

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.10.001
文章编号: 1005-8982 (2019) 10-0001-09

基础研究 · 论著

心肌缺氧状态下间充质干细胞对巨噬细胞 M2 极化的影响及其机制研究 *

彭智勇, 赵吉玲, 张烨, 余国龙

(中南大学湘雅医院 心内科, 湖南 长沙 410008)

摘要: 目的 探讨心肌缺氧状态下间充质干细胞(MSC)对巨噬细胞极化的影响,并揭示其调控巨噬细胞极化的机制。**方法** 在M0型巨噬细胞培养液中加入无糖无氧培养的心肌细胞上清液,与MSC共培养。采用流式细胞术、Western blotting及逆转录聚合酶链反应检测M1/M2型巨噬细胞生物学标志,以判断MSC在模拟心肌缺氧状态下对巨噬细胞极化的影响,并观察MSC对巨噬细胞髓样分化因子88及其上游TLR2、TLR4受体表达的影响,以及其下游的细胞核转录因子- κ B(NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路磷酸化的水平。**结果** 与M0组比较,模拟心肌缺氧状态下培养的M0巨噬细胞成功诱导M1极化($P < 0.05$);与MSC共培养促进M1向M2极化($P < 0.05$)。同等条件下加入不同浓度髓样分化因子88抑制剂后,与M0+OGD组比较,M2型巨噬细胞比例随着ST2825剂量的增加逐渐升高($P < 0.05$)。与M0+OGD组比较,M0+OGD+MSC组白细胞介素10、转化生成因子- β_1 表达水平升高($P < 0.05$)。Western blotting检测显示MSC共培养后,巨噬细胞TLR2、TLR4及髓样分化因子88表达下调,其下游的NF- κ B和MAPK信号通路标志分子P65、IKK α/β 、JNK1/2、P38、ERK1/2等磷酸化水平降低。**结论** 在心肌缺氧状态下,MSC促进巨噬细胞M2极化。其机制之一可能是MSC下调巨噬细胞TLR2、TLR4及髓样分化因子88表达,抑制TLR2/4-髓样分化因子88信号及其下游的NF- κ B和MAPK通路。

关键词: 肌细胞, 心脏; 间充质干细胞; 巨噬细胞

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

Effect of mesenchymal cells on the M2 polarization of macrophages under myocardial hypoxia and its mechanism*

Zhi-yong Peng, Ji-ling Zhao, Ye Zhang, Guo-long Yu

(Department of Cardiovascular Medicine, Xiangya Hospital of Central South University,
Changsha, Hunan 410008, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of mesenchymal stem cells (MSC) on the polarization of macrophages under myocardial hypoxia condition, and reveal the underlying mechanisms for polarization. **Methods** The supernatant of cardiomyocytes cultured in oxygen and glucose deprivation (OGD) was added into the culture medium of M0 macrophages to simulate myocardial hypoxia. Then the macrophages were directly co-cultured with MSC. To determine the effect of MSC on the M2 polarization of macrophages, the biological markers of M1/M2 macrophages were detected by flow cytometry, western blot and RT-PCR, respectively. And the expression of MyD88 (myeloid differentiation factor 88) and its upstream factors TLR2 (Toll-like receptor 2) and TLR4 (Toll-like receptor 4) as well as the phosphorylation level of NF- κ B (nuclear factor-kappa B) and

收稿日期: 2019-01-21

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81570266)

[通信作者] 余国龙, E-mail: yuguolong123@hotmail.com; 0731-88836044

MAPK (mitogen-activated protein kinase) signaling pathway were measured. **Results** Compared with the control group, flow cytometry showed that M1 polarization were successfully induced in M0 macrophages cultured under myocardial hypoxia condition ($P<0.05$). Co-cultured with MSC, M0 was promoted significantly to M2 polarization ($P<0.05$). After adding different concentrations of MyD88 inhibitor, the proportion of M2 macrophages gradually increased with the dosage of ST2825 ($P<0.05$) compared with the control group. RT-qPCR showed that compared with the control group, the M2 macrophage-associated inflammatory factors IL-10 and TGF- β 1 levels were increased after co-cultured with MSC ($P<0.05$). Western blot showed that the expression of TLR 2/4 and MyD88 in macrophages was down-regulated after co-cultured with MSC, and the phosphorylation level of downstream factors including P65, IKK α/β , JNK1/2, P38, ERK1/2, the markers of the downstream signaling pathway of TLR2/4-MyD88, were reduced. **Conclusions** MSC promote the M2 polarization from M0 macrophages under myocardial hypoxia condition. One of the main mechanisms might be that MSC down-regulate the expression of TLR2, TLR4 and MyD88 in macrophages, and inhibit TLR2/4-MyD88 signaling and its downstream NF- κ B and MAPK pathways.

Keywords: myocytes, cardiac; mesenchymal stem cells; macrophage

目前已经明确单核细胞/巨噬细胞参与急性心肌梗死(以下简称心梗)炎症反应、炎症损伤、抗炎反应及组织修复的多重效应^[1]。其主要通过 M1 和 M2 型巨噬细胞发挥作用^[2-4]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是从骨髓中分离出来的成纤维细胞样细胞,有研究证实 MSC 移植治疗急性心肌梗死疗效显著^[5-6]。其主要作用机制并非心肌细胞再生,而是旁分泌机制对心梗炎症心肌损伤、促心脏修复双重效应的调节^[7]。MSC 有促巨噬细胞 M2 亚型极化的作用,体外 MSC 对 M2 亚型单核/巨噬细胞极化研究均非心肌细胞缺血、缺氧状态下进行,且目前 MSC 对巨噬细胞 M2 极化机制缺乏相关报道。

1 材料及方法

1.1 材料及仪器

RAW264.7 小鼠 M0 型巨噬细胞(中国科学院上海细胞生物学研究所),C57BL/6 小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司),ST2825(美国 MCE 公司),蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液及 5-Brdu 均购自美国 Sigma 公司,CD11c-PE、CD206-PE 及 Flow Cytometry Staining Buffer 均购自美国 eBioscience 公司,诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)-Alexa Fluor® 594(美国 BioLegend 公司),精氨酸酶-1(Arginine 1, Arg-1)、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、抗-iNOS 抗体、抗-Liver Arginase 抗体[EPR6671(B)]、抗 Toll 样受体 2(Toll-like receptor 2, TLR2)抗体[EPR20303]、抗 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)抗体、抗-MyD88 抗体、抗-核转录因子- κ B(nuclear

factor- κ B, NF- κ B)、p65(phospho S536)抗体、抗-IKK α +IKK β (phospho S180+S181)抗体、抗-JNK1+JNK2(phospho T183+Y185)抗体、抗-p38(phospho Y182)抗体、抗-ERK1(phospho T202)+ERK2(phospho T185)抗体(EPR19401)、抗- β Actin 抗体(mAbcam 8226)-Loading Control(HRP)及山羊抗-兔 IgG H&L(HRP)均购自英国 Abcam 公司,电化学发光(Electrochemiluminescence, ECL)超敏发光液(美国 Thermo 公司),Trizol(美国 Invitrogen 公司),One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit 试剂盒(日本 TaKaRa 公司),二氧化碳培养箱(美国 Thermo Forma 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司),PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),倒置显微镜(日本奥林巴斯公司),冷冻高速离心机(美国贝克曼公司)等。

1.2 方法

1.2.1 心肌细胞获取、培养和鉴定 75% 酒精消毒新生 C57BL/6 小鼠皮肤,开胸取出心脏。根据夏机良等^[8]方法获取心肌细胞,将心肌细胞悬液均匀接种至 6 孔板中,2 ml/孔,放入 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 培养箱中。前 48 h 需要在培养液中加入 0.1 mm 5-Brdu,抑制成纤维细胞增殖。取培养 7 d 细胞进行鉴定,心肌细胞形态呈梭形或多边形,且免疫荧光染色后胞浆中可见清晰的 α -SA 抗体染色的黄绿色肌丝。

1.2.2 无糖无氧(oxygen glucose deprivation, OGD)培养心肌细胞上清液 将心肌细胞培养基换作无糖培养基,持续高流速通入无氧气体(95% 氮气 N₂+5%CO₂) 5 min 后,密封于罐中,置于培养箱中 3 h,收集 OGD 培养的心肌细胞上清液。

1.2.3 MSC 培养与鉴定 ① MSC 获取、培养、鉴定: 取 6 ~ 8 周 C57BL/6J 小鼠, 脱颈处死, 根据李鲁生等^[9]方法分离 MSC, 隔日换液, 取 P3 代细胞用于实验。采用流式细胞仪检测样本, Flowjo 分析软件进行数据分析。流式细胞仪检测 MSC 细胞表面标志物 CD44、CD90 阳性率 >95%, CD11b、CD34 及 CD45 阴性率 >95%, 方可作为实验细胞。② 巨噬细胞培养: RAW264.7 小鼠 M0 型巨噬细胞置于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中, 用含 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) 高糖细胞培养基培养。每 3 天用 0.25% 胰蛋白酶消化, 收集细胞进行传代, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.4 实验分组及细胞处理 ① M0 组: 将 1 × 10⁶ 个 RAW264.7 小鼠 M0 型巨噬细胞接种于 6 孔板中, 常规培养 24 h。② M0+OGD 组: 将 OGD 培养的心肌细胞上清液加入到 6 孔板常规培养的 RAW264.7 小鼠 M0 巨噬细胞中, 继续培养 24 h。③ M0+OGD+MSC 组: 在 M0+OGD 组基础上, 加入含 10% 胎牛血清、DMEM/F12 培养基的 1 × 10⁶ 个 MSC, 培养 24 h。④ M0+OGD+ 不同浓度髓样分化因子 88 组: 在 M0+OGD 组基础上, 分别加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖细胞培养基稀释 50、100 及 200 μmol/L 浓度的髓样分化因子 88 抑制剂, 培养 24 h 后分为 M0+OGD+50 μmol/L ST2825 组、M0+OGD+100 μmol/L ST2825 组及 M0+OGD+200 μmol/L ST2825 组。

1.2.5 流式细胞术 取 0.25% 胰蛋白酶消化 RAW264.7 巨噬细胞, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, Flow Cytometry Staining Buffer 重悬细胞。计数并调整细胞浓度至 1 × 10⁷ 个/L。取 100 μl 细胞悬液加入 2 μl CD11c-PE、iNOS-Alexa Fluor® 488、Arg-1 偶联 FITC 或 CD206-PE 抗体。4℃避光孵育 30 min。加入 1 ml 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS), 1 000 r/min 离心 5 min, 清洗细胞, 加 500 μl PBS 重悬细胞上机检测, 利用 Flowjo 软件分析结果。

1.2.6 Western blotting 检测 RIPA 裂解液裂解巨噬细胞, 提取细胞总蛋白。采用蛋白定量试剂盒按说明书操作测巨噬细胞总蛋白浓度。等量蛋白以 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 120 V 电泳 1 h, 以 350 mA 转移至聚偏二氟乙烯膜, 持续 70 min。用含 5% 胎牛血清蛋白的 TBST 溶液封闭 1 h 后清洗

2 或 3 次。4℃环境下轻摇孵育抗 iNOS、抗 Arg-1、抗 TLR2、抗 TLR4、抗髓样分化因子 88、抗 p65、IKK α/β、JNK1/JNK2、p38 及 ERK1/2 一抗过夜。第 2 天 TBST 清洗 2 或 3 次后, 室温孵育山羊抗兔 IgG H&L (HRP) 二抗 1 h。同时, 孵育 β-actin 抗体作为内参。采用 ECL 超敏发光液显色。

1.2.7 逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 使用 Trizol 提取巨噬细胞总 RNA。采用 One Step SYBR® Prime Script™ RT-PCR Kit 试剂盒逆转录合成 cDNA 第一链并以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参, RT-PCR 检测 M1 型巨噬细胞标志物 TNF-α、iNOS 及 IL-1β, M2 型巨噬细胞标志物 IL-10、TGF-β₁ mRNA 水平。见表 1。

表 1 PT-PCR 引物序列

基因	引物序列	长度 /bp
iNOS	正向: 5'-TCCAGGATGAGGACATGAGCAC-3'	463
	反向: 5'-GAACGTACACACCAGCAGGTTA-3'	
TNF-α	正向: 5'-CAGGCGGTGCCTATGTCTC-3'	264
	反向: 5'-CGATCACCCGAAGTTCAGTAG-3'	
IL-10	正向: 5'-TGGCCCAGAAATCAAGGAGG-3'	347
	反向: 5'-CAGCAGACTCAATACACACT-3'	
IL-1β	正向: 5'-AGGTGGCCTCTTGAGGTATGTG-3'	176
	反向: 5'-GTGGAAGTTCAGGCCACATT-3'	
TGF-β ₁	正向: 5'-GTGGAAGTTCAGGCCACATT-3'	158
	反向: 5'-TGTGACAAAAATGCCCTGGAA-3'	
GAPDH	正向: 5'-CTCAAGATCATCAGCAATG-3'	254
	反向: 5'-GTCATGAGTCCTTCCACG-3'	

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 和 GraphPad 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验或方差分析, 两两比较用 Bonferroni 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

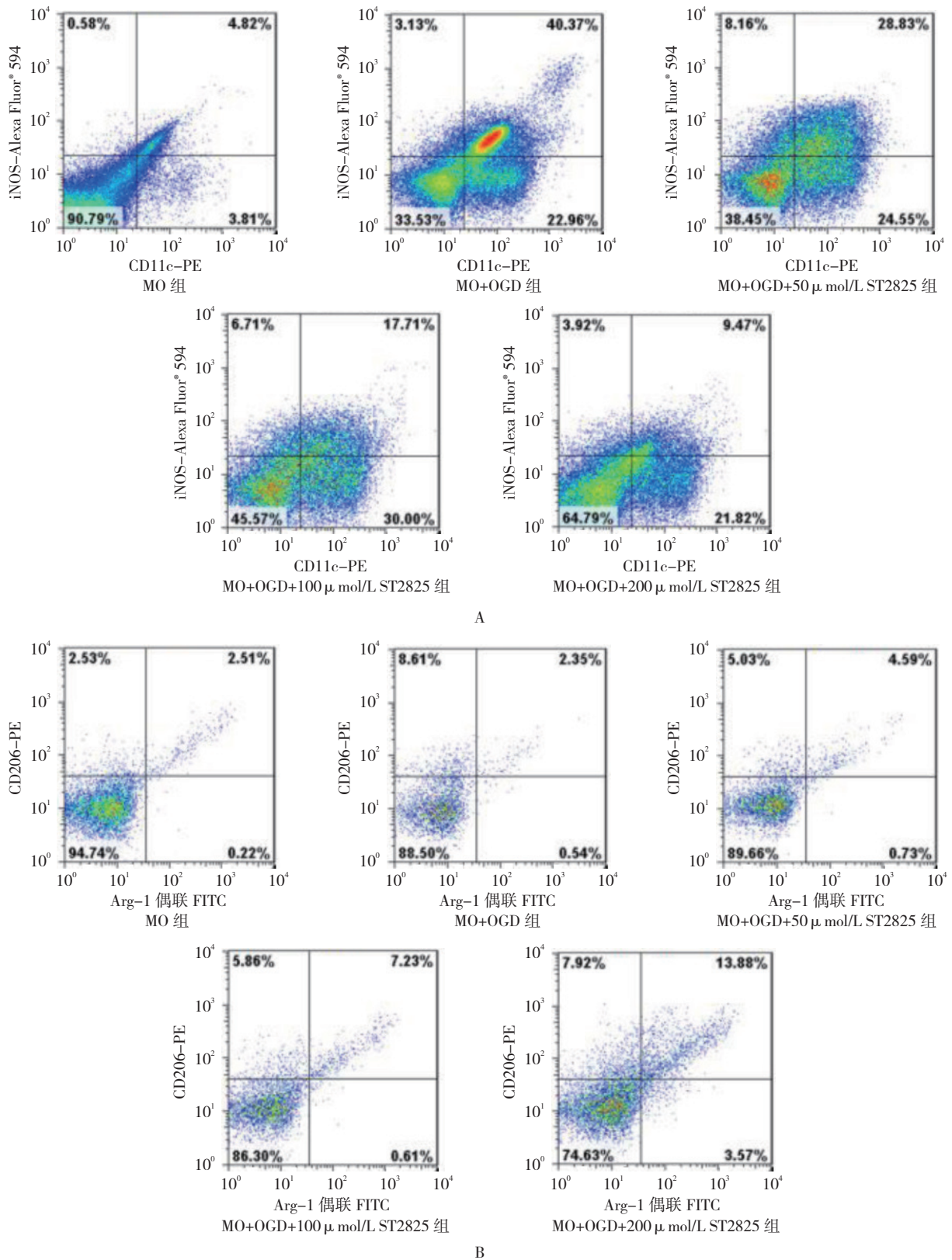
2 结果

2.1 M0 组与 M0+OGD 组 M1、M2 型巨噬细胞比例比较

M0 组与 M0+OGD 组 M1 型巨噬细胞比例分别为 (4.63 ± 0.51) % 和 (40.77 ± 2.26) %, 经 *t* 检验, 差异

有统计学意义 ($t=-27.008$, $P=0.001$), M0+OGD 组高于 M0 组。M0 组与 M0+OGD 组 M2 型巨噬细胞比例

分别为 $(2.50 \pm 0.14)\%$ 和 $(2.38 \pm 0.18)\%$, 经 t 检验, 差异无统计学意义 ($t=0.906$, $P=0.416$)。见图 1。



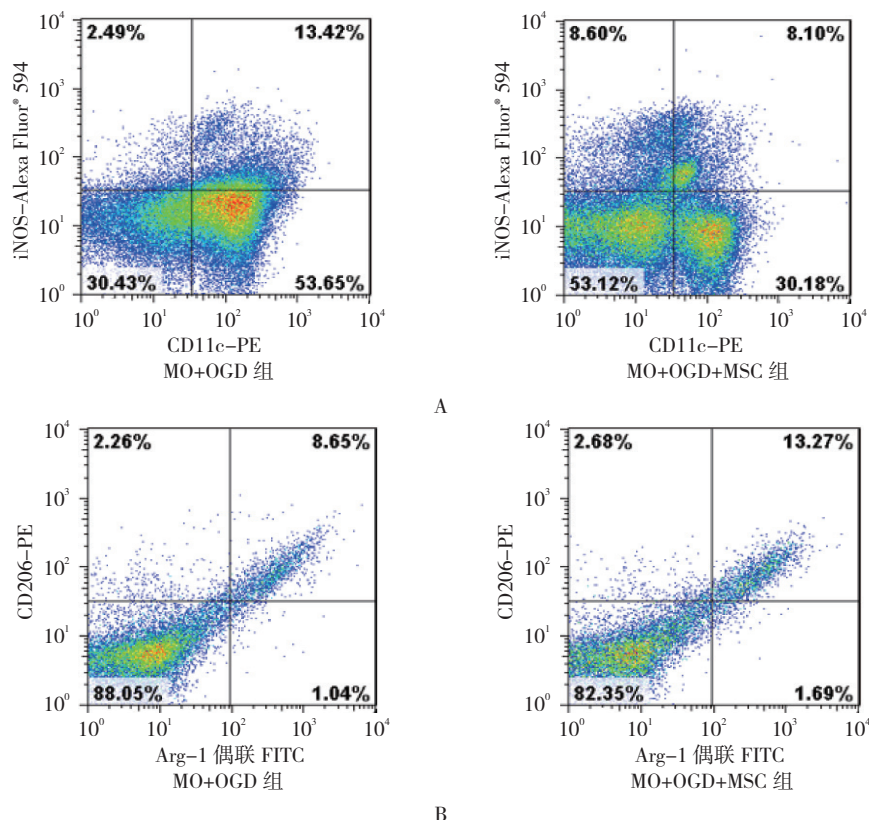
A: M1 型巨噬细胞; B: M2 型巨噬细胞

图 1 M0 组与 M0+OGD 组流式细胞图

2.2 M0+OGD 组与 M0+OGD+MSC 组 M1、M2 型巨噬细胞比例比较

M0+OGD 组与 M0+OGD+MSC 组 M1 型巨噬细胞比例分别为 $(68.47 \pm 2.67) \%$ 和 $(41.98 \pm 7.84) \%$, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=5.544$, $P=0.019$),

M0+OGD+MSC 组低于 M0+OGD 组。M0+OGD 组与 M0+OGD+MSC 组 M2 型巨噬细胞比例分别为 $(9.80 \pm 0.64) \%$ 和 $(16.11 \pm 1.49) \%$, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=-6.749$, $P=0.009$), M0+OGD+MSC 组高于 M0+OGD 组。见图 2。



A: M1 型巨噬细胞; B: M2 型巨噬细胞

图 2 M0+OGD 组与 M0+OGD+MSC 组流式细胞图

2.3 M0+OGD 组与 M0+OGD+MSC 组 iNOS、Arg-1 表达比较

Western blotting 检测结果显示, M0+OGD 组与 M0+OGD+MSC 组 M1 型巨噬细胞标记 iNOS 相对表达量分别为 (4.47 ± 0.12) 和 (1.03 ± 0.12) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=35.093$, $P=0.000$), M0+OGD+MSC 组低于 M0+OGD 组。M0+OGD 组与 M0+OGD+MSC 组 M2 型巨噬细胞标记 Arg-1 相对表达量分别为 (1.01 ± 0.11) 和 (1.84 ± 0.13) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=-8.413$, $P=0.001$), M0+OGD+MSC 组高于 M0+OGD 组。见图 3。

2.4 M0+OGD 组与 M0+OGD+MSC 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 及 TGF- β_1 mRNA 表达比较

RT-PCR 检测结果显示, M0+OGD 组与 M0+OGD+MSC 组 TNF- α mRNA 相对表达量分别为 (2.33 ± 0.70) 和 (0.97 ± 0.12) , IL-1 β mRNA 相对表

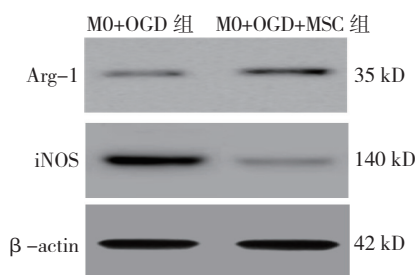


图 3 iNOS 和 Arg-1 蛋白的表达

达量分别为 (1.68 ± 0.12) 和 (1.00 ± 0.11) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=7.211$ 和 -17.399 , $P=0.002$ 和 0.000), M0+OGD+MSC 组低于 M0+OGD 组。M0+OGD 组与 M0+OGD+MSC 组 IL-10 mRNA 相对表达量分别为 (1.0 ± 0.17) 和 (1.77 ± 0.19) , TGF- β_1 mRNA 相对表达量分别为 (1.0 ± 0.54) 和 (1.43 ± 0.18) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=-5.249$ 和 -3.967 , $P=0.006$ 和 0.044), M0+OGD+MSC 组高于 M0+OGD 组。见图 4。

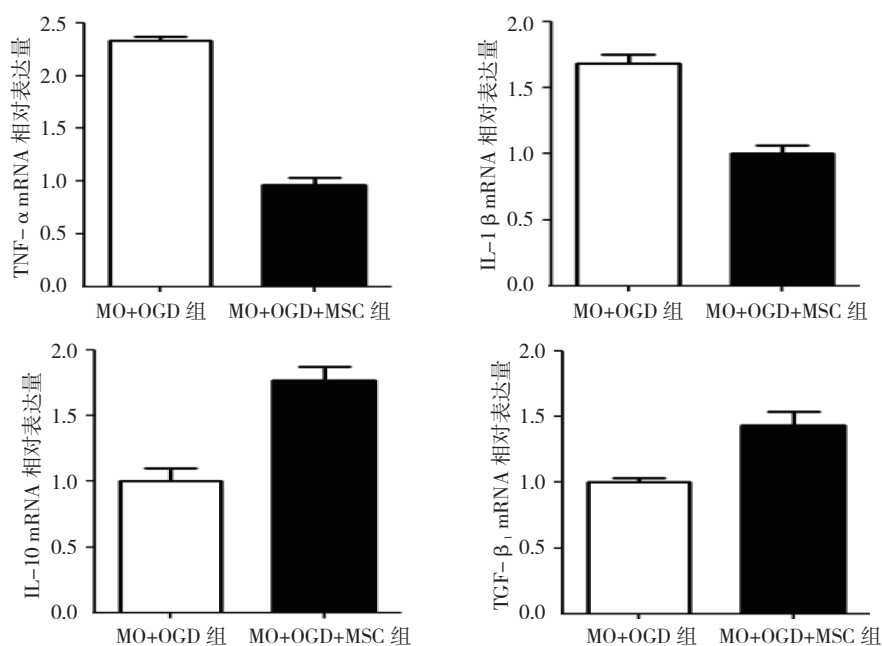


图 4 各组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、TGF- β_1 mRNA 相对表达量比较

2.5 不同浓度髓样分化因子 88 抑制剂组 M1、M2 型巨噬细胞比例比较

不同浓度髓样分化因子 88 抑制剂组 M1 型巨噬细胞比例比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); M0+OGD 组高于 M0+OGD+50 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组 ($P < 0.05$); M0+OGD+50 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组高于 M0+OGD+100 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组 ($P < 0.05$); M0+OGD+100 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组高于 M0+OGD+200 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组 ($P < 0.05$)。不同浓度髓样分化因子 88 抑制剂组 M2 型巨噬细胞比例比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); M0+OGD 组低于 M0+OGD+50 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组 ($P < 0.05$); M0+OGD+50 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组低于 M0+OGD+100 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组 ($P < 0.05$); M0+OGD+100 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组低于 M0+OGD+200 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 2。

2.6 不同浓度髓样分化因子 88 抑制剂组 iNOS、IL-10 mRNA 表达比较

不同浓度髓样分化因子 88 抑制剂组 iNOS mRNA 相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); M0+OGD 组高于 M0+OGD+50 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组 ($P < 0.05$); M0+OGD+50 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组高于 M0+OGD+100 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组 ($P < 0.05$); M0+

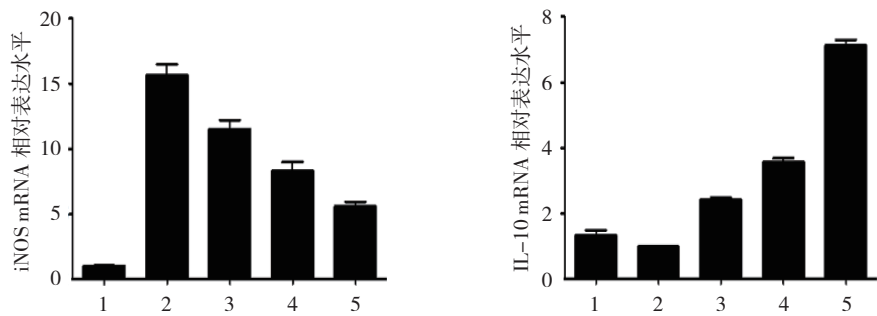
OGD+100 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组高于 M0+OGD+200 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组 ($P < 0.05$); 不同浓度髓样分化因子 88 抑制剂组 IL-10 mRNA 相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); M0+OGD 组低于 M0+OGD+50 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组 ($P < 0.05$); M0+OGD+50 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组低于 M0+OGD+100 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组 ($P < 0.05$); M0+OGD+100 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组低于 M0+OGD+200 $\mu\text{mol/L}$ ST2825 组 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 5。

2.7 各组 TLR2、TLR4、髓样分化因子 88 及磷酸化蛋白相对表达量比较

各组 TLR2、TLR4 蛋白相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。M0 组低于 M0+OGD 组和 M0+OGD+MSC 组, 与 M0+OGD 组高于 M0+OGD+MSC 组 ($P < 0.05$)。各组髓样分化因子 88 蛋白相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。M0 组低于 M0+OGD 组和 M0+OGD+MSC 组, 而 M0+OGD 组高于 M0+OGD+MSC 组 ($P < 0.05$)。各组 p-P65、p-IKK α/β 、p-JNK1/2、p-P38 及 p-ERK1/2 蛋白相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。M0 组低于 M0+OGD 组和 M0+OGD+MSC 组, 而 M0+OGD 组高于 M0+OGD+MSC 组 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 6。

表 2 各组 iNOS mRNA、IL-10 mRNA 及 M1、M2 型巨噬细胞比例比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	iNOS mRNA	IL-10 mRNA	M1/%	M2/%
M0 组	1.02 ± 0.10	1.34 ± 0.27	4.63 ± 0.51	2.50 ± 0.14
M0+OGD 组	15.6 ± 1.47	1.00 ± 0.36	40.77 ± 2.26	2.38 ± 0.18
M0+OGD+50 μmol/L ST2825 组	11.5 ± 1.21	2.43 ± 0.93	29.39 ± 1.83	4.73 ± 0.39
M0+OGD+100 μmol/L ST2825 组	8.34 ± 1.14	3.57 ± 0.20	17.10 ± 0.89	7.24 ± 0.30
M0+OGD+200 μmol/L ST2825 组	5.59 ± 0.63	7.13 ± 0.29	9.75 ± 0.67	14.0 ± 0.59
F 值	87.317	432.208	326.988	547.400
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

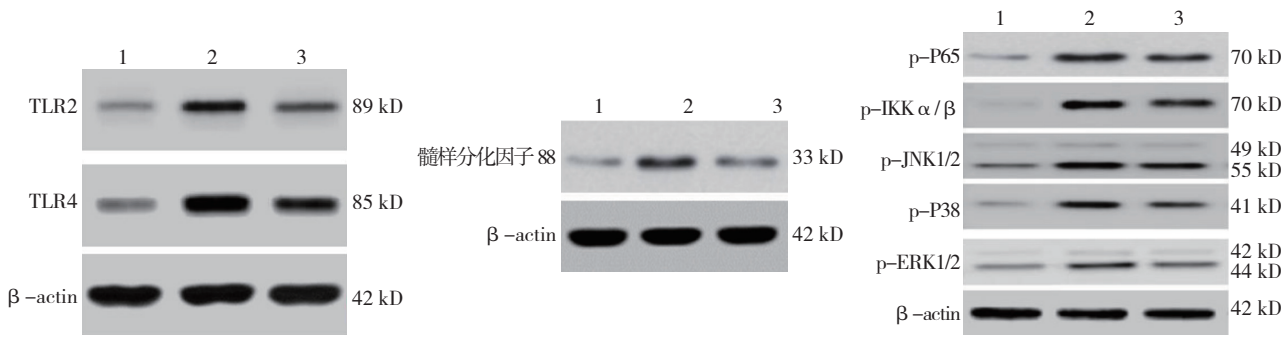


1: M0 组; 2: M0+OGD 组; 3: M0+OGD+50 μmol/L ST2825 组; 4: M0+OGD+100 μmol/L ST2825 组; 5: M0+OGD+200 μmol/L ST2825 组

图 5 各组 iNOS mRNA、IL-10 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

表 3 各组 TLR2、TLR4、髓样分化因子 88 及磷酸化蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	髓样分化因子 88	TLR2	TLR4	p-P65	p-IKK α/β	p-JNK1/2	p-P38	p-ERK1/2
M0 组	1.00 ± 0.12	1.01 ± 0.92	1.02 ± 0.18	1.00 ± 0.31	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.08
M0+OGD 组	5.11 ± 0.19	4.89 ± 0.28	3.81 ± 0.38	6.18 ± 0.89	10.00 ± 0.37	7.00 ± 0.30	7.64 ± 0.89	5.06 ± 0.30
M0+OGD+MSC 组	3.19 ± 0.48	2.91 ± 0.60	2.73 ± 0.33	4.68 ± 0.61	6.64 ± 0.45	5.13 ± 0.63	4.85 ± 0.53	3.06 ± 0.42
F 值	134.221	75.158	61.692	54.715	531.534	89.982	133.017	171.899
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



1: M0 组; 2: M0+OGD 组; 3: M0+OGD+MSC 组

图 6 各组 TLR2、TLR4 和髓样分化因子 88 蛋白表达以及下游信号通路磷酸化水平

3 讨论

MSC 促进心内巨噬细胞 M1 向 M2 亚型转化效应近期得到初步肯定。2011 年 DAYAN 等^[10]通过结扎大鼠冠状动脉左前降支复制心梗模型,对大鼠心梗后模型心肌注射 MSC,与对照组相比,免疫荧光分析 MSC 治疗组心肌中检测到 Arg-1 强表达。2009 年 KIM 等^[11]研究发现,将 MSC 和巨噬细胞体外共培养可以促进巨噬细胞转化为 M2 型,其细胞高表达 CD206。2013 年 ABUMAREE 等^[12]研究进一步证实 MSC 可以促进 M1 型巨噬细胞转化为 M2 型,研究者将单核细胞在加入粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的培养基中培养 7 d,成功地将单核细胞定向分化为 M1 型巨噬细胞,再与 MSC 共培养 3 d,通过流式细胞术发现其 CD14、CD36、CD163、CD204 及 CD206 等 M2 型细胞表型增加。以上研究均在非心肌细胞缺血缺氧状态下进行。本实验在以 OGD 处理的心肌细胞培养基上清液模拟心肌缺氧状态下进行,结果显示,与 M0 组比较,模拟心肌缺氧状态下成功诱导 M1 极化;再与 MSC 共培养促进 M1 极化向 M2 转化。

Toll 样受体是细胞膜结合模式识别受体,是机体细胞免疫中的关键受体(包括单核细胞/巨噬细胞等炎症细胞),在天然免疫和获得性免疫中起核心作用^[13]。梗死心肌细胞内损伤信号分子激活炎症细胞 Toll 样受体信号通路,诱导产生细胞因子和趋化因子表达上调(包括单核细胞/巨噬细胞等炎症细胞),促进炎症的发生和发展^[14-15]。TLR2 和 TLR4 是 Toll 样受体家族中的重要亚型,其主要参与梗死后心肌的炎症反应^[16]。髓样分化因子 88 是 Toll 样受体信号传导通路的一个关键分子,是多种受体信号下游传导的核心环节。Toll 样受体下游信号通路中髓样分化因子 88 依赖的细胞 NF- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路的激活在炎症介质的释放及免疫调节过程中发挥重要作用^[17-20]。本研究结果表明,OGD 培养的心肌细胞上清液诱导 M0 巨噬细胞极化成 M1 型,且 TLR2、TLR4 及髓样分化因子表达上升,TLR2、TLR4 及髓样分化因子 88 下游的 NF- κ B 和 MAPK 信号通路标记分子 P65、IKK α/β 、JNK1/2、P38 及 ERK1/2 磷酸化水平增加;加入 MSC 共培养后 TLR2、TLR4 及髓样分化因子 88 表达下降,且其下游的 NF- κ B 和 MAPK 信号通路标记分子 P65、IKK α/β 、JNK1/2、P38 及 ERK1/2 的磷酸化水平下降。

综上所述,本研究证实 MSC 调节巨噬细胞亚型之间转化的机制之一是通过抑制 TLR2、TLR4 及髓样分化因子 88 下游的 NF- κ B 和 MAPK 信号通路,进一步认识 MSC 治疗急性心梗抗炎与促进心脏修复的机制,为今后研究巨噬细胞亚型转化参与组织抗炎与组织修复提供新的理论依据与干预靶点。

参考文献:

- [1] 袁春菊,余国龙.心肌梗死后心肌组织炎症双重效应与骨髓间充质细胞的调节作用[J].临床与病理杂志,2014,34(2):212-215.
- [2] MACKANESS G B. Pillars article: cellular resistance to infection. J. Exp. Med. 1962. 116: 381-406[J]. Journal of Immunology, 2014, 193(7): 3185-3221.
- [3] DOYLE A G. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma[J]. Eur J Immunol, 1994, 24(6): 1441-1445.
- [4] STEIN M, KESHAV S, HARRIS N, et al. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation[J]. Journal of Experimental Medicine, 1992, 176(1): 287-292.
- [5] FRIEDENSTEIN A J, PETRAKOVA K V, KUROLESOVA A I, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues[J]. Transplantation, 1968, 6(2): 230-247.
- [6] GUOLONG Y, BORLONGAN C V, STAHL C E, et al. Transplantation of human umbilical cord blood cells for the repair of myocardial infarction[J]. Medical Science Monitor International Medical Journal of Experimental & Clinical Research, 2008, 14(10): 163-172.
- [7] 袁春菊,余国龙,李文斌,等.多次静脉移植人脐血单个核细胞对家兔急性心肌梗死炎症反应的影响[J].中华器官移植杂志,2011,32(6):372-376.
- [8] 夏机良,朱泽安,张湘涛,等.新生小鼠心肌细胞分离培养的改良及其鉴定[J].生命科学研究,2009,13(3):236-239.
- [9] 李鲁生,张涵,王成俊,等.骨髓间充质干细胞的分离方法和生物学特性[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(10):1869-1873.
- [10] DAYAN V, YANNARELLI G, BILLIA F, et al. Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction[J]. Basic Research in Cardiology, 2011, 106(6): 1299-1310.
- [11] KIM J, HEMATTI P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages[J]. Experimental Hematology, 2009, 37(12): 1445-1453.
- [12] ABUMAREE M H, AL JUMAH M A, KALIONIS B, et al. Human placental mesenchymal stem cells (pMSC) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages[J].

- Stem Cell Reviews, 2013, 9(5): 620-641.
- [13] KAWAI T, AKIRA S. TLR signaling[J]. Cell Death and Differentiation, 2007, 13(1): 24-32.
- [14] DING H S, YANG J, CHEN P, et al. The HMGB1-TLR4 axis contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury via regulation of cardiomyocyte apoptosis[J]. Gene, 2013, 527(1): 389-393.
- [15] TIMMERS L, PASTERKAMP G, DE HOOG V C, et al. The innate immune response in reperfused myocardium[J]. Cardiovascular Research, 2012, 94(2): 276-283.
- [16] RIAD A, JÄGER S, SOBIREY M, et al. Toll-like receptor-4 modulates survival by induction of left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice[J]. Journal of Immunology, 2008, 180(10): 6954-6961.
- [17] CHEN S, XIONG J, ZHAN Y, et al. Wogonin inhibits LPS-Induced inflammatory responses in rat dorsal root ganglion neurons via inhibiting TLR4-MyD88-TAK1-Mediated NF- κ B and MAPK signaling pathway[J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2015, 35(4): 523-531.
- [18] RASHTCHIZADEH N, KARIMI P, DEHGAN P, et al. Effects of selenium in the MAPK signaling cascade[J]. Journal of Cardiovascular and Thoracic Research, 2015, 7(3): 107-112.
- [19] CIMPEAN A, NEACSU P, MAZARE A, et al. Attenuation of the macrophage inflammatory activity by TiO₂ nanotubes via inhibition of MAPK and NF- κ B pathways[J]. International Journal of Nanomedicine, 2015, 10: 6455-6467.
- [20] LIU W, XU C, RAN D, et al. CaMK mediates cadmium induced apoptosis in rat primary osteoblasts through MAPK activation and endoplasmic reticulum stress[J]. Toxicology, 2018, 406-407: 70-80.

(李科 编辑)