

## ·论著·

# 脑源性神经营养因子增强间充质干细胞抑制滤泡辅助性T细胞的作用

杨赛男 蒲欣 向莎丽 陈洁平 裴莉

**【摘要】目的** 探讨脑源性神经营养因子(BDNF)增强间充质干细胞(MSC)抑制滤泡辅助性T细胞(Tfh细胞)的作用及机制。**方法** ELISA法检测MSC培养上清中吲哚胺2,3-二加氧酶(IDO)、IL-10、TGF-β和IL-21的含量;采集健康志愿者的外周血标本,采用人淋巴细胞分离液分离外周血中的淋巴细胞;采用Transwell小室进行MSC和淋巴细胞共培养,流式细胞术检测CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Tfh细胞及其亚群的比例。**结果** ①BDNF组(BDNF刺激的MSC)培养上清IL-10、TGF-β、IDO浓度均高于对照组(加入等体积磷酸盐缓冲液)[IL-10:(42.1±4.4)ng/ml对(19.3±2.1)ng/ml,  $t = 4.761, P = 0.009$ ; TGF-β:(13.9±1.7)ng/ml对(5.3±0.6)ng/ml,  $t = 5.129, P = 0.008$ ; IDO:(441.3±56.9)ng/ml对(226.7±37.6)ng/ml,  $t = 3.130, P = 0.035$ ];②BDNF组(淋巴细胞与BDNF刺激的MSC共培养)与MSC组(淋巴细胞与MSC共培养)比较:CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Tfh细胞比例降低[(3.37±0.21)%对(6.51±0.27)%,  $t = 9.353, P < 0.001$ ], CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>Tfh1细胞比例升高[(41.14±2.04)%对(26.72±2.57)%,  $t = 4.383, P = 0.012$ ], CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>Tfh2细胞和CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>Tfh17细胞比例降低[Tfh2:(30.16±5.38)%对(43.26±4.11)%,  $t = 4.426, P = 0.012$ ; Tfh17:(15.61±1.52)%对(22.32±0.72)%,  $t = 4.202, P = 0.014$ ], CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tfr细胞比例升高[(4.95±0.22)%对(2.32±0.16)%,  $t = 10.241, P < 0.001$ ],淋巴细胞培养上清中IL-21浓度降低[(0.28±0.03)ng/ml对(0.85±0.08)ng/ml,  $t = 6.675, P = 0.003$ ]。**结论** BDNF能够增强MSC抑制Tfh细胞的作用,机制是抑制淋巴细胞中Tfh细胞比例升高及其向Tfh2和Tfh17亚群的分化。

**【关键词】** 脑源性神经营养因子; 间充质干细胞; T淋巴细胞亚群

**Brain derived neurotrophic factor enhances the role of mesenchymal stem cells in inhibiting follicular helper T cells** Yang Sainan, Pu Xin, Xiang Shali, Chen Jieping, Pei Li. Department of Hematology, Southwest Hospital, Army Medical University, Chongqing 400038, China  
Corresponding author: Pei Li, Email: 1607283686@qq.com

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of brain derived neurotrophic factor (BDNF) on mesenchymal stem cells (MSC) inhibiting follicular helper T cells (Tfh cells). **Methods** The contents of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), IL-10, TGF-β and IL-21 in MSC culture supernatant were detected by ELISA; The peripheral blood of healthy volunteers were collected, and lymphocyte in peripheral blood was separated by human lymphocyte separation solution; Co-cultures of MSC and lymphocyte were performed by Transwell chamber, and the proportion of CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Tfh cells and their subtypes were detected by flow cytometry. **Results** ①The concentrations of IL-10, TGF-β, and IDO in the supernatant of BDNF group (BDNF-stimulated MSC) were higher than those of the control ones (adding PBS with the same volume) [IL-10: (42.1±4.4) ng/ml vs (19.3±2.1) ng/ml,  $t = 4.761, P = 0.009$ ; TGF-β: (13.9±1.7) ng/ml vs (5.3±0.6) ng/ml,  $t = 5.129, P = 0.008$ ; IDO: (441.3±56.9) ng/ml vs (226.7±37.6) ng/ml,  $t = 3.130, P = 0.035$ ]; ②The comparisons between BDNF (co-culture of lymphocyte and BDNF-stimulated MSC) and MSC groups (co-culture of lymphocyte and MSC) were detailed as follows: the proportion of CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Tfh cells were lower [(3.37±0.21)% vs (6.51±0.27)% ,  $t = 9.353, P < 0.001$ ], the proportion of CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>Tfh cells were higher [(41.14±2.04)% vs (26.72±2.57)% ,  $t = 4.383, P = 0.012$ ], CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>Tfh2 cells and CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>Tfh17 cells were lower [Tfh2:(30.16±5.38)% vs (43.26±4.11)% ,  $t = 4.426, P = 0.012$ ; Tfh17:(15.61±1.52)% vs (22.32±0.72)% ,  $t = 4.202,$

$P = 0.014$ ], the proportion of CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tfr cells were higher [(4.95±0.22)% vs (2.32±0.16)%],  $t = 10.241$ ,  $P < 0.001$ ], the concentration of IL-21 in the lymphocyte supernatant was lower [(0.28±0.03) ng/ml vs (0.85±0.08) ng/ml,  $t = 6.675$ ,  $P = 0.003$ ]. **Conclusion** BDNF could enhance the inhibitory effect of MSC on Tfh cells through inhibiting the increasing of Tfh cells and the differentiations of Tfh2 and Tfh17 cells.

**[Key words]** Brain derived neurotrophic factor; Mesenchymal stem cell; T-lymphocyte subset

移植植物抗宿主病(GVHD)是异基因造血干细胞移植后主要的并发症和死亡原因,近几年的研究发现B细胞免疫在GVHD特别是慢性GVHD中发挥着关键性的作用,移植前使用利妥昔单抗去除B淋巴细胞后,可以有效降低GVHD的发生率、严重程度和病死率<sup>[1]</sup>。间充质干细胞(MSC)是治疗慢性GVHD的有效手段,然而其机制目前还不明确<sup>[2-3]</sup>。滤泡辅助性T细胞(Tfh细胞)在B细胞分化和增殖中发挥着关键作用,能通过分泌白细胞介素-21(IL-21)辅助B细胞分化形成浆细胞。研究发现MSC能通过分泌吲哚胺2,3-二加氧酶(IDO)抑制Tfh细胞的分化<sup>[4-5]</sup>。然而,MSC诱导免疫耐受的作用十分微弱,需要提前在体外大量扩增,才能达到诱导免疫耐受的作用。因此,增强MSC抑制Tfh细胞的作用对于GVHD的治疗具有十分重要的意义。脑源性神经营养因子(BDNF)是一种维持中枢和周围神经元生存及正常生理功能所必需的分子,还具有细胞保护和促血管新生功能,用于MSC的移植治疗具有很好的效果<sup>[6-7]</sup>。本研究我们探讨BDNF增强MSC诱导免疫耐受的作用。

## 材料与方法

1. 主要试剂:人骨髓MSC购于广州赛业生物科技有限公司;DMEM/F12培养基、RPMI 1640培养基、0.25%胰酶和胎牛血清购于美国Hyclone公司;BDNF购于美国RD生物公司;IDO、IL-10、IL-21和TGF-β的ELISA试剂盒购于欣博盛生物科技有限公司;流式细胞仪和CD4、CXCR5、Foxp3、CXCR3、CCR6抗体购于美国BD公司。

2. 细胞培养:人骨髓MSC采用含有10%胎牛血清的DMEM/F12培养基进行培养,取处于对数生长期的第三代或第四代MSC细胞进行实验。待细胞铺满70%后,用0.25%胰酶消化,按照实验分组平均接种到培养孔内。采集健康志愿者的外周血,采用人淋巴细胞分离液分离外周血中的淋巴细胞,将其置于含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中进行培养。

3. ELISA法检测BDNF对MSC分泌IDO、

IL-10和TGF-β的影响:MSC分为对照组(培养基中加入相同体积PBS)和BDNF组(培养基中加入终浓度100 ng/ml BDNF),刺激24 h后,弃上清。加入新鲜培养基后继续培养48 h,收集上清。ELISA法检测上清中的IDO、IL-10和TGF-β的含量。

4. 流式细胞术检测各组淋巴细胞中Tfh细胞及其亚群比例:采用Transwell小室进行MSC和淋巴细胞共培养,将MSC置于下室,淋巴细胞置于上室,实验分为对照组(单纯的淋巴细胞)、MSC组(淋巴细胞与MSC共培养)和BDNF组(淋巴细胞与BDNF刺激的MSC共培养)。BDNF刺激24 h后,弃上清,PBS清洗3次后在Transwell小室上室加入淋巴细胞,继续培养48 h。收集淋巴细胞,用PBS清洗3次,分成两组,一组加入CD4、CXCR5和Foxp3抗体,另一组加入CD4、CXCR5、CXCR3和CCR6抗体,室温孵育20 min后离心,弃上清,PBS清洗3次后,上机检测Tfh细胞及其亚群的比例。参照文献[8-9],将CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>细胞定义为Tfh细胞,CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>细胞定义为Tfh1细胞,CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>细胞定义为Tfh2细胞,CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>细胞定义为Tfh17细胞,CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>细胞定义为Tfr细胞。

5. ELISA法检测各组淋巴细胞分泌IL-21的变化:MSC与淋巴细胞共培养后,去除MSC、PBS清洗3次后,淋巴细胞继续培养48 h,之后收集上清,ELISA法检测上清中IL-21的含量。

6. 统计学处理:实验重复3次,实验数据用均数±标准误( $\bar{x} \pm SE$ )表示,使用SPSS 15.0进行数据分析,采用Student *t*检验进行组间比较,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. ELISA法检测BDNF对MSC分泌IDO、IL-10和TGF-β的影响:BDNF组培养上清IL-10、TGF-β、IDO浓度均高于对照组( $P < 0.05$ )(表1),提示BDNF能够促进MSC分泌IL-10、TGF-β和IDO。

2. 流式细胞术检测各组Tfh细胞比例:MSC组(淋巴细胞与MSC共培养)Tfh细胞比例低于对照组

**表1** ELISA法检测BDNF对MSC分泌IL-10、TGF-β和IDO的影响(ng/ml,  $\bar{x} \pm SE$ )

组别	IL-10	TGF-β	IDO
对照组	19.3±2.1	5.3±0.6	226.7±37.6
BDNF组	42.1±4.4	13.9±1.7	441.3±56.9
t值	4.761	5.129	3.130
P值	0.009	0.008	0.035

注: BDNF: 脑源性神经营养因子; MSC: 间充质干细胞; IDO: 吲哚胺2,3-二加氧酶。对照组: 培养基中加入等体积PBS; BDNF组: MSC培养基中加入终浓度100 ng/ml BDNF。实验重复3次

(单纯的淋巴细胞)[(6.51±0.27)%对(9.03±0.98)%,  $t=2.962, P=0.042$ ]。BDNF组(淋巴细胞与BDNF刺激的MSC共培养)Tfh细胞比例低于MSC组[(3.37±0.21)%对(6.51±0.27)%,  $t=9.353, P<0.001$ ] (图1)。上述结果说明MSC能够抑制Tfh细胞的分化, BDNF能够进一步增强MSC抑制Tfh细胞分化的作用。

3. 流式细胞术检测各组Tfh1、Tfh2、Tfh17细胞比例: MSC组Tfh细胞中Tfh1细胞比例高于对照组[(26.72±2.57)%对(16.63±1.15)%,  $t=3.597, P=0.023$ ], Tfh2细胞低于对照组[(43.26±4.11)%对(52.72±5.63)%,  $t=2.990, P=0.040$ ]。Tfh17细胞在MSC和对照组间差异无统计学意义[(22.32±0.72)%对(23.81±0.52)%,  $t=2.189, P=0.094$ ]。BDNF组Tfh细胞中Tfh1细胞比例高于MSC组[(41.14±2.04)%对(26.72±2.57)%,  $t=4.383, P=0.012$ ],而Tfh2细胞和Tfh17细胞均低于MSC组[Tfh2:(30.16±5.38)%对(43.26±4.11)%,  $t=4.426, P=0.012$ ; Tfh17:(15.61±1.52)%对(22.32±0.72)%,  $t=4.202, P=0.014$ ]。见表2。上述结果表明BDNF能够显著增强MSC抑制Tfh细胞向Tfh17和Tfh2亚型分化。

4. 流式细胞术检测各组Tfr细胞比例: MSC组淋巴细胞中Tfr细胞比例高于对照组[(2.32±0.16)%

对(0.95±0.09)%,  $t=7.581, P=0.002$ ], BDNF组Tfr细胞的比例高于MSC组[(4.95±0.22)%对(2.32±0.16)%,  $t=10.241, P<0.001$ ] (图2), 表明BDNF能够显著增强MSC诱导Tfr细胞分化的作用。

**表2** 流式细胞术检测各组Tfh1、Tfh2、Tfh17细胞比例(% ,  $\bar{x} \pm SE$ )

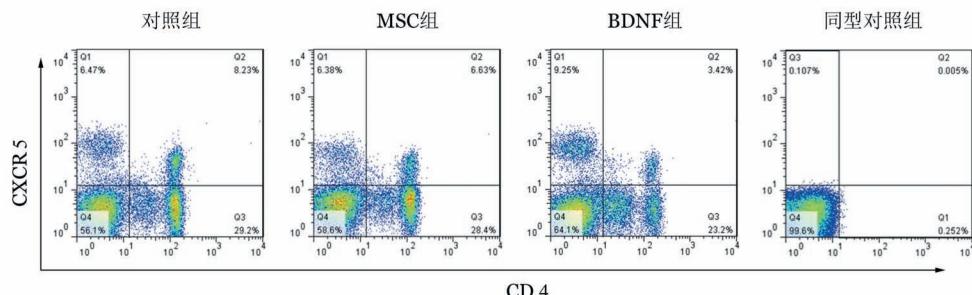
组别	Tfh1细胞	Tfh2细胞	Tfh17细胞
对照组	16.63±1.15	52.72±5.63	23.81±0.52
MSC组	26.72±2.57 <sup>a</sup>	43.26±4.11 <sup>a</sup>	22.32±0.72
BDNF组	41.14±2.04 <sup>b</sup>	30.16±5.38 <sup>b</sup>	15.61±1.52 <sup>b</sup>

注: BDNF: 脑源性神经营养因子; MSC: 间充质干细胞。Tfh细胞: 滤泡辅助性T细胞。对照组: 淋巴细胞单独培养; MSC组: 淋巴细胞与MSC共培养; BDNF组: 淋巴细胞与BDNF刺激的MSC共培养。与对照组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与MSC组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ 。实验重复3次

5. ELISA法检测各组淋巴细胞IL-21水平: MSC组淋巴细胞培养上清中IL-21含量低于对照组[(0.85±0.08)ng/ml对(2.16±0.13)ng/ml,  $t=8.386, P=0.001$ ], BDNF组淋巴细胞上清中IL-21含量低于MSC组[(0.28±0.03)ng/ml对(0.85±0.08)ng/ml,  $t=6.675, P=0.003$ ], 提示BDNF能够显著增强MSC抑制淋巴细胞分泌IL-21。

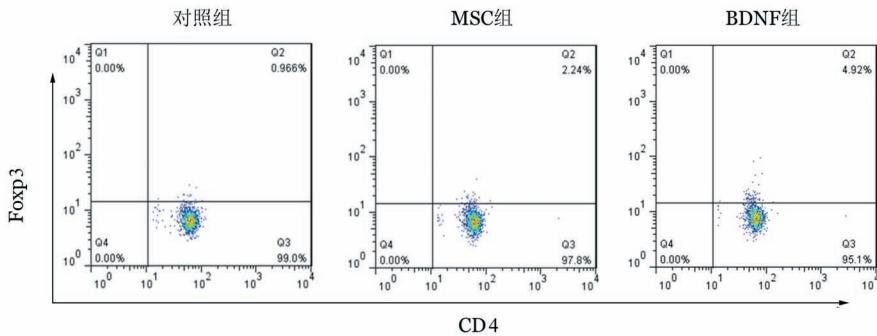
## 讨 论

慢性GVHD是影响异基因造血干细胞移植患者生存和生活质量的一个重要危险因素。B细胞在慢性GVHD特别是重度难治性GVHD中发挥着重要作用, 然而目前临床常用的免疫抑制剂对B细胞免疫排斥抑制效果并不是十分显著<sup>[10]</sup>。Tfh细胞在B细胞免疫中发挥着关键性的作用, 近期有研究者发现MSC能够通过抑制Tfh细胞的分化, 抑制B细胞免疫对机体的损伤<sup>[11]</sup>。BDNF是一种神经营养分子, 我们的研究发现其除了能调控神经生长, 还能通过促进MSC分泌IDO、IL-10和TGF-β, 显著抑制



对照组: 淋巴细胞单独培养; 间充质干细胞(MSC)组: 淋巴细胞与MSC共培养; 脑源性神经营养因子(BDNF)组: 淋巴细胞与BDNF刺激的MSC共培养

**图1** 流式细胞术检测各组淋巴细胞中滤泡辅助性T细胞比例



对照组:淋巴细胞单独培养;MSC组:淋巴细胞与MSC共培养;BDNF组:淋巴细胞与BDNF刺激的MSC共培养

图2 流式细胞术检测脑源性神经营养因子(BDNF)对间充质干细胞(MSC)诱导来源于调节性T细胞的滤泡辅助性T细胞(Tfr)分化的影响

Tfh细胞的分化。因此BDNF可能是MSC治疗慢性GVHD的一个潜在靶点。

Tfh细胞在B细胞分化和增殖中发挥着关键作用。Tfh细胞可进一步分为Th1来源的Tfh细胞(Tfh1细胞)、Th2来源的Tfh细胞(Tfh2细胞)和Th17来源的Tfh细胞(Tfh17细胞),其中仅有Tfh2细胞和Tfh17细胞能够分泌IL-21,发挥辅助B细胞分化为浆细胞功能<sup>[8-9]</sup>。此外机体内还存在一种调节性T细胞(Treg细胞)来源的Tfh细胞(Tfr细胞),具有抑制B细胞增殖和分化等功能<sup>[11-12]</sup>。本研究我们首次发现MSC能够促进Tfh1细胞和Tfr细胞比例上调,而能够产生IL-21的Tfh2细胞和Tfh17细胞的比例下调,这说明MSC除了能够抑制Tfh细胞增殖外,还能诱导Tfh细胞向不产生IL-21的亚群分化。BDNF能够进一步增强MSC抑制Tfh细胞分化的能力,一方面进一步抑制淋巴细胞中Tfh细胞比例的升高,另一方面进一步抑制Tfh细胞中产生IL-21的亚群的分化。

综上,本研究我们发现BDNF能够增强MSC抑制Tfh细胞的作用,机制是抑制淋巴细胞中Tfh细胞分化和促进Tfh细胞中Tfh1和Tfr细胞亚群比例的升高。

#### 参 考 文 献

- [1] Rezvani K, Champlin RE. Epstein-Barr virus and B cells in the pathogenesis of graft- versus- host disease after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(19):2201-2202. DOI: 10.1200/JCO.2016.66.6099.
- [2] Weng JY, Du X, Geng SX, et al. Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2010, 45 (12):1732- 1740. DOI: 10.1038/bmt.2010.195.
- [3] Li H, Jiang Y, Jiang X, et al. CCR7 guides migration of mesenchymal stem cell to secondary lymphoid organs: a novel approach to separate GvHD from GvL effect [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(7):1890-1903. DOI: 10.1002/stem.1656.
- [4] Liu R, Su D, Zhou M, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of circulating T follicular helper cells in patients with primary Sjögren's syndrome through the secretion of indoleamine 2,3- dioxygenase [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2015, 54 (2):332-342. DOI: 10.1093/rheumatology/keu316.
- [5] Guan J, Zhang ZY, Zhou ZQ, et al. Mesenchymal stem cell modulates T follicular helper cell to induce immunotolerance of islet allograft [J]. *Transplant Proc*, 2015, 47 (6):2050- 2056. DOI: 10.1016/j.transproceed.2015.05.030.
- [6] Martins LF, Costa RO, Pedro JR, et al. Mesenchymal stem cells secretome-induced axonal outgrowth is mediated by BDNF[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):4153. DOI: 10.1038/s41598-017-03592-1.
- [7] Zhou L, Lin Q, Wang P, et al. Enhanced neuroprotective efficacy of bone marrow mesenchymal stem cells co-overexpressing BDNF and VEGF in a rat model of cardiac arrest-induced global cerebral ischemia [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8 (5):e2774. DOI: 10.1038/cddis.2017.184.
- [8] Che Y, Qiu J, Jin T, et al. Circulating memory T follicular helper subsets, Tfh2 and Tfh17, participate in the pathogenesis of Guillain- Barré syndrome [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:20963. DOI: 10.1038/srep20963.
- [9] Kim CH, Hashimoto-Hill S, Kang SG. Human Tfh and Tfr cells: identification and assessment of their migration potential [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1291:175- 186. DOI: 10.1007/978-1-4939-2498-1\_15.
- [10] Srinivasan M, Flynn R, Price A, et al. Donor B-cell alloantibody deposition and germinal center formation are required for the development of murine chronic GVHD and bronchiolitis obliterans [J]. *Blood*, 2012, 119 (6):1570- 1580. DOI: 10.1182/blood-2011-07-364414.
- [11] Sun Y, Kong W, Huang S, et al. Comparable therapeutic potential of umbilical cord mesenchymal stem cells in collagen-induced arthritis to TNF inhibitor or anti-CD20 treatment [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2017, 35(2):288-295.
- [12] Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, et al. Human blood CXCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion [J]. *Immunity*, 2011, 34 (1):108-121. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.12.012.

(收稿日期:2017-08-10)

(本文编辑:徐茂强)