

人脐带间充质干细胞对重症急性胰腺炎患者树突状细胞成熟、分化的作用及参与炎症调节的机制研究

梁马可¹ 李学民¹ 孙蕾² 马保东² 吕朋举² 岳寒³

¹ 郑州大学附属郑州中心医院肝胆胰外科, 郑州 450000; ² 郑州大学附属郑州中心医院转化医学中心, 郑州 450000; ³ 河南省人民医院干细胞再生医学中心, 郑州 450000

通信作者: 李学民, Email: ztlxm@126.com

【摘要】 目的 探讨人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)对SAP患者树突状细胞(DCs)成熟、分化的作用及参与炎症调节的机制。**方法** 采集郑州大学附属郑州中心医院行剖宫产的足月胎儿脐带4~5 cm, 原代分离培养hUC-MSCs, 采用流式细胞术进行表型鉴定和成脂、成骨染色。采集5例SAP患者外周血20 ml, 采用淋巴细胞分离液分离出单核细胞, 以粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL-4、肿瘤坏死因子(TNF- α)进行诱导培养出DCs, 根据培养方式不同分为DCs组、hUC-MSCs+DCs组、hUC-MSCs+DCs+NS398组(NS398为NF- κ B下游调控基因COX-2的特异性抑制剂)。应用流式细胞术检测DCs表型, 测定细胞培养24 h上清液中的IL-1 β 、IL-1 α 、IL-2、IL-6、IL-10水平。采用蛋白质免疫印迹法检测Toll样受体4(TLR4)、IKK α 及NF- κ B-p65蛋白表达量。**结果** 成功培养出hUC-MSCs, 其表面标志物CD₉₀、CD₁₀₅、CD₇₃表达阳性, 并可向脂肪细胞、骨细胞分化。随着培养时间延长, DCs由未成熟向成熟分化。与DCs组比较, hUC-MSCs+DCs组的调节性DCs(regDCs)比例增加, 其标志物CD_{11b}显著上调[(14.26 $\pm$ 1.25)%比(4.87 $\pm$ 0.58)%], CD_{1a}、CD_{11c}显著下调[(2.81 $\pm$ 0.34)%比(13.62 $\pm$ 1.52)%、(3.88 $\pm$ 0.5)%比(11.8 $\pm$ 1.22)%], 差异均有统计学意义(P 值均 <0.05)。培养上清液IL-1 β 、INF- γ 、IL-6表达下调, 但差异无统计学意义; 而促炎因子IL-1 α 显著降低[(14.91 $\pm$ 2.58) ng/L比(30.19 $\pm$ 7.75) ng/L], 抑炎因子IL-10显著升高[(17.03 $\pm$ 4.69) ng/L比(1.83 $\pm$ 0.14) ng/L]。NF- κ B-p65、TLR4蛋白表达显著下调(0.74 $\pm$ 0.02比0.97 $\pm$ 0.01、0.89 $\pm$ 0.01比1.72 $\pm$ 0.01), IKK α 蛋白表达显著上调(1.12 $\pm$ 0.01比0.21 $\pm$ 0.01), 差异均有统计学意义(P 值均 <0.05)。与DCs组及hUC-MSCs+DCs组比较, hUC-MSCs+DCs+NS398组的NF- κ B-p65与TLR4表达量显著下调(0.34 $\pm$ 0.01比0.97 $\pm$ 0.01、0.74 $\pm$ 0.02、0.14 $\pm$ 0.01比1.72 $\pm$ 0.01、0.89 $\pm$ 0.01), 而IKK α 蛋白表达显著上调(1.68 $\pm$ 0.01比0.21 $\pm$ 0.01、1.12 $\pm$ 0.01), 差异均有统计学意义(P 值均 <0.05)。**结论** hUC-MSCs能够抑制SAP患者DCs成熟、分化, 并诱导出CD_{11b}^{high} CD_{1a}^{low} CD_{11c}^{low}的regDCs参与免疫调节, 其机制可能通过TLR4/IKK α /NF- κ B/COX-2途径抑制炎症级联反应, 发挥抗炎作用。

【关键词】 胰腺炎, 急性坏死性; 间质干细胞; 树突状细胞; 细胞分化; Toll样受体4

DOI: 10.3760/cma.j.cn.115667-20201010-00165

Role of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the maturation and differentiation of dendritic cells in patients with severe acute pancreatitis and its mechanism in the inflammation modulation

Liang Make¹, Li Xuemin¹, Sun Lei², Ma Baodong², Lyu Pengju², Yue Han³

¹ Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China; ² Translational Medicine Center, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China; ³ Center of Stem Cell and Regenerative Medicine, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, China

Corresponding author: Li Xuemin, Email: ztlxm@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells

(hUC-MSCs) on the maturation and differentiation of dendritic cells (DCs) and the mechanism involved in the regulation of inflammation in patients with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** The full-term fetal umbilical cords (about 4–5 cm) were collected from Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University after cesarean section. hUC-MSCs were isolated and cultured in primary culture. Flow cytometry was used for phenotype identification, adipogenic and osteogenic staining. 20 ml peripheral blood samples from 5 SAP patients were collected, and monocytes were isolated using lymphocyte separation solution and then induced by adding granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-4 and tumor necrosis factor (TNF)- α and cultured as DCs. According to different culture methods, DCs were divided into DCs group, hUC-MSCs + DCs group and hUC-MSCs + DCs + NS398 group (NS398 was a specific inhibitor of COX-2, a downstream regulatory gene of NF- κ B). The phenotype of DCs was detected by flow cytometry, and the levels of IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-6 and IL-10 in the supernatant of cell culture for 24 hours were determined. The expression of toll like receptor (TLR)-4, IKK α and NF- κ B-p65 were detected by Western blot. **Results** The hUC-MSCs were successfully cultured, and their surface markers CD₉₀, CD₁₀₅ and CD₇₃ were positively expressed, and they could differentiate into adipocytes and bone cells. With the prolongation of culture time, DCs differentiated from immature to mature cells. Compared with the DCs group, the proportion of regulatory DCs (regDCs) was increased in the hUC-MSCs + DCs group, and the marker CD_{11b} was significantly up regulated [(14.26 $\pm$ 1.25)% vs (4.87 $\pm$ 0.58)%], CD_{1a} and CD_{11c} were significantly down regulated [(2.81 $\pm$ 0.34)% vs (13.62 $\pm$ 1.52)%, (3.88 $\pm$ 0.5)% vs (11.8 $\pm$ 1.22)%]. All the difference were statistically significant ($P < 0.05$). The expression of IL-1 β , INF- γ and IL-6 in culture supernatant were down regulated, but the difference was not statistically significant; The pro-inflammatory factor IL-1 α was significantly decreased [(14.91 $\pm$ 2.58) ng/L vs (30.19 $\pm$ 7.75) ng/L], and the anti-inflammatory factor IL-10 was significantly increased [(17.03 $\pm$ 4.69) ng/L vs (1.83 $\pm$ 0.14) ng/L]. The expression levels of NF- κ B-p65 and TLR4 were significantly down regulated (0.74 $\pm$ 0.02 vs 0.97 $\pm$ 0.01, 0.89 $\pm$ 0.01 vs 1.72 $\pm$ 0.01), and the expression of IKK α protein was significantly up regulated (1.12 $\pm$ 0.01 vs 0.21 $\pm$ 0.01) in hUC-MSCs-DCs group. All the differences were statistically significant (all P value < 0.05). Compared with DCs group and hUC-MSCs + DCs group, the expression levels of NF- κ B-p65 and TLR4 were significantly down regulated (0.34 $\pm$ 0.01 vs 0.97 $\pm$ 0.01, 0.74 $\pm$ 0.02 and 0.14 $\pm$ 0.01 vs 1.72 $\pm$ 0.01, 0.89 $\pm$ 0.01), while the expression of IKK α protein was significantly up regulated (1.68 $\pm$ 0.01 vs 0.21 $\pm$ 0.01, 1.12 $\pm$ 0.01) in hUC-MSCs + DCs + NS398 group. All the differences were statistically significant (all P value < 0.05). **Conclusions** In SAP patients, hUC-MSCs can inhibit the maturation and differentiation of DCs, and induce CD_{11b}^{high} CD_{1a}^{low} CD_{11c}^{low} regDCs to participate in immune regulation, which may play an anti-inflammatory role by inhibiting the inflammatory cascade through TLR4/IKK α /NF- κ B/COX-2 pathway.

【Key words】 Pancreatitis, acute necrotizing; Mesenchymal stem cells; Dendritic cells; Cell differentiation; Toll-like receptor 4

DOI:10.3760/cma.j.cn.115667-20201010-00165

研究表明,树突状细胞(dendritic cells, DCs)作为机体最重要的抗原提呈细胞,参与胰腺炎的发生和发展^[1]。Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)是一类跨膜模式识别受体,可通过识别不同的病原体相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)及损伤相关分子模式(damage associated molecular patterns, DAMPs)激活固有免疫细胞,参与炎症反应。内毒素及炎症因子可与DCs表面的TLR4识别并结合,促进DCs的成熟并通过经典的TLR4/IKK α /NF- κ B/COX-2促炎信号通路引起炎症级联放大反应,从而导致全身炎症反应综合

征^[2]。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord-mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)属于干细胞家族的重要成员,不但具有自我更新和多向分化潜能^[3],还具有低免疫原性及免疫调节功能^[4-5],能够抑制DCs的成熟、分化及诱导调节性树突状细胞(regulatory DCs, regDCs)参与免疫调节。但hUC-MSCs对SAP患者DCs的影响尚不清楚。有研究认为hUC-MSCs可以通过分泌抗炎细胞因子、抑制促炎细胞因子及减轻组织损伤来治疗SAP^[6-7],但其是否通过抑制TLR4/IKK α /NF- κ B/COX-2通路调控炎症仍需进一步探究。本研究旨在探讨体外hUC-

MSCs 对 SAP 患者 DCs 的免疫调节作用及其调控通路, 以期对 SAP 的临床治疗提供新的思路。

材料与方法

一、hUC-MSCs 的分离、培养和鉴定

采集郑州大学附属郑州中心医院行剖宫产的足月胎儿脐带 4~5 cm, PBS 充分洗涤, 去除血管内残留血液, 无菌条件下分离取出脐带外膜组织和血管组织, 获得脐带 Wharton 胶组织, 将其尽量剪碎, 用 0.1% I 型胶原酶(美国 Gibco 公司) 37℃ 消化 4 h 后 200 目筛网过滤。收集滤液, 使用 Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3 系列离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 以 1 700 r/min 离心(离心半径 60 cm) 8 min, 重悬细胞沉淀接种于 75 cm² 的培养瓶中, 添加友康培养基至 12 ml, 在 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 5~6 d 第 1 次换液, 以后每 2~3 d 更换新鲜培养基。当细胞生长至接近 85% 融合时, 使用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液(北京索莱宝公司) 消化细胞, 1:3 传代。传至第 3 代时收集细胞悬于 500 μl PBS 中, 分别加入 FITC-CD₁₉、CD₃₄、CD₄₅、CD_{11b}、HLA-DR、PE-CD₉₀、APC-CD₁₀₅、APC-A750-CD₇₃ 抗体 4 μl, 4℃ 避光孵育 30 min, 离心弃上清, 加入 1 ml PBS 清洗细胞一次, 然后将细胞重悬后上流式细胞仪检测, 进行表型鉴定。同时对 hUC-MSCs 进行成脂和成骨诱导分化, 采用油红 O 染色液(北京索莱宝公司) 进行脂肪细胞染色, 采用茜素红染液(北京索莱宝公司) 进行成骨细胞染色。将传至第 3 代时的 hUC-MSCs 提前 1 d 接种于 6 孔板中, 培养过夜, 待 hUC-MSCs 融合 80%~90% 时, 加入丝裂霉素 C (10 μg/ml), 37℃ 孵育 4 h, 取出培养基, PBS 洗涤 2 次后备用。

二、DCs 分离、培养及分组

采集郑州大学附属郑州中心医院肝胆胰外科 5 例 SAP 患者新鲜肝素抗凝外周静脉血 20 ml, 用等量 PBS 充分混匀后, 用滴管沿管壁将外周血缓慢叠加于 40 ml 淋巴细胞分离液层。2 300 r/min 离心(离心半径 60 cm) 20 min。吸取白膜层, PBS 洗涤细胞 2 次。洗尽血小板, 用 RPMI1640 完全培养液悬浮细胞, 调整细胞密度为 2×10^9 个/L, 加入 6 孔板中, 每孔 2 ml, 放入 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 4 h 后, 吸去培养上清, 加入预热的培养液, 缓慢摇动培养板去除非贴壁细胞, 获得贴壁的单核细胞。每孔加入 2 ml 含 10 ng/ml GM-CSF、5 ng/ml IL-4 和 10% FCS 的完全培养液培养 5 d, 隔天半量换液。于第 5

天开始, 每孔加入 100 ng/ml TNF-α, 同时以是否加入 hUC-MSCs 共培养及是否加入 NF-κB 下游调控基因 COX-2 抑制剂 NS398 为分组标准, 将细胞分为 DCs 组、hUC-MSCs + DCs 组、hUC-MSCs + DCs + NS398 组。DCs 组为上述培养至第 8 天收集的悬浮细胞; hUC-MSCs + DCs 组为第 6 天 DCs 与 hUC-MSCs 按 10:1 的比例共培养于含有 100 ng/ml TNF-α、10 ng/ml GM-CSF、5 ng/ml IL-4 和 10% FCS 的 RPMI-1640 培养液中, 48 h 后收集细胞。hUC-MSCs + DCs + NS398 组为共培养细胞培养 40 h 后加入 75 μmol/ml NS398, 继续培养 8 h, 收集细胞。

三、DCs 表面标志物鉴定

取上述 3 组 1×10^5 个细胞于流式管, 每组细胞设 5 个管, 分别加入 FITC-Lineage Cocktail 1、PE-anti-human HLA DR、APC-750-anti-human CD_{11c}、APC-anti-human CD₈₀ 或 APC-anti-human CD₈₆, 抗体用量按照说明书推荐量, 总容积为 100 μl。设置同型对照管, 加入相同浓度的同型对照抗体。避光保存, 并于 1 h 内上流式细胞仪检测各组细胞 DCs 表面标志物 CD_{11b}、CD_{1a}、CD_{11c} 的表达量。

四、DCs 组、hUC-MSCs + DCs 组细胞培养上清液细胞因子水平检测

采集 DCs 组、hUC-MSCs + DCs 组培养 24 h 上清, 使用 LEGENDplex 自定义 11 细胞因子检测板(美国 Biolegend 公司), 并根据说明书在培养上清中加入磁珠标记的 IL-1β、IL-1α、IL-2、IL-6、IL-10 抗体。避光孵育后采用 Cytoflex 流式细胞仪进行分析, 通过 Legendplex V8.0 软件(Biolegend) 进行数据分析后根据标准曲线计算得出待测样本各指标的浓度。

五、各组细胞炎症相关蛋白 NF-κB-p65、IKKα 及 TLR4 表达检测

取上述 3 组细胞, 采用 RIPA 裂解液(北京索莱宝公司) 抽提细胞总蛋白。BCA 法定量蛋白后常规行蛋白质免疫印迹法检测 NF-κB-p65、IKKα 及 TLR4 蛋白表达, 以 GAPDH 作为内参。NF-κB-p65、IKKα、TLR4 及 GAPDH 均购于美国 Abcam 公司。过氧化物酶标记山羊抗小鼠二抗购于美国 Pierce 公司。最后 ECL 发光、X 线片曝光、显影、定影。采用凝胶图像软件分析系统扫描图像, 以目的条带与内参条带的灰度值比表示蛋白相对表达量。

六、统计学处理

应用 SPSS17.0 统计软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、hUC-MSCs 的生物学特性及表型鉴定

第 3 代 hUC-MSCs 呈成纤维样,细胞大小与形态均一、排列有序(图 1A)。hUC-MSCs 可成功诱导分化

为脂肪细胞(图 1B)、骨细胞(图 1C)。流式细胞仪检测结果显示 hUC-MSCs 表面标志物 CD₉₀、CD₁₀₅、CD₇₃ 表达阳性,阳性率分别为 94.38%、99.45%、94.91% (图 1D~1F),而 CD₁₉、CD₃₄、CD₄₅、CD_{11b}、HLA-DR 表达阴性,符合 hUC-MSCs 的表型特征。

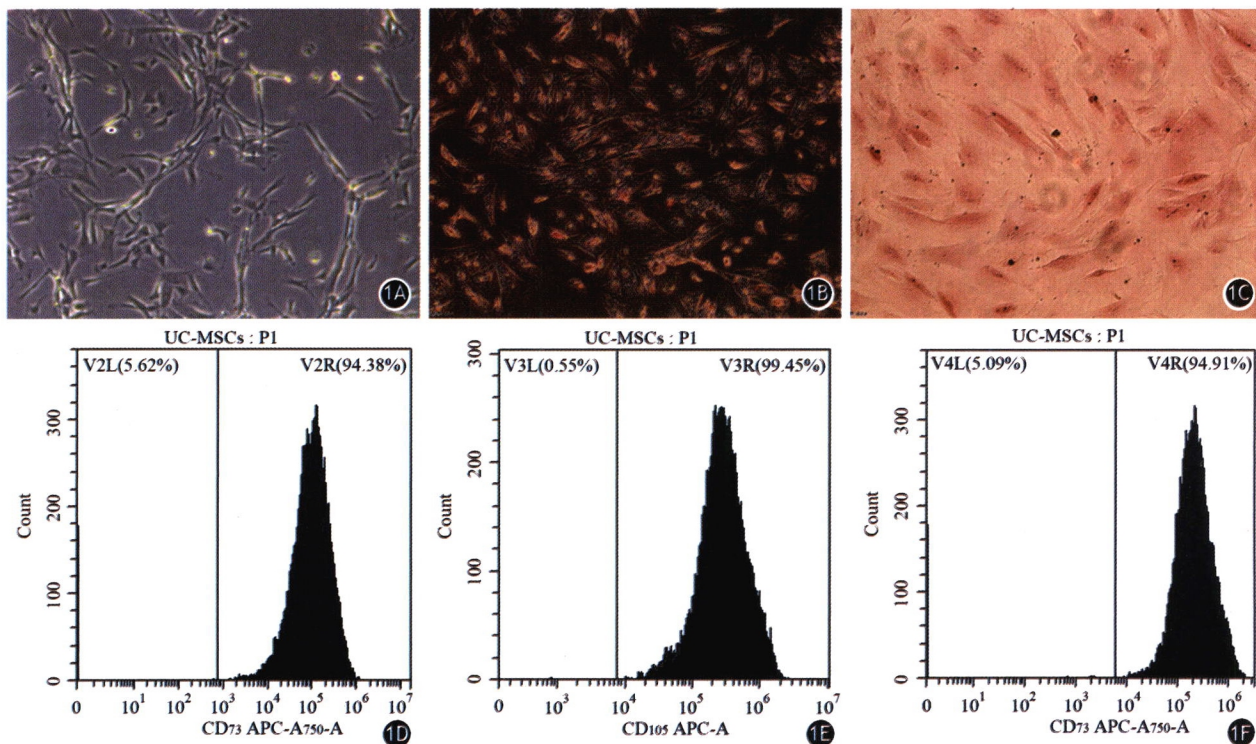


图 1 hUC-MSCs 形态、分化能力及表面标志物鉴定。1A 示第 3 代 hUC-MSCs 倒置显微镜下形态($\times 100$);1B 示 hUC-MSCs 进行成脂诱导 21 d,光镜下形态(油红 O 染色, $\times 100$);1C 示 hUC-MSCs 进行成骨诱导 21 d 光镜下形态(茜红素染色, $\times 100$);1D~1F 示流式细胞术检测 hUC-MSCs 表面标志物 CD₉₀、CD₁₀₅、CD₇₃ 表达阳性

二、DCs 细胞形态及 reg DCs 表型鉴定

在 DCs 培养第 3 天时,细胞周边出现较短的树突状突起,细胞呈现聚集生长,并随时间延长聚集更明显,此时形成未成熟 DCs(imDCs,图 2A)。imDC 中加入 TNF- α 培养 4~5 d 后,成簇的 imDCs 逐渐分开,细胞体积变大,细胞外突起增多、变长,形成成熟 DCs(maDCs,图 2A)。培养至第 5 天加入 hUC-MSCs 共培养后,imDCs 呈黏附生长,细胞树突较少(图 2B),流式细胞检测 CD_{11b} 表达增加,CD_{1a} 和 CD_{11c} 表达下降,出现 CD_{11b}^{high} CD_{1a}^{low} CD_{11c}^{low} 的表型特点,即为 regDCs(图 2B)。

三、hUC-MSCs 对 DCs 成熟和分化的影响

与 DCs 组比较,hUC-MSCs + DCs 组的 regDCs 标志物 CD_{11b} 表达显著上调[(14.26 $\pm$ 1.25)% 比 (4.87 $\pm$ 0.58)%],CD_{1a}、CD_{11c} 表达显著下调

[(2.81 $\pm$ 0.34)% 比 (13.62 $\pm$ 1.52)%、(3.88 $\pm$ 0.50)% 比 (11.80 $\pm$ 1.22)%],差异均有统计学意义(P 值均 < 0.05 ,图 3)。提示 DCs 与 hUC-MSCs 共培养后,hUC-MSCs 抑制 DCs 的成熟和分化,导致以 CD_{11b}^{high} CD_{1a}^{low} CD_{11c}^{low} 为特征的 reg DCs 比例增加。

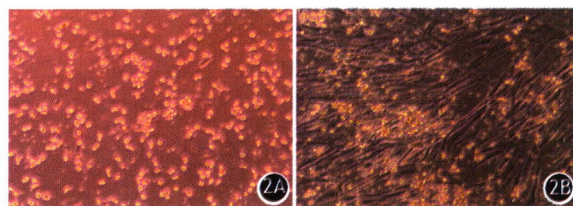


图 2 DCs 组培养 3~5 d,可见伪足样凸起,有未成熟 DCs 及成熟 DCs(2A, $\times 10$),加入 hUC-MSCs 共培养后,DCs 多呈黏附生长,细胞树突较少,主要为 regDCs(2B, $\times 10$)

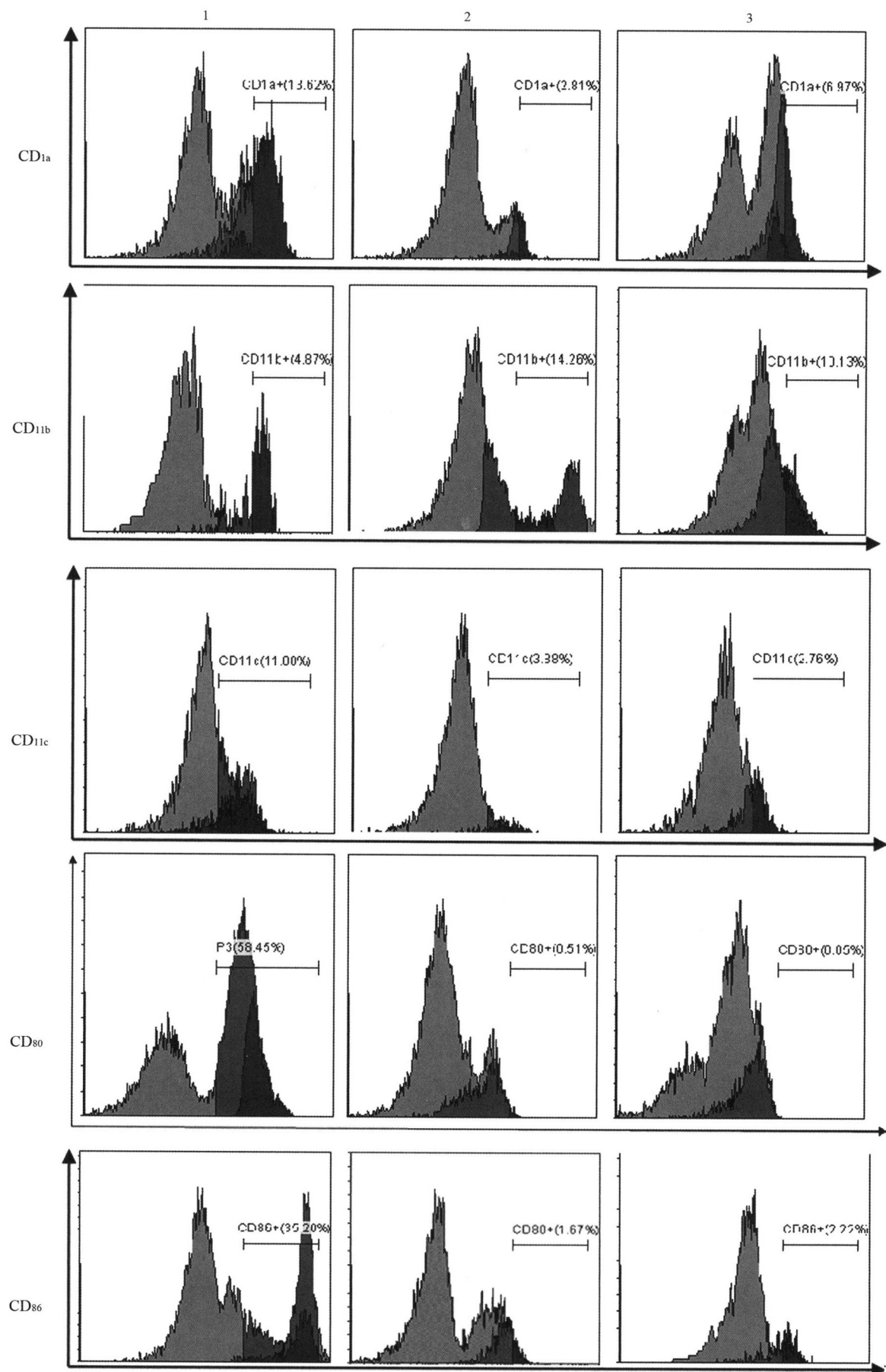


图 3 DCs 组(1)、hUC-MSCs + DCs 组(2)、hUC-MSCs + DCs + NS398 组(3) DCs 各表型的百分比

四、DCs 组、hUC-MSCs + DCs 组细胞培养上清液细胞因子水平

与 DCs 组比较, hUC-MSCs + DCs 组培养上清液 IL-1 β 、INF- γ 、IL-6 水平下降, 但差异无统计学意义 (P 值均 >0.05); 而促炎因子 IL-1 α 水平显著下降, 抗炎因子 IL-10 水平显著增加, 差异均有统计学意义 (P 值均 <0.05 , 表 1)。提示 hUC-MSCs 可能通过调控 DCs 增加抗炎细胞因子分泌、抑制促炎细胞因子发挥免疫调节作用。

表 1 2 组细胞培养上清液 IL-1 β 、INF- γ 、IL-6、IL-1 α 、IL-10 水平 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	INF- γ	IL-6	IL-1 α	IL-10
DCs 组	105.23 $\pm$ 26.83	74.84 $\pm$ 9.75	39408.26 $\pm$ 8964.65	30.19 $\pm$ 7.75	1.83 $\pm$ 0.14
hUC-MSCs + DCs 组	97.28 $\pm$ 14.32	35.53 $\pm$ 4.58	32133.99 $\pm$ 6580.25	14.91 $\pm$ 2.58 ^a	17.03 $\pm$ 4.69 ^a

注: DCs 为树突状细胞; hUC-MSCs 为人脐带间充质干细胞; 与 DCs 组比较, ^a $P < 0.05$

表 2 3 组细胞 NF- κ B-p65、TLR4、IKK α 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	NF- κ B-p65	TLR4	IKK α
DCs 组	0.97 $\pm$ 0.01	1.72 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.01
hUC-MSCs + DCs 组	0.74 $\pm$ 0.02 ^a	0.89 $\pm$ 0.01 ^a	1.12 $\pm$ 0.01 ^a
hUC-MSCs + DCs + NS398 组	0.34 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.14 $\pm$ 0.01 ^{ab}	1.68 $\pm$ 0.01 ^{ab}

注: DCs 为树突状细胞; hUC-MSCs 为人脐带间充质干细胞; 与 DCs 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 hUC-MSCs + DCs 组比较, ^b $P < 0.05$

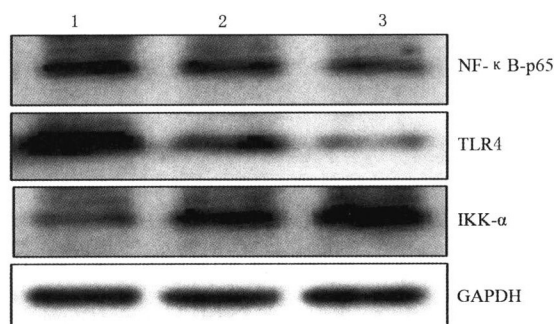


图 4 DCs 组 (1)、hUC-MSCs + DCs 组 (2)、hUC-MSCs + DCs + NS398 组 (3) NF- κ B-p65、TLR4、IKK α 蛋白表达 (蛋白印迹法)

讨 论

SAP 往往早期出现炎症级联反应导致全身炎症反应综合征, 死亡率高达 30%, 因此, 早期控制炎症是治疗 SAP 的关键。研究认为, SAP 引起的炎症因子、细菌和 (或) 内毒素等 PAMPs 或 DAMPs 可以被宿主 DCs 表面的 TLR4 识别并结合, 促进 DCs 的成熟, 通过多个信号转导途径, 引起 DCs 分泌促炎细胞因子, 如 TNF- α 、IL-8、IL-1 β 等, 从而加重炎症反应^[8]。MSCs 因其生物学特性, 可通过作用于免疫

五、DCs 组、hUC-MSCs + DCs 组、hUC-MSCs + DCs + NS398 组 NF- κ B-p65、TLR4 及 IKK α 蛋白表达

与 DCs 组比较, hUC-MSCs + DCs 组 NF- κ B-p65、TLR4 蛋白表达下降, IKK α 蛋白表达增加, 差异均有统计学意义 (P 值均 <0.05 , 表 2)。与 DCs 组及 hUC-MSCs + DCs 组比较, hUC-MSCs-DCs + NS398 组的 NF- κ B-p65、TLR4 表达下降, 而 IKK α 蛋白表达增加, 差异均有统计学意义 (P 值均 <0.05 , 表 2、图 4)。

系统包括 T 细胞、B 细胞、DCs、NKs 在内的多种免疫细胞来实施免疫调节, 调控炎症反应^[9]。有研究表明, 与 MSCs 共培养的 DCs 即使在促其成熟的脂多糖或 TNF- α 刺激下仍不表达 CD₈₃, 且其成熟标志物如 MHC II 类分子、CD₄₀ 或 CD₈₆ 表达也未上调^[10], 提示 MSCs 可以抑制 DCs 的成熟与分化。

有研究报道, 在对急性胰腺炎的治疗中, MSCs 发挥其免疫调节特性, 诱导 Foxp³⁺ 辅助 T 细胞的产生, 后者诱导中性粒细胞发生凋亡, 同时抑制 CD₃⁺ 以及 CD₄⁺ T 细胞的增殖, 进一步降低胰腺炎相关炎症因子, 如 TNF- α 、 γ 干扰素、IL-1 β 、IL-6、IL-15、IL-17、诱导型一氧化氮合酶、TGF- β 等的表达, 同时增加抗炎因子如 IL-4 和 IL-10 的表达, 这些改变又降低了全身炎症反应的发生率^[11]。本研究结果显示, MSCs 诱导的 DCs 表现出髓系分子 CD_{11c}、提呈分子 CD_{11a} 和共刺激分子 CD₈₀、CD₈₆ 表达明显下调, 而 CD_{11b} 的表达上调, 表明 MSCs 诱导出了一组不同的 DC 群体, 即 regDCs。本研究结果还显示, hUC-MSC + DCs 共培养组分泌的 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 下降, 但 IL-10 的分泌增加, 这也是 regDC 群体的一个特征。由于体外诱导 DCs 分化成熟需要 IL-4 和 TNF- α , 因

此目前无法分析这两种因子的促炎作用,但本研究结果提示 MSCs 可以通过调节 DCs 的分化进而分泌抗炎细胞因子、抑制促炎细胞因子以行使免疫调节作用。

TLRs 与炎症反应的关系目前已明确^[12],其中通过 TLR4/IKK α /NF- κ B 信号通路激活作用于 COX-2 增加促炎细胞因子合成和释放,被认为在炎症发生发展中起着重要作用。而 COX-2 抑制剂又可以抑制转录因子 NF- κ B 或激活蛋白-1 (activator protein-1, AP-1),通过负反馈调节来减弱 NF- κ B 的表达,发挥抗炎和抗增殖作用^[13]。但关于 SAP 时 TLR4/IKK α /NF- κ B 信号通路对 DCs 成熟及分化影响的研究较少。本研究结果显示,与 hUC-MSCs 共培养后,CD_{11b}^{high} CD_{1a}^{low} CD_{11c}^{low} regDCs 比例增加,NF- κ B-p65 与 TLR4 蛋白表达显著下调,IKK α 由于组蛋白修饰减少而表达上调;以 NS398 阻断 NF- κ B 下游基因 COX-2 表达后,NF- κ B-p65 与 TLR4 蛋白表达继续呈现下调趋势,而 IKK α 蛋白表达再次显著上调。提示 hUC-MSCs 可能通过调节 SAP 患者 DCs 的成熟及分化进行免疫调节,进而影响与 TLR4 的结合,导致 IKK α 激活减少,使得 NF- κ B-p65 表达下调,最终阻断 NF- κ B 通路,减少炎症因子的产生。

综上所述,hUC-MSCs 能抑制 DCs 的分化及成熟,产生 regDCs 进行免疫调节,同时经 TLR4/IKK α /NF- κ B/COX-2 途径抑制炎症级联反应,发挥抗炎作用,有效降低全身炎症反应程度,缓解胰腺及其他脏器的损伤,达到治疗 SAP 的目的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Bedrosian AS, Nguyen AH, Hackman M, et al. Dendritic cells promote pancreatic viability in mice with acute pancreatitis[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5):1915-1926. e14. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.07.033.
- [2] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway[J]. *Cytokine*, 2008, 42(2):145-151. DOI:10.1016/j.cyto.2008.01.006.
- [3] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411):143-147. DOI:10.1126/science.284.5411.143.
- [4] Abumaree MH, Abomaray FM, Alshabibi MA, et al. Immunomodulatory properties of human placental mesenchymal stem/stromal cells[J]. *Placenta*, 2017, 59:87-95. DOI: 10.1016/j.placenta.2017.04.003.
- [5] Wang Q, Ding G, Xin X. Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells and possible mechanisms[J]. *Histol Histopathol*, 2016, 31(9):949-959. DOI: 10.14670/HH-11-750.
- [6] Jung KH, Song SU, Yi T, et al. Human bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells inhibit inflammation and reduce acute pancreatitis in rats[J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(3):998-1008. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.11.047.
- [7] He Z, Hua J, Qian D, et al. Intravenous hMSCs Ameliorate Acute Pancreatitis in Mice via Secretion of Tumor Necrosis Factor-alpha Stimulated Gene/Protein 6[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:38438. DOI: 10.1038/srep38438.
- [8] Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1):54-63. DOI:10.1016/j.stem.2009.05.003.
- [9] Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. [J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(3):252-260. DOI:10.1038/nbt.2816.
- [10] Roodhart JM, Daenen LG, Stigter EC, et al. Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids[J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(3):370-383. DOI:10.1016/j.ccr.2011.08.010.
- [11] 庄培涛,谭雪莹,邱建涛,等. 人脂肪间充质干细胞对急性坏死性胰腺炎大鼠治疗疗效的观察[J]. *中华胰腺病志*, 2017, 17(2):82-87. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-1935.2017.02.003.
- [12] 黄启林,杨屹,罗晨,等. 胎盘间充质干细胞移植对大鼠重症急性胰腺炎的保护作用[J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(7):646-655.
- [13] 李斌,刘丽平,郭鸿,等. 环氧合酶-2 和核因子- κ B 在脓毒症大鼠肝损伤中的表达[J]. *中国医药导报*, 2014, 11(8):14-18. DOI:CNKI:SUN:YYCY.0.2014-08-005.

(收稿日期:2020-10-10)

(本文编辑:屠振兴)