

hADMSCs 影响 TLR4-TRIF 信号通路诱导小鼠小胶质细胞表型极化的实验研究*

孙 静^{1,2}, 刘漪论³, 李 灿¹, 马 燕³, 严伟恒³, 苏炳银^{2△}

1. 成都医学院 病理学与病理生理学教研室(成都 610500); 2. 成都医学院发育与再生四川省重点实验室(成都 610500);
3. 成都医学院第一附属医院 外科(成都 610500)

【摘要】 目的 研究人脂肪间充质干细胞(human adipose-derived mesenchymal stem cells, hADMSCs)对小胶质细胞表型极化的影响及机制。**方法** 取 C57/BL6 小鼠 BV-2 小胶质细胞,以 hADMSCs+脂多糖(LPS)间接共培养,或以单纯 LPS 培养。倒置显微镜下观察细胞形态。CCK-8 法检测小胶质细胞增殖能力,实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)检测小胶质细胞 M1/M2 表型标记物的影响,Western blot 检测小胶质细胞 Toll 样受体 4 (TLR4)- β 干扰素 TIR 结构域衔接蛋白(TRIF)信号通路相关蛋白的表达。**结果** 与单纯 LPS 培养相比,hADMSCs 加入后,小胶质细胞镜下形态相似,细胞增殖活性被抑制($P<0.05$),M1 表型标记物的基因表达减少($P<0.05$),M2 表型标记物的基因表达增加($P<0.05$),TRIF、TLR4、干扰素调节因子 3 (IRF3)和磷酸化 IRF3 (P-IRF3)蛋白的表达水平降低($P<0.05$)。**结论** hADMSCs 可抑制脂多糖(LPS)诱导的 BV2 小胶质细胞 M1 促炎表型的极化,从而诱导其向保护型 M2 表型极化,此作用可能与其对 TLR4-TRIF 信号通路活化的抑制有关。

【关键词】 人脂肪间充质干细胞 表型 Toll 样受体

Effect of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells on Phenotype Polarization of Mice Microglia via TLR3 /TRIF Signal Pathway SUN Jing^{1,2}, LIU Yi-lun³, LI Can¹, MA Yan³, YAN Wei-heng³, SU Bing-yin^{2△}. 1. Department of Pathophysiology and Pathology, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 2. Development and Regeneration Key Lab of Sichuan Province, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 3. Department of Surgery, First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China
△ Corresponding author, E-mail: subingyinn@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect and mechanism of human adipose-derived mesenchymal stem cells (hADMSCs) on phenotypic polarization of microglia. **Methods** BV-2 microglia of C57/BL6 mice were co-cultured with hADMSCs+lipopolysaccharide (LPS), or cultured with LPS alone. Cell morphology was observed under an inverted microscope. The effect of hADMSCs on microglial proliferation was evaluated by CCK-8 assay. The impact of hADMSCs on microglia M1/M2 phenotype markers were detected using quantitative real-time PCR (RT-qPCR). The affect of hADMSCs on the proteins expression levels of Toll-like receptor 4 (TLR4)-TIR domain containing adaptor protein inducing interferon β (TRIF) signaling pathway in BV-2 microglia was detected by using Western blot analysis. **Results** As compared with the LPS treatment, hADMSCs treatment had no obvious effect on microglia morphology, whereas showed significant inhibition on microglial proliferation activity ($P<0.05$). Simultaneously, hADMSCs treatment reduced expression of microglia M1 phenotype markers ($P<0.05$), and increased microglia M1 phenotype markers in gene levels ($P<0.05$). At the same time, protein expression levels of TRIF, TLR4, phosphorylated interferon regulatory factor 3 (P-IRF3) and interferon regulatory factor 3 (IRF3) in BV-2 microglia were decreased after hADMSCs treatment. **Conclusion** hADMSCs can blockade the LPS-induced pro-inflammatory microglia M1 phenotype, whereas induces protective microglial M2 phenotype, which may be related to inhibition of the TLR4-TRIF signaling pathway.

【Key words】 Human adipose derived mesenchymal stem cells (hADMSCs) Phenotype Toll-like receptors (TLRs)

* 四川省卫生计生委科研项目(No. 16ZD038, 16PJ104)、四川省医学会科研课题计划(No. S16021)、四川省老年医学临床医学研究中心专项科研项目(No. SCLNZX201805)、成都医学院科研创新团队项目(No. CYTD15-04)、成都医学院第一附属医院专项科学研究基金(No. CYFY2017YB01)和发育与再生四川省重点实验室基金(No. SYS15-004, SYS15-008)资助

△ 通信作者, E-mail: subingyinn@163.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种慢性中枢神经系统退行性疾病,主要累及中脑黑质多巴胺能(dopaminergic neurons, DA)神经元。神经炎症反应是其重要病理学特征^[1]。小胶质细胞是CNS的固有免疫细胞^[2]。类似于巨噬细胞,小胶质细胞在神经炎症反应中被活化并出现两种相对表型,即M1和M2表型^[3]。其中,M1表型小胶质细胞,可释放大炎症因子,促进神经系统炎症损伤;而M2表型小胶质细胞,则与M1表型的作用相反,对神经元起保护作用^[4]。启动小胶质细胞M1与M2表型极化有望成为PD抗炎治疗的新策略。然而,目前有关PD中小胶质细胞向抗炎保护型表型极化的初始因素及机制仍不明确。间充质干细胞(MSCs)对巨噬细胞表型具有明显的调控功能^[5],且MSCs干预炎症性疾病的可行性和有效性已在动物实验中得到证实^[6]。基于小胶质细胞炎症表型的可塑性及MSCs独特的免疫调节特性,本研究旨在通过细胞共培养系统,探索人脂肪间充质干细胞(hADMSCs)对小胶质细胞炎症表型的调控作用及其机制。通过调控小胶质细胞M1与M2表型极化,调控脑内炎症微环境,有望为PD的抗炎治疗提供有效的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

CD34、CD45、CD73和CD105抗体购自BD Biosciences。CCK-8试剂盒购于Vicmed公司。Toll样受体4(TLR4)、 β 干扰素TIR结构域衔接蛋白(TRIF)及干扰素调节因子3(IRF3)抗体购自Abcam公司。磷酸化IRF3(P-IRF3)抗体购于Cell Signaling Technology公司。HRP标记羊抗兔二抗购于武汉博士德生物工程有限公司。ECL发光试剂盒购自Pierce公司。兔多抗GAPDH购于杭州贤至生物有限公司。PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser及SYBR premix Ex TaqTM II kit购自TaKaRa公司。C57/BL6小鼠BV-2小胶质细胞购自北京北纳生物(YB-ATCC-9295)。脂多糖(LPS)购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 hADMSCs的分离培养 获取成人吸脂术抽取的脂肪组织150 mg,PBS溶液冲洗3次,用眼科剪剪碎。加入0.1% I型胶原酶10 mL,在37℃的恒温摇床中振荡培养30 min,1 000 r/min离心8 min,轻吸去上清液。用0.15 mol/L的NH₄Cl溶

解红细胞,PBS清洗3次,弃上清,细胞沉淀用DMEM培养基重悬后用70 μ m滤网过滤以去除未消化的脂肪。将细胞按照 1×10^9 mL⁻¹浓度接种至培养皿,置于37℃、体积分数5%CO₂培养箱中培养。当细胞融合度达到80%时,用0.25%胰酶消化传代,获得第1代(P1)细胞。将第3代(P3)细胞用于后续流式细胞仪检测。

1.2.2 hADMSCs表型标记物(CD73、CD105、CD34、CD45)鉴定 选用融合率达80%的P3代细胞制备成单细胞悬液。细胞于流式检测前1 d按照 1×10^9 mL⁻¹浓度铺板。流式检测时,将培养基洗掉,加入0.25%的胰酶消化。培养基终止消化后1 000 r/min,离心15 min。用PBS重悬细胞,于1 000 r/min,离心10 min。用500 μ L PBS稀释细胞,使其浓度达到 1×10^6 mL⁻¹,每管加入50 mL的HAB,室温下放置1 min,将链接有荧光素的CD73、CD105、CD34和CD45抗体分别加入对应管中,室温避光放置1 h,500 μ L PBS清洗3次,加入缓冲液重悬并用流式细胞仪进行检测。通过Cell Quest软件分析检测结果。

1.2.3 hADMSCs条件培养基的制备 用0.25% Trypsin将对数生长期的hADMSCs细胞消化成细胞悬液,以 6×10^5 mL⁻¹浓度用DMEM/F12完全培养基接种于25 cm²培养瓶中,置于体积分数5%CO₂,37℃恒温培养箱中培养。细胞培养24 h后,倒出完全培养基,加入5 mL不含血清的DMEM/High Glucose培养基,继续培养24 h。将细胞上层的培养基倒入15 mL离心管中,1 000 r/min离心10 min。用0.45 μ m无菌过滤器过滤后,所获得的淡粉红色上清液即为hADMSCs条件培养基,将其放入-80℃冰箱中冻存备用。

1.2.4 hADMSCs与小鼠小胶质细胞间接共培养 小胶质细胞培养至对数期后,分为4组:空白对照组(control组):DMEM高糖培养基培养(含10% FBS)。LPS刺激组(LPS组):采用含有DMEM高糖培养基培养(含10% FBS),并加入LPS(质量浓度1 μ g/mL)。条件培养基组(CM):采用hADMSCs条件培养基培养(含10% FBS)。LPS刺激+条件培养基干预组(LPS+CM组):采用hADMSCs条件培养基培养(含10% FBS),并加入LPS(质量浓度1 μ g/mL)。小胶质细胞按照不同分组处理24 h后,于倒置显微镜下观察各实验组小胶质细胞形态改变。

1.2.5 CCK-8法检测小鼠小胶质细胞的增殖

1.2.4 分组处理后的小胶质细胞用 0.25% Trypsin 消化成细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,共 4 板(同时设立空白质控孔),37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。24 h 后,吸出上层的培养基,再分别培养 4、12、24、36 h,加入 10 μ L CCK-8 溶液孵育 4 h,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值。实验重复 3 次,每组设定 8 个复孔。

1.2.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测小鼠小胶质细胞 M1、M2 表型标记物 mRNA 表达 小胶质细胞按照 1.2.4 分组处理 24 h 后,采用 Trizol 法提取细胞 RNA,分别测定细胞总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处的光密度(OD)值,并计算 RNA 的含

量和纯度后,按照 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书于 42 $^{\circ}$ C 反应 60 min,75 $^{\circ}$ C 灭活 5 min,逆转录 cDNA 产物置于冰上。按照 SYBR premix Ex TaqTM II kit 说明书进行实时定量 PCR 反应,BV-2 小鼠小胶质细胞 M1 表型标记物 *TNF- α* 、*IL-6*、*CD86*、*iNOS* 以及 M2 表型标记物 *IL-10*、*CD206*、*Arg-1*、*Ym1* 相应的引物序列见表 1。扩增反应条件:98 $^{\circ}$ C 30 s,98 $^{\circ}$ C 10 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,74 $^{\circ}$ C 50 s,38 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 mRNA 相对表达量,以反映 hADMSCs 对小胶质细胞炎症表型的调控作用。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 Sequences for PCR primers

Name	Primer	Sequence	Product size
β -actin	Forward	5'-CACGATGGAGGGGCCGACTCATC-3'	240 bp
	Reverse	5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3'	
<i>TNF-α</i>	Forward	5'-CGTCAGCCGATTTGCTATCT-3'	206 bp
	Reverse	5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'	
<i>IL-6</i>	Forward	5'-TACCACTCCCAACAGACCTG-3'	248 bp
	Reverse	5'-GGTACTCCAGAAGACCAGAGG-3'	
<i>CD86</i>	Forward	5'-GCACGTCTAAGCAAGGTCAC-3'	167 bp
	Reverse	5'-CATATGCCACACACCATCCG-3'	
<i>iNOS</i>	Forward	5'-TTGGCTCCAGCATGTACCCT-3'	121 bp
	Reverse	5'-TCCTGCCCACTGAGTTTCGTC-3'	
<i>IL-10</i>	Forward	5'-AGCCGGAAGACAATAACTG-3'	138 bp
	Reverse	5'-GGAGTCGGTTAGCAGTATGTTG-3'	
<i>CD206</i>	Forward	5'-CCACGGATGACCTGTGCTC-3'	158 bp
	Reverse	5'-GGTTCCACACCAGAGCCATC-3'	
<i>Arg-1</i>	Forward	5'-ATCGTGATACATTGGCTTGCG-3'	184 bp
	Reverse	5'-CGTCGACATCAAAGCTCAGG-3'	
<i>Ym1</i>	Forward	5'-TGGAATTGGTGCCCCTACAA-3'	239 bp
	Reverse	5'-CCACGGCACCTCTAAATTG-3'	

TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; *IL*: Interleukin; *iNOS*: Inducible nitric oxide synthase; *Arg-1*: Arginase-1; *Ym1*: Chitinase-3-like protein 3

1.2.7 Western blot 检测 TLR4-TRIF 信号通路蛋白表达 按照 1.2.4 分组处理小胶质细胞 24 h 后,将细胞置于含 200 μ L RIPA 和 2 μ L PMSF 的 1.5 mL EP 管内裂解细胞。利用 BCA 法于酶标仪上测定蛋白浓度。测蛋白浓度,根据蛋白浓度,计算每孔上样 50 μ g 总蛋白所需蛋白溶液体积。按比例加入 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液,沸水煮 5 min,12 000 r/min 离心 5 min 后上样,进行 SDS-PAGE 电泳。采用湿转印法转膜,将膜用 3% 的 BSA 于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。用 TBST(含 5% 脱脂奶粉)漂洗,加入内参及相应一抗(GADPH 1:1 000,TLR4 1:500,TRIF 1:800,P-IRF3 1:1 000,IRF3 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗涤 PVDF 膜 5 次。二抗稀释后浸泡 PVDF 膜,37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 2 h,TBST 洗去多余二

抗。ECL 发光试剂盒显色。利用 Image Proplus 6.0 软件分析灰度值,以目的条带和内参 GAPDH 条带的灰度值比值为目的蛋白的相对表达量。

1.2.8 统计学方法 计量数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。多组间差异比较采用单因素方差分析,两组间差异比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hADMSCs 鉴定结果

流式细胞术检测结果显示:获得的干细胞中 CD105 和 CD73 呈高表达,而造血干细胞系的标志物 CD34 和 CD45 呈低表达(图 1),即所分离细胞为 hADMSCs 细胞。

2.2 hADMSCs 对小鼠小胶质细胞形态学影响

倒置相差显微镜下,观察各组小胶质细胞形态。结果显示,control 组小胶质细胞胞体呈圆形,较小,细胞有多个突起;与 control 组相比,LPS 刺激组小胶质细胞胞体肥大,细胞突起减少甚至消失,且细胞数量显著增多;此外,LPS+CM 组与 LPS 组相比,小胶质细胞形态并无明显改变,但细胞数量有所减

少(图 2);与 control 组相比,CM 组小胶质细胞形态亦无明显改变。以上结果提示,经 LPS 刺激后,小胶质细胞出现活化,细胞胞体变大且突起减少,而再经 CM 处理后,小胶质细胞形态与 LPS 组并无明显差异。

2.3 hADMSCs 对小鼠小胶质细胞增殖能力影响

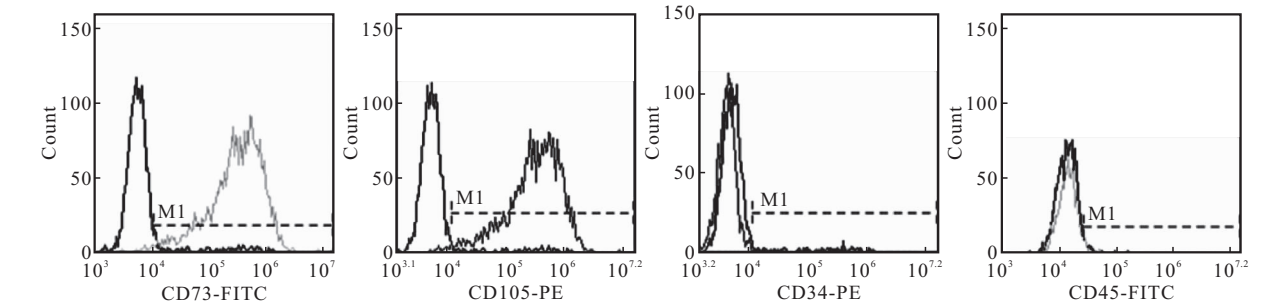


图 1 hADMSCs 表面分子标志物的流式细胞术鉴定结果
Fig 1 Flow cytometry identification of surface markers for hADMSCs

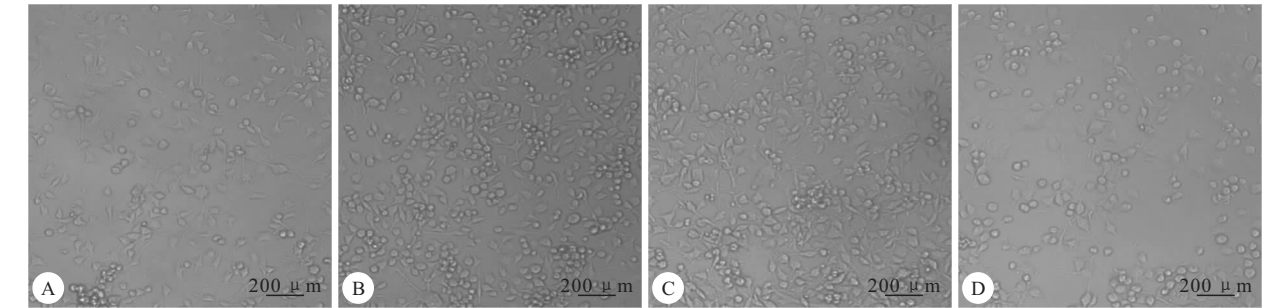


图 2 hADMSCs 对小鼠 BV-2 小胶质细胞形态的影响
Fig 2 Effect of hADMSCs on morphology of BV-2 microglia in mice

A: Control group; B: LPS group; C: CM group; D: LPS+CM group

CCK-8 结果显示(图 3):LPS 组与 control 组相比,小胶质细胞增殖能力增高,其中在 12 h、24 h、36 h 时差异有统计学意义($P<0.01$)。LPS+CM 组相对于 LPS 组,小胶质细胞增殖能力被抑制,12 h、24 h 和 36 h 的增殖率差异有统计学意义($P<0.01$)。以上结果提示,hADMSCs 条件培养基处理可以抑制由 LPS 刺激引发的小胶质细胞增殖活跃。

2.4 hADMSCs 对小鼠小胶质细胞 M1 和 M2 表型表面标记物 mRNA 表达的影响

CM 组 M2 表型标记物 *IL-10*、*CD206*、*Arg-1*、*Ym1* 的 mRNA 表达水平上调,与 control 组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。小胶质细胞经 LPS 刺激后,M1 型标记物 *TNF-α*、*IL-6*、*CD86*、*iNOS* 的 mRNA 表达水平上调,与 control 组相比,差异有统计学意义($P<0.05$);此外,与 LPS 组相比,LPS+CM 组小胶质细胞 M1 表型标记物的表达水

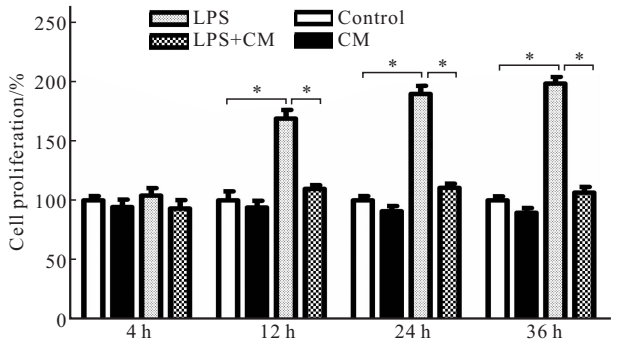


图 3 hADMSCs 对于小胶质细胞增殖的抑制作用
Fig 3 Inhibition effect of hADMSCs on microglia proliferation
* $P<0.01$

平下降,而 M2 表型标记物 *IL-10*、*CD206*、*Arg-1*、*Ym1* 的基因表达水平上调,且差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 4。此结果提示,hADMSCs 能够

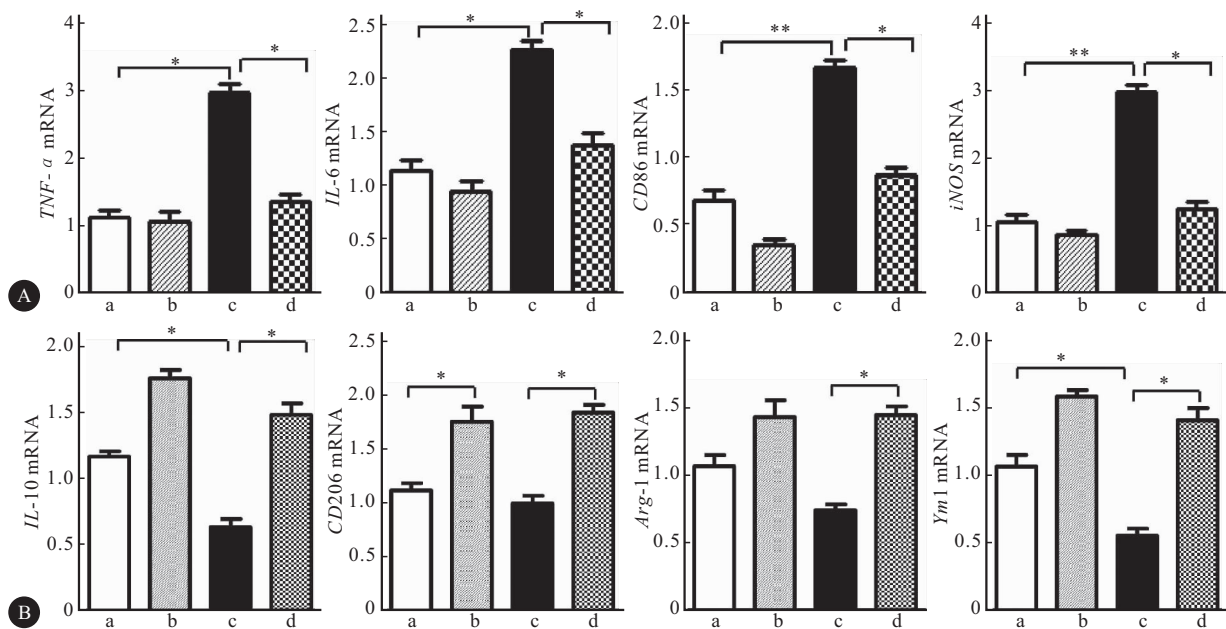


图 4 小胶质细胞 M1(A)、M2 表型(B)mRNA 水平变化

Fig 4 Changes in mRNA levels of M1 (A) and M2 (B) phenotypes in microglia

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; a: Control group; b: CM group; c: LPS group; d: LPS+CM group; *TNF-α*, *IL*, *iNOS*, *Arg-1* and *Ym1* denote the same as table 1

促进小胶质细胞 M2 表型标记物 mRNA 呈现高表达,而抑制小胶质细胞由 LPS 诱导的 M1 表型标记物的 mRNA 表达水平。

2.5 hADMSCs 对小鼠小胶质细胞 TLR4-TRIF 信号通路蛋白表达的影响

LPS 组与 control 组相比, TRIF、TLR4、P-IRF3 和 IRF3 的蛋白表达上调,且差异有统计学意

义($P < 0.01$);而 LPS+CM 组与 LPS 组相比, TRIF、TLR4、P-IRF3 和 IRF3 的蛋白表达下调,与 LPS 组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Control 组与 CM 组相比,上述蛋白表达差异无统计学意义,见图 5。此结果提示,hADMSCs 能下调 LPS 诱导的小胶质细胞 TLR4-TRIF 信号通路相关蛋白的表达。

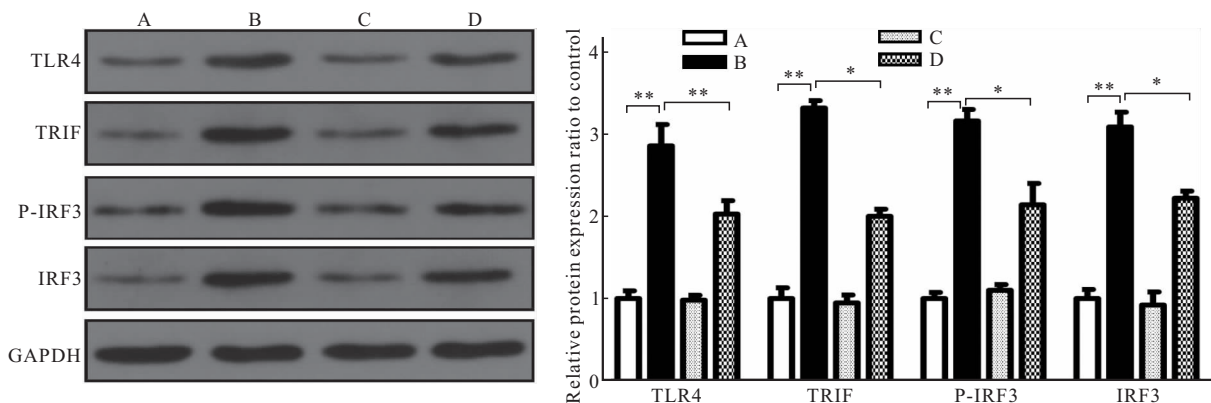


图 5 小胶质细胞 TLR4-TRIF 信号通路蛋白的表达水平

Fig 5 Protein expression levels of TLR4-TRIF signaling pathway in microglia

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; A: Control group; B: LPS group; C: CM group; D: LPS+CM group

3 讨论

干细胞治疗炎症性疾病已成为新的研究热点,干细胞包括胚胎干细胞和成体干细胞两大类。

MSCs 的免疫抑制功能已经被众多研究者所证实^[7]。随着小胶质细胞在 PD 神经炎症发生发展中的作用被不断揭示,以小胶质细胞作为潜在抗炎靶点、针对 PD 神经炎症损伤的相关应用研究受到日

益关注^[8]。小胶质细胞在神经退行性病的发病过程中的作用具有双面性,即可活化为相对的 M1 和 M2 表型^[4]。因此,许多临床治疗药物以小胶质细胞为作用靶点,以期通过增强和维持小胶质细胞对神经细胞的保护作用,抑制和消除致炎损伤作用。不同活化表型的小胶质细胞,其表面分子表达也不同。M1 型小胶质细胞主要表达 TNF- α 、IL-6、CD86、iNOS,通常将这几个分子作为 M1 表型标记物。而 M2 型小胶质细胞主要表达 IL-10、CD206、Arg-1、Ym1,故此将上述分子作为 M2 表型标记物^[9]。

本研究利用 hADMSCs 条件培养基对不同分组处理的小胶质细胞进行干预,探讨 hADMSCs 对于小胶质细胞形态学、M1/M2 表型标记物以及炎症相关 TLR4-TRIF 信号通路相关蛋白表达的影响。本研究发现,hADMSCs 对于小胶质细胞形态学没有明确特征性的影响。目前研究表明,虽然在不同的活化表型下,小胶质细胞的形态有所不同,但是其形态特征与功能活化表型并无直接的相关性,因此,小胶质细胞的活化表型仍旧不能用具体的形态学来界定。此外,CCK-8 实验结果表明,用 hADMSC 孵育小胶质细胞后,经 LPS 诱导的 M1 表型小胶质细胞的增殖能力明显减弱。已有研究证实^[10],LPS 刺激小胶质细胞向 M1 型活化,产生并释放大量的 NO、TNF- α 和 IL-6 等炎症因子,参与机体炎症反应,引起机体炎性损伤。本实验发现 LPS 组与 control 组相比,小胶质细胞的增殖能力增强。此研究结果发现 hADMSCs 可以逆转由 LPS 引发的小胶质细胞增殖。即,hADMSCs 对于 LPS 诱导的小胶质细胞活化具有抑制作用。此研究结论与之前研究结果一致^[11]。

本研究发现,hADMSCs 可以逆转由 LPS 刺激小胶质细胞活化引起的 M1 表型标记物的表达。LPS 刺激小胶质细胞后,M1 型标记物的表达量上调。hADMSCs 干预后,BV2 小胶质细胞 M1 型标记物表达下调,而 M2 型标记上调。此结果表明,hADMSCs 可抑制由 LPS 诱导的小胶质细胞 M1 表型的极化,而诱导其向 M2 表型极化。已有研究发现^[12],脑外伤后,经脑室内的骨髓间充质干细胞(BMSCs)可诱导小胶质细胞 M2 保护型表型的极化。体内外研究均发现 Ym1 表达上调,小胶质细胞吞噬能力减弱,证实小胶质细胞向 M2 表型极化,具有促进神经组织修复作用^[13]。

为进一步探索 hADMSCs 维持小胶质细胞 M2 表型的具体机制,本实验利用 Western blot 检测

hADMSCs 对小胶质细胞 TLR4-TRIF 信号通路相关蛋白表达的影响。结果证实,hADMSCs 与小胶质细胞共培养后,hADMSCs 能显著抑制 LPS 诱导的小胶质细胞中 TLR4-TRIF 信号通路相关蛋白的表达,提示 hADMSCs 可能通过阻遏 TLR4-TRIF 信号通路活化,进而诱导小胶质细胞向 M2 表型极化。换言之,hADMSCs 可能通过下调小胶质细胞 TLR4-TRIF 信号通路,进而抑制由 LPS 诱导的小胶质细胞活化表型 M1 的极化。TLR 介导的炎症反应是包括 PD 在内的神经退行性疾病的主要执行者。小胶质细胞 TLR4 识别配体后,可通过 TRIF 依赖性和非依赖性信号传导途径,激活转录因子 IRF3,生成核因子(NF)- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)^[14]。在 PD 病变过程中,TLR4-TRIF 信号通路是神经炎症反应的关键调控靶点。并且,本课题组前期研究已证实 TLR3/TRIF 信号通路对于小胶质细胞活化表型极化具有重要调控作用,敲降小胶质细胞 TRIF 信号通路导致小胶质细胞 M1/M2 极化失衡,减弱由 LPS 诱导的 M2 型小胶质细胞活化效应,使其向 M1 表型极化,从而导致 MN9D 细胞凋亡增加^[15]。近年有关巨噬细胞与 TLR4 相关性研究显示,TLR4 缺失可减弱炎症反应,促进脂肪组织中 M2 型巨噬细胞生成,提示 TLR4 可能是 M1 型和 M2 型巨噬细胞之间相互极化的重要因素^[16]。此外,也有研究发现在慢性炎症微环境,MSCs 能够抑制 TLR 的表达。脊髓损伤后小胶质细胞 TLR4 表达水平显著升高,而 BMSCs 移植能够明显抑制 TLR4 的表达^[12]。综上,hADMSCs 可通过诱导小胶质细胞向 M2 表型极化,并且此调控作用可能与阻断 TLR3/TRIF 信号通路的活化有关。

虽然本研究已在体外实验中证实 hADMSCs 能够抑制小胶质细胞增殖并诱导其向 M2 表型转化,但有关其发挥该作用的具体分子机制尚需要深入系统探讨。此外,hADMSCs 通过调控小胶质细胞向 M1/M2 表型转化对多巴胺能神经元的保护作用尚需在体实验的进一步支持。因此,下一步实验计划在 PD 动物模型中开展 hADMSCs 在体移植实验,以期深入研究 hADMSCs 对于 PD 的治疗作用及其机制。

参 考 文 献

- [1] TANSEY MG, GOLDBERG MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and

- implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(3):510-518.
- [2] LE W, ROWE D, XIE W, *et al.* Microglial activation and dopaminergic cell injury: an *in vitro* model relevant to Parkinson's disease. *J Neurosci*, 2001, 21(21):8447-8455.
- [3] MOEHLE MS, WEST AB. M1 and M2 immune activation in Parkinson's disease: foe and ally? *Neuroscience*, 2015, 27(302):59-73.
- [4] GOMES-LEAL W. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain Behav*, 2012, 2(3):345-56.
- [5] PROCKOP DJ, OH JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther*, 2012, 20(1):14-20.
- [6] HORTON JA, HUDAK KE, CHUNG EJ, *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit cutaneous radiation-induced fibrosis by suppressing chronic inflammation. *Stem Cells*, 2013, 31(10):2231-2241.
- [7] OBERMAJER N, POPP FC, SOEDER Y, *et al.* Conversion of Th17 into IL-17A (neg) regulatory T cells: a novel mechanism in prolonged allograft survival promoted by mesenchymal stem cell-supported minimized immunosuppressive therapy. *J Immunol*, 2014, 193(10):4988-4999.
- [8] HARRY GJ, KRAFT AD. Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008, 4(10):1265-1277.
- [9] DURAFOURT BA, MOORE CS, ZAMMIT DA, *et al.* Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia*, 2012, 60(5):717-727.
- [10] VARIN A, GORDON S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology*, 2009, 214(7):630-641.
- [11] ZHOU C, ZHANG C, CHI S, *et al.* Effects of human marrow stromal cells on activation of microglial cells and production of inflammatory factors induced by lipopolysaccharide. *Brain Res*, 2009(1269):23-30[2018-06-17]. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.049>.
- [12] ZANIE ER, PISCHIUTTA F, RIGANTI L, *et al.* Bone marrow mesenchymal stromal cells drive protective M2 microglia polarization after brain trauma. *Neurotherapeutics*, 2014, 11(3):679-695.
- [13] GRANDBERBE L, MICHELUCCI A, HEURTAUX T, *et al.* Notch signaling modulates the activation of microglial cells. *Glia*, 2007, 55(15):1519-1530.
- [14] AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, 124(4):783-801.
- [15] SHAN MH, LIN S, LI SR, *et al.* TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) is essential for MPTP-induced dopaminergic neuroprotection via microglial cell M1/M2 modulation. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11:35[2017-05-21]. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00035>.
- [16] ORR JS, PUGLISI MJ, ELLACOTT KL, *et al.* Toll-like receptor 4 deficiency promotes the alternative activation of adipose tissue macrophages. *Diabetes*, 2012, 61(11):2718-2727.

(2018-08-26 收稿, 2018-11-12 修回)

编辑 吕 熙