

人脐带间充质干细胞移植治疗类风湿性关节炎的临床研究

杨奕^{1,2} 何晓¹ 郭韡¹ 朱明¹ 赵榕森¹ 刘重阳^{2*} 徐祥^{1*}

(¹第三军医大学第三附属医院(所)第一研究室, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验, 重庆 400042; ²第三军医大学第三附属医院(所), 风湿免疫科, 重庆 400042)

摘要 该研究基于部分类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者常规药物治疗无法达到临床缓解, 以及具有免疫调节能力的间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)可以治疗免疫功能紊乱疾病的研究背景, 评价人脐带MSC移植治疗RA的安全性和有效性。共纳入50例对常规药物反应较差的活动性RA患者, 接受间充质干细胞移植(MSC transplantation, MSCT)。结果显示, 在MSCT后12个月, 根据EULAR反应标准评价治疗效果, 发现具有良好或中度反应的患者($n=30$)表现为外周血调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)细胞的百分比增加, 辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)比例降低, 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白介素-6(interleukin-6, IL-6)水平降低, IL-10水平增加, 而无反应的患者($n=20$)没有观察到上述现象。移植治疗没有任何严重不良事件发生。该研究结果提示, 对于部分常规治疗反应差的活动性RA患者, 同种异体MSCT可以改善疾病活动度与血清学指标, 并恢复机体免疫稳态。

关键词 间充质干细胞; 类风湿关节炎; 干细胞移植; 免疫调节; 临床试验

Clinical Evaluation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell for the Treatment of Rheumatoid Arthritis

Yang Yi^{1,2}, He Xiao¹, Guo Wei¹, Zhu Ming¹, Zhao Rongsen¹, Liu Chongyang^{2*}, Xu Xiang^{1*}

(¹First Department, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Third Affiliated Hospital & Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400044, China; ²Department of Rheumatology, Third Affiliated Hospital & Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract The part of rheumatoid arthritis (RA) patients with conventional drug treatment can not achieve clinical remission, and mesenchymal stem cells (MSC) with immunomodulatory ability could treat immune dysfunction diseases. Based on above facts, the present study evaluated the safety and efficacy of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSC) in the treatment of rheumatoid arthritis (RA). A total of 50 patients with persistently active RA but poor responses to conventional medication underwent MSCT. The results demonstrated that 12 months after MSCT, outcomes of the patients were evaluated according to the EULAR response criteria, those with good or moderate response were put into the response group ($n=30$), and those with no response were put into the no-response group ($n=20$). For the response group, peripheral regulatory T cells increased while the percentage of

收稿日期: 2017-03-20 接受日期: 2017-04-12

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81571912、81372027)和重庆市自然科学基金(批准号: cstc2014jcyjys10002、cstc2015shmszx120108)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68757746, E-mail: dpyyly@126.com; Tel: 023-68757412, E-mail: xiangxu@ymail.com

Received: March 20, 2017 Accepted: April 12, 2017

This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (Grant No.81571912, 81372027) and the Natural Science Foundation of Chongqing (Grant No.cstc2014jcyjys10002, cstc2015shmszx120108)

*Corresponding authors. Tel: +86-23-68757746, E-mail: dpyyly@126.com; Tel: +86-23-68757412, E-mail: xiangxu@ymail.com

网络出版时间: 2017-05-19 17:48:55 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170519.1748.016.html>

Th17 cells decreased, the levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in serum decreased, and interleukin-10 increased after MSCT. These were not observed in the no-response group. No serious adverse events were reported for either group. It is suggested that allogeneic MSCT ameliorated disease activity, improved serological markers and restored immune homeostasis, for a portion of patients with active RA refractory to conventional treatment.

Keywords mesenchymal stem cell; rheumatoid arthritis; stem cell transplantation; immunomodulation; clinical trial

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种自身免疫性慢性滑膜炎,其特征为手、足小关节对称性、侵袭性多关节炎。滑膜关节损伤会随时间进展而出现功能障碍,最终导致残疾,同时常伴有关节外器官受累。RA的病理主要表现为滑膜细胞增生、间质炎性细胞浸润、微血管新生及软骨和骨组织的破坏等。遗传和环境因素共同导致机体免疫稳态的失衡是系统性滑膜炎和RA发生的主要机制^[1]。

根据Klarenbeek等^[2]的研究结果,508例RA患者分别使用激素、改变病情的抗风湿药(disease-modifying antirheumatic drugs, DMARDs)或生物制剂治疗,跟踪随访5年,有超过50%的RA患者治疗后未达到临床缓解。近10年来,尽管生物制剂的研发取得了一些进步,但仍有一些问题尚未解决:(1)部分患者不能耐受生物制剂;(2)生物制剂价格昂贵并且会减弱机体免疫力,增加感染性疾病和肿瘤发生的风险。因此,迫切需要为RA患者寻找新的治疗方法。

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是来自骨髓或其他结缔组织(如脐带、脂肪、胎盘、牙龈等)的多能细胞,具有自我更新和分化成间质组织的能力^[3]。它们除了具有可分化为骨、软骨、脂肪、肌肉等多种组织细胞分化能力,在许多疾病研究中观察到MSC还具有免疫调节能力^[4-11]。MSC具有很强的免疫可塑性,在特定的微环境下,可通过分泌不同细胞因子从而发挥抑制炎症或促进炎症的功能,MSC还可以通过诱导调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)的分化,间接抑制活化T淋巴细胞和外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)^[12-13]的增殖,并且抑制辅助性Th17细胞(Th17)功能^[14-15],进而对RA免疫稳态失衡起调节作用^[16]。基于MSC具有独特的免疫调节能力,使它们成为可用于移植抗宿主病(graft-versus-host disease, GvHD)^[17]和自身免疫疾病[如系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)^[18]等]免疫功能紊乱调节的理想候选细胞。然而,对于MSC移植治疗RA的临床疗效存在很大的个体差异^[19-20],目前

原因仍不清楚。

本研究旨在评估人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cell, hUC-MSC)移植治疗RA的安全性和有效性,为其治疗RA的机制研究和进一步临床应用提供数据。

1 对象与方法

1.1 实验设计

I/II期临床干预性试验。

1.2 患者纳入标准

所有患者符合美国风湿病学会1987的RA分类标准,没有其他自身免疫性或全身性疾病。根据“赫尔辛基宣言”提供了书面知情同意书。本研究在Chictr.org(标识符:ChiCTR-ONC-16008770)中注册,由中国人民解放军第三军医大学大坪医院伦理委员会批准。登记的RA患者对常规临床治疗策略[包括DMARDs、非甾体抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)、类固醇和生物制剂]反应差,或不能耐受其严重的副作用,并且仍然处于疾病活动中。

1.3 hUC-MSC体外培养制备方案

hUC-MSC由本实验室采用本院妇产科健康孕产妇脐带贴壁法分离培养备用。用间充质干细胞无血清培养基(Gibco)置于37℃、5% CO₂孵箱中培养。大约3 d细胞生长汇合至90%以上,后用0.25%胰蛋白酶/EDTA消化,1:3传代间充质干细胞,无血清培养基继续培养。采用流式细胞术及三系分化鉴定hUC-MSC。本实验所用hUC-MSC为3~5代。

1.4 治疗方案

hUC-MSC由大坪医院的细胞生物治疗中心提供,采用细胞贴壁法提取^[21]并满足临床使用标准^[22]。患者通过静脉输注含1%白蛋白的生理盐水稀释的hUC-MSC(1×10^6 细胞/mL)的混合液,用量为 1×10^6 细胞/kg体重。如果输注后患者疾病状况持续改善,则会依据药物减量原则,逐渐减少常规药物,依次为强的松、NSAIDs和DMARDs。治疗方案的调整由风

湿病专家组会诊后实施。

1.5 评估疾病状态

所有患者在治疗后第1月每周1次, 2~6月每月1次, 之后每3个月1次, 进行随访。在这些时间点, 检查和记录患者的不良事件、一般身体状况、血清学指标、Treg和Th17细胞。记录患者的基线和每次随访时的28个关节疾病活动评分(disease activity score of 28 joints, DAS28)^[23]和健康评估问卷健康状况问卷(health assessment questionnaire, HAQ)^[24]。

1.6 实验室检查

通过使用购自Euroimmun(Lübeck, Germany)的间接免疫荧光试剂盒测定抗环瓜氨酸肽抗体(anti-CCP)和类风湿因子(rheumatoid factor, RF)的血清水平。通过流式细胞术(NovoCyte TM)分析外周血Treg、Th17细胞的百分比。针对分化群集4(cluster of differentiation 4, CD4)、CD25和叉头盒P3(forkhead box P3, Foxp3)的单克隆抗体购自eBioscience公司。使用NovoExpress软件分析流式细胞术数据。使用多重细胞因子试剂盒定量以下细

胞因子: 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-2R、IL-6、L-8和IL-10。根据说明书进行测定, 并用Luminex 200系统(Millipore Corporation公司)进行测量。

1.7 主要观察指标

包括疾病活动度评分(DAS28)、健康评估问卷健康状况问卷、C反应蛋白、血沉、Treg、Th17、炎症因子水平、anti-CCP和RF。

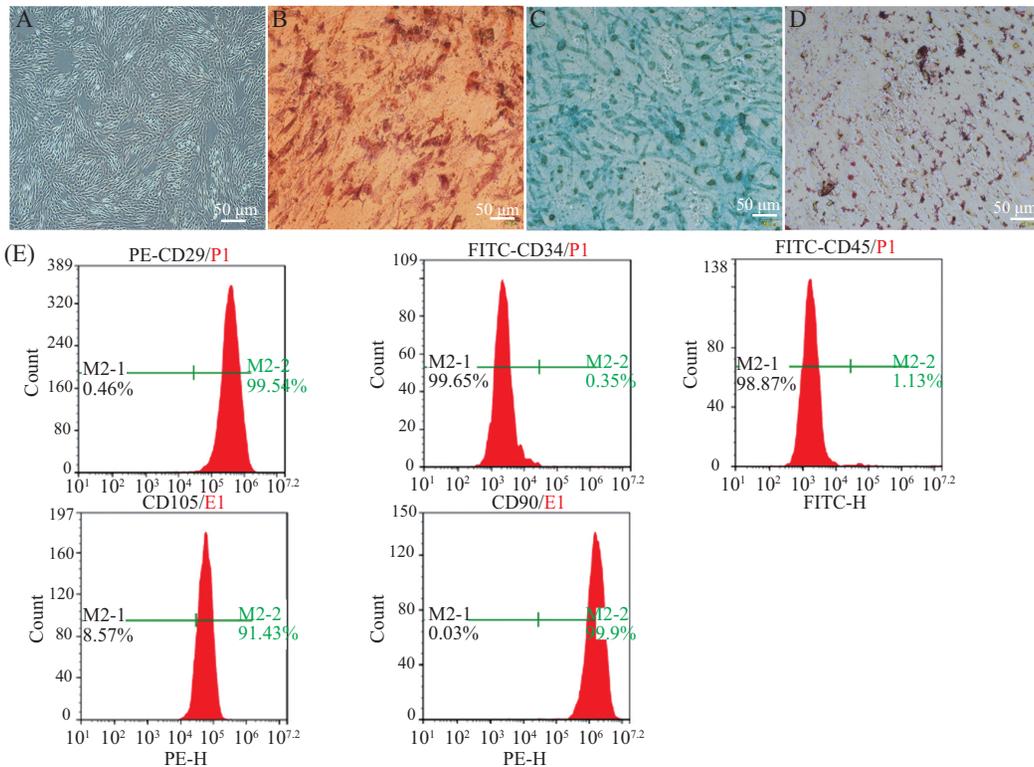
1.8 统计分析

所有统计检验均为双侧, 显著性水平设为 $P < 0.05$ 。所有分析均通过SPSS 17.0(SPSS, Inc.)进行, 数据表示为平均值 \pm 标准偏差(S.D.)。

2 结果

2.1 hUC-MSc体外诱导三系分化及表面标志鉴定

倒置显微镜下观察可见, 正常培养的hUC-MSc呈梭形且呈漩涡样排列(图1A)。体外诱导hUC-MSc分别向骨、软骨、脂肪分化, 可见hUC-MSc成



A: 正常生长的hUC-MSc; B: hUC-MSc成骨分化, 红色为钙沉积(茜素红染色); C: hUC-MSc成软骨分化, 蓝色为糖胺聚糖(阿尔新蓝染色); D: hUC-MSc成脂肪分化, 红色为细胞内脂滴(油红O染色); E: 流式细胞术鉴定hUC-MSc的表面标志物。

A: hUC-MSc in normal condition; B: osteogenic differentiation of hUC-MSc; C: chondrogenic differentiation of hUC-MSc; D: adipogenic differentiation of hUC-MSc; E: detection of surface markers of hUC-MSc by flow cytometry.

图1 hUC-MSc培养和鉴定

Fig.1 Culture and identification of hUC-MSc

功分化为具有骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞特征的细胞(图1B~图1D)。流式细胞术检测结果表明,第3代hUC-MSC表面标志为CD29⁺、CD34⁻、CD45⁻、CD90⁺和CD105⁺(图1E)。

2.2 安全性评价

在hUC-MSC输注期间或之后没有发生急性严重不良事件,3名患者在输注后发生寒战或发热($\leq 39^{\circ}\text{C}$),未经任何处理后在3 h内自行恢复。没有患者发生移植物抗宿主病GvHD,并且没有严重感染发生。在常规血液检查、肝和肾功能分析、胸部X光检查、尿液分析或心电图均未发现明显异常。在RA患者随访期间,除疾病相关状况改变外,未发现其他可能与hUC-MSC输注相关的不良事件发生。

2.3 疾病活动度评估

基于患者的报告,50例患者中有4例关节疼痛和肿胀在hUC-MSC治疗后1周即得到缓解,伴有睡眠和疲劳感的改善。在随访期间,共30例患者的临床症状得到改善,在间充质干细胞移植(mesenchymal stem cells transplantation, MSCT)后疾病活动度和药物剂量均减少,但其他20例没有上述

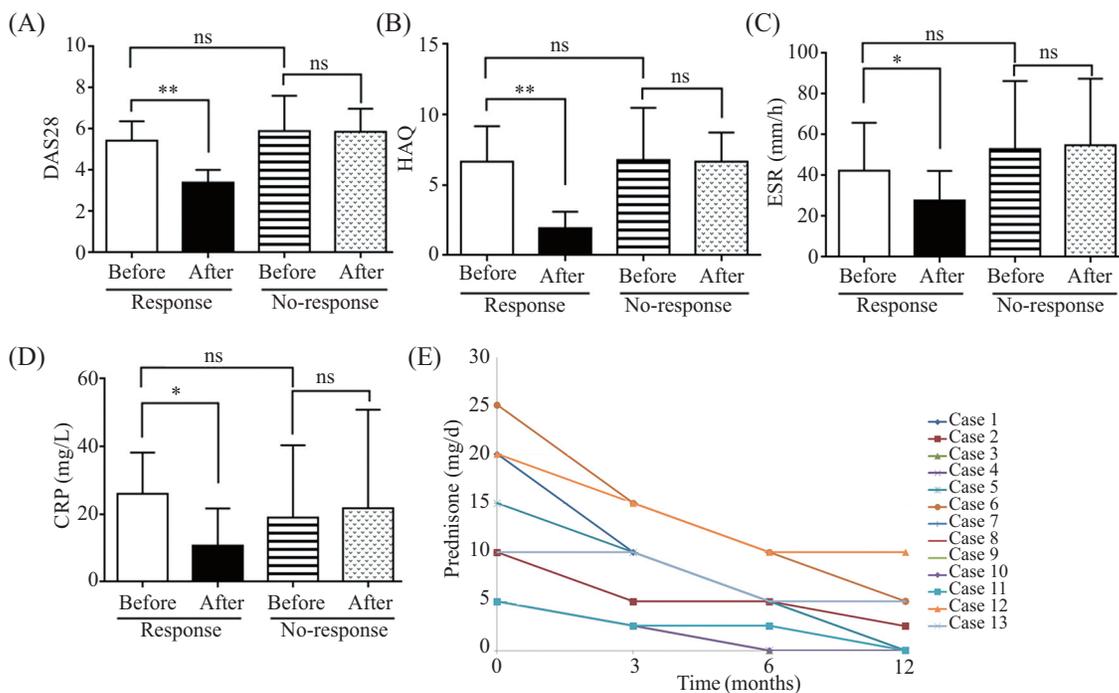
改善。根据基于DAS28的EULAR反应标准^[25],我们将患者分为显示良好或中度反应的有效组($n=30$)和显示无反应的无效组($n=20$),两组患者在基线时未检测到显著差异(表1)。MSCT后12个月,伴随着CRP和ESR的降低,有效组的HAQ和DAS28显著降低(图2A~图2D),表现出疾病状态的改善。此外,有效组中13例患者的泼尼松用量在MSCT后逐步降低(图2E),而无效组均未见上述疾病活动度改善。

2.4 自身抗体谱的血清学结果

为了进一步研究MSCT治疗效果,在MSCT前后检测患者抗环瓜氨酸肽抗体(anti-CCP)和类风湿因子(RF)。有效组的anti-CCP抗体与基线相比在移植后12个月显著降低($P<0.05$,图3A),尽管RF水平也有所降低但这些变化没有发现具有统计学差异(图3B)。

2.5 免疫稳态评估

RA是一种严重的、进行性的、病因未知的全身炎症性疾病。RA的进展与免疫系统的紊乱密切相关,其主要表现为免疫稳态失衡。进一步检测发现,MSCT后有效组外周血(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)Treg的百分比增加,而无效组中没有明显变化(图3C)。



A: 评价DAS28评分; B: 测定HAQ评分; C: 评价ESR的血清水平; D: 测定CRP的血清水平; E: 有效组MSCT后泼尼松剂量的变化。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。ns: 无显著差异。CRP: C-反应蛋白; ESR: 红细胞沉降率。

A: DAS28 score was evaluated; B: HAQ score was determined; C: serum level of ESR was evaluated; D: serum level of CRP was determined; E: the changes of prednisone dosage after the MSCT in the response group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. ns: no significant differences. CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate.

图2 疾病活动的评估

Fig.2 Assessment of disease activity

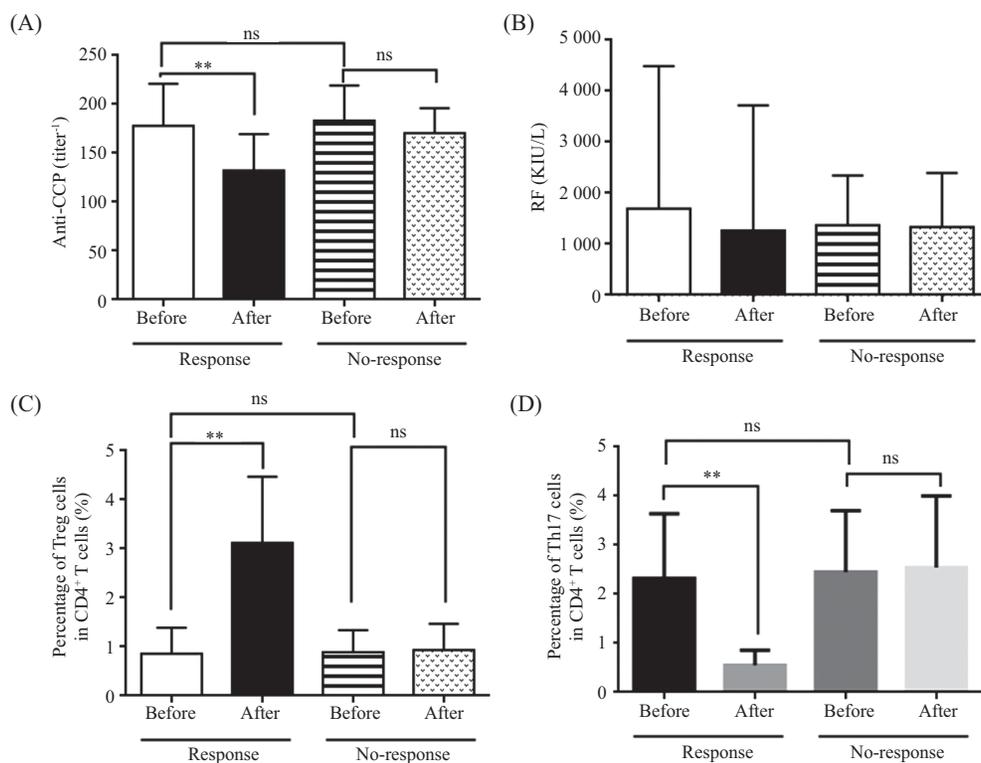
表1 患者临床流行病学数据

Table 1 Clinical and demographic characteristics of the patients enrolled in the study

项目	有效组	无效组
Item	Effective group	Invalid group
<i>n</i>	30	20
Rate of female (%)	28 (93.30)	19 (95.00)
Average age (year old)	50.70	51.20
Mean course of disease (year old)	4.00±2.75	3.94±3.79
DAS28	5.45±0.93	5.90±1.72
HAQ	6.67±2.50	6.78±3.70
Rate of history of medication (%)		
DMARDs	30 (100)	20 (100)
Biologics	7 (23.30)	6 (30.00)
NSAIDs	30 (100)	20 (100)
Steroids	13 (43.30)	12 (60.00)

HAQ: 健康评估问卷; DAS28: 28关节疾病活动评分; DMARDs: 疾病缓解性抗风湿药; NSAIDs: 非甾体抗炎药。

HAQ: health assessment questionnaire; DAS28: disease activity score of 28 joints; DMARDs: disease-modifying anti-rheumatic drugs; NSAIDs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs.



A: anti-CCP的血清水平; B: RF的血清水平; C: CD4⁺T细胞中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg的百分比; D: CD4⁺T细胞中Th17细胞的百分比。ns: 无显著差异, **P<0.01。anti-CCP抗环瓜氨酸肽抗体; RF: 类风湿因子。

A: serum level of anti-CCP; B: serum level of RF; C: the percentage of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells of CD4⁺T cells; D: the percentage of Th17 cells of CD4⁺T cells. ns: no significant differences, **P<0.01. Anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide antibody; RF: rheumatoid factor.

图3 自身抗体谱和免疫功能的血清学结果

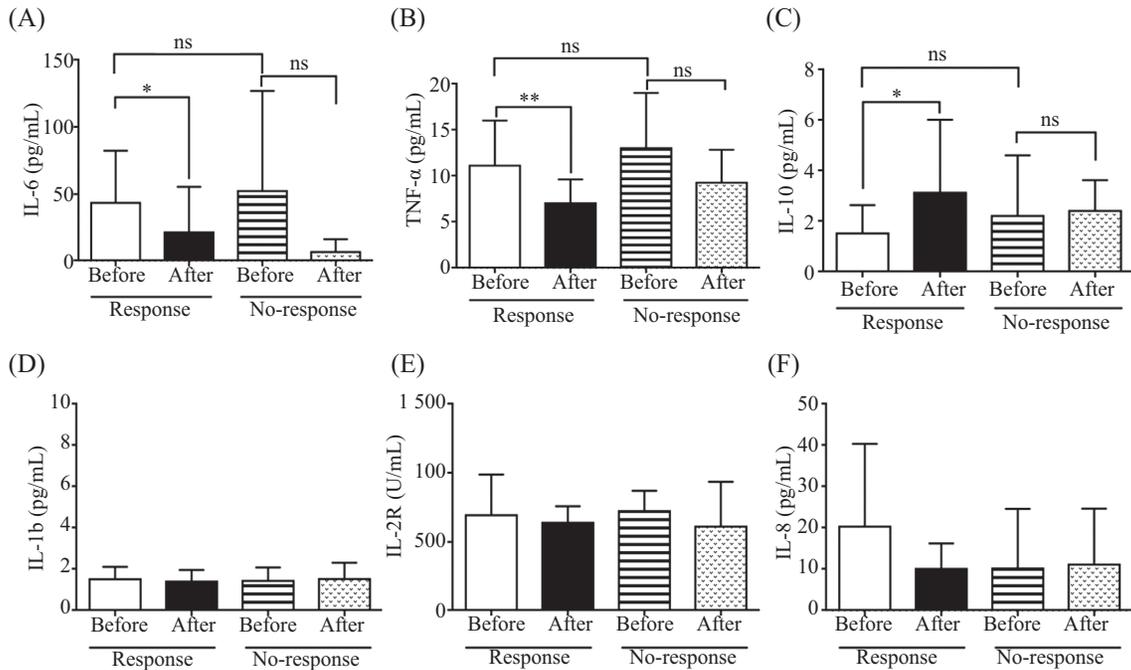
Fig.3 Serological findings of autoantibody profile and immune function

此外, 在所有患者中观察到免疫状态失衡指标Th17比例保持较高水平, 而在MSCT后有效组中则逐渐降低(图3D), 但无效组仍处于较高水平, 反应出机体

高炎症的疾病活动状态。

2.6 炎症微环境评估

作为免疫失衡的结果, RA患者常常以高炎症微



A: 白细胞介素6(IL-6)的血清水平; B: 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的血清水平; C: 白介素-10; D: 白介素-1 β ; E: 白介素-2R; F: 白介素-8; ns: 无显著性差异, * P <0.05, ** P <0.01。

A: serum level of interleukin interleukin-6 (IL-6); B: serum level of tumor necrosis factor-alpha (TNF-a); C: serum level of interleukin-10 (IL-10); D: serum level of interleukin interleukin-1b (IL-1 β); E: serum level of interleukin-2 receptor (IL-2R); F: serum level of interleukin-8 (IL-8). ns: no significant differences, * P <0.05, ** P <0.01.

图4 炎症微环境评估结果

Fig.4 The evaluated results of inflammatory microenvironment

环境为特征, 包括高水平的白细胞介素6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)(图4A和图4B)以及低白细胞介素10(IL-10)(图4C)等。hUC-MSC治疗后, 有效组患者表现出免疫稳态的恢复, 即IL-10增加(图4C)的同时IL-6和TNF- α 水平的降低(图4A和图4B)。但是IL-1 β 、IL-2R和IL-8没有观察到明显变化(图4D~图4F)。

3 讨论

类风湿性关节炎(RA)是由多种病因引起的以滑膜炎为特征的常见风湿免疫性疾病之一。2015年统计结果显示, 全球RA患者总数超过700万, 这些患者由于疾病的进展或治疗效果差, 最终会出现关节功能障碍和肢体残疾, 给家庭和社会带来沉重的负担。目前, 部分RA患者对常规药物治疗反应较差或不能耐受, 同时由于RA复杂的发病机制及众多导致病情进展的因素以及常规药物的局限性, 促使我们去寻求一种新的治疗方法, 不仅仅着眼于某一类因子、某一条通路、某一种细胞, 而是通过采用整体治疗的方式纠正机体紊乱的免疫系统, 从而恢复

免疫稳态, 从“根本上”治疗疾病, 改善病情。

MSC具有的多向分化潜能、低免疫原性和免疫调节能力等特性, 使其成为多种疾病细胞治疗的首选。作为细胞药物, 理想的种子细胞应具备的条件如下。取材容易、对机体损伤小; 体外培养过程中有较强的繁殖能力, 易于扩增; 植入机体后能够较快适应环境。综合而言, MSC较好地符合这些要求。而且, 近年来研究发现, MSC不仅具有组织再生修复功能, 还具有强烈的免疫抑制作用, 被认为无论作为干细胞进行组织修复, 还是单独作为免疫抑制剂治疗GvHD等免疫相关疾病, 都具有良好的应用前景。特别是在免疫调节失衡导致的炎症性相关疾病的治疗中表现出良好的效果。此外, 通过发挥其组织修复能力还能加速由创伤等因素导致的组织损伤。研究证实, 在系统性硬化治疗中, 对指端溃疡组织的修复有明显的作用^[26]。在原发性干燥综合征的治疗中观察到自身抗体滴度显著降低^[27]。以上研究均可提示, MSC移植后可以降低患者体内炎症水平, 促进组织修复。因此研究者认为, 干细胞在“炎症级联反应”的阻断及组织创面修复治

疗中具有非常大的应用前景。

在RA样自身免疫性疾病中发现骨髓中MSC数量减少,随着疾病的进展而减少得更为严重^[28]。最近的研究也观察到, MSC能够改善RA患者和关节炎动物模型疾病状态^[29-30],其可能机制为外源性MSC在体内通过分化为成骨、脂肪和软骨细胞替代原有受损组织细胞。此外, MSC还可分泌多种营养因子,促进局部组织修复与再生。更为重要的是, MSC在高炎症微环境作用下通过其免疫调节能力,发挥免疫抑制的作用,改善局部微环境的炎症水平,为局部组织的再生与修复创造良好的环境,同时MSC通过与机体的免疫细胞相互作用,从根本上改善了RA患者失衡的免疫系统,为RA患者MSC移植治疗后长期稳定奠定了基础。然而, MSC在治疗RA中的确切作用机制在许多方面仍不清楚。

Th17是一群以高分泌IL-17为特征的CD4⁺T细胞,可分泌IL-17A、IL-6、IL-17F和TNF- α 等炎症细胞因子,在机体抗菌、介导慢性炎症、自身免疫病及肿瘤等过程中发挥重要作用。研究发现,具有强力促炎效应的IL-17能够通过多种途径参与RA的关节炎症和进行性破坏作用^[31]。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞是一类具有免疫抑制功能的CD4⁺T细胞,可通过直接细胞与细胞接触以及分泌抑制性细胞因子等途径发挥抗炎和维持免疫稳态的作用。研究发现, Foxp3敲除的小鼠由于缺乏Treg会发生多器官受累的自身免疫性疾病^[32]。因此, Th17/Treg的平衡对于维持机体正常的免疫应答和防止自身免疫性疾病的发生具有重要意义。

本研究有以下五点发现。(1)异基因MSC移植是安全的,因为在MSCT期间或之后没有观察到严重不良事件。(2)MSCT对一些RA患者显示良好的效果,体现在DAS28和HAQ评分以及CRP和ESR的降低。(3)MSCT还可改善有效组的自身抗体谱。(4)MSCT治疗RA的潜在机制可能是MSC通过发挥其抗炎或免疫调节能力,纠正失衡的Th17/Treg,从而恢复了机体免疫平衡和免疫耐受。(5)外周血检测的IL-1 β 、IL-2R和IL-8等炎症因子在治疗前后变化不大,甚至患者的基线水平都较低,这可能与许多理论提出的RA患者外周血的部分炎症因子水平较低,而局部病变组织的炎症因子水平表达较高有关。因此,评估治疗效果不应仅从一些炎症细胞因子着手,需要进一步探索方便、易行、敏感和特异的新检测指

标,有利于临床早期评估疾病进展和预后。

本研究招募了50位RA患者,并用来自相同供体的人脐带MSC治疗。然而,结果差异很大,约3/5的患者获得了较好的结果,而2/5的患者对治疗无明显反应。进一步分析造成治疗结果差异的原因,我们着眼于MSC对宿主微环境产生的反应以及其在调节机体免疫稳态中的作用。许多研究发现, MSC并非能持续保持免疫抑制能力,而需要在宿主炎症微环境的刺激下激活其免疫调节能力^[33]。这一观点是建立在抗 γ 干扰素(interferon-gamma, IFN- γ)受体抗体能阻断MSC的免疫抑制作用上的。炎症刺激诱导的MSC能分泌高水平的可溶性分子来调节免疫稳态,这些分子包括2,3-双加氧酶吡咯啉啉胺(indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase, IDO)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)、TNF- α 、肿瘤坏死因子诱导型基因-6蛋白(tumor necrosis factor-inducible gene-6 protein, TSG-6)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、C-C模体(motif)、趋化因子配体2(chemokine C-C motif ligand 2, CCL2)、IL-10等^[34]。来自炎症性疾病的动物模型数据提示,在炎症反应的发生后使用MSC治疗效果最佳。在GvHD小鼠模型中发现,在骨髓移植的同时使用MSC治疗未发现保护效应,而骨髓移植后第3、8或20 d时使用MSC治疗能明显减轻移植抗宿主反应^[35]。由于不同RA患者MSCT后治疗反应有差异,因此,迫切需要预测对MSCT后疗效反应的生物标志物。有研究提示, MSC要持续发挥免疫调节作用需要在炎症微环境的刺激下才能进行^[36]。Dander等^[37]确定了在急性GvHD中,肿瘤坏死因子受体I(tumor necrosis factor alpha receptor I, TNFRI)和白细胞介素-2受体 α (IL-2R α)两种生物标志物可以解释患者的疗效反应,即在MSC输注前升高的患者中两种因子的水平持续降低与较好的疗效呈正相关。我们的结果与其他研究结果一致,表明MSC需要被炎症微环境激活后才可能发挥其治疗效果。因此,我们推测, MSC的疗效可能与宿主的微环境相关,下一步继续扩大对宿主微环境及免疫功能的筛查,有望找到MSCT治疗结果差异的本质原因,从而为临床上更好地应用MSC治疗RA提供理论依据。

参考文献 (References)

- 1 Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. Lancet

- 2010; 376(9746): 1094-108.
- 2 Klarenbeek NB, Guler-Yuksel M, van der Kooij SM, Han KH, Runday HK, Kerstens PJ, *et al.* The impact of four dynamic, goal-steered treatment strategies on the 5-year outcomes of rheumatoid arthritis patients in the BeSt study. *Ann Rheum Dis* 2011; 70(6): 1039-46.
 - 3 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
 - 4 Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2006; 36(10): 2566-73.
 - 5 Siegel G, Schafer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2009; 87(9 Suppl): S45-9.
 - 6 Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, *et al.* Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005; 129(1): 118-29.
 - 7 Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: A new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol* 2007; 28(5): 219-26.
 - 8 Sehmi R, Baatjes AJ, Denburg JA. Hemopoietic progenitor cells and hemopoietic factors: Potential targets for treatment of allergic inflammatory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003; 2(4): 271-8.
 - 9 Denburg JA, Inman MD, Wood L, Ellis R, Sehmi R, Dahlback M, *et al.* Bone marrow progenitors in allergic airways diseases: Studies in canine and human models. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113(1/2/3): 181-3.
 - 10 Sehmi R, Denburg JA. Haemopoietic mechanisms in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(1): 1-3.
 - 11 Denburg JA, Inman MD, Sehmi R, Uno M, O'Byrne PM. Hemopoietic mechanisms in allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 117(3): 155-9.
 - 12 Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105(4): 1815-22.
 - 13 Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101(9): 3722-9.
 - 14 Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, *et al.* Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol* 2008; 36(3): 309-18.
 - 15 Ghannam S, Pene J, Moquet-Torcy G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol* 2010; 185(1): 302-12.
 - 16 Wang D, Feng X, Lu L, Konkel JE, Zhang H, Chen Z, *et al.* A CD8 T cell/indoleamine 2,3-dioxygenase axis is required for mesenchymal stem cell suppression of human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66(8): 2234-45.
 - 17 Le Blanc K, Rasmuson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363(9419): 1439-41.
 - 18 Rafei M, Campeau PM, Aguilar-Mahecha A, Buchanan M, Williams P, Birman E, *et al.* Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. *J Immunol* 2009; 182(10): 5994-6002.
 - 19 Liang J, Li X, Zhang H, Wang D, Feng X, Wang H, *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in patients with refractory RA. *Clin Rheumatol* 2012; 31(1): 157-61.
 - 20 Wang L, Wang L, Cong X, G Liu, Zhou J, Bai B, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: Safety and efficacy. *Stem Cells Dev* 2013; 22(24): 3192-202.
 - 21 Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, *et al.* Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 2006; 91(8): 1017-26.
 - 22 Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7(5): 393-5.
 - 23 van Gestel AM, Haagsma CJ, van Riel PL. Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. *Arthritis Rheum* 1998; 41(10): 1845-50.
 - 24 Pincus T, Swearingen C, Wolfe F. Toward a multidimensional health assessment questionnaire (MDHAQ): Assessment of advanced activities of daily living and psychological status in the patient-friendly health assessment questionnaire format. *Arthritis Rheum* 1999; 42(10): 2220-30.
 - 25 van Riel PL, Renskers L. The disease activity score (DAS) and the disease activity score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2016; 101(5): 40-4.
 - 26 Scott DL, Smolen JS, Kalden JR, van de Putte LB, Larsen A, Kvien TK, *et al.* Treatment of active rheumatoid arthritis with leflunomide: Two year follow up of a double blind, placebo controlled trial versus sulfasalazine. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(10): 913-23.
 - 27 Djouad F, Fritz V, Apparailly F, Louis-Plence P, Bony C, Sany J, *et al.* Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52(5): 1595-603.
 - 28 Sullivan C, Murphy JM, MD Griffin, Porter RM, Evans CH, O'Flatharta C, *et al.* Genetic mismatch affects the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells *in vitro* and their ability to influence the course of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012; 14(4): R167.
 - 29 Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* 2012; 33(3): 136-43.
 - 30 Dander E, Lucchini G, Vinci P, Introna M, Masciocchi F, Perseghin P, *et al.* Mesenchymal stromal cells for the treatment of graft-versus-host disease: Understanding the *in vivo* biological effect through patient immune monitoring. *Leukemia* 2012; 26(7): 1681-4.
 - 31 Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; 201(2):

- 233-40.
- 32 Ivanov I, McKenzie B, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 2006; 126(6): 1121-33.
- 33 Krampera M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': A multistep process. *Leukemia* 2011; 25(9): 1408-14.
- 34 Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* 2012; 33(3): 136-43.
- 35 Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, *et al.* IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol* 2008; 38: 1745-55.
- 36 Christopeit M, Schendel M, Föll J, Müller LP, Keysser G, Behre G. Marked improvement of severe progressive systemic sclerosis after transplantation of mesenchymal stem cells from an allogeneic haploidentical-related donor mediated by ligation of CD137L. *Leukemia* 2008; 22: 1062-4.
- 37 Xu J, Wang D, Liu D, Fan Z, Zhang H, Liu O, *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjögren syndrome. *Blood* 2012; 120(15): 3142-51.