

CD44阳性人脐带间充质干细胞扰乱大鼠血小板稳态研究

杜伟¹, 杨雪^{1, 2}, 安康^{3, 4}, 梅小利¹, 何白英^{5, 6}, 龙成燕¹, 于冰^{3, 4}, 黄崇刚^{1, 2*}

1. 重庆市中药研究院/重庆市药物安全评价中心, 重庆 400065

2. 重庆中医药学院, 重庆 402760

3. 山东省药物研究院, 山东 济南 250062

4. 山东第一医科大学(山东省医学科学院), 山东 济南 250062

5. 重庆南郊医院, 重庆 400055

6. 重庆悦目可爱生命健康科技有限公司, 重庆 400054

摘要: 目的 基于生物信息分析与动物实验探讨人脐带间充质干细胞(hUCMSCs)与机体血小板稳态的关系。方法 运用DisGeNET、GeneCards、STRING 11.5等数据库,分析hUCMSCs诱发血小板减少的靶点及通路。将SD大鼠随机区组分为5组:阴性对照组(0.9%氯化钠注射液)、溶媒对照(80 mg·kg⁻¹白蛋白)组和hUCMSCs高、中、低剂量(1.0×10⁷、5×10⁶、2.5×10⁶个·kg⁻¹,分别为临床等效剂量的10.0、5.0、2.5倍)组,每组6只,雌雄各半。每周按10 mL·kg⁻¹尾iv 1次,共4次,与临床拟用方法一致。全自动血液分析仪分析血小板相关的指标:血小板计数(PLT)、血小板压积(PCT)、血小板分布宽度(PDW)、平均血小板体积(MPV);剖取大鼠胸骨,取骨髓,制备骨髓涂片,瑞特-吉姆萨复合染液染色,光学显微镜下计数全片巨核细胞总数、产血小板巨核细胞数;测量脾脏总长度;苏木精-伊红(HE)和过碘酸-雪夫(PAS)染色脾脏作组织病理学检查;实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析肝脏促血小板生成素(TPO)、血小板生成素受体(Mpl)、Krüppel样因子1(Klf1)、Friend白血病整合素1(FLII)、GATA结合蛋白1(GATA1)mRNA变化。结果 hUCMSCs与血小板减少相关的靶点有209个,作用于158条信号通路,与血小板生成最密切的通路为造血细胞谱通路,包含了20个靶点。以平均连接度筛选出14个核心靶点:IL6、TNFRSF11A、CD34、KIT、IL4、CSF2、CSF3、IL3、IL2RA、TPO、EPO、TFRC、CD44、IL11。CD44既是核心靶点又是hUCMSCs阳性表面标志物。与阴性对照、溶媒对照组比较,hUCMSCs高、中、低剂量组PLT、PCT显著降低($P < 0.05$),PDW、MPV差异无统计学意义;hUCMSCs组全片巨核细胞总数、产血小板巨核细胞数差异无统计学意义;hUCMSCs高、中剂量组脾脏长度显著增加($P < 0.05$);PAS染色见hUCMSCs高、中剂量组脾脏血小板储存增加;hUCMSCs高、中、低剂量组肝脏组织TPO、Mpl、Klf1 mRNA表达显著增加($P < 0.05$),FLII、GATA1 mRNA表达变化不显著。结论 CD44⁺hUCMSCs可能通过促脾脏吞噬血小板,增加血小板在脾脏中储存,使血液中PLT、PCT减少,从而扰乱血小板稳态。

关键词: 人脐带间充质干细胞; 血小板减少症; 网络药理学; 表面标志物; CD44; 脾脏

中图分类号: R329.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)01-0092-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.01.013

CD44⁺ human umbilical cord mesenchymal stem cells disrupt platelet homeostasis in rats

DU Wei¹, YANG Xue^{1, 2}, AN Kang^{3, 4}, MEI Xiaoli¹, HE Baiying^{5, 6}, LONG Chengyan¹, YU Bing^{3, 4}, HUANG Chonggang^{1, 2}

1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing Drug Safety Evaluation Center, Chongqing 400065, China

2. Chongqing College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 402760, China

3. Shandong Institute of Pharmaceutical Research, Jinan 250062, China

4. Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China

5. Nan Jiao Hospital of Chongqing City, Chongqing 400055, China

6. Chongqing Attractiveness & Distinctiveness Health Technology Co., Ltd., Chongqing 400054, China

收稿日期: 2022-09-24

基金项目: 重庆市技术创新与应用发展专项(cstc2020jscx-lyggX0004)

第一作者: 杜伟, 工程师, 研究方向为新药药理毒理研究。E-mail: 361521169@qq.com

*通信作者: 黄崇刚, 研究员, 研究方向为新药药理毒理研究。E-mail: hcg2091@163.com

Abstract: Objective To explore the relationship between human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) and platelet homeostasis based on biological information analysis and animal experiments. **Methods** DisGeNET, GeneCards and STRING 11.5 databases were used to analyze the targets and pathways of hUCMSCs induced thrombocytopenia. SD rats were randomly divided into five groups: Negative control group (0.9% sodium chloride injection), solvent control group (80 mg·kg⁻¹ albumin) and hUCMSCs high, medium and low dose groups (1.0 × 10⁷, 5 × 10⁶, 2.5 × 10⁶·kg⁻¹, which were 2.5, 5.0 and 10.0 times of the clinical equivalent dose, respectively) with 6 in each group, half male and half female. 10 mL·kg⁻¹ tail iv was applied once a week for four times, which was consistent with the proposed clinical method. Platelet count (PLT), platelet pressure (PCT), platelet distribution width (PDW), and mean platelet volume (MPV) were analyzed by automatic hematology analyzer. The rat sternum was dissected and bone marrow was extracted. Bone marrow smears were prepared and stained with Reiter-Giemsa composite dye solution. The total number of megakaryocytes and platelet-producing megakaryocytes in the whole film were counted under the optical microscope. Total spleen length was measured. The spleen was stained with HE and PAS for histopathological examination. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to analyze the mRNA changes of liver thrombopoietin (*TPO*), thrombopoietin receptor (*Mpl*), Kruppel-like factor 1 (*Klf1*), Friend leukemia integrin 1 (*FLII*) and GATA binding protein 1 (*GATA1*). **Results** hUCMSCs had 209 targets related to thrombocytopenia, acting on 158 signal pathways. The most closely related pathway to platelet formation was the hematopoietic cell lineage, which contains 20 targets. Based on the average connectivity, 14 core targets were screened: IL6, TNFRSF11A, CD34, KIT, IL4, CSF2, CSF3, IL3, IL2RA, TPO, EPO, TFRC, CD44 and IL11. CD44 was both a core target and a positive surface marker of hUCMSCs used in this study. Compared with negative control and solvent control group, PLT and PCT of hUCMSCs high, medium and low dose groups were significantly decreased ($P < 0.05$), and PDW and MPV differences were not statistically significant. There was no significant difference in the total number of megakaryocytes and the number of platelet-producing megakaryocytes in hUCMSCs group. Spleen length in hUCMSCs high-dose and medium-dose groups was significantly increased ($P < 0.05$). PAS staining showed increased platelet storage in spleen of hUCMSCs high-dose and medium-dose groups. The mRNA level of *TPO*, *Mpl* and *KLF1* in liver tissues of hUCMSCs high, medium and low dose groups were significantly increased ($P < 0.05$), while the mRNA level of *FLII* and *GATA1* were not significantly changed. **Conclusion** CD44⁺ hUCMSCs may promote the spleen to phagocytize platelets, increase the storage of platelets in the spleen, reduce PLT and PCT in the blood, and thus disturb the platelet homeostasis.

Key words: human umbilical cord mesenchymal stem cells; thrombocytopenia; network pharmacology; cell surface markers; CD44; spleen

由于间充质干细胞(MSCs)能够自我更新并且具有多向分化的潜能,成为当前干细胞研究的热点。目前研究较多的MSCs主要来源于骨髓、脐血、脐带、外周血和脂肪组织,不同组织来源的MSCs在分子表型和分化潜能等各方面不尽相同^[1]。与其他组织来源的MSCs相比,人脐带间充质干细胞(hUCMSCs)具有一定的优势,如取材简单、来源广泛、伦理争议小、更易体外扩增等,应用前景广阔^[2-3]。临床应用需要确定hUCMSCs的安全性。然而,目前对hUCMSCs的安全性认识还存在不足。本课题组注意到在非临床研究中有报道hUCMSCs静脉多次注射后诱发血小板减少的现象^[4],但不清楚hUCMSCs影响了血小板稳态的何种因素,即hUCMSCs是减少了血小板生成还是增加了血小板在脾脏的储存或血小板破坏。hUCMSCs虽是单一细胞,目前的药效研究却几乎涵盖了机体大部分的器官,呈多靶点特征。故本研究,采用生物信息分析方法筛选出hUCMSCs诱发血小板减少的核心靶点,并通过动物实验验证,以期进一步认识

hUCMSCs与机体血小板稳态的关系,为hUCMSCs临床应用提供安全性方面的参考。

1 材料

1.1 动物实验

SPF级SD大鼠30只,体质量120~160 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证SCXK(京)2021-0001。动物饲养于符合GLP规范的实验室,自由摄取饲料与饮水。伦理审查单位为重庆市中药研究院实验动物福利伦理审查委员会,伦理编号YLS2021-26。

1.2 药物

hUCMSCs(山东省药物研究院),细胞活率 $\geq 90\%$,镜检可见细胞贴壁生长、呈螺旋样或指纹样,基因测序显示为单一细胞来源,流式细胞术检测细胞表面标志物,以 $\geq 95\%$ 判定CD73、CD90、CD105、CD29、CD44、CD106为阳性,以 $\leq 2\%$ 判定CD34、CD45、CD31、CD14、CD19为阴性,无细菌或真菌生长。

药物配制与配制后质控:以常规的方法复苏细胞,洗涤,用生理盐水稀释至 1×10^6 、 5×10^5 、 $2.5 \times$

10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,加入白蛋白使质量浓度为 $8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。配制后用移液器取 $54\text{ }\mu\text{L}$ hUCMSCs混悬液母液与 0.4% 台盼蓝染液以 $9:1$ 比例混匀,染色 3 min 后,吸取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 经过染色的细胞加入一次性细胞计数板凹槽内,使用自动细胞计数仪计数。计数结果与理论密度差(RE)在 $\pm 15\%$ 内,细胞存活率 $\geq 85\%$,符合使用要求。

1.3 仪器及试剂

Mass2000 图象处理系统,四川大学图象处理国家研究所;CFX Connect Real-Time System, BIO RAD 公司;XT-2000i 全自动动物血液分析仪,日本 SYSMEX 株式会社;Biowave DNA 分光光度计,英国 WPA 公司。

瑞特-吉姆萨复合染液,成都铂思泰科技公司;过碘酸-雪夫(PAS)染色试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;TRIzol 试剂盒,上海源叶生物科技有限公司。白蛋白,Grifols Biologicals LLC;台盼蓝染液,北京索莱宝科技有限公司。

2 方法

2.1 生物信息分析

2.1.1 hUCMSCs 与血小板减少的相关分析 运用了本课题组之前报道的方法并参考了数据处理平台的使用说明^[5-6]。以“Human umbilical cord mesenchymal stem cells”为检索词,在 GeneCards 数据库中获取 hUCMSCs 的相关靶点,筛选得分为 30.00 以上靶点,得到目前 hUCMSCs 的相关研究靶点,即药物靶点。以“thrombocytopenia”为检索词,在 DisGeNET 数据库中获取血小板减少的相关靶点,即疾病靶点。将药物靶点与疾病靶点于 jvenn 数据处理平台取交集,即得 hUCMSCs 可能诱发血小板减少的靶点,并进一步将交集的靶点导入 STRING 11.5 数据平台进行作用信号通路分析。选取 $F < 0.01$ 且与血液系统密切相关的 1 条信号通路,分析通路中各靶点连接度,以连接度在平均值以上的靶点作为核心靶点。

2.1.2 hUCMSCs 阳性表面标志物与血小板减少核心靶点相关性分析 由于“2.1.1”项没有考虑本研究使用 hUCMSCs 的特征,故进行核心靶点与 hUCMSCs 阳性表面标志物相互作用分析。将“2.1.1”得到的核心靶点依次导入 BioGPS 数据库,设定种属为人类,查看是否与 hUCMSCs 阳性表面标志物相关。

2.2 实验动物给药

2.2.1 剂量设计 根据国家药品监督管理局《药物

重复给药毒性研究技术指导原则》(2014年)和文献报道^[7],设计 hUCMSCs 低剂量组 2.5×10^6 个 $\cdot\text{kg}^{-1}$,为临床等效剂量的 2.5 倍,中、高剂量组按照 2 倍数设置,剂量为 1×10^7 个 $\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 5×10^6 个 $\cdot\text{kg}^{-1}$ 。由于 hUCMSCs 配制过程使用了白蛋白作为溶媒,设计溶媒对照组($80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),另设置阴性对照组,给予 0.9% 氯化钠注射液。

2.2.2 给药 将大鼠随机区组分为 5 组,每组 6 只,雌雄各半。每周按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 尾 iv 1 次,共 4 次,与临床拟用方法一致。

2.3 血液学血小板相关指标检测

末次给药次日,麻醉动物后腹主动脉采血,以全自动血液分析仪分析血小板相关的指标:血小板计数(PLT)、血小板压积(PCT)、血小板分布宽度(PDW)、平均血小板体积(MPV)。

2.4 骨髓巨核细胞检查

安乐处死大鼠后,立即剖取胸骨,取骨髓,制备骨髓涂片,瑞特-吉姆萨复合染液染色,光学显微镜($\times 40$)下计数全片巨核细胞总数、产血小板巨核细胞数。

2.5 脾脏长度测量

剖取大鼠脾脏,将其附于平整纸面自然展开,测量脾脏总长度。

2.6 脾脏组织病理学检查

测量脾脏总长度后,置于 10% 中性甲醛固定,常规制备石蜡组织切片,HE 和 PAS 染色后光学显微镜($\times 40$)下定性观察脾脏组织病理变化。

2.7 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测肝脏组织 TPO/Mpl 信号通路变化

通过生物信息分析可筛选出数量较多的与血小板减少相关的靶点,但这些靶点仅是人工智能和大数据整合的结果。促血小板生成素(TPO)包含在生物信息分析结果之中,肝脏组织 TPO/血小板生成素受体(Mpl)信号通路是公认的调控血小板形成的重要信号通路之一。为保障研究效率,选取 TPO/Mpl 信号通路考察 hUCMSCs 对大鼠血小板形成的影响。取 20 mg 肝脏组织,按照 TRIzol 试剂使用方法提取总 RNA。微量紫外分光光度计测 RNA 浓度, 500 ng RNA 用第一链合成试剂盒逆转录成 cDNA。采用 SYBR 染料,以 DBI 三步法 PCR 扩增标准程序扩增 45 个循环,行荧光定量 PCR(BIO-RAD)。将肌动蛋白(β -actin)作内参,根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因的相对表达量。所有引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成(表1)。

表1 qPCR引物序列
Table 1 Primer sequence for qPCR

引物	上游(5'→3')	下游(5'→3')
<i>TPO</i>	TTTCTCCAGCCCAGCTT	TTCCATGATCTCTGCTGCT
<i>Mpl</i>	TCTTTCCGCTGCACCTCT	AAGTTCCCCTGGTTGGCT
Krüppel样因子1(<i>Klf1</i>)	TCAAGTGGTGGCGGTCT	CGTCCCTCTCATCGTCCT
Friend白血病整合素1(<i>FLII</i>)	CAACATGACCACCAACGA	GTCAATCTCCATCAAGCCA
GATA结合蛋白1(<i>GATA1</i>)	TAAACCCAGTGTCACAT	GAAAAGAAACCCGCTGAGT
β -actin	CCTGTATGCCTCTGGTCGT	CTGTAGCCACGCTCGGT

2.8 统计学处理

采用SPSS 17.0软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用LSD-*t*法。

3 结果

3.1 生物信息分析结果

3.1.1 hUCMSCs与血小板减少的相关分析结果 在GeneCards数据库中获取到hUCMSCs的相关靶点11 233个,筛选得分为30以上靶点,得到912个靶点。在DisGeNET数据库中获取血小板减少的相关靶点592个。将药物靶点与疾病靶点于jvenn数据处理平台取交集,得hUCMSCs可能诱发血小板减少的靶点209个。209个靶点可作用于158条信号通路,前20条($F < 0.01$)通路涉及免疫、造血系统等(图1)。其中造血细胞谱通路(hematopoietic cell lineage)与血小板生成最密切,包含了TPO、促红细胞生成素(Epo)、CD34、CD44等20个靶点。这20个靶点可发生相互作用,相互连接的平均连接度为12.95,筛选出14个核心靶点(表2)。

3.1.2 hUCMSCs阳性表面标志物与血小板减少核心靶点相关性分析结果 CD34、CD44为“3.1.1”项筛选出的核心靶点,同时又是表面标志物,CD44与

本研究所使用的hUCMSCs阳性表面标志物交集。IL6、TNF、KIT、CSF2、IL4、CSF3、IL3、EPO、IL2RA、TFRC、IL11、TPO均与CD71、CD34、CD105、CD19、CD8、CD4、CD56、CD33、CD14表面标志物阳性有关,CD105与本研究所使用的hUCMSCs阳性表面标志物交集。“3.1.1”项筛选出的14个核心靶点中CD34、CD19、CD14与本研究所使用的hUCMSCs阴性表面标志物交集。

3.2 动物实验结果

3.2.1 血液学血小板相关指标检测 阴性对照组、溶媒对照组之间比较,PLT、PCT、PDW、MPV差异无统计学意义。与阴性对照、溶媒对照组比较,hUCMSCs高、中、低剂量组PLT、PCT显著降低($P < 0.05$),PDW、MPV差异无统计学意义,高剂量组PLT、PCT下降的幅度最大。结果见表3。

3.2.2 骨髓巨核细胞检查 所有巨核细胞结构清楚,形态正常;hUCMSCs组全片巨核细胞总数、产血小板巨核细胞数与阴性对照组和溶媒对照组比较,未见显著统计学差异。结果见图2和表4。

3.2.3 脾脏长度测量 与阴性对照、溶媒对照组比较,hUCMSCs高、中剂量组脾脏长度显著增加($P < 0.05$)。阴性对照组、溶媒对照组、hUCMSCs低剂量

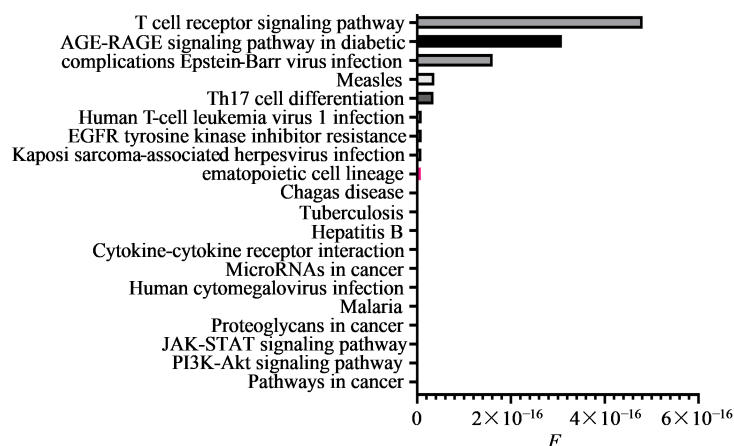


图1 hUCMSCs与血小板减少相关的前20条通路

Fig. 1 Top 20 pathways related to thrombocytopenia induced by hUCMSCs

表2 hUCMSCs与血小板减少相关的核心靶点

Table 2 Core target of thrombocytopenia induced by hUCMSCs

简称	全称	连接度	是否核心靶点
IL6	interleukin 6	18	是
TNFRSF11A	TNF receptor superfamily member 11a	17	是
CD34	CD34 molecule	17	是
KIT	KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	17	是
IL4	interleukin 4	17	是
CSF2	colony stimulating factor 2	16	是
CSF3	colony stimulating factor 3	16	是
IL3	interleukin 3	16	是
IL2RA	interleukin 2 receptor subunit alpha	15	是
TPO	thrombopoietin	15	是
EPO	erythropoietin	14	是
TFRC	transferrin receptor	14	是
CD44	CD44 molecule	13	是
IL11	interleukin 11	13	是
ITGB3	integrin subunit beta 3	11	否
ITGA2	integrin subunit alpha 2	8	否
MME	membrane metalloendopeptidase	8	否
IL4R	interleukin 4 receptor	6	否
CSF3R	colony stimulating factor 3 receptor	5	否
CD36	CD36 molecule	3	否

表3 各组大鼠血液学血小板相关指标($\bar{x}\pm s, n=6$)Table 3 Platelet related indexes of hematology in each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

指标	剂量/(个·kg ⁻¹)	PLT/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	PCT	PDW/fL	MPV/fL
阴性对照	—	1 145±76	0.940±0.070	9.47±0.44	8.27±0.29
溶媒对照	—	1 174±118	0.977±0.078	9.60±0.25	8.32±0.22
hUCMSCs	1×10 ⁷	704±64 [#]	0.565±0.048 [#]	9.12±0.40	8.03±0.31
	5×10 ⁶	862±64 [#]	0.703±0.075 [#]	9.33±0.59	8.15±0.43
	2.5×10 ⁶	1 003±73 [#]	0.825±0.063 [#]	9.32±0.28	8.22±0.17

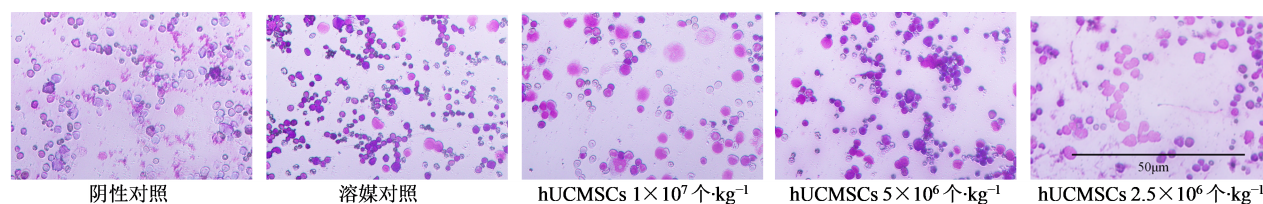
与阴性对照组比较: * $P<0.05$; 与溶媒对照组比较: [#] $P<0.05$ * $P<0.05$ vs negative control group; [#] $P<0.05$ vs solvent control group

图2 各组大鼠骨髓细胞形态学观察

Fig. 2 Morphological observation of rat bone marrow cells in each group

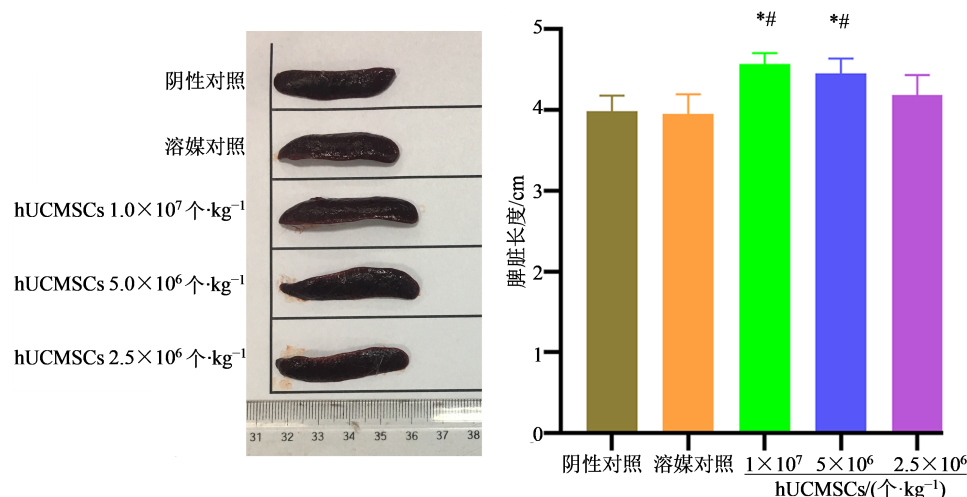
表4 各组大鼠骨髓巨核细胞检查相关指标($\bar{x}\pm s, n=6$)Table 4 Bone marrow megakaryocytes indexes of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

指标	剂量/(个·kg ⁻¹)	巨核细胞总数	产血小板巨核细胞数
阴性对照	—	155±13	21.2±1.8
溶媒对照	—	158±10	20.3±1.5
hUCMSCs	1.0×10 ⁷	154±14	20.3±1.2
	5.0×10 ⁶	149±14	21.0±1.3
	2.5×10 ⁶	146±17	20.3±1.4

组间差异无统计学意义。结果见图3。

3.2.4 脾脏组织病理学检查 脾脏组织HE染色未见明显器质性改变;PAS染色显示hUCMSCs各剂量组细胞边缘不清楚,细胞核清晰可见,血管腔和血管周围可见无核粗块状或团块状红染,诊断为血小板,hUCMSCs中、高剂量组红染略深。结果见图4。

3.2.5 肝脏组织TPO/Mpl信号通路mRNA变化 阴性对照组、溶媒对照组之间差异无统计学意义。与阴性对照组和溶媒对照组比较,hUCMSCs高、



与阴性对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与溶媒对照组比较: [#] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs negative control group; [#] $P < 0.05$ vs solvent control group

图3 各组大鼠脾脏观察 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 3 Observation of spleen in rats of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

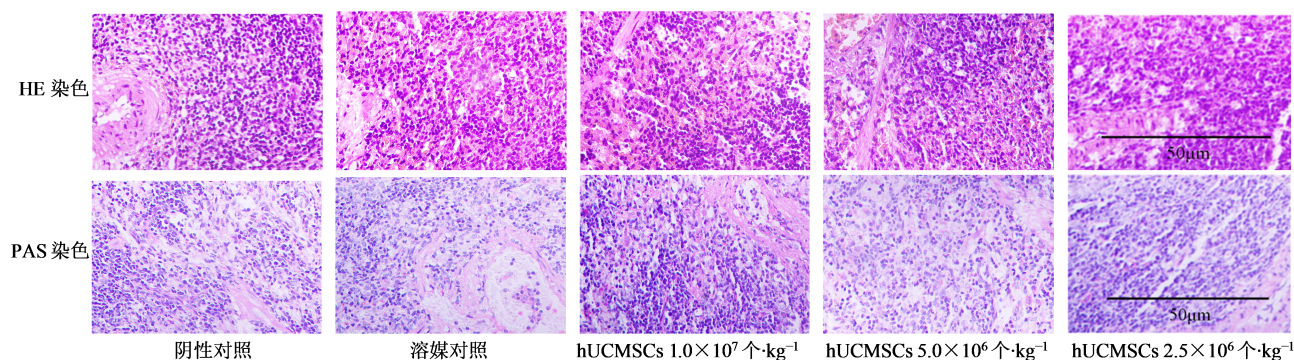


图4 各组大鼠脾脏组织病理学观察

Fig. 4 Pathological observation of spleen in each group of rats

中、低剂量组肝脏组织 *TPO*、*Mpl*、*KLF1* mRNA 显著增加 ($P < 0.05$), *FLI1*、*GATA1* mRNA 变化不显著。结果见表5。

4 讨论

本研究观察到hUCMSCs各剂量组大鼠血小板减少现象,与文献报道一致^[4],表明临床应用

hUCMSCs可能会监测到血液中PLT、PCT减少为表现的血小板稳态破坏。血小板的形成、血小板在脾脏中的储存和血小板的破坏决定了血液中血小板的稳态。

血小板的形成与肝脏和骨髓密切相关,骨髓中巨核细胞生成血小板,而肝脏则可通过分子信号感

表5 各组大鼠肝脏组织TPO/Mpl信号通路相关mRNA变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

指标	剂量/(个·kg ⁻¹)	<i>TPO</i> /β-actin	<i>Mpl</i> /β-actin	<i>KLF1</i> /β-actin	<i>FLI1</i> /β-actin	<i>GATA1</i> /β-actin
阴性对照	—	1.38±1.05	1.13±0.58	1.10±0.52	1.18±0.69	1.01±0.16
溶媒对照	—	1.35±0.13	1.12±0.031	1.16±0.44	1.19±0.42	1.05±0.12
hUCMSCs	1.0×10^7	3.86±0.58 ^{*#}	2.85±0.49 ^{*#}	2.79±0.59 ^{*#}	1.19±0.28	1.07±0.49
	5.0×10^6	3.08±0.74 ^{*#}	2.22±0.44 ^{*#}	2.60±0.98 ^{*#}	1.18±0.88	1.03±0.45
	2.5×10^6	2.37±0.39 ^{*#}	2.06±0.76 ^{*#}	2.29±0.35 ^{*#}	1.11±0.23	1.08±0.17

与阴性对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与溶媒对照组比较: [#] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs negative control group; [#] $P < 0.05$ vs solvent control group

受与传输在维持血小板稳态中发挥重要作用^[8]。巨核细胞在一系列分子信号作用下有丝分裂、成熟并释放血小板前体到血管腔内,并迅速转化为血小板^[9]。生物信息学分析显示,TPO是hUCMSCs诱导血小板减少的核心靶点之一。TPO主要驱动骨髓中巨核细胞生成,而肝脏已被证明是TPO的主要来源器官^[10-11]。TPO通过其同源受体Mpl发出信号,调控血小板生成或红细胞生成^[12],调控过程包括通过酪氨酸激酶JAK2激活下游转录因子KLF1的表达,同时抑制转录因子FLI1的表达^[13-14]。KLF1促进血小板生成,FLI1促进红细胞生成。GATA1通过激发cyclin的表达促进巨核细胞有丝分裂,与血小板生成数量有关^[15]。组织干细胞会随着机体状态作出适应性调整^[16]。大鼠尾iv hUCMSCs后,各剂量组大鼠肝脏TPO、Mpl、KLF1均呈现上调趋势,可能与hUCMSCs和机体的适应性反应有关。尽管TPO/Mpl信号通路反应灵敏而迅速,然而血小板的循环周期达9 d^[17],本研究在末次给药次日即解剖了动物,因此未观察到骨髓巨核细胞增加,亦没有观察到骨髓中血小板生成数量的变化,GATA1无显著变化。故hUCMSCs对血小板的形成不产生影响。

生物信息学分析结果提示,CD44是与血小板减少密切相关的表面标志物之一。CD44是一种细胞表面糖蛋白,是透明质酸的主要受体。透明质酸及其主要受体主要通过脾单核吞噬系统巨噬细胞上的Fcγ受体或Fcγ受体介导血小板清除^[18-19]。在免疫性血小板减少症中使用CD44抗体治疗可显著改善低血小板症状,从而认为CD44是与免疫性血小板减少症密切相关的靶点^[20-21]。动物实验观察到hUCMSCs高、中剂量组脾脏长度增加,表明脾脏可能对血小板的吞噬作用增强,成为血小板在脾脏中存储增加的1项证据。此外,高剂量组脾脏组织PAS染色见着色略深,成为血小板在脾脏中存储增加的另一项证据。本研究所使用的hUCMSCs阳性表达CD44,从而认为注射hUCMSCs使机体接受了额外的CD44,促使脾脏吞噬血小板,引起脾脏血小板储存增加,血液中PLT、PCT减少,扰乱了血小板稳态。

CD105表达于内皮细胞,是一种膜糖蛋白,稳定的CD105表达利于血管生成^[22-23]。血管内皮损伤,PLT被激活,分泌多种生长因子,包括血管内皮生长因子、血小板源性生长因子和成纤维细胞生长因子等,促进血管生成^[24]。CD105敲除可降低血管内皮生长因子表达,抑制血管生成^[25]。同时,

CD105过表达并不能促进血管生成^[23]。此外,富PLT的血浆促进CD105阳性干细胞增殖与分化,这一过程与血管内皮损伤PLT被激活后分泌的生长因子一致^[26]。表明,CD105是与PLT密切相关的蛋白,但CD105消耗PLT缺乏明确证据。尽管生物信息学分析结果提示,CD105是与血小板减少密切相关的表面标志物之一,笔者认为这一结果无助于解释hUCMSCs对血小板稳态的扰乱作用。

CD44⁺ hUCMSCs可能通过促脾脏吞噬血小板,增加血小板在脾脏中储存,使血液中PLT、PCT减少,从而扰乱血小板稳态。提示以脾脏肿大和血小板减少为临床表现的人群使用CD44⁺ hUCMSCs可能存在加重症状的风险,不建议使用CD44⁺ hUCMSCs。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 卢加琪, 韦薇, 刘伯宁, 等. 间充质干细胞的研究进展与药学评价 [J]. 药学学报, 2019, 54(7): 1317-1324.
Lu J Q, Wei W, Liu B N, et al. Research progress, chemistry, manufacturing and controls considerations of mesenchymal stem cell products [J]. Acta Pharm Sin, 2019, 54(7): 1317-1324.
- [2] 蒋杨, 陈博, 王贤君, 等. 人脐带间充质干细胞治疗肺部疾病的研究与应用进展 [J]. 临床肺科杂志, 2022, 27(1): 124-129.
Jiang Y, Chen B, Wang X J, et al. Progress in research and application of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of lung diseases [J]. J Clin Pulm Med, 2022, 27(1): 124-129.
- [3] Chung Y W, Yang H Y, Kang S J, et al. Allogeneic umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells combined with high tibial osteotomy: A retrospective study on safety and early results [J]. Int Orthop, 2021, 45(2): 481-488.
- [4] 张颖, 李娜, 林笋, 等. 大鼠静脉多次注射人脐带间充质干细胞安全性的研究 [J]. 心肺血管病杂志, 2015, 34(3): 221-227.
Zhang Y, Li N, Lin Z, et al. Safety study of repeatedly intravenous infusion with human umbilical cord mesenchymal stem cells in rats [J]. J Cardiovasc Pulm Dis, 2015, 34(3): 221-227.
- [5] 杜伟, 占敏霞, 吴思澜, 等. 基于网络药理学策略分析青蒿应用于新型冠状病毒感染肺炎的可行性 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2022, 44(2): 69-75.
Du W, Zhan M X, Wu S L, et al. Analysis of the feasibility of applying *Artemisia annua* L. to COVID-19

- based on network pharmacology strategy [J]. J Southwest Univ Nat Sci Ed, 2022, 44(2): 69-75.
- [6] Bardou P, Mariette J, Escudié F, et al. Jvenn: An interactive Venn diagram viewer [J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15(1): 293.
- [7] 林春华, 肖敏, 董润璁, 等. 脐带间充质干细胞注射液对SD大鼠尾静脉注射24W重复给药毒性试验 [A]// 中国毒理学会药物毒理与安全性评价学术大会(2019年)暨粤港澳大湾区生物医药产业第一届高峰论坛 [C]. 广州: 中国毒理学会, 2019.
- Lin C H, Xiao M, Dong R C, et al. The toxicity of umbilical cord mesenchymal stem cells injection on the tail vein of SD rats after 24W repeated administration [A]// Chinese Society of Toxicology Academic Conference on Drug Toxicology and Safety Evaluation (2019) and the First Guangdong-Hong Kong-Macao Greater Bay Area Biomedical Industry Summit Forum [C]. Guangzhou: Chinese Society of Toxicology, 2019.
- [8] Liang C, Takahashi K, Furuya K, et al. Dualistic role of platelets in living donor liver transplantation: Are they harmful ? [J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(9): 897-908.
- [9] Liu C C, Huang B M, Wang H T, et al. The heterogeneity of megakaryocytes and platelets and implications for *ex vivo* platelet generation [J]. Stem Cells Transl Med, 2021, 10(12): 1614-1620.
- [10] Gostynska S, Venkatesan T, Subramani K, et al. Megakaryocyte/platelet-derived TGF- β 1 inhibits megakaryopoiesis in bone marrow by regulating thrombopoietin production in liver [J]. Blood Adv, 2022, 6(11): 3321-3328.
- [11] Desai S, Subramanian A. Thrombocytopenia in chronic liver disease: Challenges and treatment strategies [J]. Cureus, 2021, 13(7): e16342.
- [12] Gilreath J, Lo M, Bubalo J. Thrombopoietin receptor agonists (TPO-RAs): Drug class considerations for pharmacists [J]. Drugs, 2021, 81(11): 1285-1305.
- [13] Donaghy R, Han X, Rozenova K, et al. The BRISC deubiquitinating enzyme complex limits hematopoietic stem cell expansion by regulating JAK2 K63-ubiquitination [J]. Blood, 2019, 133(14): 1560-1571.
- [14] Nakagawa M M, Rathinam C V. Constitutive activation of the canonical NF- κ B pathway leads to bone marrow failure and induction of erythroid signature in hematopoietic stem cells [J]. Cell Rep, 2018, 25(8): 2094-2109.e4.
- [15] Muntean A G, Pang L Y, Poncz M, et al. Cyclin D-Cdk4 is regulated by GATA-1 and required for megakaryocyte growth and polyploidization [J]. Blood, 2007, 109(12): 5199-5207.
- [16] Lee Y, Dimaulo-Milk E, Leslie J, et al. Hematopoietic stem cells temporally transition to thrombopoietin dependence in the fetal liver [J]. Sci Adv, 2022, 8(11): eabm7688.
- [17] Holmsen H. Platelet metabolism and activation [J]. Semin Hematol, 1985, 22(3): 219-240.
- [18] Norris P A A, Kaur G, Khan R, et al. Anti-inflammatory activity of CD44 antibodies in murine immune thrombocytopenia is mediated by Fc γ receptor inhibition [J]. Blood, 2021, 137(15): 2114-2124.
- [19] Sun L, Li L Z, Sun T, et al. Antihuman CD44 antibody BJ18 inhibits platelet phagocytosis by correcting aberrant Fc γ R expression and M1 polarization in immune thrombocytopenia [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 95: 107502.
- [20] Crow A R, Song S, Suppa S J, et al. Amelioration of murine immune thrombocytopenia by CD44 antibodies: A potential therapy for ITP? [J]. Blood, 2011, 117(3): 971-974.
- [21] Kapur R. Anti-CD44 (kur)lander hits ITP [J]. Blood, 2021, 137(15): 1997-1999.
- [22] Burrello J, Burrello A, Vacchi E, et al. Supervised and unsupervised learning to define the cardiovascular risk of patients according to an extracellular vesicle molecular signature [J]. Transl Res, 2022, 244: 114-125.
- [23] Ollauri-Ibáñez C, Núñez-Gómez E, Egido-Turrión C, et al. Continuous endoglin (CD105) overexpression disrupts angiogenesis and facilitates tumor cell metastasis [J]. Angiogenesis, 2020, 23(2): 231-247.
- [24] Yang W J, Zhang G L, Cao K X, et al. Heparanase from triple-negative breast cancer and platelets acts as an enhancer of metastasis [J]. Int J Oncol, 2020, 57(4): 890-904.
- [25] Jadhao M, Chen C L, Liu W T, et al. Endoglin modulates TGF β R2 induced VEGF and proinflammatory cytokine axis mediated angiogenesis in prolonged DEHP-exposed breast cancer cells [J]. Biomedicine, 2022, 10(2): 417.
- [26] Wang Z, Wang Z, Zhang B, et al. Effect of activated platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells Int, 2021, 2021: 9947187.