

doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2024.04.001

· 论著/基础免疫学 ·

脐带来源间充质干细胞抑制巨噬细胞M1极化

王晓旭¹ 李超然¹ 王惠² 杨春娟¹ 刘凤霞³ 徐栋花^{2,4}

(1. 潍坊医学院临床医学院, 潍坊 261053; 2. 潍坊医学院第一附属医院中心实验室, 潍坊 261041; 3. 潍坊医学院第一附属医院过敏反应科, 潍坊 261041; 4. 潍坊医学院第一附属医院风湿免疫科, 潍坊 261041)

中图分类号 R392.1 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2024)04-0673-07

[摘要] 目的:探究人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)对巨噬细胞M1/M2极化的作用。方法:将hUC-MSCs与佛波酯(PMA)诱导分化的巨噬细胞样细胞(pTHP-1巨噬细胞)共培养后进行转录组测序分析,筛选差异表达基因,进一步进行GO及KEGG富集分析。细胞增殖实验(CCK-8和EdU)分析hUC-MSCs对pTHP-1细胞增殖的影响。流式细胞术检测hUC-MSCs对LPS刺激的pTHP-1巨噬细胞炎症因子TNF- α 表达及抑炎因子IL-10表达的影响。qRT-PCR及流式细胞术探究hUC-MSCs对pTHP-1巨噬细胞M1/M2相关分子表型的作用。**结果:**转录组测序数据分析发现hUC-MSCs与pTHP-1细胞共培养后M1相关基因TNF- α ($P<0.05$)、HLA-DRA($P<0.01$)明显下调,M2相关基因ARG1($P<0.05$)明显上调,提示hUC-MSCs抑制巨噬细胞向M1表型极化。GO和KEGG富集分析提示这些表达失调的基因参与调控炎症与免疫应答。hUC-MSCs抑制pTHP-1巨噬细胞增殖,且抑制TNF- α 表达($P<0.001$),促进IL-10表达($P<0.001$)。qRT-PCR及流式细胞术分析发现,hUC-MSCs共培养后,pTHP-1细胞HLA-DRA($P<0.05$)和CD68($P<0.01$) mRNA表达明显下调,且CD14⁺CD11c⁺M1型细胞比例下调,而CD163($P<0.001$)和CD206($P<0.001$) mRNA表达及CD14⁺CD163⁺M2型细胞比例明显上调。**结论:**hUC-MSCs体外抑制巨噬细胞向M1促炎表型极化,诱导向M2抗炎表型极化。

[关键词] 脐带间充质干细胞;pTHP-1;转录组测序;巨噬细胞;极化**Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells inhibit macrophage M1 polarization**

WANG Xiaoxu¹, LI Chaoran¹, WANG Hui², YANG Chunjuan¹, LIU Fengxia³, XU Donghua^{2,4}. 1. School of Clinical Medicine, Weifang Medical University, Weifang 261053, China; 2. Central Laboratory of the First Affiliated Hospital, Weifang Medical University, Weifang 261041, China; 3. Department of Allergy of the First Affiliated Hospital, Weifang Medical University, Weifang 261041, China; 4. Rheumatology and Immunology Department of the First Affiliated Hospital, Weifang Medical University, Weifang 261041, China

[Abstract] **Objective:** To explore effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) on macrophage M1/M2 polarization. **Methods:** hUC-MSCs were co-cultured with pTHP-1 cells which were macrophage-like cells induced by PMA and transcriptome sequencing data were analyzed. Differentially expressed genes were screened and analyzed by GO and KEGG enrichment analysis. Effect of hUC-MSCs on pTHP-1 cells proliferation was analyzed by cell proliferation assay (CCK-8 and EdU). Flow cytometry was used to verify influence of hUC-MSCs on relative contents of inflammatory cytokine TNF- α and anti-inflammatory cytokine IL-10 in pTHP-1 cells which were interaction with LPS. Effect of hUC-MSCs on M1/M2-related molecular phenotype of pTHP-1 cells was studied by qRT-PCR and flow cytometry. **Results:** Transcriptome sequencing data analysis showed that M1-related genes TNF- α ($P<0.05$) and HLA-DRA ($P<0.01$) decreased to a great extent and M2-related gene ARG1 ($P<0.05$) increased to a great extent in pTHP-1 cells after co-culture with hUC-MSCs, suggesting that hUC-MSCs inhibited macrophage M1 polarization. GO and KEGG analysis showed that these dysregulated genes regulated inflammation and immune response. hUC-MSCs inhibited proliferation of pTHP-1 cells, reduced content of TNF- α and increased content of IL-10 ($P<0.001$). qRT-PCR and flow cytometry showed mRNA expressions

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82171790);山东省医药卫生科技发展计划(202103100273)。

作者简介:王晓旭,女,在读硕士,主要从事免疫治疗研究,E-mail:wangxxjy0124@163.com。

通信作者:刘凤霞,女,博士,教授,主任医师,主要从事变态反应与免疫治疗研究,E-mail:wf_lfx@163.com。

徐栋花,女,博士,教授,主任医师,主要从事干细胞与自身免疫研究,E-mail:xudh@wfmcc.edu.cn。

of HLA-DRA ($P<0.05$) and CD68 ($P<0.01$) and CD14⁺CD11c⁺M1 macrophage percentage were down-regulated, while mRNA expressions of CD163 ($P<0.001$), CD206 ($P<0.001$) and CD14⁺CD163⁺M2 macrophage percentage were significantly up-regulated in pTHP-1 cells after co-culture with hUC-MSCs. **Conclusion:** hUC-MSCs inhibit macrophage polarization to M1 and promote polarization to M2 in vitro.

[Key words] Umbilical cord mesenchymal stem cells; pTHP-1; Transcriptome sequencing; Macrophage; Polarization

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)免疫原性低,具有再生及免疫调节作用^[1]。MSCs在炎症微环境中可通过调控T淋巴细胞、B淋巴细胞和巨噬细胞等影响免疫系统平衡,对类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、移植物抗宿主病和多发性硬化等免疫相关疾病具有潜在治疗作用^[2-6]。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)由于来源广泛、易获取分离、稳定性好,在多种自身免疫病修复中具有优势^[7]。

巨噬细胞是机体重要的先天免疫细胞,作为炎症启动细胞参与调控多种自身免疫病发生。巨噬细胞具有可塑性,可分化为M1型和M2型细胞。M1型巨噬细胞是经典激活促炎细胞,分泌促炎细胞因子^[8];M2型巨噬细胞是替代激活抗炎细胞,分泌抗炎细胞因子,两者平衡是维持组织稳态的重要条件^[9]。部分实验表明MSCs发挥免疫调节作用,通过抑制免疫炎症反应对免疫性疾病起治疗作用^[10]。

转录组测序技术可辅助评价组织、血液等标本中基因表达差异,用于挖掘表达失调分子的作用靶点、信号转导途径及潜在作用机制,成为近年研究热点^[11]。本研究通过转录组测序技术评价hUC-MSCs对巨噬细胞表型极化的影响,并通过qRT-PCR、细胞增殖实验及流式细胞术等技术进一步分析hUC-MSCs在体外对巨噬细胞极化及炎症反应的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 pTHP-1细胞系购于上海吉凯基因科技公司;用于分离hUC-MSCs的脐带样本来自潍坊医学院第一附属医院经剖宫产的足月健康新生儿。本研究经潍坊医学院伦理委员会批准(2021-YX074),家属知情同意。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司;LPS购自Sigma公司;佛波酯(PMA)购自MCE公司;Transwell小室购自Corning公司;反转录试剂盒购自Accurate Biology公司;细胞固定破膜剂购自中国联科生物公司;CD163抗体、CD14抗体、CD11c抗体购自Biolgend公司;CCK-8试剂盒购自Dojindo公司。

1.2 方法

1.2.1 hUC-MSCs分离培养 无菌PBS冲洗脐带,分离脐带表面的华尔通胶并将其剪成1 mm×1 mm×1 mm组织块。将组织块分散贴于培养瓶瓶底后加入9 ml配制的DMEM/F12完全培养基,37 °C、5%CO₂培养。原代细胞培养1周后进行换液,待细胞生长至约80%融合时传代,用于后续实验。

1.2.2 pTHP-1细胞培养与诱导 取T25培养瓶,瓶中加入完全培养基(90%RPMI1640培养基+10%FBS)和pTHP-1细胞进行培养。关注细胞培养状态及细胞密度,定期(3~4 d/次)向细胞培养瓶中加入新鲜培养基。将对数生长期10代以内的pTHP-1细胞接种至6孔板,各孔加入2 ml 100 nmol/L PMA作为培养液,刺激、孵育48 h后得到静息状态的M0巨噬细胞。使用1 μg/ml LPS+20 ng/ml干扰素-γ诱导pTHP-1细胞24 h转化为M1型巨噬细胞。pTHP-1细胞中加入100 ng/ml IL-4完成24 h诱导后得到M2型巨噬细胞。

1.2.3 hUC-MSCs与巨噬细胞在Transwell内共培养 采用Transwell小室进行hUC-MSCs和巨噬细胞共培养,将pTHP-1细胞以1×10⁵个/ml铺到Transwell小室(0.4 μm孔径)下层,hUC-MSCs以1×10⁵个/ml密度铺到Transwell小室上层。将上述共培养细胞共培养12 h、24 h、48 h,收集下室中的上清及巨噬细胞用于后续实验。

1.2.4 转录组测序 收集上述M0、M1、M2巨噬细胞及与hUC-MSCs共培养的pTHP-1细胞约1×10⁶个,分别表示为M0组、M1组、M2组及MSC-M0组,将样本运送到上海欧易生物医学科技有限公司Illumina HiSeq™2500平台进行转录组测序,利用Trimmomatic软件进行原始数据质控,对测序结果进行基因定量分析和基于基因表达的各项分析(样品间相关性检验、主成分分析、聚类分析、差异表达基因分析等)。通过差异表达基因分析,包括差异基因筛选、MA图及火山图分析、差异基因表达水平聚类分析、韦恩图分析、GO和KEGG富集分析等,预测hUC-MSCs对巨噬细胞M1/M2极化及功能的调控作用。

1.2.5 CCK-8检测细胞增殖 各取100 μl细胞悬液加入96孔板,分别孵育24 h、48 h和72 h,将10 μl CCK-8溶液加入样品孔孵育1~4 h。酶标仪检测各

孔 450 nm 处吸光度,获取分析结果。

1.2.6 EdU 检测细胞增殖 各取 100 μ l 细胞悬液加入 96 孔板中孵育 48 h, 100 μ l EdU 培养基标记。依次加入 50 μ l 固定液和 100 μ l 渗透剂,利用 100 μ l 1 \times Apollo 染色反应液染色(避光)。加入 100 μ l 1 \times DAPI 染色液进行 DNA 染色,完成后获取图像。

1.2.7 流式细胞术检测细胞因子 各取 20 μ l 梯度稀释的标准品和待测样本加入不同实验管,按试剂盒说明书孵育样品,同时完成流式细胞仪设置。依次通过 BD FASComp 软件和 BD CellQuest 软件设置参数,采集各管数据进行分析。

1.2.8 流式细胞术检测巨噬细胞表型 取细胞悬液离心,利用 100 μ l PBS 和 5 μ l 封闭溶液重悬细胞,室温孵育 10 min。按照说明书进行破膜,每管加入 5 μ l 相应抗体标志物及抗体(如 PE 标记的 CD163、FITC 标记的 CD14、APC 标记的 CD11c)冰上避光孵育 30 min, PBS 重悬细胞,上机检测。

1.2.9 qRT-PCR 提取共培养前后细胞总 RNA,使用反转录试剂盒逆转录 cDNA,进行 q-RT-PCR。正反向引物由上海生工生物有限公司合成,引物序列见表 1。以 GAPDH 为内参,分析各样本循环阈值(Ct), $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因相对表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS26.0 和 Graphpad Prism 8.0.1 进行统计学分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用 One-way ANOVA 分析,两组间比较采用 Student's *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转录组测序差异基因表达 将 hUC-MSCs 与 pTHP-1 细胞在 Transwell 共培养后进行转录组测序,比较不同样本组间差异基因,发现不同样本组间基

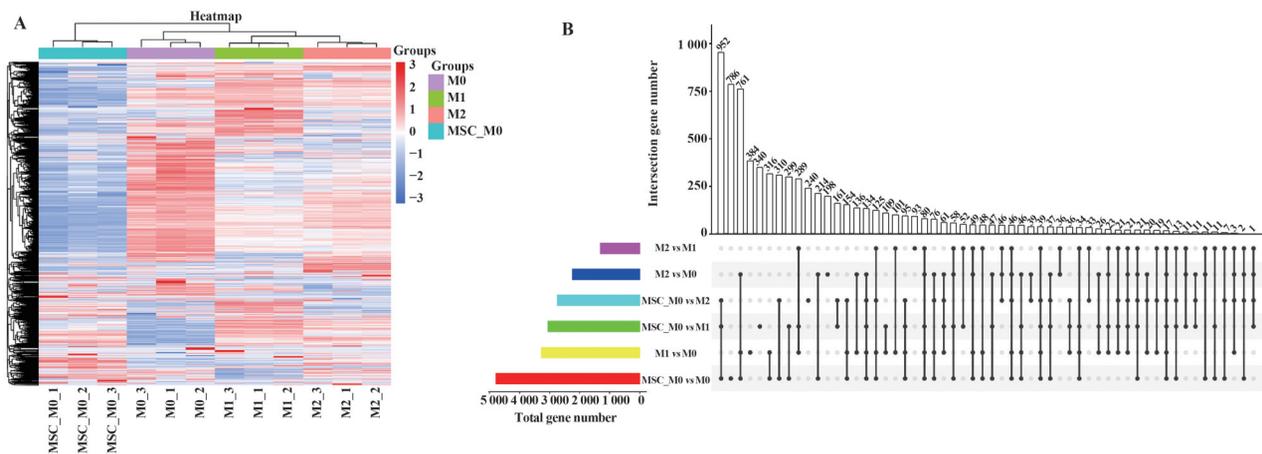
因表达不同,hUC-MSCs 与 pTHP-1 细胞共培养使部分基因表达及功能发生变化。聚类分析提示各样本间聚类良好(图 1A)。图 1B 展示了不同比较组间共有及特有的差异表达基因数量。进一步对各组样本 M1/M2 相关基因表达进行比较(表 2、图 2),发现 hUC-MSCs 与 pTHP-1 细胞共培养可诱导 pTHP-1 细胞 M1 相关基因 TNF- α ($P<0.05$)、HLA-DRA ($P<0.01$) 明显下调,而 M2 相关基因 ARG1 ($P<0.05$) 明显上调,表明 hUC-MSCs 能够抑制巨噬细胞 M1 极化,诱导其发生 M2 偏倚。

2.2 差异基因 GO 功能富集分析 对 hUC-MSCs 与 pTHP-1 细胞共培养前后的差异基因进行 GO 功能富集分析,结果显示差异基因涉及的生物学过程有低聚糖-脂质中间体的生物合成过程、负调控激活-诱导 T 细胞死亡、正向调控内皮细胞趋化性、TNF 生物合成过程正向调控、脂肪酸 β -氧化调控、跨上皮运输和 T 细胞激活等;最显著富集分子功能集中于

表 1 qRT-PCR 引物

Tab. 1 Primers used in qRT-PCR

Genes	Sequences(5'-3')
CD68	F:GAAATGCCACGGTTCATCCA R:TGGGGTTCAGTACAGAGATGC
CD206	F:TCCGGTGCTGTTCTCCTA R:CCAGTCTGTTTTGATGGCACT
CD163	F:TTTGTCAACTTGAGTCCCTTCAC R:TCCCGCTACTTGTTTTCAC
HLA-DRA	F:AGTCCCTGTGCTAGGATTTTCA R:ACATAAACTCGCCTGATTGGTC
GAPDH	F:GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT R:GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG



Note: A. Clustering heat map; B. Wayne diagrams.

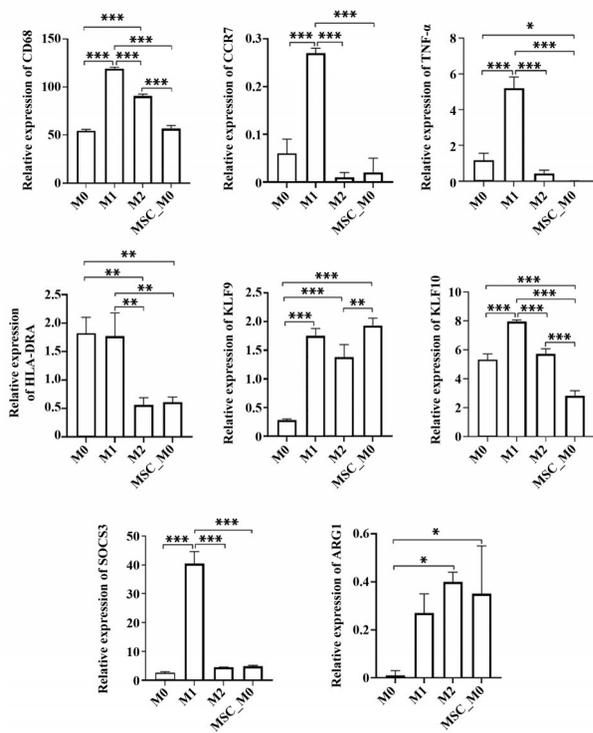
图 1 不同样本组差异表达基因分析

Fig. 1 Analysis of DEGs in different sample groups

表 2 不同亚组候选 M1/M2 相关基因表达 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 2 Expressions of candidate M1/M2 related genes in different subgroups ($\bar{x}\pm s$)

Genes	Genebank	Expression			
		M0	M1	M2	MSC-M0
CD68	NM_001251.2	54.18±1.61	119.01±1.55	90.56±2.13	56.76±3.27
CCR7	NM_001301714.1	0.06±0.03	0.27±0.01	0.01±0.01	0.02±0.03
TNF- α	NM_000594.3	1.18±0.38	5.20±0.63	0.43±0.19	0.01±0.02
HLA-DRA	NM_019111.4	1.82±0.28	1.77±0.41	0.56±0.13	0.61±0.09
KLF9	NM_001206.2	0.28±0.02	1.75±0.13	1.38±0.22	1.93±0.13
KLF10	NM_005655.3	5.31±0.41	7.96±0.11	5.72±0.36	2.82±0.35
SOCS3	NM_003955.4	2.51±0.39	40.42±4.13	4.47±0.10	4.75±0.34
ARG1	XM_011535801.2	0.01±0.02	0.27±0.08	0.40±0.04	0.35±0.20



Note: *. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$; ***. $P < 0.001$.

图 2 不同样本组 M1、M2 相关基因差异表达分析

Fig. 2 Analysis of DEGs of M1 and M2 related genes in different groups

磷酸甘油酸变位酶活性、CCR 趋化因子受体结合和黄素-偶联巯基氧化酶活性等;细胞组分主要定位于肌细胞投射膜、tRNA(m1A)甲基转移酶复合体和 t-UTP 复合体等(图 3)。表明 hUC-MSCs 可能参与调控巨噬细胞上述功能过程。

2.3 差异基因 KEGG 通路富集分析 KEGG 富集气泡图(图 4A)可以得出,hUC-MSCs 与 pTHP-1 细胞在 Transwell 共培养后的差异基因最显著富集于类

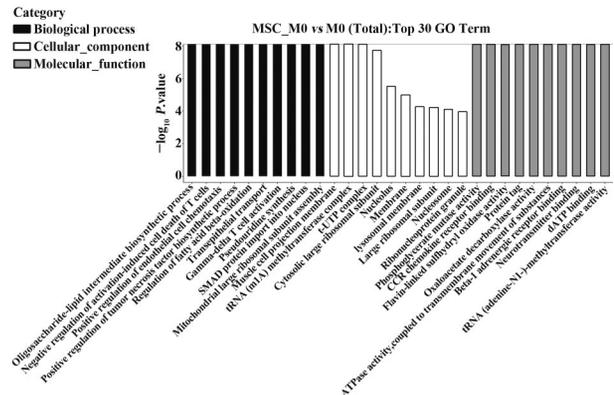


图 3 差异基因 Top 30 GO 富集分析(MSC-M0 vs M0)

Fig. 3 Top 30 GO enrichment analysis of differential genes (MSC-M0 vs M0)

风湿关节炎、人乳头瘤病毒感染、单纯疱疹病毒感染、microRNA、核因子 κB (NF- κB)、TNF、IL-17、TLR 受体、Hippo 和 mTOR 等相关信号通路。显著富集 KEGG 注释分类条形图(图 4B)显示,最显著富集的系统相关通路有免疫系统、内分泌系统、神经系统等;代谢相关通路有碳水化合物代谢、类脂(化合物)代谢作用、氨基酸代谢等;人类疾病相关通路有病毒感染、癌症、细菌感染及免疫性疾病等;基因信息处理相关通路有翻译、折叠、分选等;环境信息处理相关通路有信号转导、信号分子及相互作用、跨膜转运;细胞活动相关通路有运输和分解代谢、细胞生长和死亡、细胞群落-真核生物和细胞运动。KEGG 富集结果表明 hUC-MSCs 可能通过上述信号通路调控巨噬细胞炎症与免疫应答过程。

2.4 hUC-MSCs 对巨噬细胞增殖的影响 CCK-8 细胞增殖实验结果显示,hUC-MSCs 与 pTHP-1 巨噬细胞共培养后,可抑制 pTHP-1 巨噬细胞增殖($P <$

0.01,图5A),呈时间依赖关系;EdU(48h)细胞增殖实验结果与CCK-8结果一致(图5B),hUC-MSCs可抑制巨噬细胞增殖。

2.5 hUC-MSCs 共培养后巨噬细胞炎症细胞因子变化 流式细胞术检测细胞因子结果表明,与LPS刺激组相比,hUC-MSCs能够显著抑制LPS诱导的pTHP-1巨噬细胞炎症细胞因子TNF- α 表达($P<0.001$),促进抑炎因子IL-10表达($P<0.001$,图6)。表明hUC-MSCs可减轻巨噬细胞炎症反应。

2.6 hUC-MSCs对pTHP-1巨噬细胞M1/M2极化的影响 qRT-PCR结果显示,与pTHP-1细胞组相比,hUC-MSCs共培养12h后能够抑制pTHP-1细胞M1表型标志HLA-DRA($P<0.05$)和CD68($P<0.01$) mRNA表达,显著促进M2表型标志CD163($P<0.001$)和CD206($P<0.001$) mRNA表达(图7)。流式细胞术分析巨噬细胞表型结果显示,hUC-MSCs

与pTHP-1巨噬细胞共培养24h能够抑制pTHP-1巨噬细胞CD14⁺CD11c⁺M1极化,促进CD14⁺CD163⁺M2型细胞极化(图8)。因此,hUC-MSCs能够促进巨噬细胞向M2表型极化,发挥免疫调节作用。

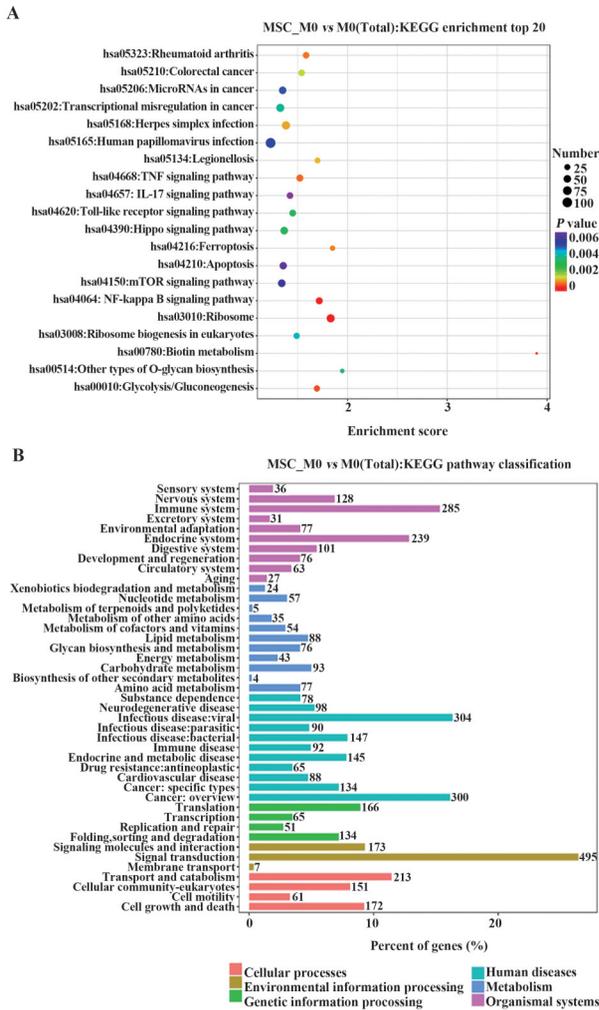
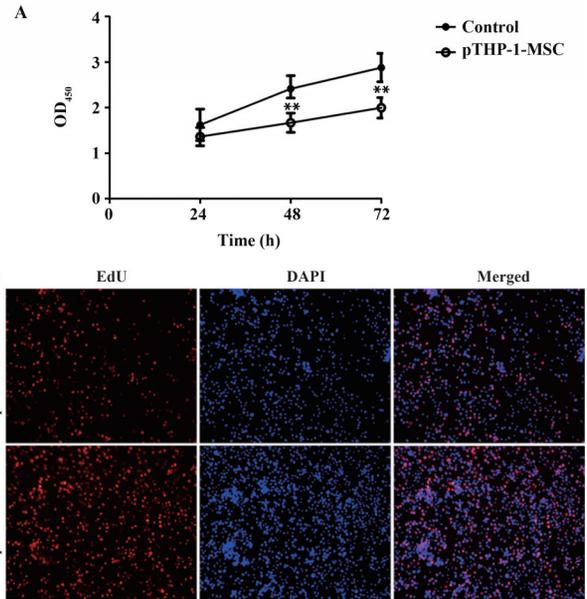
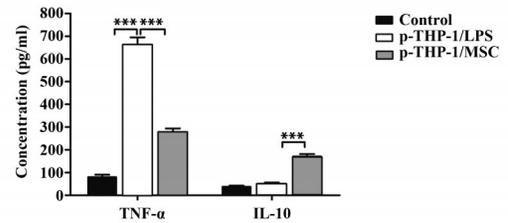


图4 差异基因KEGG富集分析(MSC_M0 vs M0)
Fig.4 KEGG enrichment analysis of differential genes (MSC_M0 vs M0)



Note: A. CCK-8 assay, n=3; B. EdU assay (48h). ** P<0.01.

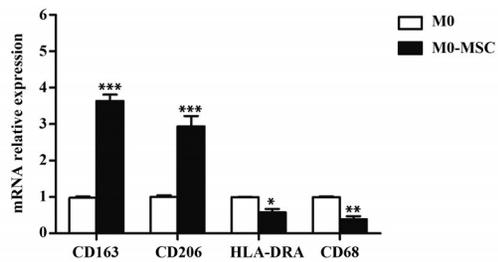
图5 hUC-MSCs抑制pTHP-1巨噬细胞增殖
Fig.5 hUC-MSCs inhibits proliferation of pTHP-1 cells



Note:*** P<0.001.

图6 流式细胞术分析巨噬细胞炎症细胞因子变化

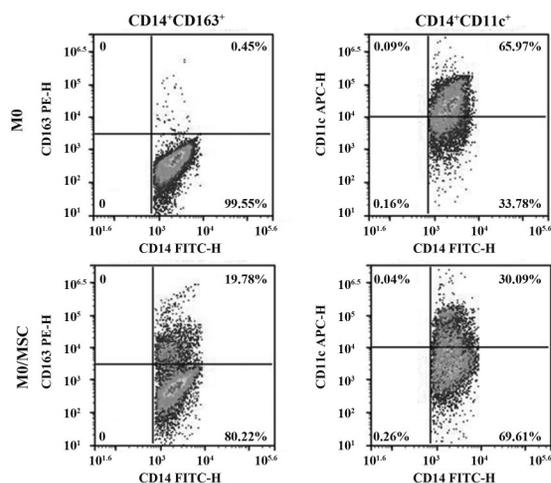
图6 Analysis of inflammatory cytokines changes in macrophages by flow cytometry



Note:M0. pTHP-1 cells; M0-MSC. hUC-MSCs and pTHP-1 cells co-cultured for 12h. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

图7 M0与M0-MSC共培养组M1/M2相关基因表达差异

图7 Difference of expressions of M1/M2-related genes in M0 and M0-MSC co-culture group



Note: M0. pTHP-1 cells; M0-MSC. hUC-MSCs and pTHP-1 cells co-cultured for 24 h. CD14 marked with FITC; CD163 marked with PE; CD11c marked with APC.

图8 流式细胞术检测 hUC-MSCs 对 pTHP-1 细胞 M1/M2 表面标志物表达的影响

Fig. 8 Effect of hUC-MSCs on expressions of M1/M2 surface markers in pTHP-1 cells detected by flow cytometry

3 讨论

MSCs 可通过细胞间接触、旁分泌作用等参与免疫功能调节,对固有免疫和适应性免疫均有一定调节作用,影响机体炎症微环境稳态^[12-13]。MSCs 能够抑制免疫炎症反应,促进组织修复,富有临床应用价值^[14]。MSCs 对巨噬细胞表型极化及功能的调控作用是当前研究热点。机体在正常情况下,巨噬细胞呈 M2 表型;机体发生炎症反应及免疫激活时,巨噬细胞极化为 M1 表型,释放促炎因子(如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12 等),导致组织与器官损伤、破坏^[15]。炎症消退时,M2 型巨噬细胞使组织环境处于抑炎状态,清除坏死的碎片,使组织损伤得以修复^[16]。然而 MSCs 对巨噬细胞表型极化及炎症的调节作用尚不清楚。近年随着基因组学、蛋白组学及转录组学等技术发展,从整体探究疾病发生机制作为一种新的研究方法具有重要价值。本研究对 hUC-MSCs 与巨噬细胞共培养的转录组测序数据进行分析,同时对结果进行实验验证。

转录组测序分析能够整体分析细胞所有基因转录及调控规律,通过基因表达比较干预前后相关基因差异表达,分析干预物质的调控作用。为深入了解 hUC-MSCs 在巨噬细胞极化中的作用机制,本研究分析了 hUC-MSCs 对巨噬细胞干预前后的转录组差异表达基因,发现 hUC-MSCs 与 pTHP-1 细胞共培养后可诱导 pTHP-1 细胞 M1 相关表型(如 TNF- α 、

HLA-DRA)明显下调,而 M2 相关表型(如 ARG1)明显上调,表明 hUC-MSCs 能够在体外抑制巨噬细胞 M1 型极化。同时,本研究对 hUC-MSCs 共培养后的差异表达基因进行深度挖掘,进行了 GO 和 KEGG 富集分析,GO 富集分析发现,两组差异基因富集于负调控激活-诱导 T 细胞死亡、正向调控内皮细胞的趋化性、TNF 生物合成过程正向调控和 T 细胞激活等生物学过程及 CCR 趋化因子受体结合等分子功能,表明 hUC-MSCs 共培养可能影响巨噬细胞免疫与炎症反应过程。此外,对 hUC-MSCs 共培养后的差异基因进行 KEGG 富集分析,发现差异基因最显著富集于类风湿关节炎等免疫性疾病及感染、癌症中的作用和相关信号通路(如 NF- κ B、TNF、IL-17 和 TLR 受体信号通路),与信号分子及相互作用、信号转导等免疫系统功能有关,表明 hUC-MSCs 可能通过调控上述信号通路活化影响巨噬细胞炎症与免疫调节过程,但需要更多研究加以论证。

本研究采用 qRT-PCR、细胞增殖实验及流式细胞术等对结果进一步验证。首先,通过细胞增殖实验发现 hUC-MSCs 能够抑制 pTHP-1 细胞增殖。利用体外细胞学实验进一步探究 hUC-MSCs 对 pTHP-1 的极化作用,分别通过 qRT-PCR 及流式细胞术分析了 hUC-MSCs 与 pTHP-1 细胞共培养后对 M1/M2 表达的影响,发现与 hUC-MSCs 共培养后 M1 型巨噬细胞相关基因 HLA-DRA 和 CD68 mRNA 表达及 CD14⁺CD11c⁺M1 型细胞比例下调,M2 相关基因 CD163 和 CD206 mRNA 表达及 CD14⁺CD163⁺M2 型细胞比例上调。此外,hUC-MSCs 可抑制 LPS 诱导的 pTHP-1 巨噬细胞炎症细胞因子 TNF- α 表达,抑炎因子 IL-10 表达明显增加,说明 hUC-MSCs 能够促进巨噬细胞向抑炎方向发展,通过减轻免疫炎症达到治疗效果,进一步验证了 hUC-MSCs 能够诱导巨噬细胞向 M2 抗炎方向极化,抑制其向 M1 促炎方向极化。

巨噬细胞极化失衡参与多种免疫炎症性疾病发病机制。研究发现类风湿关节炎患者滑膜巨噬细胞中以 M1 型巨噬细胞促炎极化表型为主,CD209 等 M2 型巨噬细胞呈低表达^[17-18]。炎症性肠病患者可检测到大量 M1 型巨噬细胞,而 M2 起抑炎及促进组织修复作用^[19]。自身免疫性肝病中同样发现总巨噬细胞和 M1 型巨噬细胞增加,M2 型巨噬细胞减少^[20]。因此,以巨噬细胞极化失衡作为治疗靶点,能够为免疫性疾病提供新的临床治疗方案。当前免疫性疾病传统治疗效果有限,如类风湿关节炎目前主要治疗药物为非甾体类抗炎药、改善病情抗风湿药、糖皮质激素及生物制剂等,以上药物在缓解

及减轻病情方面有作用,但长期使用有一定副作用,如非甾体类抗炎药长时间使用会引起胃肠道不适,糖皮质激素易引起感染、骨质疏松和心脏疾病等^[21]。考虑到传统治疗药物的局限性,基于MSCs的细胞治疗可能是一种替代策略^[22]。研究发现M1型巨噬细胞产生的促炎因子能够对MSCs进行激活,活化的MSCs通过一系列分子机制诱导抗炎因子释放,影响单核-巨噬细胞分化及功能^[23]。本研究结合转录组数据分析及实验验证发现hUC-MSCs抑制巨噬细胞向M1促炎方向极化,诱导M2型极化,进一步明确了MSCs作用于巨噬细胞的炎症调节机制。hUC-MSCs具有强大的抗炎及免疫调节作用,明确其具体分子机制,挖掘免疫调控潜在靶点,将为探究hUC-MSCs治疗难治性类风湿关节炎、系统性红斑狼疮及自身免疫性肝病等疾病生物治疗策略提供新的思路。

综上,本研究首先通过转录组测序分析对hUC-MSCs抑制巨噬细胞向M1表型分化,促进M2型极化做出预测和差异基因表达分析,并进一步证实hUC-MSCs能够抑制巨噬细胞向M1极化,诱导巨噬细胞向M2极化,抑制巨噬细胞增殖。本研究结果为hUC-MSCs在免疫性疾病中的临床应用奠定了基础,下一步应深入探索hUC-MSCs在不同疾病中的具体治疗效果及机制。

参考文献:

- [1] MA S, XIE N, LI W, *et al.* Immunobiology of mesenchymal stem cells [J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21 (2) : 216-225. DOI: 10. 1038/cdd. 2013. 158.
- [2] UCCELLI A, DE ROSBO N K. The immunomodulatory function of mesenchymal stem cells: Mode of action and pathways[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2015, 1351: 114-126. DOI: 10. 1111/nyas. 12815.
- [3] KARAMINI A, BAKOPOULOU A, ANDREADIS D, *et al.* Therapeutic potential of mesenchymal stromal stem cells in rheumatoid arthritis: A systematic review of in vivo studies[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2020, 16 (2) : 276-287. DOI: 10. 1007/s12015-020-09954-z.
- [4] FATHOLLAHI A, GABALOU N B, ASLANI S. Mesenchymal stem cell transplantation in systemic lupus erythematosus, a mesenchymal stem cell disorder[J]. *Lupus*, 2018, 27(7): 1053-1064. DOI: 10. 1177/0961203318768889.
- [5] MARTÍNEZ-CARRASCO R, SÁNCHEZ-ABARCA L I, NIETO-GÓMEZ C, *et al.* Subconjunctival injection of mesenchymal stromal cells protects the cornea in an experimental model of GVHD [J]. *Ocul Surf*, 2019, 17 (2) : 285-294. DOI: 10. 1016/j. jtos. 2019. 01. 001.
- [6] TREMBLAY F, ANSARI Y, REMAUD A, *et al.* Neurophysiological outcomes following mesenchymal stem cell therapy in multiple sclerosis [J]. *Clin Neurophysiol*, 2022, 136: 69-81. DOI: 10. 1016/j. clinph. 2022. 01. 125.
- [7] ZHANG Q, LI Q, ZHU J, *et al.* Comparison of therapeutic effects of different mesenchymal stem cells on rheumatoid arthritis in mice[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e7023. DOI: 10. 7717/peerj. 7023.
- [8] TAN H Y, WANG N, LI S, *et al.* The reactive oxygen species in macrophage polarization: Reflecting its dual role in progression and treatment of human diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 2795090. DOI: 10. 1155/2016/2795090.
- [9] BISWAS S K, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(10): 889-896. DOI: 10. 1038/ni. 1937.
- [10] SHIN T H, KIM H S, KANG T W, *et al.* Human umbilical cord blood-stem cells direct macrophage polarization and block inflammasome activation to alleviate rheumatoid arthritis[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(12): e2524. DOI: 10. 1038/cddis. 2016. 442.
- [11] CARR H L, TURNER J D, MAJOR T, *et al.* New developments in transcriptomic analysis of synovial tissue[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7: 21. DOI: 10. 3389/fmed. 2020. 00021.
- [12] NAGAISHI K, ARIMURA Y, FUJIMIYA M. Stem cell therapy for inflammatory bowel disease [J]. *J Gastroenterol*, 2015, 50 (3): 280-286. DOI: 10. 1007/s00535-015-1040-9.
- [13] GLENN J D, SMITH M D, CALABRESI P A, *et al.* Mesenchymal stem cells differentially modulate effector CD8⁺T cell subsets and exacerbate experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(10): 2744-2755. DOI: 10. 1002/stem. 1755.
- [14] 李文武, 鲍传裕, 李元明. 骨髓间充质干细胞移植在急性肝衰竭中的应用效果及对IL-10水平的影响研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(7): 774-779. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-484X. 2020. 07. 002.
- [15] DEY A, ALLEN J, HANKEY-GIBLIN P A. Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: Blood monocytes versus tissue macrophages [J]. *Front Immunol*, 2015, 5: 683. DOI: 10. 3389/fimmu. 2014. 00683.
- [16] MILLS C D, THOMAS A C, LENZ L L, *et al.* Macrophage: SHIP of immunity [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 620. DOI: 10. 3389/fimmu. 2014. 00620.
- [17] SOLER P B, ESTRADA-CAPETILLO L, IZQUIERDO E, *et al.* Macrophages from the synovium of active rheumatoid arthritis exhibit an activin A-dependent pro-inflammatory profile [J]. *J Pathol*, 2015, 235(3): 515-526. DOI: 10. 1002/path. 4466.
- [18] SAMANIEGO R, PALACIOS B S, DOMIGUEZ-SOTO Á, *et al.* Macrophage uptake and accumulation of folates are polarization-dependent in vitro and in vivo and are regulated by activin A [J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 95 (5) : 797-808. DOI: 10. 1189/jlb. 0613345.
- [19] ISIDRO R A, APPELYARD C B. Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, 311 (1) : G59-G73. DOI: 10. 1152/ajpgi. 00123. 2016.
- [20] WANG Y, GUO X, JIAO G, *et al.* Splenectomy promotes macrophage polarization in a mouse model of concanavalin A-(ConA-) induced liver fibrosis [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 5756189. DOI: 10. 1155/2019/5756189.
- [21] FRAENKEL L, BATHON J M, ENGLAND B R, *et al.* 2021 American college of rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2021, 73 (7): 924-939. DOI: 10. 1002/acr. 24596.
- [22] LOPEZ-SANTALLA M, BUEREN J A, GARIN M I. Mesenchymal stem/stromal cell-based therapy for the treatment of rheumatoid arthritis: An update on preclinical studies [J]. *EBioMedicine*, 2021, 69: 103427. DOI: 10. 1016/j. ebiom. 2021. 103427.
- [23] JIN L, DENG Z, ZHANG J, *et al.* Mesenchymal stem cells promote type 2 macrophage polarization to ameliorate the myocardial injury caused by diabetic cardiomyopathy [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 251. DOI: 10. 1186/s12967-019-1999-8.

[收稿 2022-04-18 修回 2022-05-11]

(编辑 周文瑜)