

年龄因素影响下间充质干细胞对巨噬细胞影响的改变



殷园, 吴瑞鑫, 贺小涛, 陈发明*

军事口腔医学重点实验室, 陕西省口腔医学重点实验室, 第四军医大学口腔医院牙周科, 陕西 西安 710032



研究目的

间充质干细胞 (MSCs) 由于其免疫调控能力和再生潜能被广泛应用于干细胞治疗和再生医学领域。近年来, MSCs的免疫调控能力在临床应用中展现出来的潜力使其越来越受到广泛关注。巨噬细胞 (Mφs) 作为人体免疫反应的“先遣部队”, 不仅连接先天性免疫和获得性免疫, 更是通过其不同免疫表型参与损伤修复过程。MSCs具有能够将Mφs从促进炎症反应的表型转变为促进再生修复的表型的调控能力, 诱导Mφs参与组织再生过程。然而, 众所周知, 随着年龄增长, 衰老MSCs表现出增殖、迁移、定向分化、组织再生及血管形成等能力下降。而对其免疫调控能力随着年龄增长改变的研究很少。

研究方法

本实验中, 我们设计并研究了体外不同年龄小鼠来源MSCs对Mφs (巨噬细胞系RAW264.7) 免疫调控作用。由于衰老MSCs功能下降, 我们分离、培养并对比鉴定了年轻、年老小鼠骨髓来源MSCs (定为YMSCs和AMSCs)。对MSCs调控功能研究基于YMSCs和AMSCs对RAW264.7表型、功能的不同影响而进行。同时, 根据文献所知, 干扰素γ (IFNγ) 能够激活并增强MSCs的免疫调控能力, 我们同时平行对比了IFNγ刺激和未刺激后MSCs对RAW264.7的影响。

研究结果

图 1

YMSCs和AMSCs鉴定

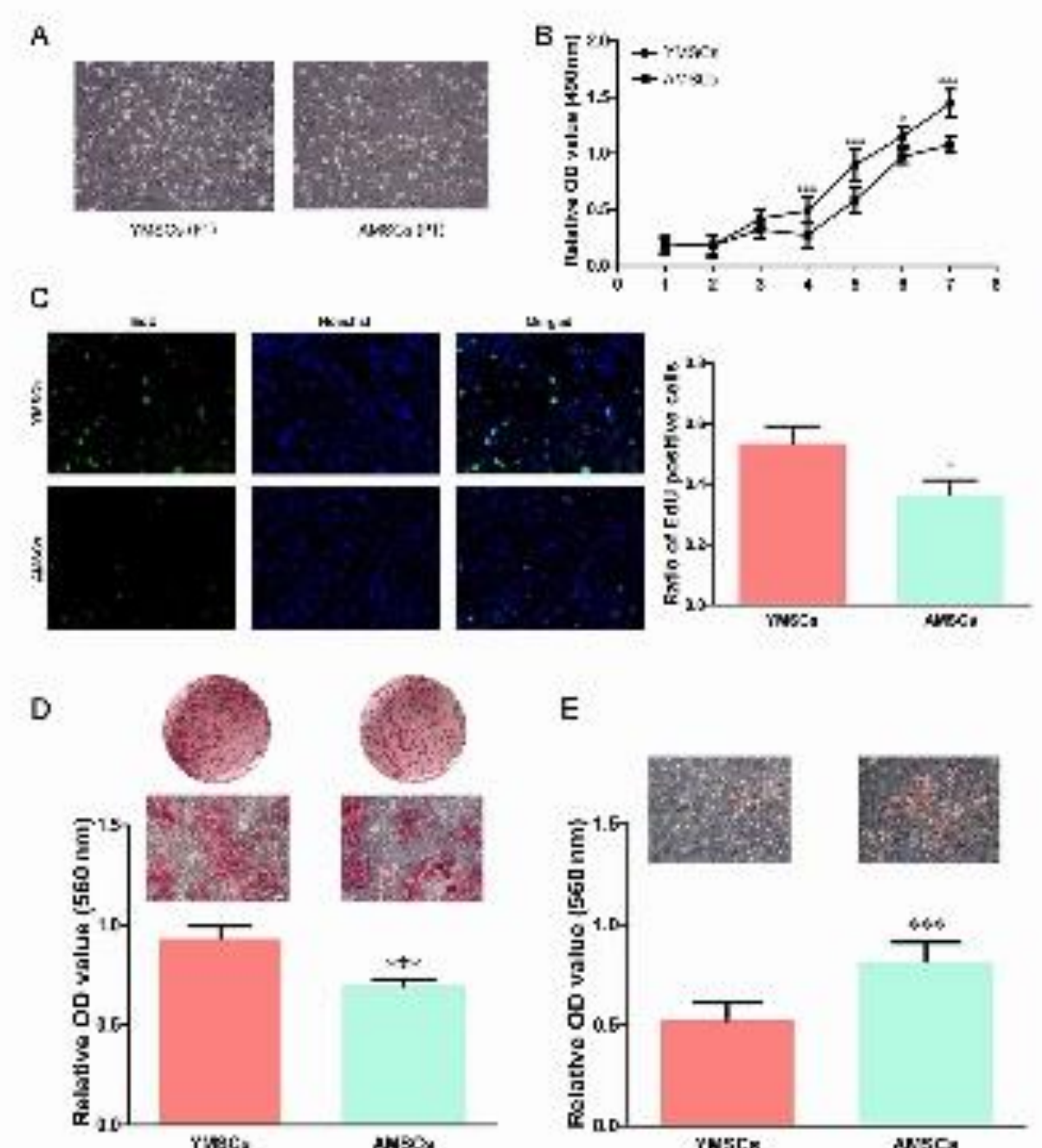


图1 小鼠YMSCs和AMSCs在细胞形态 (A)、增殖能力 (B和C)、成骨 (D) 和成脂 (E) 分化能力差异。

图 2

共培养后RAW264.7细胞表面标记物表达

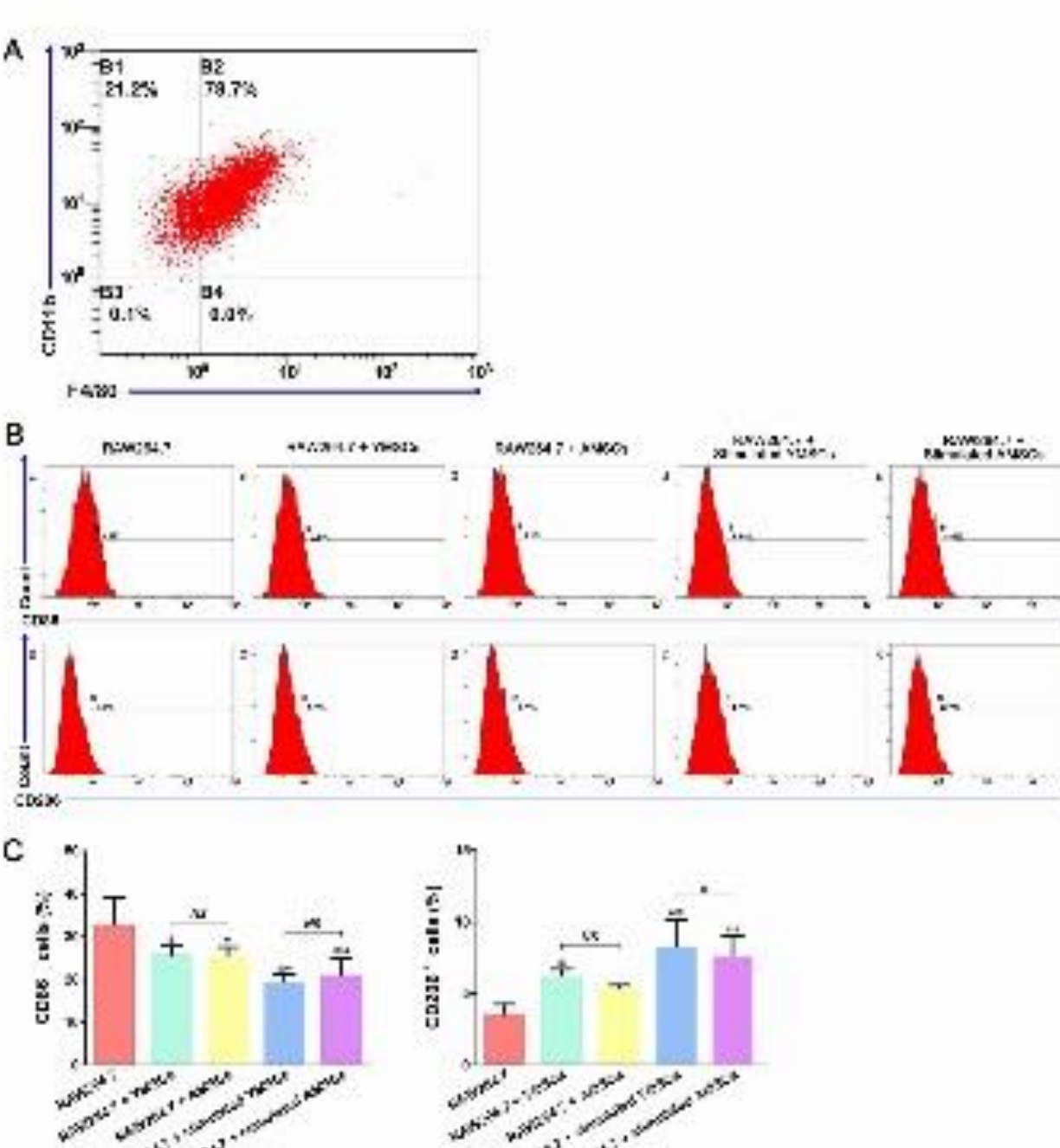


图2 RAW264.7细胞表面标记物CD11b和F4/80流式鉴定 (A); RAW264.7与MSCs共培养后细胞表面标记物CD86和CD206流式鉴定 (B和C)。

图 3

共培养后RAW264.7细胞形态和表面标记物表达

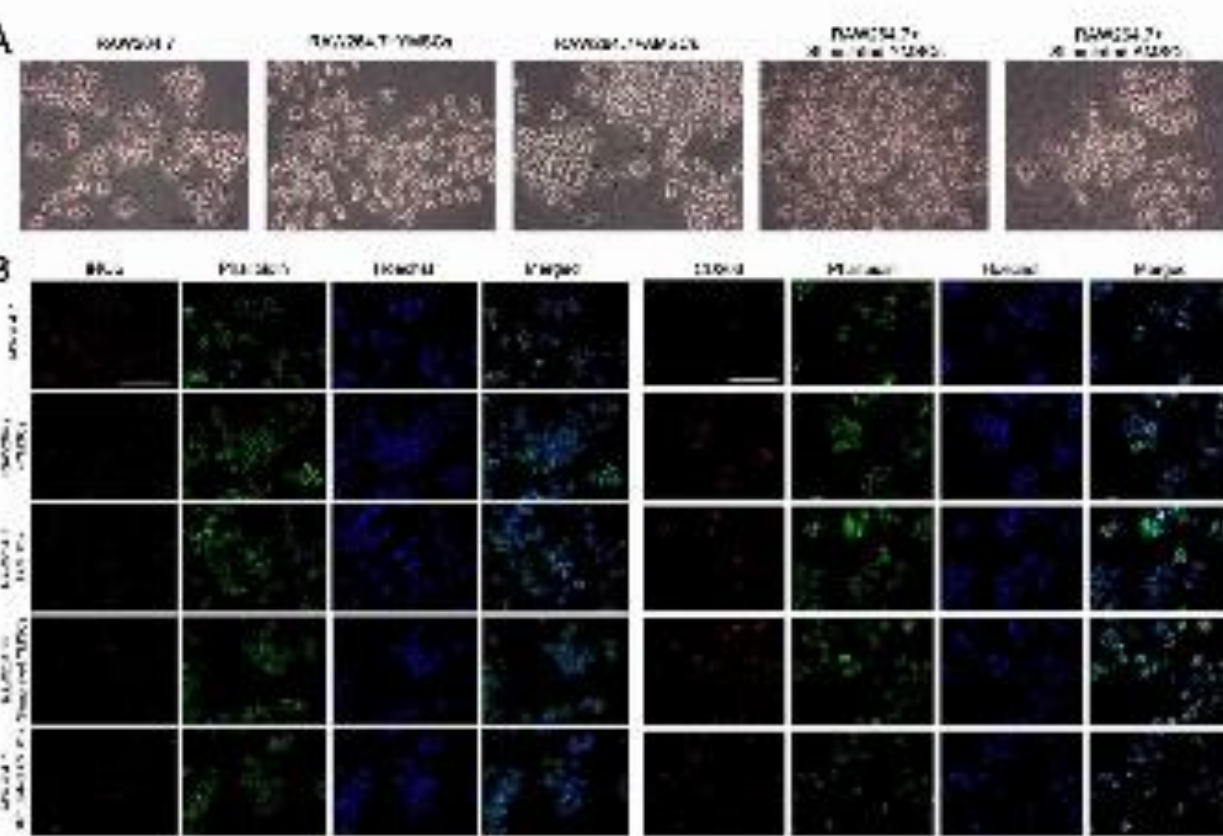


图3 RAW264.7在与 (IFNγ刺激和未刺激下) YMSCs和AMSCs共培养后, 细胞形态 (A) 和细胞免疫荧光染色 (iNOS和CD206, B) 表现, 未共培养处理的RAW264.7作为对照组。

图 4

共培养后RAW264.7细胞内mRNA表达

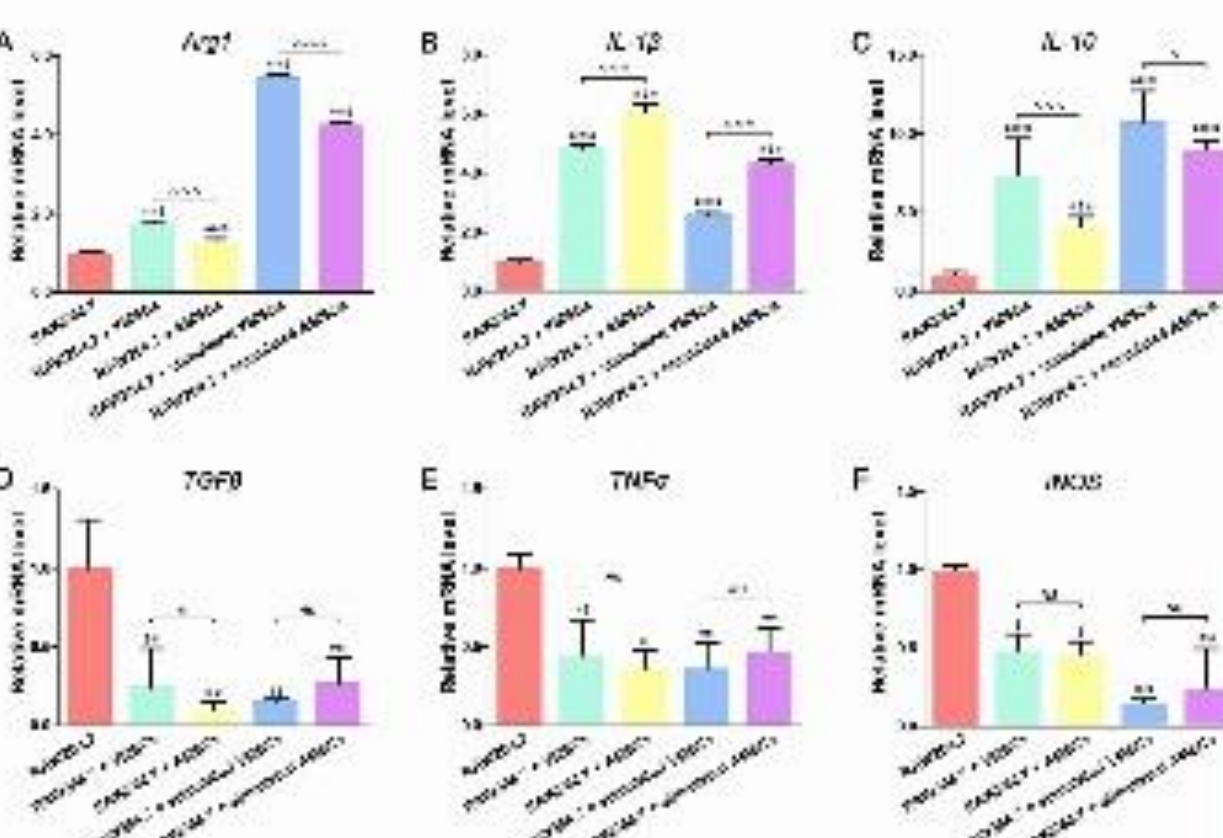


图4 RAW264.7共培养后其mRNA基因表达: M2相关酶/细胞因子表达Arg1 (A), IL-10 (B), TGFβ (C); M1相关酶/细胞因子表达TNFα (D), iNOS (E), IL-1β (F); 未共培养处理的RAW264.7作为对照组。

图 5

共培养后RAW264.7细胞上清液的IL-10、TNFα和NO表达情况

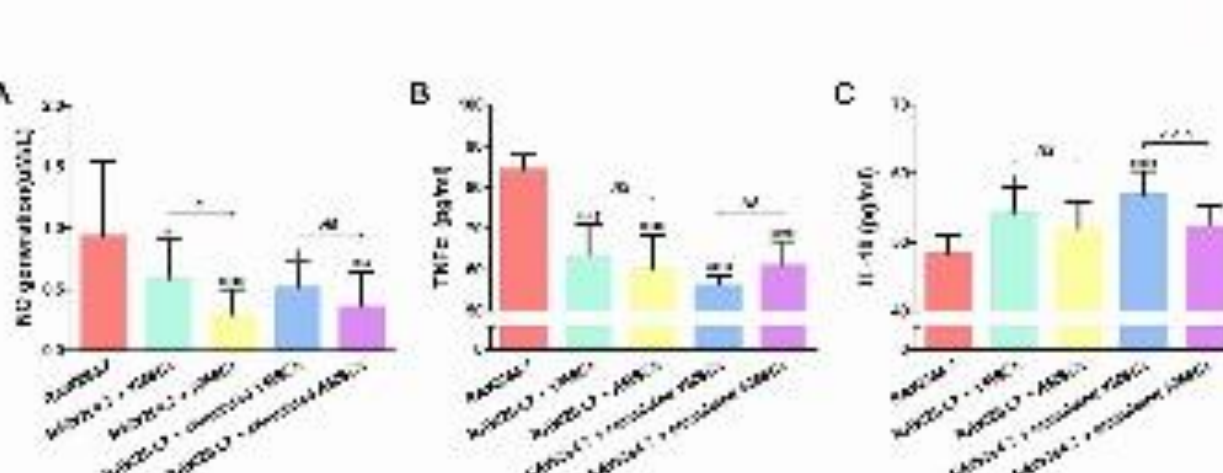


图5 共培养后RAW264.7细胞上清液的IL-10 (A)、TNFα (B) 和NO (C) 表达; 未共培养处理的RAW264.7细胞上清液作为对照组。

图 6

共培养后RAW264.7吞噬能力检测

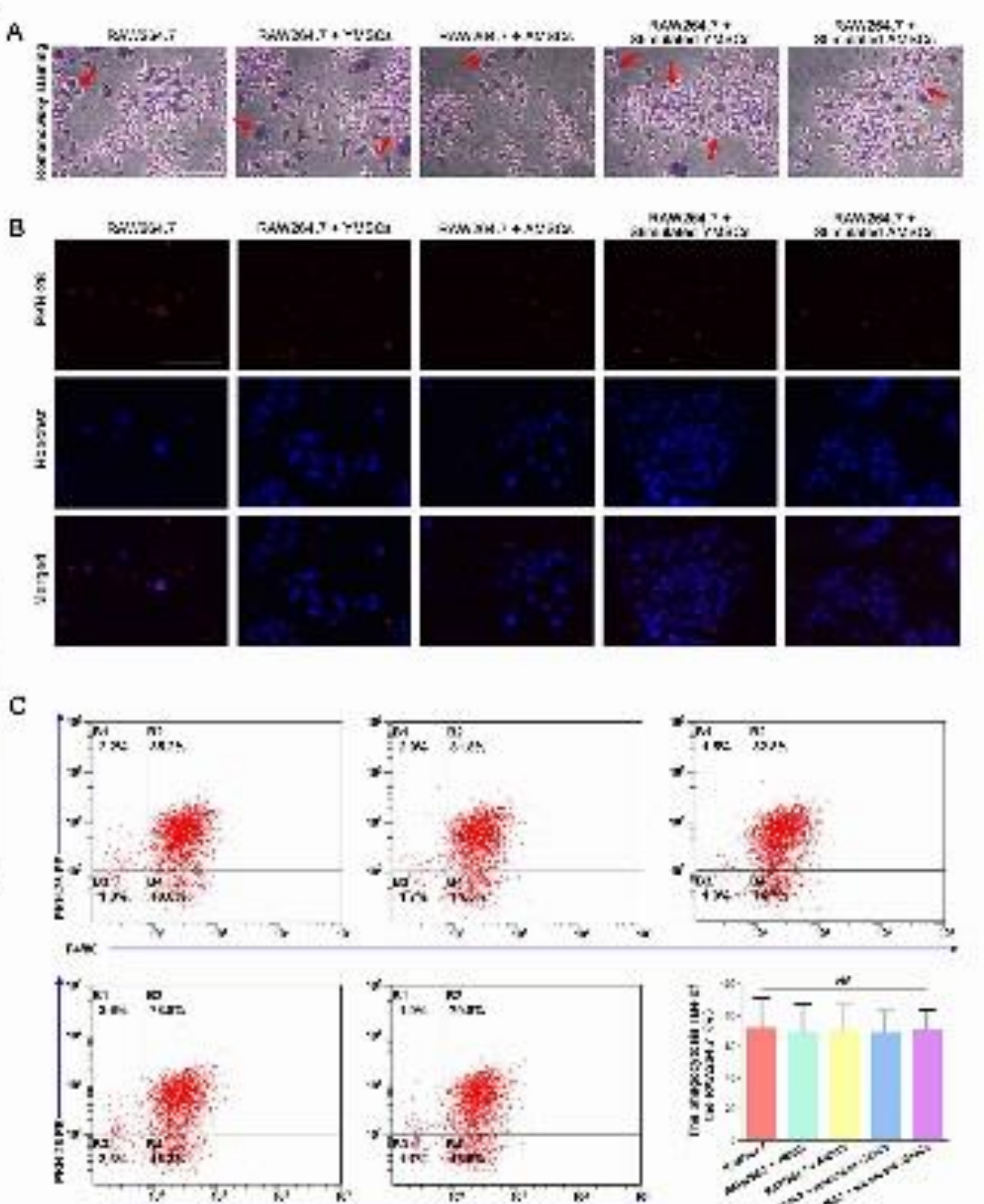


图6 共培养后RAW264.7吞噬鸡红细胞检测: (A) 吉姆萨染色 (红色箭头标记RAW264.7吞噬的鸡红细胞); (B) 荧光染色 (PKH-26染色鸡红细胞, Hoechst染色RAW264.7); (C) 细胞流式检测 (PKH-26染色鸡红细胞, FITC-F4/80染色RAW264.7); 未共培养处理的RAW264.7作为对照组。

图 7

共培养后RAW264.7迁移能力检测

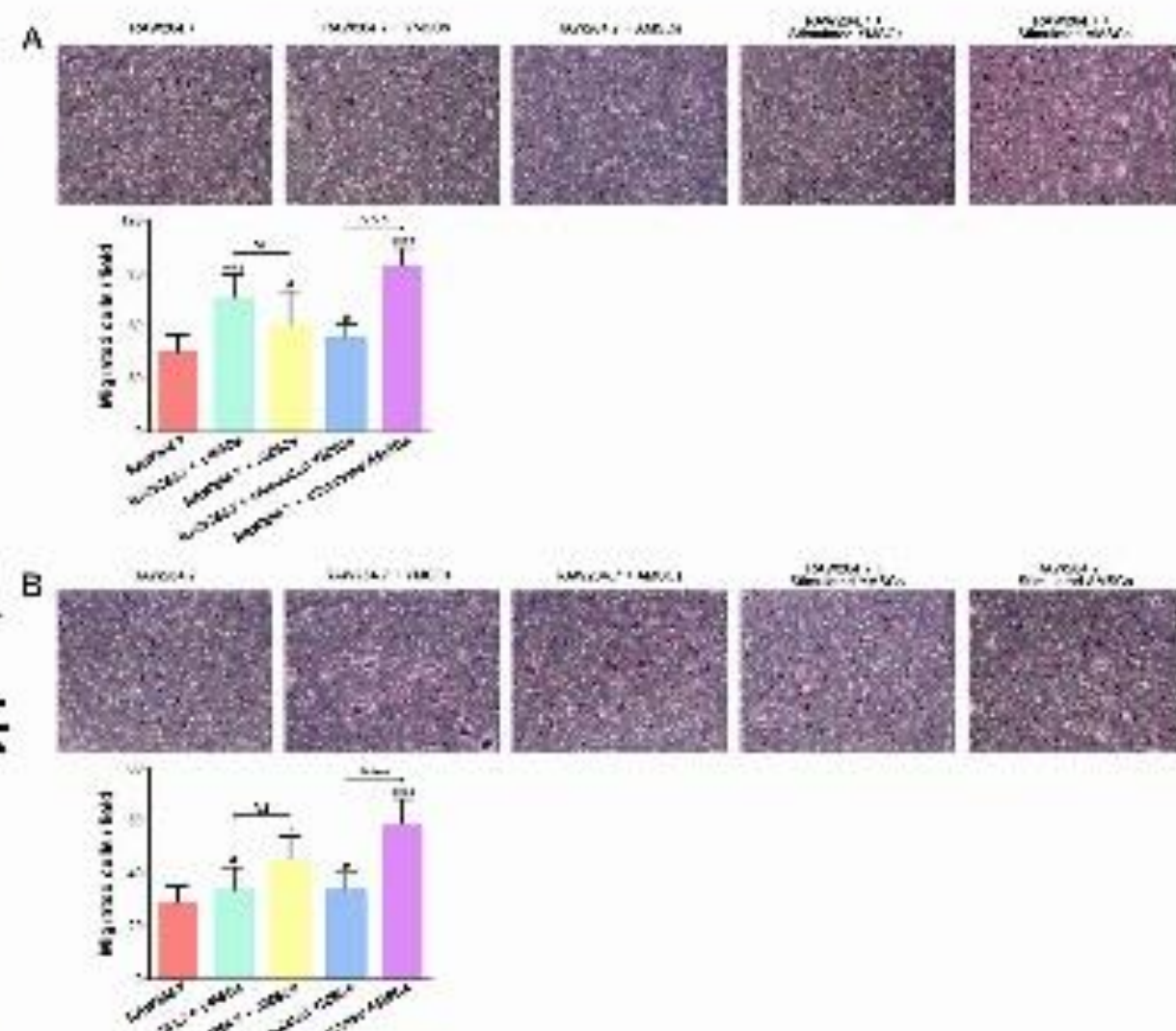


图7 Transwell系统内RAW264.7迁移能力表现: (A) 与YMSCs或AMSCs共培养后, (B) 在与YMSCs或AMSCs共培养过程中; 未共培养处理的RAW264.7作为对照组。

通过研究, 我们发现YMSCs比AMSCs表现出更强的增殖和成骨分化能力。当与RAW264.7共培养后, YMSCs和AMSCs都表现出诱导Mφs转变为M2表型, 并引导其分泌抗炎和免疫调控细胞因子, 且相比于AMSCs, YMSCs表现出更强的免疫调控能力。然而, Mφs与YMSCs或AMSCs共培养后表现出相似的吞噬能力, AMSCs与RAW264.7共培养也能增强其迁移能力。同时, IFNγ预刺激后的MSCs, 其对RAW264.7的调控作用有所改变。

研究结论

- 1, YMSCs和AMSCs都能够调控Mφs表型和功能;
- 2, YMSCs具有更强的调控Mφs向M2极化功能;
- 3, 衰老MSCs表现出来的干细胞功能下降和再生能力下降, 或许可以部分解释其免疫调控能力受损的原因。