、CD106-PE、CD4-PerCP、CD62L-APC、CD4-FITC、Foxp3-PE以及相应同型对照抗体购自美国BioLegend公司, FACSA5SE流式细胞分析仪购自美国BD公司, SRT流式细胞分选仪购自美国Beckman公司, 小动物麻醉机购自中国众实科技公司。

1.2 分组方法

分离Balb/c小鼠骨髓来源的间充质干细胞, 体外扩增培养, 取第3代生长状态良好的细胞进行实验。CCK-8法检测BMSCs体外抑制T细胞增殖实验中, 采用CD4⁺CD62L⁺T细胞作为效应细胞, 分组方法如下。空白对照组: RPMI完全培养基; 阴性对照组: 丝裂霉素(mitomycin, MMC)处理的效应细胞; 阳性对照组: 效应细胞, 加入刀豆蛋白刺激细胞增殖; 1:0组: 效应细胞组, 不加MMC处理的BMSCs(MMC-BMSCs); 20:1组: 效应细胞与MMC-BMSCs的比例为20:1; 10:1组: 效应细胞与MMC-BMSCs的比例为10:1; 5:1组: 效应细胞与MMC-BMSCs的比例为5:1。CTV法检测T细胞增殖实验未设置空白对照组, 其余分组设置与CCK-8法分组相同。

动物实验采用C57BL/6J小鼠作为移植受体鼠, 自受体鼠尾静脉输注Balb/c小鼠BMSCs, 并同时移植Balb/c小鼠的皮肤, 观察移植物的存活情况及体内免疫状态的变化。30只受体鼠随机分为4组, 具体如下。(1)空白对照组: 5只, 不进行任何处理, 用以反映受体小鼠移植之前的状态; (2)同基因移植组: 5只, 受体接受C57BL/6J小鼠皮片移植, 用以验证植皮手术是否成功; (3)对照组(异体移植): 10只, 受体接受Balb/c小鼠皮片移植, 不做其他处理; (4)BMSCs组(异体移植+BMSCs):

10只,受体经尾静脉输注Balb/c小鼠BMSCs输注,并接受Balb/c小鼠皮片移植。对照组和BMSCs组中5只小鼠用于移植物存活观察,5只小鼠用于淋巴结和脾免疫细胞比例测定。

1.3 BMSCs的培养与体外抑制T细胞增殖功能检测

1.3.1 骨髓间充质干细胞的分离培养 高浓度CO₂处死Balb/c小鼠,切取双侧股骨、胫骨和肱骨,剪去骨两端后暴露骨髓腔,1 mL注射器抽取预冷PBS,自骨端沿长轴刺入骨髓腔内,在培养皿中反复冲洗骨髓腔,将所得骨髓悬液用弯头吸管反复轻轻吹打,使其分散为细胞悬液,采用70 μm滤网过滤以去除较大沉渣,得到单细胞悬液,离心去上清后加入红细胞裂解液裂解红细胞,PBS洗涤2次,用含10%胎牛血清(fetal calf serum, FBS)和1%青链霉素的DMEM/F12培养基重悬,计数。将所获细胞以25×10⁶/mL的密度接种于25 cm²培养瓶中,置于37°C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,48 h后弃去上清液,加入等量培养基,以后每72 h换液1次,每次更换培养基时在倒置显微镜下观察细胞形态。待细胞长至90%融合时,用0.25%胰酶消化传代。留取3~6代细胞冻存于液氮备用。

1.3.2 骨髓间充质干细胞表面标志物的鉴定 取培养第3代的骨髓间充质干细胞进行表面标志物的鉴定,胰酶消化BMSCs,置于含有2% FBS的PBS缓冲液中(流式缓冲液)。将细胞分为实验组和同型对照组,实验组使用CD34-BV421、CD45-PerCP、CD105-APC、CD106-PE流式抗体进行染色,同型对照组使用相应的同型对照抗体进行染色,4°C孵育15~30 min,流式缓冲液洗涤2遍后使用A5SE流式细胞仪检测表面标志物表达。

1.3.3 小鼠CD4⁺CD62L⁺T细胞的分选 高浓度CO₂处死C57BL/6J小鼠,取脾置于含10% FBS和1%青链霉素的RPMI 1640培养基(分选缓冲液)中,研磨脾后采用70 μm滤网过滤,收集细胞悬液,加入红细胞裂解液3 mL,离心后用分选缓冲液洗涤2遍,加入CD4-PerCP、CD62L-APC流式抗体进行染色,4°C孵育15~30 min,分选缓冲液洗涤2遍后使用SRT流式细胞仪进行细胞分选,获得CD4⁺CD62L⁺T细胞。

1.3.4 T细胞增殖抑制实验 使用CD3和CD28抗体对96孔板进行预包被,每孔加入2×10⁵ CD4⁺CD62L⁺T作为效应细胞,使用MMC对

BMSCs进行预处理,防止BMSCs自身的增殖干扰实验结果。MMC处理BMSCs的方法:将MMC用无血清RPMI 1640配制成25 μg/mL的工作溶液,重悬BMSCs,37°C避光孵育30 min,用RPMI 1640完全培养基终止反应,终止反应后用RPMI 1640完全培养基洗涤BMSCs至少3遍,避免残留的MMC影响细胞增殖。MMC处理的效应细胞以相同方法进行处理。以效应细胞与MMC-BMSCs比例1:0、20:1、10:1、5:1分别加入MMC-BMSCs,同时设置空白对照组、阴性对照组和阳性对照组,具体分组方法见1.2节,37°C、5% CO₂培养4 d。4 d时在96孔板中加入10 μL CCK-8,置于细胞培养箱中孵育2 h,检测450 nm吸光值。

1.3.5 CTV细胞增殖试剂盒检测T细胞增殖 使用CTV试剂盒进一步验证BMSCs抑制T细胞增殖的作用。CD3和CD28包被、MMC处理BMSCs和效应细胞等方法与CCK-8实验相同,实验分组见1.2节。CTV染色效应细胞的方法:将CTV储存液重悬于无血清PBS,配制成5 μmol/L的CTV工作液,离心分选获得的CD4⁺CD62L⁺T细胞,PBS洗涤1遍,弃去上清,用CTV工作液重悬效应细胞,调整细胞浓度为3×10⁶/mL,37°C避光孵育20 min,加入不低于CTV工作液5倍体积的RPMI完全培养基,37°C终止反应5 min。37°C、5% CO₂培养4 d。4 d时收集细胞,使用A5SE流式细胞仪检测CTV荧光的表达,统计各组增殖细胞占比的差异。

1.4 BMSCs抑制小鼠异体皮片移植排斥反应

1.4.1 小鼠皮片移植模型的建立和受体的预处理 C57BL/6J小鼠固定后,自尾静脉输注备用的Balb/c小鼠骨髓间充质干细胞悬液,细胞悬液浓度为2.5×10⁶/mL,每日100 μL/只,连续注射4 d,共计细胞量约10⁶/只,4 d时注射细胞后行小鼠异体皮片移植手术,植皮当天记作d0。高浓度CO₂处死供体小鼠,沿鼠尾根部剪下小鼠鼠尾,用眼科剪剥离皮肤,将鼠尾皮肤完整剥离,剪成1 cm×1 cm皮片,浸泡在无菌0.9%氯化钠注射液中备用。小动物麻醉机麻醉C57BL/6J小鼠,使小鼠取右侧卧位,暴露左侧胸壁,脱毛,碘伏消毒术区,用记号笔标记出1 cm×1 cm区域,用眼科剪沿标记线剪开皮肤,剥离去除皮片,取出供体鼠皮片,6-0尼龙线缝合固定于受体鼠手术区域,创可贴环绕小鼠胸部包扎手术区域,同时外层加胶布固定。

1.4.2 观察皮片存活情况 术后第8天(即d8)拆开敷料,之后每日定时观察并记录小鼠一般状况以

及移植皮片的大小、质地、颜色、硬度，有无结痂、收缩、脱落和毛发生长情况等。若所移植皮片质地柔软、有毛发生长则判定为耐受或存活；若皮片30%变硬、有黑斑出现、色泽发暗则判定为出现排斥反应；若皮片质地变硬，干性坏死或溃烂，则判定皮片完全排斥。记录各组小鼠移植皮片完全排斥的时间。

1.4.3 受体小鼠淋巴结和脾调节性T细胞比例测定 皮片移植术后第8天(d8)取各组受体鼠引流淋巴结(drainage lymph node, DLN)、非引流淋巴结(non-draining lymph node, NDLN)和脾，每组5只。其中引流淋巴结为移植皮片侧的腋窝和腹股沟淋巴结，非引流淋巴结为对侧淋巴结。将取下的淋巴结和脾分别置于流式缓冲液中，研磨后采用70 μm 滤网过滤，收集细胞悬液，脾单细胞悬液需要进行红细胞裂解处理，加入CD4-FITC流式抗体进行染色，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min，流式缓冲液洗涤1遍。加入1 mL 1 \times Foxp3固定/破膜工作液，室温避光孵育30 min，加入2 mL 1 \times 破膜液洗涤2遍，重悬至100 μL 1 \times 破膜液，加入Foxp3-PE流式抗体，室温下避光孵育30 min，流式缓冲液洗涤2遍后使用A5SE流式细胞仪检测各组CD4 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ 调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)的比例。

1.5 统计学分析

采用GraphPad Prism软件对实验数据进行统计学处理，结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，根据实验设计采用 t 检验、AVONA检验及方差分析等统计学方法， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs体外培养及表面标志物鉴定

小鼠BMSCs接种于培养瓶后，首次换液可见少量贴壁细胞生长，约2周时细胞融合达90%，此时消化传代后细胞呈大小较均一的梭形，随传代次数增多，细胞出现形态变化，传至第8代左右细胞逐渐呈老化状态，因此本研究中采用第3~6代BMSCs进行功能验证。对第3代BMSCs进行流式分析显示，分离获得的BMSCs均质性较好，低表达CD34和CD45，高表达CD105和CD106(图1)。

2.2 T细胞增殖抑制实验

共设有7个组，分别为空白对照组、阴性对照组、阳性对照组、1:0组(未加入MMC-BMSCs)、20:1组、10:1组和5:1组，图2A为各组加入CCK-8试剂孵育2 h后450 nm吸光度值。加入

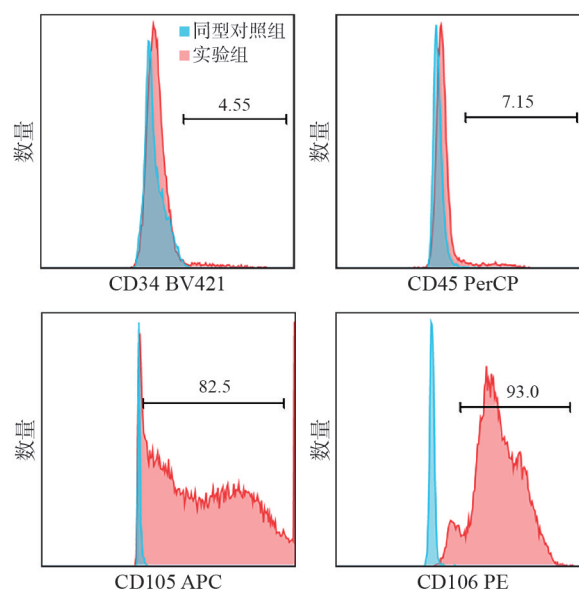


图1 骨髓间充质干细胞表面标志物表达情况

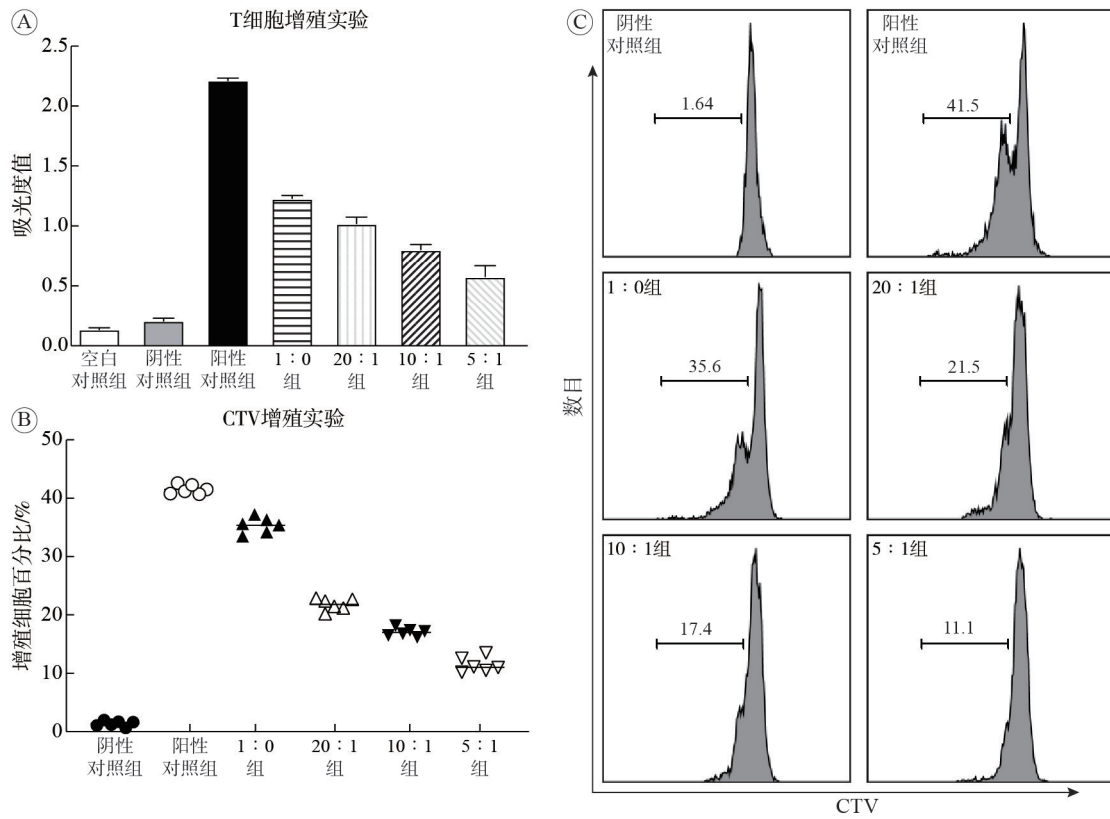
Fig. 1 Surface markers of BMSCs

ConA的阳性对照组增殖最为显著，吸光度值为 2.216 ± 0.017 ，未进行刺激的阴性对照组吸光度值为 0.209 ± 0.021 ，效应细胞与BMSCs比例为1:0、20:1、10:1、5:1组吸光度值分别为 1.229 ± 0.025 、 1.109 ± 0.054 、 0.801 ± 0.044 、 0.577 ± 0.091 。独立样本 t 检验比较1:0组与阴性对照组增殖水平，差异有统计学意义($P<0.001$)，证明效应细胞在CD3/28刺激下能够发生增殖。而20:1组、10:1组、5:1组随着加入的MMC-BMSCs细胞数量增多，T细胞增殖水平逐渐下降，通过方差分析比较各组增殖水平，差异有统计学意义($P<0.001$)。

图2B为CTV细胞增殖实验中各组增殖细胞百分比的统计图，图2C为CTV细胞增殖实验代表性的流式细胞图。CTV细胞增殖实验中，未加入BMSCs的1:0组，效应细胞增殖的比例为 $35.37\pm 1.352\%$ 。而20:1组、10:1组、5:1组的效应细胞增殖比例分别为 $21.82\%\pm 1.038\%$ 、 $17.05\%\pm 0.7148\%$ 、 $11.48\%\pm 1.289$ 。随着加入的BMSCs细胞数量增多，T细胞增殖水平逐渐下降，通过方差分析比较各组细胞增殖百分比，差异有统计学意义($P<0.001$)。上述结果表明BMSCs能够在体外有效抑制T细胞的增殖，且BMSCs比例越高，对T细胞增殖的抑制能力越强。

2.3 BMSCs延长同种异体皮片存活时长

各组小鼠皮肤移植存活时间见表1，各组小鼠移植皮片的照片见图3A，Kaplan-Meier生存曲线见图3B。同基因移植组中，将C57BL/6J小鼠的皮片移植于C57BL/6J小鼠，皮片均能存活超过



A: 各组加入CCK-8孵育2 h后450 nm处吸光度值; B: CTV细胞增殖实验中各组增殖细胞百分比; C: CTV细胞增殖实验流式图。

图2 骨髓间充质干细胞在体外抑制T细胞增殖

Fig. 2 In-vitro suppressive function of BMSCs on T cell proliferation of BMSCs

30 d, 提示本实验中的植皮手术是成功的, 移植的皮肤能够长期稳定存活。将Balb/c小鼠的全厚皮片移植于未做任何预处理的C57BL/6J小鼠, 在10.6 d时移植皮片发生了排斥坏死。在植皮术前预先给予BMSCs输注的小鼠, 移植皮片存活时间有所延长, 皮片平均存活时间为13.4 d。根据三组小鼠的存活时间绘制Kaplan-Meier生存曲线, 对生存曲线进行Log-rank检验, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 表明BMSCs输注能够有效延长异体皮片移植物的存活时间。

表1 各组小鼠皮肤移植存活时间比较(n=5)

Tab. 1 Survival time of skin grafts in different groups (n=5)

分组	存活时间/(d; $\bar{x} \pm s$)
同基因移植组	30,30,30,30,30;30 ± 0
对照组	11,11,10,11,10;10.6 ± 0.55
BMSCs组	13,12,14,15,13;13.4 ± 1.14

2.4 BMSCs使受体鼠移植术后淋巴结和脾中Treg比例升高

在植皮术后第8天, 对受体小鼠的引流淋巴结和非引流淋巴结进行取材, 检测淋巴结中

CD4⁺Foxp3⁺Treg细胞比例, 并与未植皮小鼠进行比较。各组小鼠淋巴结的流式细胞图见图4A, DLN代表引流淋巴结, NDLN代表非引流淋巴结, 空白对照组未进行植皮, 因此不区分DLN和NDLN。Foxp3⁺Treg占CD4⁺T细胞比例的统计图见图4A。接受异体皮片移植后, 受体鼠引流淋巴结和非引流淋巴结中Treg比例均升高, 其中BMSCs组Treg比例较对照组更高。对照组的DLN中Treg比例为19.47%±1.184%, BMSCs组的DLN中Treg比例为22.20%±1.729%, 独立样本t检验比较两组DLN的Treg比例, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组的NDLN中Treg比例为18.38%±2.364%, BMSCs组的NDLN中Treg比例为21.35%±1.630%, 独立样本t检验比较两组DLN的Treg比例, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组小鼠脾的流式细胞图以及脾中Foxp3⁺Treg占CD4⁺T细胞比例的统计图见图4B。接受异体皮片移植后, 受体鼠脾中的Treg比例升高, 且BMSCs组脾中Treg比例较对照组更高, 独立样本t检验比较两组的Treg比例, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

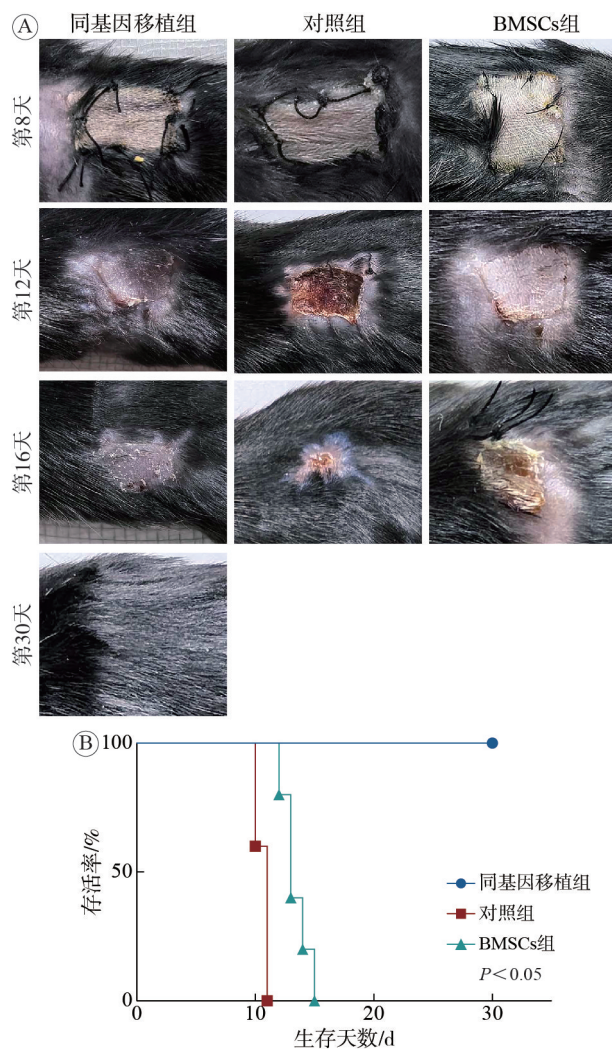


图3 小鼠皮肤移植照片(A)和Kaplan-Meier生存曲线(B)

Fig. 3 Photograph (A) and Kaplan-Meier survival curve (B) of skin grafts

3 讨论

随着大量新型免疫抑制剂的开发应用,器官移植进入了一个高速发展的阶段,但免疫抑制剂的不良反应仍是阻碍移植医学进一步发展的主要问题^[8]。救治大面积烧伤患者所面临的最主要问题就是自身皮源的匮乏,无法在早期封闭创面,与异种皮和生物敷料相比,异体皮片依然是更为理想的覆盖物^[9],延长异体皮片在受体的存活时间,能够为大面积烧伤患者争取宝贵的救治时机,减轻创面渗出、预防创面感染,进而提高患者救治成功率。间充质干细胞是干细胞治疗研究的热点^[10-11],其获取和体外扩增都相对容易,既往大量工作表明其具有免疫调节作用,近年来首款在国内获批上市的干细胞疗法采用的也是间充质干细胞,这些研究基础均提示间充质干细胞可用于延

长异体皮片移植物的存活。

本课题组在体外分离了供体鼠来源的骨髓间充质干细胞,尽管骨髓间充质干细胞在骨髓细胞中所占比例仅为0.001%~0.01%^[12],但由于干细胞具有极强的增殖能力,在培养3 d后BMSCs逐渐形成集落并开始扩增。在培养传代到第3代时,收集细胞对其进行流式细胞术检测,结果表明,分离扩增获得的细胞低表达白细胞分化抗原CD34和CD45,高表达间充质干细胞表面标志物CD105和CD106,与既往文献一致^[13],证实本研究分离出的细胞确为骨髓间充质干细胞。在进行动物实验验证前,我们对BMSCs在体外的功能进行了测定。由于CD4⁺T细胞为移植排斥反应中重要的效应细胞,因此本实验中分选出CD4和CD62L双阳性的naive CD4⁺T细胞作为效应细胞,验证BMSCs对效应细胞增殖的抑制作用。本实验中采用的ConA是一种植物凝集素,能够活化T细胞,实验结果表明ConA刺激的效应细胞增殖最明显,未加入BMSCs的效应细胞也有明显增殖,而以不同比例加入BMSCs后,效应细胞的增殖明显受到抑制,且加入的BMSCs数量越多,效应细胞的增殖越弱,表明BMSCs具有在体外抑制CD4⁺T细胞增殖的能力。

为了进一步检测BMSCs抑制移植排斥反应的能力,本课题组建立了C57BL/6J为受体的小鼠皮肤移植模型,将植皮小鼠分为自体皮片组、异体皮片组和BMSCs组。自体皮片组移植的小鼠皮片能够长期存活,证实了模型建造可靠,可用于异体皮片移植的研究。异体皮片移植组选用了Balb/c小鼠作为供体鼠,BMSCs组则是在接受异体皮片移植前预先输注了供体鼠来源的BMSCs,结果显示,BMSCs组小鼠异体皮片存活时间长于单纯异体皮片移植组,证实了BMSCs在体内也能够有效抑制移植排斥反应,与其在体外抑制CD4⁺T细胞增殖的结果相同。

为了进一步探索BMSCs抑制移植排斥反应的机制,课题组检测了移植受体小鼠淋巴结和脾中CD4⁺Foxp3⁺Treg的表达。调节性T细胞是一种重要的具有负性免疫调节作用的细胞,在维持自身免疫稳态中起到重要作用^[14],Treg比例的异常变化可能会导致自身免疫性疾病或肿瘤的发生。而Foxp3是Treg的特异性标志物,对Treg的发育和功能起到了重要作用^[15]。本研究中检测了各组受体鼠在术后8 d淋巴结和脾中Treg比例的变化,结果

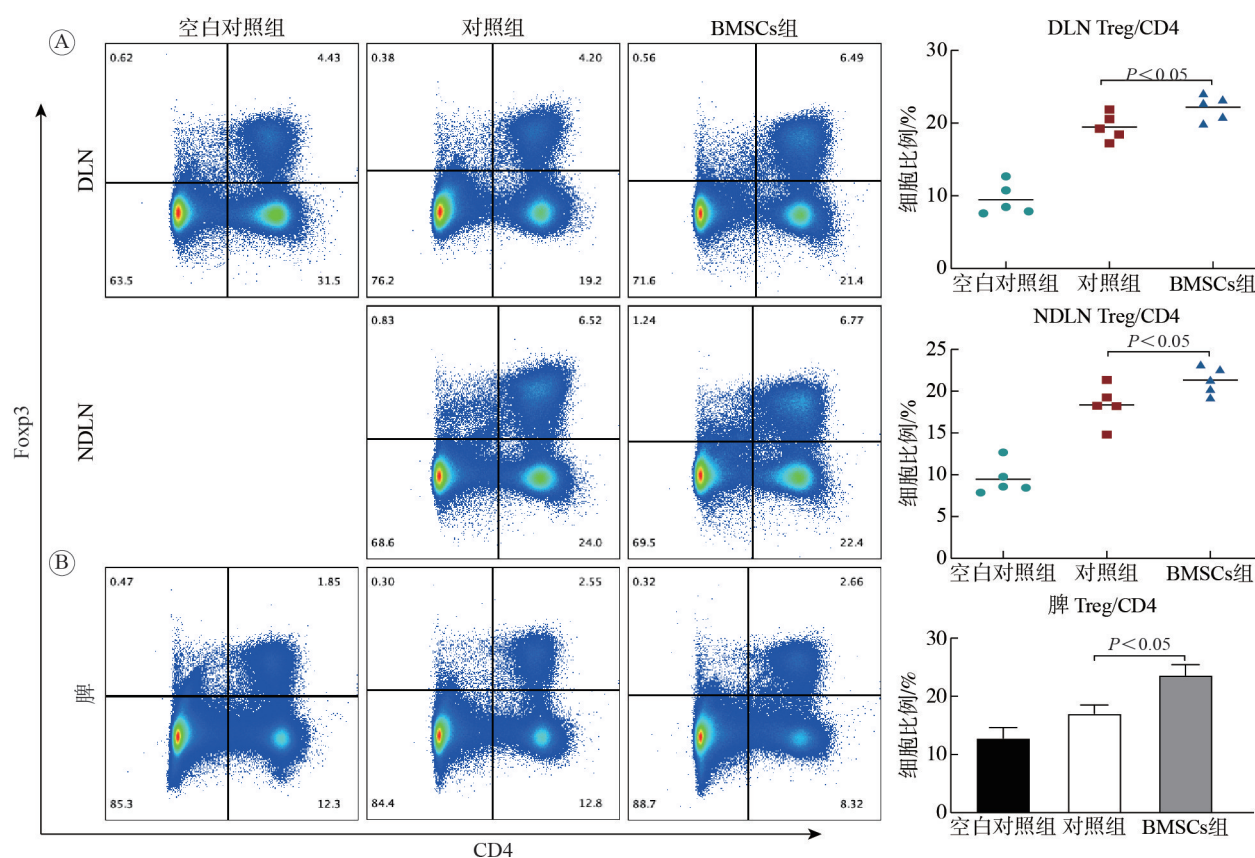


图4 移植受体鼠淋巴结(A)和脾(B)中Treg比例

Fig. 4 Treg proportion in DLN, NDLN (A) and spleen (B) of allograft recipient

表明, BMSCs组淋巴结和脾中Treg比例均高于单纯异体皮片移植组,提示BMSCs可能是通过升高Treg水平进而抑制受体鼠对异体皮片的排斥作用,而相关分子机制则需要进一步研究进行阐明。

近年来, BMSCs用于移植排斥反应的临床治疗已经在国内外展开了探索^[16-17]。2021年的一项研究纳入了经一线治疗未改善的肾移植患者^[17],给予了间充质干细胞静脉注射治疗,并在输注前和输注后6个月时进行了免疫细胞表面标志物的检测,结果表明,接受BMSCs治疗的患者并未表现出明显不良反应,提示了间充质干细胞用于临床治疗的安全性。另一项针对肝移植的研究表明,输注间充质干细胞治疗肝移植后移植排斥反应是可行的,在输注后24周的随访中未观察到不良反应,接受间充质干细胞治疗的患者在术后4周的肝组织病理学观察表明MSCs能够改善肝组织损伤,而对照组未发现明显改善^[16],提示MSCs能够有效减轻移植排斥反应引起的组织损伤。2019年意大利学者报道了使用自体BMSCs诱导肾移植免疫耐受的临床案例,患者在接受免疫抑制剂诱导和BMSCs治疗后,已成功停用免疫抑制药物,这一

研究证实了BMSCs能够调节移植受体免疫系统进而诱导免疫耐受,为BMSCs进一步在临床推广应用奠定了基础^[18]。这些研究结果均提示我们BMSCs用于大面积烧伤患者异体皮移植排斥治疗的可行性,由于大面积烧伤患者在伤后早期存在皮源匮乏的现实情况,异体皮多用于烧伤患者临时覆盖创面^[19],采用BMSCs延长异体皮存活时间可为患者争取宝贵的救治时机。烧伤患者在伤后早期主要通过中性粒细胞发挥抗炎抗感染作用^[20],而排斥反应中起重要作用的细胞主要是T细胞,尤其是CD4⁺T细胞, BMSCs抑制T细胞增殖的作用,对烧伤患者对创面定植细菌的免疫反应并无显著抑制作用。

此外,本研究中输注BMSCs并未成功诱导异体皮片的免疫耐受,移植的皮片在20 d内还是发生了排斥反应,分析可能有以下原因:(1)皮肤是一种免疫原性极强的组织,单纯通过细胞治疗可能无法成功建立免疫耐受;(2)既往采用BMSCs诱导移植免疫耐受的文献中,在输注BMSCs的同时也联合使用了免疫抑制剂^[21]。由于免疫抑制剂产生的不良反应对于烧伤患者的治疗会产生不利影

响,因此此种免疫耐受的诱导方法并不适合大面积烧伤患者。我们建议,在今后的研究中,可以通过基因编辑等方法增强BMSCs的免疫调节能力,为BMSCs最终应用于烧伤患者的临床治疗提供理论参考

作者贡献 徐成峰: 实验设计, 细胞和动物实验, 数据分析, 文章撰写; 迟云飞: 实验设计, 文章修改; 刘甜: 实验设计; 曲毅睿: 动物实验; 周惠: 细胞实验; 姚咏明: 参与实验设计、文章修改、基金支持。

利益冲突 本课题无商业机构相关利益关系, 不涉及作者配偶及未成年子女的利益关系, 无与论文存在利益关系的非财务性关系。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取, Email: fred_xucf@163.com。

参考文献

- O' Donohoe PK, Shelley O. Allograft use associated with better than predicted survival following burn injury [J]. *Burns*, 2023, 49 (8): 2020-2022.
- Wang CY, Zhang F, Lineaweaver WC. Clinical applications of allograft skin in burn care [J]. *Ann Plast Surg*, 2020, 84 (3S Suppl 2): S158-S160.
- Ke HQ, Zhang WJ, Xu WR, et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase-transfected bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote corneal allograft survival by inhibiting T cell proliferation: a rat study [J]. *Transpl Immunol*, 2024, 82: 101960.
- Chai M, Su G, Chen W, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes in central nervous system diseases [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61 (10): 7481-7499.
- Zhang XZ, Liu TH, Ran CX, et al. Immunoregulatory paracrine effect of mesenchymal stem cells and mechanism in the treatment of osteoarthritis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 12: 1411507.
- Shafeghat Z, Dorfaki M, Dehrouyeh S, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for managing graft-versus-host disease: an updated view [J]. *Transpl Immunol*, 2023, 81: 101957.
- Yang H, Cheong S, He YF, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy for autoimmune-related fibrotic skin diseases-systemic sclerosis and sclerodermatous graft-versus-host disease [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14 (1): 372.
- Szumilas K, Wilk A, Wiśniewski P, et al. Current status regarding immunosuppressive treatment in patients after renal transplantation [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (12): 10301.
- Aleman Paredes K, Selaya Rojas JC, Flores Valdés JR, et al. A comparative analysis of the outcomes of various graft types in burn reconstruction over the past 24 years: a systematic review [J]. *Cureus*, 2024, 16 (2): e54277.
- Najar M, Melki R, Khalife F, et al. Therapeutic mesenchymal stem/stromal cells: value, challenges and optimization [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 9: 716853.
- Podestà MA, Remuzzi G, Casiraghi F. Mesenchymal stromal cell therapy in solid organ transplantation [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 618243.
- Yang H, Chen JX, Li J. Isolation, culture, and delivery considerations for the use of mesenchymal stem cells in potential therapies for acute liver failure [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1243220.
- Liu F, Wang XM, Xu J, et al. Preliminary study on the mechanism by which exosomes derived from human exfoliated deciduous teeth improve the proliferation and osteogenic inhibitory effect of glucocorticoid-induced BMSCs [J]. *Gene*, 2024, 923: 148575.
- Malviya V, Yshii L, Junius S, et al. Regulatory T-cell stability and functional plasticity in health and disease [J]. *Immunol Cell Biol*, 2023, 101 (2): 112-129.
- Weijler AM, Wekerle T. Combining Treg therapy with donor bone marrow transplantation: experimental progress and clinical perspective [J]. *Transplantation*, 2024, 108 (5): 1100-1108.
- Shi M, Liu ZW, Wang Y, et al. A pilot study of mesenchymal stem cell therapy for acute liver allograft rejection [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6 (12): 2053-2061.
- Ban TH, Lee SA, Kim HD, et al. Clinical trial of allogeneic mesenchymal stem cell therapy for chronic active antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients unresponsive to rituximab and intravenous immunoglobulin [J/OL]. <https://doi.org/10.1155/2021/6672644>.
- Casiraghi F, Perico N, Gotti E, et al. Kidney transplant tolerance associated with remote autologous mesenchymal stromal cell administration [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9 (4): 427-432.
- Haug V, Tapking C, Panayi AC, et al. Outcome comparison of the most commonly employed wound coverage techniques in patients with massive burns $\geq 50\%$ TBSA - A systematic review and meta-analysis [J]. *Burns*, 2024, 50 (9): 107210.
- Laggner M, Lingitz MT, Copic D, et al. Severity of thermal burn injury is associated with systemic neutrophil activation [J]. *Sci Rep*, 2022, 12 (1): 1654.
- Wang ZG, Xu HE, Cheng FM, et al. Donor BMSC-derived small extracellular vesicles relieve acute rejection post-renal allograft through transmitting Loc108349490 to dendritic cells [J]. *Aging Cell*, 2021, 20 (10): e13461.

(责任编辑: 潘越, 施晓亚)