

文章编号: 1004-7220(2020)06-0739-05

力学刺激对巨噬细胞极性的影响

池广浩^{1,2}, 李般若¹, 吴伟¹, 郝敏¹, 马建³, 邱龙顺¹

(1. 汉中市中心医院 脊柱外科, 陕西 汉中 723000; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院 骨科, 上海市骨科内植物重点实验室, 上海 200011; 3. 镇巴县平安镇卫生院, 陕西 汉中 723000)

摘要:目的 探讨力学刺激对巨噬细胞极性的影响。方法 使用不同幅度、时间张应变刺激 RAW264.7 细胞, CCK-8试剂检测细胞活性以明确使用的力学刺激参数。将 RAW264.7 细胞诱导为 M1 型巨噬细胞, 并施加 10% 幅度、2 Hz 张应变。使用 CCK-8、流式细胞仪检测张应变对细胞活性、凋亡的影响。运用实时荧光定量聚合酶链反应仪 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测张应变对 M1 型巨噬细胞炎症相关基因表达量的影响。结果 在刺激 3 h 后, 15% 和 20% 幅度、2 Hz 张应变会显著抑制细胞活性 ($P < 0.05$), 而 10% 幅度、2 Hz 张应变不会对 RAW264.7 活性产生抑制作用 ($P > 0.05$)。10% 幅度、2 Hz 张应变对 M1 型巨噬细胞凋亡、活性无显著影响 ($P > 0.05$)。10% 幅度、2 Hz 张应变可以显著抑制 M1 型巨噬细胞炎症相关因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的表达 ($P < 0.05$)。结论 10% 幅度、2 Hz 力学刺激可抑制 M1 型巨噬细胞, 促使其向 M2 型转化。力学刺激可能成为炎症相关疾病的一种治疗手段。

关键词: 巨噬细胞极化; 张应变; 力学刺激; 细胞活性; 细胞凋亡

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2020.06.014

Effects of Mechanical Stimulation on Polarity of Macrophages

CHI Guanghao^{1,2}, LI Banruo¹, WU Wei¹, HAO Min¹, MA Jian³, QIU Longshun¹

(1. Department of Spine Surgery, Hanzhong Central Hospital, Hanzhong 723000, Shaanxi, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Orthopaedic Implants, Department of Orthopaedic Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 3. Health Center of Ping'an Town, Zhenba County, Hanzhong 723000, Shaanxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of mechanical stimulation on polarity of macrophages. **Methods** RAW264.7 cells were stimulated with tensile stretch at various amplitude and time, then cell viability was assessed with cell count kit-8 (CCK-8) for determining the stimulation parameters. RAW264.7 cells were induced to M1 type, then tensile stretch at 10% amplitude and 2 Hz was applied to M1 cells. CCK-8 and flow cytometry were used to detect the effects of tensile stretch on cell activity and apoptosis. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the effect of tensile stretch on M1 type macrophage related gene expression. **Results** After stimulation for 3 hours, tensile stretch at 15% or 20% amplitude and 2 Hz significantly inhibited cell viability ($P < 0.05$), while tensile stretch at 10% amplitude and 2 Hz did not inhibit the viability of RAW264.7 cells ($P > 0.05$). Tensile stretch at 10% amplitude and 2 Hz neither inhibited viability nor cause apoptosis of M1 type macrophages. The expression of inflammation-related genes including interleukin-1 β (IL-1 β)

收稿日期: 2019-09-05; 修回日期: 2020-02-01

基金项目: 上海市骨科内植物重点实验室开放课题 (KFKT2019002)

通信作者: 邱龙顺, 主治医师, E-mail: 5002qls@163.com

and tumor necrosis factor- α (TNF- α) of M1 type macrophages was significantly down-regulated with tensile stretch at 10% amplitude and 2 Hz ($P < 0.05$). **Conclusions** Mechanical stimulation at 10% amplitude and 2 Hz can inhibit M1 type macrophages and promote the polarization from M1 to M2. Mechanical stimulation may become a method for treating inflammation-related diseases.

Key words: macrophage polarization; tensile stretch; mechanical stimulation; cell viability; cell apoptosis

巨噬细胞是存在于所有成人组织中的多功能免疫细胞。它们参与人体生理病理过程,包括发育、代谢、维持组织内环境稳定和抵御入侵病原体等^[1]。在胚胎期,组织的特异性巨噬细胞来源于卵黄囊,并通过自我更新来维持^[2]。在成人中,骨髓造血生成的单核细胞在血液中循环,这些单核细胞通常在受伤的地方可被招募和分化,以补充组织局部巨噬细胞^[3]。巨噬细胞被微环境刺激后可诱导出多种功能表型。由于巨噬细胞表型的复杂性,使用巨噬细胞系统性耗竭的实验疗法会导致有害、往往是致命的后果。研究发现,某些功能群体对于伤口愈合十分必要,并且可以阻止疾病的进展^[4-5]。在不同的疾病环境下,M1与M2型巨噬细胞呈现的功能也各不相同。虽然M1型巨噬细胞具有杀瘤功能,但在癌症中,大多数肿瘤相关巨噬细胞呈M2样表型。M2型巨噬细胞帮助肿瘤细胞逃避宿主免疫细胞的破坏,促进血管生成、侵袭和转移。相反,在动脉粥样硬化中,M1型巨噬细胞通常被认为是致动脉粥样硬化,而M2型巨噬细胞则被认为是具有动脉粥样硬化保护作用^[6-7]。为了发掘巨噬细胞作为病理学治疗靶点的潜力,需要对巨噬细胞在疾病发病过程中的表型改变有更深入的了解。

人体的组织,如骨骼、血管和肺,都承受着人体自身的机械负荷和张应变作用力,这是它们正常功能的一部分。虽然生理水平的机械刺激对这些组织中细胞的生长和成熟很重要,但异常的刺激与炎症和疾病也具有一定相关性^[8]。目前对巨噬细胞功能可塑性的认识大多局限于可溶性因子(如细胞因子和趋化因子)对极化的影响。巨噬细胞存在于人体复杂的微环境中,故有必要考虑其他可能影响巨噬细胞表型极化的因素。鉴于力学刺激在人体微环境中起到的作用尚不清楚,本文通过10%幅度、2 Hz持续力学刺激M1型巨噬细胞3 h,探讨其是否向M2型极化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞 本实验中所用小鼠巨噬细胞系RAW264.7(见图1)来自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。RAW264.7细胞使用含有10%胎牛血清(HyClone公司,美国)、100 U/mL青霉素(Gibco公司,美国)和100 μ g/mL链霉素(Gibco公司,美国)DMEM培养基(HyClone公司,美国)培养。每2~3 d传代1次。

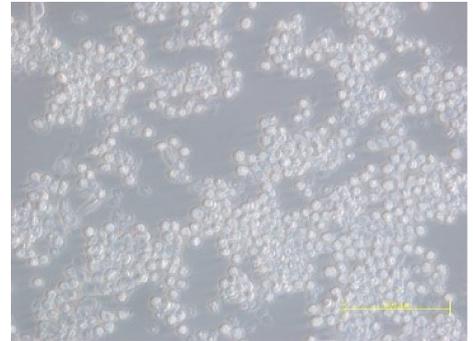


图1 RAW264.7细胞形态
Fig.1 Morphology of RAW264.7 cells

1.1.2 实验材料、试剂 细胞张应变系统(Menicon Life Science公司,日本)。0.1%明胶溶液(HyClone公司,美国),CCK-8试剂盒(Dojindo公司,日本)。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、干扰素- γ (interferon γ , IFN- γ)(Rocky Hill公司,美国)。PCR逆转录试剂(Takara公司,日本)。实时荧光定量聚合酶链反应仪(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)(ABI 7500, Life Technologies公司,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 诱导与分组 使用LPS(100 ng/mL)和IFN- γ (20 ng/mL)刺激RAW264.7细胞24 h,诱导

其向 M1 型巨噬细胞分化。体外实验分为 3 组:对照组为 RAW264.7 细胞,第 2 组为 M1 型巨噬细胞 (M1 组),第 3 组为 M1 型巨噬细胞+力学刺激 (M1+Stretch 组)。

1.2.2 细胞张应变 将 0.1% 明胶溶液加入无菌的张应变小室内,放在 4 °C 冰箱内过夜。接种 2.5×10^5 个 RAW264.7 细胞于 2 cm×2 cm 小室内。为确定合适的张应变幅度和时间,设置不同梯度的张应变幅度 (10%、15%、20%) 和张应变时间 (0、3、6、12 h),张应变频率为 2 Hz,使用正弦波张应变模式进行双向张应变。选择幅度 10%、2 Hz 正弦波张应变模式刺激 M1 型巨噬细胞 3 h。

1.2.3 流式细胞仪检测 用移液枪将细胞吹打下来,移入 15 mL 离心管,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清。使用 Annexin V/propidium iodide (PI) 凋亡试剂盒 (BD 公司,美国) 自带的封闭液洗涤 2 次,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。吸取 100 μ L 细胞悬液,加入 5 μ L 的 Annexin V 和 PI 染剂,室温避光孵育 0.5 h。使用封闭液稀释至 500 μ L 后在流式细胞仪上 (Beckman 公司,美国) 检测。

1.2.4 细胞存活率测定 使用 CCK-8 试剂检测细胞活性状态。吸掉上清液,按照 CCK-8 试剂:培养基为 1:10 的比例配制 CCK-8 检测液。将配好的检测液加入各组的张应变小室内,1 mL/孔,完全覆盖细胞。37 °C 培养箱孵育 2 h,每个小室吸出 100 μ L 液体转移至 96 孔板内,450 nm 测其吸光度值。

1.2.5 qRT-PCR 检测 使用 Trizol 溶液裂解细胞,按照试剂说明提取 RNA,测量其在 260 nm 处的吸光度计算总 RNA 的浓度。使用一步法逆转录试剂盒按说明将 mRNA 逆转录成 cDNA。然后进行实时定量荧光 PCR。促炎因子白细胞介素-1 (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的基因表达量以 GAPDH 作为参照,并使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行计算。引物序列如表 1 所示。

1.3 统计方法

计量资料以均值 \pm 标准差表示。使用 SPSS 21 对数据进行单因素方差分析 (ANOVA) 进行比较。 $P < 0.05$ 表示差异用统计学意义。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

基因	引物序列
GAPDH-F	5'-CTTCATTGACCTCAACTACATGGTCTA-3'
GAPDH-R	5'-GATGACAAGCTTCCCATTCTCAG-3'
IL-1 β -F	5'-TTCAAGGGACATTAGGCAG-3'
IL-1 β -R	5'-TGTGCTGGTGCTTCATTCAT-3'
TNF- α -F	5'-CTCAGCGAGGACAGCAAGG-3'
TNF- α -R	5'-AGGACAGAACCTGCCTGG-3'

2 结果

2.1 张应变幅度、时间测定

使用不同梯度的张应变幅度 (10%、15%、20%) 和张应变时间 (0、3、6、12 h) 刺激 RAW264.7 细胞。结果表明,幅度 10%、2 Hz 张应变刺激 3 h 对细胞活性无显著影响。而张应变幅度更高或者张应变时间更长的刺激则会抑制细胞活性 ($P < 0.05$)。因此,在后续实验中,选择幅度 10%、2 Hz、3 h 的张应变刺激。

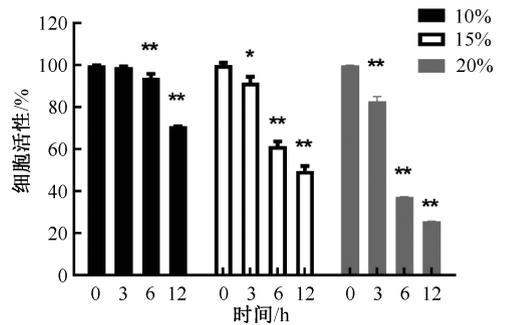


图 2 不同幅度、时间的 2 Hz 张应变对细胞活性影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.2 Effects of 2 Hz tensile stretch with various amplitudes and time on cell viability

2.2 细胞凋亡率、存活率比较

细胞可以接受微环境的改变并产生生物学反应。使用 Annexin-V/PI 双染检测细胞凋亡情况,其中右上象限 (Annexin-V 阳性,PI 阳性) 为晚期凋亡细胞,右下象限 (Annexin-V 阳性,PI 阴性) 为早期凋亡细胞。在统计细胞凋亡率时,将右上、右下象限的细胞一起计入。流式凋亡结果表明,RAW264.7 细胞 (对照组) 凋亡率约为 5%,M1 型巨噬细胞和经过 10% 幅度、2 Hz 力学张应变作用的 M1 型巨噬细

胞与对照组细胞的凋亡率无显著差异($P>0.05$)。该结果表明,LPS和IFN- γ 诱导的M1型巨噬细胞凋亡率不会增加。此外,力学刺激也不会诱导M1型巨噬细胞凋亡。细胞活性实验结果也表明,10%幅度、2 Hz力学张应变对M1型巨噬细胞的活性无影响($P>0.05$),见图3。

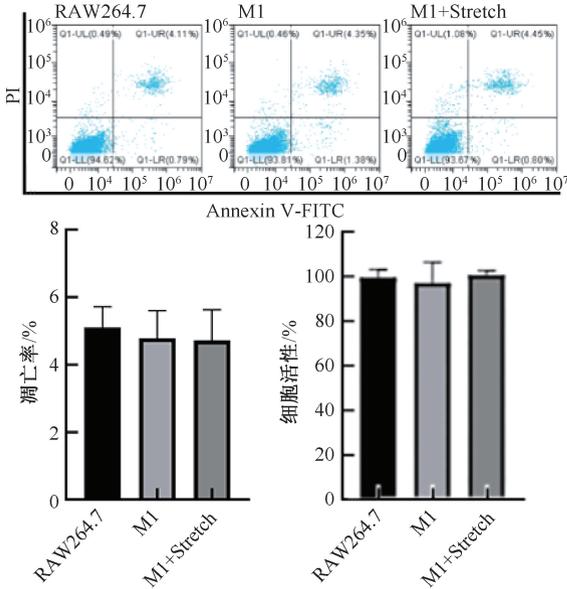


图3 10%幅度、2 Hz张应变对RAW264.7诱导的M1型巨噬细胞凋亡及活性的影响

Fig.3 Effect of tensile stretch at 10% amplitude and 2 Hz on apoptosis and viability of M1 type macrophage induced by RAW264.7 cells

2.3 炎症因子基因测定

qRT-PCR结果显示,RAW264.7细胞诱导形成的M1型巨噬细胞炎症基因IL-1 β 、TNF- α 与对照组相比表达显著增加。而10%幅度、2 Hz张应变刺激M1型巨噬细胞3 h后,细胞在炎症基因IL-1 β 、TNF- α 的表达量上与M1型巨噬细胞相比明显降低($P<0.05$),见图4。因此,本文推测,张应变刺激可以抑制M1型巨噬细胞,促使其向抗炎的M2型转化。

3 讨论与结论

在本研究中,首先使用不同幅度、时间的力学张应变刺激巨噬细胞,并检测细胞活性。结果发现,10%幅度、2 Hz力学张应变刺激3 h对巨噬细胞活性没有影响,故在后续实验中选择该刺激参数。进一步使用张应变刺激M1型巨噬细胞。结果表

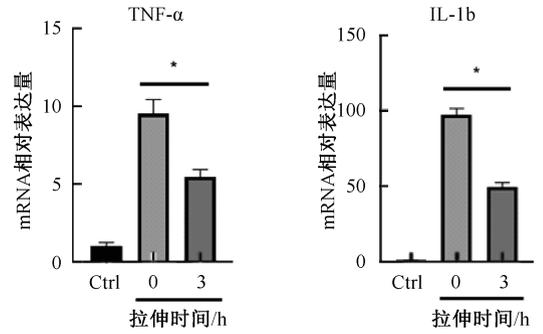


图4 10%幅度、2 Hz张应变对M1型巨噬细胞炎症因子基因表达的影响(* $P<0.05$)

Fig.4 Effects of tensile stretch at 10% amplitude and 2 Hz on expression of M1 type macrophage related genes

明,10%幅度、2 Hz力学张应变对M1型巨噬细胞活性没有影响,但是能够抑制M1炎症因子基因表达。因此,本文认为,张应变刺激可以抑制M1型巨噬细胞,可能促使其向M2型转化,力学刺激有望成为炎症相关疾病的一种治疗手段。

作为机体免疫防线的组成部分,巨噬细胞在炎症相关疾病中起着重要的作用^[9]。M0极性的巨噬细胞可以被不同刺激物极化为促炎的M1型或抗炎的M2型^[10]。M1型巨噬细胞由脂多糖和干扰素 γ 激活,其分泌促炎因子包括TNF- α 、IL-1 β 等,会损伤正常组织。M2型巨噬细胞由IL-4、IL-10、IL-13等激活,其通过分泌IL-10抑制炎症和免疫反应^[11]。在炎症性疾病如关节炎、炎症性肠病中,抑制促炎的M1型巨噬细胞,促使其向抗炎的M2型转化并减少炎症因子分泌,可能成为炎症性疾病的重要治疗手段。

巨噬细胞具有高度异质性和可塑性,它存在于全身的大多数组织中,具有多种功能。利用巨噬细胞的功能可塑性,通过生化和物理手段,合理调控,以获得有益的表型,将是一个有前途的治疗手段。巨噬细胞起源于体循环中的单核细胞,在进入组织时发生分化,从而表现出其多样性。巨噬细胞的多样性源于它们能够根据机体自身不断变化的微环境而做出的相应表型改变。事实上,巨噬细胞在癌症、心血管疾病、肥胖、伤口愈合和异物反应等病理生理过程中起着重要的作用。现在,人们普遍认为,巨噬细胞的表型可以看作是一个连续体,由多

种不同的功能状态组成,每一种都有其独特的功能。在最简单的形式中,巨噬细胞的活化通常分为经典活化(M1)和替代活化(M2)^[12]。巨噬细胞在生理状态下,可清除体内凋亡细胞维持组织稳态,机体受到破坏时,可协助进行机体组织修复。然而,巨噬细胞暴露于各种微环境刺激后可被激活并实现多种功能表型。由于巨噬细胞表型的复杂性,巨噬细胞的极化仍是当前研究和争论的焦点^[13]。

力学刺激对巨噬细胞极性有重要调节作用。巨噬细胞因环境变化刺激极化,这种极化导致其行为功能改变。研究表明,在体外低幅度张应变刺激巨噬细胞有抗炎作用,而高幅度张应变会促进炎症反应^[14-15]。本实验结果表明,10%幅度、2 Hz 力学张应变对细胞的生长状态产生影响。通过对诱导的 M1 细胞持续张应变 3 h 发现,在基因表达方面,炎症基因 IL-1 β 、TNF- α 的表达明显减弱,故可以认为通过适度的张应变会使 M1 向 M2 极化。通过本实验结果可以推测,对于骨关节炎等类似病人,适当活动有抑炎作用。

本文利用 CCK8、细胞凋亡、PCR 实验对 M1 和 M2 型巨噬细胞极化调节进行简单的阐述。实验证明了适当的力学刺激可以抑制 M1 型巨噬细胞炎症因子基因表达,故力学刺激在炎症相关疾病中可能有治疗价值。然而,本研究也存在如下的局限性:① 仅基于体外实验研究,并没有进行动物模型研究;② 仅探究力学刺激对巨噬细胞表型的影响,并未研究其内在的机制;③ 力学刺激有很多种类,包括张应变、压缩、剪切等,而本文只研究张应变刺激对巨噬细胞极性的影响。在后续研究中,本课题组将进一步研究上述问题。

综上所述,本文通过研究张应变刺激对巨噬细胞极性的调节作用发现,适当的力学刺激可以抑制 M1 型巨噬细胞以及炎症因子基因表达。因此,力学刺激可能在炎症性疾病中起到治疗作用。

参考文献:

[1] WYNN TA, CHAWLA A, POLLARD JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 445-455.

[2] HUANG J, CAI X, OU Y, et al. Resolution of inflammation

in periodontitis: A review [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(9): 4283-4295.

- [3] GUILLIAMS M, GINHOUX F, JAKUBZICK C, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: A unified nomenclature based on ontogeny [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(8): 571-578.
- [4] HU Z, PEI G, WANG P, et al. Biliverdin reductase A (BVRA) mediates macrophage expression of interleukin-10 in injured kidney [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 22621-35.
- [5] MOSSER DM, EDWARDS JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(12): 958-969.
- [6] GIBBINGS SL, THOMAS SM, ATIF SM, et al. Three unique interstitial macrophages in the murine lung at steady state [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 57(1): 66-76.
- [7] LEWIS CE, POLLARD JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 605-612.
- [8] CORNELISSEN R, LIEVENSE LA, MAAT AP, et al. Ratio of intratumoral macrophage phenotypes is a prognostic factor in epithelioid malignant pleural mesothelioma [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106742.
- [9] KERSCHENMEYER A, ARLOV O, MALHEIRO V, et al. Anti-oxidant and immune-modulatory properties of sulfated alginate derivatives on human chondrocytes and macrophages [J]. *Biomater Sci*, 2017, 5(9): 1756-1765.
- [10] GAFFNEY L, WARREN P, WRONA EA, et al. Macrophages' role in tissue disease and regeneration. Results and problems in cell differentiation [J]. *Results Probl Cell Differ*, 2017, 62: 245-271.
- [11] SIOUTI E, ANDREAKOS E. The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 165: 152-169.
- [12] AMERONGEN MJ, HARMSSEN MC, ROOIJEN N, et al. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(3): 818-829.
- [13] ORECCHIONI M, GHOSHEH Y, PRAMOD AB, et al. Macrophage polarization: Different gene signatures in M1 (LPS+) vs. classically and M2 (LPS-) vs. alternatively activated macrophages [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1084.
- [14] RICH A, HARRIS AK. Anomalous preferences of cultured macrophages for hydrophobic and roughened substrata [J]. *J Cell Sci*, 1981, 50: 1-7.
- [15] ORIHUELA R, MCPHERSON CA, HARRY GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(4): 649-665.