

·基础研究·

TLR4和IFN- γ 激活的间充质干细胞通过调节巨噬细胞极化改善血吸虫病肝纤维化

任瑶佳¹, 陈芳^{1,2}, 黄婉娴³, 吴忠道³, 雷俊霞¹

(1. 华南理工大学医学院, 广东广州510080; 2. 汕头中心医院血液科, 广东汕头515031; 3. 中山大学热带病防治研究教育部重点实验室, 广东广州510080)

摘要:【目的】探讨共激活的间充质干细胞(MSCs)是否通过调节巨噬细胞极化发挥治疗血吸虫病的作用。【方法】取20只成年Balb/c雄性小鼠,随机分为四组,分别为未感染组、感染组、MSC组和MSC^{TLR4+IFN- γ} 组。通过腹部敷贴尾蚴法建立日本血吸虫感染模型。在感染后第5周,经灌胃给予小鼠吡喹酮进行抗虫治疗;感染后第6周,分别给予不同处理的MSCs治疗或未治疗。每周监测各组小鼠体重质量变化率。采用HE染色和Masson染色观察肝组织病理变化,通过RT-qPCR检测肝组织中 α -SMA和胶原蛋白mRNA水平,以评估肝纤维化程度;检测肝脏炎症因子和基质金属蛋白酶(MMP)的mRNA水平,分析纤维化相关机制;通过RT-qPCR检测肝组织中*i-Nos*和*Arg-1*表达,并利用免疫荧光染色检测M1或M2巨噬细胞的比率,分析MSCs治疗与巨噬细胞极化的相关性;采用体外共培养体系,研究MSCs对巨噬细胞极化的直接调控作用。【结果】与感染组相比,MSC^{TLR4+IFN- γ} 组小鼠体重增加($P < 0.01$),肝脏虫卵肉芽肿面积显著减少($P < 0.001$), α -SMA、Col-I和Col-III在RNA水平表达下降($P < 0.01$)。此外,MSC^{TLR4+IFN- γ} 组小鼠肝组织中炎症因子*TNF- α* 和*IL-1 β* 表达下降($P < 0.05$),基质金属蛋白酶MMP2、MMP9和MMP13表达增高($P < 0.01$)。MSC^{TLR4+IFN- γ} 组较感染组显示M2标志物*Arg-1*mRNA高表达($P < 0.001$),而M1标志物*i-Nos*表达下降($P < 0.05$);免疫荧光结果显示MSC^{TLR4+IFN- γ} 组肝脏*i-Nos*+细胞比率较感染组显著降低($P < 0.05$),而F4/80+CD206+细胞比率升高($P < 0.0001$)。体外共培养实验进一步验证了这一现象:和MSC^{TLR4+IFN- γ} 共培养后,骨髓来源巨噬细胞中*Arg-1*在RNA水平表达升高,且促炎因子*i-Nos*和*TNF- α* 的表达下降,ELISA结果与之相符。【结论】本研究表明,TLR4与IFN- γ 协同激活的MSCs可减轻日本血吸虫感染小鼠的肝纤维化,该作用可能与激活MSCs调节巨噬细胞向M2型极化,发挥抗炎作用并促进肝脏细胞外基质降解相关。

关键词:巨噬细胞;血吸虫病;肝纤维化;间充质干细胞;M2巨噬细胞极化

中图分类号:R575.2 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2025)03-0410-10

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2025.0306

TLR4 and IFN- γ Activated Mesenchymal Stem Cells Improve Schistosomiasis Liver Fibrosis by Regulating Macrophage Polarization

REN Yaojia¹, CHEN Fang^{1,2}, HUANG Wanxian³, WU Zhongdao³, LEI Junxia¹

(1. South China University of Technology School of Medicine, Guangzhou 510080, China; 2. Hematology Department of Shantou Central Hospital, Shantou 515031, China; 3. Key Laboratory of Tropical Disease Prevention and Control Research Designated by the Chinese Ministry of Education, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: LEI Junxia E-mail: leijx@scut.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate whether co-activated mesenchymal stem cells (MSCs) exert therapeutic effects

收稿日期:2025-03-29

录用日期:2025-04-22

基金项目:国家自然科学基金(82372277)

作者简介:任瑶佳,第一作者,研究方向:干细胞免疫治疗,E-mail:921328604@qq.com;雷俊霞,通信作者,副教授,E-mail:leijx@scut.edu.cn

against schistosomiasis by modulating macrophage polarization.【Methods】 Twenty adult male Balb/c mice were randomly divided into four groups: uninfected, infected, MSC-treated, and MSC^{TLR4+IFN- γ} -treated groups. The *Schistosoma japonicum* infection model was established via abdominal patch method with cercariae. At week 5 post-infection, praziquantel was administered orally for antiparasitic treatment. At week 6, mice received either MSCs treatments (with or without pre-activation) or no treatment. Body weight changes were monitored weekly. Hepatic pathological alterations were evaluated via HE and Masson staining. RT-qPCR was used to assess α -SMA and collagen (*Col-I*, *Col-III*) mRNA levels to quantify fibrosis. The mRNA levels of hepatic inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases (MMP) were analyzed to explore fibrotic mechanisms. The expressions of *i-Nos* and *Arg-1* in liver tissues were detected by RT-qPCR, and the ratio of M1 or M2 macrophages was detected by immunofluorescence staining, aiming to analyze the correlation between MSCs treatment and macrophage polarization. An *in vitro* co-culture system validated direct MSC-macrophage interactions.【Results】 Compared with the infected group, the MSC^{TLR4+IFN- γ} group exhibited increased body weight gain ($P < 0.01$), reduced hepatic granulomatous lesion area ($P < 0.001$), and decreased α -SMA, *Col-I*, and *Col-III* mRNA levels ($P < 0.01$). Additionally, the MSC^{TLR4+IFN- γ} group showed reduced *TNF- α* and *IL-1 β* expression ($P < 0.05$), as well as elevated *MMP2*, *Mmp9*, and *MMP13* levels ($P < 0.01$). The MSC^{TLR4+IFN- γ} group showed higher expression of M2 marker *Arg-1* mRNA compared with the infection group ($P < 0.001$), while the expression of M1 marker *i-Nos* decreased ($P < 0.05$). Immunofluorescence confirmed a lower *i-Nos*+ cell ratio ($P < 0.05$) and higher *F4/80*⁺*CD206*⁺ cell ratio ($P < 0.0001$) in the MSC^{TLR4+IFN- γ} group compared with the infection group. *In vitro* co-culture experiments further demonstrated that MSC^{TLR4+IFN- γ} promoted *Arg-1* expression, suppressed pro-inflammatory cytokine *i-Nos* and *TNF- α* levels, consistent with ELISA results.【Conclusions】 This study reveals that TLR4 and IFN- γ co-activated MSCs alleviate *Schistosoma japonicum*-induced hepatic fibrosis, potentially through modulating macrophage polarization toward the M2 phenotype. This mechanism may suppress inflammation and enhance extracellular matrix degradation, providing a therapeutic strategy for schistosomiasis-associated liver fibrosis.

Key words: macrophages; schistosomiasis; hepatic fibrosis; mesenchymal stem cells; M2 macrophage polarization

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2025, 46(3): 410-419]

血吸虫病因其高发病率和死亡率,已成为全球重要的公共卫生问题。该疾病的主要病理特征是虫卵在肝脏沉积引发虫卵肉芽肿性炎症,并最终导致肝纤维化^[1-3]。在感染早期,宿主免疫应答以血吸虫成虫可溶性抗原组分触发的Th1型为主,伴随干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子(TNF- α)和白介素12(IL-12)水平升高^[4]。在感染约4~5周后,随着血吸虫产卵并随血流沉积至肝脏,虫卵抗原驱动的Th2型免疫应答逐渐增强^[5-7],巨噬细胞、中性粒细胞等炎症细胞聚集以及胶原沉积,虫卵肉芽肿形成,破坏肝组织正常结构并逐渐发展为肝纤维化。在血吸虫感染过程中,大量巨噬细胞被招募至肝脏组织。处于Th1环境时,*TNF- α* 或*IL-1 β* 等炎症因子会促进巨噬细胞极化为经典激活型(M1型)^[8],其特征性标志为高表达诱导型一氧化氮合酶(*i-Nos*)^[9]。M1型巨噬细胞被认为与免疫病理损伤加重及死亡率增加密切相关^[10]。相反,在Th2环境下,在IL-4和IL-13等信号作用下,巨噬细胞可诱

导为替代激活型(即M2型),其高表达精氨酸酶-1(*Arg-1*)、*Mcr1*和*Fizz1*等特征性基因,并在抗炎及组织修复过程中发挥关键作用^[8,11]。但另一方面,*Arg-1*将L-精氨酸转化为尿素和L-鸟氨酸,而L-鸟氨酸是胶原蛋白主要成分的前体物质,也可能参与胶原过度沉积。因此巨噬细胞在血吸虫病中作用需结合感染微环境具体分析^[12-13]。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs)因其显著的免疫调节作用,近来也被试用于一系列肝脏损伤性疾病的治疗,包括血吸虫感染引起的纤维化^[14-17]。虽然已有研究报道MSCs可通过诱导M2型巨噬细胞(替代激活型)来抑制炎症、缓解多种急性损伤模型诱发的纤维化^[18-19],但其在血吸虫感染模型,通过调节巨噬细胞功能影响纤维化发展的作用仍需更多证据。我们早期的研究发现,MSC^{TLR4+IFN- γ} 可通过调控Th1/Th2免疫反应缓解小鼠血吸虫感染导致的肝纤维化^[20]。本研究进一步探讨了TLR4和IFN- γ 激活的MSCs在血吸虫病模型中对巨噬细胞极化、

抗炎特性及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解能力的影响,以进一步阐明MSCs在纤维化治疗中的潜在应用价值,为MSCs在纤维化治疗中的应用提供更多线索。

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物

Balb/c 雄性小鼠,5~7 周龄,购自广东省实验动物中心(广州,中国),在中山大学北校区实验动物中心生物安全2级实验室中的单独通风笼中饲养。本研究中所用的含日本血吸虫尾蚴的阳性钉螺,订购于江苏省血吸虫病防治研究所(无锡)。所有程序均经中山大学动物护理和使用委员会批准,并符合中国国立卫生研究院《实验动物护理和使用指南》,审批号:SYSU-IACUC-2024-B0567。

1.2 间充质干细胞的分离和培养

1.2.1 间充质干细胞获取 采用改良的低密度培养法从5周龄Balb/c小鼠的骨髓中分离。简要步骤如下:采用脱颈法处死小鼠,无菌取出股骨和胫骨,冲洗骨髓腔,收集细胞悬液,并通过70 μm细胞滤网过滤。用红细胞裂解液(碧云天,中国)去除红细胞,用PBS(Gibco,美国)洗涤细胞,最后将细胞用DMEM完全培养基重悬,添加100 mL/L的胎牛血清(Thermo Fisher,美国)和10 mL/L的青霉素/链霉素(Gibco,美国)。以 5×10^4 个/cm²的密度接种于T25细胞培养瓶中,细胞均置于37 °C,体积分数5% CO₂细胞培养箱内培养。培养3 d后更换培养基,去除未贴壁细胞,继续培养贴壁细胞。

1.2.2 间充质干细胞鉴定 当细胞密度达80%时,使用EDTA-胰酶(Thermo Fisher,美国)消化并传代培养。传代3次后,采用流式细胞术对MSCs表面标志物进行鉴定,结果显示干细胞抗原1(stem cell antigen 1, Sca-1)、CD90、CD44和CD106呈阳性,而CD45和CD11b呈阴性^[21-22]。

1.3 分组与造模

6周龄、体质量约20 g的雄性Balb/c小鼠随机分为4组,每组5只,分别为未感染组、感染组、MSC组和MSC^{TLR4+IFN-γ}组,未感染组腹部敷贴纯净水,另外3组腹部敷贴尾蚴(尾蚴来源于血吸虫感染阳性钉螺)建立日本血吸虫感染模型,每只鼠感染 15 ± 2 条尾蚴。感染后第5周末感染组用纯净水灌胃,另外三组连续5 d给予吡喹酮(南京制药厂,中国)

120 mg kg⁻¹ d⁻¹灌胃进行杀虫治疗,从而主要观察MSCs对血吸虫病诱发的肝纤维化的治疗作用。感染后第6周,未感染组和感染对照组通过尾静脉注射生理盐水;MSC组:经尾静脉注射MSCs 1×10^6 个/鼠;MSC^{TLR4+IFN-γ}组:MSCs用LPS 5×10^{-5} g/L和IFN- γ 2×10^{-5} g/L联合刺激10 h后,经尾静脉注射至小鼠体内, 1×10^6 个/鼠。

1.4 标本采集和指标观察

感染后每周记录小鼠体质量,与第8周用脱颈法处死小鼠,取出肝脏。左侧肝叶用甲醛固定用作石蜡包埋,剩余肝组织放置液氮中保存,用于提取RNA。

1.5 肝脏组织学评估

肝脏蜡块组织切片后常规脱蜡、脱水,用苏木精-伊红(H&E)染色和Masson染色,乙醇脱水,二甲苯透明后封片,光学显微镜及全自动玻片扫描仪(江丰,中国)拍摄组织影像,并采用Image J软件进行定量分析,以测量肉芽肿面积大小。

1.6 实时荧光定量PCR

肝脏组织和巨噬细胞使用TRIzol试剂(Invitrogen,美国)提取RNA:细胞样品去除培养基后PBS润洗,加入TRIzol反复吹打后静置5 min;肝脏组织取黄豆粒大小浸润在TRIzol中,用组织研磨棒研磨成组织悬液。按照Trizol:氯仿为5:1的体积比加入氯仿,12 000×g,4 °C,离心15 min;吸取上层无色液体,加入等体积异丙醇,12 000×g,4 °C,离心15 min,可见白色沉淀,即为RNA。用无水乙醇7 500×g,4 °C,离心5 min洗涤两次,倒掉上清并晾干,预热至60 °C的DEPC水重悬RNA。分光光度计测量RNA浓度和质量。

按照Evo M-MLV反转录试剂盒(AG,中国)说明书配置反应体系,逆转录获得cDNA;将cDNA按SYBR Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒(AG,中国)说明书配置反应体系(PCR引物见附表),全程避光,冰上操作。在CFX 96荧光定量PCR仪(Bio-Rad Laboratories,美国)上机检测;以内参基因GAPDH作为内对照,采用2^{-ΔΔCt}方法计算相对mRNA表达量。

1.7 组织免疫荧光

肝脏蜡块组织切片后常规脱蜡、脱水,组织浸泡在40 g/L的多聚甲醛中固定15 min,PBST洗涤3



附表
Appendix table

次,加入 1 mL/L 的 Triton X-100 覆盖组织,室温孵育 20 min 后 PBST 洗涤。用组化笔围绕组织画闭环圈,在圈内滴加 30 g/L BSA 孵育 2 h。按照说明书建议稀释一抗,添加一抗使其覆盖样品,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日 PBST 洗涤。添加和一抗种属对应的二抗,室温避光孵育 1 h, PBST 洗涤。晾干后滴加含 DAPI 的抗荧光淬灭剂封片,用 Leika DMi8 荧光显微镜采集图像,使用 Image J 软件测定荧光强度。本研究所使用一抗如下:F4/80、*i-Nos*、*CD206* (Abcam, 英国)。

1.8 骨髓来源巨噬细胞的分离与共培养

1.8.1 骨髓来源巨噬细胞分离与获取 骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDM) 是从小鼠骨髓中提取并通过体外培养分化得到的一类巨噬细胞。分离小鼠胫骨和股骨,冲洗出骨髓细胞,用含 2×10^{-5} g/L 重组鼠源 M-CSF1 (Peprotech, 美国) 的 DMEM 高糖培养基 (含 100 mL/L 的胎牛血清和 10 mL/L 的青霉素/链霉素) 重悬,在 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 条件下培养 7 d, 每隔 1 d 半量更换培养基。

1.8.2 骨髓来源巨噬细胞与间充质干细胞共培养 BMDMs 在 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 条件下,分别单独培养 (Infection 组)、与未处理的 MSCs (MSC 组) 或经 TLR4+IFN- γ 预激活的 MSCs (MSC^{TLR4+IFN- γ} 组) 以 10:1 的数量比共培养 24 h。

1.8.3 收集样品 收集各组培养基,用于 ELISA 检测;用 PBS 清洗 BMDMs 2 次,去除残留培养基,以胰酶消化 1 min 去除 MSCs,仅保留 BMDMs, TRIzol 法收集细胞 RNA。

1.9 酶联免疫吸附试验

遵照 ELISA 试剂盒 (Elabscience, 中国) 说明书对细胞培养基上清中 TNF- α 和 IL-10 的含量进行检测。使用 MK3 酶标仪在 450 nm 波长下记录吸光度 (OD) 值。

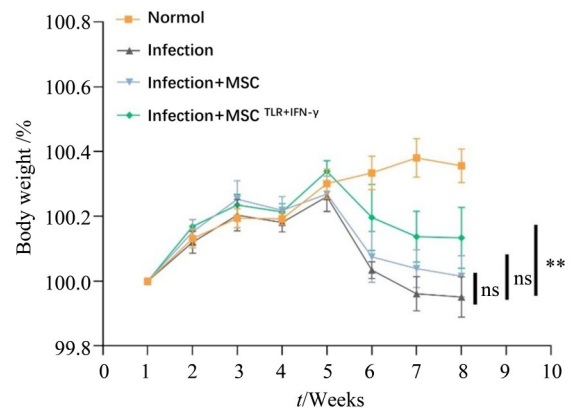
1.10 统计分析

本研究所有数据均以均值 \pm 标准误 (mean \pm SEM) 表示。符合正态分布及方差齐性检验的多组间样本均数比较采用数据单因素方差分析和 Tukey 多重比较 (One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons) 进行三组或更多组的两两比较分析^[23]。当 *P* 值小于 0.05 时,认为差异具有统计学意义。统计分析和绘图采用 GraphPad Prism 10.1 软件和 SPSS 25.0 完成。

2 结果

2.1 预激活间充质干细胞显著缓解日本血吸虫感染小鼠的肝脏病理损伤

本研究中,我们进一步验证了 MSC^{TLR4+IFN- γ} 在日本血吸虫感染模型中的治疗潜力。根据小鼠体重记录 (图 1), 从感染后第 6 周给予小鼠注射 MSC^{TLR4+IFN- γ} 后, MSC^{TLR4+IFN- γ} 组小鼠体质量下降明显减轻,对比另外两组感染鼠, MSC^{TLR4+IFN- γ} 组小鼠感染第 8 周体质量增长率显著高于另外两组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。



The body weight of mice was recorded every week after infection and a line graph of weight change rate was created. The weight change rate in week 8 was compared that of week 1 after MSC/MSC^{TLR4+IFN- γ} treatment. Results are expressed as mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA, *n* = 5, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001 and ns = not significant.

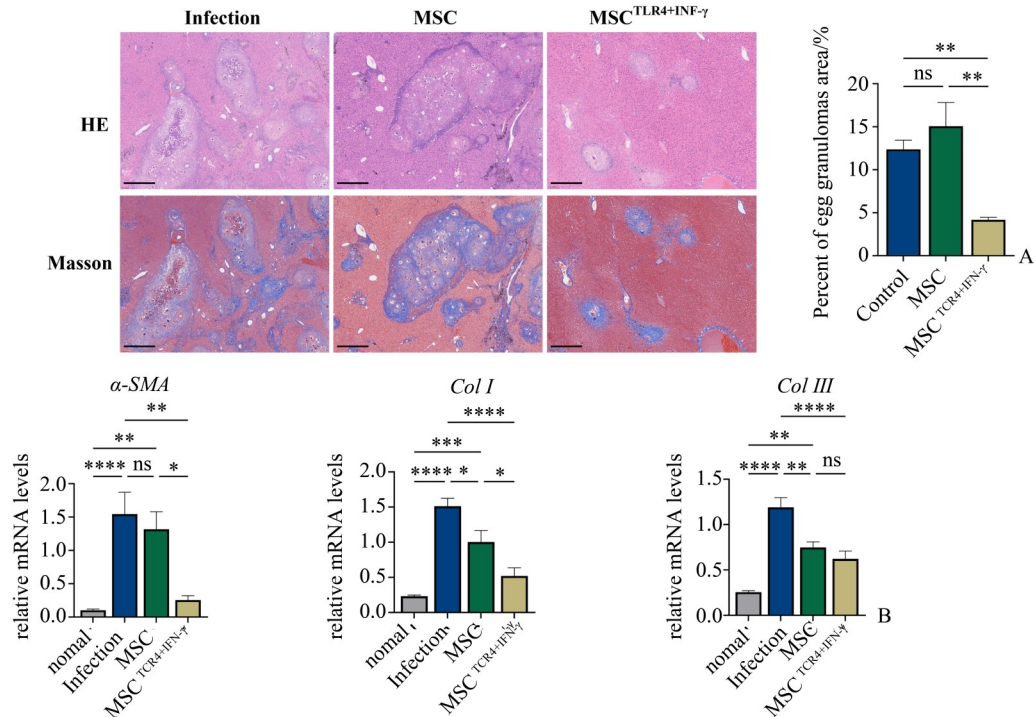
图 1 MSC^{TLR4+IFN- γ} 缓解了日本血吸虫感染小鼠体质量减轻
Fig. 1 MSC^{TLR4+IFN- γ} alleviates weight loss in mice infected with *Schistosoma japonicum*

除此之外,肝脏组织切片 HE 和 Masson 染色显示 (图 2A), MSC^{TLR4+IFN- γ} 组小鼠肝脏肉芽肿和胶原纤维沉积减少。Image J 软件定量分析肝脏肉芽肿面积占切片总面积百分比,经统计,感染组肉芽肿面积占切片总面积均值为 12.16%, MSC 组肉芽肿面积比为 13.66%, MSC^{TLR4+IFN- γ} 组面积比为 4.37%,显著低于另外两组,差异有统计学意义 (*F* = 15.24, *P* < 0.01)。

为进一步评估 MSCs 对肝纤维化的调控作用,我们采用 RT-qPCR 检测了小鼠肝脏中纤维化相关基因的表达水平,如图 2B,采用 Tukey 法作两两比较,与感染对照组相比, MSC^{TLR4+IFN- γ} 组的肝星状细胞

胞活化标志物 α -SMA 在 RNA 水平上表达显著降低 ($F=14.66, P<0.05$), 未激活 MSCs 则未表现出类似作用。此外, 相较于感染对照组, 未处理的 MSCs

和 $MSC^{TLR4+IFN-\gamma}$ 均可抑制 $Col-I$ 和 $Col-III$ 表达, 但后者对 $Col-I$ 的抑制作用更为显著 ($F=32.97$, MSC 组: $P<0.05$; $MSC^{TLR4+IFN-\gamma}$ 组: $P<0.001$)。



A: Representative granulomatous was shown by HE staining and by Masson staining, Quantitative determination of granuloma area in HE stained images using Image J software. Scale bar=400 μ m. $n=5$. B: The RNA expression of α -SMA, Col I and Col III in the mice liver issue of each group were assessed by RT-qPCR analysis. $n=5$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ and ns = not significant.

图2 $MSC^{TLR4+IFN-\gamma}$ 缓解了日本血吸虫感染小鼠的肝脏病理损伤

Fig. 2 $MSC^{TLR4+IFN-\gamma}$ alleviated liver pathology in mice infected with *Schistosoma japonicum*

2.2 预激活间充质干细胞显著缓解小鼠肝脏病理损伤机制探索

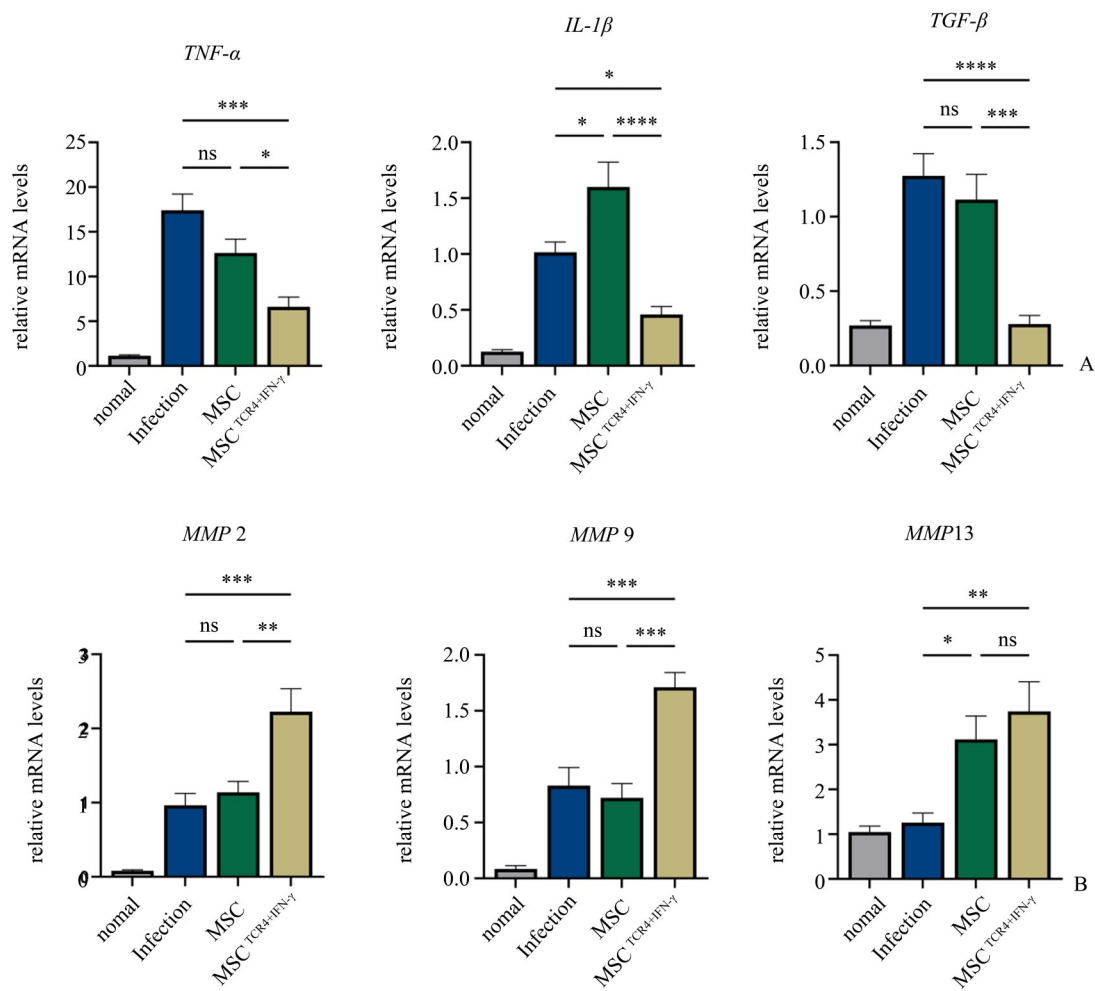
为了探究 $MSC^{TLR4+IFN-\gamma}$ 缓解日本血吸虫感染小鼠的肝脏病理损伤的机制, 如图 3A 所示, 我们测量各组小鼠肝脏中炎症因子 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 的表达, 对比感染对照组发现, $MSC^{TLR4+IFN-\gamma}$ 组中 $TNF-\alpha$ ($F=29.10, P<0.001$) 和 $IL-1\beta$ ($F=32.55, P<0.05$) 表达都显著降低, 而 MSC 组的 $TNF-\alpha$ 虽然也有下降趋势, 但差异无统计学意义, 且 $IL-1\beta$ 表达甚至升高 ($F=32.55, P<0.05$), 提示仅 $MSC^{TLR4+IFN-\gamma}$ 治疗可显著减轻肝脏炎症反应。此外, $MSC^{TLR4+IFN-\gamma}$ 组 $TGF-\beta$ 表达相比另外两组感染鼠也下降 ($F=20.57$, 感染组: $P<0.0001$, MSC 组: $P<0.001$)。结合诱导后 MSC 缓解纤维化的作用, 提示 $MSC^{TLR4+IFN-\gamma}$ 也可能通过减少肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 过度激活发挥作用。

由于肝纤维化的进程受胶原蛋白沉积及基质

金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 介导的 ECM 降解共同影响, 我们进一步分析了 MMPs 的表达变化。结果如图 3B 所示, 与感染对照相比, $MSC^{TLR4+IFN-\gamma}$ 组中 $MMP2$ ($F=29.38, P<0.05$)、 $MMP9$ ($F=33.53, P<0.05$) 和 $MMP13$ ($F=11.96, P<0.01$) 的表达都显著升高, 而 MSC 组中仅 $MMP13$ 的表达略有升高 ($F=11.96, P<0.05$)。由此提示, $MSC^{TLR4+IFN-\gamma}$ 可能通过降低肝脏炎症减少 ECM 沉积, 或通过上调 MMPs 促进 ECM 降解, 从而缓解肝脏纤维化。

2.3 预激活间充质干细胞抑制日本血吸虫感染小鼠肝巨噬细胞向 M1 型极化并促进其向 M2 型极化。

由于巨噬细胞在日本血吸虫病过程中发挥的关键免疫调节作用, 且在组织修复和重塑中起重要作用, 我们探讨了 $MSC^{TLR4+IFN-\gamma}$ 是否通过调节巨噬细胞功能影响纤维化的发展。我们分别在 RNA 和蛋白表达水平上比较了各组小鼠肝脏组织中 M1 型标志物 ($i-Nos$) 和 M2 型标志物 ($Arg-1$ 、 $CD206$) 的表达



The RNA expression of *TNF- α* , *IL-1 β* , *TGF- β* , *MMP2*, *MMP9* and *MMP13* in the mice liver issue of each group were assessed by RT-qPCR analysis. $n=5$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ and ns = not significant.

图3 MSC^{TLR4+IFN- γ} 降低肝脏炎症因子并提高MMPs表达

Fig. 3 MSC^{TLR4+IFN- γ} reduced liver inflammatory factors and increased the mRNA expression of MMPs

水平。肝脏组织 RT-qPCR 结果显示,如图 4,与感染对照组相比, MSC^{TLR4+IFN- γ} 显著降低了 *i-Nos* 的表达 ($F=36.27, P < 0.05$),同时提高了 *Arg-1* ($F=25.34, P < 0.01$) 的表达水平。MSC 组则是提高了 *i-Nos* 的表达 ($F=36.27, P < 0.01$),对 *Arg-1* 表达的影响与未治疗对照组相比无统计学意义。

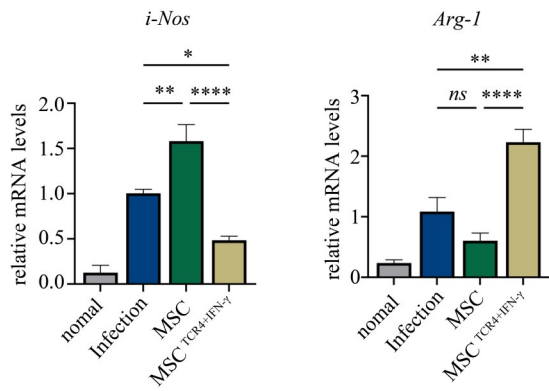
为了更直接观察 MSCs 对巨噬细胞极化的调节作用,我们采用小鼠肝脏组织切片免疫荧光染色,比较了各组间极化巨噬细胞在肉芽肿内的比率。如图 5 所示,感染对照组肉芽肿区域的 *i-Nos*⁺ 细胞占细胞总数的 3.89%, MSC 组为 3.39%, MSC^{TLR4+IFN- γ} 组肉芽肿区域相较于另外两组 *i-Nos*⁺ 的表达显著下降 ($F=5.395, P < 0.05$),仅有 0.90%;相对应的,感染对照组肉芽肿区域的 *F4/80*⁺*CD206*⁺ M2 型巨噬细胞占细胞总数的 7.06%, MSC 组 M2 型巨噬细胞有

12.0%, MSC^{TLR4+IFN- γ} 组肉芽肿区域的 M2 型巨噬细胞占比相比较另外两组显著增多 ($F=16.55$, Infection 组 $P < 0.001$, MSC 组 $P < 0.05$),有 17.6%。虽然 MSC 组也有降低 *i-Nos* 表达的趋势(差异无统计学意义),并促进 *CD206* 的表达 ($P < 0.05$),但不及预激活的 MSCs 效果显著。

综上所述,这些数据表明在患日本血吸虫病肝纤维化的小鼠中,仅 MSC^{TLR4+IFN- γ} 能抑制巨噬细胞 M1 极化并显著促进巨噬细胞 M2 极化,而未处理的 MSCs 效果不理想。

2.4 体外共培养验证预激活间充质干细胞抑制巨噬细胞向 M1 型极化并促进其向 M2 型极化

为了去除体内其他免疫细胞的影响,直接观测到 MSC^{TLR4+IFN- γ} 对巨噬细胞极化的调控作用,本研究建立了体外共培养模型。实验采用日本血吸虫感



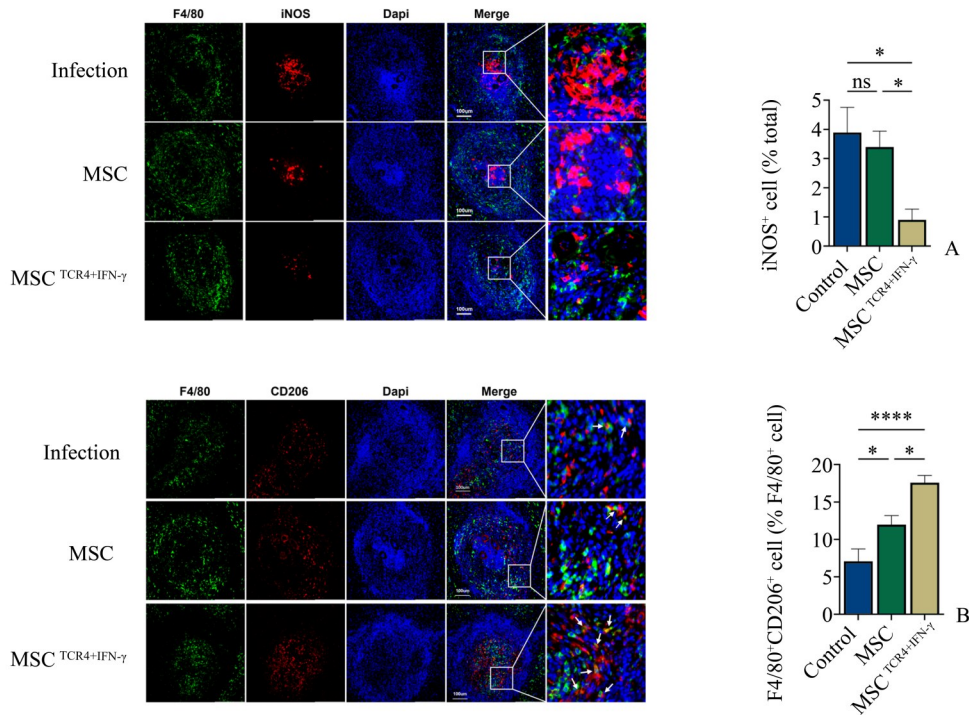
The RNA expression of *i-Nos* and *Arg1* in the mice liver issue of each group were assessed by RT-qPCR analysis. Results are expressed as mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA, $n=5$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$ and ns = not significant.

图4 MSC^{TLR4+IFN-γ}促进日本血吸虫感染小鼠肝巨噬细胞M2极化

Fig. 4 MSC^{TLR4+IFN-γ} promoted M2 phenotype polarization of liver macrophages in mice infected with *Schistosoma japonicum*

染6周的Balb/c小鼠骨髓源性巨噬细胞(BMDMs),分别单独培养(Infection组)、与未处理MSCs(MSC组)或预激活MSCs(MSC^{TLR4+IFN-γ}组)共培养,24h后去除MSCs,提取BMDMs的RNA,检测M1/M2型极化标志物及关键细胞因子的变化。如图6A可见,RT-qPCR结果显示,MSC^{TLR4+IFN-γ}共培养组巨噬细胞相比Infection组*i-Nos*表达则呈现显著性抑制($F=61.47, P < 0.0001$),而M2型标志物*Arg-1*在mRNA水平表达显著上调($F=94.01, P < 0.01$),值得注意的是,未处理MSC组虽可诱导*i-Nos*表达适度降低($F=61.47, P < 0.01$),并有上调*Arg-1*的表达的趋势,但效果不及MSC^{TLR4+IFN-γ}显著,两组之间有统计学差异($P < 0.01$),提示TLR4+IFN-γ预激活增强了MSCs的免疫调节效能。

RT-qPCR(图6A)和ELISA检测(图6B)进一步表明,相较于感染组,和MSC^{TLR4+IFN-γ}组共培养巨噬细胞分泌的*TNF-α*水平在RNA水平($F=20.63, P$



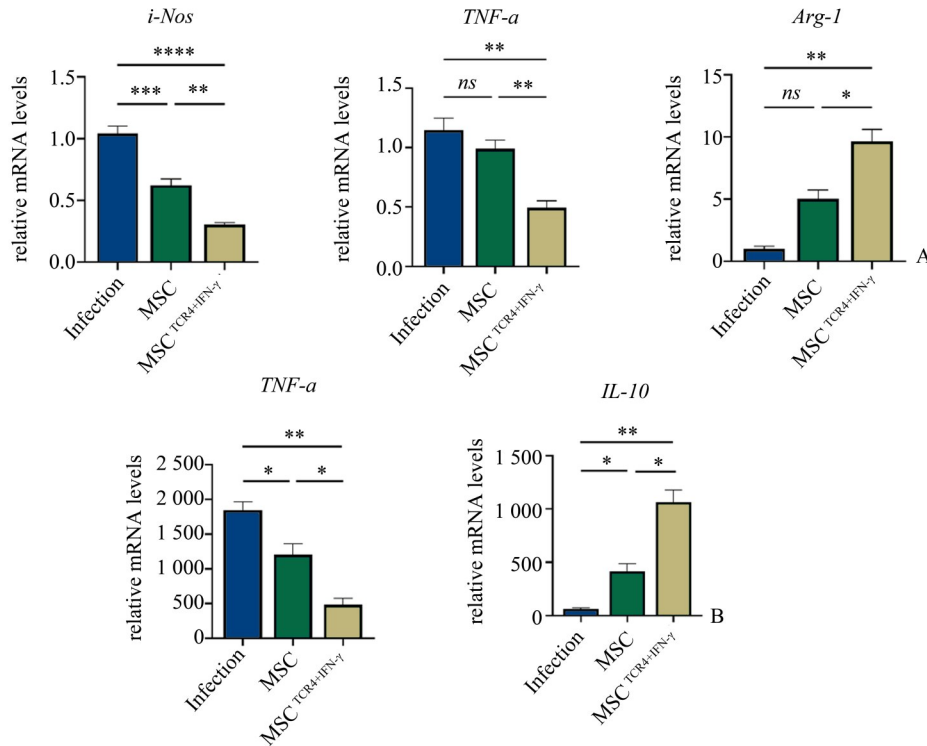
A: Immunofluorescence staining of DAPI (blue), *F4/80* (green) and *i-Nos* (red) was performed after paraffin section of liver tissue of mice in the infected group, the MSC-treated group, and the MSC^{TLR4+IFN-γ}-treated group. Scale bar=100 μm. B: Immunofluorescence staining of DAPI (blue), *F4/80* (green), and *CD206* (red) was performed after paraffin section of liver tissue of mice in the infected group, the MSC-treated group, and the MSC^{TLR4+IFN-γ}-treated group. Scale bar=100 μm. The software Image J was used to analyze the average fluorescence of the positive areas in the fluorescence map and conduct statistical analysis. Results were expressed as mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA, $n=5$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$ and ns = not significant.

图5 肝脏切片免疫荧光显示MSC^{TLR4+IFN-γ}促进了日本血吸虫感染小鼠肝脏中M2型巨噬细胞的极化

Fig. 5 Liver slice immunofluorescence showed that MSC^{TLR4+IFN-γ} promotes polarization of M2 macrophages in the liver of mice infected with *Schistosoma japonicum*

<0.01)及蛋白水平($P < 0.05$)表达均显著降低,同时抗炎因子*IL-10*的分泌量显著升高($P < 0.05$)。未处理的MSC组虽呈现相似的*TNF- α* 下降和*IL-10*上升趋势,但其调控幅度显著低于MSC^{TLR4+IFN- γ} 组($P < 0.05$),进一步验证MSC^{TLR4+IFN- γ} 共培养组表现出显著的促炎—抗炎平衡偏移。综上,本研究证实在体外

共培养体系中MSC^{TLR4+IFN- γ} 可以增强M2型巨噬细胞极化并协同抑制M1型极化,重塑巨噬细胞功能表型。而未激活MSCs效果不如MSC^{TLR4+IFN- γ} 显著,提示TLR4信号通路激活可显著增强MSCs的免疫调节特性。



Bone marrow macrophages from infected mice were cultured with MSC or TLR4+IFN- γ -activated MSC *in vitro*. A: The mRNA levels of *i-Nos*, *Arg-1* and *TNF- α* of BMDMs were analyzed by RT-qPCR. B: The content of *TNF- α* and *IL-10* in the supernatant of cell culture medium were further detected by ELISA. $n=3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ and ns = not significant.

图6 TLR4和IFN- γ 激活的MSCs在体外显著增强巨噬细胞的M2型反应并抑制其M1型反应

Fig. 6 TLR4 and IFN- γ -activated MSCs clearly enhanced M2 phenotype response of macrophages, and correspondingly inhibited their M1 phenotype response *in vitro*

3 讨论

本研究表明TLR4+IFN- γ 激活的MSCs可减轻血吸虫感染导致的肝纤维化。预激活MSCs组肝脏HSCs活化基因 α -SMA以及*Col I*、*Col III*水平显著降低;肝脏炎症因子*TNF- α* 、*IL-1 β* 和*TGF- β* 也降低,而ECM降解酶(*MMP2*、*MMP9*、*MMP13*)的水平显著升高。已有报道*MMP2*可通过降解基底膜胶原(IV型)和抑制HSCs活化缓解肝纤维化^[24],而*MMP13*可能通过裂解纤维化核心胶原(I型)促进纤维化消退^[25]。上述结果提示,激活MSCs可能通

过抑制炎症并促进过度沉积的胶原成分降解减轻纤维化。

目前已有报道指出MSCs及其衍生的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)可通过调节巨噬细胞极化在一系列肝损伤疾病发挥治疗作用^[26]: Mincheva等^[27]的研究表明MSCs的EVs可以缓解大鼠脂肪性肝病;Li Z-H等人的研究发现MSCs在急性-慢性肝衰竭模型小鼠中,通过促进M2巨噬细胞极化改善小鼠肝功能并提高小鼠48 h存活率^[28]。本研究在血吸虫感染纤维化模型,聚焦MSCs通过调节巨噬细胞极化的治疗作用机制。肝脏组织

RT-qPCR结果显示, MSC^{TLR4+IFN-γ}组治疗鼠肝组织同感染鼠相比表现为 *Arg-1* mRNA 表达显著升高, *i-Nos* 表达降低; 免疫荧光染色直接显示, MSC^{TLR4+IFN-γ}组小鼠肝组织 *i-Nos*⁺ 细胞比率较感染组显著降低, 而 *F4/80*⁺*CD206*⁺ 细胞比率升高; 体外共培养实验进一步表明, MSC^{TLR4+IFN-γ} 促进骨髓来源巨噬细胞 *Arg-1* 以及 *IL-10* 的表达, 并抑制促炎因子 *i-Nos* 和 *TNF-α* 的表达。因此, 激活 MSCs 可能通过促进巨噬细胞 M2 极化发挥治疗作用。

尽管有认为 M2 巨噬细胞可通过 *Arg-1* 催化精氨酸代谢促进胶原前体合成, 或通过分泌 *TGF-β* 激活 HSCs, 由此参与纤维化进程^[29]。但也有研究认为 M2 巨噬细胞可通过 *Arg-1* 与 Th2 细胞竞争精氨酸代谢, 限制过度 Th2 反应导致的免疫损伤^[30]。我们前期研究结果也证实了这一点^[21], 共激活 MSCs 与血吸虫感染鼠来源的淋巴细胞共培养可降低 IL-5 表达, 即抑制过度的 Th2 反应, 而过度的 Th2 反应是促进血吸虫纤维化发展的重要机制^[31]。此外, 我

们的研究也未发现激活 MSCs 可导致肝组织 *TGF-β* 升高。因此, 初步认为激活的 MSCs 可能通过促进 M2 极化抑制炎症, 并抑制过度的 Th2 反应影响纤维化进程。近来有研究还发现, MSCs 可诱导 Ly6C^{low} 修复型巨噬细胞在一些急性肝损伤纤维化模型发挥治疗作用, 修复型巨噬细胞在发挥抗炎作用的同时, 可分泌 *MMP* 改善纤维化^[32-33]。我们的研究也注意到诱导的 MSCs 在抑制炎症反应的同时, 显著促进 *MMP* 的表达, 提示诱导 MSCs 也可能通过促进过度沉积的基质降解改善纤维化。

综上, 我们的研究提示激活的 MSCs 可能通过诱导具有保护性免疫调节作用的抗炎促修复型巨噬细胞, 改善血吸虫病肝脏纤维化, 为 MSCs 在血吸虫病的治疗提供了新的依据。但本研究对预激活的 MSCs 调控巨噬细胞的具体机制尚未完全阐明, 后续本研究将聚焦 MSCs 和巨噬细胞的分子互作机制, 深入验证不同亚群巨噬细胞对疾病转归的影响。

参考文献

- [1] Mcmanus DP, Dunne DW, Sacko M, et al. Schistosomiasis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1): 13.
- [2] Lo NC, Bezerra FSM, Colley DG, et al. Review of 2022 WHO guidelines on the control and elimination of schistosomiasis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2022, 22(11): e327-e335.
- [3] 罗军涛, 钱胜南, 吴凯悦, 等. 探讨青蒿琥酯和扶正化痰方治疗血吸虫病肝纤维化对线粒体的影响 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2022, 30(1): 45-51.
Luo JT, Qian SN, Wu KY, et al. Exploring the effects of artesunate and fuzheng huayu decoction on mitochondria in the treatment of schistosomiasis liver fibrosis [J]. *Chin J Hepatol*, 2022, 30(1): 45-51.
- [4] Wang L, Liao Y, Yang R, et al. Sja-miR-71a in Schistosoma egg - derived extracellular vesicles suppresses liver fibrosis caused by schistosomiasis via targeting semaphorin 4D [J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1785738.
- [5] Wang L, Zhu Z, Liao Y, et al. Host liver-derived extracellular vesicles deliver miR-142a-3p induces neutrophil extracellular traps via targeting WASL to block the development of Schistosoma japonicum [J]. *Mol Ther*, 2022, 30(5): 2092-2107.
- [6] Colley DG, Secor WE. Immunology of human schistosomiasis [J]. *Parasite Immunol*, 2014, 36(8): 347-357.
- [7] Chen X, Yang X, Li Y, et al. Follicular helper T cells promote liver pathology in mice during Schistosoma japonicum infection [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(5): e1004097.
- [8] Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(5): 1090-1096.
- [9] Ma PF, Gao CC, Yi J, et al. Cytotherapy with M1-polarized macrophages ameliorates liver fibrosis by modulating immune microenvironment in mice [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(4): 770-779.
- [10] Mills CD, Ley K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity [J]. *J Innate Immun*, 2014, 6(6): 716-726.
- [11] Dixon LJ, Barnes M, Tang H, et al. Kupffer cells in the liver [J]. *Compr Physiol*, 2013, 3(2): 785-797.
- [12] Barron L, Wynn TA. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 300(5): G723-728.
- [13] Saldarriaga OA, Wanninger TG, Arroyave E, et al. Heterogeneity in intrahepatic macrophage populations and druggable target expression in patients with steatotic liver disease-related fibrosis [J]. *JHEP Rep*, 2024, 6(1): 100958.
- [14] Yadav P, Singh SK, Rajput S, et al. Therapeutic potential of stem cells in regeneration of liver in chronic liver diseases:

- Current perspectives and future challenges [J]. *Pharmacol Ther*, 2024, 253: 108563.
- [15] Tang Y, Wu P, Li L, et al. Mesenchymal stem cells and their small extracellular vesicles as crucial immunological efficacy for hepatic diseases[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 880523.
- [16] Yao L, Hu X, Dai K, et al. Mesenchymal stromal cells: promising treatment for liver cirrhosis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 308.
- [17] Yao Y, Xia Z, Cheng F, et al. Human placental mesenchymal stem cells ameliorate liver fibrosis in mice by upregulation of Caveolin1 in hepatic stellate cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 294.
- [18] Maqbool M, Algraittee SJR, Boroojerdi MH, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit the differentiation and effector functions of monocytes [J]. *Innate Immun*, 2020, 26(5): 424-434.
- [19] Zhou J, Feng X, Zhu J, et al. Mesenchymal stem cell treatment restores liver macrophages homeostasis to alleviate mouse acute liver injury revealed by single-cell analysis [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 179: 106229.
- [20] Liu C, Zhang YS, Chen F, et al. Immunopathology in schistosomiasis is regulated by TLR2, 4- and IFN- γ -activated MSC through modulating Th1/Th2 responses [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 217.
- [21] Yang H, Chen J, Li J. Isolation, culture, and delivery considerations for the use of mesenchymal stem cells in potential therapies for acute liver failure [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1243220.
- [22] Zhao J, Wang J, Dang J, et al. A preclinical study-systemic evaluation of safety on mesenchymal stem cells derived from human gingiva tissue [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 165.
- [23] Shen J, Zhao S, Peng M, et al. Macrophage-mediated trogocytosis contributes to destroying human schistosomes in a non-susceptible rodent host, *Microtus fortis* [J]. *Cell Discov*, 2023, 9(1): 101.
- [24] Pastor M, Zapico JM, Coderch C, et al. From a MMP2/CK2 multitarget approach to the identification of potent and selective MMP13 inhibitors [J]. *Org Biomol Chem*, 2019, 17(4): 916-929.
- [25] Luchian I, Goriuc A, Sandu D, et al. The Role of matrix metalloproteinases (MMP-8, MMP-9, MMP-13) in periodontal and peri-implant pathological processes [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3).
- [26] 杨柳,冯百岁. 间充质干细胞源性细胞外囊泡在肝脏疾病中的研究进展 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2023, 31(5): 556-560.
- Yang L, Feng BS. Research progress of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in liver diseases [J]. *Chin J Hepatol*, 2023, 31(5): 556-560.
- [27] Mincheva G, Moreno-Manzano V, Felipe V, et al. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells improve liver injury in rats with mild liver damage. Underlying mechanisms and role of TGF β [J]. *Life Sci*, 2025, 364: 123429.
- [28] Li Z-H, Chen J-F, Zhang J, et al. Mesenchymal stem cells promote polarization of M2 macrophages in mice with acute-on-chronic liver failure via Mertk/JAK1/STAT6 signaling [J]. *Stem Cells*, 2023, 41(12): 1171-1184.
- [29] Daemen S, Gainullina A, Kalugotla G, et al. Dynamic shifts in the composition of resident and recruited macrophages influence tissue remodeling in NASH [J]. *Cell Rep*, 2021, 34(2): 108626.
- [30] Wynn T, Barron L. Macrophages: Master regulators of inflammation and fibrosis [J]. *Seminars in Liver Disease*, 2010, 30(3): 245-257.
- [31] Burke ML, Jones MK, Gobert GN, et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis [J]. *Parasite Immunol*, 2009, 31(4): 163-176.
- [32] Graubardt N, Vugman M, Mouhadeb O, et al. Ly6C (hi) Monocytes and their macrophage descendants regulate neutrophil function and clearance in acetaminophen-induced liver injury [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 626.
- [33] Li YH, Shen S, Shao T, et al. Mesenchymal stem cells attenuate liver fibrosis by targeting Ly6C (hi/lo) macrophages through activating the cytokine-paracrine and apoptotic pathways [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 239.

(编辑 孙慧兰)