

脐带间充质干细胞通过调节IL-6延缓小鼠银屑病样皮损的研究

李政楠, 王秀娟, 李 伟, 牟春琳, 杨 莹, 金 星, 徐永胜*

天津长和生物技术有限公司, 天津 301925

摘要: 目的 通过咪喹莫特 (IMQ) 乳膏涂抹诱导产生银屑病样皮损的小鼠模型, 观察人源脐带间充质干细胞 (hUC-MSCs) 对其整体和局部作用效果。方法 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组和 hUC-MSCs 组, 模型组和 hUC-MSCs 组每日定时在小鼠裸露背部涂抹 5% IMQ 乳膏 62.5 mg, 对照组涂抹凡士林。在开始涂抹前 1 天 (0 d) 和涂抹后的第 6 天, 对照组和模型组 sc 200 μ L 的生理盐水, hUC-MSCs 组每只小鼠 sc 2×10^6 个 hUC-MSCs。采用银屑病样皮损面积和疾病严重指数 (PASI) 评分标准观察银屑病样小鼠模型皮损变化情况; 通过 HE 染色观察表皮层厚度, 角质层角化程度及炎性细胞浸润程度; 采集小鼠的静脉血, 试剂盒法检测血清白细胞介素-6 (IL-6) 的浓度, 评估小鼠炎症反应。结果 hUC-MSCs 组与同期模型组比较, 皮损症状轻, 通过 PASI 积分趋势图可见, hUC-MSCs 能延缓皮损出现, 同时减缓皮损严重程度, 加快皮损部分的恢复; HE 染色显示, hUC-MSCs 组角化不全的细胞明显减少, 红细胞外溢真皮层增生和炎性细胞浸润程度明显低于模型组, 造模后 6 d 表皮层厚度显著低于模型组 ($P < 0.01$); hUC-MSCs 组血清 IL-6 浓度在造模后的第 12 天显著低于模型组。结论 银屑病样小鼠模型 sc hUC-MSCs 后能延缓银屑病的发生, 并减轻银屑病症状, 加快银屑病样皮损部分的恢复, 可能通过调节 IL-6 发挥免疫调节作用。

关键词: 银屑病; 脐带间充质干细胞; 咪喹莫特; 白细胞介素-6; 炎症

中图分类号: R329 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 12-2375-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.12.003

Effect of umbilical cord mesenchymal stem cells on psoriasis-like mice model

LI Zhengnan, WANG Xiujuan, LI Wei, MOU Chunlin, YANG Ying, JIN Xing, XU Yongsheng

Ever Union Biotechnology Company Limited, Tianjin 301925, China

Abstract: Objective To observe the global and local effects of umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) on psoriasis-like lesions in mice induced by imiquimod (IMQ). **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group and hUC-MSCs group. Umbilical cord mesenchymal stem cells of 2×10^6 were sc before and 6 days after IMQ administration, and saline was sc to mice in control and model group. The skin lesions of psoriasis-like mice were observed by PASI score; the thickness of epidermis, the degree of keratinization and the infiltration of inflammatory cells were observed by HE staining; venous blood of mice was collected to detect the concentration of IL-6 to evaluate the inflammatory reaction of mice. **Results** Compared with the model group of the same period, the skin lesion symptom of hUC-MSCs injection group was lighter, the PASI score was lower than that of the model group at the same time. The number of dyskeratosis cells was significantly reduced, the degree of erythrocytic overflow, dermal hyperplasia and inflammatory cell infiltration in hUC-MSCs injection group was significantly lower than that in model group. The thickness of epidermis in the model group was significantly lower than that in the model group 6 days after modeling ($P < 0.01$). IL-6 concentration was significantly lower than that in model group on the 12th day after IMQ treatment. **Conclusion** hUC-MSCs can delay the occurrence of psoriasis, relieve the symptoms of psoriasis and accelerate the recovery of psoriasis like lesions in psoriasis like mice, it may play an immunomodulatory role by regulating IL-6.

Key words: psoriasis; umbilical cord mesenchymal stem cells; imiquimod; IL-6; inflammation

银屑病又称牛皮癣, 是常见的一种由过度活化的免疫细胞介导的以表皮细胞过度增殖与异常分化为特征的炎症性皮肤病, 欧美患病率为 1%~3%, 我国 1984 年报告患病率为 0.123%, 2008 年调查 6 个

收稿日期: 2020-11-11

基金项目: 国家重点研发计划“干细胞及转化研究”重点专项(2019YFA0112100); 天津市科技计划项目(17ZXXYSY00020)

*通信作者: 徐永胜, 临床医学博士。E-mail: brian.xu@chinaucbio.com

城市患病率为0.47%^[1]。临床表现为红色丘疹或斑块覆有多层银白色鳞屑的皮损,全身均可发病。除了累及皮肤附属器官和黏膜,银屑病还会并发代谢综合征、心血管疾病(如心肌梗死、卒中、高血压)等多系统疾病^[2]。银屑病是由多基因遗传、多环境因素刺激诱导的慢性复发性疾病,目前尚无完全根治的手段,采取适当的对症治疗可以控制症状。现代医学主要采取光疗、局部用药治疗、系统治疗或生物疗法,但仍存在不同程度的毒副作用、疗效差、易复发、价格昂贵等问题。脐带间充质干细胞(UC-MSCs)通过直接的物理接触,以及最为重要的旁分泌作用产生多种生长因子、黏附分子、趋化因子等,募集、动员或抑制T淋巴细胞、B淋巴细胞直至整个免疫系统,在治疗皮肤炎症相关疾病中起关键作用^[3-4]。本研究通过咪喹莫特(IMQ)乳膏涂抹建立银屑病样小鼠模型,探讨MSCs对银屑病的整体和局部治疗效果,为其临床应用提供试验依据。

1 材料

1.1 动物

6周龄健康成年C57BL/6小鼠20只,SFP级,初始体质量20g左右,雄性,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2011-0029。

1.2 主要试剂

咪喹莫特乳膏(批号17010139),购自四川明欣药业有限责任公司;伊红染色液(批号20170515)、苏木素染色液(批号20170201),购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Mouse白细胞介素(IL)-6 ELISA Kit(批号20670614),购自MultiSciences公司。人源脐带间充质干细胞(hUC-MSCs),由天津长和生物技术有限公司GMP实验室生产制备。脐带供者已签署用于科学研究的捐献知情同意书,经传染病检测合格。采集的脐带组织经剪切后进行爬片分离,经传代扩增后制备成 2×10^7 cells/mL生理盐水细胞悬液,批号为M2017051101、M2017051801,经无菌、支原体、内毒素、流式表型等质检合格后用于本实验。

2 方法

2.1 小鼠银屑病模型的建立^[5]

C57BL/6小鼠ip戊巴比妥钠(80 mg/kg)麻醉,刮除其背部毛发,形成约3 cm×4 cm大小的暴露区域,单笼饲养1 d后按组别分别给予药物处理。全部小鼠随机分为对照组、模型组和hUC-MSCs组,对照组6只,模型组和hUC-MSCs组各7只。对照

组每日定时在小鼠裸露背部涂抹适量凡士林,模型组和hUC-MSCs组每日定时在小鼠裸露背部涂抹5% IMQ乳膏62.5 mg。在开始涂抹前1 d(0 d)和涂抹后的第6天,对照组和模型组sc 200 μ L的生理盐水, hUC-MSCs组每只小鼠sc 2×10^6 个hUC-MSCs^[6]。

2.2 小鼠银屑病样皮损面积和疾病严重程度观察及评分

每日拍摄并记录各组小鼠银屑病样皮损面积形态,依据银屑病样皮损面积和疾病严重指数(PASI)评分^[7]标准,给予小鼠皮损处红斑、鳞屑及浸润增厚程度0~4的积分,将3者积分相加定义为总积分,即得到PASI评分。对各小鼠PASI评分绘制皮损积分趋势线,观察小鼠皮损的变化情况。

2.3 HE染色

各组小鼠在造模第6、12天取材,经脱颈处死,在每只小鼠背部相同部位剪取皮损处组织,固定于10%多聚甲醛溶液中制备石蜡切片,进行HE染色。显微镜观察HE染色后的切片,采用NIS-Elements F软件,在相同的曝光时间下记录切片的染色情况。将拍摄的照片导入Image J软件,利用测量工具,随机检测表皮5个不同部位的厚度,并计算平均厚度。

2.4 血清IL-6 ELISA检测

在持续涂抹IMQ乳膏的第6、12天,分别对每组3只小鼠采用摘眼球方法取血,并用干净的EP管收集血液,置于室温1 h后,4 000 r/min离心15 min,取上清,即得到血清样本,按ELISA试剂盒说明书进行IL-6含量检测。

3 结果

3.1 hUC-MSCs对银屑病样小鼠模型皮损形成的影响

模型组和hUC-MSCs组在涂抹IMQ乳膏1 d后皮肤即可观察到红斑。随后,模型组的皮肤红斑快速出现,第3天后红斑已经非常明显,而hUC-MSCs注射组背部红斑在第4天达到较严重程度。两组的皮肤红斑在第7天开始逐渐消退。

模型组小鼠皮肤在涂抹IMQ乳膏后第2天出现细微鳞屑,第3天逐渐增多,成片、成层,在第5天最严重,随后逐渐缓解,在第8天开始只有细小的鳞片。hUC-MSCs组的鳞屑出现时间较模型组晚,但是在第5、6天的时候也达到了严重状态,随后也开始缓解。

模型组小鼠皮损处的皮肤增厚也是在涂抹IMQ乳膏后第2天出现开始,增厚逐渐明显,在第5天的时候,皮肤隆起极为明显。在第7天后开始逐

渐缓解,但是隆起仍然明显。hUC-MSCs组皮肤变厚的时间较模型组晚1 d出现,在涂抹IMQ乳膏后的6 d内,增厚程度都低于模型组。在第9天后,皮肤增厚的情况明显缓解。

通过PASI积分趋势图可见,hUC-MSCs能延缓皮损出现,同时减缓皮损严重程度,加快皮损部分的恢复。皮损部分观察及PASI积分见图1。

3.2 小鼠皮损组织学改变

在持续涂抹IMQ乳膏6 d后,发现模型组和hUC-MSCs组的表皮都显著增厚,模型组的角质层出现角化不全,真皮层增生和炎性细胞浸润现象明显,并伴有红细胞外溢,类似银屑病样皮损组织学表现。与对照组比较,模型组小鼠表皮厚度显著增加($P < 0.001$);与模型组比较,hUC-MSCs组小鼠角化不全的细胞明显减少,表皮层厚度显著低于模型组($P < 0.01$)。在持续涂抹IMQ乳膏12 d后,模型组和hUC-MSCs组的小鼠皮肤厚度较第6天都有所恢复,两组表皮厚度没有显著差异,但模型组真皮

增生,炎性细胞浸润等现象仍较hUC-MSCs组明显。结果见图2。

3.3 小鼠血清IL-6水平检测

目前认为银屑病是由T淋巴细胞产生的一系列细胞因子共同作用引起的,IL-6是一个具有多种潜能的细胞因子,可能作为角质形成细胞的生长因子,银屑病表皮的过度增生可能部分是由于IL-6的过度产生导致的^[8]。正常血清样本中IL-6的浓度低而不能检测,在IMQ乳膏处理第12天的模型组中,IL-6含量能被检测,平均质量浓度为90.96 pg/mL,而同期的hUC-MSCs组不能检测出。结果表明hUC-MSCs可能通过调节IL-6发挥免疫调节作用。见图3。

4 讨论

IMQ是构建皮炎模型常用的药物,作为Toll样受体激动药,其与表皮浆细胞样树突状细胞及巨噬细胞内的TLR7结合,分泌大量的干扰素 α 以及多种白细胞介素致动物表皮角化过度、角化不全、棘层肥厚、血管生成和炎症细胞浸润等组织病理学改

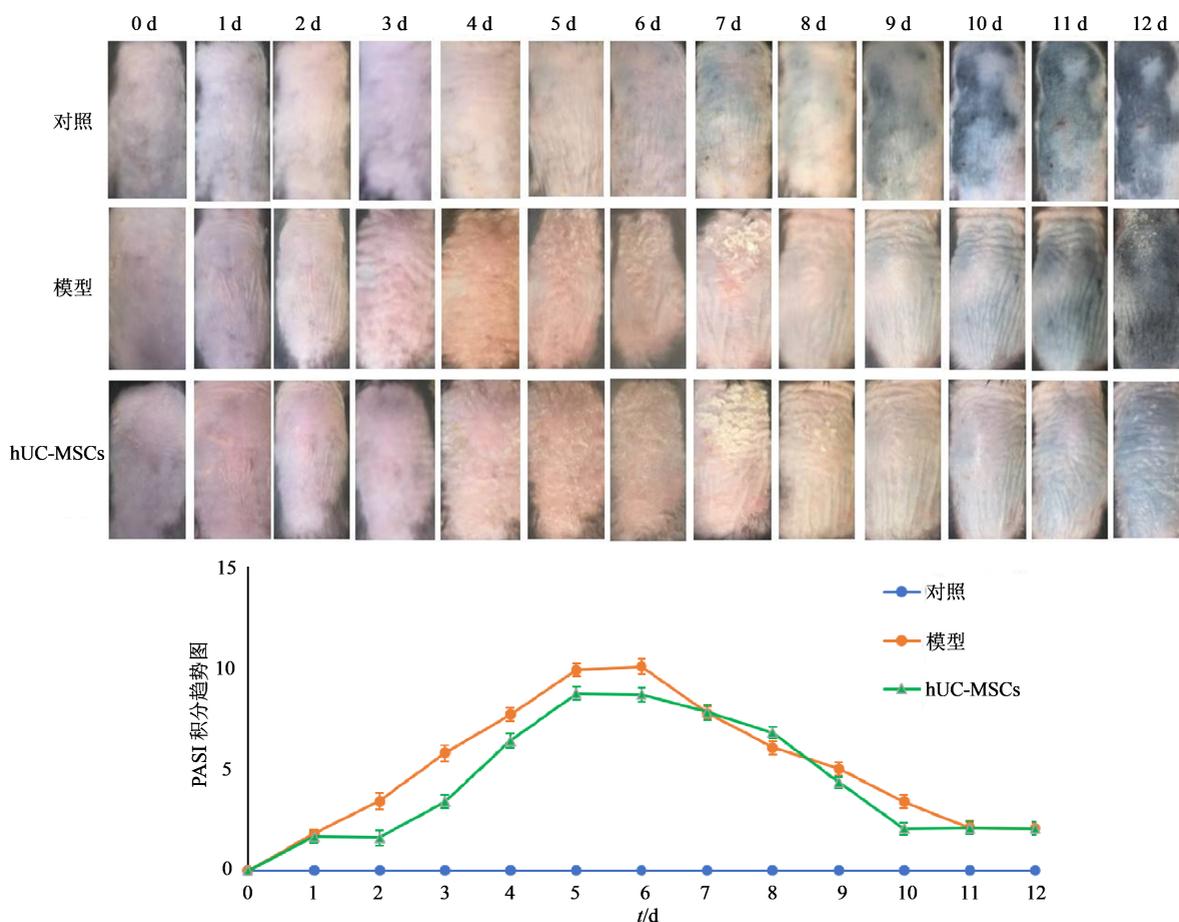
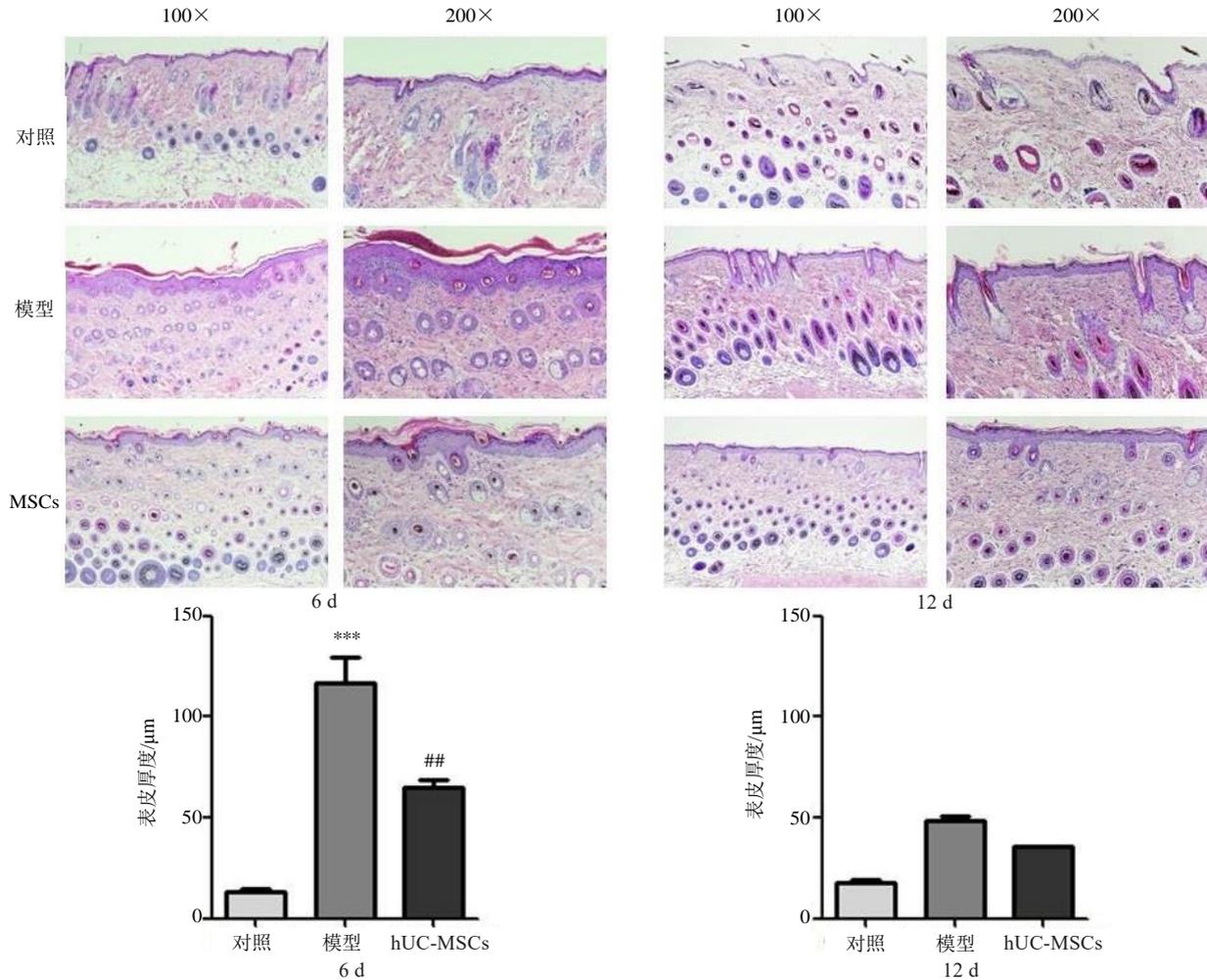


图1 小鼠皮损观察

Fig. 1 Observation of skin lesions in mice



与对照组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:## $P < 0.01$
 *** $P < 0.001$ vs control group;## $P < 0.01$ vs model group

图2 小鼠皮损组织学观察

Fig. 2 Histological observation of skin lesions in mice

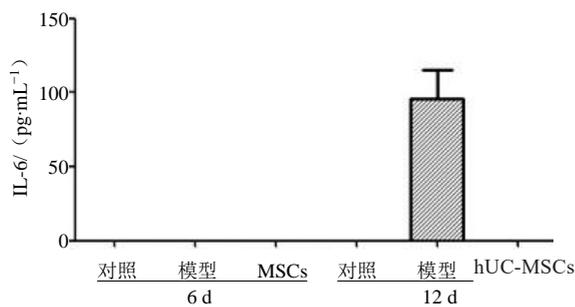


图3 小鼠血清中IL-6的含量测定

Fig. 3 Determination of IL-6 in serum of mice

变^[9],持续用IMQ乳膏涂抹小鼠裸露皮肤6~8 d,小鼠皮肤出现红斑、鳞屑、增厚现象,类似银屑病样皮损,即为造模成功^[6-7]。银屑病样皮损动物模型在皮损形态、组织病理学结构、免疫细胞功能以及细胞因子表达等方面与人类银屑病相似度较高,能较好地模拟人体银屑病的发生^[7]。

研究发现,在银屑病的发病机制中,Th1细胞和

Th17细胞起到推进作用,而Th2细胞相反。在易感因素的作用下,树突状细胞活化,初始T细胞在IL-12、IL-23细胞因子作用下分化为Th1细胞和Th17细胞,产生大量的TNF- α 、IFN- γ 、IL-17、IL-22等细胞因子刺激角质形成细胞增生活化,产生一系列趋化因子和IL-6、TNF- α 等细胞因子,诱导促炎症活动,导致皮肤内出现大量炎症细胞的浸润,表皮角质形成细胞的过度增殖,真皮乳头微血管的过度增生,临床上逐渐出现银屑病典型的皮疹——鳞屑性红斑^[10]。

间充质干细胞是中胚层来源的、具有高度自我更新能力和多向分化潜能的多能干细胞。其来源广泛,包括骨髓、脂肪、牙髓、滑膜、脐带、胎盘、羊水及胎儿组织等。除了能分化为组织细胞修复组织损伤外,最为重要的旁分泌作用产生多种生长因子、黏附分子、趋化因子等,募集、动员或抑制T淋巴

细胞、B淋巴细胞直至整个免疫系统,从而介导了固有免疫应答和适应性免疫应答。间充质干细胞活性因子在免疫系统中发挥重要的调控作用,包括前列腺素E₂(PGE₂),人类白细胞抗原G5(HLA-G5)、肝细胞生长因子(HGF)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、吡啶胺2,3-双加氧酶(IDO)、转化生长因子- β (TGF- β)、白细胞抑制因子(LIF)、IL-4、IL-6、IL-8,趋化因子(CXCL12)等^[11],是目前可用于皮肤免疫炎症相关疾病临床治疗的关键成分。在银屑病治疗中,这些因子发挥独特的临床疗效。同时,UC-MSCs还能够抑制Th1细胞和Th17细胞,促进Th1型细胞向Th2型细胞转换;抑制单核向不成熟树突细胞(iDC)和进一步向成熟DC(mDC)分化;活化Treg细胞,表达FoxP3、CTLA-4和CD69等分子,抑制细胞过度增殖;促进诸如IL-10、PGE₂等的分泌,抑制过度活化的免疫细胞^[3-4]。由此可见,UC-MSCs通过多种机制在治疗银屑病方面发挥了作用。

间充质干细胞因其来源广泛,可规模化生产,低免疫原性,已经成为移植领域和自身性免疫疾病治疗的研究热点,具有广阔的临床应用前景,是继造血干细胞之后又一类已经在世界范围内广泛开展临床试验的干细胞类型。随着安全性和有效性的深入研究,间充质干细胞或可成为银屑病治疗的新途径。

本研究通过在小鼠背部涂抹IMQ乳膏构建银屑病样小鼠模型,sc hUC-MSCs可以缓解银屑病的发生,并减轻银屑病症状,加快银屑病样皮损部分的恢复,可能通过调节IL-6发挥免疫调节作用。研究结果为hUC-MSCs治疗银屑病提供了实验动物方面的证据,为临床上使用hUC-MSCs治疗银屑病奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] 中华医学会皮肤性病学分会银屑病专业委员会. 中国银屑病诊疗指南(2018) [J]. 中华皮肤科杂志, 2019, 52(4): 223-230.
- [2] 陈文娟, 彭琛, 丁杨峰, 等. 银屑病共病的研究进展 [J]. 中华皮肤科杂志, 2020, 53(2): 147-151.
- [3] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing [J]. Stem Cells, 2007, 25(11): 2739-2749.
- [4] Castro-Manrreza M E, Montesinos J J. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications [J]. J Immunol Res, 2015: 394917.
- [5] Domala A, Bale S, Godugu C. Protective effects of nanoceria in imiquimod induced psoriasis by inhibiting the inflammatory responses [J]. Nanomedicine, 2020, 15(1): 5-22.
- [6] Sah S K, Park K H, Yun C O, et al. Effects of human mesenchymal stem cells transduced with superoxide dismutase on imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice [J]. Antioxid Redox Signal, 2016, 24(5): 233-248.
- [7] 赵京霞, 底婷婷, 王燕, 等. 5种常用药物对咪喹莫特诱导小鼠银屑病样皮损模型形成的影响 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2014, 28(3): 234-239.
- [8] 范团起, 李卫红. L-6及TNF- α 与寻常性银屑病的关系 [J]. 医药论坛杂志, 2006, 27(12): 34-37.
- [9] 赖奇伟. 咪喹莫特诱发银屑病的机制研究新进展 [J]. 中国当代医药, 2013, 20(20): 25-27.
- [10] Nestle F O, Kaplan D H, Barker J. Psoriasis [J]. N Engl J Med, 2009, 361(5): 496-509.
- [11] Lai R C, Chen T S, Lim S K, et al. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease [J]. Regen Med, 2011, 6(4): 481-92.