

网络出版时间: 2015-12-30 14:38 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20151230.1438.020.html>

体外研究人脐带血间充质干细胞对大鼠枯否细胞极化的影响

李亮¹ 彭琼¹ 蔡亦红² 戴夫¹

摘要 目的 采用脂多糖(LPS)诱导大鼠枯否细胞(KCs)发生极化改变,之后用人脐带血间充质干细胞(huMSCs)与LPS诱导的KCs在Transwell内共培养,以观察huMSCs对KCs极化偏移的调节作用。方法 实验分为KCs组、KCs+LPS组、KCs+LPS+MSCs组。对各组的白介素-4(IL-4)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-10(IL-10)、白介素-6(IL-6)等上清因子采用ELISA法进行检测;诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、精氨酸酶-1(Arg-1)、信号传导与转录激活因子3、6(STAT-3、STAT-6)、核因子 κ B(NF- κ B)用Western blot进行检测,同时用荧光实时定量PCR(qRT-PCR)对以上结果进行验证。结果 KCs+LPS组促炎因子TNF- α 、IL-6分泌增加,KCs+LPS+MSCs组抑炎因子IL-10、IL-4分泌增加;而Western blot检测表明,KCs+LPS组中iNOS升高,NF- κ B p65入核增高;而KCs+LPS+MSCs组高表达Arg-1,同时pSTAT-3、pSTAT-6表达增加。结论 huMSCs能诱导已经发生M1极化的KCs向M2表型偏移,考虑可能与huMSCs分

泌细胞因子有关,起到一种免疫调节作用,huMSCs调节巨噬细胞极化的分子机制可能与通过JAK-STAT信号转导通路有关。

关键词 枯否细胞; 人脐带血间充质干细胞; 免疫调节; 极化

中图分类号 R 318.06

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)01-0041-06

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs)取材方便,易于体外培养增殖,除了多向分化能力,还具有独特免疫特性,因此MSCs移植有望成为很多疾病治疗的有效手段。越来越多的研究者认为MSCs分泌的细胞因子和免疫调节对肝脏损伤起主要作用^[1]。另外MSCs分泌的细胞因子也具有强大的调节作用。近年来MSCs对巨噬细胞的免疫调节作用的研究也成为热点。巨噬细胞参与对抗病原体的第一道防线,各组织的巨噬细胞具有相对特异性,肝脏的巨噬细胞称为KCs,占肝脏非实质细胞的0.35,占生物体所有实质脏器的巨噬细胞总数的0.8~0.9^[2],对各种肝脏疾病的发病与转归起重要作用。成熟巨噬细胞在不同的微环境中可被诱导分化出不同的表型和功能状态,称为巨噬细胞的极化。目前很多研究^[3-5]已经证实MSCs能促进巨噬细胞向M2方向极化,所以研究巨噬细胞极化机制对治

2015-10-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81101272)

作者单位: ¹安徽医科大学第三附属医院(合肥市第一人民医院)消化内科,合肥 230001

²安徽医科大学公共卫生学院,合肥 230032

作者简介: 李亮,男,硕士研究生;

戴夫,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: hfsdf@sina.com

stem cells (hAMSCs) promote cancer metastasis remain elusive. **Methods** Colon cancer cells were co-cultured with AMSCs using a Transwell model. The capacity of invasion of HCT116 cells in the indicated conditions was detected by a Transwell invasive assay. The transcripts of EMT-associated genes in HCT116 treated with indicated conditions were determined by a qRT-PCR assay. Concentration of indicated paracrine factors and cytokines of the culture medium was ascertained by an ELISA. **Results** The results showed that AMSCs could promote colon cancer cells to a mesenchymal-like phenotype in a contact-dependent manner. Reciprocally, colon cancer cells were able to induce AMSCs to produce metastasis-related factors and cytokines, such as fibroblast growth factor 10 (FGF10), vascular endothelial growth factor C (VEGFC), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 10 (IL-10) in part through a mechanism of an activation of tumor microenvironment. Intriguingly, an inhibition of contact with AMSCs led a reduced capacity of invasion of colon cancer cells *in vitro*. **Conclusion** These findings thus suggest that the crosstalk between the microenvironment of cancer cells and paracrine factors of AMSCs has an implication in colon cancer malignancy. This study thus uncovers a novel paracrine factors mediated-crosstalk between colon cancer cells and AMSCs in colon cancer malignancy.

Key words metastatic; paracrine factor; adipose mesenchymal stem cells; colon cancer

疗各种肝病具有重要意义。目前人脐带血间充质干细胞(human umbilical cord blood mesenchymal stem cells, huMSCs)和大鼠 KCs 体外共培养尚无报道,该实验首先提取大鼠原代 KCs,并观察 huMSCs 在体外对大鼠 KCs 偏移极化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞 普通级健康雄性 SD 大鼠 20 只 8~10 周龄 (200 ± 20) g,购于苏州工业园区爱尔麦特科技有限公司,室温下自由进食标准颗粒饲料、卫生饮水,实验前 12 h 禁食,6 h 前禁水。huMSCs 为合肥市滨湖医院干细胞中心刘尚全教授馈赠。

1.2 主要试剂和仪器 青霉素、链霉素、胰酶细胞消化液和谷氨酰胺(上海碧云天生物技术研究公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);Percoll 细胞分离液、台盼蓝(美国 Sigma 公司);APC-CD68 抗体(美国 eBioscience 公司);HE-PA Class 100 二氧化碳培养箱(美国 Thermo electron corporation);TS100 倒置显微镜(日本 Nikon 公司);IX51 荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);AllegroX-30R 梯度离心机(美国 Beckman Coulter 公司);6 孔细胞培养板和 Transwell(美国 Corning 公司);PCR 试剂盒(美国 AXYGEN 公司);Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit(加拿大 Fermentas 公司);PCR Master Mix 和二抗 tetramethylrhodamine goat-anti-rabbit IgG(美国 Promega 公司);SYBR Premix Ex Taq™ II(日本 TaKaRa 公司);TRIzol(美国 Invitrogen 公司);一抗 anti-iNOS 和 anti-STAT6(美国 BD Transduction Laboratories 公司);anti-Arg1、anti-NF- κ B p65(美国 Santa Cruz 公司),免疫荧光一抗 NF- κ B p65 抗体(英国 Abcam 公司);核蛋白提取试剂盒 NucBuster Protein Extraction Kit(德国 Novagen 公司);磷酸化酶/蛋白酶抑制剂 Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail(美国 Cell Signaling 公司)。

1.3 大鼠原代 KCs 的提取及鉴定 SD 大鼠吸入乙醚麻醉,酒精消毒,放于无菌托盘,打开腹部和胸腔至见到肝、肺、心脏等器官,结扎下腔静脉,行门静脉插管,以 15 ml/min 速度灌注 PBS 液 10 min,0.5 mg/ml 浓度的 IV 型胶原酶 20 ml 原位灌注 10 min,取肝脏并剪碎至 1 mm 小块。0.5 mg/ml IV 型胶原酶 30 ml 震荡消化(37℃)。用细胞滤网(200 目)滤过,去除未消化的肝脏组织。肝脏细胞悬液 300

r/min 离心 5 min(4℃),离心 2 次,弃上清液除去残留消化酶,再次 1 550 r/min 离心 5 min(4℃),取沉渣重悬 0.30 和 0.60 percoll 密度梯度 1 850 r/min 离心 20 min(20℃);取出乳白色细胞层,利用 KCs 贴壁特性进一步纯化,纯化后细胞以 2×10^6 /孔铺板,进一步用于后续实验。台盼蓝染色实验:细胞提取后,立即以 10 μ l 细胞悬液和 90 μ l 0.4% 台盼蓝充分混匀,2~3 min 后,取 10 μ l 至计数板,台盼蓝染色实验后显微镜下观察计数。吞墨实验:用培养 24 h 后的细胞加入经过滤纸多次过滤并高压灭菌过的墨汁,6 h 后显微镜下观察细胞的吞噬能力。可见细胞内充满大小不一的黑色颗粒,但细胞仍然存活。

1.4 流式细胞术检测细胞表面标志物 收集 KCs,调整细胞浓度为 $(1 \sim 2) \times 10^6$ /ml,取 50 μ l 细胞悬液,加入 2 μ l FITC-CD68,低速振荡 5 s,混匀,室温下避光孵育 20 min 后,加适量 PBS 洗 1 次,上流式细胞仪进行检测。

1.5 huMSCs 与 KCs 在 Transwell 内共培养 将 KCs 细胞以 1×10^6 /ml 铺到 Transwell(0.4 μ m 孔径)的下层,并加入终浓度为 1 μ g/ml 的 LPS,培养 18 h 后,将 huMSCs 以 1×10^5 /孔铺到 Transwell 板的上层,将二者共培养 18 h,同时设置正常培养的 KCs 组及加入 LPS 诱导的 KCs 组以及 KCs + LPS + MSCs 组。huMSCs 和 KCs 共培养时,KCs + LPS 组同时加等量 DMEM 作对照,分别收集各组培养 18 h 上清液、18 h KCs 细胞蛋白、RNA 以便进行后续实验。

1.6 ELISA 试剂盒检测上清液相关细胞因子 收集各组上清液,用 ELISA 试剂盒分别检测 IL-6、IL-10、IL-4、TNF- α 细胞因子的水平。采用终浓度为 1 μ g/ml 的 LPS 与 KCs 共培养 18 h,再与等量 DMEM 或者 huMSCs 共培养 18 h 后检测各组 IL-4、IL-6、IL-10 细胞因子水平。而 TNF- α 为 Transwell 内与 huMSCs 共培养 18 h 后,再以终浓度为 1 μ g/ml 的 LPS 诱导 6 h 后再检测。

1.7 Western blot 检测 iNOS、Arg-1、STAT3、p-STAT3、STAT6、p-STAT6、NF- κ B p65 蛋白表达 实验各组 KCs 中加入磷酸化酶/蛋白酶抑制剂,加入裂解缓冲液提取总蛋白,并按试剂盒说明提取核蛋白。将提取蛋白按 100 μ g/孔加样,置于 SDS-PAGE 凝胶上电泳分离,在硝酸纤维素膜上进行转膜、电转、TBST 清洗硝酸纤维素膜 3 次后移至含有封闭液的平皿中,稀释一抗(1:500)后孵育 2 h,后进行二抗孵育(1:1 000),最后化学发光,显影,定

影 将胶片进行扫描,用凝胶图象处理系统(Image J)分析目标带的分子量和净光密度值。用全蛋白裂解液检测目的蛋白表达,用 GAPDH 为内参照;用核蛋白裂解液检测细胞核内 NF- κ B p65 水平,用 Histone 为内参照。

1.8 荧光实时定量 PCR 分析 M1/M2 相关基因转录水平 收集各组的 KCs 细胞总 RNA 用逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA,设计引物,用 SYBR Green PCR mix 试剂盒分别检测 IL-10、IL-6、iNOS、Arg-1 mRNA 水平,引物见表 1。

表 1 荧光实时定量 PCR 所用引物序列

项目	引物序列(5'-3')
IL-10	F: CTGTCATCGATTCTCCCTG
	R: CAGTAGATGCCGGGTGGTTC
IL-6	F: AAATGCTCCCGGAGGT
	R: AAGACACAGAGAAGCAATCCAAAC
iNOS	F: CCAAGAACGTGTTACCATG
	R: GATGTCAGGAAGTAGGTGAG
Arg-1	F: CAGCAGGAACCTGGATGA
	R: AAAGGCGTCCGATAATCTCT
β -actin	F: GCTCTCTTCCAGCCTTCCTT
	R: CTTCTGCATCCTGTCAGCAA

1.9 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,定量试验资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 F 检验判断两样本间的方差齐性, t 检验分析两组间统计学差异。

2 结果

2.1 SD 大鼠 KCs 鉴定 刚提取的 KCs 成圆形或者椭圆形,透光性好,大小均匀,可见微量杂细胞。台盼蓝染色后经细胞计数,细胞活力为 (0.9311 ± 0.009) ($n=3$)。培养 48 h 后可见细胞贴壁,变得形状不规则,部分细胞呈梭形。培养 1 周后可见大部分细胞形态更加不规则,贴壁牢固,透光性较前略差。台盼蓝染色实验、吞墨实验以及流式细胞术鉴定细胞活力及纯度,经检测活力及纯度均大于 0.92,可用于下一步实验,结果见图 1。

2.2 各组培养上清液中细胞因子的表达 KCs + LPS 组中的 KCs 经 LPS 刺激后,促炎因子 TNF- α 分泌增加,KCs + LPS + MSCs 组中的 IL-10、IL-4 分泌增加。说明 KCs + LPS + MSCs 组中的 KCs 高分泌抗炎因子 IL-4 和 IL-10,结果见图 2。

2.3 各组蛋白表达情况 KCs + LPS 组高表达 iNOS,而 KCs + LPS + MSCs 组高表达 Arg-1,KCs + LPS + MSCs 组可诱导 STAT3/STAT6 磷酸化;而 KCs +

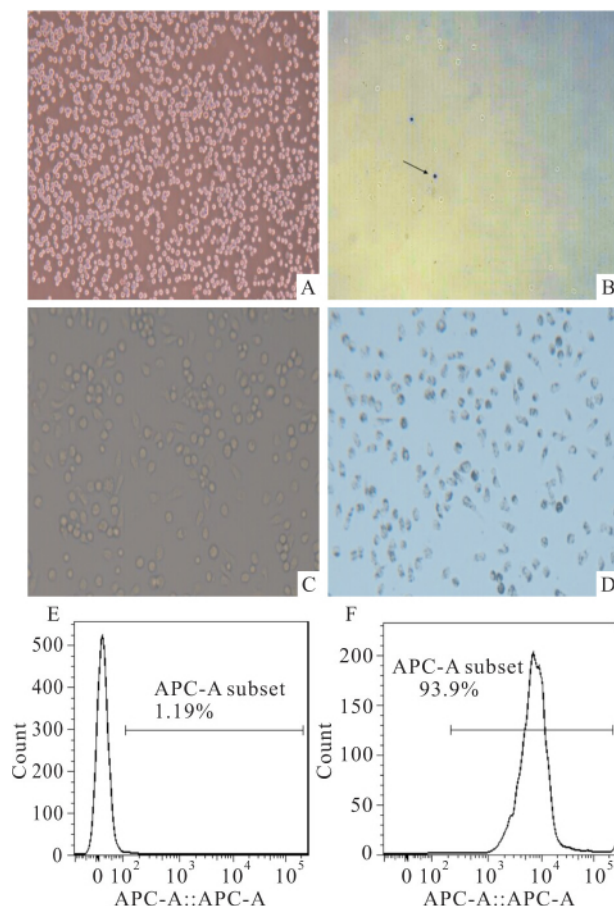


图 1 SD 大鼠 KCs 的鉴定

A: 新提取原代细胞培养 6 h KCs $\times 100$; B: KCs 台盼蓝染色图 $\times 100$; C: 原代培养 48 h KCs $\times 200$; D: KCs 吞墨实验; E: 未经 CD68 染色的正常细胞作为空白对照组; F: CD68 流式抗体染色,经流式细胞仪检测,分析细胞的纯度大于 92% ($n=3$)

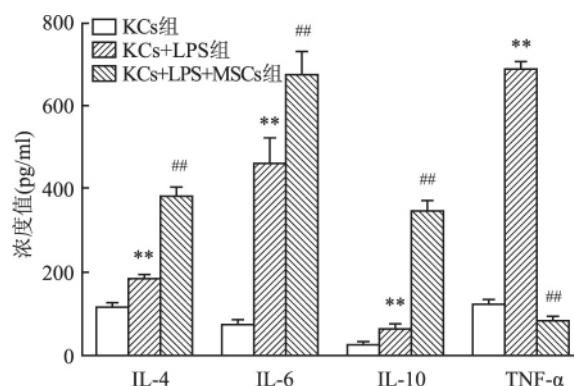


图 2 各组上清液中细胞因子水平 ($n=3$)

与 KCs 组比较: ** $P < 0.01$; 与 KCs + LPS 组比较: ## $P < 0.01$

LPS 组可诱导 NF- κ B p65 磷酸化,促进其核转位,见图 3。通过收集 KCs + LPS + MSCs 组及 KCs + LPS 组细胞 24 h 后的细胞全蛋白裂解液,经 Western blot

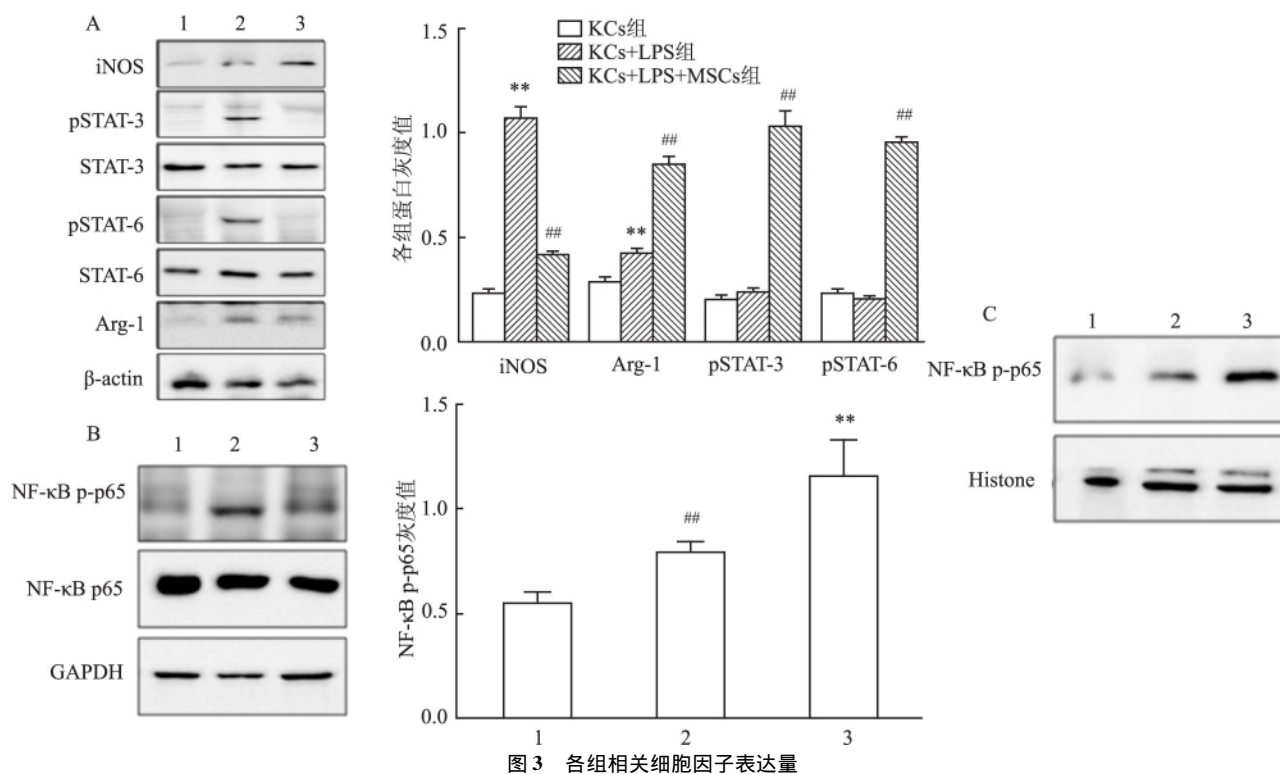


图3 各组相关细胞因子表达量

A: 各组收集全细胞裂解液用相应的抗体进行蛋白印迹实验;用灰度测定法定量分析蛋白印迹结果并比较; B: 实验各组收集细胞全蛋白裂解液(检测 NF-κB p65、NF-κB p-p65); 各组收集细胞核蛋白裂解液(NF-κB p65); 用灰度测定法定量分析核内蛋白印迹 NF-κB p-p65 结果; C: 收集细胞核蛋白裂解液(检测 NF-κB p65); 1: KCs 组; 2: KCs + LPS + MSCs 组; 3: KCs + LPS 组; 与 KCs 组比较: ** $P < 0.01$; 与 KCs + LPS 组比较: ## $P < 0.01$

检测,以正常细胞为阴性对照。实验结果表明,KCs + LPS + MSCs 组高表达 Arg-1,低表达 iNOS;而 KCs + LPS 组高表达 iNOS,低表达 Arg-1,见图3。

2.4 各组 iNOS、Arg-1、IL-10、IL-6 mRNA 水平

通过荧光实时定量 PCR 对以上结果中 iNOS、Arg-1、IL-10、IL-6 mRNA 表达水平进行验证,结果显示,KCs + LPS + MSCs 组高表达 Arg-1、IL-10 mRNA,而 KCs + LPS 组高表达 iNOS mRNA。KCs + LPS 组与 KCs + LPS + MSCs 组 IL-6 mRNA 水平差异无统计学意义,见图4。

2.5 huMSCs 促进大鼠 KCs 向 M2 方向转化 当用 LPS 诱导 KCs 时,KCs 高表达 TNF-α,并且 Western blot 检测结果显示 iNOS 高表达,提示 KCs 经 LPS 诱导后可以成功向 M1 表型转化。在此基础上,用 huMSCs 与极化的 KCs 共培养,KCs + LPS + MSCs 组高表达 Arg-1,并且上清液细胞因子 IL-10、IL-4 浓度明显增加,提示 KCs 向 M2 方向极化。以上结果经荧光实时定量 PCR 鉴定,提示 KCs 表型发生改变。为进一步研究表型转化机制,从胞质蛋白中提取 STAT-3、STAT-6、pSTAT-3、pSTAT-6 以及在核内和核外提取 NF-κB p65。结果显示,在静息状

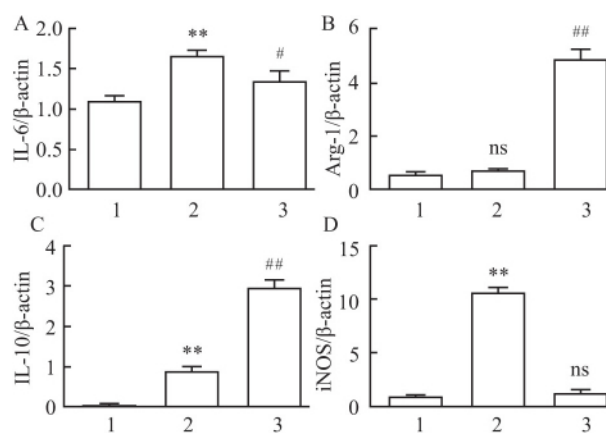


图4 各组同一时间点收集细胞后提取 RNA,

应用实时定量 PCR 分析相关基因的 mRNA 水平

1: KCs 组; 2: KCs + LPS 组; 3: KCs + LPS + MSCs 组; 与 KCs 组比较: ** $P < 0.01$; 与 KCs + LPS 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

态时,NF-κB p65 蛋白主要是位于细胞质内,LPS 能刺激 NF-κB p65 核转位增加,但与 huMSCs 共培养时发现其入核减弱,而 NF-κB p-p65 入核增多,弱化了炎症基因表达,提示其参与了 KCs 的表型转化。因此,可以得知 MSCs 通过分泌细胞因子调节 KCs

表型转化。

3 讨论

有研究者利用人骨髓 MSCs 治疗猪的爆发性肝衰竭^[6],所以利用不同种系的细胞共培养具有可行性。当肝脏发生急性炎症变化时, MSCs 条件培养基能改变白细胞浸润,通过分泌营养因子减少肝细胞凋亡,增加肝细胞的增殖,进一步发挥对炎症部位进行修复作用。MSCs 可以引起调节性 T 细胞的增加并减少树突细胞分泌 TNF- α , Th1 细胞分泌 IFN- α 和 Th-2 细胞分泌 IL-4^[7]。不论外源性或者内源性 MSCs 对巨噬细胞的极化起到明显调节作用。目前,根据巨噬细胞的功能和表型分为经典活化的 M1 型极化和选择性活化的 M2 型极化,经典激活途径的巨噬细胞通常可以由 LPS、干扰素 α 、肿瘤坏死因子和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子诱导 M1 方向极化,主要参与体内炎症反应,有促炎作用,能高分分泌 IL-1、IL-6、TNF- α ,具有高 IL-12、IL-23、低 IL-10 表型。而旁路激活途径的巨噬细胞具有清除寄生虫,促进组织修复,促进血管形成及肿瘤发展的作用。具有高 IL-10、低 IL-12、IL-23 表型,高水平清道夫受体 CD206 并高表达 Arg-1^[8],类似于 T 细胞亚群 Th1 和 Th2 亚群在炎症中的变化。众所周知, LPS 能诱导巨噬细胞向经典的 M1 型巨噬细胞偏移,但是近年巨噬细胞极化后在乙型病毒性感染所致的肝纤维化中发挥重要作用^[9]。M2 型巨噬细胞在酒精性肝病中促进肝细胞衰老^[10],所以采用 huMSCs 对 LPS 已经诱导 M1 型巨噬细胞进行干预来研究 KCs 的偏移极化。

本实验在 Transwell 内共培养 huMSCs 和 KCs 两种细胞,用 huMSCs 和经 LPS 诱导后的 KCs 共培养证明实验组 IL-10、IL-4 分泌增加,体外研究表明 MSCs 能够通过分泌 IL-10、IL-4 部分促进巨噬细胞激活途径改变,并发现 MSCs 分泌前列腺素 E2 与前列腺素 E2 受体亚型 EP4 作用后可以增加巨噬细胞 IL-10 的分泌,荧光实时定量 PCR 验证结果提示 KCs 分泌细胞抗炎因子 IL-4、IL-10 增加。本实验中 ELISA 检测提示 IL-6 在实验组升高,而 M2 表型的枯否细胞多为 IL-6 分泌减少,近年来发现 MSCs 也存在不同表型^[11],因此, MSCs 不同表型是否对巨噬细胞极化有影响值得进一步研究。从上清液 TNF- α 以及 iNOS 表达增加看,经 LPS 诱导后部分细胞已经发生 M1 极化,再与 huMSCs 细胞共培养后,经本实验验证,提示可以进一步发生 M2 极化偏移,这可

能反映从炎症到修复的一个过程,巨噬细胞 M1 和 M2 极化代表了一个广泛的、连续的巨噬细胞功能状态^[12],与不同表型的巨噬细胞在不同炎症阶段发挥不同作用相符。但也有研究^[13]表明 M2 极化的巨噬细胞能促进 M1 细胞凋亡,调节肝脏炎症反应。这说明不同表型的巨噬细胞来源及作用和调节机制需要进一步证实和验证。

目前肝脏疾病中巨噬细胞的个体发生情况仍不清楚,巨噬细胞发生极化的分子机制很复杂,包括多种信号通路参与其中,激活 NF- κ B 和 STAT1 主要促进 M1 巨噬细胞极化,而 STAT3 和 STAT6 激活促进巨噬细胞 M2 极化进一步发挥其免疫功能^[14]。其中 NF- κ B 信号蛋白的激活对于 M1 型巨噬细胞偏移极化非常重要。NF- κ B 家族含有 5 个成员: p50、p52、p65 (RELA)、RELB 和 REL 蛋白,这些蛋白二聚化可引发 NF- κ B 的入核增加,促进炎症因子表达,同时也参与细胞的生存和凋亡过程。NF- κ B 检测结果提示经 LPS 诱导后,激活 M1 型巨噬细胞并产生相关炎症介质如 TNF- α 升高, iNOS 表达增加。在试验中当 LPS 刺激后, NF- κ B p65 入核增多,但与 huMSCs 共培养时发现其入核减弱,提示其参与了 KCs 的表型转化。体外实验已经明确提示 MSCs 能诱导巨噬细胞发生 M2 极化,本研究结果显示 KCs + LPS + MSCs 组 pSTAT-3、pSTAT-6 蛋白合成增加,提示其信号转导途径与 JAK-STAT 信号通路有关。STAT-6 是 IL-4 介导的信号通路主要效应蛋白分子^[15],这与本实验中 IL-4 升高是一致的, IL-4 的升高通过各种途径进一步促进核内基因表达,介导 M2 细胞分化成熟^[16]。M2 型巨噬细胞可以通过 Arg-1 水解精氨酸,产生鸟氨酸,鸟氨酸是脯氨酸和多肽前体,与纤维化疾病相关。

总的来说,本实验证明了 huMSCs 分泌的可溶性因子诱导大鼠 KCs 向 M2 表型的转化,这一过程通过调节巨噬细胞 JAK-STAT 信号通路实现。但是,由于巨噬细胞极化的分子机制相当复杂,需要进一步实验验证。目前明确的是 MSCs 分泌的细胞因子及免疫调节作用是明确的,对进一步研究 huMSCs 应用于终末期肝病的治疗有明确的意义,同时也说明了 MSCs 细胞治疗具有独特的免疫优势,可以用于多种疾病的免疫治疗。

参考文献

- [1] Meirelles Lda S, Fontes A M, Covas D T, et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells [J].

- Cytokine Growth Factor Rev 2009 20(5 - 6) : 419 - 27.
- [2] Liaskou E ,Wilson D V ,Oo Y H. Innate immune cells in liver inflammation [J]. *Mediators Inflamm* 2012 2012: 949157.
- [3] Zhang Q Z ,Su W R ,Shi S H , et al. Human ingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing [J]. *Stem Cells* 2010 28(10) : 1856 - 68.
- [4] Kim J ,Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages [J]. *Exp Hematol* 2009 37(12) : 1445 - 53.
- [5] Dayan V ,Yannarelli G ,Billia F ,et al. Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction [J]. *Basic Res Cardiol* 2011 106(6) : 1299 - 310.
- [6] Li J ,Zhang L ,Xin J , et al. Immediate intraportal transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells prevents death from fulminant hepatic failure in pigs [J]. *Hepatology* 2012 56(3) : 1044 - 52.
- [7] Fibbe W E ,Nauta A J ,Roelofs H. Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells [J]. *Ann N Y Acad Sci* 2007 , 1106: 272 - 8.
- [8] Locati M , Mantovani A , Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity [J]. *Adv Immunol* 2013 120: 163 - 84.
- [9] Moses T B ,Cheng L ,Zhang Z ,et al. Hepatitis B virus infection and immunopathogenesis in a humanized mouse model: induction of human-specific liver fibrosis and M2-like macrophages [J]. *PLoS Pathog* 2014 10(3) : e1004032.
- [10] Wan J , Benkdane M , Alons E ,et al. M2 Kupffer cells promote hepatocyte senescence an IL-6-dependent protective mechanism against alcoholic liver disease [J]. *Am J Pathol* 2014 184(6) : 1763 - 72.
- [11] Waterman R S ,Tomchuck S L ,Henkle S L ,et al. A new mesenchymal stem cell (MSCs) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSCs1 or an immunosuppressive MSCs2 phenotype [J]. *PLoS One* 2010 5(4) : e10088.
- [12] Biswas S K ,Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages [J]. *Cell Metab* 2012 15(4) : 432 - 7.
- [13] Wan J ,Benkdane M ,Teixeira-Clerc F ,et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology* 2014; 59(1) : 130 - 42.
- [14] Sica A ,Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas [J]. *J Clin Invest* 2012 122(3) : 787 - 95.
- [15] Goenka S ,Kaplan M H. Transcriptional regulation by STAT6 [J]. *Immunol Res* 2011 50(1) : 87 - 96.
- [16] Ishii M ,Wen H ,Corsa C A , et al. Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype [J]. *Blood* 2009 114(15) : 3244 - 54.

The effect of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells on the polarization of rat Kupffer cells *in vitro*

Li Liang¹ ,Peng Qiong¹ ,Cai Yihong² ,et al

[¹*Dept of Gastroenterology ,The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University(The First People's Hospital of Hefei) ,Hefei 230001;* ²*School of Public Health ,Anhui Medical University ,Hefei 230032]*

Abstract Objective LPS-stimulated Kupffer cells (KCs) and human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (huMSCs) were co-cultured in Transwell to observe the effect of huMSCs on the polarization of KCs. **Methods**

During this study , the model of huMSCs *in vitro* co-culturing with KCs was built , and three groups were assigned , which were KCs group(normal group) ,KCs cells + LPS group(control group) , KCs + LPS + MSCs group (experimental group) . Among the three groups ,IL-4 ,TNF- α , IL-10 , IL-6 were detected by ELISA while inducible nitricoxide synthase (iNOS) , arginase-1(Arg-1) , phosphorylation reaction level of signal transducer and activator of transcription-3 p(STAT-3 ,STAT-6) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) were detected by Western bolt. After that ,qRT-PCT was adopted to check the previous results. **Results** It was found that both TNF- α and IL-6 secretion increased in the control group , while both IL-10 and IL-4 secretion increased in the experimental group. Western blot detection showed that the level of iNOS increased in the control group ,NF- κ B p65 increased in the nucleus , while the experimental group was high expression of Arg-1 , pSTAT-6 , pSTAT-3. **Conclusion** Our experiment's findings indicate that huMSCs can induce alternative activation of KCs , and the activation pathway might be the JAK-STAT pathways.

Key words mesenchymal stem cells; Kupffer cells; polarization; signaling pathway