

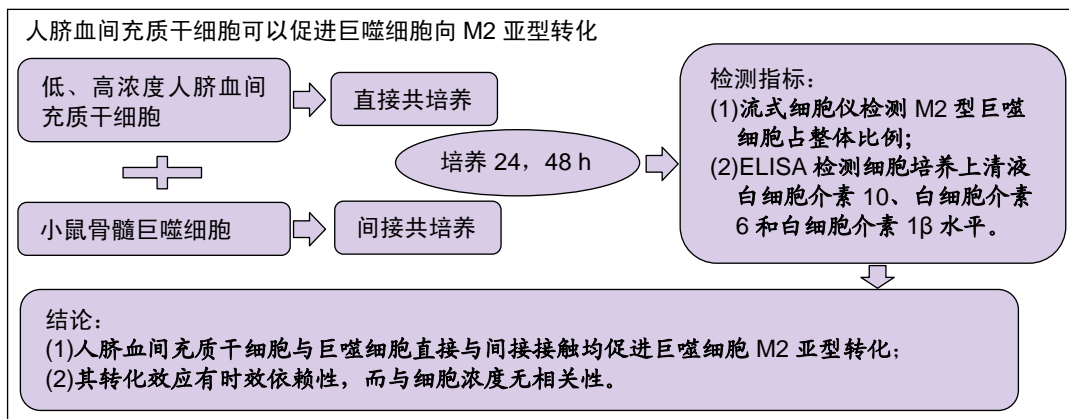
人脐血间充质干细胞对小鼠骨髓巨噬细胞M2亚型的转化作用

陈柄全, 彭 漪, 肖 轶, 彭智勇, 赵吉玲, 余国龙(中南大学湘雅医院心内科, 湖南省长沙市 410008)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1778

ORCID: 0000-0002-4147-1461(陈柄全)

文章快速阅读:



陈柄全, 男, 1991 年生, 湖南省张家界市人, 土家族, 2018 年中南大学湘雅医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事干细胞治疗心肌梗死的基础医学研究。

通讯作者: 余国龙, 博士, 教授, 中南大学湘雅医院心内科, 湖南省长沙市 410008

文献标识码:A

稿件接受: 2019-03-10



文题释义:

人脐血间充质干细胞具有更多的优势: ①脐血获取方法较骨髓更容易, 无任何痛苦和不良作用, 更易让人们接受; ②与骨髓来源间充质干细胞没有明显的形态学和免疫表型的差异; ③相较于骨髓来源, 具有更强的繁殖能力; ④收集的脐血更容易保存, 可以放在液氮中长期保存, 复苏后可以维持 90% 的细胞活性; ⑤使用人脐血在伦理学上更容易被人们所接受; ⑥现在各国已经建立起脐血库, 为干细胞治疗奠定坚实的基础。

M1/M2 型巨噬细胞: 巨噬细胞是非特异性免疫的重要组成部分, 在炎症和宿主防御中发挥重要作用。在组织中, 巨噬细胞可以因为环境信号(例如微生物产物、受损细胞、活化的淋巴细胞)表达出不同的免疫表型。两种功能及表型相反的巨噬细胞被命名为经典活化的巨噬细胞(M1 型)和交替活化型巨噬细胞(M2 型)。M1 型巨噬细胞生物特性是杀菌活性加强, 并产生多种促炎的递质; 而 M2 型巨噬细胞主要生物特性是促进炎症吸收与消退, 产生多种抑炎的递质, 促进炎症组织修复。

摘要

背景: 间充质干细胞已经被用于多种疾病的治疗, 且研究表明间充质干细胞可能是通过促进巨噬细胞向 M2 亚型转化来产生生物效应, 但这种效应是否呈量效、时效关系及其转化效应是否需要细胞间直接接触尚不明确。

目的: 验证人脐血间充质干细胞对巨噬细胞 M2 亚型转化效应, 并探讨人脐血间充质干细胞对巨噬细胞 M2 亚型转化效应的剂量与时间相关性。

方法: 从小鼠骨髓中提取单核细胞, 采用巨噬细胞集落刺激因子诱导产生 M0 型巨噬细胞(F4/80⁺, CD11b⁺)。将 M0 型巨噬细胞以 1×10⁶/孔密度植入 Transwell 板或 6 孔培养板中, 分别以不同密度(0, 2×10⁵, 4×10⁵)人脐血间充质干细胞在含有脂多糖(100 μg/L)/干扰素 γ (20 μg/L)完全培养基中直接或间接共培养 24, 48 h。显微镜下观察巨噬细胞形态学改变, 流式细胞仪检测 M2 型巨噬细胞(CD206⁺, CD11c⁻)占整体比例, ELISA 检测细胞培养上清液白细胞介素 10、白细胞介素 6 和白细胞介素 1β 水平。

结果与结论: ①与人脐血间充质干细胞共培养后, 巨噬细胞触角伸长, 呈长索状 M2 型细胞形态特征; ②与人脐血间充质干细胞直接共培养、间接共培养 24, 48 h, M2 型巨噬细胞百分比显著性增加($P < 0.05$); ③人脐血间充质干细胞低浓度与高浓度组间比较, M2 型巨噬细胞百分比差异无显著性意义; ④直接或间接培养 48 h 的 M2 型巨噬细胞百分比均显著高于 24 h, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。⑤人脐血间充质干细胞直接共培养、间接共培养上清中促炎性细胞因子白细胞介素 6、白细胞介素 1β 水平显著减少, 而抑炎性细胞因子白细胞介素 10 水平显著增加($P < 0.05$); ⑥直接或间接共培养 48 h 抑炎性细胞因子白细胞介素 10 水平均较 24 h 显著上升($P < 0.05$); ⑦结果表明, 人脐血间充质干细胞与巨噬细胞直接与间接接触均促进巨噬细胞 M2 亚型转化, 其转化效应有时效依赖性, 而与细胞浓度无相关性。

关键词:

人脐血间充质干细胞; 巨噬细胞; 巨噬细胞 M1/M2 亚型; M2 亚型转化效应; 炎症反应; 直接共培养; 间接共培养; 国家自然科学基金

中图分类号: R459.9; R394.2

基金资助:

国家自然科学基金面上项目(81570266), 项目负责人: 余国龙; 湖南省自然科学基金重点项目(2015SK2025), 项目负责人: 余国龙

Chen Bingquan, Master, Physician, Department of Cardiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Corresponding author: Yu Guolong, MD, Professor, Department of Cardiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Effect of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells on the transformation of M2 macrophages from mouse bone marrow

Chen Bingquan, Peng Yi, Xiao Yi, Peng Zhiyong, Zhao Jiling, Yu Guolong (Department of Cardiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Mesenchymal stem cells have been used in the treatment of a variety of diseases. They may produce biological effects by promoting the conversion of macrophages to M2 subtypes, but it is unclear whether these effects are dose- and time-sensitive, as well as whether intercellular direct contact is involved in the cell transformation.

OBJECTIVE: To verify the effect of umbilical cord blood mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) on the transformation of M2 subtypes of macrophages, and to investigate the dose- and time-dependent effects of hUC-MSCs on the transformation of M2 subtypes of macrophages.

METHODS: Monocytes were extracted from mouse bone marrow and induced by macrophage colony-stimulating factor to produce M0 macrophages (F4/80⁺, CD11b⁺). M0 macrophages were implanted into Transwell plates or 6-well culture plates at a density of 1×10^6 /well, and co-cultured directly or indirectly with hUC-MSCs at different concentrations (0, 2×10^5 , 4×10^5) in complete medium containing lipopolysaccharide (100 μ g/L) and interferon- γ (20 μ g/L) for 24 and 48 hours. The morphological changes of macrophages were observed under direct microscope. The number of M2 macrophages (CD206⁺, CD11c) was detected by flow cytometry. The levels of interleukin-10, interleukin-6 and interleukin-1 β in the cell culture supernatant were measured by ELISA.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) After co-cultured with hUC-MSCs, the macrophages were elongated in cell antennae and the funicular cells, like M2 macrophages, appeared. (2) After 24 and 48 hours of direct or indirect co-culture with hUC-MSCs, the percentage of M2 macrophages was significantly increased ($P < 0.05$). (3) The percentage of M2 macrophages insignificantly differed after direct or indirect co-culture with low- and high-concentration hUC-MSCs. (4) The percentage of M2 macrophages was significantly higher after 48 hours co-culture than after 24 hours co-culture ($P < 0.05$). (5) After direct or indirect co-culture with hUC-MSCs, the levels of interleukin 6 and interleukin-1 β in the cell supernatant were decreased significantly, while the interleukin-10 level increased significantly ($P < 0.05$). (6) The interleukin-10 level was significantly increased after 48 hours co-culture relative to that after 24 hours co-culture. In conclusion, hUC-MSCs can promote the transformation of M2 macrophages in a time-dependent but not concentration-dependent manner.

Key words: human umbilical cord blood mesenchymal stem cells; macrophages; macrophage M1/M2 subtype; M2 subtype transformation; inflammatory response; direct co-culture; indirect co-culture; National Natural Science Foundation of China

Funding: the National Natural Science Foundation of China (General Program), No. 81570266 (to YGL); the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 2015SK2025 (to YGL)

0 引言 Introduction

近年动物实验与临床初步研究表明人脐血间充质干细胞、骨髓间充质干细胞等间充质干细胞应用于治疗多种疾病取得了较好的效果。心、肺、肾等组织与器官实验证实单核细胞/巨噬细胞M1/M2亚型转化在促炎与抗炎双重效应中发挥至关重要的调节作用^[1-8]。国内外近期实验研究证实间充质干细胞可以通过多种中间途径来调控单核/巨噬细胞在炎症反应中的表型和作用,从而抑制心肌梗死后炎症进展^[1]。间充质干细胞调控单核/巨噬细胞介导炎症反应的方式与其机制目前尚未明确,体外直接观察间充质干细胞对单核细胞/巨噬细胞M2亚型转化效应国内外尚未有报道,间充质干细胞对单核细胞/巨噬细胞M2亚型转化效应是否呈量效、时效关系及其转化效应是否需要细胞间直接接触尚不明确。

实验将人脐血间充质干细胞与BALB/C小鼠骨髓单核细胞衍生的M0型巨噬细胞直接或间接体外共培养,经体外实验求证脐血间充质干细胞对小鼠骨髓单核细胞衍生的巨噬细胞M2亚型转化效应,并探讨其效应与人脐血间充质干细胞剂量与时间的相关性,为人脐血间充质干细胞临床应用提供实验佐证和理论依据,并促进干细胞治疗在临床实践中的应用与推广。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于2017-08-01/2018-02-01在中南大学湘雅医院医学科学实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物及细胞 雄性近交系BALB/C小鼠12只, SPF级, 44-54 d龄, 体质量28-30 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司。第2代人脐血间充质干细胞购自赛业公司。

人脐血间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源: 购买于赛业生物科技有限公司

细胞培养基: OriCell™人脐血间充质干细胞完全培养基(货号: HUXUB-90011)

添加材料: Phosphate-Buffered Saline (1xPBS)(货号: PBS-10001), 0.25%Trypsin-0.04%EDTA(货号: TEDTA-10001)

培养时间: 6 d

细胞传代: 第5代

细胞鉴定: CD29、CD44、CD73、CD105 表达>99%, CD34、CD45、CD11b 表达<1%

伦理学批准: 实验方案经中南大学湘雅医院医学伦理委员会批准

1.3.2 实验试剂与仪器 OriCell™人脐血间充质干细胞完全培养基(赛业公司); DMEM培养基(Hypcom公司); 胎牛血清(Wisent公司); 重组人干扰素 γ (Life Technologies, USA); 脂多糖(Sigma-Aldrich, USA); 巨噬细胞集落刺激因子(Prospec公司); 小鼠白细胞介素6、白细胞介素1 β 、白细胞介素10 ELISA检测试剂盒(eBioscience公司); APC标记的F4/80抗体(Biolegend公司); PE标记的CD11c抗体(Biolegend公司); FITC标记的CD11b抗体(Biolegend公司); PE/CY7 标记的CD206 抗体(Biolegend公司);

Pharmingen固定/破膜试剂盒(BD公司); 红细胞裂解液(BD公司); 青霉素+链霉素(Hypcom公司); 0.25%胰蛋白酶(Gibco公司); 二氧化碳培养箱(美国赛默飞世尔科技公司); 生物安全柜(上海力申科学仪器公司); DM5000B倒置显微镜(德国Leica公司); 流式细胞仪(BD公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠巨噬细胞培养 颈椎脱臼法处死小鼠, 剪开股骨、胫骨两端, 用1 mL无菌注射器吸取PBS溶液冲出骨髓; 避光裂解红细胞3 min; PBS吹打清洗, 低温250×g离心3 min, 重复清洗2遍; 加入巨噬细胞集落刺激因子(40 μg/L)条件培养基(90%DMEM+体积分数为10%小牛血清+1%青霉素、链霉素+50 μg/L巨噬细胞集落刺激因子)^[9], 37 °C、体积分数为5%CO₂细胞培养箱培养; 培养3 d后换液, 再培养4 d后收集贴壁细胞即为骨髓来源的巨噬细胞, 使用流式细胞仪鉴定, 如果F4/80与CD11b双阳性细胞达90%以上即培养成功。图1显示单核细胞分出多个触角, 细胞透亮度高, 即为M0型巨噬细胞。细胞刮刀刮下, 计数, 为下一步实验做准备^[10]。

1.4.2 实验分组

直接共培养: 将人脐血间充质干细胞分为低细胞浓度组(2×10⁵)、高细胞浓度组(4×10⁵)、空白对照组, 分别与1×10⁶巨噬细胞在加入脂多糖(100 μg/L)/干扰素γ(20 μg/L)的完全培养基中(90%DMEM+体积分数为10%小牛血清+1%青霉素、链霉素)培养24, 48 h。

间接共培养: 在Transwell培养体系上层小室接种低、高细胞浓度人脐血间充质干细胞2×10⁵, 4×10⁵, 另设置空白对照组, 上室中加入干细胞完全培养基(90%DMEM+体积分数为10%小牛血清+1%青霉素、链霉素); 下层小室中接种1×10⁶巨噬细胞, 在加入脂多糖(100 μg/L)/干扰素γ(20 μg/L)的完全培养基中(90%DMEM+体积分数为10%小牛血清+1%青霉素、链霉素)培养24, 48 h。

1.4.3 流式细胞术鉴定巨噬细胞表型 用细胞刮刀刮下各组细胞, PBS洗2次, 调整至1×10⁶/100 μL重悬于EP管中, 每孔分别加入1 μL F4/80(APC), 1 μL CD11b(FITC), 1 μL CD11c(PE)抗体, 4 °C避光孵育30 min; PBS清洗1次后, 使用固定/破膜试剂盒, 按照说明书方法破膜, 再加入1.25 μL CD206(PE/CY7)孵育已破膜固定细胞30 min, 用PBS重悬于100 μL流式管中, 上流式细胞仪检测。

1.4.4 ELISA检测培养液中白细胞介素6、白细胞介素1β、白细胞介素10水平 取试剂盒中标准品制作标准曲线, 按照说明书方法测定培养液吸光度值, 以标准浓度为X轴, 吸光度为Y轴, 生成标准曲线和回归方程, 计算各组培养液中白细胞介素6、白细胞介素1β、白细胞介素10水平。

1.5 主要观察指标 ①M2型细胞(CD206⁺, CD11c⁺)占整体比例; ②培养24, 48 h各组培养液中白细胞介素6、白细胞介素1β、白细胞介素10水平。

1.6 统计学分析 所有数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 使用SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)软件进行单因素方差分析, 进一步两两间组比较采用LSD检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 巨噬细胞形态学 巨噬细胞在加入脂多糖/干扰素γ的完全培养基中培养1 d时, 主要呈扁平圆形, 透光性较差, 煎蛋样, 其触角较短, 为M1型细胞形态特征, 见图2A。人脐血间充质干细胞与巨噬细胞间接共培养24 h以及直接共培养24 h后, 巨噬细胞触角伸长, 透光性较好, 细胞呈长索状, 为M2型细胞形态特征, 见图2B, C。

2.2 巨噬细胞流式细胞仪鉴定结果 用细胞刮刀刮下巨噬细胞集落刺激因子条件培养基培养7 d的巨噬细胞, 加入F4/80(APC)与CD11b(FITC)抗体4 °C孵育30 min, 流式细胞仪以F4/80/CD11b设门, 结果显示F4/80与CD11b双阳性巨噬细胞高达98%以上, 见图3。

2.3 直接共培养后巨噬细胞流式细胞仪分析结果 从表1、图4可观察到与人脐血间充质干细胞直接共培养24, 48 h后M2型巨噬细胞百分比变化。与空白对照组比较, 低、高浓度人脐带间充质干细胞组M2型细胞(F4/80⁺, CD11b⁺, CD11c-CD206⁺)百分比均显著增高, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 与低浓度人脐血间充质干细胞组比较, 高浓度人脐血间充质干细胞组培养24 h后M2型细胞百分比差异无显著性意义, 但培养48 h后M2型细胞百分比均显著增高, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

表1 巨噬细胞与人脐血间充质干细胞共培养后 M2 型细胞百分比 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$, %)

Table 1 Percentage of M2 subtype macrophages after co-culture with human umbilical cord blood mesenchymal stem cells

组别	直接共培养		间接共培养	
	24 h	48 h	24 h	48 h
低浓度人脐血间充质干细胞组	63.2±10.3 ^a	69.4±13.0 ^a	63.0±7.0 ^a	70.0±6.9 ^a
高浓度人脐血间充质干细胞组	59.8±9.6 ^a	83.0±4.0 ^{abcd}	61.3±1.1 ^a	72.0±3.1 ^{ac}
空白对照组	22.4±7.1	43.0±13.0	31.8±1.2	41.0±3.7

表注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与低浓度人脐血间充质干细胞组比较, ^b $P < 0.05$; 与同组24 h比较, ^c $P < 0.05$, 与间接共培养比较, ^d $P < 0.05$ 。

2.4 间接共培养后巨噬细胞流式细胞仪分析结果 从表1、图5可观察到与人脐血间充质干细胞间接共培养24, 48 h后M2型巨噬细胞百分比变化。与空白对照组比较, 低、高浓度人脐带间充质干细胞组M2型细胞百分比均显著增高, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 与低浓度人脐血间充质干细胞组比较, 高浓度人脐血间充质干细胞组培养24, 48 h后M2型细胞百分比差异均无显著性意义; 与培养24 h比较, 高浓度人脐血间充质干细胞组培养48 h M2型细胞百分比显著增加, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.5 直接与间接共培养细胞流式细胞仪分析结果比较 从表1可观察到仅高浓度人脐血间充质干细胞组直接共培养48 h的M2型细胞百分比显著高于同时时间点的间接共培养, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.6 直接/间接共培养各组白细胞介素1β、白细胞介素6和白细胞介素10水平比较 从图6可以看出, 与空白对照组比较, 直接、间接共培养24, 48 h均可显著减低M1型巨噬

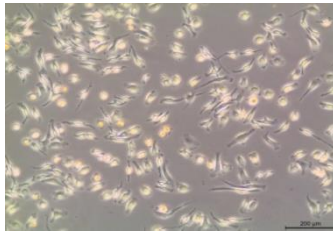


图1 小鼠骨髓单核/巨噬细胞
光镜下形态(x40)
Figure 1 Mouse bone marrow-derived monocytes/macrophages under light microscope (x40)

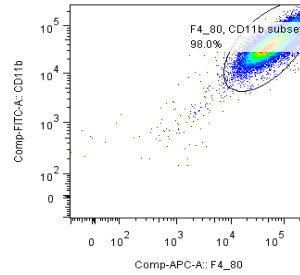
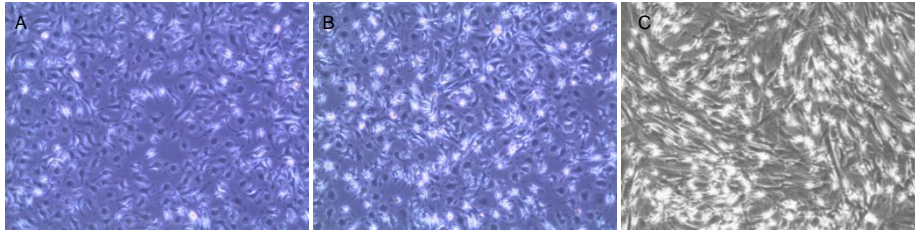
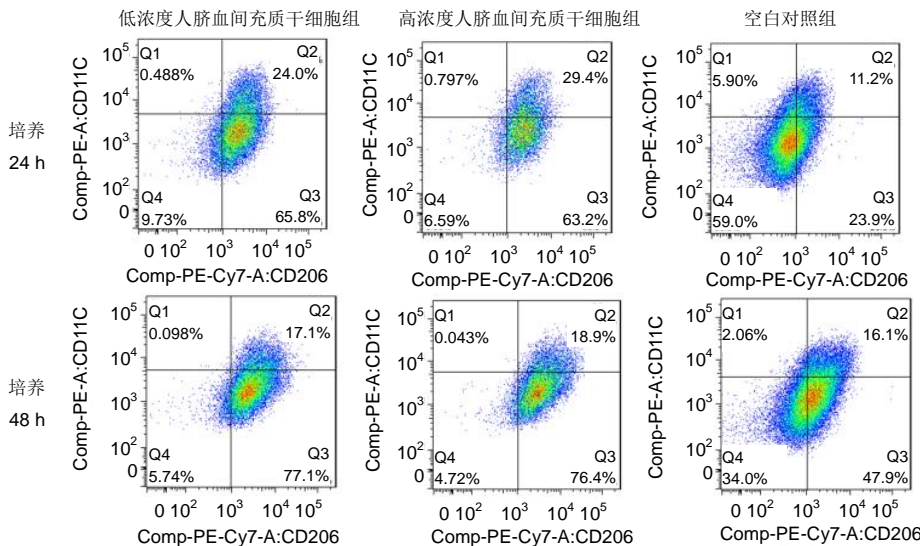


图3 M0 巨噬细胞 F4/80-CD11b 散点图
Figure 3 F4/80-CD11b scatter plot of M0 subtype macrophages



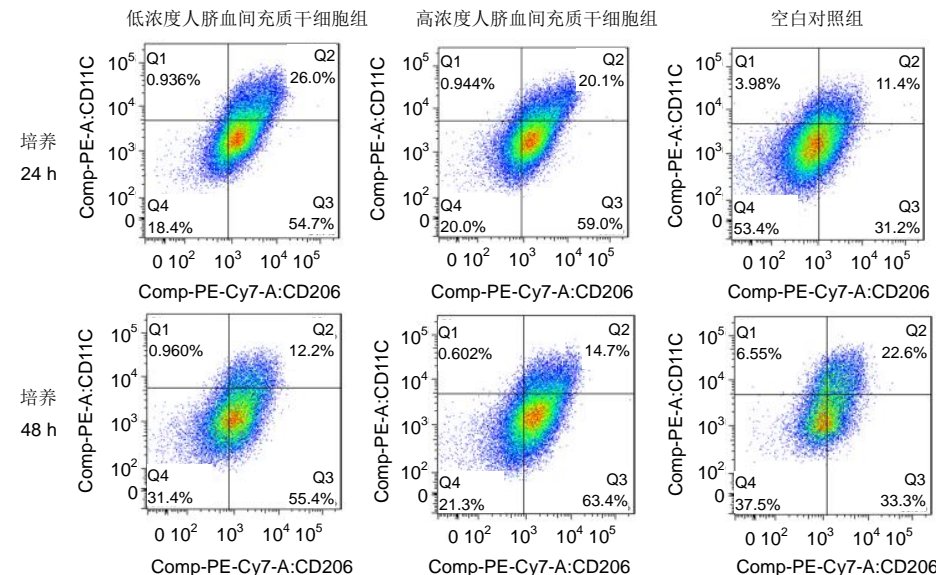
图注: 图中 A 为巨噬细胞在加入脂多糖/干扰素 γ 的完全培养基中培养 1 d, 呈扁平圆形, 透光性较差, 煎蛋样, 其触角较短, 为 M1 型细胞形态特征; B 为人脐血间充质干细胞与巨噬细胞间接共培养 24 h 后, 巨噬细胞触角伸长, 透光性较好, 细胞呈长索状, 为 M2 型细胞形态特征; C 为人脐血间充质干细胞与巨噬细胞直接共培养 24 h 后, 巨噬细胞触角伸长, 透光性较好, 细胞呈长索状, 为 M2 型细胞形态特征。

图2 小鼠巨噬细胞形态学变化(x40)
Figure 2 Morphological changes of mouse macrophages (x40)



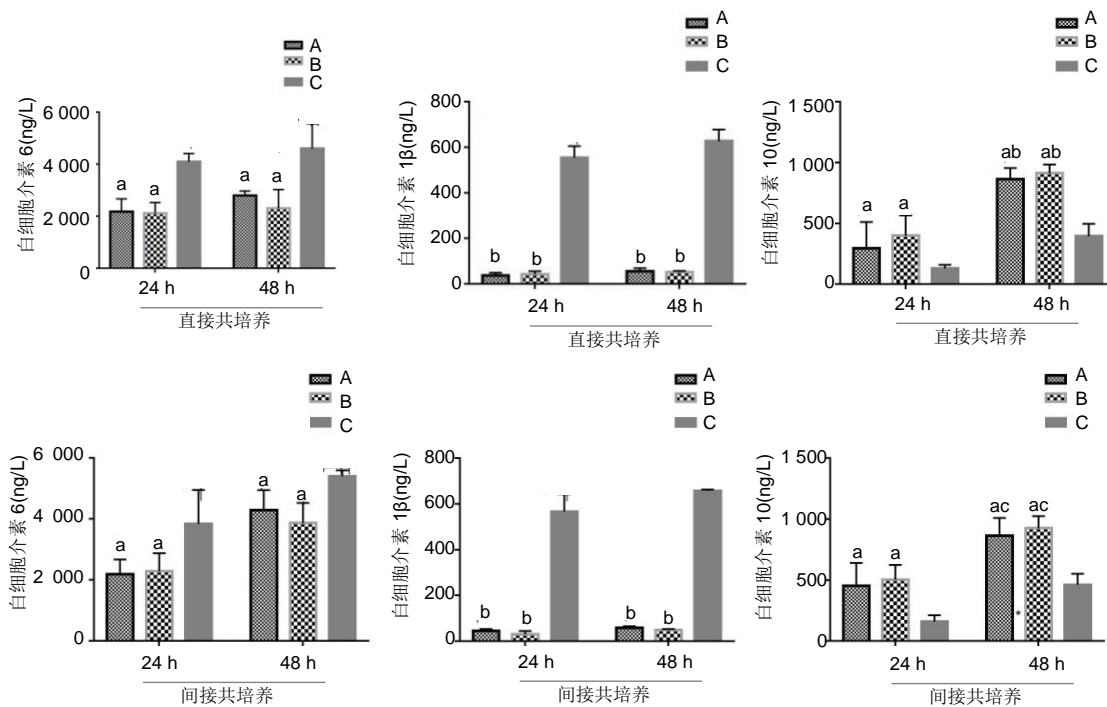
图注: 从流式图中画门圈出 F4/80、CD11b 强阳性的巨噬细胞, 第三象限 Q3(CD206⁺CD11C⁻)表示 M2 型细胞的比例。

图4 巨噬细胞与人脐血间充质干细胞直接共培养 M2 型细胞流式图
Figure 4 Flow cytometry detection of M2 macrophages under direct co-culture of macrophages and human umbilical cord blood mesenchymal stem cells



图注: 从流式图中画门圈出 F4/80、CD11b 强阳性的巨噬细胞, 第三象限 Q3(CD206⁺CD11C⁻)表示 M2 型细胞的比例。

图5 巨噬细胞与人脐血间充质干细胞间接共培养 M2 型细胞流式图
Figure 5 Flow cytometry detection of M2 macrophages under indirect co-culture of macrophages and human umbilical cord blood mesenchymal stem cells



图注: A 为低浓度人脐血间充质干细胞组, B 为高浓度人脐血间充质干细胞组, C 为空白对照组。与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 24 h 比较, ^c $P < 0.05$ 。

图 6 巨噬细胞和人脐血间充质干细胞直接/间接共培养后各组培养液中炎症因子变化趋势

Figure 6 Trends of inflammatory factors in culture media after direct/indirect co-culture of macrophages and human umbilical cord blood mesenchymal stem cells

细胞标志性生物因子白细胞介素6($P < 0.05$)和白细胞介素1 β ($P < 0.01$)水平, 可以显著上调白细胞介素10水平($P < 0.05$)。不同人脐血间充质干细胞浓度组间白细胞介素1 β 、白细胞介素6和白细胞介素10水平差异无显著性意义($P > 0.05$)。相同人脐血间充质干细胞浓度、不同时间组间比较, 48 h 抗炎细胞因子白细胞介素10水平均较24 h 显著上升($P < 0.05$)。

人脐血间充质干细胞相同浓度、相同时间间接共培养组与直接共培养组白细胞介素1 β 、白细胞介素6和白细胞介素10水平比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。

3 讨论 Discussion

人脐血间充质干细胞一直是近期移植医学研究的焦点, 被认为是一种多功能干细胞, 能够分化为骨、软骨、脂肪、肌肉等多种组织细胞。传统上骨髓是间充质干细胞的主要来源, 但由于有创的侵入性取得方式在应用中受到限制。人脐血间充质干细胞具有更多的优势: ①其获得方法较骨髓更容易, 无任何痛苦和不良作用, 更易让人们接受; ②与骨髓来源间充质干细胞没有明显的形态学和免疫表型的差异; ③相较于骨髓来源, 具有更强的繁殖能力^[11]; ④收集的脐血更容易保存, 可以放在液氮中长期保存, 复苏后可以维持90%的细胞活性; ⑤使用人脐血在伦理学上更容易被人们所接受; ⑥现在各国已经建立起脐血库, 为干细胞治疗奠定坚实的基础。因此, 该研究探讨人脐血间充质干细胞对骨髓单核细胞衍生的巨噬细胞M2亚型转化效应, 有别于传统实验采用骨髓间质细胞为实验细胞。

单核/巨噬细胞是非特异性免疫的重要组成部分, 在炎症和宿主防御中发挥重要作用, 其中2种功能及表型相反的单核细胞/巨噬细胞被命名为经典活化型单核细胞/巨噬细胞(M1型)和交替活化型单核细胞/巨噬细胞(M2型)^[11-12]。M1型单核细胞/巨噬细胞可以通过脂多糖和干扰素 γ 刺激

得到, 其细胞呈“煎蛋形”特征性细胞形态^[13], 高表达CD86、CD11C, 并产生多种促炎递质, 包括诱导性一氧化氮合酶、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素6、白细胞介素12和蛋白水解酶^[13], 构成对病原体的第一道防线。M2型单核细胞/巨噬细胞呈现出细长的纺锤样的形态, 高表达CD206、CD163, 可以通过白细胞介素4刺激诱导产生, 能高表达精氨酸酶1、CCL24、CCL17、白细胞介素4、白细胞介素10等细胞因子^[14-15], 能够促进炎症吸收与消退, 促进炎症组织修复。近期多个实验与临床试验证实可以通过单核巨噬细胞M1/M2型相互转化调节炎症反应。有实验证实急性心肌梗死组织出现时间依赖性巨噬细胞M1/M2变化^[16], 并且有学者发现心肌梗死后通过药物耗竭巨噬细胞, 反而增加心肌梗死的面积和死亡率^[4]。结果说明巨噬细胞在心肌梗死后炎症修复方面起到了至关重要的作用。该研究以单核细胞/巨噬细胞M2亚型转化为切入点, 探讨人脐血间充质干细胞对炎症反应的调控机制。

实验在体外冲洗出小鼠骨髓细胞, 使用巨噬细胞集落刺激因子条件培养基建立单核巨噬细胞培养系, F4/80是单核细胞表面糖蛋白, CD11b是巨噬细胞表面糖蛋白, 流式细胞结果显示培养的单核/巨噬细胞F4/80和CD11b阳性率为(98.00 \pm 1.02)%, 证明已成功、有效地建立单核/巨噬细胞培养系。

体外、体内多个实验均证实间充质干细胞对单核细胞/巨噬细胞介导炎症反应的影响是间充质干细胞主要炎症调控机制之一^[2, 4, 7, 13, 17-19]。间充质干细胞促进巨噬细胞从M1型转化成M2型, 释放抗炎细胞因子, 抑制促炎细胞因子的表达, 进而减少组织炎性损伤, 抑制炎症的进展, 促进炎症组织修复。

在体外实验中通过细胞形态学、细胞表型及细胞炎症因子多方面证实了人脐血间充质干细胞上调单核/巨噬细胞转换为M2型的生物学效应。该研究发现人脐血间充质干

细胞与BALB/C小鼠M0型巨噬细胞直接或间接体外共培养24, 48 h, 表现出细胞触角伸长, 细胞呈长索状M2型细胞形态特征。流式细胞检测结果显示M2型细胞表型CD206表达明显上升, M1型细胞表型CD11c表达下降, M1/M2比例下降。酶联免疫吸附测定分析直接或间接共培养细胞上清液中促炎的白细胞介素1 β 、白细胞介素6等细胞因子显著下调, 而抑制炎症进展的白细胞介素10水平显著增加。对于人脐血间充质干细胞调节巨噬细胞免疫表型的机制, 很多研究认为白细胞介素10的变化是关键^[20-21], 研究者将白细胞介素10注射到心肌梗死模型小鼠体内, 与安慰剂对照组比较, 发现M2型标记抗体显著提高, 这种变化可能和吲哚胺2,3-双加氧酶、转化生长因子 β 等细胞因子有关^[22-23], 另外的一些研究者发现间充质干细胞可以释放外泌体并且促进巨噬细胞分泌白细胞介素10, 从而改变巨噬细胞的免疫表型, 发挥其生物学效应^[6, 19]。

实验结果显示直接共培养组和间接共培养组间比较, 促进M2型转化效应没有显著差异性, 说明人脐血间充质干细胞对单核/巨噬细胞影响是通过小分子物质(直径<0.4 μm)发挥作用, 并不需要两种细胞直接接触。实验没有发现不同人脐血间充质干细胞浓度促进M2型转化效应在显著性差异, 但直接或间接共培养48 h较24 h效应更显著, 说明人脐血间充质干细胞对单核/巨噬细胞促进M2型转化效应有时效依赖性, 在实验中观察到人脐血间充质干细胞初期处于对数生长期, 其分裂速度非常快, 2倍的浓度差异可能无法对其结果产生影响, 人脐血间充质干细胞的浓度对其转化效应的具体影响有待进一步研究。

实验证实人脐血间充质干细胞与巨噬细胞直接与间接接触均促进巨噬细胞M2亚型转化, 其转化效应有时效依赖性, 而与细胞浓度无相关性, 人脐血间充质干细胞与巨噬细胞共培养促进巨噬细胞M2亚型转化机制有待进一步研究。研究结果为人脐血间充质干细胞调控单核/巨噬细胞介导炎症反应机制提供了实验佐证。

作者贡献: 实验设计、评估为第一作者及通讯作者, 实验实施及论文写作为第一作者, 资料收集为第二、三、四、五作者。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金面上项目(81570266)”“湖南省自然科学基金重点项目(2015SK2025)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经中南大学湘雅医院医学伦理委员会批准, 批准号为伦审(科)第201503435号。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过中南大学统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Cho DI, Kim MR, Jeong HY, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med*. 2014;46:e70.
- [2] Asami T, Ishii M, Namkoong H, et al. Anti-inflammatory roles of mesenchymal stromal cells during acute Streptococcus pneumoniae pulmonary infection in mice. *Cytotherapy*. 2018; 20(3):302-313.
- [3] Delewi R, van der Laan AM, Robbers LF, et al. Long term outcome after mononuclear bone marrow or peripheral blood cells infusion after myocardial infarction. *Heart*. 2015;101(5): 363-368.
- [4] Ben-Mordechai T, Holbova R, Landa-Rouben N, et al. Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(20): 1890-1901.
- [5] Silva JD, Lopes-Pacheco M, Paz AHR, et al. Mesenchymal Stem Cells From Bone Marrow, Adipose Tissue, and Lung Tissue Differentially Mitigate Lung and Distal Organ Damage in Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. *Crit Care Med*. 2018;46(2):e132-e140.
- [6] Ti D, Hao H, Tong C, et al. LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. *J Transl Med*. 2015;13:308.
- [7] Li Y, Liu J, Liao G, et al. Early intervention with mesenchymal stem cells prevents nephropathy in diabetic rats by ameliorating the inflammatory microenvironment. *Int J Mol Med*. 2018;41(5):2629-2639.
- [8] Yu G, Borlongan CV, Stahl CE, et al. Transplantation of human umbilical cord blood cells for the repair of myocardial infarction. *Med Sci Monit*. 2008;14(10):RA163-172.
- [9] Weischenfeldt J, Porse B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH Protoc*. 2008;2008.pdb. prot5080.
- [10] Brandenberger C, Kling KM, Vital M, et al. The Role of Pulmonary and Systemic Immunosenescence in Acute Lung Injury. *Aging Dis*. 2018; 9(4):553-565.
- [11] Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-1301.
- [12] Spaggiari GM, Moretta L. Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity. *Immunol Cell Biol*. 2013; 91(1):27-31.
- [13] Abumaree MH, Al Jumah MA, Kalionis B, et al. Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Rev*. 2013;9(5):620-641.
- [14] Chazaud B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology*. 2014;219(3):172-178.
- [15] Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593-604.
- [16] Swirski FK. Inflammation and repair in the ischaemic myocardium. *Hamostaseologie*. 2015;35(1):34-36.
- [17] Eirin A, Zhu XY, Jonnada S, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Improve the Renal Microvasculature in Metabolic Renovascular Disease in Swine. *Cell Transplant*. 2018;27(7):1080-1095.
- [18] Lavinia PD, Escalante P, García NC, et al. Continental-scale analysis reveals deep diversification within the polytypic Red-crowned Ant Tanager (*Habia rubica*, Cardinalidae). *Mol Phylogenet Evol*. 2015;89: 182-193.
- [19] Song Y, Dou H, Li X, et al. Exosomal miR-146a Contributes to the Enhanced Therapeutic Efficacy of Interleukin-1 β -Primed Mesenchymal Stem Cells Against Sepsis. *Stem Cells*. 2017;35(5):1208-1221.
- [20] Jung M, Ma Y, Iyer RP, et al. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res Cardiol*. 2017;112(3):33.
- [21] Holladay CA, Duffy AM, Chen X, et al. Recovery of cardiac function mediated by MSC and interleukin-10 plasmid functionalised scaffold. *Biomaterials*. 2012;33(5):1303-1314.
- [22] Lee S, Zhang QZ, Karabucak B, et al. DPSCs from Inflamed Pulp Modulate Macrophage Function via the TNF- α /IDO Axis. *J Dent Res*. 2016;95(11):1274-1281.
- [23] Liu W, Zhang S, Gu S, et al. Mesenchymal stem cells recruit macrophages to alleviate experimental colitis through TGF β 1. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(3):858-865.