

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.23.006
文章编号: 1005-8982 (2021) 23-0030-08

实验研究·论著

M2型巨噬细胞来源的外泌体对类风湿关节炎小鼠的作用及其机制研究*

闻君侠, 王瑾, 江彬锋, 翟利锋, 刘建

(浙江省立同德医院 骨伤科, 浙江 杭州 310012)

摘要: **目的** 探讨M2型巨噬细胞来源的外泌体(M2-Exo)对胶原诱导的类风湿关节炎(RA)小鼠的作用及可能机制。**方法** 分离提取C57BL/6J小鼠骨髓来源的巨噬细胞(BMDMs), 收集白细胞介素-4(IL-4)诱导的M2型巨噬细胞培养的上清液, 用超速离心法分离出M2-Exo。使用透射电子显微镜(TEM)和动态光散射(DLS)观察M2-Exo的形态结构及粒径分布; 采用细胞免疫荧光染色及Western blotting法检测M2-Exo处理的M1型巨噬细胞的表面标志物诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、精氨酸酶(Arginase)的表达。复制胶原诱导的DBA/1小鼠RA模型, 随机分为模型组和M2-Exo组, 以正常DBA/1小鼠为对照组。M2-Exo组在首次免疫后第16天及第26天关节腔注射M2-Exo(100 μ g/只), 发病全过程监测关节炎病变并评分, 于第42天安乐处死小鼠。对3组小鼠左后足拍照并测定厚度; 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测小鼠关节中促炎症细胞因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)的表达; 采用RT-PCR检测3组小鼠关节中M1型和M2型巨噬细胞的表面标志物iNOS2、CD86、Arginase、CD206 mRNA的相对表达量。**结果** M2-Exo为类圆形、有完整的包膜的囊状结构, 粒径均值为44.1 nm。M2-Exo处理24 h后的M1型巨噬细胞表达Arginase, 不表达iNOS。在RA发病过程中, M2-Exo组小鼠平均关节炎指数(AI)低于模型组($P < 0.05$)。与模型组比较, 模型复制第42天M2-Exo组小鼠的足趾关节红肿不明显, 活动障碍程度不高, 差异无统计学意义($P > 0.05$); M2-Exo组小鼠关节IL-1 β 、TNF- α 和IL-6水平均降低($P < 0.05$)。M2-Exo组小鼠关节组织中iNOS和CD86 mRNA的相对表达量低于模型组($P < 0.05$), 而CD206和Arginase mRNA的相对表达量高于模型组($P < 0.05$)。**结论** M2-Exo可能通过重编程炎症M1型巨噬细胞转换为M2型抗炎的巨噬细胞, 以缓解RA病情。

关键词: 类风湿关节炎; M2型巨噬细胞外泌体; 重编程

中图分类号: R593.22

文献标识码: A

Effect and mechanism study of M2 macrophages-derived exosomes in treatment of collagen induced rheumatoid arthritis mouse*

Jun-xia Wen, Jin Wang, Bin-feng Jiang, Li-feng Zhai, Jian Liu

(Department of Orthopedics, Zhejiang Tongde Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310012, China)

Abstract: Objective To explore the physiological therapeutic actions and its mechanism of M2-derived exosome on the collagen-induced rheumatoid arthritis (RA) mouse. **Methods** The C57BL/6J mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were separated. The supernatant of IL-4 induced M2 macrophage were collected, and the M2-Exo were collected by ultracentrifugation. The transmission electron microscope (TEM) and dynamic light scattering (DLS) were used to observe the morphological structure and particle size distribution of M2-Exo. The cell immunofluorescence and Western blotting were used to detect the transformation of M1-type macrophages

收稿日期: 2021-03-14

* 基金项目: 浙江省中医药科技计划项目 (No: 2017ZB012)

[通信作者] 刘建, E-mail: qiancheng@hotmail.com; Tel: 13777877795

to M2-type macrophages after M2-Exo treatment. The collagen-induced IA model of DBA/1 mice were randomly divide into the model group and M2-Exo group, normal DBA/1 mice were as the control group. M2-Exo (100 μg /mouse) was injected into the joint cavity of the M2-Exo group on d16 and d26 after the first immunization. The arthritis lesions were monitored and scored during the whole course of the onset. The mice were euthanized on d42. The left hind feet of each group of mice were photographed and the thickness was measured. The pro-inflammatory cytokines interleukin 1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) expression in the arthritis lesions were defined by ELISA. The relative expression of the surface markers iNOS, CD86, Arginase, and CD206 mRNA of M1 and M2 macrophages in the joints was detected by RT-PCR. **Results** M2-Exo was a round-like, cyst-like structure with a complete envelope, with an average particle size of 44.1 nm. M1 macrophages was treated with M2-Exo for 24 h, arginase was expressed but not iNOS. During the onset of RA, the average arthritis index (AI) of the M2-Exo group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the toe joints of the model M2-Exo group on d42 were not swollen and the toe joints were not high, and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The mice in the M2-Exo group had no significant difference ($P > 0.05$). The levels of TNF- α and IL-6 were significantly reduced ($P < 0.05$). The relative expression levels of M1 marker iNOS and CD86 in the joint tissues of the M2-Exo group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$), while the relative expression levels of CD206 and arginase were significantly higher than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** M2-Exo may reprogram inflammatory M1 macrophages into M2 anti-inflammatory macrophages to alleviate the condition of RA.

Keywords: arthritis, rheumatoid; m2 macrophages-derived exosomes; reprogramming

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种世界性高发的自身免疫性疾病, 其发病率高达 1%^[1-2], 是骨骼和软骨炎症损伤导致的关节肿胀和变形。RA 常伴随关节受累、身体功能失调, 严重者可致残疾, 影响患者及家人的生活质量^[3]。目前, RA 的临床治疗主要采用糖皮质激素和非甾体抗炎药, 如经典的抗风湿性药物氨甲喋呤, 虽然可以缓解临床症状, 但长期使用有肝毒性及致畸等严重副作用^[4]; 再如抗 TNF- α 抗体, 可明显抑制炎症反应, 但伴随免疫系统下降, 也增加患者的感染风险, 此外高额的费用也限制其在临床的广泛应用^[5-6]。鉴于此, 研究 RA 安全有效的治疗方案具有显著的现实意义。

巨噬细胞是机体最常见的防御性免疫细胞之一, 在炎症相关性疾病的发生、发展中扮演重要角色^[7]。滑膜中的巨噬细胞通过分泌多种炎症因子及基质金属蛋白酶等介质促进炎症反应, 在调控 RA 发病过程中起关键作用^[8-12]。已有研究^[13]表明, M2 型巨噬细胞衍生的外泌体 (M2-Exo) 在体外能够诱导 M1 重新编程, 上调精氨酸酶 (Arginase) (M2 标记), 下调诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) (M1 标记) 的表达, 完全转化为 M2 型巨噬细胞, 表现出 M2 型巨噬细胞独特的表型和功能特征。此外, M2-Exo 不仅具有重编程巨噬细胞的功能, 而且有

促进伤口愈合的各种细胞因子和生长因子^[14]。

本研究采用超速离心法体外分离提取白细胞介素-4 (Interleukin-4, IL-4) 诱导的 M2 型巨噬细胞, 研究 M2-Exo 对炎症性 M1 型巨噬细胞的表型标志物 iNOS2、Arginase 表达分布的影响, 探讨 M2-Exo 抗炎反应的分子机制, 为外泌体调控关节组织的炎症状态及修复过程提供新的思路, 为寻找 RA 新的治疗方案提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

C57BL/6 小鼠 10 只, 雌性, 6~8 周龄, 体重 (21.0 \pm 2.0) g; DBA/1 小鼠 30 只, 雌性, 6~8 周龄, 体重 (25.0 \pm 2.5) g 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物实验均严格按照实验动物指南进行, 并经医院伦理委员会批准 [实验动物许可证号 SYXK(浙)2019-0010]。RPMI 1640 培养基及胎牛血清 (美国 Life 公司), 脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) (L2880) (美国 Sigma 公司), 青霉素及链霉素 (美国 Invitrogen 公司), 巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) 及 IL-4 (美国 Peprotech 公司), DAPI 染色液 (上海碧云天生物技术公司), BCA 蛋白测定试剂盒和 Trizol 试剂 (美国 Thermo Scientific 公司), 苏木精-伊红 (HE)

染色液(南京建成生物工程研究所),酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海西唐生物科技有限公司), iNOS(ab210823,美国 Abcam 公司), Arginase(93668,美国 CST 公司), F4/80(ab6640)、Alexa Fluor 488(ab150117)、Alexa Fluor 647(ab150083)(美国 Abcam 公司)。Zetasizer 型 Nanosight 可视型纳米颗粒分析仪(荷兰 Malvern Panalytical 公司), 35 mm 细胞培养皿(美国 Corning 公司)。

1.2 M2型巨噬细胞来源的外泌体的制备、鉴定及生物学功能

骨髓来源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMDMs)的分离诱导:取10只C57BL/6小鼠的股骨和胫骨,剪开两端,打开骨髓腔,用10 ml注射器注射无菌磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲出骨髓,加入红细胞裂解液重悬,冰上裂解10 min;完全培养基重悬后,以10 ng/ml M-CSF诱导单核细胞向巨噬细胞分化,培养7 d后置于含10 ng/ml IL-4的完全培养基,诱导分化48 h后,即得M2型巨噬细胞。采用超速离心法分离M2-Exo^[15]:将M2型巨噬细胞在无血清条件下培养48 h,收集上清液,4℃ 1 000 r/min离心20 min,去除细胞,4 600 r/min离心20 min,去除死细胞,9 000 r/min离心1 h,去除细胞碎片,收集上清液,11 000 r/min离心1.5 h,收集M2-Exo。PBS清洗1次,去除污染蛋白,36 000 r/min离心1.5 h,收集上清液待测。将M2-Exo在2%多聚甲醛溶液中固定过夜,以25 000 r/min离心1 h,悬浮于无水乙醇中。取2 μl滴加到铜网上,晾干后通过透射电镜(TEM)观察M2-Exo的形貌,以纳米颗粒分析仪分析粒径大小。将BMDMs以 3×10^5 个细胞密度接种于细胞培养皿,培养过夜后,以LPS(100 ng/ml)刺激6 h诱导为M1型巨噬细胞,采用含50 μg/ml的M2-Exo无血清培养基37℃孵育24 h备用。分离部分含M2-Exo无血清孵育的M1型巨噬细胞,以36 000 r/min离心18 h去除外泌体,作为M0-Exo^[16]。

1.3 RA模型的复制及分组

1.3.1 复制胶原诱导的RA模型^[17] 在低温冰水浴条件下,将牛Ⅱ型胶原与完全弗氏佐剂以1:1等体积混合,使用匀浆器搅拌混合溶液,直到颜色变白、形状黏稠,将乳化剂皮下注射于麻醉后的20只DBA/1小鼠尾根部,100 μl/只。在首次免疫注射后第21天,进行第2次注射,剂量同第1次。实验

小鼠随机编号,分为模型组和M2-Exo组,每组10只。另取10只DBA/1小鼠为对照组,同法注射生理盐水。

1.3.2 M2-Exo处理 M2-Exo组小鼠首次免疫注射后第16天和第26天采用关节腔注射方式进行原位给药M2-Exo,100 μg/只,左右关节腔分别给予50 μg。模型组和对照组小鼠注射相同体积的生理盐水。

1.4 观察指标

①体重。每周称体重,记录3组小鼠的生长状况。②小鼠关节炎严重程度。监测小鼠RA的发展情况,记录RA严重程度。参照关节炎指数(AI)评分^[18]评价小鼠足爪肿胀情况:0分,无红肿;1分,足小趾关节红肿;2分,趾关节、足跖均红肿;3分,踝关节以下均红肿;4分,包括踝关节在内的全部足爪红肿。平均AI=每组小鼠AI总和/只数。③小鼠前足腕部直径、后足足垫厚度和关节炎评分。使用游标卡尺测量小鼠每只脚,测量3次取平均值。

1.5 关节标本处理

免疫(首次注射)后第42天,抽取所有小鼠的眼静脉丛血,离心得血清,安乐法处死小鼠,解剖取关节标本。

1.6 ELISA法检测小鼠关节组织中炎症细胞因子水平

将3组小鼠的关节组织分别匀浆,采用ELISA法检测小鼠关节匀浆上清液中白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素-6(IL-6)水平,严格按照试剂盒说明书操作。

1.7 免疫荧光染色及Western blotting检测

免疫荧光染色:将分离得到的M1巨噬细胞以4%多聚甲醛固定,封闭后孵育相应的一抗M1(F4/80和iNOS)和M2(F4/80和Arginase)过夜,加入荧光二抗,DAPI核染后封片,激光共聚焦显微镜下观察并分析。

采用Western blotting分别检测M1型和M2型巨噬细胞的iNOS和Arginase蛋白相对表达量。将细胞标本以PBS清洗1次,加入细胞裂解液,采用SDS-PAGE电泳分离,转至PVDF膜,封闭,置于一抗孵育,兔抗iNOS(工作浓度1:1 000)和兔抗Arginase(工作浓度1:1 000),二抗为含HRP的山羊抗兔/小鼠抗体,化学发光凝胶成像系统曝光成像,内参为β-actin(工作浓度1:4 000),采用Image J图像分析

软件检测蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.8 RT-PCR检测小鼠关节腔M1和M2型巨噬细胞表面标志物mRNA的相对表达量

分离3组小鼠的关节,采用RT-PCR检测M1型和M2型巨噬细胞表面标志物mRNA相对表达量。采用Trizol法提取关节巨噬细胞RNA,以逆转录酶逆转录cDNA,引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR扩增条件:95℃预变性3 min(1个循环),95℃变性30 s,60℃退火60 s,60℃延伸15 s,40个循环。 β -actin为内参。PCR采集目的基因及内参基因的Ct值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列

基因名称	引物序列	序列长度/bp
iNOS	正向: 5'-CCTTGGTGAAGGGACTGAGC-3'	314
	反向: 5'-CAACGTTCTCCGTTCTCTTGC-3'	
CD86	正向: 5'-GACCGTTGTGTGTCTCTGG-3'	300
	反向: 5'-GATGAGCAGCATCACAAGGA-3'	
Arginase	正向: 5'-CAGAAGAATGGAAGAGTCAG-3'	215
	反向: 5'-CAGATATGCAGGGAGTCACC-3'	
CD206	正向: 5'-GGAAACGGGAGAACCATCAC-3'	119
	反向: 5'-GGCGAGCATCAAGAGTAAAG-3'	
β -actin	正向: 5'-ACCCTGAAAAGATGACCCAG-3'	650
	反向: 5'-AGCCTGGATGGCTACGTACA-3'	

1.9 统计学方法

数据分析采用SPSS 22.0统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用 t 检验,多组间的比较用方差分析或重复测量设计的方差分析,进一步的两两比较用LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功制备的M2-Exo及对M1型巨噬细胞的影响

TEM结果表明,M2-Exo呈现类圆形、有完整的包膜的囊状结构(见图1)。DLS检测结果显示,M2-Exo的粒径均值44.1 nm(见图2)。表明成功分离提取M2-Exo,可用于后续实验。

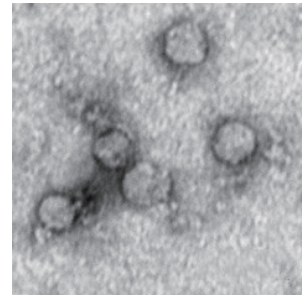


图1 M2-Exo的形态结构 (TEM $\times 10\,000$)

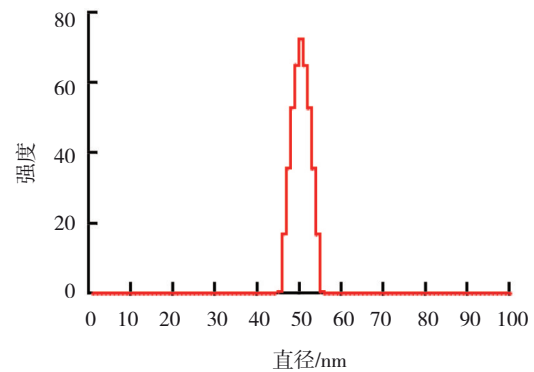


图2 M2-Exo的粒径分布

免疫荧光染色结果表明,与M0-Exo处理比较,50 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的M2-Exo可诱导M1型巨噬细胞高表达Arginase,而iNOS蛋白表达明显下调(见图3)。Western blotting检测结果表明,M0-Exo处理的M1型巨噬细胞的Arginase蛋白相对表达量为 (0.25 ± 0.06) ,M2-Exo处理的M1型巨噬细胞Arginase蛋白相对表达量为 (8.21 ± 1.26) ,两者比较,50 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的M2-Exo处理的Arginase相对表达量高($t = 14.110, P = 0.000$);M0-Exo处理的M1型巨噬细胞的iNOS蛋白相对表达量为 (4.32 ± 0.89) ,M2-Exo处理的M1型巨噬细胞的iNOS蛋白相对表达量为 (0.34 ± 0.09) ,50 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的M2-Exo处理的iNOS蛋白相对表达量低($t = 9.949, P = 0.000$)(见图4)。

2.2 M2-Exo可延缓AR小鼠的发病过程

对照组、模型组和M2-Exo组在治疗第16天、第21天、第26天、第31天和第36天的AI评分比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的AI评分有差异($F = 71.002, P = 0.000$);②3组的AI评分有差异($F = 401.238, P = 0.000$),模型组AI评分高于对照组,M2-Exo组AI评分低于模型组;③3组的AI评分变化趋势有差异($F = 217.634, P = 0.000$)。见表2和图5。

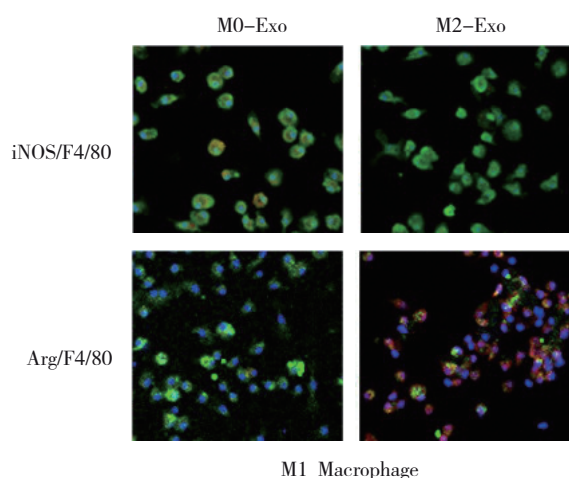


图3 M2-Exo 刺激 M1 型巨噬细胞后表面分子的表达 (免疫荧光染色 × 400)

2.3 M2-Exo 对 3 组小鼠关节肿胀程度 (足趾厚度) 的影响

在 M2-Exo 使用 7 d 后, 对照组小鼠的足趾厚度为 (2.12 ± 0.32) mm, 模型组小鼠的足趾厚度为 (3.75 ± 0.19) mm, M2-Exo 组小鼠的足趾厚度为

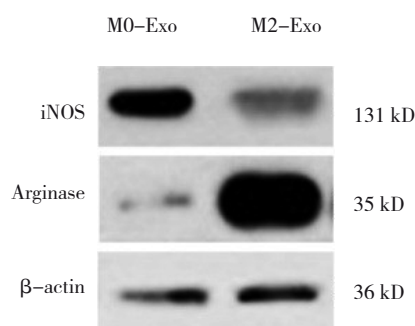


图4 M2-Exo 和 M2-Exo 处理 24 h 的 M1 型巨噬细胞表面分子蛋白表达

(2.82 ± 0.53) mm, 3 组小鼠的足趾厚度比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=45.972, P=0.000$); 进一步两两比较, 模型组和 M2-Exo 组足趾厚度大于对照组, M2-Exo 组小于模型组 (见图 6)。模型组第 2 次免疫注射 10 d 后小鼠前足腕关节和后足足垫及趾关节出现红肿增厚现象, 而 M2-Exo 组后足红肿明显得到缓解 (见图 7)。

表 2 3 组小鼠 AI 评分比较 ($n=10$)

组别	第 16 天	第 21 天	第 26 天	第 31 天	第 36 天
对照组	0.22 ± 0.04	0.24 ± 0.02	0.35 ± 0.05^{③}	0.41 ± 0.05^{③}	0.42 ± 0.05^{③}
模型组	0.29 ± 0.05^{①}	0.51 ± 0.10^{①③}	3.23 ± 0.69^{①③}	5.41 ± 1.02^{①③}	6.73 ± 1.13^{①③}
M2-Exo 组	0.23 ± 0.03^{②}	0.44 ± 0.11^{①③}	0.80 ± 0.20^{①②③}	2.32 ± 0.81^{①②③}	3.25 ± 0.81^{①②③}

注: ①与对照组同时间点比较, $P < 0.05$; ②与模型组同时间点比较, $P < 0.05$; ③与组内第 16 天比较, $P < 0.05$ 。

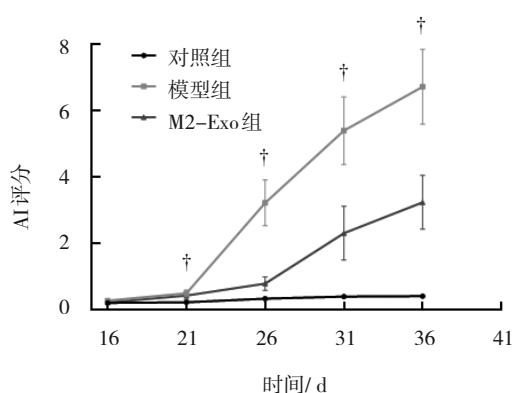


图5 3 组小鼠在治疗过程中的 AI 评分情况 ($n=10$)

2.4 3 组小鼠关节组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平比较

3 组小鼠关节组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水

平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较, M2-Exo 组小鼠关节组织的 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 水平较模型组明显降低。见表 3 和图 8。

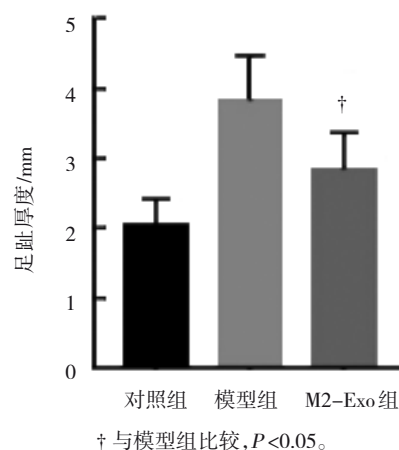


图6 3 组小鼠关节肿胀程度 (足趾厚度) 的比较 ($n=10$)

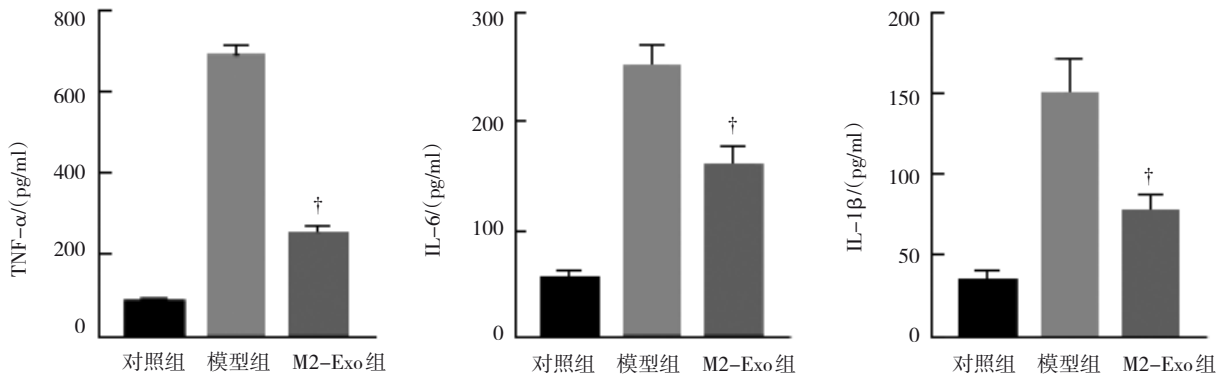


图 7 M2-Exo 对 3 组小鼠关节肿胀程度的影响

表 3 3 组小鼠关节组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平的比较 (n=10, pg/ml)

组别	TNF- α	IL-6	IL-1 β
对照组	82.43 \pm 8.43	52.06 \pm 5.78	37.32 \pm 4.72
模型组	683.23 \pm 86.36 ^①	248.18 \pm 47.47 ^①	152.89 \pm 58.75 ^①
M2-Exo 组	262.58 \pm 60.04 ^{①②}	163.22 \pm 65.99 ^{①②}	80.13 \pm 03.63 ^{①②}
F 值	6 666.257	474.779	102.377
P 值	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, P<0.05; ②与模型组比较, P<0.05。



† 与模型组比较, P<0.05。

图 8 3 组小鼠关节组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平的比较 (n=10)

表 4 3 组小鼠关节组织中 iNOS mRNA、CD86 mRNA、Arginase mRNA 和 CD206 mRNA 相对表达量的比较 (n=10)

组别	M1 型巨噬细胞		M2 型巨噬细胞	
	iNOS mRNA	CD86 mRNA	Arginase mRNA	CD206 mRNA
对照组	1.00 \pm 0.17	1.00 \pm 0.20	1.00 \pm 0.14	1.00 \pm 0.25
模型组	2.62 \pm 0.21 ^①	1.92 \pm 0.30 ^①	0.82 \pm 0.11 ^①	0.52 \pm 0.13 ^①
M2-Exo 组	1.34 \pm 0.38 ^{①②}	1.26 \pm 0.19 ^{①②}	1.94 \pm 0.24 ^{①②}	2.16 \pm 0.31 ^{①②}
F 值	101.525	43.704	125.529	113.752
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, P<0.05; ②与模型组比较, P<0.05。

2.5 3 组小鼠关节组织中 M1 型和 M2 型巨噬细胞的 mRNA 相对表达量比较

3 组小鼠关节组织中 iNOS mRNA、CD86 mRNA、Arginase mRNA 和 CD206 mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 (P<0.05); 进一步两两比较, M2-Exo 组关节组织中 iNOS mRNA、CD86 mRNA 相对表达量低于模型组 (P<0.05), Arginase mRNA 和 CD206 mRNA 相对表达量高于模型组 (P<0.05)。见表 4 和图 9。

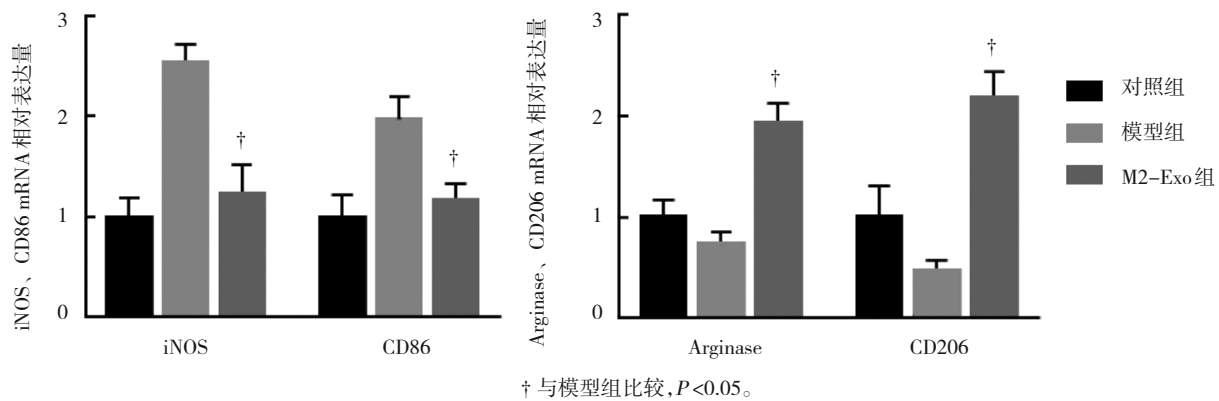


图9 3组小鼠关节组织中M1型和M2型巨噬细胞的mRNA相对表达量比较 ($n=10$)

3 讨论

RA是一种以滑膜炎症、软骨和关节骨质破坏及功能受损等为特征的慢性自身免疫性疾病。已往研究提示过度炎症是RA患者的病变特点,持续存在的抗原可引起机体内连续的免疫反应,表现为滑膜内炎症细胞浸润,参与RA发病^[19-20]。因此,溶解炎症、调节免疫对RA治疗至关重要。巨噬细胞是重要的天然免疫细胞,具有趋化运动、吞噬、分泌多种炎症介质等功能,在免疫防御中起着重要的作用。已有研究表明,巨噬细胞参与了RA的发病机制。滑膜的巨噬细胞可分泌炎症细胞因子白细胞介素-12(IL-12)、白细胞介素-23(IL-23)、IL-6和TNF- α 和IL-1 β ,诱导T细胞活化,加重滑膜的炎症效应。另外,巨噬细胞产生B细胞活化因子,促进产生抗体的B细胞的增殖^[21-22]。有研究报告^[23],巨噬细胞向抗炎状态的转化可明显缓解RA和其他自身免疫性疾病的炎症状态,通过调控巨噬细胞表型转换是治疗RA的潜在靶点。

近年来,许多研究报道了不同类型干细胞来源的外泌体具有再生的潜力。大多数研究只是简单地将外泌体添加到受损的组织和器官中,组织结构和功能恢复的详细机制尚不明确,探索外泌体如何通过操纵特定细胞表型来缓解疾病症状是很好的突破口。很多研究已证明使用外泌体作为自身免疫性疾病治疗的潜力,包括I型糖尿病、系统性红斑狼疮、炎症性肠病及RA等^[24],来源于人间充质干细胞的外泌体能够参与修复骨关节炎退变软骨^[25]。另一项研究证实了人脐带血来源的外泌体(UCB-Exos)通过下调巨噬细胞来源的白细胞介素-17(IL-17)的表达减轻葡聚糖硫酸钠(DSS)

诱导的炎症性肠病^[26]。由于外泌体在体内快速清除和相对较短的体内半衰期,其应用于自身免疫性疾病的治疗仍然面临挑战。

M1表型是由Toll样受体激动剂LPS或Th1细胞因子如干扰素 γ (IFN- γ)诱导,M2表型可由Th2细胞因子IL-10或IL-4等激活。研究表明单核-巨噬细胞有相当大的表型可塑性,激活单核细胞可改变其表型和功能^[27]。基于巨噬细胞的可塑性,持续激活抗炎巨噬细胞在一定程度上可以改变病变组织的免疫环境,以达到抗炎的目的。为验证M2-Exo是否能够诱导M1型巨噬细胞的重编程,即由促炎的M1表型向抗炎M2表型转换,本研究采用免疫荧光和Western blotting检测M2-Exo处理的M1型巨噬细胞,孵育24 h后可看到M1和M2特异性标记iNOS和Arginase蛋白分别下调和上调。考虑到关节腔存在一定的封闭性,通过2次原位关节腔注射M2-Exo治疗胶原诱导的RA,发病表现为后足红肿,与文献报道类似^[28-29]。在此期间,滑膜组织中促炎的M1型巨噬细胞逐渐增多,与局部和全身性炎症细胞因子的表达上调同步,因此在二次免疫前后5 d进行干预治疗,结果显示,M2-Exo组RA小鼠后足红肿减退,IA评分显著降低,促炎症细胞因子TNF- α 、IL-6和IL-1 β 也明显减少。研究显示,促炎症细胞因子参与肥胖、溃疡性结肠炎和RA等多种疾病的发生发展^[30],TNF- α 、IL-6和IL-1 β 3种促炎症细胞因子可促进破骨细胞活化,参与滑膜成纤维细胞增殖活化及关节软骨的破坏,扩大级联炎症效应^[31]。本研究采用RT-PCR检测各组小鼠的关节组织中巨噬细胞的表型标志物mRNA相对表达量,M2-Exo干预后激活经典M1型巨噬细胞

胞重编程为 M2 型巨噬细胞, 结果表明巨噬细胞来源的外泌体可以调控巨噬细胞激活的开关, 体内外研究均证明了 M2 型巨噬细胞来源的外泌体可以通过诱导巨噬细胞从 M1 型向 M2 型转换。

综上所述, 本研究提出一种利用外泌体调控的细胞重编程的实验室治疗策略, 将促炎的 M1 型巨噬细胞直接转化为抗炎的 M2 型巨噬细胞, 提高炎症溶解效果, 为 RA 的治疗提供新途径。

参 考 文 献 :

- [1] 吴晶金. 类风湿关节炎动物模型研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2016, 5(12): 70-73.
- [2] KLARESKOG L, CATRINA A I, PAGET S. Rheumatoid arthritis[J]. *The Lancet*, 2009, 9664(9664): 659-672.
- [3] MCINNES I B, SCHETT G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [4] 徐琦, 王龙, 顾丹今, 等. 甲氨蝶呤对胶原诱导的关节炎小鼠 Tfh 细胞的影响及其机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(9): 1281-1284.
- [5] JACQUES P, van den BOSCH F. Emerging therapies for rheumatoid arthritis[J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2013, 18(2): 231-244.
- [6] 黄娜, 俞海国. 生物制剂治疗巨噬细胞活化综合征的研究进展[J]. 中华风湿病学杂志, 2018, 22(12): 843-846.
- [7] 朱宸佑, 魏诗敏, 汪媛婧, 等. 巨噬细胞在骨组织修复中的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2018, 45(4): 444-448.
- [8] 黄自坤, 李雪, 罗清. 类风湿关节炎单核巨噬细胞极化表型分析及临床意义[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(4): 605-609.
- [9] 叶丹丽, 刘庆, 胡昕. 滑膜在骨关节炎发病中的作用研究进展[J]. 北方药学, 2014(2): 66.
- [10] WYNN T A, CHAWLA A, POLLARD J W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 445-455.
- [11] COLOMBO M, RAPOSO G, THÉRY C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30(1): 255-289.
- [12] ROBBINS P D, MORELLI A E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 3(3): 195-208.
- [13] 刘訥鹂, 王炳蔚, 郑瑞茂. 巨噬细胞外泌体参与胰岛素敏感性调控[J]. 生理科学进展, 2017, 48(6): 408.
- [14] HYOSUK K, SUN Y W, GIJUNG K, et al. Exosome-guided phenotypic switch of M1 to M2 macrophages for cutaneous wound healing[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, 6(20): 1900513
- [15] 王飘飘, 王会会, 彭代银, 等. 巨噬细胞来源的外泌体不同提取方法的比较[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(4): 589-592.
- [16] WU L, XIA J J, LI D H, et al. Mechanisms of M2 macrophage-derived exosomal long non-coding RNA PVT1 in regulating Th17 cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Front Immunol*, 2020, 11(9): 1934.
- [17] TRENTHAM D E, TOWNES A S, KANG A H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis[J]. *J Exp Med*, 1977, 146(3): 857-868.
- [18] 单文君, 朱晓煜, 齐杰莹, 等. 小乌桂汤治疗小鼠胶原诱导性关节炎的作用机制[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(11): 1682-1688.
- [19] SMOLEN J S, ALETAHA D, MCINNES I B. Rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [20] 张旭飞, 李振彬, 刁玉晓, 等. 类风湿关节炎疾病的临床特点及危险因素分析[J]. 风湿病与关节炎, 2018, 7(3): 13-17.
- [21] 韩悦, 姚煦. 外泌体免疫作用机制在自身免疫性疾病中的研究进展[J]. 国际皮肤性病学期刊, 2017, 43(4): 220-222.
- [22] 王宁, 胡志芳, 李爱连, 等. 胶原诱导性关节炎小鼠体内 Tfh 细胞及其相关免疫分子的表达[J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(1): 26-31.
- [23] 王小琴, 刘燕, 邓乔文, 等. DBA/1 小鼠与 C57BL/6 小鼠胶原诱导性关节炎模型的比较研究[J]. 南通大学学报(医学版), 2014(4): 254-257.
- [24] 崔雪娇, 李玉妹. 外泌体的免疫调节作用及在自身免疫性疾病中的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2017(33): 1891-1895.
- [25] MAO F, XU W R, QIAN H, et al. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells in collagen-induced mouse arthritis[J]. *Inflamm Res*, 2010, 59(3): 219-225.
- [26] 李华杰, 邱波. 间充质干细胞源性外泌体参与修复骨关节炎退变软骨的研究进展[J]. 中华风湿病学杂志, 2018, 22(7): 493-496.
- [27] MAO F, WU Y B, TANG X D, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells relieve inflammatory bowel disease in mice[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017(4): 5356760.
- [28] LISETTE B, MARGRIET J V, PAUL P T. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(8): 2192-2205.
- [29] HUANG Q Q, MA Y Y, ADEDAMOLA A, et al. Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(7): 2192-2201.
- [30] 张江, 乔晓红. 细胞因子在自噬与类风湿关节炎中的作用[J]. 中国现代医药杂志, 2017, 19(5): 99-102.
- [31] 赵晓菲, 安高, 郭亚春, 等. 细胞因子在类风湿性关节炎中的研究进展[J]. 承德医学院学报, 2016, 33(1): 53-56.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 闻君侠, 王瑾, 江彬锋, 等. M2 型巨噬细胞来源的外泌体对类风湿关节炎小鼠的作用及其机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(23): 30-37.

Cite this article as: WEN J X, WANG J, JIANG B F, et al. Effect and mechanism study of M2 macrophages-derived exosomes in treatment of collagen induced rheumatoid arthritis mouse[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(23): 30-37.