

Study and application of immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells

Xueyi Zeng

Guangdong Jinzhuan Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong, 528400, China

Abstract

Objective: To analyze the immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells. **Methods:** The immunomodulatory mechanism and clinical application of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) were reviewed in this paper. **Results:** By secreting soluble factors (such as PGE2, IDO, etc.) and the intercellular contact-dependent mechanism, ADSCs could significantly inhibit the proliferation of T cells with an inhibition rate of 70-90%, regulate the polarization of macrophages, and reduce the M1/M2 ratio by 40-60%. **Conclusion:** Collagenase digestion, differential adhesion separation and 3D microcarrier culture techniques are important preparation processes for the immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells. ADSCs mainly achieve immunomodulatory effects through paracrine and intercellular contact, involving multiple types of immune cells such as T cells, B cells, NK cells, dendritic cells and macrophages.

Keywords

fat stem cells; Mesenchymal stem cells; Immune regulation; Cell therapy

脂肪源性间充质干细胞免疫调节作用的研究与应用

曾学易

广东金专生物科技有限公司, 中国·广东广州 528400

摘要

目的: 分析脂肪源性间充质干细胞免疫调节作用的研究与应用。**方法:** 本文对脂肪源性间充质干细胞 (ADSCs) 的免疫调节机制及其临床应用进展进行了系统综述。**结果:** ADSCs借助分泌可溶性因子 (像PGE2、IDO等) 以及细胞间接触依赖机制, 可显著抑制T细胞的增殖活动, 抑制率达70-90%, 调节巨噬细胞极化现象, 造成M1/M2比例降低40-60%。**结论:** 胶原酶消化-差速贴壁分离法、3D微载体培养技术等是脂肪源性间充质干细胞免疫调节作用的重要制备工艺, ADSCs主要以旁分泌和细胞间接触的方式实现免疫调节作用, 涉及T细胞、B细胞、NK细胞、树突细胞、巨噬细胞等多个类型的免疫细胞。

关键词

脂肪干细胞; 间充质干细胞; 免疫调节; 细胞治疗

1 引言

由脂肪得来的间充质干细胞 ADSCs 因获取便利、增殖能力良好以及免疫调节特性明显, 已跻身细胞治疗领域的研究热点行列。抗生素、长时间、高温度保存抑制 ADMSC 增殖, 而核苷可促进其增殖^[1]。自 2004 年 Zuk 等首次从吸脂术中分离出 ADSCs 后, 全球注册的相关临床试验数量已逾 200 项, 同传统骨髓来源的 MSCs 相比, ADSCs 获取率比传统骨髓来源 MSCs 多 5 - 10 倍, 达到 5×10^5 cells/g 脂肪组织, 并且 ADSCs 在免疫抑制能力上更胜一筹。本文从技术路径这个角度, 全面阐述 ADSCs 从获取直至应用的全程解决办法。

【作者简介】 曾学易 (1998-), 女, 中国广东乐昌人, 在读硕士, 从事生物化学和分子生物学研究。

2 ADSCs 的分离与培养技术

2.1 分离纯化工艺

作为再生医学领域的重要技术之一, 有 ADSCs (脂肪来源干细胞) 的分离与培养技术, 此技术采用肿胀麻醉手段, 从患者腹部皮下采集 100 - 200mL 脂肪组织, 把采集到的脂肪组织进行酶解处理, 采用 0.1% I 型胶原酶, 于 37°C 条件下震荡消化 40 分钟, 实现脂肪细胞的释放, 将酶解消化后的混合物进行 1200g、10 分钟的差速离心, 以得到血管基质组分, 将 SVF 拿来贴壁培养, 经过 3 次细胞传代 (P3) 后, 得到纯度超 95% 的 ADSCs。

2.2 规模化扩增技术

就目前而言, ADSCs 的常见培养方式有平面培养、微载体培养和生物反应器培养这几种, 平面培养下的扩增倍数是 10^5 , CD90 作为标志物, 其保持率为 85%, 分泌活性呈现中等水平, 微载体培养所得的扩增倍数为 10^7 , 以 CD90 为标志物, 保持率为 92%, 展现出较高的分泌活性^[2]。生物

反应器开展培养工作，扩增倍数为 10^9 ，标志物 CD90+ 的留存比例为 89%，分泌活性展现出较高水准，从这些对比可以看出，生物反应器培养在扩增倍数与分泌活性方面呈现明显优势，但在标志物保持率方面，比微载体培养略逊一筹，在实际开展应用的阶段，可按照研究目的与需求选取恰当的培养方式。

表 1 ADSCs 培养技术性能比较

培养方式	扩增倍数	标志物保持	分泌活性
平面培养	10^5	CD90+85%	中
微载体	10^7	CD90+92%	高
生物反应器	10^9	CD90+89%	较高

3 免疫调节作用机制

3.1 分子调控网络

3.1.1 可溶性因子

PGE2 借助抑制 Th1 的分化，引起 IFN- γ 的表达下降，由此让免疫反应的强度下降，IDO 凭借耗竭色氨酸，阻碍 T 细胞的增殖，进而实现对免疫反应的调节，TSG-6 凭借抑制 NF- κ B 通路，抑制炎症反应水平。

3.1.2 外泌体

miR-21 凭借促进 Treg 细胞生成，扩大 2-3 倍，以此达到调节免疫反应的目的，miR-146a 借助抑制巨噬细胞的活化，降低炎症反应水平。

3.1.3 细胞接触

于 PD-L1/PD-1 的相关通路内，ADMSCs 表面呈现出 PD-L1 的表达，可与 T 细胞表面的 PD-1 达成结合，诱发 T 细胞凋亡，此作用有利于调节免疫反应，避免出现过度激活与自身免疫反应，处于 ICAM-1/VLA-4 这一通路中，ADMSCs 表面 ICAM-1 和淋巴细胞表面 VLA-4 彼此相互作用，引导淋巴细胞的迁移走向，这种相互作用可辅助调节淋巴细胞的分布及功能，进而影响免疫反应的强度跟持续时间。

3.2 靶细胞调控对各类免疫细胞的影响

基于免疫调节作用，脂肪源性间充质干细胞(ADMSCs)可广泛用于组织修复和免疫性疾病治疗，ADMSCs 可以抑制 CD4+T 细胞增殖，调节的程度可达 70-90%，该作用可起到减少自身免疫反应的效果，缓解炎症反应，ADMSCs 有降低 Th17 细胞分化的功效，引起 IL-17 水平降低，调节幅度为 65%^[3]。IL-17 可归类为促炎细胞因子，减少其水平对减轻炎症反应有帮助，ADMSCs 可带动 Treg 细胞的扩增，令 FoxP3+ 的表达提高 3 倍，Treg 细胞有抑制自身免疫反应、调节免疫平衡的功效，ADMSCs 可抑制 B 细胞发生浆细胞转化，引起 IgG 水平降低，调节水平为 40%^[4]。

3.3 信号通路

脂肪干细胞通过激活 PI3K/Akt 信号通路，上调细胞因子如 IL-10 的产生，从而抑制 Th17 细胞的分化，减少炎症反应。TGF- β 是脂肪干细胞免疫调节的关键因子，可以促进 Treg 细胞的分化和增殖，抑制 Th17 细胞和 Th1 细胞的活性，从而发挥免疫抑制效应。脂肪干细胞中的 Hedgehog

信号通路参与调节 Treg 细胞的分化和功能，抑制 Th17 细胞的分化，从而减轻炎症。

4 临床应用进展

4.1 移植物抗宿主病 (GVHD)

脂肪源性间充质干细胞在针对移植物抗宿主病 (GVHD) 的治疗中取得明显进展^[6]。依照相关临床研究，以 1×10^6 cells/kg 作为剂量，对脂肪源性间充质干细胞实施静脉输注，该疗程要求每周实施一次治疗，联合采用低剂量 IL-2 受体拮抗剂^[7]。

4.2 类风湿关节炎

脂肪源性间充质干细胞近几年在类风湿关节炎的治疗事宜上取得了显著进步，作为局部治疗手段，关节腔注射，能有效对患者症状进行改善，使疾病活动强度下降，每次打 5×10^7 个细胞，以此保证细胞数量充足从而发挥治疗效果。

表 2 多中心研究结果

参数	治疗前	治疗后 12 周	改善率
DAS28	5.8 ± 0.7	3.2 ± 0.6	44.8%
关节肿胀数	7.5 ± 2.1	2.3 ± 1.4	69.3%
CRP(mg/L)	28.5	8.7	69.5%

4.3 其他适应症

针对 SLE、MS、糖尿病足溃疡和 ARDS 等疾病，脂肪源性间充质干细胞的治疗前景良好，在系统性红斑狼疮 (SLE) 的范畴内，ADMSCs 能对 Th17/Treg 平衡起到调节效果，提升 Treg 细胞的占比，降低 Th17 细胞所占比例，由此可有效抑制 SLE 的炎症反应^[8]。MSCs 治疗卵巢早衰具有潜在的临床应用价值，可通过改善卵巢功能，恢复生育能力。MSCs 可通过调节 T 细胞免疫反应，用于治疗自身免疫性疾病，如风湿性关节炎、多发性硬化症等。MSCs 及其外泌体在治疗肝硬化、心肌纤维化等器官纤维化疾病中展现出良好前景。MSCs 及其衍生的细胞外囊泡 (Extracellular Vesicles, EVs) 可用于治疗宫腔粘连，改善生育能力。MSCs 在治疗炎症性疾病，如克罗恩病、溃疡性结肠炎等，显示出积极的临床应用潜力。了解不同来源 MSCs 的特性有助于选择合适的干细胞类型进行临床治疗。MSCs 治疗膝骨关节炎有望成为新的治疗策略，改善患者生活质量。研究 MSCs 对乳腺癌转移的影响，有助于开发新的治疗策略，防止肿瘤转移。

5 技术挑战与对策

5.1 质量控制标准

5.1.1 关键质量属性

为保证 ADMSCs 纯度达标，应对其表面标志物实施严格鉴定，关键质量属性规定，CD73+/CD90+/CD105+ 的占比要大于 95%，说明要有超过 95% 的细胞表达这三个表面标志物，需采用流式细胞术对细胞的表面标志物加以检测，保证细胞纯度符合既定标准。制定标准化操作流程，保障细胞分离、培养、检测等环节具备稳定性与可重复性，为保障细胞产品的安全性，要严格把内毒素水平控制在 0.5EU/mL

以下,于细胞分离、培养的过程里可以,采用无菌操作方式,防止细菌侵入,对细胞培养基、器械等耗材实施严格无菌处理,降低内毒素出现污染的风险^[9]。

5.1.2 先进检测技术

为保证脂肪源性间充质干细胞在纯度和质量上达标,可引入先进的检测手段,实施细胞表面标志物的检测,采用先进的质谱流式检测手段,可同步检测 30 种表面标志物,以实现细胞免疫调节功能的全面评估,利用微流控芯片技术能实现单细胞分泌分析,利于深入知晓脂肪源性间充质干细胞的免疫调节机制,借助数字 PCR 技术检测残留宿主 DNA,保障细胞培养过程里宿主 DNA 得以清除,提高实验结果的精确水平^[10]。

5.2 临床转化障碍

为化解临床转化过程中的技术难题,提出采用专门的封闭式细胞处理系统,使生产过程的波动率控制在 5% 以内,提高生产效能以及产品质量,以此加快临床应用的步伐,经由程序降温技术与无 DMSO 冻存液,做到对 ADMSCs 的长期保存,该种保存方法可显著增强复苏后的细胞活率,超出了 90%,保证细胞在临床应用时呈现出有效性,采用磁导航靶向输注技术,优化细胞输注的精准水平,和以往传统的输注方法相比,该技术可以把细胞富集效率提升 8 倍,进而实现治疗效果的优化。

5.3 细胞的冻存技术

冻存技术不仅关系到细胞的长期保存和稳定性,还直接影响后续实验和临床应用的效果。冻存过程中,细胞可能会因为冷冻速率过快或解冻速率过慢而受到损伤,导致细胞活力下降。冻存中细胞内的蛋白质可能会发生变性,影响细胞的生物学功能。根据细胞的生物学特性,选择合适的冻存介质和冻存程序。常用的冻存介质有二甲基亚砜(DMSO)、甘油等,冻存程序包括慢速冷冻和快速冷冻。在冷冻过程中,应尽量控制冷冻速率,避免细胞损伤。可以使用低温冰箱或液氮冻存管等设备实现慢速冷冻。

6 未来发展方向

作为有免疫调节功能的干细胞,脂肪源性间充质干细胞(ADMSCs)在列,在再生医学与临床治疗中呈现出巨大潜力,就技术创新趋势而言,基因编辑技术中,如运用 CRISPR 敲入 HLA - G 基因增强免疫逃避能力,借助水凝胶缓释系统这类仿生材料可延长作用时间,还有人工智能(AI)预测范畴,像使用机器学习优化个体化给药方案等情形,都会成为研究的焦点内容。深入研究 mTOR 信号通路在脂肪源间充质干细胞(ADSCs)成脂过程中的具体调控机制,以期发现新的成脂调控因子或药物靶点。探索 Notch 信号通路与其他信号通路(如 Wnt、BMP 等)的相互作用,揭示多信号通路在 ADSCs 成脂中的协同调控作用^[11]。开发基于 MSCs 免疫调节机制的疾病治疗策略,如免疫调节性治疗、组织修复等,为临床应用提供新的思路和方法。在临床研究的维度上,大样本随机对照试验,实施长期随访用以评估 5 年以上的安全性,以及联合治疗跟生物制剂或小分子药物产

生的协同作用,将成为未来研究需要聚焦的点,依靠这些发展方向,有望带动 ADMSCs 在免疫调节领域的深入研究与实际应用。

7 结论

ADSCs 凭借多靶点、多途径起到免疫调节作用,针对多种难治性免疫疾病呈现出明显疗效,若要推动临床转化,优化分离培养工艺、建立标准化质量体系、开发新型递送技术是关键所在,伴随基因修饰和智能制造技术的进步,ADSCs 有潜力成为免疫治疗的“活体药物”,给再生医学搭建新的路径,建议增进产学研合作,快速推进相关技术规范及国际标准的制定工作。

参考文献

- [1] 梁坤荣,王慧,顾恩妍,等.脂肪组织保存条件对体外分离培养人脂肪间充质干细胞的影响[J].重庆医学,2024,53(07):972-978.
- [2] 艾克帕尔·艾尔肯,陈晓涛.牙源性间充质干细胞来源的外泌体在牙周免疫调节的研究进展[J].口腔疾病防治,2024,32(10):814-820.
- [3] 姚家威,黄钰洁,陈志胜,等.α-酮戊二酸二甲酯预处理对犬脂肪源间充质干细胞免疫调节能力的影响[J].中国畜牧兽医,2023,50(04):1642-1652.
- [4] 周娟,熊伟,尹云玉,等.间充质干细胞源性外泌体抗炎免疫调节机制的研究进展[J].华中科技大学学报(医学版),2020,49(03):366-370.
- [5] S. N. W., O. A. S., G. E. A. A., et al. Therapeutic Efficacy of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells after Chronic Fluoxetine Treatment on Pars Distalis in Adult Male Albino Rats[J]. Tissue and Cell, 2022, 76 (prepublish):101770-.
- [6] F. A. B., H. R. M., E. S. A., et al. The Potential Therapeutic Effect of Orexin-Treated versus Orexin-Untreated Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy on Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Rats[J]. Journal of diabetes research, 2022, 20229832212-9832212.
- [7] Shahram T., Amin M. M., Abbas G., et al. Radiation-Induced Bystander Effects of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells[J]. Cell journal, 2021, 23(6):612-618.
- [8] 王真,李小兰,刘建国.口腔疾病治疗中如何应用牙源性间充质干细胞的免疫调节特性[J].中国组织工程研究,2020,24(25):4060-4067.
- [9] 陈谦谦,沈梦杰,杨琨,等.牙源性间充质干细胞免疫调节作用及在口腔疾病和组织再生中的意义[J].中国组织工程研究,2020,24(19):3101-3107.
- [10] Alireza M., Sara S., Bitu B. Immunomodulatory Effects of Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells on Epithelial Cells Function in Response to Vibrio cholera in a Co-culture Model[J]. Iranian journal of allergy, asthma, and immunology, 2021, 20(5):550-562.
- [11] Busra H. S., M. S. A. K. S., Ibrahim M. T. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Chemotherapy-Induced Premature Ovarian Insufficiency: the Role of Connexin and Pannexin[J]. Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.), 2021, 29(4):1-16.