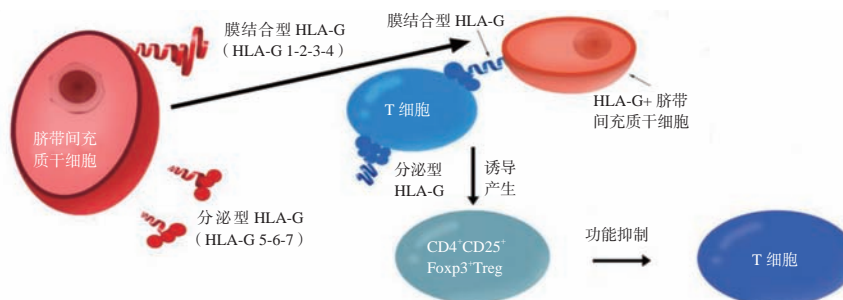


· 实验研究 ·

# 人类白细胞抗原-G阳性的脐带间充质干细胞体外诱导调节性T细胞的实验研究

白剑 肖漓 苗兰英 林大勇 刘鸿 高钰 陈文 毕丽丽 孔祥瑞 黄海燕 石炳毅

## 结构式摘要



**【摘要】** 目的 探讨人类白细胞抗原(HLA)-G阳性的脐带间充质干细胞在体外诱导调节性T细胞(Treg)产生的效果。方法 从新生儿脐带中分离脐带间充质干细胞,采用脂质体转染的方式将PEGFP-N1-HLA-G质粒转染到脐带间充质干细胞中,设为PEGFP-N1-HLA-G组;转染空载体PEGFP-N1质粒的脐带间充质干细胞设为PEGFP-N1组;相同条件下,未加入空载体的脐带间充质干细胞设为空白对照组。采用流式细胞仪检测脐带间充质干细胞标志物;采用蛋白质免疫印迹法鉴定各组细胞HLA-G蛋白的表达;各组细胞与健康人外周血中CD4<sup>+</sup>T细胞混合培养24h和48h后,采用流式细胞仪检测CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg占全部T细胞的比例。结果 脐带间充质干细胞CD45、CD34和HLA-DR呈阴性表达,CD29、CD44和CD105呈阳性表达;PEGFP-N1-HLA-G组可以表达HLA-G蛋白,与空白对照组和PEGFP-N1组比较差异均有统计学意义(均为 $P<0.01$ )。PEGFP-N1-HLA-G组细胞在与CD4<sup>+</sup>T细胞混合培养24h后,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg占全部T细胞的(15.3±1.9)%,在培养48h后,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg占全部T细胞的(14.3±2.1)%,与空白对照组和PEGFP-N1组比较,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$ )。结论 HLA-G基因修饰后脐带间充质干细胞能够有效地在体外诱导CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg的产生。

**【关键词】** 人类白细胞抗原(HLA)-G;脐带间充质干细胞;T细胞;调节性T细胞(Treg);转染;修饰;免疫排斥;免疫耐受;CD4<sup>+</sup>T细胞

**【中图分类号】** R392.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445(2018)02-0002-06

**Experimental study on the *in vitro* induction of regulatory T cells by umbilical cord mesenchymal stem cells with positive human leukocyte antigen-G** Bai Jian\*, Xiao Li, Miao Lanying, Lin Dayong, Liu Hong, Gao Yu, Chen Wen, Bi Lili, Kong Xiangrui, Huang Haiyan, Shi Bingyi. \*Basic Research Laboratory of Organ Transplant Institute, the 309<sup>th</sup> Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing Key Laboratory of Organ Transplantation and Immunology Regulatory, Beijing 100091, China

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2018.02.002

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81571555); 辽宁省自然科学基金(2015020714)

作者单位: 100091 北京, 解放军第309医院全军器官移植研究所移植研究室 北京市器官移植与免疫调节重点实验室(白剑、肖漓、高钰、陈文、毕丽丽、孔祥瑞、黄海燕、石炳毅); 辽宁中医药大学(白剑、肖漓、苗兰英、林大勇、刘鸿)

作者简介: 白剑, 男, 1979年生, 博士, 助理研究员, 研究方向为免疫调节、免疫耐受, Email: baijian988@hotmail.com

通讯作者: 石炳毅, 男, 1953年生, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为器官移植, Email: shibingyi@medmail.com.cn

Corresponding author: Shi Bingyi, Email: shibingyi@medmail.com.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of umbilical cord mesenchymal stem cells with positive human leukocyte antigen (HLA)-G on inducing the production of regulatory T cells (Treg) *in vitro*. **Methods** Umbilical cord mesenchymal stem cells were isolated from umbilical cord of neonates. PEGFP-N1-HLA-G plasmid was transfected into the human umbilical cord mesenchymal stem cells by liposome transfection, as PEGFP-N1-HLA-G group. PEGFP-N1 empty vector plasmid was transfected into the human umbilical cord mesenchymal stem cells, as PEGFP-N1 group. The human umbilical cord mesenchymal stem cells without empty vector under the same conditions were set as blank control group. Markers of the umbilical cord mesenchymal stem cells were detected using flow cytometry. The expression of HLA-G protein in each group of cells was identified by Western Blot. After mixed-culturing with CD4<sup>+</sup>T cells in peripheral blood of healthy subjects for 24 h and 48 h, the proportion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>Treg in total T cells of each group was detected by flow cytometry. **Results** CD45, CD34 and HLA-DR presented negative expression on umbilical cord mesenchymal stem cells, while CD29, CD44 and CD105 presented positive expression. HLA-G protein could be expressed in the PEGFP-N1-HLA-G group, which had statistically significant difference compared with the blank control group and PEGFP-N1 group (both  $P < 0.01$ ). After PEGFP-N1-HLA-G group and CD4<sup>+</sup>T cells were mixed-cultured for 24 h and 48 h, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>Treg accounted for (15.3 ± 1.9)% and (14.3 ± 2.1)% of the total T cells respectively, both of which presented statistically significant difference compared with the blank control group and PEGFP-N1 group (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Umbilical cord mesenchymal stem cells with HLA-G gene modified can effectively induce the production of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>Treg *in vitro*.

**【Key words】** Human leukocyte antigen (HLA)-G; Umbilical cord mesenchymal stem cells; T cells; Regulatory T cell (Treg); Transfection; Modification; Immunologic rejection; Immunologic tolerance; CD4<sup>+</sup>T cells

器官移植是治疗器官功能衰竭的有效手段之一，但是排斥反应是制约移植器官长期存活的重要障碍。随着免疫抑制剂的不断发展，移植物在受体体内的存活时间已经明显延长，但如何诱导移植器官产生免疫耐受、调节器官移植受体的免疫状态，从而有效地延长移植物的存活时间，一直是移植工作者研究的重要课题。有研究显示，器官移植受体体内的调节性 T 细胞 (Treg) 有利于移植物在受体体内产生免疫耐受，预示着受体术后恢复良好，这对延长移植物的存活时间、减少排斥反应发生率有着重要意义<sup>[1-3]</sup>。

间充质干细胞是成体干细胞的一种，具有自我更新和多向分化的潜能，由于其具有低免疫原性、来源广泛和免疫抑制的特点，目前已经应用于临床治疗和预防移植抗宿主病。间充质干细胞对机体免疫功能调节虽然十分明确，但是作用效果不强，因此许多研究通过转染细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4, CTLA4)、吲哚胺 2,3-双加氧酶 (indolamine 2,3-dioxygenase, IDO) 和白细胞介素 (IL) -10 等基因来增强间充质干细胞的免疫抑制功能<sup>[4-6]</sup>。人类白细胞抗原 (HLA) - G 属于非经典的 HLA I 类分子，在孕妇体内表达较高，其主要功能是诱导母婴耐受，

具有明确的免疫抑制作用。有研究显示 HLA-G 可以诱导 Treg 的产生，并且促进体内的效应细胞分泌 IL-10 诱导免疫耐受的形<sup>[7]</sup>。因此，本研究在此基础上将脐带间充质干细胞外源地转染 HLA-G 基因，通过将 HLA-G 阳性的脐带间充质干细胞与 T 细胞混合体外培养，检测 HLA-G 阳性的脐带间充质干细胞对 T 细胞的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

RPMI1640 培养基、DMEM/DF12 培养基和磷酸盐缓冲液 (PBS) 均购自美国 Gibco 公司；胎牛血清购自杭州四季青公司；Percoll 分离液购自美国 GE 公司；多甲藻黄素 - 叶绿素 - 蛋白质复合物 (peridinin-chlorophyll-protein complex, PerCP) 标记的 CD45 (CD45-PerCP)、CD34-藻红蛋白 (PE) 标记的 CD34 (CD34-PE)、异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的 HLA-DR (HLA-DR-FITC)、CD29-PE、CD44-FITC、别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 标记的 CD105 (CD105-APC)、CD4-FITC、CD25-PE、Foxp3-APC 购自美国 BD 公司；PEGFP-N1-HLA-G

全基因合成质粒购自北京奥科鼎盛生物科技有限公司; 转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司; HLA-G 特异性单抗 4H84 和  $\alpha$ -tublin 购自美国 Santa Cruz 公司; CD4<sup>+</sup> 分选试剂盒购自德国 Miltenyi 公司; 0.25% 胰酶购自美国 Sigma 公司; 实验所用分析纯试剂购自国药集团北京分公司。CO<sub>2</sub> 培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司。

## 1.2 实验材料

足月新生儿脐带取自于解放军第309医院妇产科, 取得父母知情同意书, 经本院伦理委员会讨论通过后用以制备脐带间充质干细胞。健康人血液标本经本人签署知情同意书, 经本院伦理委员会讨论通过后用于混合淋巴细胞反应实验。

## 1.3 脐带间充质干细胞的分离培养及鉴定

按照文献 [8] 操作, 将脐带表面用 75% 乙醇消毒后, 用生理盐水反复冲洗 3 次。将脐带放置于超净工作台中, 取经过无菌消毒后的 6 cm 表面皿, 将脐带放在表面皿中并切成段, 长度约 5 cm 左右。用 10 mL 注射器吸入生理盐水后沿脐带动脉和静脉中的断端注入并冲洗直至生理盐水无色。用眼科剪将脐带剪开, 用齿镊分离出脐带动脉和静脉, 最后分离华氏胶组织 (Wharton's jelly)。

将 Wharton's jelly 分离后剪碎为大小约为 1~2 mm<sup>3</sup> 的组织块, 将组织块放入 50 mL 的离心管中, 加入生理盐水约 30 mL, 380 × g 离心 5 min 并重复此过程 2 次。将离心后剩余的沉淀物用含 10% 胎牛血清的 DMEM/DF12 培养基混匀, 并转移至培养瓶中, 在培养至第 3 日时半量换液。继续培养 Wharton's jelly 组织块, 直至组织块的边缘发现有呈铺路石样生长的细胞为止。在传代过程中弃去 Wharton's jelly 组织块, 用胰酶将细胞消化接种于新的培养瓶中。当传代后的细胞进入对数生长期后, 将细胞消化重悬后制备单细胞悬液并调整浓度为 1 × 10<sup>6</sup>/mL, 取 200  $\mu$ L 细胞悬液, 分别加入 CD45-PerCP、CD34-PE、HLA-DR-FITC、CD29-PE、CD44-FITC、CD105-APC 流式抗体各 5  $\mu$ L, 避光室温孵育 20 min 后用流式细胞仪检测脐带间充质干细胞表面标志物的表达情况, 采用 Cell Quest 软件进行流式细胞分析。

## 1.4 HLA-G 基因转染脐带间充质干细胞及分组

将对数生长期的脐带间充质干细胞 2 × 10<sup>5</sup> 个接种到 6 孔板内, 加入 10% 胎牛血清的 DMEM/DF12 培养基 3 mL, 待细胞融合度达到 80% 左右进行转染。

分别设为 PEGFP-N1-HLA-G 组和 PEGFP-N1 组, 将 200  $\mu$ L 混有 PEGFP-N1-HLA-G 及空载体 PEGFP-N1 的 Lipofectamine™ 2000 的 DMEM/F12 分别滴入 6 孔板内, 在 CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育 4 h 后弃去转染液, 加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM/DF12 培养基 3 mL 在培养箱内继续培养 20 h。空白对照组为相同条件下 (在培养过程中也加入 Lipofectamine™ 2000, 但是未加入空载体) 的脐带间充质干细胞。

## 1.5 HLA-G 基因转染脐带间充质干细胞的鉴定

收集 6 孔板中各组脐带间充质干细胞, 通过蛋白裂解液裂解后, 收集到 1.5 mL 离心管中, 煮沸 5 min 后 10 000 × g 离心 1 min, 弃上清备用。二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法进行蛋白定量, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中加入样本, 电泳分离后电转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜。5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜。加入 HLA-G (1:1 000) 和  $\alpha$ -tublin (1:1 000) 抗体 4 °C 孵育过夜后, 加入二抗 37 °C 孵育 30 min。采用凝胶成像分析系统检测各条带的吸光度值并计算蛋白的相对表达量。

## 1.6 健康人外周血中 CD4<sup>+</sup>T 细胞的分离

取健康人的外周血 10 mL, 同时加入等体积的 Percoll 分离液, 放入 50 mL 离心管中 380 × g 离心 20 min, 吸取液面交界处的有核细胞, 并将细胞转移至 15 mL 离心管中, 使用 PBS 稀释后 380 × g 离心 5 min, 弃去上清液, 再加入 10 mL PBS 重复离心清洗 1 次, 加入 PBS 稀释并调整有核细胞浓度为 1 × 10<sup>7</sup>/mL。取 150  $\mu$ L 的细胞悬液加入 40  $\mu$ L 的 CD4 MicroBeads 混匀并在培养箱中孵育 10 min, 将 LS 柱放置于 MACS 分选架上, 用 PBS 冲洗, 将孵育好的细胞悬液导入 LS 柱中, 用 3 mL PBS 冲洗 1 次。CD4<sup>+</sup>T 细胞滞留于 LS 柱中, 用缓冲液将 LS 柱中吸附的 CD4<sup>+</sup>T 细胞冲洗下来并用 15 mL 离心管离心备用。

## 1.7 各组脐带间充质干细胞与 CD4<sup>+</sup>T 细胞混合淋巴细胞培养

将分离后的 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数, 按照细胞计数 1:10 的比例加入到含有 HLA-G 阳性的脐带间充质干细胞的 6 孔板内 (PEGFP-N1-HLA-G 组), 同时按照相同的比例将 CD4<sup>+</sup>T 细胞加入到 PEGFP-N1 组和空白对照组的 6 孔板内, 并在上述各组中加入含有 10% 血清的 RPMI1640 培养基中, 培养 24 h 和 48 h 后, 采用流式细胞仪分别检测 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 占

T 细胞的比例。

### 1.8 研究方法

采用流式细胞仪检测脐带间充质干细胞标志物；采用蛋白质免疫印迹法鉴定各组细胞 HLA-G 蛋白的表达；各组细胞与健康人外周血中 CD4<sup>+</sup> T 细胞混合培养 24 h 和 48 h 后，采用流式细胞仪检测 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 占全部 T 细胞的比例。

### 1.9 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差表示，比较采用方差分析，组间比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 脐带间充质干细胞表面标志物的鉴定结果

通过流式细胞仪检测脐带间充质干细胞标志物，其中 CD45、CD34 和 HLA-DR 呈阴性表达，CD29、CD44 和 CD105 呈阳性表达（图 1）。

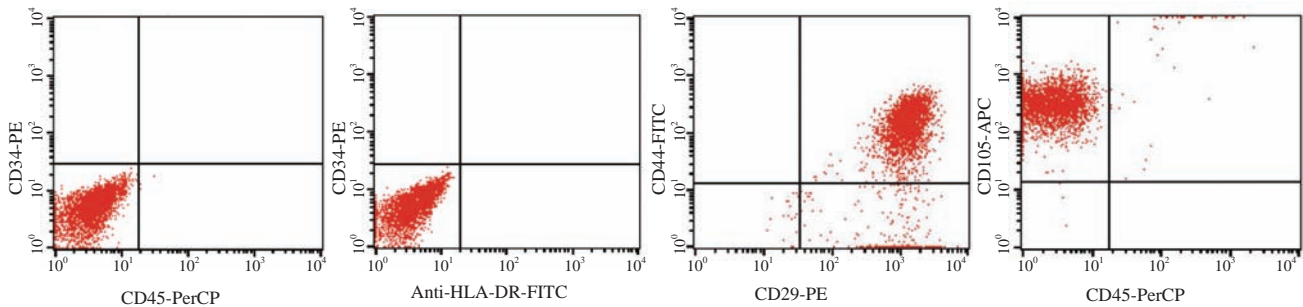


图 1 脐带间充质干细胞标志物的表达情况

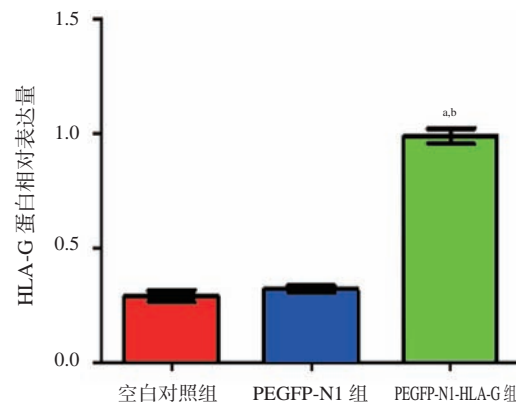
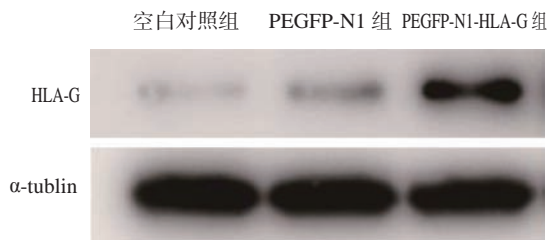
Figure 1 The expression of markers of umbilical cord mesenchymal stem cells

### 2.2 脐带间充质干细胞转染 HLA-G 基因的鉴定结果

各组脐带间充质干细胞的鉴定结果见图 2。空白对照组、PEGFP-N1 组、PEGFP-N1-HLA-G 组的 HLA-G 蛋白相对表达量分别为 0.29 ± 0.03、0.32 ± 0.02、1.00 ± 0.04。PEGFP-N1-HLA-G 组与空白对照组、PEGFP-N1 组比较，差异均有统计学意义（均为 *P*<0.01）。

### 2.3 各组脐带间充质干细胞与混合淋巴细胞培养诱导 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 产生的结果

空白对照组、PEGFP-N1 组和 PEGFP-N1-HLA-G 组脐带间充质干细胞与 CD4<sup>+</sup>T 细胞混合培养 24 h 后，各组中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 占全部 T 细胞的比例分别为 (10.2 ± 0.9)%、(10.5 ± 0.7)% 和 (15.3 ± 1.9)%，PEGFP-N1-HLA-G 组与空白对照组、PEGFP-N1 组比较，差异均有统计学意义（均为 *P*<0.05）；在培养 48 h 后，各组中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 占全部 T 细胞的比例分别为 (2.5 ± 0.4)%、(2.3 ± 0.2)% 和 (14.3 ± 2.1)%，PEGFP-N1-HLA-G 组与空白对照组、PEGFP-N1 组比较，差异均有统计学意义（均为



与空白对照组比较，<sup>a</sup>*P*<0.01；与 PEGFP-N1 组比较，<sup>b</sup>*P*<0.01

图 2 各组脐带间充质干细胞 HLA-G 蛋白的表达情况

Figure 2 Expression of HLA-G protein in umbilical cord mesenchymal stem cells of each group



$P < 0.05$ )。

### 3 讨 论

在移植领域, Treg 是临床免疫耐受研究的重点之一, Treg 在移植受体体内的表达对于建立受体体内的免疫耐受和维持移植免疫状态起着重要作用。Treg 是以  $CD4^+ CD25^+$  为主要标志物, 并特异性地表达 Foxp3 因子, 可以降低移植受体对外来抗原的反应性和抑制免疫应答的功能<sup>[9]</sup>。有研究显示, Treg 在外周血中的比例与移植存活密切相关, 外源性输入扩增后可以诱导受体的免疫耐受状态, 而对长期存活的肾移植受体研究发现, 其体内的  $CD4^+ CD25^+$  T 细胞明显高于慢性排斥反应的肾移植受体<sup>[10-12]</sup>。因此, 临床上常常把移植受体体内的 Treg 水平作为衡量移植存活状态的重要生物标志物。

HLA-G 是一种非经典主要组织相容性复合体 (MHC) I 类抗原, 其受体主要有 3 种: ILT2、ILT4 和 KIR2DL4。ILT4 主要分布在单核细胞和树突状细胞等髓样细胞表面, HLA-G 与 ILT4 相互作用可让树突状细胞分泌 IL-10 而实现对 T 细胞功能的抑制, 同时活化的树突状细胞可以诱导 T 细胞分化为  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  Treg, 还可以诱导 T 细胞分化成具有免疫抑制功能且不表达 Foxp3 转录因子的  $CD3^+ CD4^{low}$  或  $CD3^+ CD8^{low}$  Treg, 最终形成机体的免疫耐受<sup>[13-14]</sup>。如果能够上调移植受体体内 HLA-G 就可以诱导  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  Treg 的产生, 从而实现移植受体在受体内的免疫耐受。

脐带间充质干细胞由于其来源无伦理学限制, 容易获得, 且增殖速度快, 免疫原性低, 目前已经广泛用于治疗移植排斥和自身免疫性疾病, 是目前最具应用前景的间充质干细胞之一<sup>[15-17]</sup>。脐带间充质干细胞具有强大的免疫调节功能, 同时脐带间充质干细胞又能够被其他基因所修饰而表达相应的蛋白, 因此本实验选用 HLA-G 基因修饰脐带间充质干细胞作为反应细胞, 将淋巴细胞作为效应细胞, 观察 HLA-G 阳性的脐带间充质干细胞在体外诱导  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  Treg 的效果, 结果表明 HLA-G 阳性的脐带间充质干细胞在与 T 细胞混合培养 24 h 后可以有效的诱导  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  Treg, 其比例占全部 T 细胞的  $(15.3 \pm 1.9)\%$ , 在混合培养 48 h 后,  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  Treg 比例仍然占全部 T 细胞的  $(14.3 \pm 2.1)\%$ , 而同时时间段的脐带间充质干细胞诱导  $CD4^+ CD25^+$

$Foxp3^+$  Treg 比例只占全部 T 细胞的  $(2.5 \pm 0.4)\%$ 。

综上所述, 脐带间充质干细胞本身也具有诱导  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  Treg 产生的功能, 经过 HLA-G 基因修饰后能够更加有效地在体外诱导  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  Treg 的产生, 具有潜在的临床应用价值。但本实验现仅局限于体外实验, 体内试验是否有类似的结果仍然待于进一步观察。

### 参考文献:

- [1] 孔伟浩, 张剑. PD-1/PD-L1 信号通路在不同组织来源间充质干细胞中免疫调节作用的研究进展 [J]. 器官移植, 2017, 8(6): 483-485. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.06.015. KONG WH, ZHANG J. Research progress of PD-1/PD-L1 signaling pathway in immunoregulation of mesenchymal stem cell derived from different tissues [J]. Organ Transplant, 2017, 8(6): 483-485. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.06.015.
- [2] 申升, 刘东, 黎程, 等. 外周血  $CD4^+ CD25^{high}$  调节性 T 细胞比例变化在肾移植受体移植后免疫监测中的应用 [J]. 中国组织工程研究, 2009, 13(18): 3425-3428. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8225.2009.18.005. SHEN S, LIU D, LI C, et al. The application of the change of  $CD4^+ CD25^{high}$  regulatory T cell ratio in peripheral blood of renal transplant recipients in immunological monitoring after transplantation [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2009, 13(18): 3425-3428. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8225.2009.18.005.
- [3] SHAN J, GUO Y, LUO L, et al. Do  $CD4^+ Foxp3^+$  Treg cells correlate with transplant outcomes: a systematic review on recipients of solid organ transplantation [J]. Cell Immunol, 2011, 270(1): 5-12. DOI: 10.1016/j.cellimm.2011.05.006.
- [4] 尹东亮, 孙翀, 朱焕斌, 等. CTLA4-Ig 基因修饰骨髓间充质干细胞抑制大鼠肝移植排斥反应 [J]. 器官移植, 2014, 5(4): 231-236. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2014.04.008. YIN DL, SUN C, ZHU HB, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell modified by CTLA4-Ig gene can inhibit the rejection of liver transplantation in rats [J]. Organ Transplant, 2014, 5(4): 231-236. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2014.04.008.
- [5] WADA N, BARTOLD PM, GRONTHOS S. Human foreskin fibroblasts exert immunomodulatory properties by a different mechanism to bone marrow stromal/stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2011, 20(4): 647-659. DOI: 10.1089/scd.2010.0246.
- [6] 牛坚, 刘斌, 张业伟, 等. hIL-10 修饰骨髓间充质干

- 细胞对大鼠原位异种肝移植急性排斥反应的影响[J]. 中华肝胆外科杂志, 2010, 16(10): 777-780. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2010.10.020.
- NIU J, LIU B, ZHANG YW, et al. The role of hIL-10-MSCs in immune tolerance of rat discordant liver xenotransplantation[J]. Chin J Hepatobiliary Surg, 2010, 16(10): 777-780. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2010.10.020.
- [7] XU DP, SHI WW, ZHANG TT, et al. Elevation of HLA-G-expressing DC-10 cells in patients with gastric cancer[J]. Hum Immunol, 2016, 77(9): 800-804. DOI: 10.1016/j.humimm.2016.01.003.
- [8] 马锡慧, 肖漓, 冯凯, 等. 人脐带和骨髓间充质干细胞体外分离培养及生物学特性比较[J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2015, 5(2): 10-13. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2015.02.002.
- MA XH, XIAO L, FENG K, et al. Comparison of biological characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells with human bone marrow mesenchymal stem cells[J/CD]. Chin J Cell Stem Cell(Electr Edit), 2015, 5(2): 10-13. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2015.02.002.
- [9] PLAIN KM, VERMA ND, TRAN GT, et al. Cytokines affecting CD4(+) T regulatory cells in transplant tolerance. interleukin-4 does not maintain alloantigen specific CD4(+) CD25(+) Treg[J]. Transpl Immunol, 2013, 29(1/2/3/4): 51-59. DOI: 10.1016/j.trim.2013.10.003.
- [10] ZHANG C, SHAN J, HUANG Y, et al. Rapamycin in combination with donor-specific CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cells amplified in vitro might be realize the immune tolerance in clinical organ transplantation[J]. Cell Immunol, 2010, 264(2): 111-113. DOI: 10.1016/j.cellimm.2010.05.014.
- [11] WANG Z, XIAO L, SHI BY, et al. Short-term anti-CD25 monoclonal antibody treatment and neogenetic CD4(+)CD25(high) regulatory T cells in kidney transplantation.[J]. Transpl Immunol, 2008, 19(1): 69-73. DOI: 10.1016/j.trim.2008.01.005.
- [12] WANG Z, FU XY, SHI BY, et al. Antigen-specific suppression by induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in kidney recipients[J]. Transplant Proc, 2009, 41(5): 1574-1576. DOI: 10.1016/j.transproceed.2009.01.093.
- [13] 徐小丽, 邹萍, 游泳, 等. 异基因造血干细胞移植受者外周血中可溶性HLA-G与急性GVHD的相关性[J]. 中华器官移植杂志, 2010, 31(4): 234-237. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2010.04.011.
- XU XL, ZOU P, YOU Y, et al. The correlation between soluble HLA-G and acute graft-versus-host disease after allo-geneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Chin J Organ Transplant, 2010, 31(4): 234-237. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2010.04.011.
- [14] WLASIUK P, STEC A, PIECHNIK A, et al. Expression of soluble HLA-G in multiple myeloma patients and patients with renal failure[J]. Leuk Res, 2012, 36(7): 881-883. DOI: 10.1016/j.leukres.2012.02.015.
- [15] 余碧珍, 杜庆华, 李庆山, 等. allo-HSCT后外周血TH17细胞/Treg细胞的平衡与aGVHD的相关性[J]. 中华器官移植杂志, 2015, 36(3): 171-175. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2015.03.009.
- YU BZ, DU QH, LI QS, et al. Relationship between helper T cell 17/regulatory T cells balance and acute graft versus host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Chin J Organ Transplant, 2015, 36(3): 171-175. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2015.03.009.
- [16] LEE MW, CHOI J, YANG MS, et al. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 320(1): 273-278. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.04.206.
- [17] BOISSEL L, TUNCER HH, BETANCUR M, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells increase expansion of cord blood natural killer cells[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2008, 14(9): 1031-1038. DOI: 10.1016/j.bbmt.2008.06.016.

(收稿日期: 2017-11-01)

(本文编辑: 邬加佳 朱佩玲)