

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.06.001
文章编号: 1005-8982 (2018) 06-0001-08

基础研究 · 论著

溶酶体在巨噬细胞极化中的作用研究 *

吴鹏¹, 田孝祥², 刘丹², 齐艳萍¹, 闫承慧², 韩雅玲²

(1. 锦州医科大学研究生院, 辽宁 锦州 121000; 2. 沈阳军区总医院 心内科, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: **目的** 探讨溶酶体在巨噬细胞极化中的作用。**方法** 体外培养小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7, 用脂多糖 (LPS) 100 ng/ml+ 伽马干扰素 (IFN- γ) 20 ng/ml 诱导其向经典活化型 (M1) 极化, 用白细胞介素 4 (IL-4) 20 ng/ml 诱导其向替代活化型 (M2) 极化, 建立巨噬细胞极化模型。以未诱导细胞作为对照组。通过流式细胞术、ELISA、Western blot 及实时 PCR (real-time PCR) 法, 检测 M1 型及 M2 型巨噬细胞比例及标志物表达, 验证巨噬细胞极化模型是否建立成功。通过 Western blot、real-time PCR 及免疫荧光染色检测 M1 型及 M2 型巨噬细胞中溶酶体标志物表达, 包括溶酶体膜相关蛋白 1、2 (LAMP-1、LAMP-2) 及溶酶体整合膜蛋白 2 (LIMP-2)。给予溶酶体抑制剂氯喹 (chloroquine) 25 μ .mol/L 刺激巨噬细胞, 流式细胞术检测 M1、M2 型巨噬细胞比例。**结果** 成功建立巨噬细胞极化模型。与对照组比较, 溶酶体标志物 (LAMP-1、LAMP-2 及 LIMP-2) 转录及蛋白水平表达在 M1 型极化组中降低, 而在 M2 型极化组中增加。溶酶体抑制剂氯喹处理可降低 M2 型极化比例, 增加 M1 型极化比例。**结论** 溶酶体参与巨噬细胞极化过程, 抑制溶酶体可促进巨噬细胞向 M1 型极化。

关键词: 巨噬细胞; 极化; 溶酶体

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

Role of lysosomes in macrophage polarization*

Peng Wu¹, Xiao-xiang Tian², Dan Liu², Yan-ping Qi¹, Cheng-hui Yan², Ya-ling Han²

(1. The Graduate School, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 2. Department of Cardiology, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang, Liaoning 110016, China)

Abstract: Objective To investigate the role of lysosomes in macrophage polarization. **Methods** In vitro model of macrophage polarization was established with RAW 264.7 cell line. M1 macrophages were obtained by co-incubating of cells with lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml) plus interferon-g (IFN-g, 20 ng/ml). M2 macrophages were obtained by co-incubating of cells with interleukine-4 (IL-4, 20 ng/ml). Chloroquine (25 μ mol/l), a well-accepted lysosome inhibitor, was used to treat RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells in sham control group did not received any treatments. Flow cytometry, ELISA, Western blot and Real-time PCR were performed to measure differential success of two cell types and lysosome markers expression including lysosome associated membrane protein 1, 2 (LAMP-1, LAMP-2) and lysosome integral membrane protein 2 (LIMP-2). **Results** Flow cytometry data suggested that in vitro model of macrophage polarization was successfully established. Compared with the control group, expression of lysosome makers including LAMP-1, LAMP-2 and LIMP-2 were significantly decreased in M1 macrophage subgroup while a dramatic increase of mentioned biomarkers of lysosomes was witnessed in M2 macrophages. In addition, treatment of chloroquine significantly decreased ratio of M2 macrophages over M1 macrophages. **Conclusions** Lysosome participates in macrophage polarization, and inhibition of lysosome facilitates

收稿日期: 2017-06-07

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81570767); 辽宁省自然科学基金 (No: 201602791)

[通信作者] 韩雅玲, E-mail: yalinghan@gmail.com

differentiation of M1 polarization.

Keywords: macrophage; polarization; lysosome

巨噬细胞是机体内重要的吞噬和抗原提呈细胞,是炎症和先天性免疫的关键效应物,并在多种炎症相关疾病,包括心血管病(动脉粥样硬化、心肌梗死、心肌炎)、代谢性疾病(肥胖、糖尿病,代谢综合征)及癌症等中发挥重要作用^[1-3]。在不同病理生理条件下,巨噬细胞可发生极化,成为功能不同的经典活化型 M1[脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)共同作用]或替代活化型 M2[白细胞介素 4(interleukine-4, IL-4)作用]。M1 型巨噬细胞可以分泌多种促炎因子[如:肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α)、单核细胞趋化因子 1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)],在动脉粥样硬化及代谢性疾病的发生、发展过程中增多,发挥促炎症作用;M2 型巨噬细胞分泌抑炎因子[如:白细胞介素 10(interleukine-10, IL-10)、转化生长因子 β_1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β_1)],增强细胞清除能力,在动脉粥样硬化及代谢性疾病的发生、发展过程中增多,抑制炎症的作用^[4-5]。目前认为,巨噬细胞极化是巨噬细胞发挥病理生理作用的主要机制之一。因此,巨噬细胞极化调控研究已成为多种疾病研究的热点。

目前,有研究报道 C-Jun N-terminal kinase(JNK)及 Notch 等信号通路参与巨噬细胞极化调控,但其机制尚未阐明^[6]。溶酶体在巨噬细胞中大量表达,是其对抗外源和内源性病原分子不可或缺的重要细胞结构,在炎症反应中发挥重要作用^[7]。但是对溶酶体是否参与调控巨噬细胞极化仍少见报道。因此,本研究拟采用单核巨噬细胞系,在体外建立巨噬细胞极化模型,探讨溶酶体在巨噬细胞极化中的作用。本研究将为巨噬细胞新的极化调控机制提供实验依据和理论线索,并为多种巨噬细胞极化相关疾病的防治提供新的干预靶点。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7(购自中国科学院细胞库),抗 GAPDH 抗体、Lipopolysaccharide-LPS(Sigma 公司),DMEM(Gibco 公司),胎牛血清(Biochrom 公司),蛋白测定 BCA 试剂盒(Pierce 公司),

辣根过氧化物酶标记的二抗(北京中杉金桥生物公司),Mouse IL-10/Mouse MCP-1/Mouse TNF- α /Mouse TGF- β_1 ELISA 检测试剂盒(R&D 公司),PE 标记大鼠抗小鼠 F4/80 抗体、FITC 标记抗小鼠 CD206 抗体(BD Pharmingen 公司),FITC 标记抗小鼠 CD16/32 抗体(Biolegend 公司),抗 TNF- α 、INOS 抗体(Cell signaling 公司),抗 CD206 抗体、抗 LAMP-1/LAMP-2/LIMP-2 抗体(Abcam 公司),逆转录试剂盒、SYBR Green 染料(TaKaRa 公司),PCR 引物(上海生工生物工程股份有限公司),重组小鼠 IFN- γ 、白细胞介素 4(IL-4)(PeproTech 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞处理及分组 实验分为对照组(未接受诱导剂刺激)、经 LPS(100 ng/ml)+IFN- γ (20 ng/ml)刺激 24 h 诱导 M1 组及 IL-4(20 ng/ml)刺激 24 h 诱导 M2 组^[8]。

1.2.2 光镜观察细胞形态变化 细胞进行上述处理后,倒置显微镜下观察各组细胞形态学变化。

1.2.3 流式细胞术检测 M1、M2 型巨噬细胞比例 经上述处理的细胞,每组经胰 0.25% 蛋白酶消化后并计数。取 5×10^5 个细胞/管, PBS 液洗 3 次, $50 \mu\text{l}$ PBS 重悬,加入 $5 \mu\text{l}$ PE 标记的大鼠抗小鼠 F4/80 抗体、 $2 \mu\text{l}$ FITC 标记的抗小鼠 CD16/32 抗体、 $2 \mu\text{l}$ FITC 标记的抗小鼠 CD206 抗体,冰上孵育 20 ~ 30 min,用 PBS 洗去未结合的抗体。PBS 重悬后,用流式细胞仪 FACS Calibur 检测 M1 型及 M2 型巨噬细胞比例。

1.2.4 ELISA 检测细胞培养上清中炎症因子及趋化因子 分别收集 3 组经 24 h 刺激的细胞培养上清液,按照 ELISA 试剂盒产品说明书进行操作,分别检测细胞培养上清液中 TNF- α 、MCP-1、IL-10 及 TGF- β_1 含量。在 30 min 内用酶标仪读取结果,450 nm 为测定波长,570 nm 为校正波长。

1.2.5 Western blot 细胞刮刀刮取并收集各组细胞,每 1×10^5 个细胞比例加入细胞裂解液 100 ~ 200 μl 。吹打混匀,冰上裂解细胞 30 min,每 5 分钟振荡 1 次。用 4℃ 离心机 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液。采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,各组取 40 μg 总蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳。半干法将蛋白转印到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉 TBS-T 溶液室温封闭 1 h。一抗 4℃

摇晃过夜(1:1000稀释),TBS-T洗3遍。次日相应二抗(1:10000稀释)室温摇晃孵育1h。增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒显色,暗室发光显影。扫描胶片,采用Quantity-One(Biorad公司)软件对条带进行灰度分析。

1.2.6 实时PCR(real-time PCR) 各组细胞弃培养基,PBS洗3次,加入1ml Trizol。按Trizol法提取总RNA,测定浓度及纯度,A260/280比值在1.7~1.8之间满足实验要求。按照TaRaRa Prime Script™试剂盒产品说明书进行逆转录cDNA。使用Takara SYBR荧光染料,配制20 μl反应体系:10 μl 2×SYBR Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus),PCR正向、反向引物(10 μmol/L)0.8 μl,0.4 μl ROX Reference Dye,2.0 μl cDNA,6.0 μl dH₂O。反应条件:95℃ 3 min 热变性;95℃ 5 s 变性、60℃ 31 s 退火 40个循环;95℃ 15 s、60℃ 30 s、95℃ 15 s 熔解。每个样本设2~3个复孔,其中GAPDH为内参。采用诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、IL-6及MCP-1标记M1型巨噬细胞;精氨酸酶1(arginase-1, Arg-1)和甘露醇受体(mannitol receptor, CD206)标记M2型巨噬细胞;溶酶体标志物[如溶酶体膜相关蛋白1(lysosomal membrane associated protein 1, LAMP-1)、溶酶体膜相关蛋白2(lysosomal membrane associated protein 2, LAMP-2)及溶酶体整合膜蛋白2(lysosome integral membrane protein 2, LIMP-2)]目的基因mRNA的相对表达量根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的公式及方法进行换算。本研究所用引物序列见附表。

1.2.7 免疫荧光观察溶酶体发生情况 将上述处理的3组细胞以合适密度接种于置有玻片的6孔板中,行细胞免疫荧光染色。弃上清液,PBS洗4次,4%多

聚甲醛固定5 min,PBS洗4次;0.2% Triton X-100室温通透10 min,PBS洗3次;10%山羊血清封闭1 h,弃掉血清,加入PBS稀释的抗LAMP-1、LAMP-2、LIMP-2抗体(1:100),4℃过夜;PBS洗3次,加入Alexa Fluor 488/555标记的荧光二抗(1:100)室温避光孵育1 h,PBS洗3次;PBS稀释DAPI(1:200)染细胞核1 min,PBS洗3次,去离子水漂洗,抗淬灭封片剂封片。在共聚焦显微镜下观察、照像。

1.2.8 溶酶体抑制剂可影响巨噬细胞极化 在分别经LPS+IFN-γ和IL-4刺激诱导M1型和M2型巨噬细胞中同时各加入25 μmol/l 氯喹刺激24 h,流式细胞术检测M1型、M2型巨噬细胞比例(方法同1.2.3)。

1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 19.0统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用独立样本t检验;多组间比较用单因素方差分析(One-way, ANOVA),组间两两比较采用LSD-t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 诱导后细胞形态学改变

与对照组RAW264.7细胞比较,经LPS+IFN-γ诱导M1型极化组中,细胞形态呈小圆型,伪足少;经IL-4刺激诱导M2型极化中,细胞形态呈长梭型,伪足多。见图1。

2.2 M1、M2型巨噬细胞诱导比例

M1型及M2型巨噬细胞均表达巨噬细胞标志物F4/80。此外,M1型巨噬细胞特异性表达CD16/32,而M2型巨噬细胞特异性表达CD206。流式细胞术结果显

附表 引物序列

基因名称	引物序列	
GAPDH	正向: 5'-AACGACCCCTTCATTGACCT-3'	反向: 5'-ATGTTAGTGGGTCTCGCTC-3'
INOS	正向: 5'-GTTTGACCAGAGACCCAGA-3'	反向: 5'-GTGAGCTGCTAGGTTCTCTGT-3'
MCP-1	正向: 5'-AGGTGTCCTCCAAAGAAGCTGT-3'	反向: 5'-ACGGTCAACTTCACATTCA-3'
IL-6	正向: 5'-AGCACAGAAAGCATGATCCG-3'	反向: 5'-CTGATGAGAGGGAGGCCATT-3'
Arg-1	正向: 5'-GGACCTGGCCTTTGTTGATG-3'	反向: 5'-CCAGAGATGCTTCCAAGTGC-3'
CD206	正向: 5'-AACAAAGGGACGTTTCGGTG-3'	反向: 5'-TCCTTCTGCCCAATGTTTGC-3'
LAMP-1	正向: 5'-GCCTCCTTTCTGACCACCTA-3'	反向: 5'-ACATATGCTGGACACTGTAACG-3'
LAMP-2	正向: 5'-GTTCTAGGAGCCGTTCACT-3'	反向: 5'-GTCATCCCCACAAGTCTTC-3'
LIMP-2	正向: 5'-ACTAGCCAACACCTCCGAAA-3'	反向: 5'-GAATCTCTTGCCCTCTCA-3'

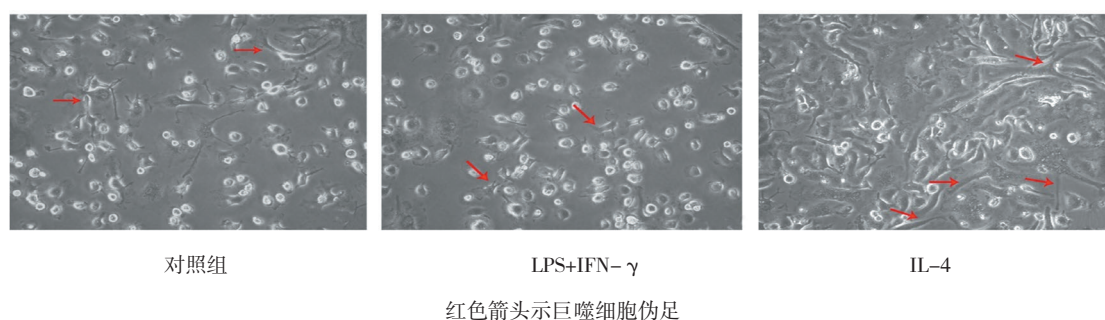


图 1 巨噬细胞形态 (相差显微镜 × 20)

示, 经 LPS+IFN- γ 诱导 M1 型极化组中, PE-F4/80、FITC-CD16/32 双阳性的 M1 型巨噬细胞比例较对照组增加 [与对照组比较, $(83.18 \pm 3.07) \%$ vs $(24.33 \pm 2.95) \% ; t = 13.81, P = 0.000$]。经 IL-4 诱导 M2 型极化组中, PE-F4/80、FITC-CD206 双阳性的 M2 型巨噬细胞比例较对照组增加 [与对照组比较, $(42.79 \pm 2.70) \%$ vs $(5.90 \pm 1.08) \% ; t = 12.63, P = 0.000$]。见图 2。

2.3 细胞培养上清液中炎症因子水平

ELISA 结果显示, 经 LPS 100 ng/ml+IFN- γ 20 ng/ml 刺激诱导 M1 型巨噬细胞培养上清中 TNF- α 和 MCP-1 含量高于对照组 (与对照组比较, $t_{TNF-\alpha} = 10.96, P_{TNF-\alpha} = 0.000$ 和 $t_{mcp-1} = 66.07, P_{mcp-1} = 0.000$), 而经 IL-4 20 ng/ml 刺激诱导 M2 型巨噬细胞培养上清中 IL-10 和 TGF- β_1 较对照组增多 (与对照组比较, $t_{IL-10} = 10.18, P_{IL-10} = 0.001$ 和 $t_{TGF-\beta_1} = 8.821, P_{TGF-\beta_1} = 0.001$)。见图 3。

2.4 M1、M2 型巨噬细胞表面分子及溶酶体相关分子表达

各组 iNOS、TNF- α 和 CD206 蛋白水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F_{iNOS} = 2700, P_{iNOS} = 0.000 ; F_{TNF-\alpha} = 97.197, P_{TNF-\alpha} = 0.000 ; F_{CD206} = 535.79, P_{CD206} = 0.000$)。与对照组比较, 在经 LPS+IFN- γ 向 M1 型诱导的巨噬细胞中高表达 iNOS 和 TNF- α 蛋白 ($P_{iNOS} = 0.001 ; P_{TNF-\alpha} = 0.018$) ; 经 IL-4 向 M2 型诱导的巨噬细胞高表达 CD206 蛋白 ($P_{CD206} = 0.003$)。各组 LAMP-1、LAMP-2 及 LIMP-2 蛋白水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F_{LIMP-2} = 120.537, P_{LIMP-2} = 0.000 ; F_{LAMP-2} = 121.437, P_{LAMP-2} = 0.000 ; F_{LAMP-1} = 99.771, P_{LAMP-1} = 0.000$)。与对照组比较, LAMP-1、LAMP-2 及 LIMP-2 蛋白在 M1 型巨噬细胞中的低表达 ($P_{LIMP-2} = 0.001, P_{LAMP-2} = 0.001, P_{LAMP-1} = 0.001$), 而在 M2 型巨噬细胞中高表

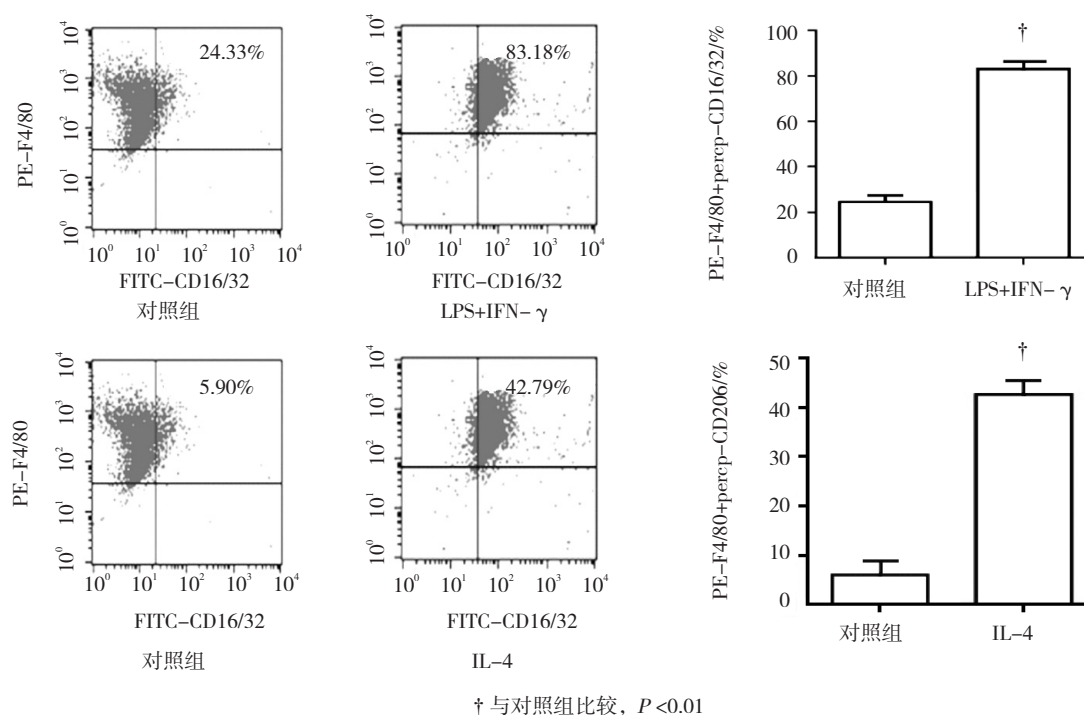


图 2 M1、M2 型巨噬细胞比例 (流式细胞术)

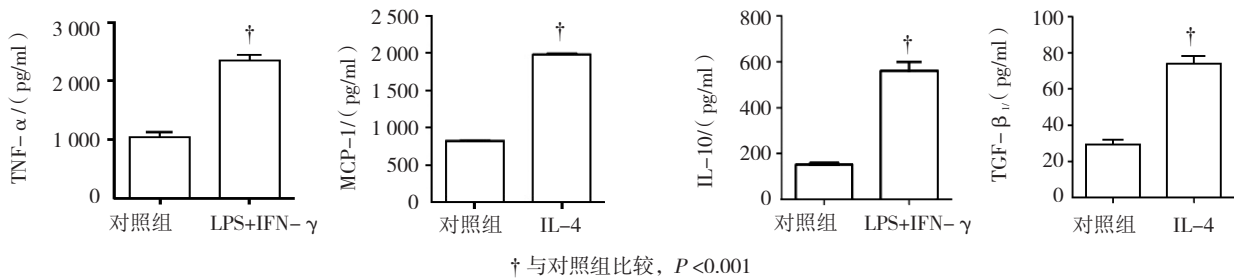


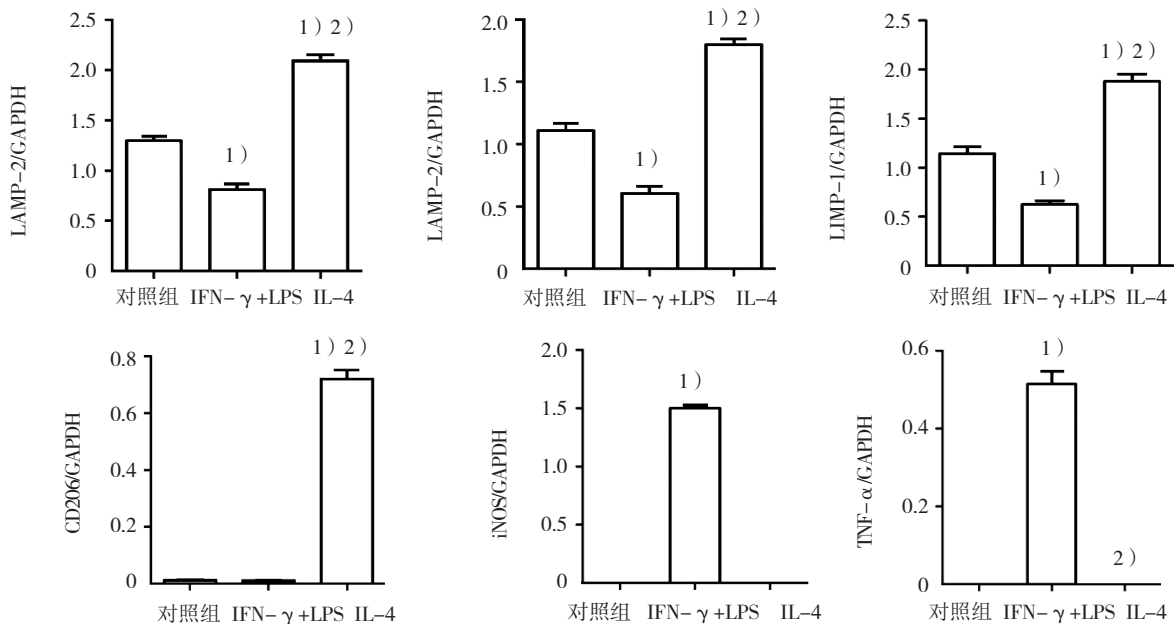
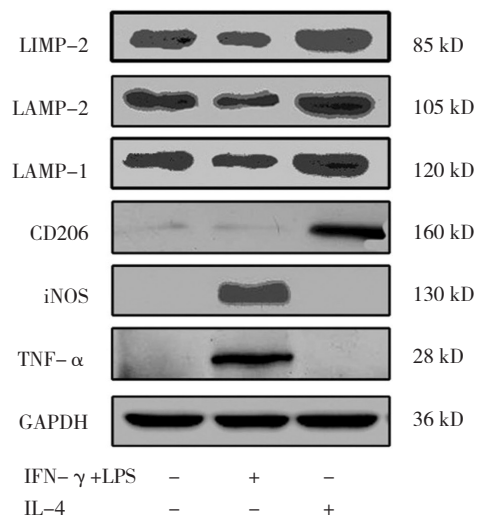
图3 细胞培养上清液中炎症因子水平

达 ($P_{LIMP-2}=0.000, P_{LAMP-2}=0.000, P_{LAMP-1}=0.000$)。见图4。

2.5 M1、M2型巨噬细胞表面分子及溶酶体相关分子表达

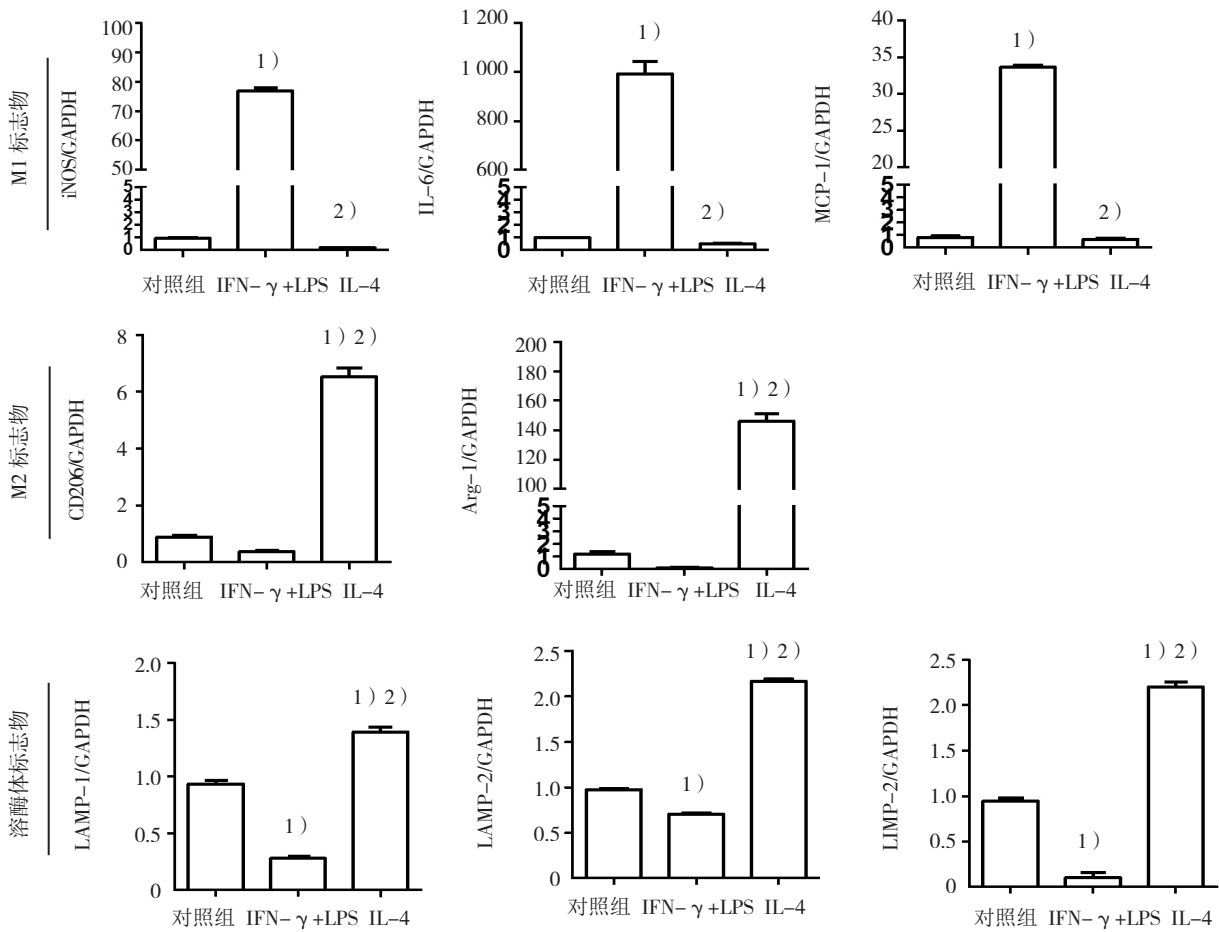
各组 iNOS、IL-6、MCP-1、Arg-1 和 CD206 mRNA 水平比较,经方差分析,差异有统计学意义 ($F_{iNOS}=4850.693, P_{iNOS}=0.000; F_{IL-6}=377.775, P_{IL-6}=0.000; F_{MCP-1}=10682.159, P_{MCP-1}=0.000; F_{Arg-1}=757.883, P_{Arg-1}=0.000; F_{CD206}=326.235, P_{CD206}=0.000$)。与对照组比较,在经 LPS+IFN- γ 向 M1 型诱导的巨噬细胞中 iNOS、IL-6 和 MCP-1 mRNA 表达水平升高 (均 $P=0.000$),而在经 IL-4 向 M2 型诱导的巨噬细胞中 Arg-1 和 CD206 mRNA 水平高于对照组和 LPS+IFN- γ 组 (均 $P=0.000$)。同时,各组细胞中 LAMP-1、LAMP-2 及 LIMP-2 mRNA 水平比较,经方差分析,差异有统计学意义 ($F_{LIMP-2}=436.174, P_{LIMP-2}=0.000; F_{LAMP-2}=1403.731, P_{LAMP-2}=0.000; F_{LAMP-1}=308.116, P_{LAMP-1}=0.000$)。与对照组

比较,在 LPS+IFN- γ 向 M1 型诱导细胞中 LAMP-1、LAMP-2 及 LIMP-2 mRNA 降低 (均 $P=0.000$),而且在 M2 组细胞中升高 (均 $P=0.000$)。见图5。



1) 与对照组比较, $P < 0.001$; 2) 与 IFN- γ +LPS 组比较, $P < 0.001$

图4 M1、M2型巨噬细胞表面分子及溶酶体相关分子表达 (Western blot)



1) 与对照组比较, $P < 0.001$; 2) 与 IFN- γ +LPS 组比较, $P < 0.01$

图 5 M1、M2 型巨噬细胞表面分子及溶酶体相关分子表达 (real-time PCR)

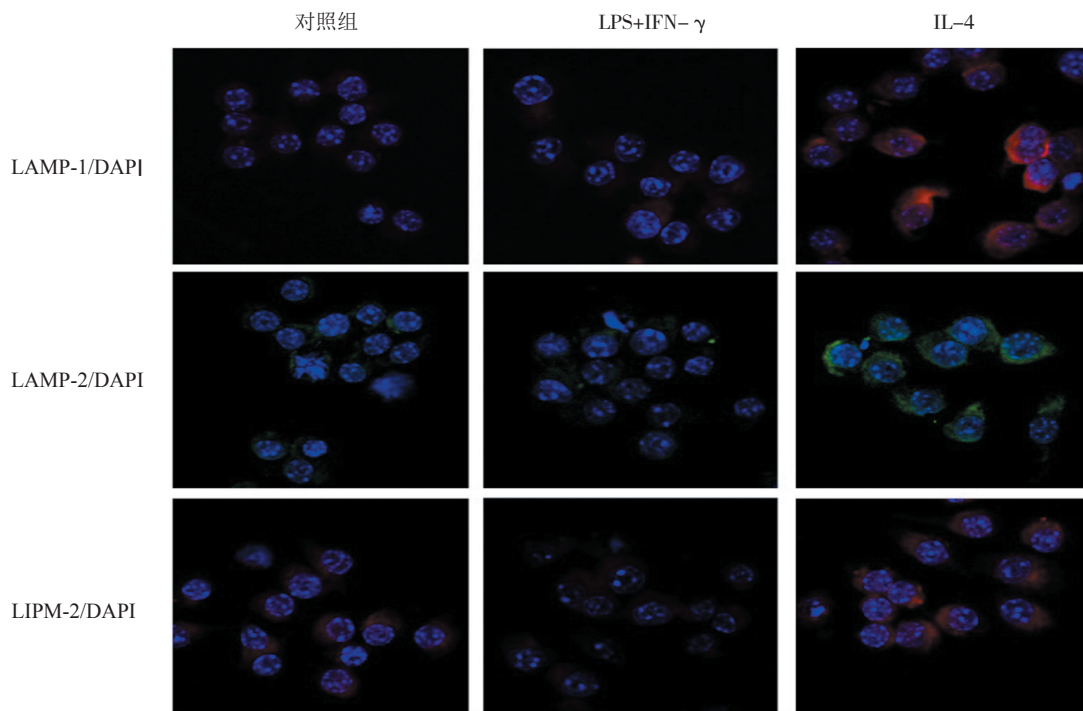


图 6 M1、M2 型巨噬细胞溶酶体 (免疫荧光 $\times 40$)

2.6 M1、M2 型巨噬细胞中溶酶体发生情况

M1 型巨噬细胞中红色荧光标记的 LAMP-1、LIMP-2 以及绿色荧光标记的 LAMP-2 少于未刺激组和 M2 组, 而在 M2 型巨噬细胞中 LAMP-1、LIMP-2 及 LAMP-2 都多于未刺激组和 M1 组。见图 6。

2.7 溶酶体抑制剂对巨噬细胞极化的作用

为进一步明确溶酶体与巨噬细胞极化的关系, 在 M1 组和 M2 组中加入溶酶体抑制剂氯喹(chloroquine), 流式细胞术结果显示, 在 LPS+IFN- γ +chloroquine 组 PE-F4/80、FITC-CD16/32 双阳性的 M1 型巨噬细胞比例较 LPS+IFN- γ 组增加 [与 LPS+IFN- γ 组比较, $(85.33 \pm 1.333) \% vs (73.52 \pm 2.348) \% ; t=4.377, P=0.012$]。同时, 在 IL-4+chloroquine 组 PE-F4/80、FITC-CD206 双阳性的 M2 型巨噬细胞比例较 IL-4 组降低 [与 IL-4 组比较, $(42.79 \pm 2.702) \% vs (21.02 \pm 1.528) \% ; (t=7.021, P=0.002)$]。见图 7。

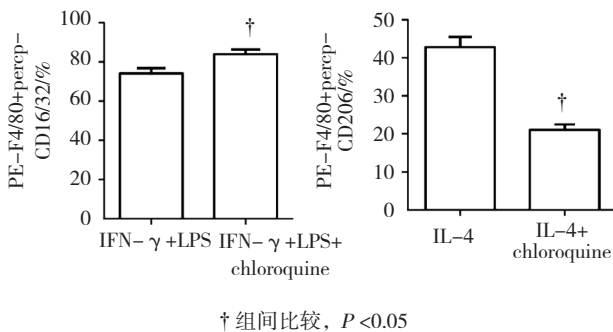


图 7 M1 型、M2 型巨噬细胞比例 (流式细胞术)

3 讨论

巨噬细胞是一种重要、多功能的细胞, 在先天性免疫和获得性免疫系统中扮演着极为重要的角色。同时, 巨噬细胞具有高度的可塑性, 在不同环境的刺激下巨噬细胞可极化为经典活化巨噬细胞 M1 型和替代性活化巨噬细胞 M2 型, 两者极化功能几乎相互拮抗, M1、M2 型巨噬细胞之间的平衡, 是维持机体稳定的重要方面^[9-11]。近年来研究发现, 巨噬细胞极化表型与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 密切相关。在急性炎症反应初期和进展期, 巨噬细胞主要表现为 M1 型, 参与病原体吞噬并促发炎症反应; 在急性炎症的消退期, 巨噬细胞则由 M1 型转分化为具有抗炎作用的 M2 型, 抑制过度的炎症反应, 促进损伤组织的修复。在 AS 发生过程中, M1 型巨噬细胞吞噬脂蛋白, 分泌促炎因子, 参与炎症反应, 促进 AS 发生和演进; 而 M2 型巨噬细胞分泌抗炎因子, 增强细胞清除能力, 抑制炎症反应, 促

进斑块稳定和消退。但 AS 演进过程中, 由于脂质和炎症刺激持续存在, 使斑块中 M1 型巨噬细胞长期占主要位置, 不能顺利转化为 M2 型巨噬细胞, 因此呈现为一种长期慢性炎症, 导致 AS 难以消退和修复^[4-5]。因此, 若能明确调节 M1 型和 M2 型巨噬细胞极化的具体分子及其调控的分子机制, 有望在 AS 的防治中进行有效干预。目前多项研究表明, 巨噬细胞极化是 1 个多因子、多环节相互作用的复杂过程, 受多种信号分子及通路的调控。迄今研究较为成熟的信号通路有: PI3K/Akt、C-Jun N-terminal kinase (JNK)、Notch 以及 B7-H3-STAT3 等信号通路^[12-14]。最新研究发现, 溶酶体在巨噬细胞极化表型调控中也起着重要作用。M1 型巨噬细胞中溶酶体的稳定性较 M2 型降低, 表现为溶酶体组织蛋白酶严重渗漏, 细胞吞噬能力下降, 易演变成泡沫细胞。2014 年 XU 等研究发现, 溶酶体在脂肪巨噬细胞 M2 型极化中起重要作用, 抑制溶酶体功能会引起巨噬细胞脂质降解能力降低, 发生脂代谢紊乱, 形成泡沫细胞^[15-16]。根据以上研究结果表明溶酶体参与并影响巨噬细胞极化过程, 但是都未明确溶酶体在巨噬细胞极化中的作用。因此, 本研究的目的是探讨溶酶体在巨噬细胞极化中的作用。

本流式细胞术检测结果显示, PE-F4/80、FITC-CD16/32 双阳性标记的 M1 型巨噬细胞比例达 88.85%, PE-F4/80、FITC-CD206 双阳性标记的 M2 型巨噬细胞比例达 41.93%。与文献中报道的诱导比例相同^[9]。为进一步标记 M1 和 M2 型巨噬细胞, 本研究选择目前研究公认的标志物, 如 iNOS、TNF- α 标记 M1 型巨噬细胞; CD206 标记 M2 型巨噬细胞。不仅从蛋白水平及转录水平分别验证建立巨噬细胞极化模型, 而且本研究分别从 M1 和 M2 型巨噬细胞功能上验证建立极化模型。结果显示, M1 型巨噬细胞中高表达 iNOS、TNF- α 蛋白并大量分泌促炎症因子 MCP-1、TNF- α ; 而 M2 型巨噬细胞中高表达 CD206 蛋白并大量分泌抑炎因子 IL-10、TGF- β_1 。根据以上结果表明成功建立巨噬细胞极化模型。

本研究发现, 溶酶体标志物 (LAMP-1、LAMP-2 及 LIMP-2) 转录及蛋白水平表达在 M1 型极化组中降低, 而在 M2 型极化组中增加, 与免疫荧光结果一致。最后, 给予溶酶体抑制剂氯喹 (chloroquine) 刺激巨噬细胞, 流式细胞术检测 M1、M2 型巨噬细胞比例。其结果显示溶酶体抑制剂氯喹处理可降低 M2 型极化比例, 增加 M1 型极化比例。目前研究认为, 氯喹作为自噬-

溶酶体抑制剂,其主要作用是抑制内体成熟,改变其酸性环境^[17]。但具体地分子机制尚不明确,笔者推测氯喹可能改变溶酶体的酸性环境来影响巨噬细胞极化。

综上所述,不同的微环境下巨噬细胞有着不同功能形式的表型并参与多种疾病的病理过程。M1型巨噬细胞虽然可以分泌多种促炎症因子诱发机体的炎症,但是M1型分泌的肿瘤坏死因子TNF- α 在抑制肿瘤的发生、发展中发挥巨大作用;而M2型巨噬细胞作为机体中的抑制炎症细胞,可以促进肿瘤的发生、发展^[18]。因此,平衡M1型和M2型巨噬细胞的极化,可以有效的干预不同疾病的病理过程。溶酶体作为巨噬细胞行使功能的重要细胞器,其结构和数量的稳定是维持巨噬细胞正常功能的重要方面。研究表明溶酶体在巨噬细胞极化过程中有着重要作用,为巨噬细胞新的极化调控机制提供实验依据和理论线索,并为多种巨噬细胞极化相关疾病的防治提供新的干预靶点。

参 考 文 献:

- [1] YUGAMI M, ODAGIRI H, ENDO M, et al. Mice deficient in angiotensin-like protein 2 (Angptl 2) gene show increased susceptibility to bacterial infection due to attenuated macrophage activity[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(36): 18843-18852.
- [2] VIEGAS C S B, COSTA R M, SANTOS L, et al. Gla-rich protein function as an anti-inflammatory agent in monocytes/macrophages: Implications for calcification-related chronic inflammatory diseases[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177829.
- [3] CHUNG S, RANJAN R, LEE Y G, et al. Distinct role of FoxO1 in M-CSF-and GM-CSF-differentiated macrophages contributes LPS-mediated IL-10: implication in hyperglycemia[J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 97(2): 327-339.
- [4] LIU G and YANG H. Modulation of macrophage activation and programming in immunity[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(3): 502-512.
- [5] FANG S, XU Y, ZHANG Y, et al. Irgm1 promotes M1 but not M2 macrophage polarization in atherosclerosis pathogenesis and development[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 251: 282-290.
- [6] SOLINAS G and BECATTINI B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response[J]. *Mol Metab*, 2017, 6(2): 174-184.
- [7] SAFTIG P and KLUMPERMAN J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(9): 623-635.
- [8] TABAS I and BORNFELDT K E. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 653-667.
- [9] ANTONIOS J K, YAO Z, LI C, et al. Macrophage polarization in response to wear particles in vitro[J]. *Cell Mol Immunol*, 2013, 10(6): 471-482.
- [10] DUEWELL P, KONO H, RAYNER K J, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals[J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1357-1361.
- [11] LODDER J, DENAES T, CHOBERT M N, et al. Macrophage autophagy protects against liver fibrosis in mice[J]. *Autophagy*, 2015, 11(8): 1280-1292.
- [12] 张颖,王永福.巨噬细胞极化相关机制的研究进展[J].*细胞与分子免疫学杂志*,2016,32(11):1570-1574.
- [13] 马坚妹.巨噬细胞极化表型与转录因子调节[J].*大连医科大学学报*,2017,39(1):1-7.
- [14] 孙康,瞿建国,陈吉祥.干扰素调节因子5(IRF5)调控小鼠骨髓源性巨噬细胞的极化[J].*细胞与分子免疫学杂志*,2017,2:168-173.
- [15] OKAHASHI N, NAKATA M, KUWATA H, et al. Streptococcus oralis induces lysosomal impairment of macrophages via bacterial hydrogen peroxide[J]. *Infect Immun*, 2016, 84(7): 2042-2050.
- [16] XU X, GRIJALVA A, SKOWRONSKI A, et al. Obesity activates a program of lysosomal-dependent lipid metabolism in adipose tissue macrophages independently of classic activation[J]. *Cell Metab*, 2013, 18(6): 816-830.
- [17] YE H, CHEN M, CAO F, et al. Chloroquine, an autophagy inhibitor, potentiates the radiosensitivity of glioma initiating cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis[J]. *BMC Neurol*, 2016, 16(1): 178.
- [18] LAM R S, O'BRIEN-SIMPSON N M, HOLDEN J A, et al. Unprimed, M1 and M2 macrophages differentially interact with porphyromonas gingivalis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158629.

(王荣兵 编辑)