

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.06.0522

论著

# 低氧预处理骨髓间充质干细胞对小鼠脑缺血再灌注模型中 IL-12 的影响

吴慧娴, 练学淦

(江苏省常州市第一人民医院神经内科, 常州 213003)

**摘要** 目的:探讨骨髓间充质干细胞(BMSCs)对缺血性脑损伤后白细胞介素(IL)-12介导炎症的影响及其分子机制。方法:将雄性C57BL/6小鼠随机分为3组:假手术组(Sham组)、模型组(MCAO组)、BMSCs组,每组20只。除Sham组外,其他组构建小鼠大脑中动脉闭塞模型。神经功能缺损评分评价小鼠的神经功能;3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色检测脑梗死体积,免疫荧光检测小胶质细胞活化情况,Western印迹检测IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、IL-6、干扰素(IFN)- $\gamma$ 、IL-4、IL-12蛋白的表达。RT-PCR检测脑组织损伤区酪氨酸蛋白激酶(JAK)/信号转导与转录激活因子4(STAT4)mRNA的表达。结果:与Sham组相比,MCAO组小鼠Clark评分( $t=18.27, P<0.001$ )、脑梗死面积均增加( $F=41.18, P<0.001$ ),脑组织TNF- $\alpha$ ( $F=13.81, P<0.01$ )、IL-1 $\beta$ ( $F=8.753, P<0.01$ )和IL-6( $F=10.96, P<0.01$ )、IFN- $\gamma$ ( $F=18.08, P<0.01$ )水平升高,IL-4( $F=10.76, P<0.05$ )表达水平降低;与MCAO组相比,BMSCs组小鼠Clark评分( $t=3.416, P<0.05$ )、脑梗死面积均显著降低( $F=41.18, P<0.05$ ),脑组织中TNF- $\alpha$ ( $F=13.81, P<0.05$ )、IL-1 $\beta$ ( $F=8.753, P<0.05$ )和IL-6( $F=10.96, P<0.05$ )、IFN- $\gamma$ ( $F=18.08, P<0.05$ )表达水平显著降低,IL-4( $F=10.76, P<0.01$ )表达水平升高。Western印迹显示,BMSCs组较MCAO组脑组织中IL-12( $F=9.927, P<0.05$ )含量明显下降。RT-PCR结果显示,JAK( $F=14.83, P<0.01$ )、STAT4的mRNA表达( $F=37.95, P<0.05$ )较MCAO组降低。结论:BMSCs对缺血性脑卒中小鼠模型有神经保护作用,调控IL-12的表达与其介导的JAK/STAT4信号通路可能是其改善缺血损伤区炎症反应的分子机制。

**关键词** 骨髓间充质干细胞;白细胞介素-12;低氧;缺血-再灌注;炎症

中图分类号 R743.31

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)06-0522-06

## The effect of hypoxic pretreatment of bone marrow mesenchymal stem cells on IL-12 after cerebral ischemia-reperfusion injury in mice

WU Huixian, LIAN Xuegan

(Department of Neurology, Changzhou First People's Hospital, Changzhou 213003, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on the interleukin (IL)-12-mediated inflammatory response and their molecular mechanisms following ischemic brain injury. **Methods:** The male C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: the sham surgery group (Sham group), the model group (MCAO group), and the BMSCs group, with 20 mice in each group. Except for the Sham group, all other groups established a middle cerebral artery occlusion model in mice. The neurological defect score was used to assess the neurological function of mice. The 3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining method was used to measure the volume of cerebral infarction, and the microglial cell activation was detected by immunofluorescent detection. The expression of IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-4, and IL-12 proteins were detected by Western blotting. RT-PCR was used to detect the expression of tyrosine protein kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) mRNA in brain tissue injury area. **Results:** Compared to the Sham group, the Clark score ( $t=18.27, P<0.001$ ) and the cerebral infarction area in mice of the MCAO group were significantly increased ( $F=41.18, P<0.001$ ). The levels of TNF- $\alpha$  ( $F=13.81, P<0.01$ ), IL-1 $\beta$  ( $F=8.753, P<0.01$ ), IL-6 ( $F=10.96, P<0.01$ ), and IFN- $\gamma$  ( $F=18.08, P<0.01$ ) in brain tissue were elevated, while the expression level of IL-4 ( $F=10.76, P<0.05$ ) was significantly decreased. In contrast, when compared to the MCAO group, the Clark score ( $t=3.416, P<0.05$ ) and the cerebral infarction area in mice of the BMSCs group were significantly reduced ( $F=41.18, P<0.05$ ). The expression levels of TNF- $\alpha$  ( $F=13.81, P<0.05$ ), IL-1 $\beta$  ( $F=8.753, P<0.05$ ), IL-6 ( $F=10.96, P<0.05$ ), and IFN- $\gamma$  ( $F=18.08, P<0.05$ ) in brain tissue were also significantly reduced, while the expression level of IL-4 ( $F=10.76, P<0.01$ ) was significantly increased. Western blotting analysis revealed that the content of IL-12 ( $F=9.927, P<0.05$ ) in brain tissue was significantly decreased in the BMSCs group compared to the MCAO group. According to the RT-PCR results, the mRNA expression of JAK ( $F=14.83, P<0.01$ ) and STAT4 ( $F=37.95, P<0.05$ ) was reduced in comparison to the MCAO group. **Conclusion:** BMSCs have neuroprotective effects on ischemic stroke mouse models, and regulating IL-12 expression and its mediated JAK/STAT4 signaling pathway may be the molecular mechanism for improving the inflamma-

基金项目 江苏省级横向课题(JKHY2021005)

作者简介 吴慧娴(1998-),女,硕士在读,研究方向:脑血管病;通信作者:练学淦,E-mail:lxgneuro@126.com。

tory response in ischemic injury areas.

**Key words** bone marrow mesenchymal stem cells; interleukin-12; hypoxia; ischemia reperfusion; inflammatory

急性脑血管病又称为“脑卒中”,是一种常见的神经系统疾病。其中缺血性脑卒中占比为 75%~80%<sup>[1]</sup>,其主要是由于血流中断引起,可产生一系列的病理生理反应:细胞兴奋毒性、氧化应激、细胞死亡、神经炎症等<sup>[2]</sup>。由于脑卒中损伤的复杂性,目前的治疗手段有限,卒中后几个小时内再灌注治疗是最好的办法,但这种治疗手段有严格的时间窗<sup>[3-4]</sup>。因此,迫切需要探索研究更有效的治疗靶点。细胞疗法是最具希望的一种治疗手段。其中,间充质干细胞不仅来源广泛、具有自我更新分化的潜力、也消除了移植排斥及伦理争议的相关问题<sup>[5-6]</sup>。研究表明,缺血性脑卒中后,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)移植,可减少脑卒中的梗死面积并提高神经功能,这可能与其发挥免疫调节的功能有关,但具体确切的分子机制尚不清楚。对体外培养的 BMSCs,给予低氧预处理, BMSCs 表现出更强的生存能力且在缺血、缺氧的组织中存活的更好<sup>[7-9]</sup>。白细胞介素(IL)-12 是一种作用于先天性免疫系统和适应性免疫系统的细胞因子<sup>[10]</sup>。作为一种关键的炎性介质,对缺血性脑卒中的炎症具有重要作用。在缺血再灌注这一过程中,IL-12 由坏死的细胞产生并释放,IL-12 的释放可激活并引导适应性免疫细胞参与炎症<sup>[11]</sup>,CD4<sup>+</sup>T 细胞产生细胞因子干扰素(IFN)- $\gamma$  诱导静止状态的小胶质细胞向 M1 小胶质细胞分化并分泌 IL-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ ,这一循环过程加剧炎症与神经功能损伤<sup>[12]</sup>。研究表明,在缺血再灌注的条件下,IL-12 抗体及 Janus 激酶(JAK)抑制剂可有效减少梗死面积,改善神经功能损伤<sup>[11-13]</sup>。以上研究发现 IL-12 介导的炎症通路有望成为预防和治理缺血性脑卒中的重要靶点。本研究以 IL-12 为靶点,探讨低氧预处理 BMSCs 对缺血性脑卒中的免疫调控机制。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂与仪器** MCAO 线栓(北京西浓科技有限公司),3,5-二氢三苯基四氮唑粉末(美国 sigma),BCA 蛋白检测试剂盒(上海碧云天),增强型 ECL 化学发光检测试剂盒(上海碧云天),荧光显微镜(徕卡显微系统),实时定量荧光 PCR 仪(赛默飞世尔科技),CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(赛默飞世尔科技),IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  抗体(affinity 公司),TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-4、IBA1 抗体(SAB 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验动物与分组** 6~8 周龄雄性 C57/BL6 小鼠(20~25 g),3~5 周龄 Sprague-Dawley(SD)大鼠均被饲养在 12 h 白天/黑夜的动物房中,温度 20~26℃,相对湿度 50%~55%,自由获取食物和水。将小鼠随机盲法分为 3 组(每组 20 只):假手术组(Sham 组)、模型组(MCAO 组)、BMSCs 组。

**1.2.2 BMSCs 的分离培养与鉴定** 首先,对 3~5 周龄 SD 大鼠进行深麻醉,在无菌室中迅速将其股骨、胫骨取下,剥离其与其上所依附的肌、韧带。使用 PBS 连续冲刷股、胫骨的骨髓腔,并将其收集,然后转移至含有 10% 胎牛血清及 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养液中,24 h 后再换液,当其成长率达到 80%~90%时,再用胰酶消化传代。将细胞传代至 3 代,在 1% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 下进行 24 h 的孵育,再进行 1 h 的复氧后,采用 FCM 技术对细胞的表面标志物进行检测。本课题以 BMSC 为对象,通过胰酶消化制备单个细胞悬浮液,分别与 CD90、CD29、CD34、CD45 等抗体避光孵育 30 min,然后在 500  $\mu$ L PBS 中重悬上机检测。

**1.2.3 小鼠局灶性 I/R 模型及 BMSCs 的移植** 通过大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)构建小鼠大脑 I/R 模型。首先,以异氟烷法对其进行全身麻醉,将其置于解剖台上,刮去颈部的毛发,从颈正中线切开,显露出右颈总动脉,同时钝性分离其与颈外动脉。将一根尼龙栓线从颈总动脉进入颈内动脉,将栓线向前推(10.0 $\pm$ 0.5) mm,直到感受到一股轻微的阻力,阻止右侧大脑中动脉的血液供应 60 min 后,将栓子缓缓抽出以再次灌注。Sham 组仅分离血管,不作其他处理。BMSCs 组经尾静脉给予 1 $\times$ 10<sup>6</sup>  $\mu$ L 的低氧预处理 BMSCs,而 MCAO 组和 Sham 组则注射相同体积 PBS。

**1.2.4 神经功能缺损评分** 本研究拟以脑缺血再灌注(I/R)后 72 h 小鼠为对象,应用 Clark 局部神经功能量表(Clark Neuroscore)评价模型,从肢体对称度、步态、爬行、旋转、前肢对称性、强迫转圈、双须触碰 7 个维度上进行评价。Clark 局灶性神经功能缺损的评分为 0~28 分,评分愈高,其损害程度愈重。

**1.2.5 染色** I/R 72 h 后,用 2,3,5-三苯基氯代四氮唑(TTC)染色,评价脑梗死面积。将小鼠用 10% 的水合氯醛(350 mg/kg)麻醉后直接处死。将小鼠的脑快速取出,于-80℃冰冻 10 min,制成厚度约 2 mm 的

切片,经2% TTC 染色 30 min。利用 Image J 软件进行图像处理:梗死面积(%)=脑梗死面积/总面积×100%。

**1.2.6 免疫荧光** 将小鼠脑石蜡切片进行脱蜡,经微波加热 10 min 使其进行抗原的修复,经 5% BSA 封闭,再与小胶质细胞标志物 IBA1 抗体(1:200)孵育过夜。第 2 天加入荧光二抗,37℃ 孵育 1 h,经 DAPI 避光孵育 10 min 后,密封,放置于 4℃ 黑暗箱内。用荧光显微镜对样本进行观测。

**1.2.7 Western 印迹** 将小鼠脑组织与 RIPA 溶解缓冲溶液进行研磨混合均匀,提取的上清液即为总蛋白量。应用 BCA 蛋白质分析方法对蛋白质含量进行测定。用 12% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行电泳,将其转至 PVDF 薄膜上。再用 TBST 缓冲液冲洗 3 遍,使用快速封闭液封闭 15 min。膜与一抗混合液(IL-1 $\beta$  1:1 000, TNF- $\alpha$  1:1 000, IL-6 1:1 000, IFN- $\gamma$  1:1 000, IL-4 1:1 000, IL-12 1:1 000)于 4℃ 震荡孵育过夜,再用 TBST 缓冲溶液清洗 5 遍。然后使用二抗(1:5 000)对其在室温下孵育 1 h。使用 ECL 化学发光试剂盒对其进行显色。利用 Image J 软件以内参  $\beta$ -actin 标准化蛋白的强度来评价目的蛋白表达情况。

**1.2.8 RT-PCR RNA 提取及实时定量** 用 Trizol 方法提取和纯化小鼠脑组织的总 RNA,用标准的逆转录酶试剂盒将该基因反转录成 cDNA。随后进行 SYBR Green 荧光定量聚合酶链式反应。具体反应条件如下:预变性:95℃ 300 s;变性:95℃ 10 s;退火:60℃ 35 s;持续 40 个循环。将基因表达水平归一化  $\beta$ -actin 基因表达。引物由上海生工设计并合成,见表 1。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

引物名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
JAK	GGAATGGCCTGCCCTTACAATG	TGGCTCTATCT-GCTTCACAGAAT
STAT4	GCAGCCAACATGCCTATCCA	TGGCAGA-CACTTTGTGTCCA
$\beta$ -actin	GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	GCCGGACTCATCG-TACTCC

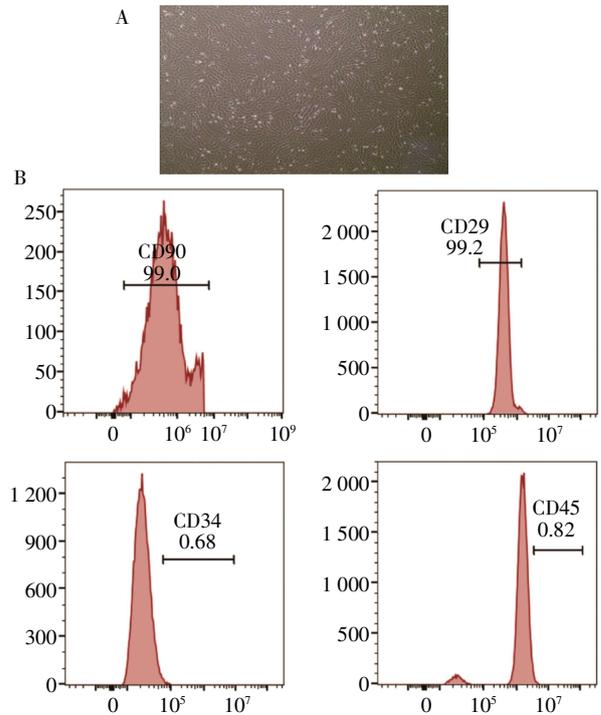
注:JAK:Janus 激酶;STAT4:信号转导与转录激活因子

**1.2.9 统计学处理** 将所得数据经统计学处理后,符合正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间数据资料使用 Graphpadprism8.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA),经检验为正态分布的数据使用  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 BMSCs 的培养与鉴定** 培养的 BMSCs 胞体呈

长梭形,呈漩涡状或辐射状排列。流式细胞术分析结果显示 BMSCs 的表面抗原 CD29、CD90 表达为 99.2%、98.9%、CD34、CD45 表达为 0.68%、0.82%,低氧后 BMSCs 无明显变化(图 1)。

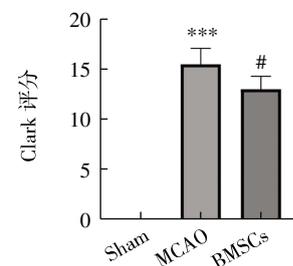


注:A:低氧预处理 BMSCs 的形态( $\times 40$ ); B:流式细胞术检测 BMSCs 表面抗原 CD90、CD29、CD34、CD45 表达

图 1 BMSCs 的鉴定

Fig.1 Identification of BMSCs

**2.2 BMSCs 对小鼠神经功能障碍的影响** 结果显示,Sham 组小鼠没有表现出任何神经系统的缺陷,而在 MCAO 组则表现为严重的神经系统缺陷,Clark 局灶功能损伤评分较 Sham 组明显增加,且 BMSCs 治疗后其局灶功能损伤明显低于 MCAO 组,且两者间存在明显差别( $t=18.87, 3.416$ , 均  $P < 0.05$ , 图 2)。

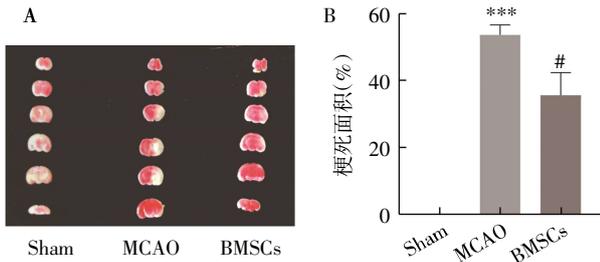


注:Sham:假手术组;MCAO:模型组;BMSCs:骨髓间充质干细胞组;与 Sham 组比较,\*\*\* $P < 0.001$ ;与 MCAO 组比较,# $P < 0.05$

图 2 BMSCs 对小鼠局灶功能损伤的影响

Fig.2 The effect of BMSCs on focal function injury in mice

**2.3 BMSCs 对小鼠脑梗死面积的影响** TTC 染色结果显示,MCAO 组小鼠出现明显的脑梗死,且 BMSCs 治疗后脑梗死面积比 MCAO 组小鼠减少,差异有统计学意义( $F=41.18, P < 0.05$ , 图 3)。

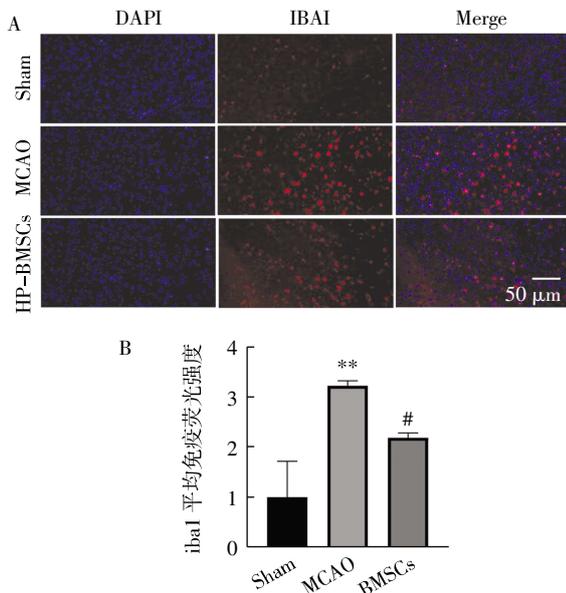


注: Sham: 假手术组; MCAO 组: 模型组; BMSCs: 骨髓间充质干细胞组; 与 Sham 组相比, \*\*\* $P < 0.001$ , 与 MCAO 组相比, # $P < 0.05$

图 3 BMSCs 对小鼠脑梗死面积的影响

Fig.3 The effect of BMSCs on the area of mouse brain infarction

2.4 BMSCs 对小鼠小胶质细胞活化的影响 与 Sham 组相比, MCAO 组小鼠脑内活化的小胶质细胞数目显著增加, 与 MCAO 组相比, BMSCs 组小鼠脑组织中小胶质细胞活化的数目显著下降 ( $F=20.93, P < 0.05$ , 图 4)。



注: Sham: 假手术组; MCAO 组: 模型组; BMSCs: 骨髓间充质干细胞组; A: 小胶质细胞 IBA1 的表达情况 ( $\times 200$ ); B: 小胶质细胞 IBA1 平均免疫荧光强度分析; 与 Sham 组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与 MCAO 组相比, # $P < 0.05$

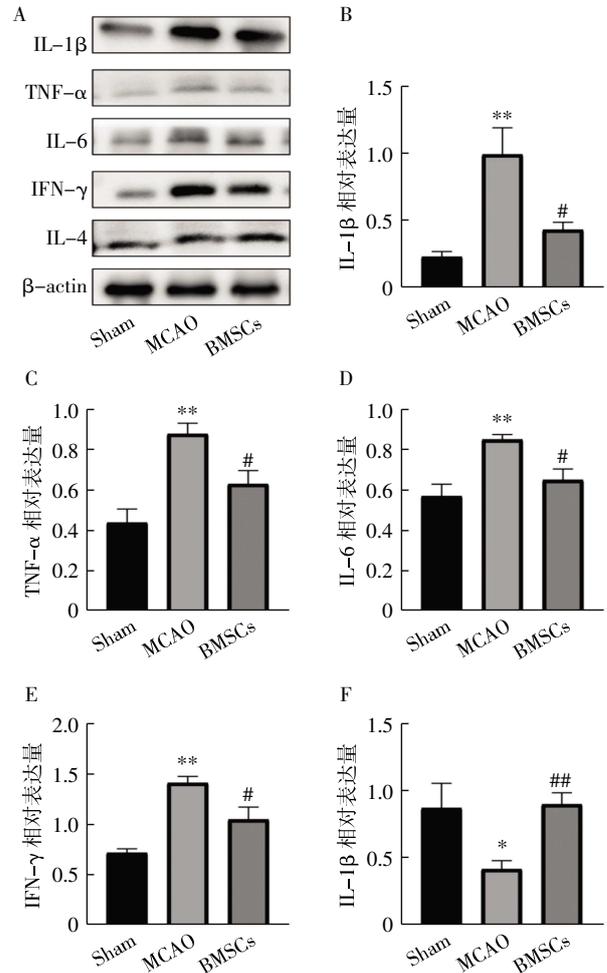
图 4 BMSCs 对小鼠小胶质细胞活化的影响 ( $\times 200$ )

Fig.4 The impact of BMSCs on the activation of mice for microglial cells ( $\times 200$ )

2.5 BMSCs 对小鼠脑组织的炎症的影响 与 Sham 组相比, MCAO 组小鼠缺血脑组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  表达显著升高, IL-4 表达降低; 与 MCAO 组相比, BMSCs 治疗后, 小鼠缺血脑组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  表达降低, 抗炎因子 IL-4 表达升高, 差异具有统计学意义 ( $F=8.753$ 、13.81、10.96、18.08、10.76, 均  $P < 0.05$ , 图 5)。

2.6 BMSCs 对 MCAO 小鼠脑组织中 IL-12 含量的影响 MCAO 组小鼠缺血脑组织 IL-12 含量高于

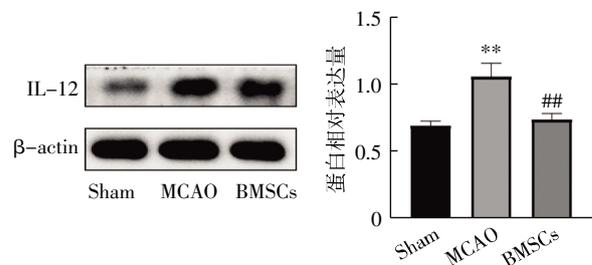
Sham 组。BMSCs 组小鼠缺血脑组织 IL-12 含量低于 MCAO 组 ( $F=9.927, P < 0.05$ , 图 6)。



注: IL-1 $\beta$ : 白细胞介素-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$ : 肿瘤坏死因子; IL-6: 白细胞介素-6; IFN- $\gamma$ : 干扰素; IL-4: 白细胞介素-4; Sham: 假手术组; MCAO 组: 模型组; BMSCs: 骨髓间充质干细胞组; A: Western 印迹检测蛋白表达水平; B、C、D、E、F: 对蛋白表达水平量化分析; 与 Sham 组相比, \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , 与 MCAO 组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

图 5 BMSCs 对小鼠脑组织中炎症的影响

Fig.5 The effect of BMSCs on inflammation in mice brain tissue

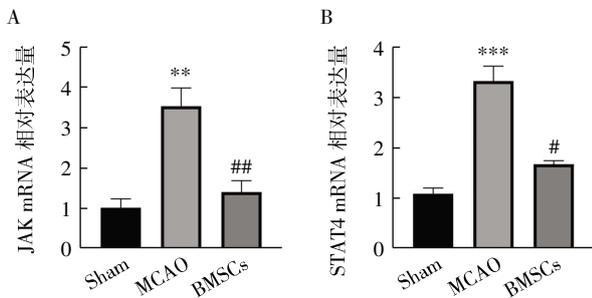


注: IL-12: 白细胞介素-12; Sham: 假手术组; MCAO 组: 模型组; BMSCs: 骨髓间充质干细胞组; Western 印迹检测蛋白 IL-12 表达水平; 与 Sham 组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与 MCAO 组相比, # $P < 0.01$

图 6 BMSCs 对小鼠脑组织中 IL-12 表达的影响

Fig.6 The effect of BMSCs on the IL-12 expression in mice brain tissue

2.7 BMSCs 对 IL-12 介导的 JAK/STAT4 信号通路的影响 与 Sham 组比较, MCAO 组小鼠脑组织中 JAK、STAT4 mRNA 明显升高; 与 MCAO 组比较, BMSCs 组小鼠脑组织中 JAK、STAT4 mRNA 明显降低( $F=14.83、37.95$ , 均  $P<0.05$ , 图 7)。



注: Sham: 假手术组; MCAO 组: 模型组; BMSCs: 骨髓间充质干细胞组; A: 实时荧光定量 PCR 检测 JAK mRNA 表达水平; B: 实时荧光定量 PCR 检测 STAT4 mRNA 表达水平; 与 Sham 组相比, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ; 与 MCAO 组相比, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

图 7 各组小鼠脑组织中 JAK、STAT4 mRNA 的表达情况

Fig.7 The expression of JAK and STAT4 mRNA in each group of mouse brain tissue

### 3 讨论

缺血性脑卒中是由于大脑供血动脉突然中断、脑组织缺血、缺氧, 致使大脑发生不可逆性损伤的一类神经系统疾病<sup>[14]</sup>。由于缺血、缺氧继发的炎症被认为是缺血性脑卒中发生后, 二次损伤的主要病理生理因素<sup>[15]</sup>。炎症与梗死面积相关, 也与疾病的发生、发展和预后密切相关<sup>[16]</sup>。因此, 抑制神经炎症是治疗缺血性脑卒中的关键靶点<sup>[17]</sup>。虽然基于动物水平的不同治疗方法广泛开展, 但仍然没有找到最理想的治疗手段。研究表明, BMSCs 在局灶性脑损伤模型中具有有益作用<sup>[14]</sup>, 然而针对 BMSCs 治疗后脑梗死面积减少和改善神经功能背后的免疫调节机制尚未完全清楚。本研究探讨了 BMSCs 对小鼠脑缺血再灌注损伤的治疗作用, 发现 BMSCs 可抑制炎症、降低促炎因子的表达、减少小胶质细胞活化的数量, 从而表现出对脑缺血再灌注损伤的保护作用。

为了进一步确定 BMSCs 依赖免疫调节而进行神经系统保护的分子机制, 本课题组研究了局灶型缺血再灌注模型中 IL-12 的表达及其介导的 JAK/STAT4 信号通路以及小胶质细胞的活化与相关炎症因子的表达。IL-12 作为一种促炎细胞因子, 由 IL-12P<sub>40</sub> 和 IL-12P<sub>35</sub> 亚基通过二硫键组成 IL-12P<sub>70</sub><sup>[18]</sup>。IL-12 在脑组织发生缺血、缺氧过程中由激活的免疫细胞产生并释放, 并承担一定的抗原呈递作用<sup>[11, 19]</sup>。STAT 是一类具有信号转导与激活作用的蛋白家族<sup>[20]</sup>, 在适应性免疫的细胞免疫反应中扮演着重要的角

色。JAK/STAT 通路构成细胞因子信号转导的重要途径<sup>[21-22]</sup>。STAT4 作为 STAT 家族重要成员之一, 主要由细胞因子 IL-12 激活。相关研究表明, STAT4 基因敲除小鼠对 IL-12 表现出明显的缺陷反应<sup>[23]</sup>。也侧面说明 IL-12 与其受体结合, 通过激活并活化表达 STAT4 的 T-bet 细胞, 诱导其向 Th1 细胞分化<sup>[19-24]</sup>。Th1 细胞分泌更多促炎细胞因子(IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-12、TNF- $\alpha$ ), 其中以 IFN- $\gamma$  为主且是梗死早期重要的促炎因子, 其可激活小胶质细胞(M1)、幼稚 CD4<sup>+</sup>T 细胞向 Th1 细胞分化, 抑制向 Th2 细胞分化及抗炎因子 IL-4 表达等多种免疫反应, 该免疫系统的调节与炎症发展密切相关<sup>[25-26]</sup>。活化的 Th1 细胞又可正反馈刺激 IL-12 的生成, IL-12 在 Th1 细胞的分化和 M1 小胶质细胞的活化中起到重要作用, 这一过程离不开 JAK/STAT4 信号转导作用<sup>[27]</sup>。正向激活的 M1 小胶质细胞分泌的 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  表达水平在炎症级联反应中起重要作用, 这些因子可诱导其他炎症介质, 增强白细胞和内皮细胞的黏附, 促进一氧化氮的合成, 诱导氨基酸和自由基的生成, 并引发多重级联反应, 进而导致脑缺血区域不可逆的神经元凋亡<sup>[28-29]</sup>。Konoeda 等<sup>[13]</sup>研究表明, 给予 JAK 激酶抑制剂可以部分抑制 I/R 后梗死体积的增加, 静脉注射抗 IL-12/23 单克隆抗体可有效抑制 I/R 损伤并改善神经功能。研究表明缺血性脑卒中患者外周血 IFN- $\gamma$  含量增加, 抑制 IL-12 的表达可减轻炎症反应所致的缺血性脑损伤<sup>[30]</sup>。此外, 在小鼠肿瘤模型中, IL-12 基因治疗与自然杀伤细胞和 T 细胞的组织浸润和凋亡增加有关, 这是缺血性脑卒中中侵袭性炎症细胞诱导神经元死亡的重要机制<sup>[31]</sup>。目前根据研究得出结论, 缺血性脑卒中患者 IL-12 水平升高与急性期炎症因子的表达、免疫细胞的激活、早期脑损伤面积大小、脑卒中严重程度和功能障碍密切相关, 这些都提示 IL-12 可能在脑缺血的病理生理中起关键作用, 其介导的 JAK/STAT4 信号通路在梗死炎症级联发生中起到重要作用。既往研究表明 BMSCs 可调控 IL-12 mRNA 表达, 但其如何调控 JAK/STAT4 尚未见报道。本研究显示: BMSCs 抑制 MCAO 模型小鼠脑组织中 IL-12 的表达、抑制小胶质细胞的活化、降低促炎因子(IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ) 的表达、上调抗炎因子 IL-4, 下调 JAK、STAT4, 推测 BMSCs 通过抑制 IL-12 的表达, 并作用于 IL-12 介导 JAK/STAT4 途径发挥抗脑缺血损伤效应。

综上所述, 本研究结果表明 BMSCs 治疗对 I/R 小鼠具有神经保护作用, 且 BMSCs 的免疫调节作用

与抗炎作用可能与抑制 IL-12 产生与释放以及其作用于 IL-12 介导 JAK/STAT4 信号通路有关,该结论为支持 BMSCs 作为治疗缺血性脑卒中新靶标提供了依据。

#### 参考文献:

- [1] BAI M, SUN R, CAO B, et al. Monocyte-related cytokines/chemokines in cerebral ischemic stroke[J]. *Cns Neurosci Ther*, 2023, 29(12):3693-3712.
- [2] QIN X, AKTER F, QIN L, et al. Adaptive immunity regulation and cerebral ischemia[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:689.
- [3] WIDIMSKY P, SNYDER K, SULZENKO J, et al. Acute ischaemic stroke: recent advances in reperfusion treatment[J]. *Eur Heart J*, 2023, 44(14):1205-1215.
- [4] SAINI V, GUADA L, YAVAGAL D R. Global epidemiology of stroke and access to acute ischemic stroke interventions[J]. *Neurology*, 2021, 97(20 Suppl 2):S6-S16.
- [5] XU K, LEE J Y, KANEKO Y, et al. Human stem cells transplanted into the rat stroke brain migrate to the spleen via lymphatic and inflammation pathways[J]. *Haematologica*, 2019, 104(5):1062-1073.
- [6] YANG B, HAMILTON J A, VALENZUELA K S, et al. Multipotent adult progenitor cells enhance recovery after stroke by modulating the immune response from the spleen[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(5):1290-1302.
- [7] SALAUDEEN M A, ALLAN S, PINTEAUX E. Hypoxia and interleukin-1-primed mesenchymal stem/stromal cells as novel therapy for stroke[J]. *Hum Cell*, 2024, 37(1):154-166.
- [8] YANG Y, LEE E H, YANG Z. Hypoxia-conditioned mesenchymal stem cells in tissue regeneration application[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2022, 28(5):966-977.
- [9] HU Y, CHEN W, WU L, et al. Hypoxic preconditioning improves the survival and neural effects of transplanted mesenchymal stem cells via CXCL12/CXCR4 signalling in a rat model of cerebral infarction[J]. *Cell Biochem Funct*, 2019, 37(7):504-515.
- [10] EGGENHOFER E, LUK F, DAHLKE M H, et al. The life and fate of mesenchymal stem cells[J]. *Front Immunol*, 2014, 5:148.
- [11] ANDREADOU M, INGELFINGER F, DE FEO D, et al. IL-12 sensing in neurons induces neuroprotective CNS tissue adaptation and attenuates neuroinflammation in mice[J]. *Nat Neurosci*, 2023, 26(10):1701-1712.
- [12] ZHU H, HU S, LI Y, et al. Interleukins and ischemic stroke[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:828447.
- [13] KONOEDA F, SHICHITA T, YOSHIDA H, et al. Therapeutic effect of IL-12/23 and their signaling pathway blockade on brain ischemia model[J]. *Biochem Bioph Res Commun*, 2010, 402(3):500-506.
- [14] ABDELRAHMAN S A, ABDELRAHMAN A A, SAMY W, et al. Hypoxia pretreatment enhances the therapeutic potential of mesenchymal stem cells (BMSCs) on ozone-induced lung injury in rats[J]. *Cell Tissue Res*, 2022, 389(2):201-217.
- [15] CHEN J, LIN X, YAO C, et al. Transplantation of roxadustat-preconditioned bone marrow stromal cells improves neurological function recovery through enhancing grafted cell survival in ischemic stroke rats[J]. *Cns Neurosci Ther*, 2022, 28(10):1519-1531.
- [16] ZHU D, JOHNSON T K, WANG Y, et al. Macrophage M2 polarization induced by exosomes from adipose-derived stem cells contributes to the exosomal proangiogenic effect on mouse ischemic hindlimb[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):162.
- [17] ZHOU G, WANG Y, GAO S, et al. Potential mechanisms and perspectives in ischemic stroke treatment using stem cell therapies[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:646927.
- [18] BEHZADI P, BEHZADI E, RANJBAR R. IL-12 family cytokines: general characteristics, pathogenic microorganisms, receptors, and signalling pathways[J]. *Acta Microbiol Imm H*, 2016, 63(1):1-25.
- [19] TRINCHIERI G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(2):133-146.
- [20] ALESKANDARANY M A, AGARWAL D, NEGM O H, et al. The prognostic significance of STAT3 in invasive breast cancer: analysis of protein and mRNA expressions in large cohorts[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2016, 156(1):9-20.
- [21] CAO W, LIU Y, ZHANG R, et al. Homoharringtonine induces apoptosis and inhibits STAT3 via IL-6/JAK1/STAT3 signal pathway in gefitinib-resistant lung cancer cells[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:8477.
- [22] HUANG C, BI J. Expression regulation and function of T-Bet in NK cells[J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12:761920.
- [23] TAKEDA K, AKIRA S. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000, 11(3):199-207.
- [24] ULLRICH K A, SCHULZE L L, PAAP E M, et al. Immunology of IL-12: an update on functional activities and implications for disease[J]. *Excli J*, 2020, 19:1563-1589.
- [25] BELLAVIA S, SCALA I, RIZZO P A, et al. Th1/Th2 polarization of peripheral immune response in atherothrombotic and cardioembolic stroke: a prospective study[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):16384.
- [26] YANG H S, ZHANG C, CARLYLE B C, et al. Plasma IL-12/IFN- $\gamma$  axis predicts cognitive trajectories in cognitively unimpaired older adults[J]. *Alzheimers Dement*, 2022, 18(4):645-653.
- [27] MIRLEKAR B. Co-expression of master transcription factors determines CD4<sup>+</sup>T cell plasticity and functions in auto-inflammatory diseases[J]. *Immunol Lett*, 2020, 222:58-66.
- [28] CAMPBELL BCV, DE SILVA D A, MACLEOD M R, et al. Ischaemic stroke[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1):70.
- [29] MARKOWSKA A, KOZIOROWSKI D, SZLUFIK S. Microglia and stem cells for ischemic stroke treatment-mechanisms, current status, and therapeutic challenges[J]. *Front Biosci Landmark Ed*, 2023, 28(10):269.
- [30] LEE J H, WEI Z Z, CAO W, et al. Regulation of therapeutic hypothermia on inflammatory cytokines, microglia polarization, migration and functional recovery after ischemic stroke in mice[J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 96:248-260.

(2024-06-01 收稿)