

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 传染病科, 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

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2025)06-0679-08

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-β1 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-γt、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, 同时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 μmol/L 地塞米松、100 μg/mL IBMX、10 μg/mL 胰岛素和 200 μmol/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 μmol/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作记录。

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: 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 μL 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 处理后第 0、1、3、5 和 7 天取各组小鼠尾部静脉血 100 μL, 添加 100 μL 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-β1 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-β1 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 ℃ 预热 30 s,随后进行 40 个循环,每个循环包括步骤 95 ℃ 变性 5 s、60 ℃ 退火 30 s,最后进行熔解曲线分析,条件为 95 ℃ 15 s、65 ℃ 1 min 和 95 ℃ 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 ℃ 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)。

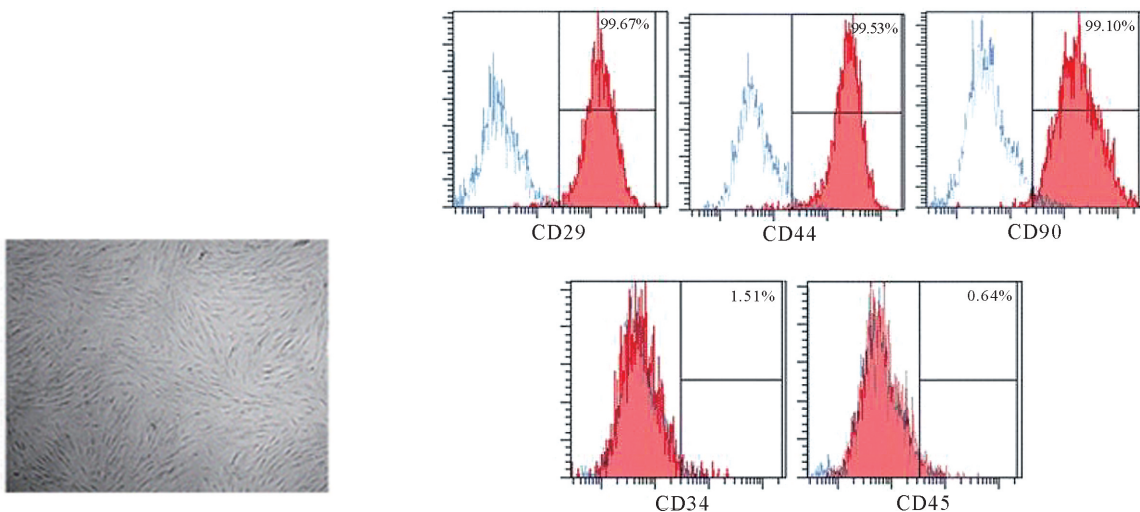
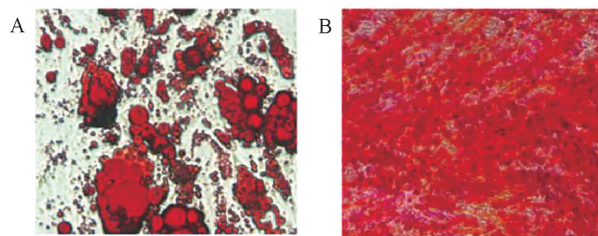


图1 第4代 hUC-MSC 显微镜下形态($\times 200$)

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,[#] $P<0.05$ 。

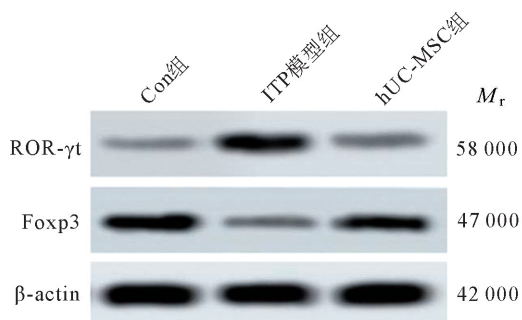
2.6 hUC-MSC对ITP小鼠脾脏 *ROR-γt*、*Foxp3* mRNA及蛋白表达的影响 与Con组比较,ITP模型组小鼠脾脏组织 *ROR-γt* mRNA及蛋白表达显著升高(均 $P<0.05$),*Foxp3* mRNA及蛋白表达

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,[#] $P<0.05$ 。

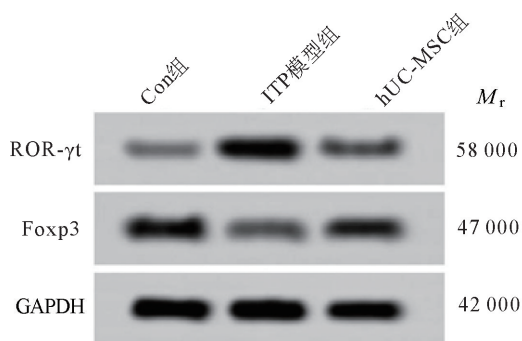


图6 Western blotting 示各组小鼠外周血 ROR- γ t、Foxp3 蛋白表达

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, 12(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 W, Liu X, Zhu Y, *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 Y, Li X, Wen D, *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 Y, Ying Q, 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 Z, Zhang G, Gan G, *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 X, Yin X, 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 J, 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 Y, Mu L, *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 W, Cao Y, Zhong Y, *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

(上接第 678 页)

injury, CRISPR/Cas9 gene editing technology was used to construct *Gpr84* conditional knockout mice (*Gpr84^{loxP/loxP}*), which were subsequently hybridized with macrophage-specific *Ly2z*-Cre mice to generate the macrophage *Gpr84* conditional knockout (cKO) mice. Next, the acute lung injury model was established by a single intratracheal administration of LPS (5 mg/kg) to the conditional knockout and C57BL/6 wild-type (WT) mice. The mice were divided into 4 groups: the WT-control, the cKO-control, the WT-LPS, and the cKO-LPS groups, with 6 animals in each group. The cKO mice were identified using PCR technology. H-E staining was employed to examine the pathological changes in lung tissue. The ratio of wet weight/dry weight (W/D) was measured in lung tissue, and qRT-PCR was utilized to quantify the expression of inflammatory factors, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), and heme oxygenase 1 (Hmox1) in lung tissue. ELISA was used to determine the levels of IL-1 β , IL-6, and MCP-1 in mouse serum, and immunohistochemistry was performed to detect the protein level of Nrf2 in lung tissue. The results showed that the macrophage *Gpr84* knockout mice were successfully constructed, and the function of GPR84 in acute lung injury was studied. Compared to the control group, the LPS group exhibited significant inflammatory cell infiltration and alveolar collapse, increased lung injury scores, elevated lung W/D ratio, and increased expression of inflammatory factors in lung tissue and serum. However, compared to the WT-LPS group, the cKO-LPS group showed reduced pulmonary inflammatory cell infiltration, decreased lung injury scores, and significantly reduced expression of inflammatory factors in lung tissue and serum. In addition, the expressions of Nrf2 and Hmox1, which have antioxidant functions, significantly increased. This study suggests that the specific knockout of the *Gpr84* gene in macrophages can significantly alleviate LPS-induced lung inflammation and enhance the resistance to oxidative stress, indicating that GPR84 may serve as a potential target for the treatment of acute lung injury.

Key words: macrophage; G protein-coupled receptor 84; acute lung injury; inflammation; gene knockout