

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.11.006

GM-CSF 基因转染的 BMSCs 对脓毒症小鼠血管内皮损伤、凝血功能及炎症因子的影响*

王倩 徐玲文 揭凤英 孙雯 魏文娇 谌芳 董芳[△]

(武汉市第三医院重症医学科 湖北 武汉 434200)

摘要目的:探讨粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)基因转染的骨髓间充质干细胞(BMSCs)对脓毒症小鼠血管内皮损伤、凝血功能及炎症因子的影响。**方法:**将 60 只 SD 小鼠分为 Sham 组、模型(Model)组、BMSCs 组、GM-CSF-BMSCs 组,每组 15 只,采用盲肠结扎穿孔法制备小鼠脓毒症模型。实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测细胞 GM-CSF 基因表达;记录 24 h 小鼠尾出血时间;检测血浆凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶原时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(Fib)水平;ELISA 法检测血清白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-1、IL-10 水平;苏木精-伊红(HE)染色观察血管组织形态;TUNEL 法检测血管内皮细胞凋亡;Western blot 检测血管组织因子(TF)、组织因子途径抑制物(TFPI)、抗凝血酶(ATIII)、血管细胞粘附因子 1(VCAM1)、蛋白酶激活受体(PAR1)蛋白表达。**结果:**与 CK 组 BMSCs 比较,Transfection 组 BMSCs 细胞 GM-CSF mRNA 表达显著升高($P<0.05$)。与 Sham 组比较,Model 组小鼠血管形态结构有明显的损伤,小鼠尾出血时间、Fib 含量、血清 IL-10 水平和血管内皮组织 ATIII 蛋白表达显著降低,PT、APTT、TT 时间、血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 水平、凋亡率、血管内皮组织 TF、TFPI、VCAM1、PAR1 蛋白表达显著升高($P<0.05$);与 Model 组比较,BMSCs 组和 GM-CSF-BMSCs 组小鼠血管形态结构损伤明显减轻,小鼠尾出血时间、Fib 含量、血清 IL-10 水平和血管内皮组织 ATIII 蛋白表达显著升高,PT、APTT 时间、血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 水平、凋亡率、血管内皮组织 TF、TFPI、VCAM1、PAR1 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$);GM-CSF-BMSCs 组各项检测指标优于 BMSCs 组 ($P<0.05$)。**结论:**GM-CSF 转染的 BMSCs 可减轻脓毒症小鼠炎症反应和血管内皮细胞损伤,改善凝血功能。

关键词:GM-CSF;BMSCs;脓毒症;小鼠;血管内皮损伤;凝血功能;炎症因子

中图分类号:R-33;R631.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)11-2032-06

Effects of GM-CSF Gene Transfected BMSCs on Vascular Endothelial Injury, Coagulation Function and Inflammatory Factors in Septic Mice*

WANG Qian, XU Ling-wen, JIE Feng-ying, SUN Wen, WEI Wen-jiao, CHEN Fang, DONG Fang[△]

(Department of Intensive Care Medicine, Wuhan Third Hospital, Wuhan, Hubei, 434200, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) gene transfected bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on vascular endothelial injury, coagulation function and inflammatory factors in septic mice. **Methods:** 60 SD mice were divided into Sham group, model (Model) group, BMSCs group and GM-CSF-BMSCs group, with 15 mice in each group, sepsis model of mice was prepared by cecal ligation and puncture. The expression of GM-CSF gene was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). The tail bleeding time of 24h mice was recorded. The levels of plasma prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT) and fibrinogen (Fib) were detected. The levels of serum interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-1 and IL-10 were detected by ELISA. The morphology of vascular tissue was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Apoptosis of vascular endothelial cells was detected by TUNEL method. The expression of vascular tissue factor (TF), tissue factor pathway inhibitor (TFPI), antithrombin (ATIII), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1) and protease-activated receptor 1 (PAR1) were detected by Western blot. **Results:** Compared with BMSCs in CK group, the expression of GM-CSF mRNA in BMSCs in Transfection group was significantly increased ($P<0.05$). Compared with Sham group, the vascular morphology of the mice in Model group was significantly damaged, the tail bleeding time, Fib content, serum IL-10 level and ATIII protein expression in vascular endothelial tissue of the mice in Model group were significantly decreased, PT, APTT, TT time, serum IL-6, TNF- α , IL-1 levels, apoptosis rate, TF, TFPI, VCAM1, PAR1 protein expression in vascular endothelial tissue were significantly increased ($P<0.05$). Compared with Model group, the damage of vascular morphology and structure in BMSCs group and GM-CSF-BMSCs group was significantly reduced, the tail bleeding time, Fib content, serum IL-10 level and ATIII protein expression in vascular endothelial tissue were significantly increased, PT, APTT time, serum IL-6, TNF- α , IL-1 level, apoptosis rate, TF, TFPI,

* 基金项目:武汉市卫健委西医青年项目(WX20C27);湖北省科技厅计划项目(2019CFB789)

作者简介:王倩(1990-),女,硕士,住院医师,研究方向:脓毒症,E-mail:wangqian4221@163.com

[△] 通讯作者:董芳(1981-),女,硕士,主任医师,研究方向:重症医学,E-mail:24207891@163.com

(收稿日期:2024-01-09 接受日期:2024-01-31)

VCAM1 and PAR1 protein expression in vascular endothelial tissue were significantly decreased ($P<0.05$). The detection indexes in GM-CSF-BMSCs group were better than those in BMSCs group ($P<0.05$). **Conclusion:** GM-CSF transfected BMSCs can reduce the inflammatory response and vascular endothelial cell injury in septic mice, and improve coagulation function.

Key words: GM-CSF; BMSCs; Sepsis; Mice; Vascular endothelial injury; Coagulation function; Inflammatory factors

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R631.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)11-2032-06

前言

脓毒症是指宿主感染细菌、真菌、病毒等各种病原体后机体反应失调,进而对多种功能器官造成危及生命的严重损害性疾病^[1]。其发病机制复杂,至今尚未完全阐明,相关报道,凝血功能障碍是其发病机理之一^[2]。脓毒症发生时伴随着大量炎症因子释放,炎症因子进入血管对血管内皮细胞造成损伤,造成凝血功能障碍^[3]。目前,大量抗凝药物用于脓毒症患者抗凝治疗,但部分患者治疗效果不佳^[4]。因此有必要探究新的治疗方案和措施以改善凝血功能障碍。研究显示,骨髓间充质干细胞(BMSCs)具有分化能力,可调节免疫和修复受损组织的功能,具有治疗脓毒症的潜力^[5]。研究表明,BMSCs移植可降低脓毒症大鼠炎症反应,改善器官功能,提高大鼠存活率^[6],另有研究显示,BMSCs移植可激活 Nrf2 通路减轻脓毒症大鼠炎症反应和氧化应激进而减轻肝损伤^[7]。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)属于集落刺激因子家族,具有修复内皮细胞和调节免疫的作用^[8]。相关研究表明,GM-CSF可提高脓毒症小鼠机体杀菌能力,降低炎症因子释放,改善脓毒症小鼠继发性肺炎的预后^[9]。另有研究表明,GM-CSF可降低脓毒症患者调节性T细胞(Tregs)活性,改善T细胞功能,提高脓毒症患者生存率^[10]。因此本研究通过建立脓毒症小鼠模型,通过转染 GM-CSF 的 BMSCs 移植进行干预来观察其对脓毒症小鼠血管内皮细胞损伤、凝血功能和炎症的影响,以期治疗脓毒症提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取 SPF 级 18-22 g 小鼠 60 只[购自武汉大学(医学研究院)],动物实验许可证号:SYXK(鄂)2018-0102。小鼠均自由摄食(普通饲料)、饮水,饲养于(25±1)℃,55%恒湿、12 h/12 h 明暗循环条件下。

1.1.2 主要试剂与仪器 RPMI 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;H1201 全自动血凝分析仪购自济南爱来宝仪器设备有限公司;Trizol 试剂购自广州易锦生物技术有限公司;实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)试剂盒购自北京百奥创新科技有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒购自上海极威生物科技有限公司;白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)-α、IL-1、IL-10 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自湖北艾普蒂生物工程有限公司;TUNEL 试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;胰蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司;组织因子(TF)、组织因子途径抑制物(TFPI)、抗凝血酶(ATIII)、血管细胞粘附因子 1(VCAM1)、蛋白酶激活受体 1(PAR1)一抗和二抗均购自英国 Abcam 公司。骨髓间充质干细胞 BMSCs(武汉大学细胞库)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 将 BMSCs 细胞于 RPMI 1640 培养基,环境(37℃、5% CO₂)条件下连续培养传代,用第三代细胞进行转染实验。采用 Lipofectamine™2000 将 pUMVC1-GM-CSF 质粒转染到对数期 BMSCs 细胞中,培养 24 h 后检验 GM-CSF 是否转染成功,保存转染成功的 BMSCs 细胞待用。

1.2.2 qRT-PCR 检测细胞中 GM-CSF mRNA 表达 Trizol 试剂提取正常 BMSCs 细胞(CK 组)和转染后细胞(Transfection 组)总 RNA,将 RNA 逆转录为 cDNA 后,以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 扩增。以 GAPDH 为内参,2^{-ΔΔCt} 方法计算 GM-CSF mRNA 的相对表达量。引物序列:GM-CSF mRNA:正向:5'-TCCTGGGCATTGTGGTCT-3';反向:5'-TGAAATCCG-CATAGGTGGT-3';GAPDH:正向:5'-GTTCCAGTATGACTC-TACCC-3';反向:5'-AGTCTTCTGAGTGGCAGTGATG-3'。

1.2.3 分组与造模 将 60 只 SD 小鼠分为 Sham 组、Model 组、BMSCs 组、GM-CSF-BMSCs 组,每组 15 只。除 Sham 组外,其余各组进行造模,将小鼠麻醉,手术部位消毒,腹部中线位置作 1.5 cm 左右长的切口,分拉出盲肠,将盲肠用 4 号线结扎,20 号针穿刺 3 次,稍微挤出少量粪渣,将盲肠放回,然后缝合腹部切口^[11]。Sham 组小鼠开腹后只翻动盲肠。造模成功标志:小鼠出现食欲不振,拉稀和震颤症状、精神萎靡行动迟缓等现象。造模后 BMSCs 组和 GM-CSF-BMSCs 组小鼠分别腹腔注射 0.2 mL 的 BMSCs 细胞和转染 GM-CSF 的 GM-CSF-BMSCs 细胞(1×10⁶ 个)^[12],Sham 组和 Model 组小鼠腹腔注射等体积生理盐水。

1.2.4 小鼠尾出血时间测定 24 h 后在距小鼠尾尖 5 mm 处剪尾,计时,每 15 s 用滤纸擦拭断尾处,直至无血流出。

1.2.5 样本采集 麻醉小鼠后腹主动脉取血 2 mL,处死小鼠取出腹主动脉至髂总动脉分叉处血管,保存待测。

1.2.6 血浆凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶原时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(Fib)水平检测 采用全自动血凝分析仪检测血液中 PT、APTT、TT、Fib 水平。

1.2.7 IL-6、TNF-α、IL-1 和 IL-10 水平检测 将新鲜血液 3500 r/min 离心 10 min,取上清,根据 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6、TNF-α、IL-1 和 IL-10 水平。

1.2.8 HE 染色观察小鼠血管组织形态 取血管组织,经 4%甲醛进行固定,石蜡包埋,切片约 5 μm,HE 染色,中性树胶封片,显微镜下观察血管组织形态变化。

1.2.9 TUNEL 法检测血管内皮细胞凋亡 取 1.2.6 中固定血管组织,包埋,切片,脱蜡,梯度酒精脱水,根据 TUNEL 试剂盒说明书进行检测,荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

1.2.10 Western blot 检测血管组织中 TF、TFPI、ATIII、VCAM1、PAR1 蛋白表达 取部分血管组织,提取总蛋白并定量检测,

热水浴变性后进行电泳,然后转移到 PVDF 膜上,封闭液中封闭 2 h, 加入 TF、TFPI、ATIII、VCAM1、PAR1、 β -actin 一抗 4℃ 孵育过夜,然后加入二抗,ECL 显色,Image J 软件分析蛋白。

1.3 统计学方法

采用 Graphpad Prism 8.0.1 软件分析数据。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示;多组间比较用单因素方差分析,组内两者比较用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞中 GM-CSF 表达比较

与 CK 组 BMSCs 细胞相比,Transfection 组 BMSCs 细胞中 GM-CSF 基因表达显著升高($P < 0.05$)。见图 1。

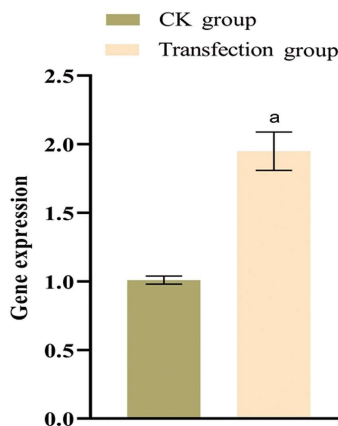


图 1 细胞中 GM-CSF 表达比较

Fig.1 Comparison of GM-CSF expression in cells

Note: Compare with CK group, ^a $P < 0.05$.

2.2 各组小鼠出血时间比较

与 Sham 组相比,Model 组小鼠尾出血时间明显缩短($P < 0.05$);与 Model 组相比,BMSCs 组和 GM-CSF-BMSCs 组小鼠尾出血时间明显延长($P < 0.05$);与 BMSCs 组相比,GM-CSF-BMSCs 组小鼠尾出血时间明显延长($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 各组小鼠凝血功能指标比较

与 Sham 组相比,Model 组小鼠 PT、APTT、TT 时间显著增加,Fib 含量显著减少($P < 0.05$);与 Model 组相比,BMSCs 组小鼠 PT、APTT 时间显著减少,Fib 含量显著增加($P < 0.05$),TT 时间无统计学差异($P > 0.05$),GM-CSF-BMSCs 组小鼠 PT、APTT、TT 时间显著减少,Fib 含量显著增多($P < 0.05$);与 BMSCs 组相比,GM-CSF-BMSCs 组小鼠 PT、APTT、TT 时间显著减少,Fib 含量显著增多($P < 0.05$)。见图 3。

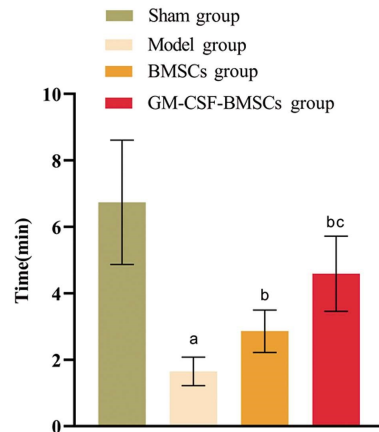


图 2 各组小鼠出血时间比较

Fig.2 Comparison of bleeding time in each group of mice

Note: Compare with Sham group, ^a $P < 0.05$; Compare with Model group,

^b $P < 0.05$; Compare with BMSCs group, ^c $P < 0.05$.

2.4 各组小鼠血清中炎症因子表达比较

与 Sham 组比较,Model 组小鼠血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 水平显著升高,IL-10 水平显著降低($P < 0.05$);与 Model 组比较,BMSCs 组和 GM-CSF-BMSCs 组小鼠血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 水平显著降低,IL-10 水平显著升高($P < 0.05$);与 BMSCs 组相比,GM-CSF-BMSCs 组小鼠血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 水平显著降低,IL-10 水平显著升高($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 各组小鼠血管组织形态变化比较

Sham 组小鼠血管内皮组织正常;Model 组小鼠血管管腔变窄,出现收缩和内皮细胞脱落现象;BMSCs 组和 GM-CSF-BMSCs 组血管内皮组织损伤显著减轻。见图 5。

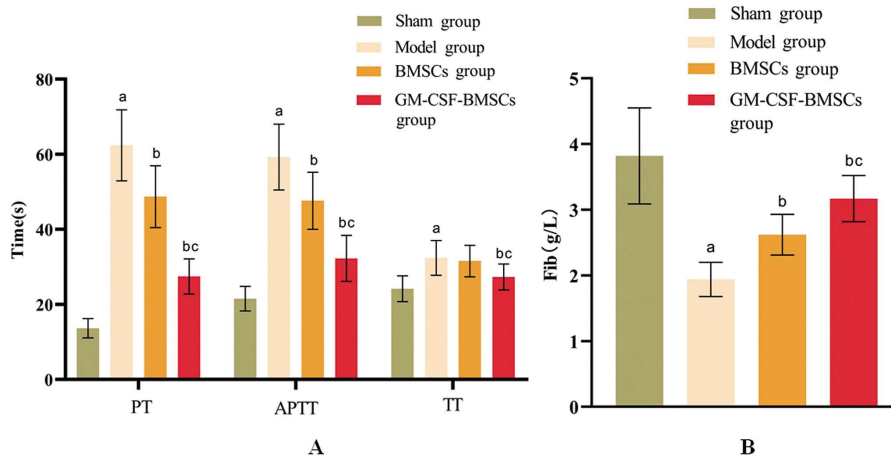


图 3 各组小鼠 PT、APTT、TT 和 Fib 水平比较

Fig. 3 Comparison of PT, APTT, TT and Fib levels in each group of mice

Note: Compare with Sham group, ^a $P < 0.05$; Compare with Model group, ^b $P < 0.05$; Compare with BMSCs group, ^c $P < 0.05$.

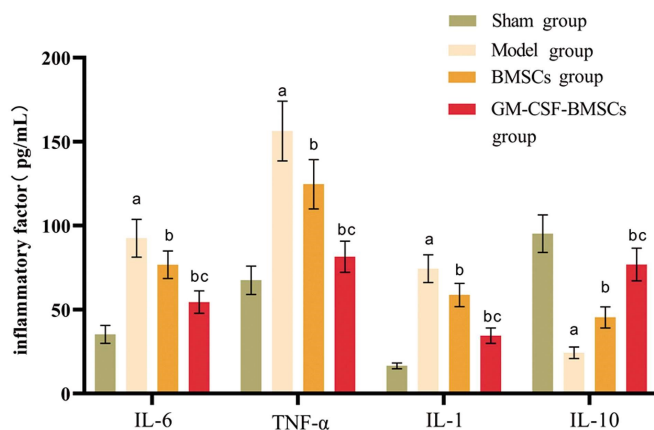


图4 小鼠血清 IL-6、TNF-α、IL-1、IL-10 水平比较

Fig.4 Comparison of serum IL-6, TNF-α, IL-1 and IL-10 levels in mice

Note: Compare with Sham group, ^a $P < 0.05$; Compare with Model group, ^b $P < 0.05$; Compare with BMSCs group, ^c $P < 0.05$.

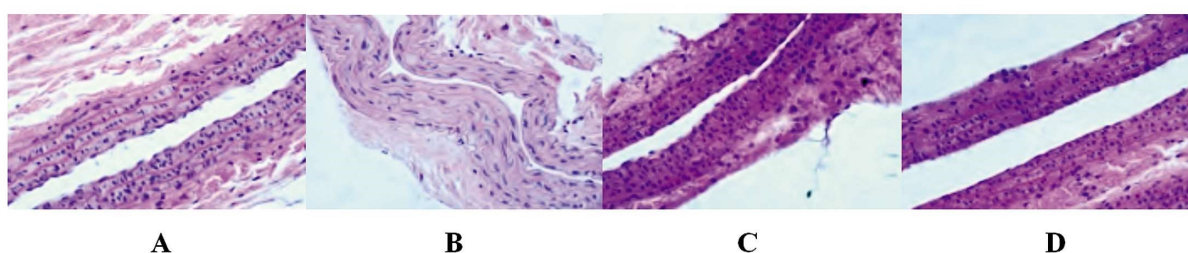


图5 各组小鼠血管组织形态(HE 染色, ×200)

Figure 5 Vascular tissue morphology of mice in each group (HE staining, ×200)

Note: A: Sham group; B: Model group; C: BMSCs group; D: GM-CSF-BMSCs group.

2.6 各组小鼠血管内皮细胞凋亡比较

与 Sham 组比较, Model 组小鼠血管内皮细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 与 Model 组比较, BMSCs 组和 GM-CSF-BM-

SCs 组小鼠血管内皮细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。与 BMSCs 组相比, GM-CSF-BMSCs 组小鼠血管内皮细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。见图 6、7。

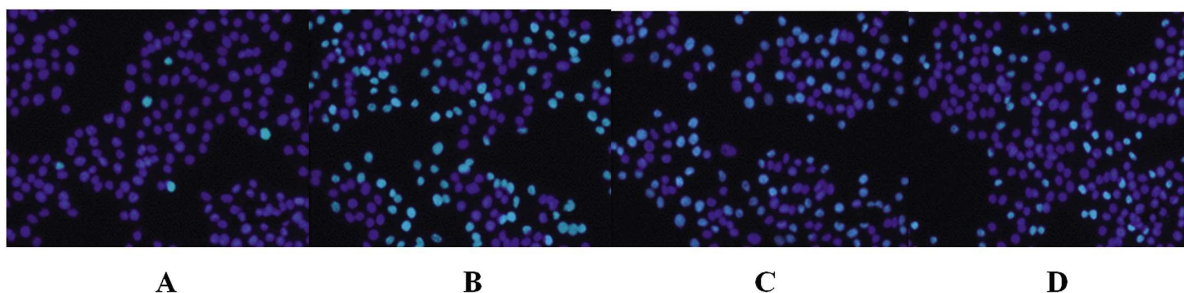


图6 各组小鼠内皮细胞凋亡(×400)

Fig. 6 Apoptosis of endothelial cells in each group of mice(×400)

Note: A: Sham group; B: Model group; C: BMSCs group; D: GM-CSF-BMSCs group

2.7 各组小鼠血管内皮组织中 TF、TFPI、ATIII、VCAM1、PAR1 蛋白表达比较

与 Sham 组比较, Model 组小鼠血管内皮组织 TF、TFPI、VCAM1、PAR1 蛋白表达显著升高, ATIII 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); 与 Model 组比较, BMSCs 组和 GM-CSF-BMSCs 组小鼠血管内皮组织 TF、TFPI、VCAM1、PAR1 蛋白表达显著降低, ATIII 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。与 BMSCs 组相比, GM-CSF-BMSCs 组小鼠小鼠血管内皮组织 TF、TFPI、VCAM1、PAR1 蛋白表达显著降低, ATIII 蛋白表达显著升高

($P < 0.05$)。见图 8、9。

3 讨论

脓毒症是由病原微生物感染而引发的一种多器官功能障碍综合征, 可造成器官衰竭而引发死亡, 近年来随着环境污染加剧和抗生素滥用导致脓毒症发病率逐年升高, 已严重威胁人类生命健康^[13]。脓毒症发病初期会产生大量炎症因子进入血管, 随血液循环造成全身炎症反应, 炎症因子进入血管后会造内皮损伤, 进而激活凝血系统, 引起凝血功能障碍^[14]。炎

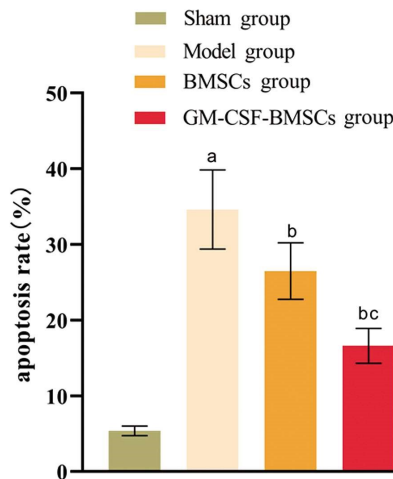


图7 各组小鼠血管内皮细胞凋亡率比较

Fig.7 Comparison of apoptosis rate of vascular endothelial cells in mice of each group

Note: Compare with Sham group, ^a*P*<0.05; Compare with Model group, ^b*P*<0.05; Compare with BMSCs group, ^c*P*<0.05.

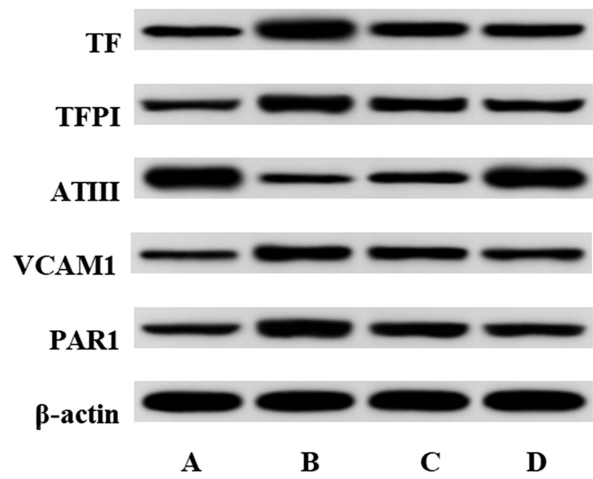


图8 各组小鼠血管内皮组织相关蛋白表达

Fig.8 Expression of vascular endothelial tissue-related proteins in each group of mice

Note: A Sham group; B Model group; C BMSCs group; D GM-CSF-BMSCs group.

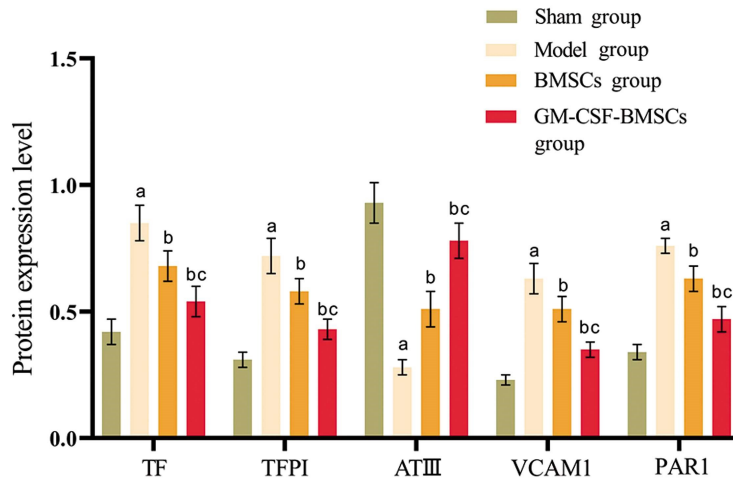


图9 各组小鼠血管内皮组织中 TF、TFPI、ATIII、VCAM1、PAR1 蛋白表达比较

Fig. 9 Comparison of TF, TFPI, ATIII, VCAM1 and PAR1 protein expression in vascular endothelial tissue of mice in each group

Note: Compare with Sham group, ^a*P*<0.05; Compare with Model group, ^b*P*<0.05; Compare with BMSCs group, ^c*P*<0.05.

症反应与凝血激活相互促进,进一步加重炎症和凝血功能障碍,可引起微血栓形成,导致血液循环障碍^[15],目前针对脓毒症主要是抗感染和血管活性药物治疗,但长期使用易产生耐药性且抗凝效果不佳,因此有必要探究新的治疗措施用于脓毒症的治疗。BMSCs 移植治疗是一种不同于传统药物的治疗方式,其可直接修复受损组织,调节免疫功能,进而改善患者临床症状^[16]。Tao 等^[17]研究表明 BMSCs 外泌体 miR-125b-5p 可抑制脓毒症小鼠巨噬细胞凋亡进而缓解小鼠急性肺损伤。Liang 等^[18]研究表明 BMSCs 移植可减轻炎症,减轻脂多糖诱导的脓毒症。推测 BMSCs 移植可减轻炎症,对脓毒症有一定治疗作用。

凝血功能紊乱是脓毒症发展过程中的主要病理过程,可加速器官功能障碍,PT 常用于检测外源性凝血途径,是凝血酶原转化为凝血酶的时间;APTT 是外源性凝血指标,常见于内源性凝血因子缺乏;TT 时间可反映体内抗凝物质;Fib 是参与凝血和止血的纤维蛋白,Fib 高含量可促进血栓形成^[19]。本研究结

果显示,脓毒症小鼠 PT、APTT、TT 时间和 Fib 含量均异常表达,表明脓毒症小鼠发生凝血功能障碍。BMSCs 干预后可显著改善上述指标含量,改善凝血功能。脓毒症发生时伴随着大量炎症因子释放,IL-6、TNF- α 、IL-1 为炎症因子进入血液后可导致血管内皮损伤,并随血液循环损伤其他器官,IL-10 为抗炎因子,可降低炎症损伤^[20]。本研究结果显示,脓毒症小鼠 IL-6、TNF- α 、IL-1 水平显著升高,IL-10 水平显著降低,BMSCs 干预后可显著降低炎症因子水平,提高抗炎因子释放,缓解炎症损伤。脓毒症发生时 TF 从内皮细胞释放并活化,进而诱发血液凝固,TFPI 与凝血因子结合后可灭活 TF 进而抑制凝血,TF 与 TFPI 共同维持血液平衡,而高凝状态下 TF 也会导致 TFPI 代偿性升高;ATIII 为抗凝血酶,可抑制凝血酶发挥作用^[21];VCAM1 蛋白可控制血管扩张和收缩,可调控凝血和免疫反应,其高表达可导致血管炎症,可反映血管内皮细胞损伤^[22]。PAR1 蛋白属于凝血酶受体,可促进微血栓形成^[23]。本研究结果

显示, BMSCs 干预后可显著降低 TF、TFPI、VCAM1、PAR1 蛋白表达, 提高 ATIII 蛋白表达。进一步通过尾出血实验发现 BMSCs 干预可提高出血时间, 改善凝血功能。通过观察血管形态发现 BMSCs 细胞移植可显著减轻血管组织损伤。提示 BMSCs 可减轻脓毒症小鼠血管内皮损伤, 改善凝血功能, 降低炎症。

GM-CSF 是一种多功能细胞因子, 研究显示其具有修复受损内皮细胞, 改善内皮细胞功能, 影响凝血纤溶系统活性的作用^[24]。Frydrych 等^[23]研究表明 GM-CSF 给药可提高肥胖糖尿病脓毒症小鼠存活率。Joshi 等^[25]研究表明 GM-CSF 可有效改善脓症患者免疫麻痹。推测 GM-CSF 对脓毒症有一定治疗作用。BMSCs 本身可分泌少量 GM-CSF, 本研究中 BMSCs 细胞移植对脓毒症小鼠有一定治疗作用, 为进一步验证 BMSCs 细胞移植对脓毒症小鼠治疗的作用机理, 本研究通过在 BMSCs 细胞中转染 GM-CSF 来干预小鼠, 结果显示, GM-CSF-BMSCs 组小鼠各项检测指标优于单独 BMSCs 组。提示 BMSCs 细胞移植治疗对脓毒症小鼠的治疗作用可能是通过分泌 GM-CSF 实现的。

综上所述, GM-CSF 转染的 BMSCs 可减轻脓毒症小鼠炎症反应和血管内皮细胞损伤, 改善凝血功能。

参考文献(References)

- [1] Gauthier T, Yao C, Dowdy T, et al. TGF- β uncouples glycolysis and inflammation in macrophages and controls survival during sepsis[J]. *Sci Signal*, 2023, 16(797): eade0385-0396.
- [2] 尹彦芬, 容维娜, 张霞, 等. 脓症患者血清降钙素原、C-反应蛋白与凝血功能、病情评分的关系及预后的影响因素分析[J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21(7): 1333-1337.
- [3] Maneta E, Aivalioti E, Tual-Chalot S, et al. Endothelial dysfunction and immunothrombosis in sepsis [J]. *Front Immunol*, 2023, 14(2): 1144229-1144240.
- [4] Zhou X, Yu X, Wan C, et al. NINJ1 Regulates Platelet Activation and PANoptosis in Septic Disseminated Intravascular Coagulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 4168-4179.
- [5] Zheng XL, Gu WJ, Zhang F, et al. Exosomal miR-127-5p from BMSCs alleviated sepsis-related acute lung injury by inhibiting neutrophil extracellular trap formation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 125(3): 111076-111085.
- [6] Xiu G, Li X, Chen J, et al. Role of Serum Inflammatory Cytokines in Sepsis Rats Following BMSCs Transplantation: Protein Microarray Analysis[J]. *Cell Transplant*, 2023, 32(4): 9636897231198175-9636897231198188.
- [7] Selim SA, El-Baset SAA, Kattaia AAA, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate liver injury in a rat model of sepsis by activating Nrf2 signaling[J]. *Histochem Cell Biol*, 2019, 151(3): 249-262.
- [8] Krebs J, Hillenbrand A, Tzagogiorgas C, et al. Intravenous delivery of granulocyte-macrophage colony stimulating factor impairs survival in lipopolysaccharide-induced sepsis[J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0218602-e0218615.
- [9] Tu F, Pan L, Wu W, et al. Recombinant GM-CSF enhances the bactericidal ability of PMNs by increasing intracellular IL-1 β and improves the prognosis of secondary *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in sepsis[J]. *J Leukoc Biol*, 2023, 114(5): 443-458.
- [10] Sehgal R, Maiwall R, Rajan V, et al. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Modulates Myeloid-Derived Suppressor Cells and Treg Activity in Decompensated Cirrhotic Patients With Sepsis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13(2): 828949-828962.
- [11] Guo J, Wang R, Min F. Ginsenoside Rg1 ameliorates sepsis-induced acute kidney injury by inhibiting ferroptosis in renal tubular epithelial cells[J]. *J Leukoc Biol*, 2022, 112(5): 1065-1077.
- [12] Guo J, Wang R, Liu D. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Sepsis-Induced Acute Kidney Injury by Promoting Mitophagy of Renal Tubular Epithelial Cells via the SIRT1/Parkin Axis[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12(2): 639165-639176.
- [13] Salomão R, Ferreira BL, Salomão MC, et al. Sepsis: evolving concepts and challenges[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2019, 52(4): e8595
- [14] Iba T, Levi M, Levy JH. Sepsis-Induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2020, 46(1): 89-95.
- [15] Cánovas-Cervera I, Nacher-Sendra E, Osca-Verdegal R, et al. The Intricate Role of Non-Coding RNAs in Sepsis-Associated Disseminated Intravascular Coagulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2582-2594.
- [16] Cui J, Chen C, Zhou X, et al. IFITM3 overexpression reverses insufficient healing benefits of small extracellular vesicles from high-fat-diet BMSCs in sepsis via the HMGB1 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 126(3): 111250-111263.
- [17] Tao Y, Xu X, Yang B, et al. Mitigation of Sepsis-Induced Acute Lung Injury by BMSC-Derived Exosomal miR-125b-5p Through STAT3-Mediated Suppression of Macrophage Pyroptosis [J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18(4): 7095-7113.
- [18] Liang G, Feng Y, Tang W, et al. Proinflammatory Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal miR-150-3p Suppresses Proinflammatory Polarization of Alveolar Macrophages in Sepsis by Targeting Inhibin Subunit Beta A[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2023, 43(11): 518-530.
- [19] Campbell RA, Manne BK, Banerjee M, et al. IFITM3 regulates fibrinogen endocytosis and platelet reactivity in nonviral sepsis [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(23): e153014.
- [20] Molema G, Zijlstra JG, van Meurs M, et al. Renal microvascular endothelial cell responses in sepsis-induced acute kidney injury [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2022, 18(2): 95-112.
- [21] 曹昭, 吴明燕, 李悦, 等. 降钙素原和白细胞介素-6与抗凝血酶III联合检测对脓症患者病情严重程度及预后的预测价值[J]. *中华危重病急救医学*, 2023, 35(10): 1033-1038.
- [22] Troncoso MF, Ortiz-Quintero J, Garrido-Moreno V, et al. VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(9): 166170-166182.
- [23] Li Z, Yin M, Zhang H, et al. BMX Represses Thrombin-PAR1-Mediated Endothelial Permeability and Vascular Leakage During Early Sepsis[J]. *Circ Res*, 2020, 126(4): 471-485.
- [24] Frydrych LM, Bian G, Fattahi F, et al. GM-CSF Administration Improves Defects in Innate Immunity and Sepsis Survival in Obese Diabetic Mice[J]. *J Immunol*, 2019, 202(3): 931-942.
- [25] Joshi I, Carney WP, Rock EP. Utility of monocyte HLA-DR and rationale for therapeutic GM-CSF in sepsis immunoparalysis[J]. *Front Immunol*, 2023, 14(3): 1130214-1130226.