

·基础研究·

丁香酚增强MSCs对肝星状细胞炎性活化的抑制作用

吴逐宇¹, 汪显耀¹, 陈艳², 何志旭³

(1. 遵义医科大学免疫学教研室, 贵州 遵义 563099; 2. 贵州省儿童医院 // 遵义医科大学附属医院小儿内科, 贵州 遵义 563099; 3. 遵义医科大学 // 教育部组织损伤与再生医学协同创新中心, 贵州 遵义 563099)

摘要:【目的】研究丁香酚对人脐带间充质干细胞(HUC-MSCs)抑制肝星状细胞(HSCs)炎性活化以及巨噬细胞促炎表型作用的影响及其相关机制;【方法】体外培养并鉴定HUC-MSCs,并采用MTT法评估丁香酚对HUC-MSCs的毒性作用;体外划痕实验探究丁香酚对HUC-MSCs迁移能力的影响;丁香酚处理HUC-MSCs后的旁分泌产物(EU-MSCs-CM)、HUC-MSCs旁分泌产物(MSCs-CM)处理经TGF- β_1 处理活化的LX-2细胞, WB实验检测LX-2的 α -SMA、COL1A1、Smad2/3、p-Smad2/3表达的变化。EU-MSCs-CM、MSCs-CM处理经脂多糖(LPS)诱导的THP-1巨噬细胞, 流式细胞术检测THP-1巨噬细胞表面标志物CD11b、CD86、CD206的表达情况, qPCR检测THP-1巨噬细胞促炎基因TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达情况。【结果】MTT法结果显示在0、7.5、15 μ g/mL浓度处理细胞24 h、48 h后, 细胞活力保持在90%以上;体外划痕显示, 丁香酚处理可以增强HUC-MSCs迁移能力。WB结果显示, 与MSCs-CM处理相比, EU-MSCs-CM处理对活化状态的HSCs的 α -SMA、COL1A1、Smad2/3、p-Smad2/3表达抑制作用更加显著。流式细胞术实验结果显示, 与MSCs-CM处理, EU-MSCs-CM处理对THP-1巨噬细胞M1型极化标志物CD86的抑制作用更加显著; qPCR实验结果显示, 与MSCs-CM处理, EU-MSCs-CM处理更加显著的抑制THP-1巨噬细胞促炎基因TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达。【结论】丁香酚增强了HUC-MSCs对HSCs炎性活化抑制作用, 可能是通过调节TGF- β_1 /Smads信号通路抑制HSCs的活化; 丁香酚增强了HUC-MSCs对巨噬细胞促炎表型的抑制作用; 促炎表型巨噬细胞可以促进HSCs炎性活化。

关键词:人脐带间充质干细胞; 肝纤维化; 肝星状细胞; 巨噬细胞; 条件培养基

中图分类号: R392.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2023)05-0784-08

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0509

Experimental Study on the Inhibitory Effect of Eugenol on Inflammatory Activation of Hepatic Stellate Cells by MSCs

WU Zhu-yu¹, WANG Xian-yao¹, CHEN Yan², HE Zhi-xu³

(1. Department of Immunology, Zunyi Medical University, Zunyi 563099, Guizhou, 2. Department of Pediatric Medicine, Guizhou Children's Hospital // Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563099, China; 3. Collaborative Innovation Center of Tissue Injury and Regenerative Medicine, co-sponsored by the Chinese Ministry of Education // Zunyi Medical University, Zunyi 563099, China)

Correspondence to: HE Zhi-xu; E-mail: hzx@gmc.edu.cn

Abstract:【Objective】This study aimed to investigate the effects of eugenol on inhibiting the inflammatory activation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUC-MSCs) and the pro-inflammatory phenotype of hepatic stellate cells (HSCs) in liver fibrosis, and to explore their underlying mechanisms.【Methods】HUC-MSCs were cultured and identified in vitro, and the toxicity of eugenol to HUC-MSCs was evaluated by MTT method. The effect of eugenol on the migra-

收稿日期: 2023-03-17

基金项目: 省部共建协同创新中心项目(教科厅函[2020]39)

作者简介: 吴逐宇, 第一作者, E-mail: 1216691992@qq.com; 何志旭, 通信作者, 教授, 博士生导师, 研究方向: 干细胞研究, E-mail: hzx@gmc.edu.cn

tion ability of HUC-MSCs was investigated by in vitro scratch test. The expression of α -SMA, COL1A1, Smad2/3 and p-Smad2/3 of LX-2 cells activated by TGF- β 1 treated with EU-MSCs-CM and MSCs-CM were detected by WB assay. EU-MSCs-CM and MSCs-CM treated THP-1 macrophages stimulated with Lipopolysaccharide (LPS) were analyzed for the expression of surface markers CD11b, CD86, and CD206 by flow cytometry. Additionally, the expression of pro-inflammatory genes TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in THP-1 macrophages was detected by qPCR.【Results】The results of MTT method showed that the viability of the cells remained above 90% after 24 h and 48 h treatment at 0, 7.5, 15 μ g/mL. In vitro scratches showed that eugenol treatment enhanced HUC-MSCs migration. WB results showed that compared with MSCs-CM treatment, EU-MSCs-CM treatment significantly inhibited the expression of α -SMA, COL1A1, Smad2/3, and p-Smad2/3 of activated HSCs. Flow cytometry showed that compared with MSCs-CM treatment, EU-MSCs-CM treatment had a more significant inhibitory effect on CD86, a M1-type polarization marker in THP-1 macrophages. The results of qPCR experiment showed that compared with MSCs-CM treatment, EU-MSCs-CM treatment more significantly inhibited the expressions of TNF- α , IL-1 β and IL-6 of THP-1 macrophage proinflammatory genes.【Conclusions】Eugenol enhances the inhibitory effect of HUC-MSCs on inflammatory activation of HSCs, possibly by regulating TGF- β 1/Smads signaling pathway. It also enhances the inhibitory effect of HUC-MSCs on the pro-inflammatory phenotype of macrophages. Pro-inflammatory macrophages can promote inflammatory activation of HSCs.

Key words: human umbilical cord mesenchymal stem cells; liver fibrosis; hepatic stellate cells; macrophage; conditioned medium

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(5): 784-791]

肝纤维化是由各种致病因素(如酒精、病毒、自身免疫性疾病等)造成的慢性肝脏损伤演变而来^[1],流行病学数据显示,全球每年有超过100万人死于肝纤维化相关疾病^[2]。HSCs活化过度产生细胞外基质是肝纤维化的主要特征性事件^[3],转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)具有很强的促纤维化活性,可以刺激静止状态HSCs活化,分泌大量一型胶原蛋白(COL1A1, Type 1 collagen)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)等细胞外基质^[4]。在肝损伤时,活化的HSCs分泌TGF- β 1,通过Smad2/Smad3形成正反馈环路促进纤维化形成,而Smad7则是该途径的抑制因子^[5-7]。当肝脏发生炎症时,活化的肝脏内的巨噬细胞(Kupffer cells, KCs)通过释放各种细胞因子如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等,诱导静止状态HSCs活化^[8-9],M1型巨噬细胞在肝纤维化进展期发挥促炎和促纤维化的作用;而M2型巨噬细胞可以在肝纤维化恢复期发挥抗炎和抗纤维化作用^[10]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有自我更新能力、趋化迁移特性和跨胚层分化潜能等特性,是组织工程的理想种子细胞^[11]。MSCs通过旁分泌产生多种细胞因子,这些旁分泌因子具有调节免疫反应、促进血管生成、促进组织修复和再生等作用^[12],通常将这种含有大量细胞因子及生长因子的培养基称为条件培养基(conditioned medium,

CM)^[13]。新近报道显示,在暴发性肝衰竭大鼠模型中, MSCs-CM对肝细胞死亡有直接抑制作用,对肝细胞再生有促进作用^[14]。有学者发现肝纤维化小鼠注射MSCs-CM可以抑制肝细胞凋亡、促进其再生,抑制中性粒细胞浸润和KCS激活^[15]。值得注意的是,通过不同方法(包括药物处理、促炎细胞因子刺激、缺氧处理等)处理MSCs可以调节其生物学功能(比如:自我更新、迁移和分化潜能等)^[16-17]。丁香酚是一种具有广泛药理作用的化合物,在过去的十年中受到了广泛的关注,具有抗氧化、抗炎、免疫调节等作用^[18-19]。有研究发现用丁香酚处理小鼠骨髓MSCs,通过上调Sox2、Rex1和Tex10来增强MSCs增殖以及自我更新能力^[20]。作为前人研究成果的延伸,本研究旨在探究丁香酚对HUC-MSCs抑制肝纤维化进展的关键因素(HSCs炎性活化)作用的影响。

1 材料与方法

1.1 HUC-MSCs的分离培养及鉴定。

脐带组织取自遵义医科大学附属医院产科,健康足月新生儿,经过产妇知情同意,产妇乙型肝炎、丙型肝炎、艾滋、梅毒等检查均为阴性;采集好标本后,将其放入含2%双抗的DMEM培养基中,低温运送至细胞间无菌超净台进行后续分离培养。在

超净台中用无菌PBS清洗脐带并去除两根脐静脉和一根脐动脉,分离出脐带中的华通氏胶组织并剪碎,铺于T75细胞培养瓶中,加入90% DMEM低糖培养基(Gibco, USA)、10% FBS(USA, New Zealand)和1%双抗(Gibco, USA),在37℃,体积分数5% CO₂湿度培养箱中培养,定期更换培养基。培养7 d可见HUC-MSCs逐渐从组织块中爬出,到80%~85%融合度时,用胰蛋白酶消化,传代至第四代,然后将细胞制备为细胞悬液以待使用。通过流式细胞术鉴定HUC-MSCs,鉴定HUC-MSCs表面的MSCs标志物(CD73、CD90、CD105)和造血标志物(CD34、CD45、CD19、CD11b、HLA-DR)。

1.2 MTT检测细胞活力

为了评估丁香酚对HUC-MSCs的细胞活力的影响,将HUC-MSCs铺在96孔板(5×10^3 cells/well)中,12 h后,用不同浓度(0、7.5、15、30、60、120、240 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的丁香酚处理HUC-MSCs,24 h和48 h后,小心吸去上清,加入90 μL 新鲜培养液,再加入10 μL MTT(Solarbio, China)溶液,继续培养4 h;然后吸掉上清,每孔加入110 μL Formazan溶解液,置摇床上低速震荡10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪490 nm处测量各孔的吸光值。

1.3 体外划痕实验

为了评估丁香酚对HUC-MSCs迁移能力的影响,将 2×10^5 cells/well HUC-MSCs接种在六孔板中,12 h后,当HUC-MSCs贴壁后,使用200 μL 枪头尖端从细胞单层中心垂直划痕,然后用PBS清洗以去除刮下的细胞。用含10% FBS的DMEM 2 mL,丁香酚15 $\mu\text{g}/\text{mL}$,37℃,体积分数5% CO₂,处理细胞24 h;通过倒置显微镜观察HUC-MSCs从划痕边缘迁移到中央区域并拍照,在Image J软件中进行分析,来评估细胞的迁移能力。

1.4 条件培养基的制备

将HUC-MSCs铺在6孔板中加入完全培养基,待到细胞融合度70%时加入15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丁香酚处理细胞24 h,然后将完全培养基换成DMEM基础培养基继续培养细胞24 h,然后吸取上清,在4℃、1 000 $\times g$ 下离心10 min,吸取上清即为Eu-MSCs-CM,在-80℃保存,以备后续使用。对照组不丁香酚处理HUC-MSCs,其余操作步骤一致。

1.5 Western Blotting实验

将收集到的细胞,通过添加1:100蛋白酶抑制剂(Solarbio, China)的RIPA裂解液(强)(Solarbio, China)裂解细胞。采用BCA蛋白检测试剂盒(So-

larbio, China)进行蛋白定量。样品通过SDS-PAGE凝胶分离,转移到PVDF膜(Millipore)上。用5%脱脂牛奶封闭膜2 h,4℃下用一抗:anti-COL1A1(1:2 000, ab138492, abcam)、anti- α -SMA(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ab5694, abcam)、anti-Smad2/3(1:1 000, ab202445, abcam)、anti-p-Smad2/3(1:1 000, ab254407, abcam)、GAPDH(1:2 000, GB11002, Servicebio)孵育过夜。清洗3次后,用酶标兔二抗在室温下孵育2 h。使用Immobilon Western HRP(GeneBank; USA)曝光;并用Image J软件中进行分析。

1.6 流式细胞术分析

收集THP-1细胞,PBS重悬。加入流式细胞抗体CD86(invitrogen, 2400629, USA)、CD11b(invitrogen, 2414642, USA)和CD206(invitrogen, 2344972, USA),在室温下黑暗孵育30 min,然后用PBS清洗。最后用流式细胞仪检测。

1.7 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

向THP-1巨噬细胞中加入1 mL TRNzol(Takara, Japan)提取总RNA,然后用RT Master Mix将提取的RNA反向转化为cDNA进行qPCR(Takara, Japan)。Real-time PCR采用Applied Biosystems Viia6 Real-time PCR系统,采用SYBR Green qPCR Master Mix(Takara, Japan)。PCR引物序列:TNF- α : FORWARD: AGC TGG TGG TGC CAT CAG AGG, REVERSE: TGG TAG GAG ACG GCG ATG CG; IL-1 β : FORWARD: TGG CTT ATT ACA GTG GCA ATG AGG ATG, REVERSE: TGT AGT GGT GGT CGG AGA TTC GTA; IL-6: FORWARD: GGT GTT GCC TGC TGC CTT CCG, REVERSE: GTT CTG AAG AGG TGA GTG GCT GTC。

1.8 统计学分析

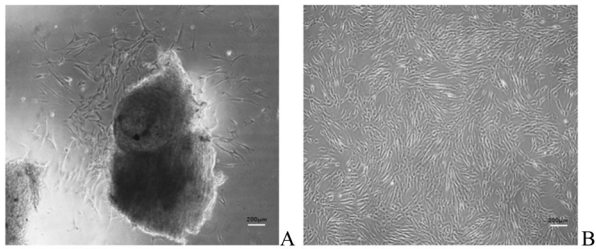
数据数值均采用均数 \pm 标准差表示。数据处理两样本间比较采用 t 检验。多组数据比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),多组数据比较差异有统计学意义后,对于不同浓度处理组检测结果和对照组比较采用Dunnett's t 检验;所有数据均采用Graphpad Prism version 8.20软件统计。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 体外培养HUC-MSCs

从遵义医科大学附属医院产科取回脐带标本,

去除一根脐静脉和两根脐动脉后剥离出脐带中的华通氏胶组织并剪碎,组织贴壁法培养7 d左右在低倍镜下可观察到细胞与组织块分离,贴壁细胞形成为多边形、短纤维状或梭形,也有圆形细胞(图1),培养两至三周细胞融合度达到80%,可见成纤维状细胞集落生长。



A: On the seventh day, HCU-MSCs climbed out of Umbilical cord tissue of Waldorf's glue; B: Morphology of human umbilical cord mesenchymal stem cells in P3 generation. *n*=3 in every group. Bar=200 μm

图1 倒置显微镜下HUC-MSCs的形态

Fig. 1 Morphology of HUC-MSCs under an inverted microscope

2.2 HUC-MSCs的鉴定

收集对数生长期P4代HUC-MSCs,通过流式细胞术检测其表面标志物CD73、CD90、CD105、CD34、CD45、CD19、CD11b、HLA-DR的表达,流式分析结果显示:MSCs表面标志物CD73、CD90、CD105阳性率均接近100%,而造血细胞标志物CD34、CD45、CD19、CD11b和HLA-DR几乎不表达(图2),符合MSCs基本生物学特征。

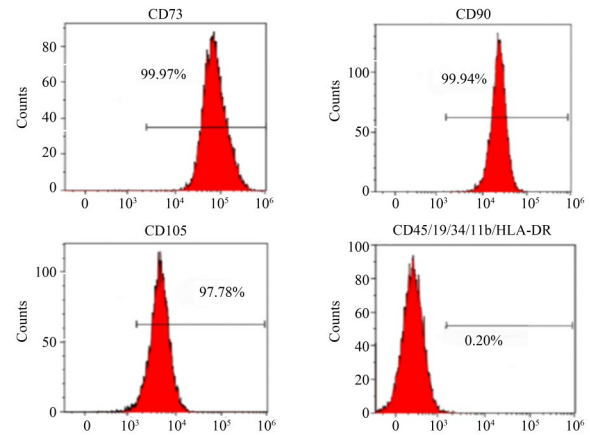
2.3 丁香酚对HUC-MSCs细胞活性的影响

为了评估丁香酚处理对HUC-MSCs的细胞活力的影响,我们采用0、7.5、15、30、60、120和240 μg/mL的丁香酚分别处理HUC-MSCs 24 h和48 h后,用MTT法检测各组吸光度,计算HUC-MSCs的细胞活力[计算公式:细胞活力(%)=(每组平均吸光度值/对照组平均吸光度值)×100]。结果显示:0、7.5、15、30 μg/mL浓度丁香酚处理HUC-MSCs,细胞活力在90%以上(图3),因此,后续实验选取15 μg/mL丁香酚处理HUC-MSCs进行实验。

2.4 丁香酚处理增强了HUC-MSCs的细胞迁移能力

我们采用体外划痕实验探究了丁香酚对HUC-MSCs的迁移能力影响,倒置显微镜拍照,Image J软件分析不同处理前后划痕面积的改变。结果显示:未用丁香酚处理组(MSCs组)的细胞迁移

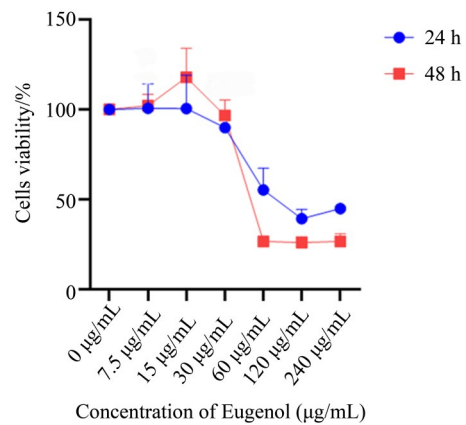
率为(42±2.8)%(图4A),而用15 μg/mL丁香酚处理组(Eu-MSCs组)的细胞迁移率为(83±1.6)%(图4B)(MSCs组 VS Eu-MSCs组 *t*=7.018 *P*=0.0024)。结果表明,丁香酚处理可以增强HUC-MSCs的细胞迁移能力。



The surface markers of CD73, CD90, CD105, CD34, CD45, CD19, CD11b and HLA-DR of HUC-MSCs were detected by flow cytometry. One representative data from three independent experiments is presented. *n*=3 in every group.

图2 HUC-MSCs的鉴定

Fig. 2 Identification of HUC-MSCs



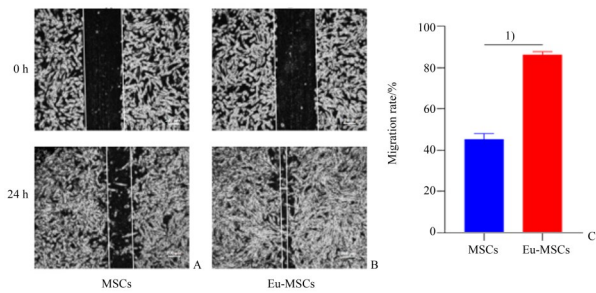
The cell viability of HUC-MSCs treated with eugenol at 0, 7.5, 15, 30, 60, 120, 240 μg/mL for 24 h and 48 h was detected by MTT assay. *n*=3 in every group.

图3 丁香酚对HUC-MSCs细胞活力的影响

Fig. 3 Effect of eugenol on the viability of HUC-MSCs cells

2.5 TGF-β₁诱导LX-2细胞活化

在本研究中,我们用10 ng/mL TGF-β₁处理LX-2细胞24 h使其活化,倒置相差显微镜观察显示:未经TGF-β₁处理组【TGF-β₁(-)】的LX-2细胞



A: HUC-MSCs without eugenol treatment; B: Eugenol treatment of HUC-MSCs; C: the statistical graph of the analysis results. One representative data from three independent experiments is given, and ¹⁾ $p < 0.001$ indicates statistical significance compared with the control group. $n=3$ in every group.

图4 HUC-MSCs的体外划痕实验

Fig. 4 In vitro scratch experiment of HUC-MSCs

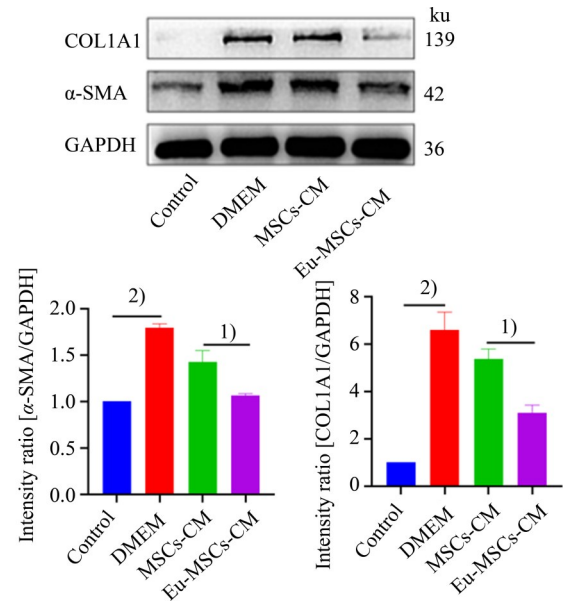
呈多角形或短梭形; TGF- β_1 处理 24h 组 [TGF- β_1 (+)], LX-2 细胞呈纺锤形或梭形, 细胞形态向成纤维细胞样细胞转变 (附图 1A); 收集细胞提取总蛋白, WB 实验检测 LX-2 细胞 α -SMA、COL₁A₁ 的表达情况, 结果显示: TGF- β_1 处理后 α -SMA、COL₁A₁ 表达显著上调 (α -SMA $t=5.705$ $P=0.0047$, COL₁A₁ $t=6.73$ $P=0.025$); 根据 LX-2 细胞形态与 WB 结果, 表明 LX-2 细胞被 TGF- β_1 活化。

2.6 丁香酚预处理增强了 HUC-MSCs 对 HSCs 细胞活化的抑制作用

为了探究 Eu-MSCs-CM、MSCs-CM 对 HSCs 活化的影响, 我们用 10 ng/mL TGF- β_1 处理 LX-2 肝星状细胞 24 h 使其活化, 再用 Eu-MSCs-CM、MSCs-CM 分别处理 LX-2 细胞 24 h, WB 检测 LX-2 细胞中与其活化相关的蛋白 α -SMA、COL₁A₁ 的表达情况 (图 5)。结果显示: 各组间 α -SMA、COL₁A₁ 经方差分析, 差异具有统计学意义 ($F=32.64$, $P < 0.0001$; $F=28.87$, $P=0.0001$)。与 Control 组相比, DMEM 组 α -SMA、COL₁A₁ 表达显著升高 (α -SMA $P=0.0001$, COL₁A₁ $P=0.0001$); 与 MSCs-CM 处理组相比, Eu-MSCs-CM 处理组可以更加显著降低活化的 LX-2 细胞 α -SMA、COL₁A₁ 的表达 (α -SMA $P=0.0169$, COL₁A₁ $P=0.0338$), 说明丁香酚处理增强了 HUC-MSCs 对 HSCs 细胞活化的抑制作用。

2.7 Eu-MSCs-CM 对 HSCs 的 TGF- β_1 /Smads 信号通路具有更强的抑制作用

TGF- β_1 在 HSCs 活化过程中起着至关重要的作用, Smads 蛋白家族是其下游因子, 它们的异常表达是促进 HSCs 活化的重要因素。为进一步探究



The expression of α -SMA and COL1A1 in TGF- β_1 -induced activated LX-2 cells treated with EU-MSCs-CM was detected by WB and the statistical graph of the analysis results. One representative data from three independent experiments is shown. ²⁾ $p < 0.001$ indicated that the DMEM group was compared with the Control group, and ¹⁾ $p < 0.05$ indicated that the MSCs-CM group was compared with the Eu-MSCs-CM group. $n=3$ in every group.

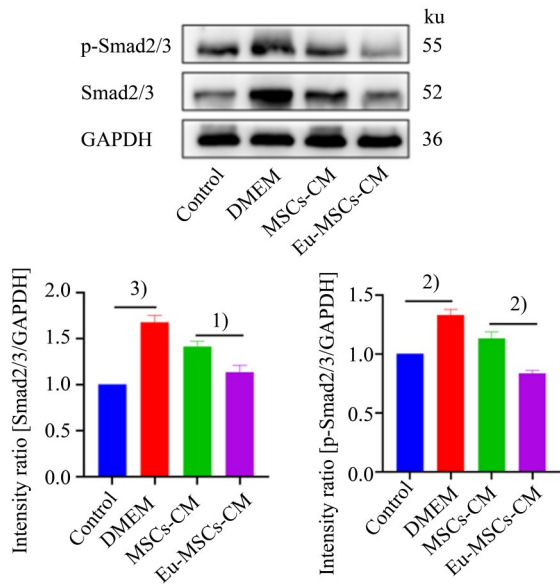
图5 丁香酚处理增强了 HUC-MSCs 对 HSCs 细胞活化的抑制作用

Fig. 5 Eugenol treatment enhanced the inhibitory effect of HUC-MSCs on HSCs cell activation

丁香酚处理增强 HUC-MSCs 对 HSCs 活化抑制作用与 TGF- β_1 /Smads 信号通路的关系, 我们分别用 Eu-MSCs-CM、MSCs-CM 处理经 TGF- β_1 诱导活化的 LX-2 细胞, 检测 LX-2 中的 Smad2/3、p-Smad2/3 蛋白表达水平。WB 结果显示各组间 Smad2/3、p-Smad2/3 经方差分析, 差异具有统计学意义 ($F=24.57$, $P=0.0002$; $F=29.56$, $P=0.0001$)。与 Control 组相比, DMEM 组 Smad2/3、p-Smad2/3 表达显著升高 (Smad2/3 $P=0.0002$, p-Smad2/3 $P=0.0013$); 与 MSCs-CM 处理组相比, Eu-MSCs-CM 处理组可以更加显著降低活化的 LX-2 细胞 Smad2/3、p-Smad2/3 的表达 (Smad2/3 $P=0.0492$, p-Smad2/3 $P=0.0027$; 图 6)。

2.8 PMA 诱导 THP-1 细胞分化为巨噬细胞

我们采用了 PMA 诱导 THP-1 单核细胞分化形成 THP-1 巨噬细胞, 作为探讨巨噬细胞极化的体外细胞模型。THP-1 单核细胞在未接受 PMA 处理时, 为悬浮状态生长, 呈现圆形 (附图 2A); 在加入



The expression levels and results of Smad2/3 and p-Smad2/3 in LX-2 cells were detected by WB and the statistical graph of the analysis results. One representative data from three independent experiments is shown. ²⁾ $p < 0.01$ ³⁾ $p < 0.001$ means the comparison between DMEM group and Control group, and ¹⁾ $p < 0.05$ ²⁾ $p < 0.01$ means the comparison between MSCs-CM group and Eu-MSCs-CM group is statistically significant. $n=3$ in every group.

图6 Eu-MSCs-CM对HSCs的TGF-β1/Smads信号通路具有更强的抑制作用

Fig. 6 Eu-MSCs-CM showed a stronger inhibitory effect on TGF-β1/Smads signaling pathway in HSCs

75 ng/mL PMA 处理后,细胞胞体逐渐变大,表面出现伪足,由悬浮状态逐渐变为贴壁生长,处理 72 h 后几乎完全贴壁(附图 2B)。收集贴壁细胞,通过流式细胞术检测细胞表面标志物 CD11b、CD86、CD206 的表达情况(附图 2C),结果显示 CD11b 的表达率接近 100%,CD86、CD206 几乎不表达。细胞形态与流式鉴定,该贴壁细胞符合 M0 型巨噬细胞。

2.9 丁香酚处理增强了 HUC-MSCs 对巨噬细胞 M1 型极化的抑制作用

在肝纤维化过程中,巨噬细胞可以释放促炎细胞因子等活化 HSCs,导致肝纤维化的发生与发展。巨噬细胞具有高度可塑性,环境变化时可以在 M1 (促炎)和 M2 型(抗炎)之间转化。在本研究中,为了评估 EU-MSCs-CM 是否可以逆转巨噬细胞的促炎 M1 型极化,首先用 75 ng/mL PMA 处理 THP-1 单核细胞 72 h,使其分化为巨噬细胞,然后用 100 ng/mL LPS 处理 THP-1 巨噬细胞 48 h,最后再用 EU-MSCs-CM、MSCs-CM 分别处理 THP-1 巨噬细胞 24

h 后,收集细胞悬液,通过流式细胞术检测 THP-1 巨噬细胞表面的巨噬细胞标志物 CD11b、M1 型极化标志物 CD86、M2 型极化标志物 CD206(附图 3A)。结果显示:各组间 CD86、CD206 经方差分析,差异具有统计学意义($F=10.7, P=0.0035; F=31.41, P=0.0001$);与 Control 组相比,DMEM 组 CD86 表达显著升高($P=0.0029$);与 MSCs-CM 处理组相比,EU-MSCs-CM 处理组相比 CD86 表达显著下降($P=0.0249$),CD206 表达显著升高($P=0.0069$)。表明丁香酚处理增强了 HUC-MSCs 对巨噬细胞 M1 极化的抑制作用。

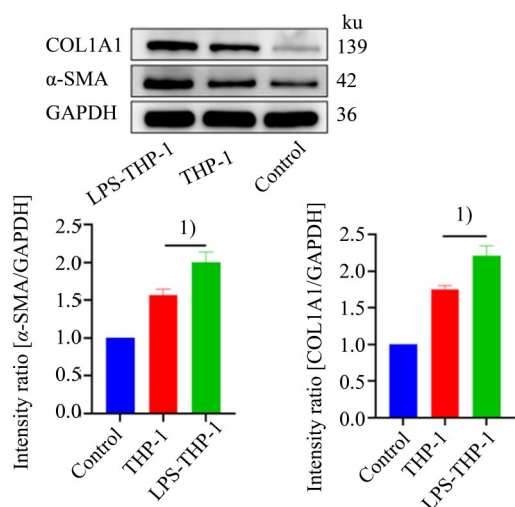
同时通过 qRT-PCR 实验检测不同处理组 THP-1 巨噬细胞促炎基因 TNF-α、IL-1β、IL-6 的表达情况(附图 3B),结果显示:各组间 TNF-α、IL-1β、IL-6 经方差分析,差异具有统计学意义($F=49.14, P=0.0001; F=33.75, P<0.0001; F=44.53, P<0.0001$);与 Control 组相比,DMEM 组 TNF-α、IL-1β、IL-6 表达显著升高(TNF-α $P=0.0001$, IL-1β $P=0.0006$, IL-6 $P=0.0004$);与 MSCs-CM 处理组相比,EU-MSCs-CM 处理组 TNF-α、IL-1β、IL-6 表达显著降低(TNF-α $P=0.0137$, IL-1β $P=0.0015$, IL-6 $P=0.0155$)。

2.10 促炎型 THP-1 巨噬细胞可以促进 LX-2 肝星状细胞活化

HSCs 与巨噬细胞之间的相互作用共同决定着肝纤维化的进展。为了探究 THP-1 巨噬细胞是否对 LX-2 细胞活化产生影响,我们将 LPS 处理诱导为促炎表型的 THP-1 巨噬细胞和 LX-2 细胞进行共培养,WB 检测 LX-2 细胞的 α-SMA、COL₁A₁ 蛋白的表达情况(图 7)。结果显示:各组间 α-SMA、COL₁A₁ 经方差分析,差异具有统计学意义($F=31.40, P=0.0007; F=49.95, P=0.0002$);无论是经或者不经 LPS 处理的 THP-1 巨噬细胞与 LX-2 细胞共培养,都会促进其 α-SMA、COL₁A₁ 蛋白的表达;但是与经过 LPS 处理的 THP-1 巨噬细胞共培养,能更加显著的增强 LX-2 细胞的 α-SMA、COL₁A₁ 蛋白的表达(α-SMA $P=0.0317$, COL₁A₁ $P=0.0224$),表明其具有更强的活化 LX-2 细胞的作用。

3 讨论

近年来,在以细胞疗法为基础的研究中,MSCs 因其巨大的应用潜力而受到广泛关注。研究表明,



WB detection of α -SMA and COL1A1 protein expression in LX-2 cells and the statistical graph of the analysis results. A representative data from three independent experiments is presented. ¹⁾ $p < 0.05$ indicated that the MSCs-CM group was statistically significant compared with the Eu-MSCs-CM group. $n=3$ in every group.

图7 促炎型巨噬细胞可以促进LX-2肝星状细胞活化
Fig. 7 Proinflammatory macrophages can promote LX-2 hepatic stellate cell activation

MSCs 可以有助于组织修复^[21], 缓解局灶性脑缺血^[22] 以及有助于肝纤维化治疗^[23] 等。在体外条件下, 培养条件(如培养基、添加剂, 环境因素等)的改变对 MSCs 的增殖、迁移等生物学功能有着至关重要的影响, 因此探索改造 MSCs 生物学功能以增强其疾病治疗潜力的方法备受关注; Mortezaee 等^[24] 报道了, 褪黑素处理可以增强骨髓来源 MSCs 对 CCL4 诱导的小鼠肝纤维化的治疗作用。Sisakhtnezhad 等^[20] 报道用丁香酚处理小鼠骨髓来源的 MSCs 可以增强其更新、迁移等生物学功能。但是, 目前尚未有关于丁香酚处理 HUC-MSCs 治疗肝纤维化的报道。本研究中, 我们通过 MTT 实验评估丁香酚对 HUC-MSCs 的毒力作用, 通过体外划痕实验发现丁香酚可以增强 HUC-MSCs 的迁移能力。我们用 TGF- β_1 处理 LX-2 细胞使其活化, 通过 WB 结果显示: 与 MSCs-CM 处理组相比, Eu-MSCs-CM 处理组更加显著地抑制 LX-2 细胞的 α -SMA、COL₁A₁、Smad2/3、p-Smad2/3 的表达, 表明丁香酚增强了 HUC-MSCs 对 LX-2 细胞的炎性抑制作用, 可能是通过 TGF- β_1 /Smads 信号通路调节。

肝巨噬细胞在肝纤维化发展过程中起着关键的作用, 肝脏巨噬细胞的两种最典型的表型是 M1

和 M2 表型, 分别介导肝脏炎症和组织重塑。M1 巨噬细胞表现为促炎, 分泌 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、CCL2 等促炎因子, 相反, M2 巨噬细胞表现为抗炎, 分泌 Arg-1、IL-10 等抗炎因子, 因此, 调节肝巨噬细胞的 M1 或 M2 极化可以有利于肝纤维化的治疗。Yang 等^[25] 报道了脯氨酸-丝氨酸-苏氨酸-磷酸酶相互作用蛋白-2 以 STAT-STAT6 依赖的方式刺激 M2 巨噬细胞极化, 从而改善 CCL4 诱导的小鼠肝纤维化模型中的肝脏炎症和肝纤维化。He 等^[26] 报道了颌骨膜来源的 MSCs 能有效抑制巨噬细胞的 M1 型极化。Jin 等^[27] 报道了 IL-4 可以增强骨髓来源的 MSCs 对 LPS 诱导活化的巨噬细胞的炎性抑制作用。本研究中, 我们用 PMA 处理 THP-1 单核细胞使其分化为 M0 型 THP-1 巨噬细胞, 用 LPS 诱导 THP-1 巨噬细胞使其表现为促炎型的 M1 表型, 通过流式细胞术分析细胞表面标志物 CD11b、CD86、CD206 的表达水平, 结果显示: 与 MSCs-CM 处理组相比, Eu-MSCs-CM 处理组对 THP-1 巨噬细胞的 CD86 表型更具抑制作用; qPCR 实验检测细胞促炎基因 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达, 结果显示: 与 MSCs-CM 处理组, Eu-MSCs-CM 处理组更加显著的抑制 THP-1 巨噬细胞促炎基因 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达。上述结果表明: 丁香酚增强了 HUC-MSCs 对巨噬细胞的抗炎作用。

HSCs 与巨噬细胞之间的相互作用共同决定着肝纤维化的进展, Pradere 等^[28] 报道了肝巨噬细胞以核因子 κ B (NF- κ B) 依赖的方式增强 HSCs 的存活, 从而促进肝纤维化。在另一项研究中, Marra 等^[29] 报道了活化的 HSCs 通过产生趋化因子(如 CCL2) 招募单核细胞/巨噬细胞, 招募的单核/巨噬细胞又进一步激活 HSCs, 促进肝纤维化。Duffield 等^[30] 报道了, 在 CCL4 小鼠肝纤维化模型中, 巨噬细胞在纤维化的进展和消退中起着负向调控的作用。在本研究中, 我们用 LPS 处理 THP-1 巨噬细胞并与 LX-2 细胞共培养。WB 实验检测 LX-2 细胞的 α -SMA、COL₁A₁ 表达情况, 结果显示: LPS 处理 THP-1 巨噬细胞共培养组的 HSCs 的 α -SMA、COL₁A₁ 表达量增高更加显著, 表明促炎型的 M1 型巨噬细胞极化可以促进 HSCs 活化, 进而促进肝纤维化进展。



附图
Appendix figure

参考文献

- [1] Zoubek ME, Trautwein C, Strnad P. Reversal of liver fibrosis: From fiction to reality [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2017, 31(2):129–141.
- [2] Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis [J]. *Lancet*, 2014, 383(9930):1749–1761.
- [3] Kisseleva T. The origin of fibrogenic myofibroblasts in fibrotic liver [J]. *Hepatology*, 2017, 65(3):1039–1043.
- [4] Zhao M, Wang L, Yao Y, et al. Targeting fibrosis, mechanisms and clinical trials [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):206.
- [5] Vander Ark A, Cao J, Li X. TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling [J]. *Cell Signal*, 2018, 52:112–120.
- [6] Carthy JM. TGF β signaling and the control of myofibroblast differentiation: Implications for chronic inflammatory disorders [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(1):98–106.
- [7] Shi M, Zhu J, Walz T, et al. Springer TA. Latent TGF- β structure and activation [J]. *Nature*, 2011, 474(7351):343–9.
- [8] Ju C, Tacke F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases; from pathogenesis to novel therapeutic strategies [J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(3):316–27.
- [9] Kubo K, Ohnishi S, Sakamoto N. Human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates liver fibrosis in rats [J]. *Transplant Direct*, 2015, 1(4):e16.
- [10] Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(5):1090–6.
- [11] Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(6):824–833.
- [12] Kharaziha P, Hellström PM, Soleimani M, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I–II clinical trial [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 21(10):1199–205.
- [13] Jang YO, Kim YJ, Kim YM, et al. Histological improvement following administration of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: a pilot study [J]. *Liver Int*, 2014, 34(1):33–41.
- [14] Chen L, Zhang J, Zhang S, et al. The effects of conditioned medium derived from mesenchymal stem cells cocultured with hepatocytes on damaged hepatocytes and acute liver failure in rats [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018:9156560.
- [15] Du Z, Wei C, Liu Y, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation [J]. *J Surg Res*, 2013, 183(2):907–15.
- [16] Shaban S, El-Husseny MWA, Abdel-Daim MM, et al. Effects of antioxidant supplements on the survival and differentiation of stem Cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:5032102.
- [17] Pieczenik SR, Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease [J]. *Exp Mol Pathol*, 2007, 83(1):84–92.
- [18] Hussain A, Brahmhatt K, Sharma C. Eugenol enhances the chemotherapeutic potential of gemcitabine and induces anti-carcinogenic and anti-inflammatory activity in human cervical cancer cells [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2011, 26(5):519–27.
- [19] Kamatou GP, Vermaak I, Viljoen AM. Eugenol—from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule [J]. *Molecules*, 2012, 17(6):6953–81.
- [20] Sisakhtnezhad S, Heidari M, Bidmeshkipour A. Eugenol enhances proliferation and migration of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2018, 57:166–174.
- [21] De Luna-Saldivar MM, Muñoz Espinosa LE, et al. Advantages of adipose tissue stem cells over CD34 mobilization to decrease hepatic fibrosis in Wistar rats [J]. *Ann Hepatol*, 2019, 18(4):620–626.
- [22] Shi Y, Hu G, Ren G, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair [J]. *Cell Res*, 2010, 20(5):510–8.
- [23] Tang Y, Cai B, Yang GY, et al. Melatonin pretreatment improves the survival and function of transplanted mesenchymal stem cells after focal cerebral ischemia [J]. *Cell Transplant*, 2014, 23(10):1279–1291.
- [24] Mortezaee K, Khanlarkhani N, Zendedel A, et al. Preconditioning with melatonin improves therapeutic outcomes of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in targeting liver fibrosis induced by CCl₄ [J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 369(2):303–312.
- [25] Yang Y, Wu XQ, Li J, et al. PSTPIP2 connects DNA methylation to macrophage polarization in CCL₄-induced mouse model of hepatic fibrosis [J]. *Oncogene*, 2018, 37(47):6119–6135.
- [26] He F, Umrath F, Alexander D, et al. Jaw periosteum-derived mesenchymal stem cells regulate THP-1-derived macrophage polarization [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9):4310.
- [27] Jin QH, Kim HK, Seon JK, et al. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cell-conditioned media inhibited macrophages activation in vitro [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):4754.
- [28] Pradere JP, Kluwe J, De Minicis S, et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice [J]. *Hepatology*, 2013, 58(4):1461–1473.
- [29] Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(3):577–594.
- [30] Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(1):56–65.