

人脐带血间充质干细胞治疗免疫性血小板减少症小鼠的效应研究

杨宝娟¹, 杨敏², 吴新华¹

(1. 郑州大学第二附属医院 妇产科, 郑州 453001; 2. 新乡医学院第一附属医院 传染内科, 新乡 453100)

摘要: 探讨人脐带血间充质干细胞(human umbilical cord blood mesenchymal stem cell, hUC-MSC)对免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP)模型小鼠及对维甲酸相关孤儿受体 γ t(retinoic acid-related orphan receptor γ t, ROR- γ t)/叉头翼状螺旋转录因子 3(forkhead winged helix transcription factor 3, Foxp3)通路的影响。分离培养健康 hUC-MSC, 观察其生长形态并鉴定, 筛选稳定增殖的原代细胞传代。将 30 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组(Con 组)、ITP 模型组及 hUC-MSC 组, 每组 10 只; 相应处理后观察小鼠的一般状况; 检测小鼠外周血血小板计数(platelet count, PLT); ELISA 试剂盒检测血清 IL-6、IL-17、IL-10 和 TGF- β 1 水平; 瑞氏染色观察小鼠骨髓组织病理学变化并计数巨核细胞分类数量; RT-qPCR、Western blotting 检测小鼠脾脏组织、外周血中 ROR- γ t、Foxp3 mRNA 及蛋白表达。结果显示, 与 Con 组比较, ITP 模型组小鼠血清 IL-6 和 IL-17 水平、脾脏组织 ROR- γ t mRNA 和蛋白表达及外周血 ROR- γ t mRNA 和蛋白表达显著升高(均 $P < 0.05$), PLT、血清 IL-10 和 TGF- β 1 水平、脾脏组织 Foxp3 mRNA 和蛋白表达及外周血 Foxp3 mRNA 和蛋白表达显著降低(均 $P < 0.05$), 产板巨核细胞数量显著减少($P < 0.05$)。与 ITP 模型组比较, hUC-MSC 组小鼠血清 IL-6 和 IL-17 水平、脾脏组织 ROR- γ t mRNA 和蛋白表达及外周血 ROR- γ t mRNA 和蛋白表达显著降低(均 $P < 0.05$), PLT、血清 IL-10 和 TGF- β 1 水平、脾脏组织 Foxp3 mRNA 和蛋白表达及外周血 Foxp3 mRNA 和蛋白表达显著升高(均 $P < 0.05$), 产板巨核细胞数量有所增多($P < 0.05$)。由此, hUC-MSC 可促进血小板生成和产板巨核细胞数量增多, 或通过调节细胞因子及 ROR- γ t/Foxp3 表达改善 ITP 小鼠症状。

关键词: 脐带血间充质干细胞; 免疫性血小板减少症; 维甲酸相关孤儿受体 γ t /叉头蛋白 3

中图分类号: R558+.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(XXXX)XX-0001-08

免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP)是一种常见的自身免疫性疾病, 特点是外周血小板破坏增加或生成减少、骨髓巨核细胞数正常或增多^[1]。成年 ITP 患者中, 超过 95% 的人群伴有免疫基础疾病, 该类患者的死亡率约为 1%^[2]。ITP 的发病机制尚不完全清楚, 可能涉及自身免疫耐受的失衡, 导致针对血小板及巨核细胞的体液免疫和细胞免疫异常^[3]。由于 ITP 的临床治疗策略有限, 且慢性难治性 ITP 患者的死亡率较高, 生活质量差^[4], 因此探寻新的治疗策略显得尤为重要。近年来, 间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)因其具有免疫调节功能, 在多种自身免疫性疾病的治疗中展现出潜力, 已成为一种创新性的治疗策略^[5]。与其他类型 MSC 比较, 人脐带血

MSC(human umbilical cord blood mesenchymal stem cell, hUC-MSC)易于分离、无伦理争议且免疫原性较低, 具有更高的安全性和免疫耐受性^[6]。维甲酸相关孤儿受体 γ t(retinoic acid-related orphan receptor γ t, ROR- γ t)和叉头翼状螺旋转录因子 3(forkhead winged helix transcription factor 3, Foxp3)分别是 Th17 和 Treg 的关键转录因子, 在维持免疫平衡中发挥重要作用^[7]。其中, Th17 通过释放促炎因子如 IL-6、IL-17 等促进炎症反应, 而 Treg 则通过释放抑炎因子如 IL-10、TGF- β 1 等抑制炎症反应, 两者的平衡共同维持免疫耐受^[8]。在 ITP 中, Th17/Treg 细胞因子失衡可能是导致疾病进展的关键因素^[9], hUC-MSC 对 ITP 的影响是否涉及 ROR- γ t/Foxp3 途径鲜有报道。因此, 本研究建立 ITP 小鼠模型, 探讨 hUC-MSC 是否通过影响 ROR- γ t/Foxp3 的表达调节免疫平衡, 从而改善 ITP 的症状, 以期为 hUC-MSC 治疗 ITP 提供理论依据, 并为开发新的治疗策略提供可能。

收稿日期: 2025-01-22

基金项目: 二〇二三年度河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20230320)

作者简介: 杨宝娟(1983—), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事妇产科相关研究

通信作者: 吴新华(E-mail: Jiwei1629@163.com)

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂 30 只 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 6 周龄, 体质量 18~20 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司[生产许可证号: SYXK(京)2022-0052]。饲养条件设定如下: 光照周期遵循 12 h 光照与 12 h 黑暗的自然节律, 室内温度维持在 20~25 °C, 相对湿度(50±5)%, 通风良好, 期间小鼠自由进食与饮水。

hUC-MSC, 购自北京清美联创干细胞科技有限公司; 杜氏改良 Eagle 培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM), 购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清, 购自美国 Gibco 公司; 青-链霉素、地塞米松、胰岛素、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、油红 O 试剂和茜素红染料, 均购自 Sigma-Aldrich 公司; 吲哚美辛, 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 鼠抗 CD29-FITC、CD34-FITC、CD45-FITC、CD44-PE 和 CD90-PE 单抗, 均购自美国 eBioscience 公司; 豚鼠抗小鼠血小板血清(Guinea pig anti-mouse platelet serum, GP-APS), 购自北京百奥莱博科技有限公司; IL-6、IL-17、IL-10 和 TGF- β 1 ELISA 检测试剂盒, 均购自杭州联科生物技术股份有限公司; 兔抗 ROR- γ t、Foxp3 单抗, 均购自艾博抗(上海)贸易有限公司。

1.2 hUC-MSC 的培养和观察 接种 hUC-MSC 于含 10% 胎牛血清及 100 U/mL 青-链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 待细胞融合度至 90% 时, 按照比例传代, 并于显微镜下观察细胞形态变化。

1.3 hUC-MSC 的鉴定

1.3.1 流式细胞术检测 hUC-MSC 表面标志物表达 取生长状态良好的第 4 代 hUC-MSC, 贴壁细胞经胰蛋白酶消化后, 添加抗 CD29-FITC、CD34-FITC、CD45-FITC 和抗 CD44-PE、CD90-PE 抗体, 并设置阴性同型对照组, 于常温下避光孵育 40 min; PBS 漂洗、重悬, 经尼龙筛网过滤后获得单细胞悬液, 流式细胞仪上机检测细胞表面标志物表达。

1.3.2 hUC-MSC 成脂分化能力的鉴定 取生长状态良好的第 4 代 hUC-MSC, 以 1×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板, 待细胞融合度至 80%~90% 时, 替换培养基为含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养

基, 并添加 1 μ mol/L 地塞米松、100 μ g/mL IBMX、10 μ g/mL 胰岛素和 200 μ mol/L 吲哚美辛, 每间隔 3 d 进行 1 次全量换液。细胞诱导分化 14 d 后, 油红 O 染色处理, 随后于倒置相差显微镜下观察细胞脂肪滴的形成情况。

1.3.3 hUC-MSC 成骨分化能力的鉴定 取生长状态良好的第 4 代 hUC-MSC, 以 1×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板, 待细胞融合度至 80%~90% 时, 替换培养基为含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 并添加 100 nmol/L 地塞米松、50 μ mol/L 抗坏血酸和 10 mmol/L β -磷酸甘油, 每间隔 3 d 进行 1 次全量换液。细胞诱导分化 21 d 后, 茜素红染色处理, 随后于倒置相差显微镜下观察细胞的矿化情况并记录。

1.4 实验鼠的分组、造模及处理 将 30 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组(Con 组)、ITP 模型组及 hUC-MSC 组, 每组 10 只。除 Con 组外, 其余 2 组腹腔注射 GP-APS 构建 ITP 小鼠模型^[10]。具体方法如下: 56 °C 水浴 GP-APS 灭活补体 30 min 后, 使用生理盐水按 1:4 比例稀释; 于第 0、1、3、5、7、9、11 和 13 天(Day 0, 可缩写为 D0, 后类推)时, 腹腔注射 0.1 mL 稀释后的 GP-APS, 对照组注射等量生理盐水, 处理均 1 次/d。当小鼠出现明显的皮下紫癜、体质量明显下降时, 说明 ITP 模型建立成功^[11]。造模成功后, hUC-MSC 组小鼠尾静脉注射 200 μ L 1×10^6 个/mL 密度 hUC-MSC, 其余 2 组注射等量生理盐水。

1.5 检测外周血血小板计数(platelet count, PLT)

分别于 hUC-MSC 处理后 0、1、3、5 和 7 天取各组小鼠尾部静脉血 100 μ L, 添加 100 μ L 1% EDTA-2Na 抗凝剂, 充分混合后离心, 取上清液, 使用全自动血细胞分析仪检测 PLT。

1.6 ELISA 试剂盒检测小鼠血清 IL-6、IL-17、IL-10 和 TGF- β 1 水平 hUC-MSC 处理后第 7 天, 麻醉小鼠球后静脉采血, 离心取上清液, 按照 ELISA 试剂盒的详细说明书, 严谨地执行操作步骤, 检测各组小鼠血清中 IL-6、IL-17、IL-10 和 TGF- β 1 水平。

1.7 瑞氏染色观察小鼠骨髓组织病理学改变并分类计数 眼球取血后, 于无菌条件下暴露小鼠胸骨, 穿刺收集骨髓液, 滴于载玻片并均匀推开。使用瑞氏-吉姆萨 A 液覆盖染色 1 min, 再添加 B 液染色 3~10 min。染色后水流缓慢冲洗、干燥, 于显微镜下观察骨髓组织病理学变化, 高倍镜下计数

100 个巨核细胞分类。

1.8 RT-qPCR 检测小鼠脾脏组织及外周血 *ROR-γt*、*Foxp3* mRNA 表达 取小鼠脾脏组织及尾部静脉血,使用 RNAVzol 试剂提取总 RNA,经反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA 后,进行 PCR 反应。扩增条件如下:95 °C 预热 30 s,随后进行 40 个循环,每个循环包括步骤 95 °C 变性 5 s、60 °C 退火 30 s,最后进行熔解曲线分析,条件为 95 °C 15 s、65 °C 1 min 和 95 °C 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 *ROR-γt*、*Foxp3* mRNA 相对表达量。

1.9 Western blotting 检测小鼠脾脏组织及外周血 *ROR-γt*、*Foxp3* 蛋白表达 取小鼠脾脏组织及尾部静脉血,采用双辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白质浓度。取 20 μg 蛋白样本电泳分离,将蛋白转移至凝胶膜上,封闭处理。将凝胶膜与抗 *Foxp3*(稀释比例为 1:1 000)、*ROR-γt*(稀释比例为 1:2 000)一抗于 4 °C 条件下孵育过夜,含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(PBST)洗膜,添加山羊抗兔 IgG-HRP 二抗(稀释比例为 1:10 000),于室温条件下孵育 2 h。再次使用 PBST 洗膜后,增强型化学发光剂显影成像,采用 ImageJ 图像分析软件对

目的蛋白的灰度值展开统计分析。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件对数据处理分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间比较采用单因素方差分析,两组间比较则使用 *t* 检验,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 hUC-MSC 的鉴定 hUC-MSC 为贴壁细胞,呈梭形或不规则三角形,多次传代后呈涡旋状排列(图 1)。流式细胞术鉴定结果显示,hUC-MSC 高表达 CD29、CD44 和 CD90 分子,阳性表达率分别为 99.67%、99.53%、99.10%,低表达 CD34、CD45,阳性率仅为 1.51%和 0.64%(图 2)。诱导过程完成后,显微镜下观察油红 O 染色处理组织样本,可见 hUC-MSC 胞质内脂质与油红 O 结合,形成红色圆形或椭圆形脂滴,说明所培养的细胞具有成脂分化能力(图 3A)。经过茜素红染色后,显微镜下可观察到广泛的橘红色区域,即钙化结节,说明矿化基质已形成、沉积,所培养的细胞具有成骨分化能力(图 3B)。

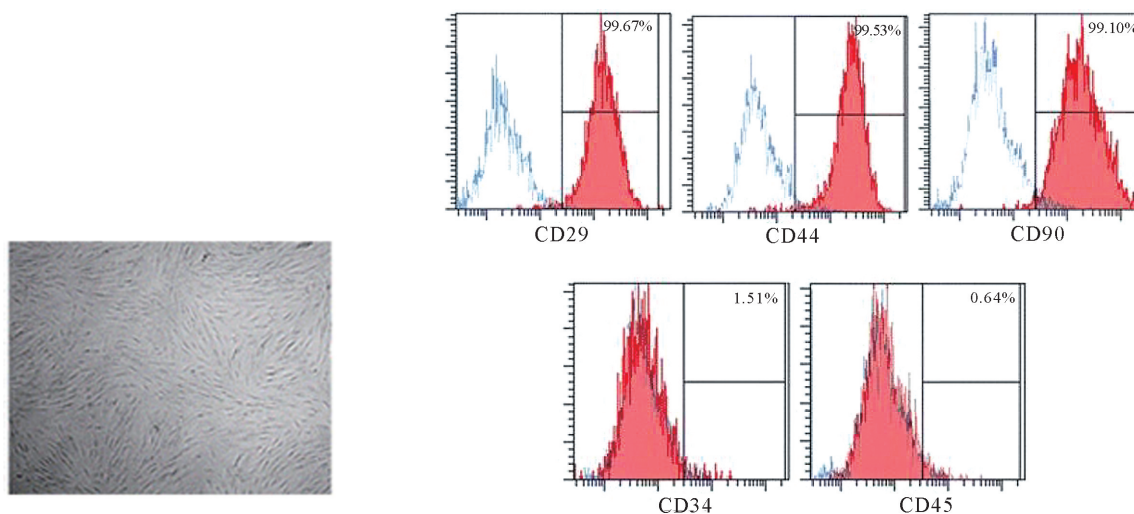
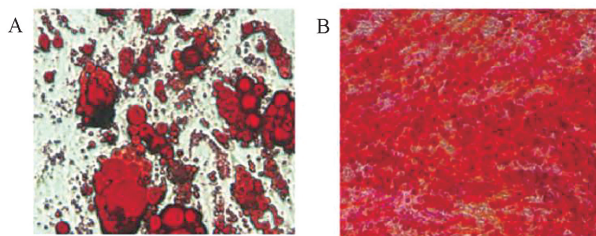


图1 第4代 hUC-MSC 显微镜下形态($\times 200$)

图2 hUC-MSC 表面标志物的阳性表达率



注: A. hUC-MSC 诱导成脂分化后油红 O 染色结果($\times 400$); B. hUC-MSC 诱导成骨分化后茜素红染色结果($\times 400$)。

图3 hUC-MSC 成脂成骨分化能力的评估鉴定

2.2 各组小鼠一般状况的观察比较 与 Con 组比较, ITP 模型组小鼠的整体状态较差, 具体表现为出现明显的皮下紫癜(以注射部位、四肢和尾部为严重), 精神状态明显变差, 进食量减少。与 ITP 模型组比较, hUC-MSC 组小鼠的皮下紫癜范围有所削减, 进食量和活动量明显增加。

2.3 hUC-MSC 对 ITP 小鼠 PLT 的影响 与 Con 组比较, 第 0、1、3、5、7 天, ITP 模型组小鼠 PLT 显著降低(均 $P < 0.05$)。与 ITP 模型组比较, 第 3、5、7 天, hUC-MSC 组小鼠 PLT 显著升高(均 $P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 hUC-MSC 对 ITP 小鼠 PLT 的影响($n=10$)

分组	PLT/($\times 10^9$ 个/L)				
	D0	D1	D3	D5	D7
Con 组	1 025.64 $\pm$ 95.44	995.23 $\pm$ 101.95	983.63 $\pm$ 96.08	1 001.34 $\pm$ 98.58	1 012.68 $\pm$ 82.02
ITP 模型组	289.36 $\pm$ 29.68 *	265.59 $\pm$ 32.95 *	226.13 $\pm$ 24.38 *	200.46 $\pm$ 19.49 *	193.40 $\pm$ 16.45 *
hUC-MSC 组	290.15 $\pm$ 31.36	318.47 $\pm$ 34.18	424.85 $\pm$ 46.75 #	591.67 $\pm$ 59.62 #	725.89 $\pm$ 68.04 #
F 值	493.502	392.628	385.275	352.422	9.711
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001

注: 与 Con 组比较, * $P < 0.05$; 与 ITP 模型组比较, # $P < 0.05$ 。

2.4 hUC-MSC 对 ITP 小鼠血清细胞因子水平的影响 与 Con 组比较, ITP 模型组小鼠血清 IL-6、IL-17 水平显著升高(均 $P < 0.05$), 而 IL-10、TGF- β 1 水平显著降低(均 $P < 0.05$)。与 ITP 模型组比

较, hUC-MSC 组小鼠血清 IL-6、IL-17 水平显著降低(均 $P < 0.05$), 而 IL-10、TGF- β 1 水平显著升高(均 $P < 0.05$)。详见表 2。

表 2 hUC-MSC 对 ITP 小鼠血清细胞因子水平的影响($n=10$)

分组	IL-6/(pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	IL-17/(pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	IL-10/(pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	TGF- β 1/(pg $\cdot$ mL $^{-1}$)
Con 组	5.27 $\pm$ 1.32	12.45 $\pm$ 2.81	54.05 $\pm$ 7.15	65.38 $\pm$ 3.32
ITP 模型组	7.37 $\pm$ 1.66 *	16.43 $\pm$ 3.20 *	37.11 $\pm$ 2.01 *	47.85 $\pm$ 4.71 *
hUC-MSC 组	5.85 $\pm$ 0.88 #	11.28 $\pm$ 1.53 #	53.81 $\pm$ 3.67 #	60.13 $\pm$ 7.35 #
F 值	6.692	10.678	41.228	27.838
P 值	0.004	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 Con 组比较, * $P < 0.05$; 与 ITP 模型组比较, # $P < 0.05$ 。

2.5 hUC-MSC 对 ITP 小鼠骨髓组织病理学变化及巨核细胞分类数量的影响 染色结果显示, 细胞质呈现出粉红或桃红色, 而细胞核则呈现为蓝色。相较于 Con 组, ITP 模型组中形态保持完整的细胞数量减少。与 ITP 模型组比较, hUC-MSC 组形态完整的细胞数量有一定程度的增加。详见图 4。高倍

镜下计数巨核细胞分类, 结果显示, 与 Con 组比较, ITP 模型组小鼠骨髓中产板巨核细胞数量显著减少($P < 0.05$)。与 ITP 模型组比较, hUC-MSC 组小鼠骨髓中产板巨核细胞数量显著增加($P < 0.05$)。详见表 3。



图 4 各组小鼠骨髓组织瑞氏染色结果($\times 400$)

表 3 hUC-MSC 对 ITP 小鼠骨髓中巨核细胞分类数量的影响($n=10$)

分组	幼稚巨核细胞/%	产板巨核细胞/%	颗粒巨核细胞/%	裸核巨核细胞/%
Con 组	30.41±5.24	29.36±3.14	42.93±4.18	5.76±2.51
ITP 模型组	33.86±5.29	15.31±2.53 *	45.02±3.14	6.38±1.57
hUC-MSC 组	31.52±4.82	27.08±4.69 #	41.88±4.53	6.17±1.45
<i>F</i> 值	1.183	44.585	1.602	0.274
<i>P</i> 值	0.322	<0.001	0.220	0.762

注: 与 Con 组比较, * $P<0.05$; 与 ITP 模型组比较, # $P<0.05$ 。

2.6 hUC-MSC 对 ITP 小鼠脾脏 *ROR-γt*、*Foxp3* mRNA 及蛋白表达的影响 与 Con 组比较, ITP 模型组小鼠脾脏组织 *ROR-γt* mRNA 及蛋白表达显著升高(均 $P<0.05$), *Foxp3* mRNA 及蛋白表达

显著降低(均 $P<0.05$)。与 ITP 模型组比较, hUC-MSC 组小鼠脾脏组织 *ROR-γt* mRNA 及蛋白表达显著降低(均 $P<0.05$), *Foxp3* mRNA 及蛋白表达显著升高(均 $P<0.05$)。详见表 4、图 5。

表 4 hUC-MSC 对 ITP 小鼠脾脏 *ROR-γt*、*Foxp3* mRNA 及蛋白表达的影响($n=10$)

分组	<i>ROR-γt</i> mRNA	<i>Foxp3</i> mRNA	<i>ROR-γt</i> 蛋白	<i>Foxp3</i> 蛋白
Con 组	0.31±0.20	1.00±0.28	0.72±0.08	1.35±0.13
ITP 模型组	1.32±0.32 *	0.19±0.06 *	1.18±0.10 *	0.75±0.09 *
hUC-MSC 组	0.36±0.09 #	0.99±0.33 #	0.76±0.08 #	1.29±0.12 #
<i>F</i> 值	64.591	33.950	85.439	83.147
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 Con 组比较, * $P<0.05$; 与 ITP 模型组比较, # $P<0.05$ 。

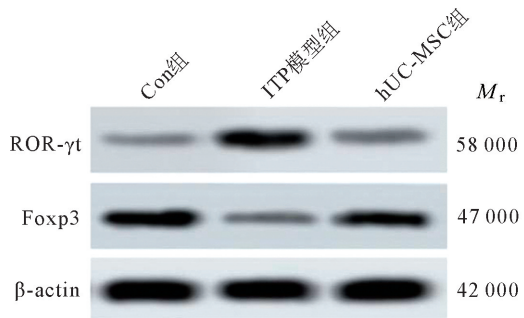


图 5 Western blotting 示各组小鼠脾脏组织 *ROR-γt*、*Foxp3* 蛋白表达

2.7 hUC-MSC 对 ITP 小鼠外周血中 *ROR-γt*、*Foxp3* mRNA 及蛋白表达的影响 与 Con 组比较, ITP 模型组小鼠外周血 *ROR-γt* mRNA 及蛋白表达显著升高(均 $P<0.05$), *Foxp3* mRNA 及蛋白表达显著降低(均 $P<0.05$)。与 ITP 模型组比较, hUC-MSC 组小鼠外周血 *ROR-γt* mRNA 及蛋白表达显著降低(均 $P<0.05$), *Foxp3* mRNA 及蛋白表达显著升高(均 $P<0.05$)。详见表 5、图 6。

表 5 hUC-MSC 对 ITP 小鼠外周血中 *ROR-γt*、*Foxp3* mRNA 及蛋白表达的影响($n=10$)

分组	<i>ROR-γt</i> mRNA	<i>Foxp3</i> mRNA	<i>ROR-γt</i> 蛋白	<i>Foxp3</i> 蛋白
Con 组	0.47±0.06	1.16±0.14	0.33±0.03	0.89±0.11
ITP 模型组	1.21±0.33 *	0.42±0.04 *	0.98±0.10 *	0.40±0.06 *
hUC-MSC 组	0.54±0.05 #	1.04±0.12 #	0.40±0.07 #	0.79±0.10 #
<i>F</i> 值	43.539	132.921	241.709	78.249
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 Con 组比较, * $P<0.05$; 与 ITP 模型组比较, # $P<0.05$ 。

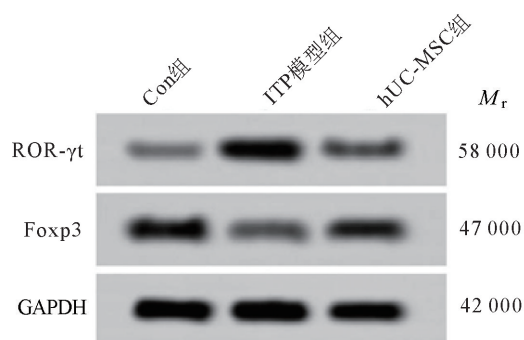


图6 Western blotting 示各组小鼠外周血 ROR- γ t、Foxp3 蛋白表达

3 讨论

ITP 是血液科最常见的一类疾病,发病机制源于自身免疫系统的紊乱,导致体内血小板数量减少。该病在免疫学上具有器官特异性,主要表现为人体产生抗血小板自身抗体,导致单核-巨噬细胞系统过度破坏血小板,进而使患者出现皮肤、黏膜渗血症状,导致多个器官发生不同程度的出血^[12]。在临床治疗中,对于轻、中度以及急性 ITP 患者,一般采用糖皮质激素、免疫抑制剂治疗及脾脏切除手术等方法,然而,对于复发性和难治性 ITP 患者而言,目前尚缺乏有效的预防和治疗方案^[13]。

hUC-MSC 属于多能干细胞范畴,具备高度增殖、多向分化以及免疫调节功能,已成为治疗免疫性疾病的“实用干细胞”。肖建红等^[14]研究显示,脂肪来源 MSC 可改善 ITP 小鼠免疫失衡,提高血小板水平。Liang 等^[15]认为,给予 ITP 小鼠模型输注骨髓来源 MSC 可逆转高迁移率蛋白 1 诱导的血小板功能障碍。而 hUC-MSC 作为仅存在于新生儿脐带组织中的多功能干细胞,据报道,其治疗慢性、难治性 ITP 患者疗效显著,尽管研究例数有限,但在 2 年随访过程中,治疗后 1 年的有效缓解率高达 100%,且副反应轻^[16]。相较于其他类型 MSC, hUC-MSC 含量更丰富,易于获得,且增殖能力和免疫调节功能更强,临床上治疗 ITP 等自身免疫性疾病的前景广阔^[17]。Dominici 等^[18]提出 MSC 的 3 条鉴定标准,与国际细胞治疗协会意见一致,即:细胞贴壁生长;高表达 CD90、CD73、CD105,低表达 CD45、CD34、CD14 和 CD19;能离体分化为成骨、软骨及脂肪细胞。本研究选用单克隆抗体 CD29、CD34、CD45、CD44 及 CD90 对提取的 hUC-MSC 展开鉴定,结果显示细胞中 CD29、CD44、CD90 为高表达,CD34、CD45 为低表达。油红 O 和茜素红染色结果表明获取的 hUC-MSC 具有

成脂分化和成骨分化能力,这些结果均符合 MSC 的鉴定标准。

近年来,随着对 MSC 研究的不断深入,其免疫抑制作用也日益受到人们的广泛关注。ITP 是一种常见的自身免疫性疾病,因此,提取 hUC-MSC 后,本研究建立 ITP 小鼠模型,探讨 hUC-MSC 对 ITP 小鼠的影响。结果显示,与 Con 组比较,ITP 模型组小鼠出现明显的皮下紫癜,精神状态不佳和进食量减少,且 PLT 显著降低($P < 0.05$),提示模型构建成功。经 hUC-MSC 注射后,小鼠精神状态、进食量有所改善,且在注射 hUC-MSC 后,PLT 不断升高,在第 3、5、7 天时显著高于 ITP 模型组(均 $P < 0.05$),提示 MSC 可改善 ITP 小鼠的血小板水平。此外,ITP 的一个重要特征是骨髓巨核细胞数量正常或增多,但能产生血小板的巨核细胞数量明显减少或缺乏。本研究的骨髓组织瑞氏染色以及巨核细胞分类计数结果显示, hUC-MSC 组产板巨核细胞数量显著多于 ITP 模型组($P < 0.05$),再次证明 hUC-MSC 提高 ITP 小鼠的血小板水平。

尽管 ITP 的发病机制尚未完全阐明,但人们普遍认为,ITP 患者中观察到的低 PLT 是由 T 淋巴细胞免疫失衡导致的血小板抗原免疫耐受性遭破坏引起^[19]。Th 在机体免疫系统中扮演着重要角色,初始 Th 可进一步分化为 Th1、Th2、Th17 及 Treg 等多种亚群。其中, Th17 与 Treg 之间的平衡状态是维持机体免疫稳态的一个关键因素^[20]。作为机体炎症反应的启动和调节组分, Th17 可产生 IL-6、IL-17 等特异性炎症细胞因子; Treg 则可介导免疫耐受和免疫自稳,分泌 IL-10、TGF- β 1 等抗炎细胞因子,通过增强抑制性免疫细胞表面分子表达以抑制活化 T 细胞的相关基因表达,从而实现免疫调节功能^[21]。研究显示, ITP 的发生与发展过程中存在 Th17/Treg 失衡的现象^[22]。本研究中,与 Con 组比较, ITP 模型组小鼠血清 IL-6、IL-17 水平显著升高, IL-10、TGF- β 1 水平显著降低(均 $P < 0.05$)。经 hUC-MSC 干预后,小鼠上述异常变化均有明显改善,提示 Th17/Treg 失衡参与并促进了 ITP 的进展,而 MSC 可改善 ITP 小鼠的免疫失衡现象。ROR- γ t 和 Foxp3 分别是 Th17、Treg 分化的正向转录调控因子,在初始 Th 向 Th17 和 Treg 分化及发育的过程中发挥着至关重要的作用^[23]。Kim 等^[24]研究表明, MSC 分泌的细胞因子的动态表达可通过调节 Foxp3 表达调控 T 细胞的功能和成熟。

杨妮等^[25]研究显示,中药方剂可通过调控 ROR- γ t 和 Foxp3 的表达改善自身免疫性肝炎小鼠的 Th17/Treg 失衡。本研究中,与 ITP 模型组比较, hUC-MSC 组小鼠 ROR- γ t 表达显著降低, Foxp3 表达显著升高(均 $P < 0.05$),提示 MSC 可通过调控 ROR- γ t/Foxp3 的表达,调节 ITP 小鼠的 Th17/Treg 免疫平衡。

综上所述, hUC-MSC 可促进 PLT 生成和产板巨核细胞数量增多,调节细胞因子及 ROR- γ t/Foxp3 表达,改善 ITP 小鼠症状。但本研究因条件限制,并未深入探讨 ROR- γ t/Foxp3 在 ITP 中的具体调控作用,后续我们会沿该方向深入研究,或探索其他替代实验方法间接验证 ROR- γ t/Foxp3 的调控作用。

参考文献

- [1] Bussell J, Cooper N, Boccia R, *et al.* Immune thrombocytopenia[J]. Expert Rev Hematol, 2021, 14(11): 1013-1025.
- [2] 张秀秀. 血小板减少症临床治疗方案研究[J]. 名医, 2021(19): 67-68.
- [3] Nelson VS, Jolink AC, Amini SN, *et al.* Platelets in ITP: victims in charge of their own fate?[J]. Cells, 2021, 10(11): 3235.
- [4] Terrell DR, Neunert CE, Cooper N, *et al.* Immune thrombocytopenia (ITP): current limitations in patient management[J]. Medicina (Kaunas), 2020, 56(12): 667.
- [5] 路明, 尹晓玉, 张志清. 间充质干细胞对自身免疫病治疗作用研究进展及机制探究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(6): 700-706.
- [6] 冯静雯, 李东阳, 周慧, 等. 黄芪提取物对人脐带间充质干细胞成骨分化的作用及机制[J]. 解剖科学进展, 2023, 29(1): 29-32; 36.
- [7] Zhang WQ, Liu X, Zhu YC, *et al.* Transcriptional and post-translational regulation of Th17/Treg balance in health and disease[J]. Eur J Immunol, 2021, 51(9): 2137-2150.
- [8] Zhu YJ, Li XG, Wen DC, *et al.* Remote ischemic post-conditioning reduces cognitive impairment in rats following subarachnoid hemorrhage: possible involvement in STAT3/STAT5 phosphorylation and Th17/Treg cell homeostasis[J]. Transl Stroke Res, 2025, 16(3): 600-611.
- [9] Guo NH, Fu X, Zi FM, *et al.* The potential therapeutic benefit of resveratrol on Th17/Treg imbalance in immune thrombocytopenic purpura[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 73: 181-192.
- [10] Ren YJ, Ying QQ, Chen Y, *et al.* HLA-DRB5 overexpression promotes platelet reduction in immune thrombocytopenia mice model by facilitating MHC-II-mediated antigen presentation[J]. Acta Haematol, 2025, 148(1): 68-76.
- [11] 肖建红, 李君君, 张阳春. 免疫法 ITP 小鼠模型的建立与鉴定[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(12): 1849-1853; 1856.
- [12] 李昕雨, 何杨, 阮长耿. 原发免疫性血小板减少症的治疗进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2021, 29(3): 983-987.
- [13] Viana R, DAlessio D, Grant L, *et al.* Psychometric evaluation of ITP life quality index (ILQI) in a global survey of patients with immune thrombocytopenia[J]. Adv Ther, 2021, 38(12): 5791-5808.
- [14] 肖建红, 张阳春. 脂肪来源间充质干细胞调控原发免疫性血小板减少症小鼠 Th 细胞因子失衡[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2022, 43(4): 563-572.
- [15] Liang ZY, Zhang GY, Gan GT, *et al.* Activation of the HMGB1-TLR4 pathway impacts the functionality of bone marrow mesenchymal stem cells and disrupts macrophage polarization in immune thrombocytopenia[J]. Br J Haematol, 2024, 205(4): 1516-1531.
- [16] Wang XH, Yin XG, Sun W, *et al.* Intravenous infusion umbilical cord-derived mesenchymal stem cell in primary immune thrombocytopenia: a two-year follow-up[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(5): 2255-2258.
- [17] Wang JS, Metheny L. Umbilical cord blood derived cellular therapy: advances in clinical development[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1167266.
- [18] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317.
- [19] Marini I, Bakchoul T. Pathophysiology of autoimmune thrombocytopenia: current insight with a focus on thrombopoiesis[J]. Hamostaseologie, 2019, 39(3): 227-237.
- [20] Wang J, Hou YQ, Mu LF, *et al.* Gut microbiota contributes to the intestinal and extraintestinal immune homeostasis by balancing Th17/Treg cells[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 143(Pt 3): 113570.
- [21] Ahmad Ansari M, Singh PK, Ahmad Dar S, *et al.* Deregulated phenotype of autoreactive Th17 and Treg clone cells in *Pemphigus vulgaris* after *in-vitro* treatment with desmoglein antigen (Dsg-3) [J]. Immunobiology, 2023, 228(2): 152340.
- [22] 罗雅琴, 黄伟. 芪黄益气摄血方对免疫性血小板减少症模型小鼠 Th17/Treg 细胞因子及转录因子 ROR- γ t/Foxp3 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(6): 129-133.
- [23] Chen WJ, Cao YX, Zhong YY, *et al.* The mechanisms of effector Th cell responses contribute to Treg cell function: new insights into pathogenesis and therapy of asthma[J]. Front Immunol, 2022, 13: 862866.
- [24] Kim SH, Jung J, Cho KJ, *et al.* Immunomodulatory effects of placenta-derived mesenchymal stem cells on T cells by regulation of Foxp3 expression[J]. Int J Stem Cells, 2018, 11(2): 196-204.
- [25] 杨妮, 郑通通, 徐建良, 等. 海珠益肝加味方对自身免疫性肝炎小鼠 Th17/Treg 平衡与 Foxp3/ROR γ t 的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2024, 34(8): 709-712; 719.

Efficacy study of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells on immune thrombocytopenia mouse

YANG Baojuan¹, YANG Min², WU Xinhua¹ (1. *Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 453001, China*; 2. *Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453100, China*)

Abstract: The aim of the study was to investigate the effect of human umbilical cord blood mesenchymal stem cell (hUC-MSC) on immune thrombocytopenia (ITP) mouse model and its regulation on the retinoic acid-related orphan receptor γ t (ROR- γ t)/forkhead winged helix transcription factor 3 (Foxp3) signaling pathway. Healthy hUC-MSCs were isolated and cultured, the growth patterns were observed and identified, and the stably-proliferating primary cells were selected for passaging. Thirty male BALB/c mice were randomly divided into the normal control group (Con group), the ITP model group and the hUC-MSC group, with 10 mice in each group. After corresponding treatments, the general condition of the mice was observed. Peripheral platelet count (PLT) was measured, and serum levels of IL-6, IL-17, IL-10, and TGF- β 1 were detected using ELISA. Wright-Giemsa staining was used to evaluate the pathological changes in mouse bone marrow and to count the megakaryocytes. Western blotting and RT-qPCR were used to detect protein and mRNA levels of ROR- γ t and Foxp3 in mice spleen and peripheral blood, respectively. The results showed that compared to those of the Con group, the serum IL-6 and IL-17 levels, ROR- γ t mRNA and protein expression in spleen and the ROR- γ t mRNA and protein expression in peripheral blood were all significantly higher in the ITP model group (all with $P < 0.05$), while the PLT, serum IL-10 and TGF- β 1 levels, Foxp3 mRNA and protein expression in spleen and Foxp3 mRNA and protein expression in peripheral blood were significantly decreased (all with $P < 0.05$), along with significantly reduced number of platelet-producing megakaryocytes ($P < 0.05$). Compared to the ITP model group, the hUC-MSC group showed significantly lower serum IL-6 and IL-17 levels, splenic ROR- γ t mRNA and protein expression and peripheral blood ROR- γ t mRNA and protein levels (all with $P < 0.05$), but significantly higher PLT, serum IL-10 and TGF- β 1 levels, splenic Foxp3 mRNA and protein expression, peripheral blood Foxp3 mRNA and protein expression (all with $P < 0.05$), and the elevated number of platelet-producing megakaryocytes ($P < 0.05$). As a result, hUC-MSC can promote platelet formation and increase the number of platelet-producing megakaryocyte, which may relief the symptoms of ITP mice by regulating the expressions of cytokines and the ROR- γ t/Foxp3 axis.

Key words: human umbilical cord blood mesenchymal stem cell; immune thrombocytopenia; retinoic acid-related orphan receptor γ t/forkhead winged helix transcription factor 3