

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.16.002
文章编号: 1005-8982 (2022) 16-0007-07

肺部感染性疾病·论著

二肽基肽酶-4通过CXCR4/mTOR信号通路介导小鼠肺泡巨噬细胞MH-S自噬的机制研究

杨帆¹, 邓璐², 陈睦虎¹

(西南医科大学附属医院 1.急诊科, 2. 甲状腺外科, 四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 探究二肽基肽酶-4(DPP-4)通过趋化因子受体4(CXCR4)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路介导小鼠肺泡巨噬细胞MH-S自噬的机制。**方法** 体外培养小鼠肺泡巨噬细胞MH-S并分组转染。分别设置PBS组(PBS培养MH-S细胞)、LPS组(100 ng/mL LPS诱导24 h)、DPP-4组(DPP-4表达病毒转染)、si-DPP-4组(si-DPP-4病毒载体转染)、DPP-4 + BafA1组(DPP-4表达病毒转染+自噬抑制剂BafA1干预)及si-DPP-4 + BafA1组(si-DPP-4病毒载体转染+自噬抑制剂BafA1干预)。绿色荧光蛋白(GFP)检测转染效率,稳定转染后,酶联免疫吸附试验检测MH-S细胞上清液炎症因子水平,腺病毒检测MH-S细胞自噬流变化,实时荧光定量聚合酶链反应检测细胞DPP-4、CXCR4、mTOR mRNA的表达,Western blottig检测CXCR4/mTOR通路蛋白的表达。**结果** LPS组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、GFP、RPF、Merge数量,CXCR4 mRNA、mTOR mRNA和CXCR4蛋白、p-mTOR/mTOR蛋白相对表达量高于PBS组($P < 0.05$);DPP-4组与LPS组IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);DPP-4组GFP、RPF、Merge数量,DPP-4 mRNA相对表达量高于LPS组($P < 0.05$),CXCR4 mRNA、mTOR mRNA、CXCR4蛋白、p-mTOR/mTOR蛋白相对表达量低于LPS组($P < 0.05$);si-DPP-4组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平高于LPS组($P < 0.05$),GFP、RPF及Merge数量低于LPS组($P < 0.05$);si-DPP-4组和DPP-4 + BafA1组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平、CXCR4蛋白、p-mTOR/mTOR蛋白相对表达量高于DPP-4组($P < 0.05$),GFP、RPF及Merge数量低于DPP-4组($P < 0.05$);si-DPP-4组DPP-4 mRNA相对表达量低于DPP-4组($P < 0.05$),CXCR4 mRNA、mTOR mRNA相对表达量高于DPP-4组($P < 0.05$);si-DPP-4 + BafA1组IL-1 β 、IL-6水平、CXCR4 mRNA、mTOR mRNA、CXCR4蛋白、p-mTOR/mTOR蛋白相对表达量高于si-DPP-4组($P < 0.05$),GFP、RPF、Merge数量低于si-DPP-4组($P < 0.05$)。**结论** DPP-4能够调节小鼠肺泡巨噬细胞自噬作用,调控炎症反应,其作用机制可能与CXCR4/mTOR通路有关。

关键词: 肺泡巨噬细胞;自噬;二肽基肽酶-4;趋化因子受体4/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路;小鼠
中图分类号: R563 **文献标识码:** A

DPP-4 mediates autophagy in mouse alveolar macrophages through CXCR4/mTOR signaling pathway

Fan Yang¹, Lu Deng², Mu-hu Chen¹

(1. Department of Emergency, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Thyroid Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To explore whether dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) mediates autophagy in mouse alveolar macrophages through CXCR4/mTOR signaling pathway. **Methods** Mouse alveolar macrophages (MH-S

收稿日期: 2022-04-08

[通信作者] 邓璐, E-mail: 181764243@qq.com; Tel: 18383065632

cells) were cultured in vitro, and were then grouped and transfected with different viruses. Specifically, the cells were divided into PBS group (MH-S cells were cultured in PBS), LPS group (MH-S cells were stimulated via 100 ng/mL of LPS for 24 h), DPP-4 group (MH-S cells were transfected with DPP-4 overexpression viral vector), si-DPP-4 group (MH-S cells were transfected with si-DPP-4 viral vector), DPP-4 + BafA1 group (MH-S cells were transfected with DPP-4 overexpression viral vector and treated with autophagy inhibitor BafA1) and si-DPP-4 + BafA1 group (MH-S cells were transfected with si-DPP-4 viral vector and treated with autophagy inhibitor BafA1). The fluorescence intensity of GFP was used to detect the transfection efficiency. After stable transfection, ELISA was used to detect the levels of inflammatory factors in the cell culture supernatants. Adenoviruses were used to detect the changes of autophagic flux in MH-S cells. The mRNA expressions of DPP-4, CXCR4 and mTOR in MH-S cells were determined via qPCR, and the expressions of proteins associated with CXCR4/mTOR pathway were measured via Western blotting. **Results** Compared with the PBS group, the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were higher, the number of cells expressing GFP, RFP and both was increased, and the mRNA expressions of mTOR and CXCR4 and the protein expressions of CXCR4 and p-mTOR/mTOR were up-regulated in the LPS group ($P < 0.05$). There was no difference in the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α between the DPP-4 group and the LPS group ($P > 0.05$). Compared with LPS group, the number of cells expressing GFP, RFP and both was increased, and the mRNA expressions of mTOR and CXCR4 and the protein expressions of CXCR4 and p-mTOR/mTOR were down-regulated ($P < 0.05$). In the si-DPP-4 group, the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were higher, and the number of cells expressing GFP, RFP and both was lower than those in the LPS group ($P < 0.05$). Compared with the DPP-4 group, the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were higher, the protein expressions of CXCR4 and p-mTOR/mTOR were up-regulated, and the number of cells expressing GFP, RFP and both was inhibited in the si-DPP-4 group and the DPP-4 + BafA1 group ($P < 0.05$). The mRNA expression of DPP-4 was lower, but the mRNA expressions of CXCR4 and mTOR were higher in the si-DPP-4 group than those in the DPP-4 group ($P < 0.05$). Compared with the si-DPP-4 group, the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were higher, the mRNA expressions of mTOR and CXCR4 and the protein expressions of CXCR4 and p-mTOR/mTOR were up-regulated, and the number of cells expressing GFP, RFP and both was lower in the si-DPP-4 + BafA1 group ($P < 0.05$). **Conclusions** DPP-4 can regulate the autophagy and the inflammatory response in mouse alveolar macrophages, which may be achieved via the CXCR4/mTOR pathway.

Keywords: alveolar macrophages; autophagy; dipeptide peptidase-4; chemokine receptor 4/mammalian target of rapamycin pathway; mouse

肺巨噬细胞是免疫细胞的一种,能够吞噬外来病原体及人体衰老的细胞,同时肺巨噬细胞参与特异性免疫,刺激细胞因子的分泌^[1-2]。多种肺疾病的病理特征均由炎症细胞及细胞因子导致,在其发病过程中,肺巨噬细胞发挥着重要作用。目前认为肺巨噬细胞在一些细菌或有害物质的刺激下,分泌大量炎症因子,部分因子又可趋化中性粒细胞等向肺部迁移,最终引起气道炎症或损伤,加重疾病^[3]。因此,有效抑制炎症因子的释放对肺疾病的治疗具有重要意义。自噬是调节肺巨噬细胞吞噬、杀伤,以及调节细胞因子的重要机制,能够调控机体免疫系统^[4]。本课题组前期研究发现,脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)能诱导肺巨噬细胞自噬。目前有多项研究表明,肺损伤及炎症反应与肺巨噬细胞炎性小体有关,因此推测肺巨噬细胞的自噬过程能够调控炎症反应^[5-6]。二肽基肽酶-4(dipeptidyl

peptidase-4, DPP-4)在肺巨噬细胞中大量表达,参与细胞免疫、自噬等多种生物学过程,目前DPP-4对趋化因子及细胞因子的调控作用已得到证实^[7-8]。本研究探究DPP-4通过CXCR4/mTOR通路对小鼠肺巨噬细胞自噬的机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞来源及培养

小鼠肺泡巨噬细胞MH-S购自上海酶研生物科技有限公司。取出液氮冻存的MH-S细胞,恢复至室温后转移至25 mL培养瓶,同时加入15 mL含10%胎牛血清的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)培养液,在37℃、5%二氧化碳培养箱中培养24 h。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 主要试剂 DPP-4表达病毒、si-DPP-4病毒

载体(上海钰博生物科技有限公司),白细胞介素 1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素 6 (Interleukin-6, IL-6)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫试剂盒(上海广锐生物科技有限公司),转染试剂盒(上海研卉生物科技有限公司), TRIzol、逆转录试剂盒(上海雅吉生物科技有限公司),实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒(上海一研生物科技有限公司),DPP-4、mTOR 兔抗大鼠一抗(1 mg/mL)及山羊抗兔二抗(1 mg/mL)(上海圻明生物科技有限公司),CXCR4兔抗大鼠一抗(1 mg/mL)及山羊抗兔二抗(1 mg/mL)(上海康朗生物科技有限公司)。

1.2.2 主要仪器 倒置荧光显微镜(型号:Echo Revolve,北京普迈精医科技有限公司),酶标仪(型号:LONZA ELx808,北京泽平科技有限责任公司),全自动生化分析仪(型号:PUZS-300,上海帝博思生物科技有限公司)。

1.3 细胞分组及干预

取对数生长期的MH-S细胞,接种于6孔板,每孔取 1×10^5 个细胞继续贴壁生长,当细胞融合75%~85%时进行转染。分别设置PBS组、LPS组、DPP-4组,si-DPP-4组、DPP-4 + BafA1组及si-DPP-4 + BafA1组。

PBS组仅为PBS培养的MH-S细胞;LPS组在MH-S细胞中加入100 ng/mL LPS,诱导培养24 h;DPP-4组在LPS组的基础上,加入100 nmol/L DPP-4表达病毒转染MH-S细胞;si-DPP-4组在LPS组的基础上,加入100 nmol/L si-DPP-4病毒载体转染MH-S细胞;DPP-4 + BafA1组在LPS组的基础上,在DPP-4表达病毒转染MH-S细胞中加入自噬抑制剂BafA1干预;si-DPP-4 + BafA1组在LPS组的基础上,在si-DPP-4病毒载体转染的MH-S细胞中加入自噬抑制剂BafA1干预。

1.4 细胞转染

根据细胞分组进行操作,每孔加入1 mL病毒稀释液(病毒感染复数=100,DMEM培养液1:99),具体操作步骤参考转染试剂盒说明书,转染48 h后,采用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)检测转染效率,当转染效率>70%时,可用于后续实验^[9]。

1.5 酶联免疫吸附试验检测MH-S细胞上清液炎症因子水平

取各组MH-S细胞培养液,离心取上清液,采用酶联免疫吸附试验试剂盒检测MH-S细胞IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平,向稀释后的标准品中加入MH-S细胞上清液50 μ L,混匀后于恒温水浴锅中温育0.5 h,分别加入50 μ L酶标志物、50 μ L显色剂A、50 μ L显色剂B及50 μ L终止液,用酶标仪检测各孔450 nm处吸光度,根据IL-1 β 、IL-6及TNF- α 的标准曲线计算其相应浓度^[10]。每组有4个复孔,实验均重复3次,取均值。

1.6 腺病毒检测MH-S细胞自噬流变化

取各组稳定转染的MH-S细胞,接种于12孔板上,孔内铺放细胞爬片,加入携带mRFP-GFP-LC3的腺病毒,进行贴壁生长,当细胞融合度为70%时,移除上清液,PBS冲洗3次,加入4%多聚甲醛固定,再冲洗3次,加入抗荧光猝灭封片液进行封片,于荧光显微镜下观察自噬流的变化,即GFP、红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)及其合并通道(黄色)^[11]。GFP减弱表明自噬小体与溶酶体融合,形成自噬溶酶体。

1.7 qRT-PCR检测DPP-4、CXCR4、mTOR mRNA的表达

取各组稳定转染的MH-S细胞,采用TRIzol试剂盒提取MH-S细胞总RNA,检测RNA浓度及纯度。采用逆转录试剂盒,以RNA为模板,通过逆转录得到cRNA。设置20 μ L的PCR反应体系:cDNA模板1 μ L,SYBR 10 μ L,正、反向引物各0.5 μ L,纯水8 μ L;反应体系设置完成后进行扩增,反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性2 min,95 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共40个循环。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算DPP-4、CXCR4、mTOR相对表达量^[12],引物序列见表1。

1.8 Western blottig检测CXCR4/mTOR通路蛋白的表达

取各组稳定转染的MH-S细胞,加入适量裂解液裂解混匀,裂解MH-S细胞,1 500 r/min离心20 min,取上清液进行免疫凝胶电泳,分离CXCR4、mTOR蛋白条带,并采用湿膜法转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭2 h,将PVDF膜分别在含有一抗(1:500稀释)及二抗(1:1 000稀释)的孵育盒中孵

表 1 qRT-PCR引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
DPP-4	正向: 5'-CCACCTAATAGTTCAGATACT-3'	21
	反向: 5'-ACATGATTCACGACGAGTCGT-3'	
CXCR4	正向: 5'-GAAGCACTCAGCCAATC-3'	17
	反向: 5'-CCAGCCAGGCTCTAGCAC-3'	
mTOR	正向: 5'-CAGACTGTCCAGACAGGGA-3'	19
	反向: 5'-CAGGCTATGTCGGGTAGAG-3'	
GADPH	正向: 5'-GACATATGCACTATCACCACAG-3'	2
	反向: 5'-GACACGAACGATGCACTACAG-3'	

育, 孵育后 PBS 冲洗 3 次进行显影、定影, 分析相应灰度值, 目的蛋白相对表达量=目的蛋白/ β -actin 灰度值^[13]。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义

2 结果

2.1 MH-S 细胞转染情况

正常 MH-S 细胞形态均匀, 呈梭形, 而转染后细胞一般成簇存在, 呈漩涡样生长, 经绿色荧光蛋白标记后, 细胞在荧光显微镜下呈绿色荧光。见图 1。

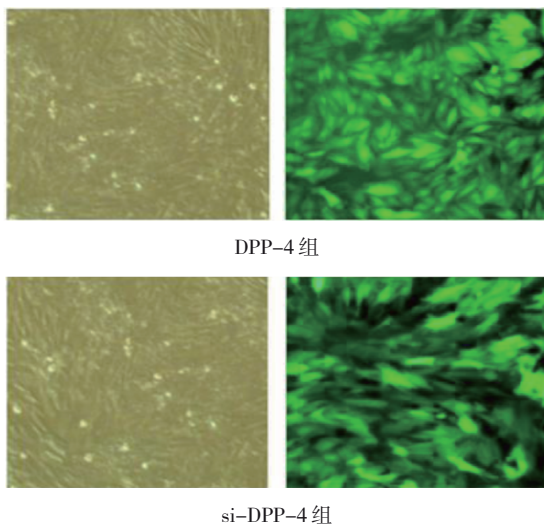


图 1 MH-S 细胞转染图 (左图: $\times 100$, 右图: $\times 200$)

2.2 各组 MH-S 细胞上清液炎症因子水平比较

各组 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: LPS 组 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 高于 PBS 组 ($P < 0.05$); DPP-4 组与 LPS 组 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); si-DPP-4 组 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 高于 LPS 组 ($P < 0.05$); si-DPP-4 组和 DPP-4 + BafA1 组 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 高于 DPP-4 组 ($P < 0.05$); si-DPP-4 + BafA1 组 IL-1 β 、IL-6 高于 si-DPP-4 组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组 MH-S 细胞上清液炎症因子水平比较

(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
PBS 组	0.24 \pm 0.03	0.13 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02
LPS 组	0.87 \pm 0.10 ^①	1.43 \pm 0.15 ^①	0.40 \pm 0.05 ^①
DPP-4 组	0.78 \pm 0.09	0.80 \pm 0.09	0.22 \pm 0.03
si-DPP-4 组	1.59 \pm 0.17 ^{②③}	2.06 \pm 0.22 ^{②③}	0.63 \pm 0.07 ^{②③}
DPP-4 + BafA1 组	1.27 \pm 0.13 ^③	1.18 \pm 0.13 ^③	0.96 \pm 0.10 ^③
si-DPP-4 + BafA1 组	1.83 \pm 0.19 ^④	2.81 \pm 0.30 ^④	0.77 \pm 0.08
F 值	36.789	53.456	66.532
P 值	0.000	0.000	0.000

注: ①与 PBS 组比较, $P < 0.05$; ②与 LPS 组比较, $P < 0.05$; ③与 DPP-4 组比较, $P < 0.05$; ④与 si-DPP-4 组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 各组 MH-S 细胞自噬流的变化

各组 MH-S 细胞 GFP、RPF 及 Merge 数量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: LPS 组 GFP、RPF 及 Merge 数量高于 PBS 组 ($P < 0.05$); DPP-4 组 GFP、RPF 及 Merge 数量高于 LPS 组 ($P < 0.05$); si-DPP-4 组 GFP、RPF 及 Merge 数量低于 LPS 组 ($P < 0.05$); si-DPP-4 组和 DPP-4 + BafA1 组 GFP、RPF 及 Merge 数量低于 DPP-4 组 ($P < 0.05$); si-DPP-4 + BafA1 组 GFP、RPF 及 Merge 数量低于 si-DPP-4 组 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 2。

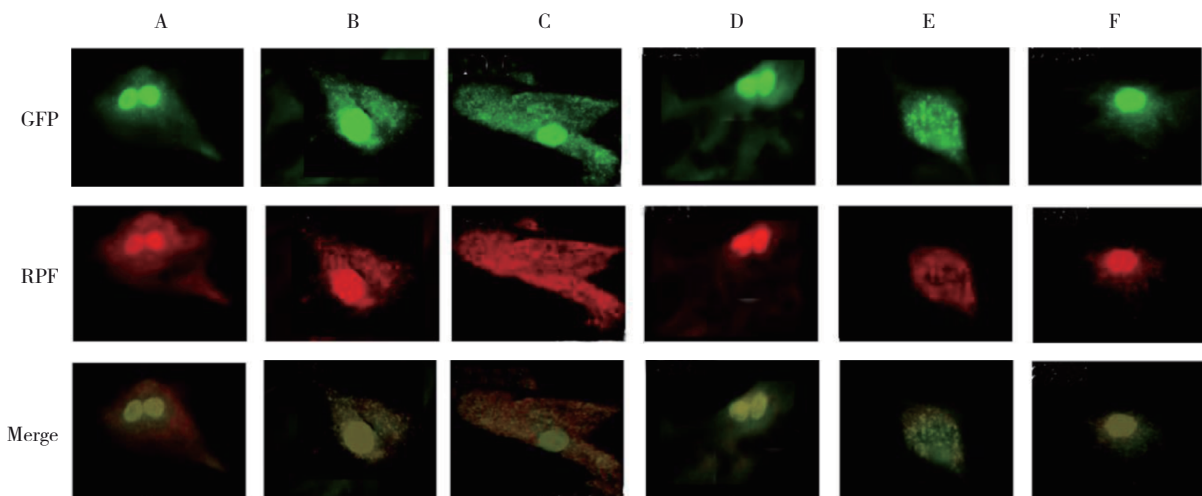
2.4 各组 MH-S 细胞 DPP-4、CXCR4、mTOR mRNA 相对表达量比较

各组 DPP-4、mTOR、CXCR4 mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: LPS 组 CXCR4、mTOR mRNA 相对表达量高于 PBS 组 ($P < 0.05$); DPP-4 组 DPP-4 mRNA 相对表达量高于 LPS 组 ($P < 0.05$), CXCR4、mTOR mRNA 相对表达量低于 LPS 组 ($P < 0.05$); si-

表 3 各组 MH-S 细胞 GFP、RPF 及 Merge 数量比较 (个/细胞, $\bar{x} \pm s$)

组别	GFP	RPF	Merge
PBS 组	106.68 ± 0.07	156.97 ± 16.86	104.83 ± 10.68
LPS 组	169.70 ± 0.08 ^①	201.55 ± 22.64 ^①	171.66 ± 17.83 ^①
DPP-4 组	221.64 ± 0.17 ^②	274.75 ± 30.54 ^②	199.67 ± 20.56 ^②
si-DPP-4 组	95.75 ± 0.04 ^{②③}	138.73 ± 14.47 ^{②③}	97.68 ± 9.96 ^{②③}
DPP-4 + BafA1 组	133.58 ± 0.17 ^③	189.29 ± 18.68 ^③	138.34 ± 15.75 ^③
si-DPP-4 + BafA1 组	79.45 ± 8.17 ^④	119.68 ± 21.65 ^④	77.98 ± 8.02 ^④
F 值	364.897	495.588	318.456
P 值	0.000	0.000	0.000

注: ①与 PBS 组比较, $P < 0.05$; ②与 LPS 组比较, $P < 0.05$; ③与 DPP-4 组比较, $P < 0.05$; ④与 si-DPP-4 组比较, $P < 0.05$ 。



A: PBS 组; B: LPS 组; C: DPP-4 组; D: si-DPP-4 组; E: DPP-4 + BafA1 组; F: si-DPP-4 + BafA1 组。

图 2 各组 MH-S 细胞自噬流的变化 (× 400)

DPP-4 组 DPP-4 mRNA 相对表达量低于 DPP-4 组 ($P < 0.05$), CXCR4、mTOR mRNA 相对表达量高于 DPP-4 组 ($P < 0.05$); DPP-4 + BafA1 组 CXCR4、mTOR mRNA 相对表达量高于 DPP-4 组 ($P < 0.05$); si-DPP-4 + BafA1 组 CXCR4、mTOR mRNA 相对表达量高于 si-DPP-4 组 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.5 各组 MH-S 细胞 CXCR4/mTOR 通路蛋白相对表达量比较

各组 CXCR4、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: LPS 组 CXCR4、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量高于 PBS 组 ($P < 0.05$); DPP-4 组 CXCR4、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量低于 LPS 组 ($P < 0.05$); si-DPP-4 组和 DPP-4 + BafA1 组 CXCR4、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量高于 DPP-4 组 ($P < 0.05$); si-DPP-4 + BafA1 组 CXCR4、p-mTOR/

表 4 各组 MH-S 细胞 DPP-4、CXCR4、mTOR mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	DPP-4 mRNA	CXCR4 mRNA	mTOR mRNA
PBS 组	0.68 ± 0.07	0.74 ± 0.08	0.83 ± 0.09
LPS 组	0.70 ± 0.08	1.15 ± 0.12 ^①	1.26 ± 0.13 ^①
DPP-4 组	1.64 ± 0.17 ^②	0.92 ± 0.10 ^②	1.02 ± 0.10 ^②
si-DPP-4 组	0.33 ± 0.04 ^{②③}	1.47 ± 0.15 ^{②③}	1.58 ± 0.16 ^{②③}
DPP-4 + BafA1 组	1.58 ± 0.17	1.23 ± 0.13 ^③	1.34 ± 0.13 ^③
si-DPP-4 + BafA1 组	0.35 ± 0.04	1.73 ± 0.18 ^④	1.86 ± 0.18 ^④
F 值	132.456	73.456	49.656
P 值	0.000	0.000	0.000

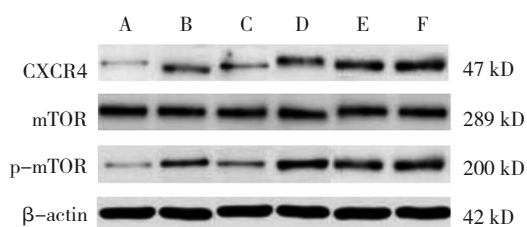
注: ①与 PBS 组比较, $P < 0.05$; ②与 LPS 组比较, $P < 0.05$; ③与 DPP-4 组比较, $P < 0.05$; ④与 si-DPP-4 组比较, $P < 0.05$ 。

mTOR 蛋白相对表达量高于 si-DPP-4 组 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 3。

表 5 各组 MH-S 细胞 CXCR4/mTOR 通路蛋白
相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CXCR4 蛋白	p-mTOR/mTOR 蛋白
PBS 组	0.23 ± 0.04	0.28 ± 0.03
LPS 组	0.62 ± 0.07 ^①	0.48 ± 0.05 ^①
DPP-4 组	0.47 ± 0.05 ^②	0.31 ± 0.04 ^②
si-DPP-4 组	0.79 ± 0.09 ^{②③}	0.87 ± 0.09 ^{②③}
DPP-4 + BafA1 组	0.81 ± 0.09 ^③	0.83 ± 0.09 ^③
si-DPP-4 + BafA1 组	0.93 ± 0.10 ^④	0.97 ± 0.10 ^④
F 值	89.457	104.567
P 值	0.000	0.000

注：①与 PBS 组比较, $P < 0.05$; ②与 LPS 组比较, $P < 0.05$; ③与 DPP-4 组比较, $P < 0.05$; ④与 si-DPP-4 组比较, $P < 0.05$ 。



A: PBS 组; B: LPS 组; C: DPP-4 组; D: si-DPP-4 组; E: DPP-4 + BafA1 组; F: si-DPP-4 + BafA1 组。

图 3 各组 MH-S 细胞 CXCR4/mTOR 通路蛋白的表达

3 讨论

细胞自噬是机体重要的生物学过程,能够调节细胞代谢平衡,促进增殖分化等,在非生理状态下自噬作用被激活,能够调控多种细胞因子,发挥保护细胞的作用^[14]。肺巨噬细胞在免疫应答过程中发挥重要作用。多数研究认为,肺巨噬细胞的自噬作用在动脉粥样硬化、尘肺及癌症等多种疾病中均有积极作用^[15]。DPP-4 在肺巨噬细胞中大量表达,在细胞自噬过程中具有一定作用。在郑文彬^[16]的研究中,DPP4 抑制剂(西格列汀)具有降糖作用,同时还可以通过抑制 NF- κ B 和 JNK/AP1 通路减轻肝脏炎症,上调 AMPK/mTOR 信号通路增强细胞自噬作用,进而改善肝脂肪变性,表明 DPP-4 参与细胞炎症及自噬作用的调节过程。国外有研究显示,DPP-4 对 mTOR 通路有一定的调控作用^[17],因此推测 DPP-4 可能通过 mTOR 通路介导小鼠肺泡巨噬细胞 MH-S 自噬。CXCL12 是 DPP-4 底物中的一种,而 CXCR4 是 CXCL12 的特异性受体,在肺巨噬细胞中高表达,相关研究表明,CXCR4/mTOR 信号能够对肿瘤相关

巨噬细胞发挥调控作用^[18]。

在马晓娟等^[19]研究中显示,DPP-4 抑制剂能有效降低血糖并抑制血清肺巨噬细胞移动抑制因子水平,从而发挥抗炎作用,对糖尿病合并冠状动脉粥样硬化性心脏病患者起到一定的保护作用。黄玉芳等^[20]研究显示,DPP-4 抑制剂能够下调小鼠肺巨噬细胞系 RAW264.7 细胞的炎症反应,其作用机制与 PKA/NF- κ B 通路有关。上述研究均显示,DPP-4 对小鼠肺巨噬细胞具有一定的抗炎作用。本研究中同样对各组 MH-S 细胞炎症因子水平进行检测,其中 LPS 组 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 明显高于 PBS 组,表明 MH-S 细胞在 LPS 的诱导下激活细胞炎症反应,释放大量炎症因子,分析其原因为 LPS 是内毒素的主要成分,能够与细胞中多种受体结合,诱导细胞炎症反应的发生。与 LPS 组比较,DPP-4 组炎症因子水平呈下降趋势,但无统计学意义,而 si-DPP-4 组炎症因子水平升高,说明 DPP-4 对细胞炎症水平具有一定的抑制作用,但抑制作用较弱,导致各组炎症因子变化不明显,而抑制 DPP-4 表达能够促进炎症反应的发生。与 DPP-4 组比较,si-DPP-4 组和 DPP-4 + BafA1 组 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 升高,提示抑制 DPP-4 表达能够促进炎症反应,DPP-4 在自噬抑制剂的作用下,同样有促炎作用,反向说明 DPP-4 高表达和细胞自噬均有抗炎作用。与 si-DPP-4 组比较,si-DPP-4 + BafA1 组 IL-1 β 、IL-6 降低,表明在 DPP-4 低表达情况下,抑制细胞自噬作用相较于炎症反应的促进作用更强,进一步说明 DPP-4 高表达与细胞自噬均有抗炎作用。

CXCL12/CXCR4 通路在肿瘤转移、炎症、免疫等过程中发挥重要作用。国外有研究显示,抑制 DPP-4 表达能够通过 CXCL12/CXCR4/mTOR 通路促进上皮间质转化,加速乳腺癌细胞转移,且能够增加乳腺癌细胞的化疗耐药性^[21-22]。本研究对 MH-S 细胞自噬流、CXCR4/mTOR 通路 mRNA 和蛋白进行检测,结果显示,经过 LPS 诱导,细胞自噬流升高,mTOR mRNA、CXCR4 mRNA、p-mTOR 蛋白、CXCR4 蛋白表达上调,表明在炎症反应的刺激下,CXCR4/mTOR 通路部分被激活,而在 DPP-4 过表达的情况下,自噬流进一步升高,通路 mRNA 和蛋白表达进一步上调,表明 DPP-4 能够有效激活 CXCR4/mTOR 通路,促进细胞自噬;而在 DPP-4 低表达的情况下,自噬

作用受到抑制。另外本研究在 DPP-4 过表达及低表达的情况下给予自噬抑制剂, 结果显示, 两种情况下细胞自噬流及通路蛋白表达均下调, 进一步说明 DPP-4 能够通过 CXCR4/mTOR 通路对 MH-S 细胞自噬作用进行调控。

综上所述, DPP-4 能够通过调控小鼠肺巨噬细胞自噬作用影响细胞炎症因子分泌, 其作用机制与 CXCR4/mTOR 通路有关, 未来可对 DPP4 抑制剂的抗炎作用进行深入研究, 为炎症性疾病的治疗提供新的研究思路。

参 考 文 献 :

- [1] FUNES S C, RIOS M, ESCOBAR-VERA J, et al. Implications of macrophage polarization in autoimmunity[J]. *Immunology*, 2018, 154(2): 186-195.
- [2] LEE J W, CHUN W, LEE H J, et al. The role of macrophages in the development of acute and chronic inflammatory lung diseases[J]. *Cells*, 2021, 10(4): 897.
- [3] TAN S Y, CHEN S. Macrophage autophagy and silicosis: current perspective and latest insights[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(1): 453.
- [4] 董颖. 血清 25-(OH)D 通过巨噬细胞自我吞噬调节免疫功能对 AD 影响的相关研究[J]. *佳木斯大学学报(自然科学版)*, 2021, 39(2): 120-123.
- [5] XUE Z Y, ZHANG Z M, LIU H K, et al. lincRNA-Cox2 regulates NLRP3 inflammasome and autophagy mediated neuroinflammation[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(1): 130-145.
- [6] LIU T, WANG L Q, LIANG P P, et al. USP19 suppresses inflammation and promotes M2-like macrophage polarization by manipulating NLRP3 function via autophagy[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(10): 2431-2442.
- [7] RUYTINX P, PROOST P, van DAMME J, et al. Chemokine-Induced macrophage polarization in inflammatory conditions[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1930.
- [8] 陈钰洁, 郑天鹏. 二肽基肽酶-4 影响内皮细胞与血管生成机制的研究进展[J]. *医学综述*, 2021, 27(1): 169-174.
- [9] 曹蔚堂, 王文欣. LncRNA 人浆细胞瘤变体易位 1 介导 miR-148b 调控脂多糖诱导巨噬细胞自噬的机制研究[J]. *医学研究生学报*, 2021, 34(7): 698-705.
- [10] ZHOU S, GU J, LIU R, et al. Spermine alleviates acute liver injury by inhibiting liver-resident macrophage pro-inflammatory response through ATG5-dependent autophagy[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 948.
- [11] 赵冬婷, 彭文仪, 薛盼盼, 等. 苯并(a)芘通过降低突触融合蛋白 17 和溶酶体关联膜蛋白 2 表达抑制人脐静脉内皮细胞自噬流[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(11): 934-940.
- [12] 潘宇晨, 李京蔓, 李丹, 等. 鹿血晶增强巨噬细胞抗黑色素瘤作用及其机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(8): 939-943.
- [13] 赵晶, 秦合伟, 李彦杰, 等. 血管软化丸调控 PI3K/Akt/mTOR 通路影响细胞自噬及抗动脉粥样硬化的作用机制研究[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(1): 65-69.
- [14] WU M Y, LU J H. Autophagy and macrophage functions: inflammatory response and phagocytosis[J]. *Cells*, 2019, 9(1): 70.
- [15] 李叶, 孟伟明, 赵雪梅. 鸡内金提取物通过调节肺泡巨噬细胞自噬水平减轻尘肺大鼠肺间质纤维化的机制[J]. *临床和实验医学杂志*, 2021, 20(8): 792-796.
- [16] 郑文彬. DPP4 抑制剂调节 ob/ob 小鼠肝脏脂肪变性、炎症及自噬的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2018.
- [17] KAWAKITA E, YANG F, KUMAGAI A, et al. Metformin mitigates DPP-4 Inhibitor-Induced breast cancer metastasis via suppression of mTOR signaling[J]. *Mol Cancer Res*, 2021, 19(1): 61-73.
- [18] 侯季秋, 陈雅丽, 马迪, 等. 从 CXCL12/CXCR4 轴探析空瓶诱导的慢性情绪应激对急性心肌梗死大鼠炎症因子的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(5): 624-631.
- [19] 马晓娟, 孙敏, 王丽双, 等. 二肽基肽酶抑制剂对合并冠心病的老年糖尿病患者巨噬细胞移动抑制因子的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(21): 6075-6077.
- [20] 黄玉芳, 邓文, 朱涛. 二肽酰基肽酶-4 抑制剂通过 PKA/NF- κ B 信号通路调节 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应的实验研究[J]. *西部医学*, 2016, 28(1): 28-31.
- [21] YANG F, TAKAGAKI Y, YOSHITOMI Y, et al. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 accelerates epithelial-mesenchymal transition and breast cancer metastasis via the CXCL12/CXCR4/mTOR axis[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(4): 735-746.
- [22] LI S L, FAN Y, KUMAGAI A, et al. Deficiency in dipeptidyl peptidase-4 promotes chemoresistance through the CXCL12/CXCR4/mTOR/TGF β signaling pathway in breast cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 805.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 杨帆, 邓璐, 陈睦虎. 二肽基肽酶-4 通过 CXCR4/mTOR 信号通路介导小鼠肺泡巨噬细胞 MH-S 自噬的机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(16): 7-13.

Cite this article as: YANG F, DENG L, CHEN M H. DPP-4 mediates autophagy in mouse alveolar macrophages through CXCR4/mTOR signaling pathway[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(16): 7-13.