

• 医学与免疫生物技术 •

人骨髓间充质干细胞过表达白细胞介素-34 对 THP-1 细胞的调节作用

高雪明*, 张顺*, 许兆军, 单艳, 王子鸿, 蔡挺, 江雪

宁波市第二医院, 浙江 宁波 315010

高雪明, 张顺, 许兆军, 等. 人骨髓间充质干细胞过表达白细胞介素-34 对 THP-1 细胞的调节作用. 生物工程学报, 2017, 33(4): 642-652.

Gao XM, Zhang S, Xu ZJ, et al. Effects of interleukin-34 expressed by human bone marrow derived mesenchymal stem cells on THP-1 cells. Chin J Biotech, 2017, 33(4): 642-652.

摘要: 构建人 IL-34 真核表达载体并将其转染到人骨髓间充质干细胞, 观察高表达 IL-34 的骨髓间充质干细胞对 THP-1 细胞的影响。PCR 扩增 IL-34 DNA, 并将其克隆到真核表达载体 pIRES2-EGFP; 将构建成功的重组体转染到骨髓间充质干细胞, Western blotting 和 ELISA 分析 IL-34 在细胞中的表达; 用高表达 IL-34 的骨髓间充质干细胞培养上清液来培养 THP-1 细胞, Real-time PCR 分析 THP-1 细胞中 IL-10 和 TNF α 的表达变化。经双酶切和测序鉴定, 成功构建了 pIRES2-EGFP-IL-34 重组体; 转染至骨髓间充质干细胞的 IL-34 可以促进 THP-1 细胞表达 IL-10 和 TNF α 。结果表明, 骨髓间充质干细胞表达分泌的 IL-34 对 THP-1 有调节作用。

关键词: 人骨髓间充质干细胞, 白细胞介素-34, THP-1 细胞, 白细胞介素-10, 肿瘤坏死因子- α

Received: August 30, 2016; **Accepted:** January 18, 2017

Supported by: Ningbo Municipal Natural Science Foundation (No. 2016A610139), Project of Scientific Innovation Team of Ningbo (No. 2011B82016).

Corresponding author: Zhaojun Xu. Tel: +86-574-83870439; E-mail: zhaojunxuguest@163.com

* These authors contributed equally to this study.

宁波市自然科学基金 (No. 2016A610139), 宁波科技创新团队项目 (No. 2011B82016) 资助。

网络出版时间: 2017-02-16

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170216.1024.001.html>

Effects of interleukin-34 expressed by human bone marrow derived mesenchymal stem cells on THP-1 cells

Xueming Gao^{*}, Shun Zhang^{*}, Zhaojun Xu, Yan Shan, Zihong Wang, Ting Cai, and Xue Jiang

Ningbo No.2 Hospital, Ningbo 315010, Zhejiang, China

Abstract: To construct recombinant eukaryotic expression plasmid vector of human IL-34 gene, and to study the effects of IL-34 expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) on THP-1 cells. Full-length IL-34 encoding sequence was amplified by PCR. And this fragment was cloned into the plasmid pIRES2-EGFP. Western blotting and ELISA were used to analyze the expression of IL-34 in hBM-MSCs. THP-1 cells were cultured with hBM-MSCs medium containing IL-34 protein. Real-time PCR detected the effects of IL-34 on the expression of IL-10 and TNF α in THP-1 cells. Restrictive enzyme analysis and sequencing demonstrated that IL-34 eukaryotic expression vector was successfully constructed. IL-34 protein expressed by hBM-MSCs could promote IL-10 and TNF α expression in THP-1 cells. Those results show that IL-34 expressed by hBM-MSCs has regulating effect on THP-1 cells.

Keywords: human bone marrow derived mesenchymal stem cells, IL-34, THP-1 cells, IL-10, TNF α

近十几年来, 研究发现间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs) 可以促进慢性创伤愈合, 并且已经应用于临床试验, 同时研究者发现 MSCs 也可以促进烧伤和放射损伤创面愈合^[1-4]。MSCs 作用于伤口, 可以加速伤口愈合并促进肉芽组织和血管形成^[5]。MSCs 在促进伤口愈合过程中并不是通过分化并替代损伤的组织来修复创面, 而是通过分泌可溶性细胞因子来调节多种细胞应答皮肤损伤。MSCs 通过分泌细胞因子和生长因子促进血管再生、减少细胞死亡率并促进创面处疤痕形成^[6]。MSCs 也可以分泌免疫抑制因子来抑制免疫细胞增殖, 如 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞。外源性 MSCs 能够促进伤口愈合、肉芽组织形成和新血管形成; 进一步研究发现 MSCs 通过分泌细胞因子调节巨噬细胞、角质细胞、真皮成纤维细胞和上皮细胞, 进而促进伤口愈合^[5]。

尽管已经有研究发现 MSCs 可以募集巨噬细胞到达创面处^[7], 但是两种细胞之间的作用关系并不清楚。研究者利用牙龈间充质干细胞研究发现, 在体外 MSCs 与巨噬细胞共培养可以促进巨噬细胞分化为具有抗炎作用的 M2 型巨噬细胞, 这些巨噬细胞具有较强的吞噬功能, 并且可以分泌抗炎因子以及抑制促炎因子的表达^[8]。有学者用骨髓间充质干细胞进行研究得到相同的效果^[9-11]。在 MSCs-巨噬细胞共培养体系中抑制白细胞介素 6 (Interleukin-6, IL-6) 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的活性可以抑制 M2 巨噬细胞的形成, 这说明 MSCs 分泌的这些细胞因子在调节巨噬细胞表型过程中有重要作用。

虽然 MSCs 可以趋化巨噬细胞并促进巨噬细胞表型转换, 但是对于其中的具体机制尚不完全清楚。特别是近年来发现白细胞介素 34

(Interleukin-34, IL-34), 它作为一个新的细胞因子, 和巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 以及 GM-CSF 都可以调节巨噬细胞的功能。M-CSF 和 IL-34 有共同的受体 CSF-1R, 这两个因子都可以诱导单核细胞分化为 IL-10(高)IL-12(低) 免疫调节巨噬细胞, 这种细胞与卵巢癌中的肿瘤相关巨噬细胞类似。M-CSF 诱导型巨噬细胞 (M-CSF-M ϕ)、IL-34 诱导型巨噬细胞 (IL-34-M ϕ) 和肿瘤相关巨噬细胞都可以促进 CD4(+)T 细胞分化为 CCR4(+)CCR6(+)CD161(+)Th17 细胞, 而 GM-CSF 诱导型巨噬细胞可以促进其分化为 Th1 细胞; 膜型 IL-1 α 可以调节记忆 T 细胞分化为 Th17 细胞, M-CSF、IL-34 诱导型巨噬细胞和肿瘤相关巨噬细胞都可以表达膜型 IL-1 α ^[12]。因此证明巨噬细胞通过促进 CD4(+)T 细胞极化来调节免疫应答。研究发现 IL-34 蛋白可以刺激单核细胞分化为 CD14(高)CD163 (高)CD1a(-) 巨噬细胞; 受 LPS 刺激后, IL-34-M ϕ 转变为 IL-10(高)IL-12(低) M2 表型, 同时共刺激分子 CD80 和 CD86 表达降低, 因此 IL-34-M ϕ 对 T 细胞的激活作用欠佳, 具有潜在的免疫抑制作用; IL-34-M ϕ 和 M-CSF-M ϕ 的表型及功能相似, 但是 IL-34-M ϕ 的形成是通过 CSF-1R 介导的, 而不依赖于 M-CSF, IL-6 可以促进该细胞形成; IFN γ 和 GM-CSF 都可以抑制 IL-34 诱导单核细胞分化为免疫抑制型巨噬细胞, 此外, IFN γ 还可以促进 IL-34-M ϕ 转变为免疫调节型 M ϕ ^[13]。

为了研究 IL-34 在人骨髓间充质干细胞 (hBM-MSCs) 调节巨噬细胞功能过程中的作用, 特别是 hBM-MSCs 高表达 IL-34 对单核巨噬细胞的影响, 我们构建 IL-34 真核表达载体 pIRES2-EGFP-IL-34, 然后将该载体转染到 hBM-MSCs 中, 利用转染 pIRES2-EGFP-IL-34

的 BM-MSCs 上清液培养 THP-1 细胞, Real-time PCR 分析白细胞介素-10 (IL-10) 和肿瘤坏死因子 α (TNF α) 在 THP-1 细胞中的表达变化。研究结果将为进一步探究 IL-34 对单核/巨噬细胞的调节作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人骨髓组织标本取自于宁波市第二医院风湿免疫科病人, 实验开展前已经取得病人同意, 并经宁波市伦理委员会批准; THP-1 细胞购自上海中科院细胞库。pIRES2-EGFP 和大肠杆菌 DH5 α 购自上海 Invitrogen 公司。pcDNA3.1-IL-34 为本实验室保存。

1.2 试剂

RNA 提取试剂盒 RNeasy Mini Kit 购自 QIAGEN 公司。PrimeScriptTM RT Master Mix、Prime ATAR Max DNA polymerase、EcoR I、BamH I、DL2000 DNA marker、SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Tli RNase H Plus) 和 DNA Ligation Kit Ver.2.1 购自 TaKaRa 公司。Gel Extraction Kit、Endo-Free Plasmid Mini Kit 和 Plasmid Mini Kit I 购自 OMEGA 公司。NanoFectin Transfection Reagent 购自上海依科赛生物制品有限公司。抗生素、胎牛血清、胰酶和分化培养基购自 GIBCO 公司。干细胞培养基购自 Sciencell 公司。流式抗体购自优宁维生物科技有限公司。油红 O、甲苯胺蓝和茜素红购自 Solarbio 公司。SANTA CRUZ 鼠抗人 IL-34 单克隆抗体 (sc-517217)。WB 试剂购自上海生工生物有限公司。ELISA 试剂盒购自上海桥杜生物有限公司 (REN001)。细菌培养基购自 OXOID 公司。实验过程中用到的所有引物由华大测序公司合成 (表 1)。

表 1 Real-time PCR 引物序列

Table 1 Sequences of the primers for real-time PCR

Primer name	Primer sequences (5'-3')
IL-34-foward	GCAGAATGAGGAGTGCACTG
IL-34-reverse	ACCAAGACCCACAGATACCG
TNF α -foward	CCATGTTGTAGCAAACCTCAA
TNF α -reverse	CTTGAAGAGGACCTGGGAGTAG
IL-10-foward	TCCATTCCAAGCCTGACCAC
IL-10-reverse	ATCCCTCCGAGACTGGAA
GAPDH-foward	GGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT
GAPDH-reverse	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC

1.3 pIRES2-EGFP-IL-34 质粒的构建与鉴定

利用 Primer 5 设计一对 IL-34 特异性引物, 上游引物: 5'-CCGGAATTCGCCACCATGCCCCGGGCTT-3', 引物序列含有一个 *EcoR* I 酶切位点和一个 Kozak 序列; 下游引物: 5'-CGCGGATCCTCAGGGCAAGAGGCCCTCGC-3', 引物序列含有 1 个 *Bam*H I 酶切位点。

以本实验室保存的 pcDNA3.1-IL-34 质粒为模板, 用上述引物扩增出 IL-34 表达序列, 利用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 将目的基因和 pIRES2-EGFP 空载体分别进行酶切, 待酶切结束后, 进行电泳回收; 将回收的 IL-34 基因和 pIRES2-EGFP 大片段进行连接, 然后转化 DH5 α 感受态菌株; 将转化后的 DH5 α 菌株涂布于含有卡那霉素的平板, 37 °C 培养 12–16 h, 观察菌落生长状态, 并挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 挑取经 PCR 鉴定为阳性的菌落并接种到含抗生素的 LB 培养基中, 过夜培养并提取质粒, 然后进行酶切鉴定, 送华大公司进行测序鉴定。

1.4 hBM-MSCs 分离培养及鉴定

用 PBS 缓冲液与骨髓组织液 1:1 混合, 缓慢颠倒均匀, 向干净无菌的 15 mL 离心管中加入 3 mL Ficoll 分离液, 然后再向离心管中缓慢

加入稀释后的骨髓液 6 mL, 2 000 r/min 离心 15 min, 将中间层的白色细胞轻轻吸取并转移到新的离心管中, 用 PBS 缓冲液清洗细胞 2 次, 最后用 Sciencell 完全干细胞培养基将细胞混合吹散, 接种到培养皿中。CO₂ 浓度为 5%, 37 °C 培养, 12–24 h 观察细胞生长情况, 同时更换培养基, 去除未贴壁的细胞, 每间隔 3 d 更换一次培养基, 待细胞汇合度达到 80% 时, 进行细胞传代。

当细胞培养至第 3 或 4 代, 消化并收集细胞, 进行流式分析鉴定以及分化鉴定。取部分细胞, 分别孵育 CD90、CD105、CD73、CD79a、CD34、CD11b、CD19、CD14、CD45 和 HLA-DR 抗体, 上机检测细胞表面标记性分子的表达情况; CD90、CD105 和 CD73 在细胞表面阳性表达, 而其他的标记分子则阴性表达。另外再取一部分细胞, 分成 3 组, 分别进行成脂、成软骨和成骨分化培养, 培养后分别用油红 O、甲苯胺蓝和茜素红进行染色鉴定。

1.5 IL-34 基因在 hBM-MSC 中的表达分析

复苏培养 hBM-MSC 细胞, 当细胞密度达到 90% 时, 将细胞转接到 6 孔板中。分别用 LPS (100 ng/mL) 和 TNF α (100 ng/mL) 刺激培养 hBM-MSC。培养 6 h、24 h 和 48 h 后提取细胞总 RNA, 经逆转录合成 cDNA。Real-time PCR 分析 hBM-MSC 细胞中 IL-34 表达变化。

1.6 pIRES2-EGFP-IL-34 转染 hBM-MSCs 及表达

提取无内毒素 pIRES2-EGFP-IL-34 和 pIRES2-EGFP 质粒。复苏 hBM-MSCs 培养汇合度至 80% 传代, 细胞换液, 2 h 后按照 NanoFectin Transfection Reagent 说明书操作, 将两种质粒分别转染至 hBM-MSCs。培养 24 h 后, 观察荧光蛋白在细胞中的表达情况。培养 48 h 后收集细

胞培养上清液备用，提取细胞总蛋白，Western blotting 检测 IL-34 蛋白在 hBM-MSCs 中的表达情况。实验所使用的一抗为 SANTA CRUZ 鼠抗人 IL-34 单克隆抗体 (sc-517217)，抗体使用浓度为 1 : 500；二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG，使用浓度为 1 : 8 000；ECL 显色拍照。利用收集到的细胞培养上清液进行 ELISA 实验，检测 IL-34 蛋白在培养液中的浓度。

1.7 转染 pIRES2-EGFP-IL-34 的 hBM-MSCs 培养上清液对 THP-1 细胞的影响

用上述收集的两种上清液 (pIRES2-EGFP-

hIL-34+hBM-MSCs 和 pIRES2-EGFP+hBM-MSCs) 分别培养 THP-1 细胞，分别在 24 h 和 48 h 收集 THP-1 细胞并提取总 RNA，经逆转录合成 cDNA，然后 Real-time PCR 检测两组 THP-1 细胞中 IL-10 和 TNF α 的表达变化。

2 结果与分析

2.1 IL-34 真核表达载体构建

pIRES2-EGFP 载体 (图 1A) 用来构建 IL-34 基因真核表达载体。在 pIRES2-EGFP 载体的多克隆位点 (MCS) 和增强型绿色荧光蛋

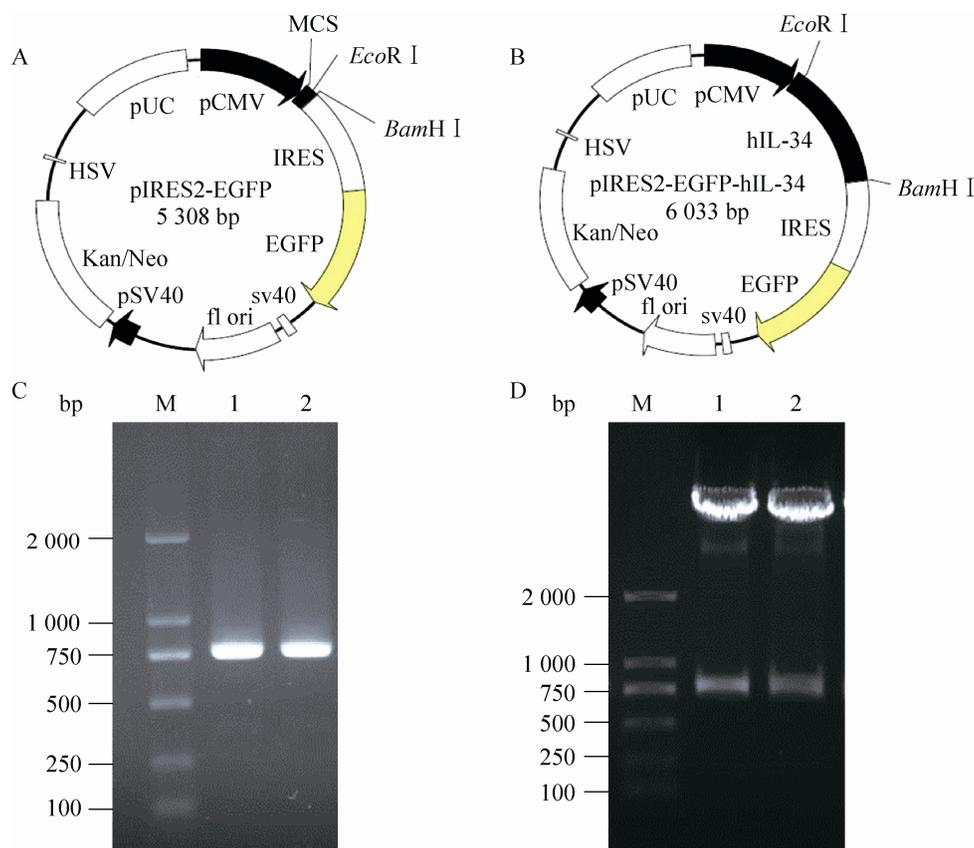


图 1 重组质粒 pIRES2-EGFP-IL-34 构建结果

Fig. 1 The results of pIRES2-EGFP-IL-34 construction. (A) Plasmid map of pIRES2-EGFP. (B) Plasmid map of pIRES2-EGFP-IL-34. (C) The products of colony PCR. (D) pIRES2-EGFP-IL-34 digested with *EcoR* I and *BamH* I.

白 (EGFP) 编码区之间含有一段脑心肌炎病毒的内部核糖体进入序列 (IRES), 因此可以使 MCS 中插入的外源基因和 EGFP 在同一条 mRNA 上进行翻译。在 pIRES2-EGFP 载体中还含有卡那霉素和新霉素编码基因, 用于克隆筛选和稳定细胞表达株筛选。

通过 PCR 特异性扩增出 IL-34 基因编码序列 726 bp, 然后与 pIRES2-EGFP 载体分别进行 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切, 将 IL-34 基因片段与 pIRES2-EGFP 载体连接 (图 1B)。将连接产物转化到 DH5 α 感受态中, 涂布在含有卡那霉素的平板筛选阳性克隆。菌落 PCR 可以扩增出一条约 750 bp 的片段 (图 1C); 重组质粒经双酶切可以形成两条片段, 小片段大小约为 750 bp (图 1D); 将重组质粒送测序, 测序结果与 GenBank 中的 IL-34 序列 (GenBank Accession No. NM_152456.2) 对比完全匹配。

2.2 hBM-MSCs 分离培养及鉴定

利用 Ficoll 分离液从骨髓组织中分离单核细胞, 然后接种在细胞培养皿中, 培养 24 h 后换液, 观察细胞形态, hBM-MSCs 为成纤维状。细胞培养生长至汇合度为 80% 时, 进行传代, 细胞培养至第 3 代用于流式鉴定以及多向分化鉴定。分别检测细胞上 CD90、CD105、CD73、CD79a、CD34、CD11b、CD19、CD14、CD45 和 HLA-DR 标记性分子的表达情况, 分别检测细胞向脂肪、成骨和软骨分化的能力。结果显示我们分离出的细胞 90% 以上表达 CD90、CD105 和 CD73, 而 CD79a、CD34、CD11b、CD19、CD14、CD45 和 HLA-DR 几乎不表达 (图 2A), 并且该细胞可以向脂肪、成骨和软骨分化 (图 2B), 这说明我们成功地分离出 hBM-MSCs。

2.3 IL-34 基因在 hBM-MSCs 中的表达分析

分别用 LPS 和 TNF α 刺激培养 hBM-MSCs, 在培养 6 h、24 h 和 48 h 后提取总 RNA 并逆转录合成 cDNA。Real-time PCR 分析细菌脂多糖 (LPS) 和 TNF α 在不同时间对 hBM-MSCs 表达 IL-34 的影响。结果发现在不同时间段 LPS 可以显著抑制 IL-34 的 mRNA 的表达; 而 TNF α 可以明显刺激 IL-34 mRNA 表达 (图 3)。

2.4 pIRES2-EGFP-IL-34 在 hBM-MSCs 中的表达

将 pIRES2-EGFP-IL-34 转染 hBM-MSCs 后, 24 h 观察细胞中有绿色荧光表达 (图 4A, B); 经 Western blotting 鉴定, pIRES2-EGFP-IL-34 可以在 hBM-MSCs 中高表达 IL-34 蛋白质; 我们利用 SANTA CRUZ 鼠抗人单克隆抗体 (sc-517217) 1:500 浓度 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育以及成像仪曝光检测在未转染的 hBM-MSCs 中也有微量的 IL-34 蛋白 (图 4C)。ELISA 结果证明 hBM-MSCs 可以表达并分泌 IL-34, 重组载体 pIRES2-EGFP-IL-34 可以在 hBM-MSCs 中高表达 IL-34 并分泌到细胞外 (图 4D)。

2.5 hBM-MSCs 高表达 IL-34 促进 THP-1 细胞表达 IL-10 和 TNF α

用转染 pIRES2-EGFP-IL-34 的 hBM-MSCs 的细胞培养上清液培养 THP-1 细胞, 然后提取总 RNA, Real-time PCR 分析 IL-10 和 TNF α 的表达变化。与对照组相比, 高表达 IL-34 的 hBM-MSCs 上清液培养 THP-1 细胞 48 h 后可以明显地刺激 THP-1 表达 IL-10 和 TNF α (图 5)。结果说明我们不仅成功地克隆了 IL-34 真核表达载体, 同时该载体可以在 hBM-MSCs 中表达具有活性的 IL-34 蛋白。

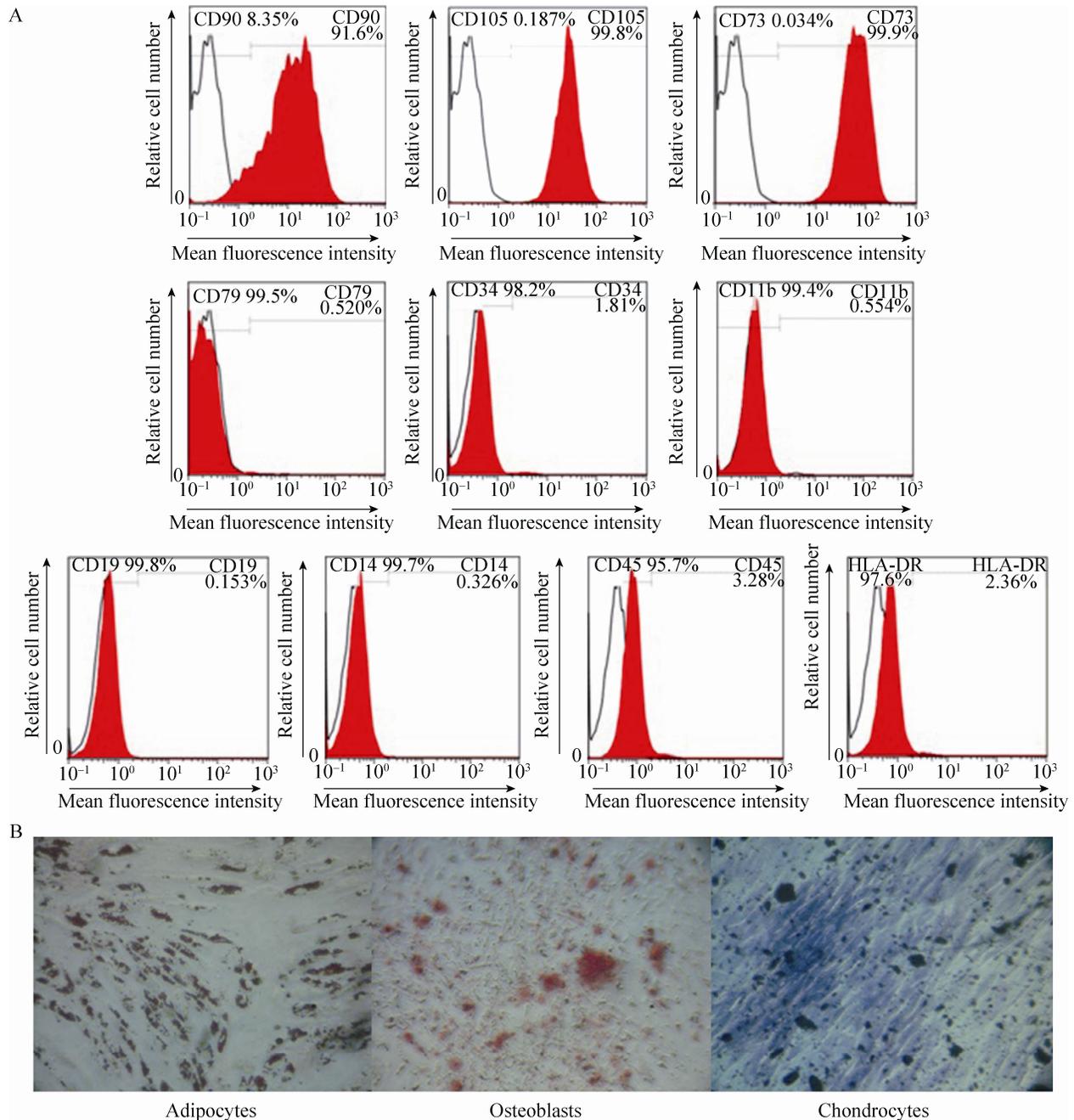


图 2 hBM-MSCs 表面标记物流式细胞术鉴定和三系分化结果

Fig. 2 The flow cytometry results of cell surface markers on hBM-MSCs, and the ability of hBM-MSCs differentiate into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes. (A) The hBM-MSCs exhibit a $CD90^+CD105^+CD73^+$ and $CD79a^-CD34^-CD11b^-CD19^-CD14^-CD45^-HLA-DR^-$ phenotype. (B) The hBM-MSCs could differentiate into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes.

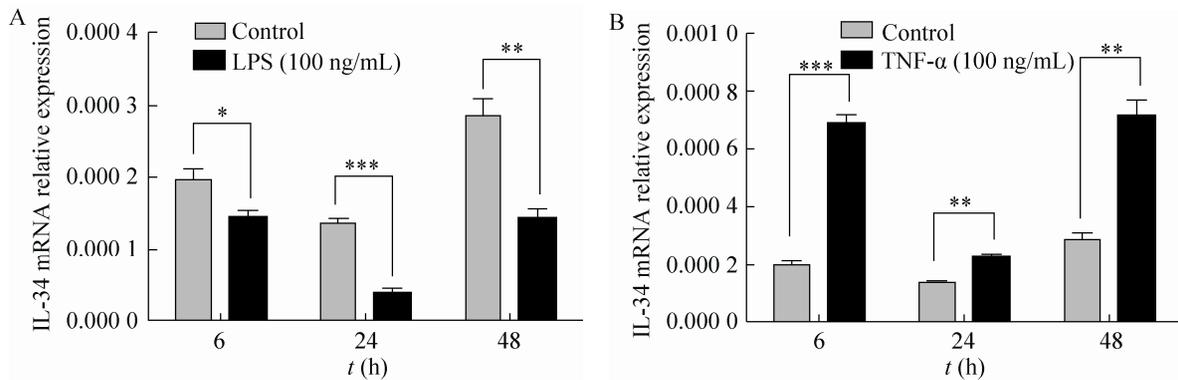


图3 Real-time PCR 分析 IL-34 在 hBM-MSCs 中的表达分析

Fig. 3 Analysis of IL-34 expression in hBM-MSCs by real-time PCR. The expression of IL-34 mRNA was significantly decreased after LPS stimulation. The level of IL-34 mRNA in hBM-MSCs can be obviously increased by TNF α . * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001.

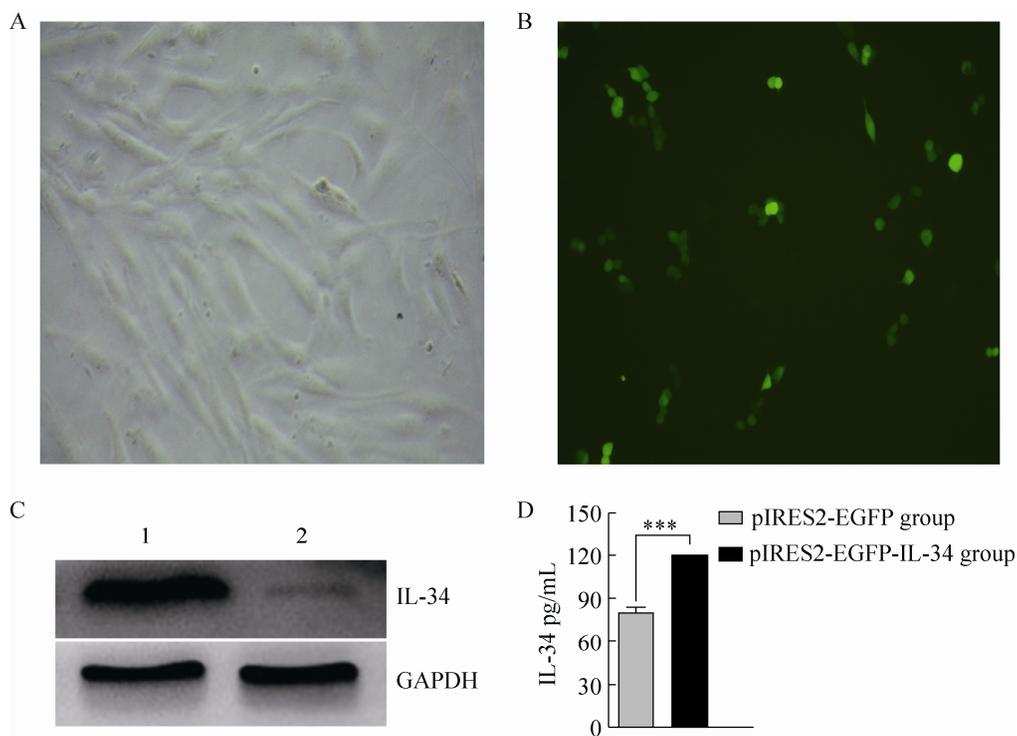


图4 pIRES2-EGFP-IL-34 在 hBM-MSCs 细胞中的表达

Fig. 4 The results of pIRES2-EGFP-IL-34 expression in hBM-MSCs. (A) MSCs were derived from human bone marrow. (B) The expression of green fluorescence protein was analyzed by fluorescence microscope in hBM-MSCs. (C) The expression of IL-34 protein was analyzed by Western blotting in hBM-MSCs after 48 h. 1: pIRES2-EGFP-IL-34 group, 2: pIRES2-EGFP group. (D) ELISA analyzed the expression of IL-34 in hBM-MSCs. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001.

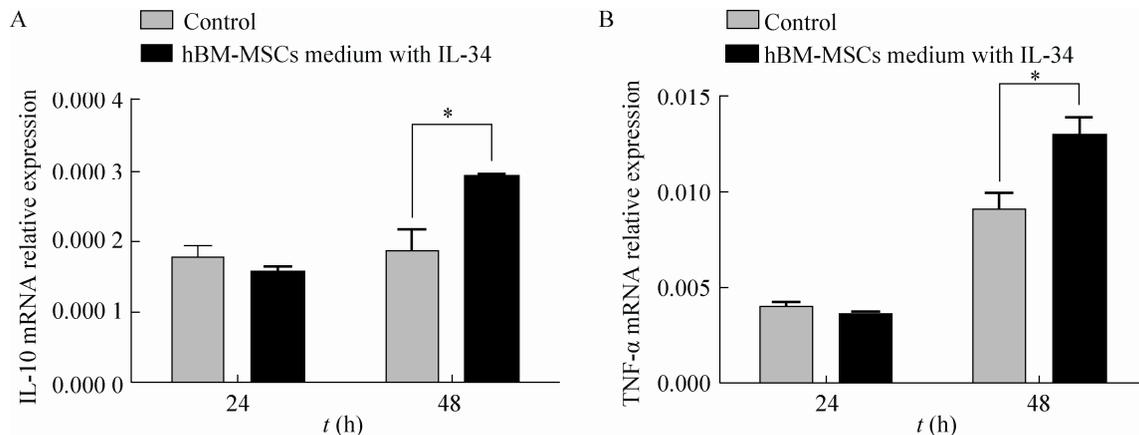


图5 hBM-MSCs 过表达 IL-34 促进 THP-1 细胞表达 IL-10 (A) 和 TNF α (B)

Fig. 5 IL-34 expressed by hBM-MSCs could promote IL-10 (A) and TNF α (B) expression in THP-1 cells. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001.

3 讨论

IL-34 是一个新发现的细胞因子,它与 M-CSF 没有同源序列,但是它们有共同的受体 CSF-1R,这两种细胞因子的生物学功能相似但不完全相同^[14]。IL-34 可以通过与受体 CSF-1R 结合来调节单核细胞和巨噬细胞的增殖、分化及生存^[12-13,15]。研究证明,IL-34 不仅参与调节细胞生物活性,而且在多种炎症性疾病的发生和发展过程中也起重要作用^[16-17]。IL-34 在很多组织中都有表达,多种炎症因子都可以诱导 IL-34 表达。Kawabe 等^[18]发现 TNF α 可以刺激牙周膜细胞表达 IL-34 和 M-CSF。Ciccia 等^[17]用 TNF α 刺激 MC3T3-E1 细胞 15 min 后,核转录因子 NF- κ B 从细胞质转移到细胞核,同时 IL-34 的表达量升高;利用 NF- κ B 抑制剂 CAPE 可以明显抑制 TNF α 诱导 IL-34 表达,因此证明 TNF α 是通过转录因子 NF- κ B 诱导 IL-34 的表达。Boström 等^[19]发现 IL-34 在牙龈成纤维细胞中表达, TNF α 和 IL-1 β 刺激牙龈成纤维细胞,通过

调节 NF- κ B 和 JNK 信号分子使 IL-34 mRNA 表达量增高。

Eda 等^[20]用 IL-1 β 、IL-6、IL-17 和 TNF α 4 种炎症因子分别刺激成骨细胞后,只有 IL-1 β 和 TNF α 可以显著诱导细胞表达 IL-34 mRNA; IL-1 β 和 TNF α 可以激活细胞内 MAPKs 通路 (p44/42 MAPK、p38、JNK 和 NF- κ B 等信号分子); JNK 抑制剂可以显著抑制 IL-1 β 和 TNF α 诱导 IL-34 mRNA 表达,而 MEK-1/2 抑制剂不能抑制 IL-34 mRNA 表达,令人惊奇的是,两种抑制剂同时作用可以更明显地抑制 IL-34 mRNA 表达; IL-1 β 和 TNF α 也可以诱导成骨细胞表达 M-CSF mRNA, p38、JNK 和 MEK-1/2 抑制剂对其表达并没有影响,但是 NF- κ B 抑制剂可以显著抑制 M-CSF mRNA 表达。上述结果说明炎症性因子 IL-1 β 和 TNF α 是通过 JNK 和 P44/42 MAPK 信号通路诱导成骨细胞表达 IL-34,而不是通过 P38 通路;p38 和 JNK 等信号分子并不参与诱导 M-CSF 表达。我们的研究结果也证实了 TNF α 可以促进 IL-34 的表达;在

本研究结果中,我们发现 LPS 可以显著抑制 IL-34 表达,但是作用机制尚不清楚。有研究表明 LPS 与炎症细胞(包括单核/巨噬细胞)上的受体结合后,可启动一系列快速反应,最终导致 p38 MAPK 的激活,进而作用于下游的激酶、转录因子等靶蛋白^[21-25]。但是根据已知结果证明 IL-34 表达并不受 p38 途径调控,LPS 对 IL-34 的具体调控机制有待进一步深入研究。

为了探究 IL-34 在 hBM-MSCs 调节巨噬细胞表型过程中的作用机制,我们首先将 IL-34 基因克隆到 pIRES2-EGFP 载体中,并在 hBM-MSCs 中表达 IL-34 蛋白质。我们利用转染 pIRES2-EGFP-IL-34 的 hBM-MSCs 培养上清液培养 THP-1 细胞,结果证明 pIRES2-EGFP-IL-34 载体可以在 hBM-MSCs 中表达具有生物活性的 IL-34 蛋白质,在此过程中,IL-34 蛋白可以促进 THP-1 细胞表达 IL-10 和 TNF α 。IL-34 可以通过 ERK 促进肠固有层单核细胞表达 TNF α ^[26],但是对于 IL-34 促进 IL-10 表达的作用机制还不清楚。综上所述,我们成功地构建了 IL-34 在 hBM-MSCs 中的表达体系,这为后续研究 hBM-MSCs 对巨噬细胞表型的调节作用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] U.S. National Institutes of Health Registry of Clinical Trials. <http://clinicaltrials.gov>.
- [2] Butler KL, Goverman J, Ma H, et al. Stem cells and burns: review and therapeutic implications. *J Burn Care Res*, 2010, 31(6): 874–881.
- [3] François S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells*, 2006, 24(4): 1020–1029.
- [4] Benderitter M, Gourmelon P, Bey E, et al. New emerging concepts in the medical management of local radiation injury. *Health Phys*, 2010, 98(6): 851–857.
- [5] Hocking AM, Gibran NS. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res*, 2010, 316(14): 2213–2219.
- [6] Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: two steps forward, one step back. *Trends Mol Med*, 2010, 16(5): 203–209.
- [7] Chen LW, Tredget EE, Wu PYG, et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS ONE*, 2008, 3(4): e1886.
- [8] Zhang QZ, Su WR, Shi SH, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem Cells*, 2010, 28(10): 1856–1868.
- [9] Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol*, 2009, 37(12): 1445–1453.
- [10] Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS ONE*, 2010, 5(2): e9252.
- [11] Ohtaki H, Ylostalo JH, Foraker JE, et al. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(38): 14638–14643.
- [12] Foucher ED, Blanchard S, Preisser L, et al. IL-34- and M-CSF-induced macrophages switch memory T cells into Th17 cells *via* membrane IL-1 α . *Eur J Immunol*, 2015, 45(4): 1092–1102.
- [13] Foucher ED, Blanchard S, Preisser L, et al. IL-34 induces the differentiation of human monocytes

- into immunosuppressive macrophages antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ . *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e56045.
- [14] Lin HS, Lee E, Hestir K, et al. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science*, 2008, 320(5877): 807–811.
- [15] Chihara T, Suzu S, Hassan R, et al. IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ*, 2010, 17(12): 1917–1927.
- [16] Hwang SJ, Choi B, Kang SS, et al. Interleukin-34 produced by human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis supports osteoclastogenesis. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(1): R14.
- [17] Ciccia F, Alessandro R, Rodolico V, et al. IL-34 is overexpressed in the inflamed salivary glands of patients with Sjögren's syndrome and is associated with the local expansion of pro-inflammatory CD14^{bright}CD16⁺ monocytes. *Rheumatology*, 2013, 52(6): 1009–1017.
- [18] Kawabe M, Ohyama H, Kato-Kogoe N, et al. Expression of interleukin-34 and colony stimulating factor-1 in the stimulated periodontal ligament cells with tumor necrosis factor- α . *Med Mol Morphol*, 2015, 48(3): 169–176.
- [19] Boström EA, Lundberg P. The newly discovered cytokine IL-34 is expressed in gingival fibroblasts, shows enhanced expression by pro-inflammatory cytokines, and stimulates osteoclast differentiation. *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e81665.
- [20] Eda H, Shimada H, Beidler DR, et al. Proinflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α , induce expression of interleukin-34 mRNA *via* JNK- and p44/42 MAPK-NF- κ B pathway but not p38 pathway in osteoblasts. *Rheumatol Int*, 2011, 31(11): 1525–1530.
- [21] Teed HJ, Mcgrath BP, Desilva L, et al. Isoflavones reduce arterial stiffness: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(6): 1066–1071.
- [22] Fessler MB, Malcolm KC, Duncan MW, et al. A genomic and proteomic analysis of activation of the human neutrophil lipopolysaccharide and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 2002, 277(35): 31291–31302.
- [23] Ma W, Lim W, Gee K, et al. The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter *via* the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *J Biol Chem*, 2001, 276(17): 13664–13674.
- [24] Mancuso G, Midri A, Beninati C, et al. Mitogen-activated protein kinases and NF- κ B are involved in TNF- α responses to group B *Streptococci*. *Immunol*, 2002, 169(3): 1401–1409.
- [25] Dean JL, Brook M, Clark AR, et al. p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem*, 1999, 274(1): 246–269.
- [26] Franzè E, Monteleone I, Cupi ML, et al. Interleukin-34 sustains inflammatory pathways in the gut. *Clin Sci*, 2015, 129(3): 271–280.

(本文责编 郝丽芳)