

# 异基因骨髓间充质干细胞治疗实验性自身免疫性甲状腺炎 疗效评价及作用机制

褚亚男<sup>1</sup>, 徐芬芬<sup>1</sup>, 江晓宇<sup>1</sup>, 倪永青<sup>1</sup>, 汪李慧<sup>1</sup>, 张毅<sup>2</sup>, 郑荣秀<sup>1</sup>

(1. 天津医科大学总医院儿科, 天津 300052; 2. 军事医学科学院基础医学研究所细胞生物学研究室, 北京 100850)

**摘要:** **目的** 探讨异基因骨髓间充质干细胞(BM-MSC)对实验性自身免疫性甲状腺炎(EAT)的治疗作用及其机制。**方法** 利用猪甲状腺球蛋白和弗氏佐剂免疫 C57BL/6 小鼠, 制备 EAT 小鼠模型。BM-MSC 干预组小鼠在建模同时尾静脉输注同源 BM-MSC, 每只  $3 \times 10^5$ , 每周 1 次, 共 4 次。所有小鼠均在免疫后 28 d 处死, 分离甲状腺组织, 石蜡切片、HE 染色后进行病理学分析; 分离血清, 放射免疫分析法检测甲状腺球蛋白抗体(TgAb)、甲状腺微粒体抗体(TmAb)、甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)、总 3,5,3',5'-四碘甲腺原氨酸(TT4)、总 3,5,3'-三碘甲腺原氨酸(TT3)、干扰素  $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) 和白细胞介素 10(IL-10) 水平。**结果** ① 与正常对照组比较, 模型组小鼠 TgAb, TmAb 和 TPOAb 均明显增高, TT4 水平明显降低( $P < 0.05$ ), TT3 水平无明显差异, 甲状腺组织破坏明显, 提示成功建立 EAT 小鼠模型。② 正常对照组甲状腺组织未见淋巴细胞浸润; 模型组甲状腺组织淋巴细胞浸润明显; BM-MSC 干预组可见甲状腺组织淋巴细胞浸润, 浸润程度较模型组减轻。③ 与正常对照组相比, 模型组血清中 TgAb, TmAb, TPOAb 和 IFN- $\gamma$  水平增高, IL-10 水平降低( $P < 0.05$ ); BM-MSC 干预组与模型组相比, 血清中 TgAb, TmAb 和 TPOAb 水平明显降低, TT4 水平明显升高( $P < 0.05$ ), TT3 水平无明显差异, IFN- $\gamma$  表达水平降低, IL-10 表达水平增高( $P < 0.05$ )。**结论** BM-MSC 对 EAT 具有一定的治疗作用, 其机制有可能与其调节辅助性 T 细胞(Th)1/Th2 免疫平衡有关。

**关键词:** 甲状腺炎; 自身免疫性; 间充质干细胞; 骨髓; 细胞因子; 自身抗体

**中图分类号:** R967 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2014)05-0725-06

**DOI:** 10.3867/j.issn.1000-3002.2014.05.007

自身免疫性甲状腺炎(autoimmune thyroiditis, AIT), 也称桥本甲状腺炎, 具有较高的发病率, 是世界上非碘缺乏区引起甲状腺功能低下最重要的原因之一<sup>[1]</sup>。AIT 发病机制复杂, 特别是与免疫功能紊乱有密切关系, 调整机体自身免疫功能紊乱是治疗该病的核心与关键<sup>[2-3]</sup>。目前临床上治疗 AIT 的方法较多, 但尚非特效方法, 且不能逆转并阻止甲状腺病变的进展, 疾病后期患者多需长期服药和监测甲状腺功能状态, 严重影响患者的生活质量。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)因其具有低免疫原性和调节免疫功能等特性, 日益引起人们的关注, 也为 AIT 的治疗带来了希望。本研究

首先制备实验性自身免疫性甲状腺炎(experimental autoimmune thyroiditis, EAT)小鼠模型, 在其发病的早期即进行 MSC 干预, 探讨骨髓来源 MSC(bone marrow-derived MSC, BM-MSC)是否可重建辅助性 T 细胞 1(T helper cell 1, Th1)/Th2 细胞间的免疫平衡, 缓解甲状腺组织局部的炎症反应, 为深入阐述 AIT 的发病机制及 BM-MSC 介导的免疫疗法提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物和分组

36 只雌性 C57BL/6 小鼠, 8 周龄, 体质量 19~21 g, 购于北京维通利华实验动物中心, 动物许可证号 SCXK(京)2012-0001, 空调控制室温 20~26°C, 相对湿度 45%~65%, 照明黑暗交替 12 h/12 h。随机分为正常对照组、模型组和 BM-MSC 干预组, 每组 12 只, 均用标准食料喂养, 饮用自来水, 食物及饮水均自由摄取。

**基金项目:** 天津市自然科学基金项目(12JCYBJC17100)

**作者简介:** 褚亚男, 女, 硕士研究生, 主要从事儿内科临床研究。

**通讯作者:** 郑荣秀, Tel: (022) 60363821, E-mail: rxzheng@hotmail.com; 张毅, Tel: (010) 66931320, E-mail: zhangyi612@hotmail.com

## 1.2 主要试剂和仪器

猪甲状腺球蛋白 (porcine thyroglobulin, PTg)、完全弗氏佐剂 (complete Freund adjuvant, CFA) 和不完全弗氏佐剂 (incomplete Freund adjuvant, IFA) 均购于美国 Sigma 公司; 甲状腺球蛋白抗体 (thyroglobulin antibody, TgAb)、甲状腺微粒体抗体 (thyroid microsomal autoantibody, TmAb) 和甲状腺过氧化物酶抗体 (antithyroid peroxidase antibodies, TPOAb) 放射免疫检测试剂盒购于北京北方生物技术研究所; 总 3,5,3',5'-四碘甲腺原氨酸 (3,5,3',5'-tetraiodothyronine, TT4) 和总 3,5,3'-三碘甲腺原氨酸 (3,5,3'-triiodothyronine, TT3) 放射免疫检测试剂盒购于天津九鼎医学生物工程有限公司; 干扰素  $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 和白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) ELISA 试剂盒均购于天津索罗门生物实验有限公司; II 型胶原酶、 $\alpha$ -MEM 培养液和胎牛血清购于美国 Gibco 公司; 红细胞裂解液购于美国 BD 公司; 异硫氰基荧光素 (FITC) 标记的兔抗小鼠 Sca-1, CD11b, CD34 和 CD45 抗体及藻红蛋白 (PE) 标记的兔抗小鼠 CD105, CD29, CD31 和 CD44 抗体均购于美国 EBioscience 公司。Coulter EPICS XL 型流式细胞仪购自美国 BD 公司。

## 1.3 BM-MSC 的制备

无菌取小鼠股骨和胫骨, 剪除两端骨骺, 用含 2% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 冲出骨髓细胞, 分散成单个细胞, 按  $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$  密度接种于 25 mL 培养瓶中, 培养体系为含 10% 胎牛血清, 谷氨酰胺  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 青霉素  $1 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ , 链霉素  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\alpha$ -MEM,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 4 d, 更换培养液, 以后每 3 d 更换培养液, 当培养细胞达到将近 80% 融合时, 以 0.25% 的胰蛋白酶 PBS 液 (含有 0.02% EDTA) 消化, 传代, 在第 4 代时收集细胞制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为每管  $1 \times 10^6$  细胞, 洗净后 PBS 重悬至每管 100  $\mu\text{L}$ 。按照抗体说明书要求, 分别加入 FITC 标记的兔抗小鼠 CD11b, CD34, CD45 和 Sca-1 抗体, 以及 PE 标记的兔抗小鼠 CD29, CD31, CD44 和 CD105 抗体。 $4^\circ\text{C}$  避光孵育 30 min, 而后用 PBS, 洗 2 次, 标记的细胞流式细胞仪上机, 应用 winmdi29 程序分析分离及培养的 BM-MSC 表面抗原成分。

## 1.4 BM-MSC 输注前准备

培养至第 4 代的 BM-MSC 在干预 3 h 前收获。先用 PBS 液冲洗 2 次, 加入 0.25% 胰酶消化 3~5 min, 消化过程中在显微镜下严密观察细胞形态, 当细胞出现回缩, 边缘与培养瓶底部剥离时立即加入含胎

牛血清的培养液终止。消化后的 BM-MSC 用 PBS 洗涤 2 次, 制备成单细胞悬液, 调整细胞浓度为  $6 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$  单细胞悬液以备用。

## 1.5 EAT 小鼠模型的制备及 BM-MSC 治疗

初次免疫: 取 PTg 与 CFA 等体积混合并充分乳化, 在实验第 0 天时对模型组和 BM-MSC 干预组每只小鼠的两后足跖和腹股沟皮下注射 PTg 100  $\mu\text{g}$ , 并于相同时间点及部位对正常对照组小鼠注射等量的生理盐水。

加强免疫: 将 PTg 与 IFA 等体积混合并充分乳化后, 在实验第 14 天时再次对模型组及 BM-MSC 干预组小鼠两后足跖和腹股沟进行皮下注射, 每只 100  $\mu\text{g}$ , 同时正常对照组小鼠注射等量的生理盐水。BM-MSC 干预组在建立 EAT 模型的同时于第 0, 7, 14 和 21 天分别通过尾静脉注射同源小鼠 BM-MSC 细胞, 每只  $3 \times 10^5$  细胞。

## 1.6 HE 染色光镜下观察甲状腺组织病理改变

实验第 28 天摘眼球取血并处死所有小鼠, 取甲状腺组织, 置于 4% 甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, HE 染色光镜下观察甲状腺组织病理形态改变, 包括滤泡大小、上皮形态、上皮及滤泡间的淋巴细胞浸润。参考 Tang 等<sup>[4]</sup> 的炎症分级标准, 光镜下观察甲状腺组织的炎症细胞浸润程度。1 级: 炎症细胞在  $\geq 2$  个甲状腺滤泡间聚集; 2 级: 炎症细胞病灶可达 1 个甲状腺滤泡大小; 3 级: 10%~40% 的甲状腺组织被炎症细胞取代; 4 级: >40% 的甲状腺组织被炎症细胞取代。EAT 炎症分级标准: <1 级为正常, 1~2 级为轻度, 2~3 级为中度, 3~4 级为重度。

## 1.7 放射免疫法检测血清相关成分

采用放射免疫法检测血清中 TT3, TT4, TgAb, TPOAb 和 TmAb 水平, 严格按照试剂盒说明书进行操作; ELISA 检测血清中 IFN- $\gamma$  和 IL-10 的表达水平, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

## 1.8 统计学分析

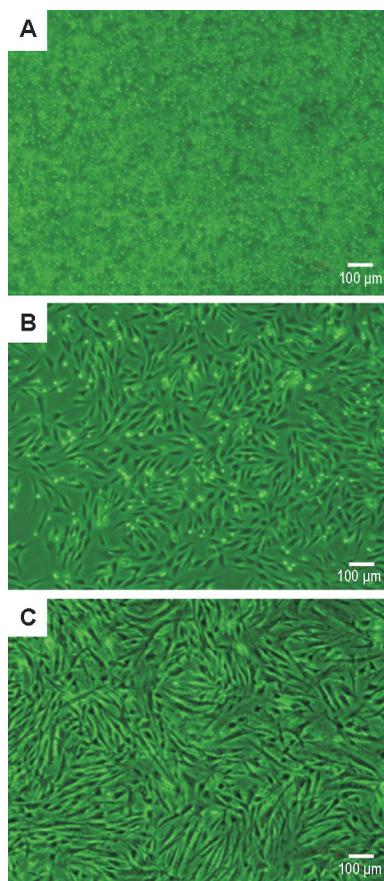
实验结果数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS18.0 专业统计软件进行分析。计量数据的组间比较进行单因素方差分析, 两两比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BM-MSC 的分离培养与鉴定

将分离的 C57BL/6 小鼠的胫、股骨骨髓进行分离后用胶原酶消化, 并给予完全培养基进行培养, 并根据细胞生长情况及密度进行连续传代。新鲜分离

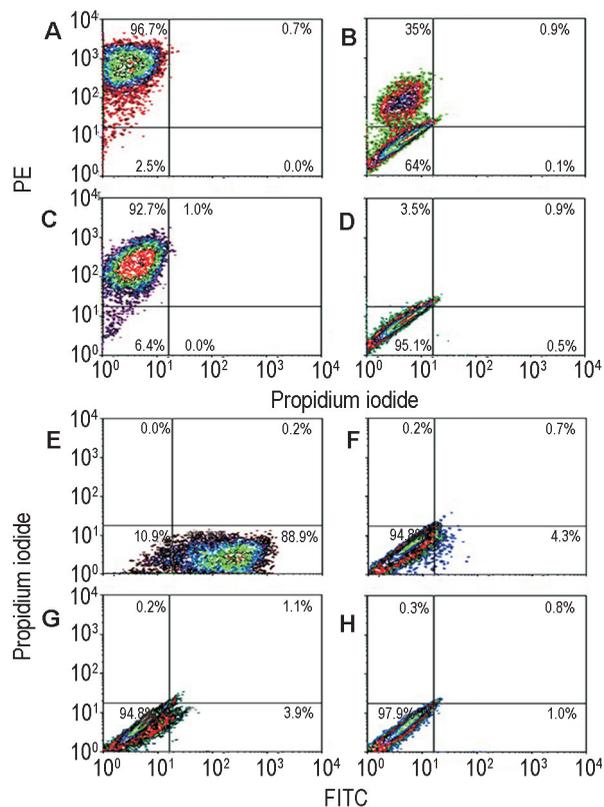
的骨髓细胞呈球形,漂浮于完全培养基中(图 1A),在培养第 3 天时可见成纤维状贴壁生长的细胞,为单个纺锤形细胞(图 1B),此后该形状的细胞逐渐形成克隆,继续培养。细胞传至第 3~4 代左右,细胞形态多均一,呈梭形(图 1C)。收获第 4 代细胞,标记不同抗体,应用流式细胞仪检测细胞表型。结果表明,细胞高表达干细胞表型 Sca-1 和 CD105 及间充质表型 CD29 和 CD44,低表达或者不表达造血表型 CD11b, CD34 和 CD45 及内皮细胞表型 CD31 (图 2)。



**Fig.1 Morphological observation of separated and cultured bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) of mice.** The BM-MSCs of C57BL/6 mice were separated and digested using clostridiopeptidases, and then cultured in the complete cell culture. A: the fresh bone marrow cells of C57BL/6 mice, spherical and suspending in the medium; B: BM-MSCs on the 3rd day, adherent growth like fibroblast; C: the 4th passage of BM-MSCs, showing a rather homogeneous fusiform form.

**2.2 尾静脉输注 BM-MSC 对 EAT 模型小鼠甲状腺组织病理变化的影响**

小鼠甲状腺组织经 HE 染色固定后在光学显微镜下观察,正常对照组(图 3A)小鼠甲状腺组织的甲状腺滤泡大小均一,发育成熟,滤泡腔充满均匀胶质,滤泡上皮多呈单层,滤泡呈小叶状排列,小叶周围有少量纤维组织和血管,未见炎症细胞浸



**Fig.2 Analysis of phenotype of cultured BM-MSCs by flow cytometry.** A: PE-CD105, positive; B: PE-CD29, positive; C: PE-CD44, positive; D: PE-CD31, negative; E: FITC-Sca-1, positive; F: FITC-CD34, negative; G: FITC-CD45, negative; H: FITC-CD11b, negative.

润。与正常对照组相比,EAT 模型组(图 3B)甲状腺滤泡呈椭圆形,滤泡腔充满红色胶质,并有上皮细胞及新滤泡增生,间质水肿及毛细血管扩张,且有不同程度的炎症反应。与模型组相比,BM-MSC 干预组(图 3C)甲状腺滤泡大小不一,可见淋巴细胞浸润,炎症反应较模型组减轻。

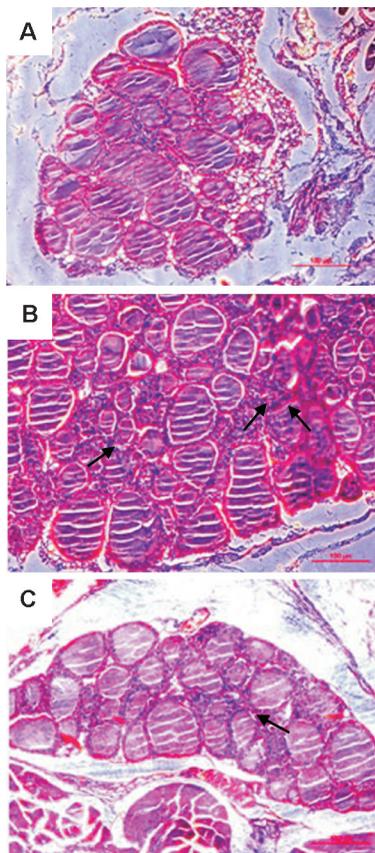
**2.3 尾静脉输注 BM-MSC 对 EAT 模型小鼠血清 TT3 和 TT4 水平的影响**

表 1 结果表明,正常对照组、模型组和 BM-MSC 干预组 TT3 水平均无明显差异。模型组 TT4 水平与正常对照组相比显著降低 ( $P < 0.01$ ), BM-MSC 干预组 TT4 水平较模型组明显升高 ( $P < 0.05$ )。

**Tab.1 Effect of BM-MSCs on level of 3,5,3'-triiodothyronine (TT3) and 3,5,3',5'-tetraiodothyronine (TT4) in serum of EAT model mice**

| Group          | TT3/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | TT4/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ |
|----------------|--|--|
| Normal control | 1.1 $\pm$ 0.1                          | 70.8 $\pm$ 3.5                         |
| Model          | 1.0 $\pm$ 0.1                          | 50.7 $\pm$ 4.9**                       |
| BM-MSC         | 1.1 $\pm$ 0.1                          | 65.0 $\pm$ 5.4 <sup>#</sup>            |

See Fig.3 for the mouse treatment.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with normal control group; <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , compared with model group.



**Fig.3 Effect of BM-MSCs on histopathological changes of thyroid tissue of EAT model mice (HE ×200).** BM-MSCs were injected into the EAT mice,  $3 \times 10^5$  per mouse, on the 0, 7th, 14th and 21st day. Thyroid tissue was collected and observed on the 28th day. A: normal control group; B: EAT model group; C: BM-MSC treated group. The arrows show inflammatory cells.

**2.4 尾静脉输注 BM-MSC 对 EAT 模型小鼠血清 TPOAb, TgAb 和 TmAb 水平的影响**

由表 2 可见,模型组血清 TPOAb, TgAb 和 TmAb 抗体水平均显著高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, BM-MSC 干预组血清中 TPOAb 水平显著下降 ( $P < 0.01$ ), TgAb 和 TmAb 水平亦明显下降 ( $P < 0.05$ )。

**Tab.2 Effect of BM-MSCs on level of antithyroid peroxidase antibody (TPOAb), thyroglobulin antibody (TgAb) and thyroid microsomal autoantibody (TmAb) in serum of EAT model mice**

| Group          | TPOAb/% | TgAb/% | TmAb/% |
|----------------|---------|--------|--------|
| Normal control | 23±3    | 8±2    | 10±2   |
| Model          | 60±4**  | 60±3** | 64±2** |
| BM-MSC         | 48±8##  | 50±5#  | 54±4#  |

See Fig.3 for the mouse treatment.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with normal control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with model group.

**2.5 尾静脉输注 BM-MSC 对 EAT 模型小鼠血清 IFN- $\gamma$  和 IL-10 水平的影响**

由表 3 可以看出,模型组血清 IFN- $\gamma$  水平较正常对照组显著增高 ( $P < 0.01$ ), IL-10 水平明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, BM-MSC 干预组中 IFN- $\gamma$  水平降低 ( $P < 0.05$ ), IL-10 水平显著增高 ( $P < 0.01$ )。

**Tab.3 Effect of BM-MSCs on level of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and interleukin-10 (IL-10) in serum of EAT model mice**

| Group          | IFN- $\gamma$ /ng·L <sup>-1</sup> | IL-10/ng·L <sup>-1</sup> |
|----------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Normal control | 96.2±5.7                          | 102.3±6.9                |
| Model          | 132.1±8.0**                       | 78.1±4.4**               |
| BM-MSC         | 112.9±6.1#                        | 90.3±4.1##               |

See Fig.3 for the mouse treatment.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.05$ , compared with normal control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with model group.

**3 讨论**

AIT 是一种器官特异性自身免疫性疾病,以甲状腺组织的破坏及自身抗体的产生为主要特征,遗传易感性、生活环境等多方面因素共同参与该病的发生与发展<sup>[5]</sup>。AIT 发病机制复杂,细胞免疫及体液免疫均参与其中,细胞因子被认为是启动免疫紊乱的关键所在<sup>[6]</sup>。已有研究显示,在 EAT 中 IFN- $\gamma$  分泌量的增加会加重甲状腺组织的炎症反应,提示 EAT 是一种主要由 Th1 细胞介导的自身免疫性疾病<sup>[7]</sup>。亦有研究显示,在 AIT 中 Th2 细胞数量有减少的趋势<sup>[8]</sup>,组织浸润的淋巴细胞对甲状腺细胞有杀伤作用,而 IL-10 可增加 FasL 在甲状腺细胞中的表达,从而通过 Fas 途径对甲状腺细胞发挥保护作用<sup>[9]</sup>。故 Th1 与 Th2 细胞平衡的失调在 AIT 的发病过程中发挥着巨大的作用。

MSC 是一群中胚层来源的具有自我更新和多向分化潜能的多能干细胞,因其具有低免疫原性和在免疫调节中的重要作用,所以日益引起研究者的注意,尤其是在治疗移植物抗宿主病方面取得了可喜的成果<sup>[10]</sup>。目前已有研究表明, MSC 在体外可通过一氧化氮、前列腺素 E<sub>2</sub> 及吲哚胺 2,3-双加氧酶等细胞因子间相互作用发挥抑制 T 和 B 细胞增殖及对自然杀伤细胞功能抑制的作用<sup>[11]</sup>。亦有体内实验结果显示,在动物模型内输注异体 MSC 后, Th1 型促炎症细胞因子如 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 和 IL-2 下调;同时, Th2 型抗炎细胞因子如 IL-4, IL-10 和 TGF- $\beta$  的表达上调,使免疫应答由 Th1 向 Th2 发生偏移,即

导致促炎症环境向抗炎环境转变<sup>[12]</sup>。

小鼠 EAT 模型与人类 AIT 具有相同的病理基础和临床表现,为探索研究 AIT 的发病机制及治疗方法提供了实验基础<sup>[13]</sup>。目前普遍认为,成功的动物模型应具备 2 个方面的特征。首先,血清中 TPOAb, TgAb 以及 TmAb 水平的增高;其次表现为甲状腺组织自身的破坏。本研究采用国内外公认的经典建模方法即用甲状腺自身抗原成分 Tg 加弗氏佐剂免疫小鼠建立 EAT 小鼠模型。本研究结果表明,模型组甲状腺组织可见有不同程度炎症细胞浸润,血清 TPOAb, TGAb 和 TmAb 水平明显升高,血清中 TT4 水平明显降低,均提示 EAT 模型构建成功。在成功制备 EAT 小鼠模型的基础上,应用 BM-MSC 对 EAT 小鼠进行干预。结果显示, BM-MSC 干预组小鼠甲状腺组织炎症浸润程度明显减轻,自身抗体 TPOAb, TgAb 和 TmAb 水平均明显降低, TT4 水平升高,提示 BM-MSC 对 EAT 模型小鼠具有显著干预作用。结合 Th1 型促炎因子 IFN- $\gamma$  水平降低,而 Th2 型抑炎因子 IL-10 水平显著升高,推测 BM-MSC 可能在一定程度上通过恢复 Th1/Th2 平衡从而起到对 EAT 的治疗作用,此结论为 AIT 的治疗提供了实验依据和新思路。本研究结果中 3 组间 TT3 水平均无明显差异,考虑可能与建模时间短有关,以后可延长观察时间等进一步完善实验条件。

综上所述,应用 BM-MSC 早期干预可降低 EAT 甲状腺组织的破坏程度以及血清 TPOAb, TgAb 和 TmAb 水平,提示 MSC 介导的调节作用在 EAT 的发病中至关重要,为临床 AIT 治疗提供了新思路。

#### 参考文献:

- [1] Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding [J]. *Endocr Rev*, 1994, **15**(6):788-830.
- [2] Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. The colorado thyroid disease prevalence study[J]. *Arch Intern Med*, 2000, **160**(4):526-534.
- [3] Mikoś H, Mikoś M, Obara-Moszyńska M, Niedziela M. The role of the immune system and cytokines involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease (AITD) [J]. *Endokrynol Pol*, 2014, **65**(2):150-155.
- [4] Tang H, Mignon-Godefroy K, Meroni PL, Garotta G, Charreire J, Nicoletti F. The effects of a monoclonal antibody to interferon-gamma on experimental autoimmune thyroiditis (EAT): prevention of disease and decrease of EAT-specific T cells [J]. *Eur J Immunol*, 1993, **23**(1):275-278.
- [5] Swain M, Swain T, Mohanty BK. Autoimmune thyroid disorders – an update [J]. *Indian J Clin Biochem*, 2005, **20**(1):9-17.
- [6] Choi EW, Shin IS, Bhang DH, Lee DH, Bae BK, Kang MS, et al. Hormonal change and cytokine mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells during the development of canine autoimmune thyroiditis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, **146**(1):101-108.
- [7] Farine JC. Animal models in autoimmune disease in immunotoxicity assessment [J]. *Toxicology*, 1997, **119**(1):29-35.
- [8] Salamero J, Remy JJ, Michel-Bechet M, Charreire J. Experimental autoimmune thyroiditis induced by a 5–10-ku tryptic fragment from porcine thyroglobulin [J]. *Eur J Immunol*, 1987, **17**(6):843-848.
- [9] Wang SH, Bretz JD, Phelps E, Mezosi E, Arscott PL, Utsugi S, et al. A unique combination of inflammatory cytokines enhances apoptosis of thyroid follicular cells and transforms nondestructive to destructive thyroiditis in experimental autoimmune thyroiditis [J]. *J Immunol*, 2002, **168**(5):2470-2474.
- [10] Nepom GT, St Clair EW, Turka LA. Challenges in the pursuit of immune tolerance [J]. *Immunol Rev*, 2011, **241**(1):49-62.
- [11] Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, Colmenero I, Ramírez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have *in vivo* immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease [J]. *Stem Cells*, 2006, **24**(11):2582-2591.
- [12] Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells [J]. *Blood*, 2007, **110**(10):3499-3506.
- [13] Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells [J]. *Blood*, 2007, **109**(1):228-234.

## Therapeutical effect and mechanism of allo-bone marrow mesenchymal stem cells in experimental autoimmune thyroiditis

CHU Ya-nan<sup>1</sup>, XU Fen-fen<sup>1</sup>, JIANG Xiao-yu<sup>1</sup>, NI Yong-qing<sup>1</sup>, WANG Li-hui<sup>1</sup>,  
ZHANG Yi<sup>2</sup>, ZHENG Rong-xiu<sup>1</sup>

(1. Department of Pediatrics, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China;  
2. Department of Cell Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military  
Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To investigate the curative effect and mechanism of allo-bone marrow mesenchymal stem cell (BM-MSC) infusion in the experimental autoimmune thyroiditis (EAT) mouse model. **METHODS** An EAT mouse model was established in C57BL/6 mice using porcine thyroglobulin (PTg) and Freund adjuvant, while BM-MSCs were injected into the EAT mice of BM-MSC treated group,  $3 \times 10^5$  per mouse on the 0, 7th, 14th and 21st day. On the 28th day, all the mice were sacrificed, and thyroid tissue was isolated, embedded in paraffin and stained with HE staining for histological examination. Serum was collected to assess the level of thyroglobulin antibodies (TgAb), thyroid microsomal autoantibodies (TmAb), antithyroid peroxidase antibodies (TPOAb), 3, 5, 3', 5'-tetraiodothyronine (TT4), 3, 5, 3'-triiodothyronine (TT3), interleukin-10 (IL-10) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). **RESULTS** ① Thyroid tissue in model group showed inflammatory response and infiltration. The level of TmAb, TgAb and TPOAb was significantly increased compared with normal control group, but the level of TT4 was decreased while there was no change in the level of TT3, suggesting that an EAT mouse model was established. ② The thyroid in model group and BM-MSC treated group showed inflammatory response and inflammatory cell infiltration, but the response in BM-MSC treated group was weaker than in model group. ③ Compared with model group, the level of TgAb, TmAb, TPOAb and IFN- $\gamma$  was decreased obviously ( $P < 0.05$ ), the level of TT4 and IL-10 was increased significantly ( $P < 0.05$ ), but the level of TT3 changed little in BM-MSC treated group. **CONCLUSION** BM-MSCs may partly restore the immunological homeostasis state. The mechanism may be related to its modulation of immune balance of Th1/Th2. **Key words:** thyroiditis, autoimmune; mesenchymal stem cells; bone marrow; cytokines; autoantibodies

**Foundation item:** The project supported by Natural Science Foundation of Tianjin City (12JCYBJC17100)

**Corresponding author:** ZHENG Rong-xiu, Tel: (022)60363821, E-mail: rxzheng@hotmail.com; ZHANG Yi, Tel: (010)66931320, E-mail: zhangyi612@hotmail.com

(收稿日期: 2014-05-05 接受日期: 2014-09-16)  
(本文编辑: 齐春会)