

综述

骨髓间充质干细胞缺陷与获得性再生障碍性贫血

章婧嫻 综述 竺晓凡 审校

(1. 中国医学科学院血液学研究所, 天津 300021;
2. 北京协和医学院血液病医院儿童血液病诊疗中心, 天津 300021)

[摘要] 获得性再生障碍性贫血(AA)患者骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)缺陷已成为近年来研究的热点之一。该文对BM-MSCs缺陷在AA发病中的作用及其对AA治疗的临床应用进行综述。越来越多的实验室证据证明了BM-MSCs缺陷在AA的发病中极有可能起着重要的作用,无论是其生物学特点、基因表达谱的缺陷,抑或是增殖分化能力、造血支持作用乃至免疫调节功能的耗竭,都成为在免疫失衡基础上促使AA不断进展至难以恢复的重要节点。随着MSCs研究的不断深化,将恢复骨髓造血微环境为主要目的的MSCs输注可能成为AA治疗的新模式。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(1): 100-106]

[关键词] 获得性再生障碍性贫血; 骨髓间充质干细胞; 缺陷

Defectiveness of bone marrow mesenchymal stem cells in acquired aplastic anemia

ZHANG Jing-Liao, ZHU Xiao-Fan. Diagnosis and Treatment Center of Pediatric Blood Diseases, Institute of Hematology and Blood Disease Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300021, China (Email: xfzhu@126.com)

Abstract: The defectiveness of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) in acquired aplastic anemia (AA) has been a frequent research topic in recent years. This review summarizes the defectiveness of BM-MSCs which is responsible for the mechanism of acquired AA and the prospective application of BM-MSCs in the treatment of acquired AA. An increasingly number of laboratory statistics has demonstrated that the defectiveness of BM-MSCs is more likely to play an important role in the pathogenesis of AA, namely, the apparently different biological characteristics and gene expression profiles, the decreased ability of supporting hematopoiesis as well as self-renewal and differentiation, and the exhaustion of regulating immune response of hematopoietic environment. Those abnormalities continuously prompt AA to become irreversible bone marrow failure along with the imbalanced immunity. With deepening research on MSCs, infusion of MSCs for the primary purpose of recovering hematopoietic microenvironment may become a new approach for the treatment of AA.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(1): 100-106]

Key words: Acquired aplastic anemia; Bone marrow mesenchymal stem cell; Defectiveness

获得性再生障碍性贫血(acquired aplastic anemia, 简称AA)是一种免疫介导的以骨髓增生减低及三系造血细胞减少、非造血细胞增多为特征的骨髓造血功能衰竭综合征。近年研究表明,异常的免疫细胞及分子介导的造血干细胞功能缺陷及骨髓造血微环境异常是AA的微观表现^[1-2]。异常免疫细胞通过分泌诸如IFN- γ 、TNF- α 和ILs等多种细胞因子直接或间接地破坏骨髓中的造血干/祖细胞,同时抑制基质细胞产生早期造血生

长因子,使得骨髓正常造血受到抑制^[3-5]。既往研究表明,AA患者的造血干细胞存在生物学特性异常和功能的损伤,其CD34⁺细胞表达的与免疫应答、凋亡、细胞周期及增殖相关的基因不同于正常人,体外培养方法发现造血干细胞及髓系造血祖细胞数量锐减,这可能是造血干细胞(HSC)过度凋亡所致骨髓衰竭的重要机制之一^[6-7]。

免疫异常是AA发病的主要病理机制^[2,7],而异常的T细胞又是发病的重要因素,由CD4⁺T细

[收稿日期] 2014-06-24; [接受日期] 2014-09-13

[作者简介] 章婧嫻,女,硕士研究生。

胞及 CD8⁺ T 细胞介导的免疫应答造成了 AA 患者的 HSC 损伤, 这一过程包括激活的树突状细胞 (DCs) 促进 Th1/Th2 失衡并激活更多的 CD8⁺ T 细胞、CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 活性减低、异常的免疫细胞及间质细胞产生大量的诸如 IFN- γ 、TNF- α 、MIP-1 α 和 IL-2、-8、-12、-15、-17、-23 等细胞因子构成细胞因子网络, 从而损伤造血干/祖细胞、血管内皮祖细胞以及间充质干细胞。

然而越来越多的证据表明, 包括骨髓间充质干细胞 (BM-MSCs) 在内的骨髓基质细胞本身的缺陷, 极有可能是 AA 的另一病理机制。本文对 BM-MSCs 缺陷在 AA 发病中的作用进行综述。

1 AA 患者 BM-MSCs 生物学特性改变

1.1 AA 患者 BM-MSCs 的形态及免疫表型

通过正常对照和 AA 儿童的 BM-MSCs 研究发现, 患儿 BM-MSCs 前 3 代形态与对照组无显著性差异, 但患儿 BM-MSCs 较对照出现提前分化和老化现象, 且体外培养成功率低于对照组^[8]。研究表明 AA 患儿与正常对照 BM-MSCs 具有相同的免疫表型, CD29、CD44 和 CD105 阳性, 而 CD3、CD19、CD34 和 CD45 等造血细胞的标记阴性, 但动态观察发现, 随着培养时间延长, BM-MSCs 的生长速度和增殖能力逐渐下降^[9]。正常 BM-MSCs 均可传至 20 代以上, 而 AA 患儿 BM-MSCs 传代多在 15 代以内。还有研究证实, 虽然 AA 患者和健康对照组 BM-MSCs 均表达 CD105、CD73、CD90、CD29、CD44、CD49e、CD166 和 HLA-ABC, 但不表达 CD34、CD45 和 HLA-DR^[10-11]。通过 β -微管蛋白荧光标记后, 在荧光共聚焦显微镜下观察到 AA 患者的 BM-MSCs 纺锤形、漩涡状结构比对照更为不规则且凌乱。

1.2 AA 患者 BM-MSCs 的基因表达谱异常

Li 等^[12]对基因表达谱的筛查并通过实时定量 PCR 验证后发现 AA 患者 BM-MSCs 与正常对照相比, 有 314 个基因表达不同, 其中 207 个基因表达上调, 107 个基因表达下调, 这些基因大部分参与了包括甾体激素的生物合成, 脂肪细胞因子、细胞粘附分子 (CAM)、转化生长因子 β (TGF- β) 信号通路, 细胞周期循环, 造血干细胞系发育与

凋亡等在内的重要生物过程的信号通路。这与之之后所证实的 AA 患者 BM-MSCs 众多生物学特性异常一致, 提示异常的基因表达谱可能是 BM-MSCs 功能紊乱并造成骨髓造血微环境中干/祖细胞异常增殖分化、凋亡增加、生物学特性改变的重要根源之一。

2 AA 患者 BM-MSCs 细胞因子水平异常减低造血支持作用

AA 发生骨髓衰竭的病理机制复杂, 发病的主要原因可能为造血干细胞数量减少或质量缺陷, 然而其内在机制仍有待研究。AA 患者造血干细胞缺陷和骨髓微环境异常可能同时存在。虽然 MSCs 支持促进造血的机制尚不清楚, 但是 MSCs 对骨髓造血微环境的营养支持作用以及对促进骨髓造血祖细胞植活的造血重建作用是已被多项研究证实的^[13-14]。研究发现 AA 患者 BM-MSCs 分泌 SCF 及可溶性 c-kit 受体的含量低于正常人, 推测 SCF 水平的下降是 AA 发病的重要病理生理机制^[15-16]。研究证实, SCF 水平下降后, 其与配体 c-kit 结合也会随之减少, SCF/c-kit 信号通路异常不仅影响 HSC 的增殖能力, 同时还会降低其他的造血生长因子的反应性, 故而 SCF 减少极有可能影响造血功能。由此推测骨髓造血衰竭的发生可能与此有着密切的联系。但是 Kojima 等^[17]研究发现 AA 患者血浆中可溶性 SCF 水平与正常对照无显著差别。

刘双等^[18]检测 AA 治疗前后及正常人 (对照组) 骨髓组织中血管内皮生长因子 (VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的表达, 发现治疗前骨髓组织中 VEGF、bFGF 表达水平明显低于对照组, 缓解后 VEGF、bFGF 表达水平较治疗前明显提高。作为骨髓组织中两种重要的促血管生成因子, VEGF、bFGF 表达水平的变化与骨髓基质损伤及恢复程度一致。

IL-6 的作用在于上调造血干细胞进入 G0 期, 促使 G0 期细胞进入增殖周期, 从而促进造血干细胞的分化和成熟。虽然作为一种重要的前炎症因子 IL-6 在 AA 小鼠模型 (放射与化疗药物构建) 中分泌水平较正常小鼠高^[19], 但 AA 患者 BM-MSCs IL-6 的表达明显低于正常对照组, 进一步说明 AA 患者 BM-MSCs 在支持造血干细胞增殖和成

熟方面存在缺陷^[20]。

FGF2 作为发挥调节骨髓造血支持作用的重要细胞因子,由相应受体通过旁分泌及自分泌信号通路刺激基质细胞扩增并促进造血干细胞增殖^[21]。研究表明,AA 患儿 BM-MSCs FGF2 表达水平较正常人低,因而推测 BM-MSCs 低水平的 FGF2 表达极有可能参与 AA 的发病。Jiang 等^[22]将 10 名 AA 患儿的 BM-MSCs 在体外进行分离培养并传代后利用 RT-PCR 检测 BM-MSCs 中的 FGF2 mRNA 水平,利用 Western blot 检测 FGF2 的蛋白表达水平并通过 ELISA 验证细胞外液的 FGF2 水平发现,同正常对照相比 AA 患儿 BM-MSCs 的 FGF2 基因表达水平下降,但具体的体内实验尚未完成。

TPO 是体内促进巨核细胞系增殖、分化、成熟的主要细胞因子,其含量主要受血小板及成熟巨核细胞表面的血小板生成素受体总量的负调控,杨诗梅等^[16]发现 AA 患者 BM-MSCs TPO 表达明显高于正常对照组,虽然患者 BM-MSCs 的 TPO 表达增多,但其受体的减少可能导致了造血干细胞增殖和分化功能的失调^[2]。Liu 等^[23]对比非重型再生障碍性贫血(NSAA)患者与正常志愿者 BM-MSCs 分泌细胞因子时发现,患者的 BM-MSCs 表达 TGF- β 1、3 减少而 HGF 和 TGF- β 3 的表达无明显区别。AA 的疾病过程极可能是因失去了骨髓基质细胞的造血支持作用而发展加重,说明 BM-MSCs 等骨髓基质细胞的造血支持缺陷与 AA 的发生、发展及预后密切相关。

3 AA 患者 BM-MSCs 增殖与分化潜能异常

3.1 AA 患者 BM-MSCs 自我更新与增殖能力下降

黄永兰等^[24]、Chao 等^[25]、El-Mahgoub 等^[26]发现儿童 AA 的 BM-MSCs 存在增殖能力缺陷:就增殖能力而言,AA 患儿的 BM-MSCs 比正常儿童和胎儿 BM-MSCs 在培养早期并无明显区别,但将增殖细胞群体扩增至 20 倍或者传代至第 5 代之后,两者之间产生明显的差异,其中患儿 BM-MSCs 增殖能力明显下降,而正常儿童和胎儿的 BM-MSCs 则可以稳定地扩增至 30 倍增殖;Jiang 等^[22]在研究中通过对比增殖曲线发现,AA 患儿的 BM-MSCs 传代至第 8 代后其增殖能力较正常对照明显降低;

吴艳等^[8]将 AA 患儿体外扩增 1 周后的骨髓单个核细胞进行集落培养,发现 BFU-E、CFU-GM 计数显著低于正常对照组,这种支持造血功能的减低可能与 AA 患儿 BM-MSCs 增殖能力的减低及分泌 SCFs 的减少有关;这些研究结果均提示儿童 AA 患者的 BM-MSCs 增殖能力下降。

成人 AA 患者 BM-MSCs 增殖能力亦较正常人弱,其传代一般不超过 15 代,程梅等^[27]通过对 AA 患者的 BM-MSCs 培养发现,AA 组 BM-MSCs 增殖能力显著低于对照组,细胞倍增时间高于对照组。此外,Li 等^[12]在培养分离获取患者 BM-MSCs 并传代至第 3 代后,利用 BrdU-ELISA 方法在第 0、2、4、6、8、10、12 天评估患者与正常对照组 BM-MSCs 的增殖能力,并对培养传代的 MSCs 进行成纤维细胞集落形成单位(CFU-F)分析,结果同样发现 AA 患者的 BM-MSCs 增殖率明显低于正常对照组,且体外 CFU-F 形成能力显著低于对照组。研究者利用 Annexin V 凋亡检测试剂盒对两组细胞的凋亡率进行检测后发现,AA 组 BM-MSCs 凋亡细胞率($8.09\% \pm 3.32\%$)明显高于健康对照组($5.00\% \pm 2.59\%$)。也有实验将 AA 患者和正常对照组 BM-MSCs 进行体外培养,均发现不同程度的 BM-MSCs 总量减少、增殖能力、自我更新能力等的异常^[28]。

因而不难推论,AA 患者的 BM-MSCs 自我更新及增殖能力低于正常人,更严重的是伴随着凋亡率的增加,BM-MSCs 这类骨髓基质细胞数目锐减,必然造成造血干细胞损伤易感性增加,因此 BM-MSCs 的这些变化极有可能加重 AA 的疾病进展。

3.2 AA 患者 BM-MSCs 分化潜能异常

BM-MSCs 在骨髓微环境中可以分化为成骨细胞和脂肪细胞,这是可以互相转化的两个可逆的调节,而骨髓逐步脂肪化则是 AA 最主要的一个病理特征。

岳寒等^[29]以脂蛋白脂酶(LPL)作为标志性基因,应用 PCR 技术检测其作为晚期脂肪形成标志在 AA 患者和正常人 BM-MSCs 中的表达差异,发现 AA 患者的 BM-MSCs 在诱导脂肪形成的过程中,早、中期(7 d、14 d) LPL 基因的表达较正常人明显增高,晚期(21 d)表达亦增加。提示 AA 患者 BM-MSCs 有更强的易成脂性,影响造血干细

细胞的增殖和分化,从而参与AA的发病。

程梅等^[27]分别用成骨诱导液及成脂肪诱导液对AA患者和对照组的BM-MSCs进行培养,经油红O及茜红素染色鉴定,发现AA患者的BM-MSCs成脂肪细胞分化诱导率高于对照组(85% vs 60%, $P<0.05$),而成骨细胞分化诱导率低于对照组(45% vs 65%, $P<0.05$);收集诱导后细胞在转录水平分别检测相关基因表达情况后,发现AA患者BM-MSCs成脂肪细胞相关基因PPAR γ mRNA、FABP4 mRNA表达水平上调而成骨细胞相关基因ALP mRNA和BGLAP mRNA的表达水平下调;Tripathy等^[30]通过RT-PCR和Western blot分析发现AA患者BM-MSCs脂联素和FABP4 mRNA及蛋白表达水平较正常对照高,而与成骨分化相关的骨桥蛋白基因表达水平较对照组则无明显差异;Li等^[12]在筛查验证基因表达谱时亦发现AA患者BM-MSCs与成脂肪信号通路相关的细胞因子表达水平较正常人上调;Xu等^[31]研究发现AA患者的BM-MSCs较正常对照相比,对成脂分化具有抑制作用的转录因子GATA-2表达降低,而PPAR γ 的表达则是明显上调的;El-Mahgoub等^[26]在儿童AA患者中亦发现类似的结果。以上这些研究结果表明:AA的BM-MSCs存在成脂肪细胞和成骨细胞分化失衡。因为成骨细胞是造血干细胞壁龛的重要组成细胞^[32],造血干细胞伴随成骨细胞同时增加或减少,成骨细胞的相对损失会导致造血受损^[33],因此推测BM-MSCs的分化潜能异常有可能会促使AA患者成骨细胞相对减少,骨髓脂肪化,进而引起造血干细胞壁龛减少,并最终导致AA患者造血功能衰竭。

4 AA患者BM-MSCs免疫调节功能紊乱

4.1 AA患者BM-MSCs对T淋巴细胞增殖活化的影响

近年来有大量实验证明AA患者BM-MSCs对淋巴细胞的增殖和活化的抑制作用减弱,使其成为AA发病的重要机制之一^[11,34]。Liu等^[23]通过PHA刺激的T淋巴细胞增殖实验、混合淋巴细胞培养(MLR)反应和T淋巴细胞周期检测比较正常志愿者和AA患者两组BM-MSCs对T淋巴细胞的抑制作用发现,正常的BM-MSCs对T淋巴细胞

增殖的抑制作用明显(均抑制至1%以下),而AA患者的BM-MSCs抑制增殖的能力存在明显缺陷(抑制率仅仅为61%和43%),且经免疫抑制剂治疗后,抑制率仍无明显改变。PHA刺激后的T淋巴细胞在加入正常志愿者BM-MSCs后,活化的T淋巴细胞被阻滞在G0/G1期,更少进入S期,而加入患者BM-MSCs后虽也能将T淋巴细胞阻滞在G0/G1期,但这种能力相对较弱。Bacigalupo等^[35]对重型再生障碍性贫血(SAA)患者与健康对照者的BM-MSCs在混合淋巴细胞培养反应(MLR)、PHA刺激的T淋巴细胞增殖实验对比发现相似的结果,并且这种缺陷在免疫抑制治疗后依然存在,只有在骨髓移植后才可能恢复。来自于SAA和NSAA患者BM-MSCs对T淋巴细胞的抑制作用存在差异,后者的BM-MSCs对活化T淋巴细胞的抑制作用的减弱不如前者显著,也许这能够用来说明为什么SAA患者的造血功能更难以恢复。值得注意的是,Xu等^[36]在对比34个儿童AA患者与正常对照来源的BM-MSCs在PHA刺激的T淋巴细胞增殖实验中的反应后,并没有发现Bacigalupo所发现的差异,二者对剂量依赖性的T细胞增殖抑制作用均存在且并没有明显的差异,两种不同的观察结果除了可能由于样本量的差异外,亦不排除儿童AA与成人AA发病机制可能存在差异性。

4.2 AA患者BM-MSCs对T淋巴细胞各亚群比例及功能的作用

目前认为AA的重要发病机制是免疫异常,即CD8⁺CTL功能亢进,CD4⁺Th1/Th2失衡及Treg细胞数目减少及功能缺陷^[37],多年的实验室研究证据表明,正常的脐带来源的间充质干细胞(hUC-MSCs)及BM-MSCs均具备对不同T细胞亚群的免疫调节功能,而与正常人相比,AA患者的BM-MSCs无论从质量还是数量都存在异常^[38-42],因此有学者推测这样的异常极有可能加重AA本就失衡的免疫调节系统^[11],BM-MSCs固有的免疫抑制作用的减低,必然会造成CD8⁺CTL功能亢进及Treg细胞功能减低,T淋巴细胞亚群的失衡而致机体免疫紊乱,其中功能亢进的CD8⁺CTL可以激活Fas凋亡途径,使得造血干/祖细胞大量凋亡。虽然在临床上已经有通过输注第三方供者来源的BM-MSCs使部分AA患者获得缓解并脱离血制品输注的病例报道^[43-46],然而这种治疗的作用机制

并不明确,不过可以肯定的是,AA患者BM-MSCs数量减少及功能缺陷不仅可使其支持造血功能缺陷,还会影响其对免疫细胞的抑制能力,致使体内T淋巴细胞和NK细胞异常活化损伤造血细胞,最终导致造血功能衰竭。

陈新等^[10]提取hUC-MSCs并在体外检测不同浓度hUC-MSCs对AA患者T淋巴细胞的抑制率发现,hUC-MSCs能调整AA患者倒置的CD4⁺/CD8⁺比例,抑制AA患者造血负调控因子IL-2、IFN- γ 分泌水平,且这种免疫调节作用依赖于hUC-MSCs的数量,这也在一定程度上从侧面反映了AA缺陷的BM-MSCs对T淋巴细胞的比例及功能的影响。

4.3 AA患者BM-MSCs与Treg细胞

研究证实AA患者体内的Treg细胞水平较正常人下降,而Th17细胞水平较正常人则是上升的,这种比例在免疫抑制治疗成功后可以逐渐恢复正常^[47-49],而正常MSCs也能通过其免疫调节作用使得Treg细胞数目扩增,其机制并非仅仅同传统的免疫抑制治疗一样针对自身反应性T细胞群,Yan等^[50]研究发现,MSC不仅增加Treg细胞IL-10、TGF- β 的分泌,还可以上调Treg细胞PD-1的表达,通过增强PD-1/B7-H1相互作用而放大Treg细胞的免疫调节功能,也有研究者构建了人类胚胎干细胞来源的MSCs诱导Treg细胞扩增的模型,即MSCs分泌外泌体囊泡(exosomes),并通过单核细胞表面TLR受体信号通路分泌细胞因子IL-10等,从而诱导CD4⁺T淋巴细胞分化成为Treg细胞^[51]。但AA患者缺陷的BM-MSCs是否影响Treg细胞发挥免疫调节作用,以及BM-MSCs是否能在治疗中与免疫抑制剂、骨髓生长因子等联合使用治疗AA,尚待进一步证实。

柴晔等^[52]将hUC-MSCs与AA患者外周血单个核细胞以不同比例共培养,发现能增加Foxp3 mRNA相对表达量及CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞占外周血CD4⁺T细胞比例,且hUC-MSCs能增加AA患者Treg细胞数量,其可能的机制是通过细胞间接触分泌可溶性细胞因子(TGF- β 、HGF等)诱导Treg细胞产生。刘增慧等^[53]利用流式细胞仪检测了13例SAA、17例慢性再生障碍性贫血(CAA)及10例健康对照者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg表达发现AA患者表达明显低于健康对照者;且SAA表达较CAA低;进一步对其中7例应用免

疫抑制治疗1年以上无效的AA患者进行亲缘供者BM-MSCs静脉回输(剂量 $(1\sim 10)\times 10^6/\text{kg}$,1次/周,4周为1疗程),检测对比回输治疗前后外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg表达发现,异体BM-MSCs治疗后AA患者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg表达上调,这种上调作用在应用BM-MSCs回输治疗第1个疗程后即可出现,第2个疗程CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞表达依然上升,最高时可接近正常水平,总体上逐步趋于稳定,但维持时间尚不确定。因此推测,MSCs治疗有可能上调AA患者CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞的表达,而更确切的临床结论则需要进一步更多临床病例的对比研究以及更长的临床进程研究。MSCs作为一种强大的免疫调节细胞,可能有诱导机体产生Treg细胞以维持免疫耐受,发挥免疫抑制作用,这一推测也为AA细胞治疗的进一步研究提供了理论依据。

综上所述,尽管目前也有学者认为AA患者的BM-MSCs与正常人相比,在表型、造血支持作用乃至免疫应答及抗炎作用方面均没有明显的差别^[54],但越来越多的实验室证据证明了BM-MSCs缺陷在AA的发病中极有可能起着重要的作用,无论是其生物学特点、基因表达谱的缺陷,抑或是增殖分化能力、造血支持作用乃至免疫调节功能的耗竭,都成为在免疫失衡基础上促使AA不断进展至难以恢复的重要节点,随着MSCs研究的不断深化,将恢复骨髓造血微环境为主要目的的MSCs输注可能成为AA治疗的新模式^[55-58]。

[参考文献]

- [1] Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia[J]. Blood, 2006, 108(8): 2509-2519.
- [2] Li JP, Zheng CL, Han ZC. Abnormal immunity and stem/progenitor cells in acquired aplastic anemia[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2010, 75(2): 79-93.
- [3] Zoumbos NC, Gascon P, Djeu JY, et al. Interferon is a mediator of hematopoietic suppression in aplastic anemia in vitro and possibly in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci U S A., 1985, 82(1): 188-192.
- [4] Verma A, Deb DK, Sassano A, et al. Cutting edge: activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway mediates cytokine-induced hemopoietic suppression in aplastic anemia[J]. J Immunol, 2002, 168(12): 5984-5988.
- [5] Sloand E, Kim S, Maciejewski JP, et al. Intracellular interferon- γ

- in circulating and marrow T cells detected by flow cytometry and the response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia[J]. *Blood*, 2002, 100(4): 1185-1191.
- [6] Zeng W, Chen G, Kajigaya S, et al. Gene expression profiling in CD34 cells to identify differences between aplastic anemia patients and healthy volunteers[J]. *Blood*, 2004, 103(1): 325-332.
- [7] Young NS, Bacigalupo A, Marsh JCW. Aplastic anemia: pathophysiology and treatment[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010, 16(1): S119-S125.
- [8] 吴艳, 于洁, 张磊, 等. 再生障碍性贫血患儿骨髓间充质干细胞体外造血支持作用的研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2008, 10(4): 455-459.
- [9] 张乐玲, 李府, 吴镇, 等. 再生障碍性贫血患儿骨髓间充质干细胞免疫调节特性和造血支持作用的研究[J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2008, 13(4): 145-148.
- [10] 陈新, 华建媛, 石庆之. 人脐带间充质干细胞对再生障碍性贫血 T 细胞的调节作用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(40): 7908-7912.
- [11] Li JP, Lu SH, Yang SG, et al. Impaired immunomodulatory ability of bone marrow mesenchymal stem cells on CD4⁺ T cells in aplastic anemia[J]. *Results Immunol*, 2012, 2: 142-147.
- [12] Li J, Yang S, Lu S, et al. Differential gene expression profile associated with the abnormality of bone marrow mesenchymal stem cells in aplastic anemia[J]. *PloS One*, 2012, 7(11): e47764.
- [13] De Lima M, McNiece I, Robinson SN, et al. Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal cell coculture[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367: 2305e15.
- [14] Bernardo ME, Fibbe WE. Safety and efficacy of mesenchymal stromal cell therapy in autoimmune disorders[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1266(1): 107-117.
- [15] Nimer SD, Leung DH, Wolin MJ, et al. Serum stem cell factor levels in patients with aplastic anemia[J]. *Int J Hematol*, 1994, 60(3): 185-189.
- [16] 杨诗梅, 陆世丰, 费小明, 等. 骨髓衰竭患者骨髓间充质干细胞细胞因子的表达变化及其意义[J]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(6): 1560-1563.
- [17] Kojima S, Matsuyama T, Kadera Y. Plasma levels and production of soluble stem cell factor by marrow stromal cells in patients with aplastic anaemia[J]. *Br J Haematol*, 1997, 99(2): 440-446.
- [18] 刘双, 滕清良. VEGF, bFGF 在再生障碍性贫血患者骨髓中的表达及意义[J]. *山东医药*, 2009, 49(11): 44-45.
- [19] Chen YF, Wu ZM, Xie C, et al. Expression level of IL-6 secreted by bone marrow stromal cells in mice with aplastic anemia[J]. *ISRN Hematol*, 2013, 2013: 986219.
- [20] 管英华, 谢杨虎, 魏晓巍, 等. 骨髓间充质干细胞与再生障碍性贫血的研究进展[J]. *中华全科医学*, 2012, 10(7): 1131-1132.
- [21] Di Maggio N, Mehrkens A, Papadimitropoulos A, et al. Fibroblast growth factor-2 maintains a niche-dependent population of self-renewing highly potent non-adherent mesenchymal progenitors through FGFR2c[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(7): 1455-1464.
- [22] Jiang SY, Xie XT, Jiang H, et al. Low expression of basic fibroblastic growth factor in mesenchymal stem cells and bone marrow of children with aplastic anemia[J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2014, 31(1): 11-19.
- [23] Liu L, Sun Z, Han Q, et al. T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells in patients with chronic aplastic anemia[J]. *Basic Clin Med*, 2007, 27(9): 1006-1010.
- [24] 黄永兰, 黄绍良, 黄科, 等. 再生障碍性贫血患儿骨髓间充质干细胞体外生物学特性及其与免疫抑制疗效的关系[J]. *中国当代儿科杂志*, 2008, 10(1): 9-13.
- [25] Chao YH, Peng CT, Harn HJ, et al. Poor potential of proliferation and differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells derived from children with severe aplastic anemia[J]. *Ann Hematol*, 2010, 89(7): 715-723.
- [26] El-Mahgoub ER, Ahmed E, Afifi RAEA, et al. Mesenchymal stem cells from pediatric patients with aplastic anemia: isolation, characterization, adipogenic, and osteogenic differentiation[J]. *Fetal Pediatr Pathol*, 2014, 33(1): 9-15.
- [27] 程梅, 张颢, 陶艳玲, 等. 成人再生障碍性贫血患者骨髓间充质干细胞增殖分化潜能: 与健康人的比较[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(32): 5936-5940.
- [28] Gurevitch O, Slavin S, Resnick I, et al. Mesenchymal progenitor cells in red and yellow bone marrow[J]. *Folia Biol (Praha)*, 2009, 55(1): 27-34.
- [29] 岳寒, 陈磊, 李静, 等. 再生障碍性贫血患者骨髓间充质干细胞生物学特性的初步研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(6): 20-24.
- [30] Tripathy NK, Singh SP, Nityanand S. Enhanced adipogenicity of bone marrow mesenchymal stem cells in aplastic anemia[J]. *Stem Cells Int*, 2014, 2014: 276862.
- [31] Xu Y, Takahashi Y, Wang Y, et al. Downregulation of GATA-2 and overexpression of adipogenic gene PPARgamma in mesenchymal stem cells from patients with aplastic anemia[J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(12): 1393-1399.
- [32] Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size[J]. *Nature*, 2003, 425(6960): 836-841.
- [33] Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, et al. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency[J]. *Blood*, 2004, 103(9): 3258-3264.
- [34] 李建平, 杨少光, 卢世红, 等. 再生障碍性贫血患者骨髓间充质干细胞对 CD4⁺ 细胞功能的影响[J]. *青海医学院学报*, 2012, 33(4): 217-223.
- [35] Bacigalupo A, Valle M, Podestà M, et al. T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia[J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(7): 819-827.
- [36] Xu Y, Takahashi Y, Yoshimi A, et al. Immunosuppressive activity of mesenchymal stem cells is not decreased in children with aplastic anemia[J]. *Int J Hematol*, 2009, 89(1): 126-127.
- [37] Kordasti S, Marsh J, Al-Khan S, et al. Functional characterization of CD4⁺ T cells in aplastic anemia[J]. *Blood*, 2012, 119(9): 2033-2043.
- [38] Guo Z, Zheng C, Chen Z, et al. Fetal BM-derived mesenchymal stem cells promote the expansion of human Th17 cells, but inhibit the production of Th1 cells[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(10): 2840-2849.
- [39] Chen K, Wang D, Du WT, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive

- activities through a PGE2-dependent mechanism[J]. Clin Immunol, 2010, 135(3): 448-458.
- [40] Gieseke F, Bohringer J, Bussolari R, et al. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells[J]. Blood, 2010, 116 (19): 3770-3779.
- [41] Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells[J]. Trends Mol Med, 2012, 18(2): 128-134.
- [42] Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation[J]. Annu Rev Pathol, 2011, 6: 457-478..
- [43] Jaganathan BG, Tisato V, Vulliamy T, et al. Effects of MSC co-injection on the reconstitution of aplastic anemia patient following hematopoietic stem cell transplantation[J]. Leukemia, 2010, 24(10): 1791-1795.
- [44] Wang H, Wang Z, Xue M, et al. Co-transfusion of haplo-identical hematopoietic and mesenchymal stromal cells to treat a patient with severe aplastic[J]. Cytotherapy, 2010, 12(4): 563-565.
- [45] Chao YH, Tsai C, Peng CT, et al. Cotransplantation of umbilical cord MSCs to enhance engraftment of hematopoietic stem cells in patients with severe aplastic anemia[J]. Bone Marrow Transp, 2011, 46(10): 1391-1392.
- [46] Wang H, Yan H, Wang Z, et al. Cotransplantation of allogeneic mesenchymal and hematopoietic stem cells in children with aplastic anemia[J]. Pediatrics, 2012, 129(6): e1612-1615.
- [47] de Latour RP, Visconte V, Takaku T, et al. Th17 immune responses contribute to the pathophysiology of aplastic anemia[J]. Blood, 2010, 116(20): 4175-4184 .
- [48] Scheinberg P, Young NS. How I treat acquired aplastic anemia[J]. Blood, 2012, 120(6): 1185-1196
- [49] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells[J]. Nature, 2006, 441(7090): 235-238.
- [50] Yan Z, Zhuansun Y, Chen R, et al. Immunomodulation of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells and its possible mechanism[J]. Exp Cell Res, 2014, 324(1): 65-74.
- [51] Zhang B, Yin Y, Lai RC, et al. Mesenchymal stem cell secretes immunologically active exosomes[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(11): 1233-1244.
- [52] 柴晔, 刘瑛, 孙媛媛, 等. 人脐带间充质干细胞对再生障碍性贫血患者 Treg 细胞的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2012, 27(9): 837-839.
- [53] 刘增慧, 肖扬, 蒋祖军, 等. 骨髓间充质干细胞上调再生障碍性贫血患者 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的临床研究 [J]. 实用医学杂志, 2011, 27(9): 1582-1585.
- [54] Bueno C, Roldan M, Anguita E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells from aplastic anemia patients preserve functional and immune properties and do not contribute to the pathogenesis of the disease[J]. Haematologica, 2014, 99(7): 1168-1175.
- [55] Si Y, Yang K, Qin M, et al. Efficacy and safety of human umbilical cord derived mesenchymal stem cell therapy in children with severe aplastic anemia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective case series of 37 patients[J]. Pediatr Hematol Oncol, 2014, 31(1): 39-49.
- [56] 徐丽昕, 曹永彬, 王志红, 等. 单倍体相合造血干细胞联合脐带血间充质干细胞移植治疗急性重型再生障碍性贫血的疗效观察 [J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(5): 1241-1245.
- [57] 闫洪敏, 王志东, 朱玲, 等. 多种来源造血干细胞移植治疗重型再生障碍性贫血 [J]. 中国组织工程研究, 2011, 15(10): 1884-1888.
- [58] Kim EJ, Kim N, Cho SG. The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation[J]. Exp Mol Med, 2013, 45(1): e2.

(本文编辑: 邓芳明)