

· 基础研究 ·

间充质干细胞上清对高糖慢性炎症损伤的巨噬细胞表型极化的影响

靳丽媛¹, 邓子辉², 张金英², 杨晨¹, 司艺玲^{2*}, 陈光辉^{1*}

(解放军总医院:¹ 心血管内科, ² 基础医学研究所, 北京 100853)

【摘要】 目的 探讨脂肪间充质干细胞(MSCs)培养上清对高糖、炎症环境中巨噬细胞表型的影响及其机制。**方法** 分别以及联合利用高浓度葡萄糖(33 mmol/L)、脂多糖(LPS; 1 µg/ml)体外处理大鼠腹腔巨噬细胞 12 h。依据是否采用 MSCs 干预分为干预组和非干预组,考察各损伤条件下两组巨噬细胞表型的差异。MSCs 干预方法为加入 MSCs 上清 0.5 ml,培养 48 h。**结果** 在各非干预组中,与正常条件下相比,各损伤条件下的 M1 型巨噬细胞比例、M1/M2 值和 IL-6 水平均显著增高,而 M2 型巨噬细胞比例以及 IL-10 和 PGE2 水平均显著降低。MSCs 干预后,在 LPS 和高糖 + LPS 的损伤条件下,与非干预组相比,干预组的 M1 型巨噬细胞的比例和 M1/M2 值均显著降低,而 M2 型巨噬细胞的比例均增加,ELISA 结果也显示,在各损伤条件下,与非干预组相比,干预组的 IL-6 水平均显著降低,而 IL-10 和 PGE2 的水平均显著增加。**结论** 高糖及慢性炎症因素叠加可加剧巨噬细胞向 M1 促炎表型极化及炎症因子的分泌, MSCs 上清作用于损伤的巨噬细胞,促使其向 M2 抗炎表型极化,同时使炎症因子分泌减少,抗炎因子分泌增多。

【关键词】 间充质干细胞;巨噬细胞极化;高糖;慢性炎症

【中图分类号】 R541

【文献标志码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.04.066

Effect of cultural supernatant of mesenchymal stem cells on phenotype of macrophages in high glucose and chronic inflammatory circumstance

JIN Li-Yuan¹, DENG Zi-Hui², ZHANG Jin-Ying², YANG Chen¹, SI Yi-Ling^{2*}, CHEN Guang-Hui^{1*}

(¹Department of Cardiology, ²Institute of Basic Medicine, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】 Objective To determine the effect of the supernatant of adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) on macrophages phenotype cultured under high glucose or combined with inflammation circumstance. **Methods** Rat peritoneal macrophages were isolated and then cultured under 33 mmol/L glucose, 1 µg/ml LPS and their combination separately for 12 h, then the culture media were added with 0.5 ml supernatant of AD-MSCs. After 48h, the morphology of the macrophages with the supernatant intervention or not was observed with microscopy. The percentages of M1 and M2 macrophages were detected by flow cytometry, and the concentrations of cytokines IL-6, IL-10 and PGE2 were determined with ELISA. **Results** Compared with normal control cells, the percentage of M1 macrophage, M1/M2 ratio and IL-6 concentration were significantly higher, while the proportion of M2 macrophages and contents of IL-10 and PGE2 were obviously declined in the macrophages treated with high glucose, LPS or their combination. However, addition of the MSCs supernatant resulted in notable decrease in the percentage of M1 macrophages and M1/M2 ratio, and significant increases in the proportion of M2 macrophage in the LPS and combination groups. The results of ELISA indicated that MSCs supernatant reduced the level of IL-6 while elevated those of IL-10 and PGE2 in the macrophages treated with high glucose, LPS or their combination. **Conclusion** Combination of high glucose and LPS synergistically aggravates the polarization of pro-inflammatory M1 macrophages, and promotes the secretion of inflammatory cytokines. The supernatant of MSCs improves M2 phenotype polarization and production of anti-inflammatory cytokines.

【Key words】 mesenchymal stem cells; macrophage polarization; high glucose; chronic inflammation

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2011AA020101) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (81471052).

Corresponding author: CHEN Guang-Hui, E-mail: chenkevin@yahoo.com; SI Yi-Ling, E-mail: ys2618columbia@163.com

收稿日期: 2016-12-06; 修回日期: 2017-01-03

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划, 2011AA020101); 国家自然科学基金面上项目(81471052)

通信作者: 陈光辉, E-mail: chenkevin@yahoo.com; 司艺玲, E-mail: ys2618columbia@163.com

近年来,糖尿病已成为威胁全人类健康的主要慢性疾病,长期控制不佳的高血糖会导致严重的心、脑及肾脏并发症,造成极高的死亡率^[1-3]。在糖尿病并发症的炎症反应中,巨噬细胞是一种重要的参与其炎症调节的免疫细胞^[4-6]。巨噬细胞主要存在两种亚型:经典活化型(M1型)和选择活化型(M2型)。在不同微环境中,炎症介质刺激巨噬细胞活化,转化成不同的表型,同时分泌促炎或抗炎细胞因子参与炎症调节^[7]。正常情况下,巨噬细胞M1和M2处于动态平衡以维持稳态,当发生糖尿病并发症的高糖慢性炎症时,M1和M2比例失衡,造成炎症级联反应,分泌大量炎症细胞因子,进一步加重细胞和组织的炎症损伤,若未能得到有效控制,将造成不可逆转的心、脑、肾功能损害^[5,6,8]。近年的研究表明,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)可以通过分泌的物质调节巨噬细胞极化,影响巨噬细胞功能,从而在多种免疫代谢疾病中起到治疗作用^[9,10]。在糖尿病并发症的高糖慢性炎症中, MSCs的免疫调节机制尚不清楚。故本研究拟利用高糖联合脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)模拟糖尿病并发症的慢性炎症环境,探讨高糖炎症损伤条件下巨噬细胞的变化及 MSCs培养上清对损伤的巨噬细胞表型极化的影响,旨在阐明糖尿病并发慢性炎症的致病机理及 MSCs的干预机制,为 MSCs防治糖尿病并发症提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性SD大鼠15只:体质量120~150 g,10只;体质量80 g,5只。购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养环境为解放军总医院SPF级实验动物中心。

1.2 试剂

DMEM高糖和低糖培养液以及10 000 U/ml青霉素-10 000 μg/ml链霉素(HyClone公司,新西兰),胎牛血清(天津市灏洋生物技术公司),LPS和I型胶原酶(Sigma公司,美国),50%葡萄糖和0.25%胰酶(Gibco公司,美国)。大鼠白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-10和前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(R&D),抗大鼠CD45和CD29(eBioscience公司,美国),CD11b和CD90(BD公司,美国),CD34、CD45、CD68、CD163和CD11c(AbD Serotec公司,英国)。

1.3 巨噬细胞的分离、培养与鉴定

选取体质量为120~150 g雄性SD大鼠,分离

腹腔巨噬细胞^[11]。细胞培养至36~48 h显微镜下观察细胞形态,稳定生长的细胞可进行流式细胞术鉴定。按照流式实验步骤,用特异白细胞CD45、中性粒细胞CD11b以及巨噬细胞特异CD68抗体进行反应,流式细胞仪计数并分析阳性巨噬细胞的比例。

1.4 MSCs的分离、培养与鉴定

选取体质量为80 g雄性SD大鼠,分离和培养腹股沟处脂肪MSCs^[12]。待细胞密度接近90%,消化细胞进行传代,P3或P4代细胞显微镜下观察细胞形态,流式细胞术进行细胞鉴定,采用MSCs阳性表面标记抗体CD29和CD90,阴性表面标记抗体CD34、CD45和CD11b避光反应15 min,流式鉴定各表面标记分子的阳性率。

1.5 分组

分别以及联合利用高浓度葡萄糖(33 mmol/L)和LPS(1 μg/ml)体外处理大鼠腹腔巨噬细胞12 h。依据是否采用MSCs干预分为干预组和非干预组,考察各损伤条件下两组巨噬细胞表型的差异。MSCs干预方法为加入MSCs上清0.5 ml换取0.5 ml原培养基,培养48 h,此后收集细胞上清进行细胞因子的ELISA检测,收集细胞后进行流式细胞仪检测。

1.6 流式细胞仪检测

MSCs处理48 h后,吹打收集巨噬细胞,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗2次,用流式抗体CD68特异标记巨噬细胞、CD163标记M1型、CD11c标记M2型,避光室温孵育细胞20 min, PBS洗涤,重悬后进行检测分析。

1.7 ELISA检测

处理48 h后收集细胞上清,冻存于-80℃,检测前离心20 min(3000转/min),收集上清进行细胞因子IL-6、IL-10和PGE2的ELISA检测。

1.8 统计学处理

采用SPSS22.0软件进行数据处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间差异比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态及鉴定

由大鼠腹腔分离的巨噬细胞经2 h后换液纯化,培养2~3 d,观察细胞形态呈类圆形或不规则形(图1A)。P3~P4代MSCs呈长梭形,且聚集呈漩涡状稳定生长(图1B)。

流式细胞检测结果示 CD68 阳性的细胞比例为 99.39%,说明腹腔分离的细胞中巨噬细胞纯度高,可以用作下一步分组干预试验(图 2A)。MSCs 阴性标记 CD34、CD45 和 CD11b 的阳性率均 $<0.5\%$,阳性标志 CD29 和 CD90 的阳性率均 $>99.0\%$,符合 MSCs 的表型,可用作后续试验(图 2B)。

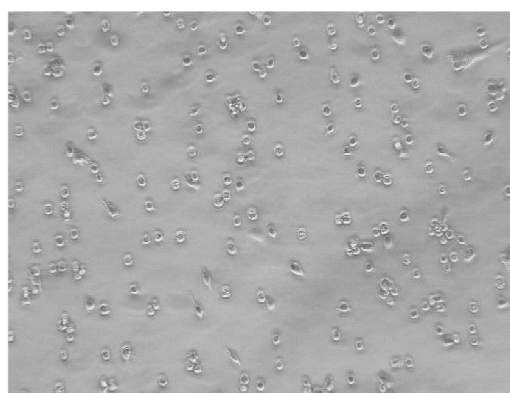
2.2 MSCs 对高糖、炎症环境中巨噬细胞表型变化的影响

在各非干预组中,与正常条件下相比,高糖、LPS 和高糖 + LPS 损伤条件下的 M1 型巨噬细胞比例和 M1/M2 值均显著增高,而 M2 型巨噬细胞的比例则显著减少,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。MSCs 干预后,在 LPS 和高糖 + LPS 的损伤条件下,

与非干预组相比,干预组的 M1 型巨噬细胞的比例和 M1/M2 值均显著降低(均 $P < 0.05$),而 M2 型巨噬细胞的比例均增加($P_{LPS} < 0.05$, $P_{高糖+LPS} = 0.063$;图 3)。

2.3 ELISA 检测结果

在各非干预组中,与正常条件下相比,高糖、LPS 和高糖 + LPS 损伤条件下的 IL-6 水平均显著增加,而 IL-10 和 PGE2 水平均显著降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。MSCs 干预后,在高糖、LPS 和高糖 + LPS 的损伤条件下,与非干预组相比,干预组的 IL-6 水平均显著降低,而 IL-10 和 PGE2 的水平均显著增加,差异均具有统计学意义($P < 0.05$;图 4)。



A



B

图 1 原代培养细胞的形态学观察

Figure 1 Primarily cultured Cells under light microscope

A: macrophages ($\times 40$); B: mesenchymal stem cells ($\times 10$)

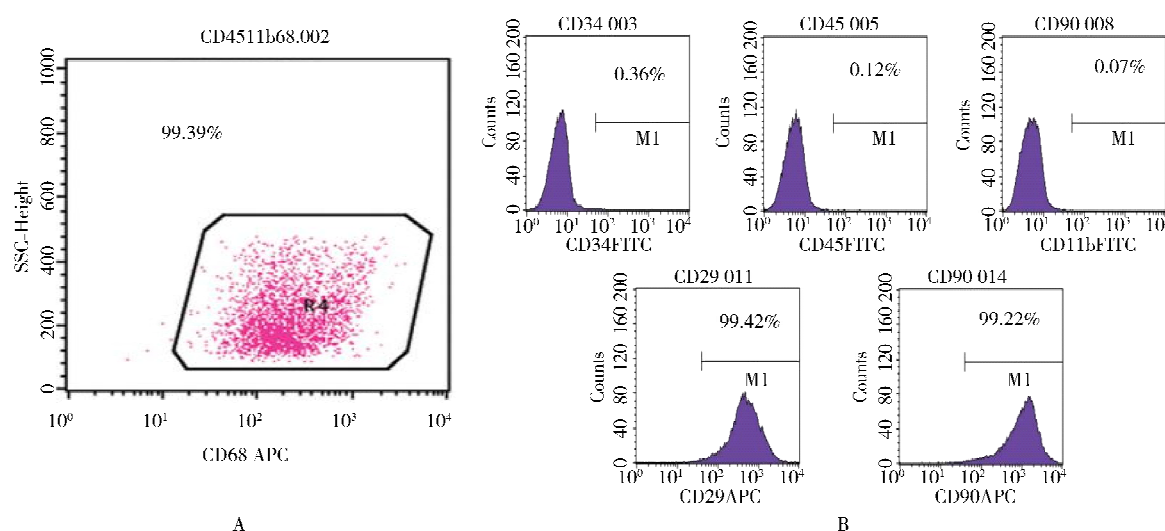


图 2 培养细胞的流式细胞细胞术鉴定

Figure 2 Identification of the cultured cells by flow cytometry

A: macrophages; B: mesenchymal stem cells

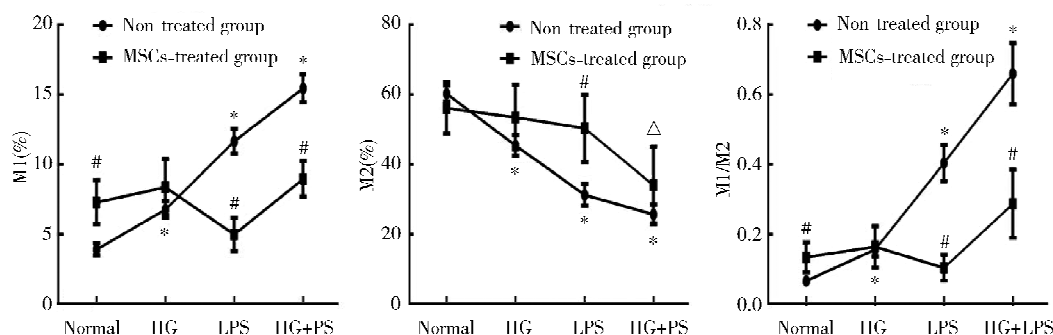


图3 各组巨噬细胞分型比例

Figure 3 The proportion of M1, M2 macrophages and M1/M2 among groups ($n=8$)

MSCs; mesenchymal stem cells; HG; high glucose; LPS; lipopolysaccharide. Compared with normal condition, * $P<0.05$; compared with non-treated group, # $P<0.05$; $\Delta P=0.063$

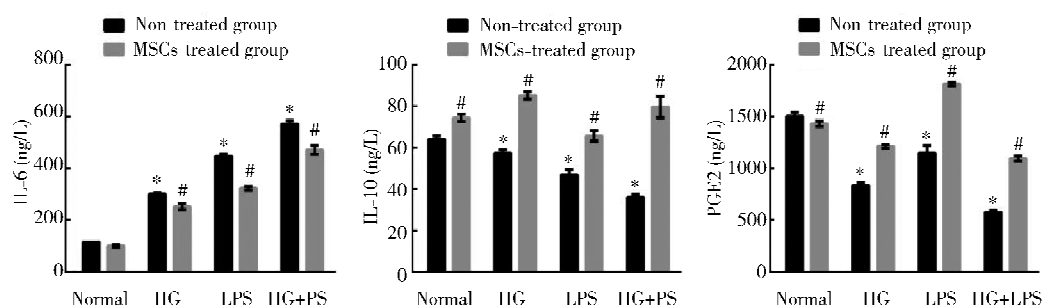


图4 各组细胞上清中细胞因子的浓度

Figure 4 The concentration of cytokines in different groups of cell supernatant ($n=3$)

MSCs; mesenchymal stem cells; HG; high glucose; LPS; lipopolysaccharide. Compared with normal condition, * $P<0.05$; compared with non-treated group, # $P<0.05$

3 讨论

近年的研究表明,炎症是糖尿病患者产生胰岛素抵抗以及心脏病、脑卒中、肾病和其他相关并发症的主要原因之一^[6]。在糖尿病并发症的高糖慢性炎症中,巨噬细胞不同表型起着重要的炎症调节作用。受到炎症刺激后的巨噬细胞可发生表型极化,参与炎症过程的调节,M1型巨噬细胞可分泌促炎类细胞因子,如IL-6、IL-1 β 等,促进炎症发生、加重组织损伤;M2型巨噬细胞可分泌抗炎类细胞因子,如IL-10、转化生长因子 β 、MMP-12等,发挥抗炎作用,促进组织的修复^[6-8]。糖尿病心脏并发症的晚期阶段,机体自身免疫炎症调节受损,由循环单核细胞募集的巨噬细胞逐渐替代驻地M2细胞群,M1与M2比例失衡,M1促炎型巨噬细胞增多并分泌促炎因子,造成持续性炎症损害,诱发心肌细胞凋亡及间质性炎症。因此,如果能够增加驻地M2型巨噬细胞的扩增与更新,则可促进损伤的修复^[8,13,14],这是近年来从免疫调节角度探索提高糖尿病并发症治疗效果的研究热点。

本试验采用33 mmol/L高糖联合1 μ g/ml LPS的方法干预大鼠腹腔巨噬细胞,模拟体内的高糖及慢性炎症环境,结果显示,在各非干预组中,与正常条件下相比,各损伤条件下的M1型巨噬细胞比例、M1/M2值和IL-6水平均显著增高,而M2型巨噬细胞比例以及IL-10和PGE2水平均显著降低。此结果验证了在高糖、炎症环境中,巨噬细胞向M1促炎表型转化的推论。

多项临床前和临床试验证明,MSCs可减轻胰岛素抵抗,促进胰岛 β 细胞的再生及功能修复^[15];同时在胰岛素抵抗的脂肪中MSCs可有效减轻炎症^[16]。但是,有关MSCs对糖尿病并发症的治疗效果及其作用机制的研究报道较少。本研究采用大鼠腹股沟脂肪MSCs上清0.5ml干预各损伤组细胞,结果显示,在LPS和高糖+LPS的损伤条件下,与非干预组相比,干预组的M1型巨噬细胞的比例和M1/M2值均显著降低,而M2型巨噬细胞的比例均增加,ELISA结果也显示,在各损伤条件下,与非干预组相比,干预组的IL-6水平均显著降低,而IL-10和PGE2的水平均显著增加,表明高糖慢性炎症环

境中 MSCs 上清具有明显的促进巨噬细胞从促炎的 M1 型向抗炎的 M2 表型转化的作用,在减轻炎症损伤的同时促进炎症的修复,从而能够调节炎症损伤的程度,改善细胞和组织的功能。

综上所述,体外高糖联合 LPS 诱导能够模拟糖尿病慢性炎症并发症的局部微环境,在此环境下,巨噬细胞向 M1 型极化明显,同时分泌大量促炎因子,造成细胞及组织炎症损伤;而 MSCs 上清可以促进高糖慢性炎症环境中巨噬细胞由 M1 亚型向 M2 亚型极化,同时分泌大量抗炎细胞因子 IL-10 和 PGE2。本研究在一定程度上解释了糖尿病并发症的发病机制,为 MSCs 应用于临床提供了理论依据,开辟了有效防治糖尿病并发症发生及进展的篇章。

【参考文献】

- [1] Israili ZH. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. Am J Ther, 2011, 18(2): 117 - 152. DOI: 10.1097/MJT.0b013e3181afb51.
- [2] Yilmaz S, Canpolat U, Aydogdu S, *et al.* Diabetic cardiomyopathy: summary of 41 years [J]. Korean Circ J, 2015, 45(4): 266 - 272. DOI: 10.4070/kcj.2015.45.4.266.
- [3] 李章芳, 沈洁. 从指南共识看老年糖尿病降糖药物的应用[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2016, 15(1): 60 - 63. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.01.015.
Li ZF, Shen J. Applications of anti-diabetic drugs in elderly diabetic patients: a review based on guidelines and consensus[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2016, 15(1): 60 - 63. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.01.015.
- [4] Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy[J]. Diabetologia, 2014, 57(4): 660 - 671. DOI: 10.1007/s00125-014-3171-6.
- [5] Isfort M, Stevens SC, Schaffer S, *et al.* Metabolic dysfunction in diabetic cardiomyopathy[J]. Heart Fail Rev, 2014, 19(1): 35 - 48. DOI: 10.1007/s10741-013-9377-8.
- [6] Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance[J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72: 219 - 246. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135846.
- [7] Hume DA. The many alternative faces of macrophage activation[J]. Front Immunol, 2015, 6: 370. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00370.
- [8] 沈竹夏, 段胜仲. 巨噬细胞极化在 2 型糖尿病和心血管疾病中的作用[J]. 生命科学, 2013, 25(2): 191 - 197. DOI: 10.13376/j.cbbs/2013.02.005.
Shen ZX, Duan SZ. The function of macrophage polarization in type 2 diabetes and cardiovascular disease[J]. Chin Bull Life Sci, 2013, 25(2): 191 - 197. DOI: 10.13376/j.cbbs/2013.02.005.
- [9] Cho DI, Kim MR, Jeong HY, *et al.* Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages [J]. Exp Mol Med, 2014, 46: e70. DOI: 10.1038/emm.2013.135.
- [10] Si YL, Zhao YL, Hao HJ, *et al.* MSCs: biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns [J]. Ageing Res Rev, 2011, 10(1): 93 - 103. DOI: 10.1016/j.arr.2010.08.005.
- [11] Zhu S, Wang Y, Wang X, *et al.* Emodin inhibits ATP-induced IL-1 β secretion, ROS production and phagocytosis attenuation in rat peritoneal macrophages via antagonizing P2X7 receptor [J]. Pharm Biol, 2014, 52(1): 51 - 57. DOI: 10.3109/13880209.2013.810648.
- [12] Meligy FY, Shigemura K, Behnsawy HM, *et al.* The efficiency of *in vitro* isolation and myogenic differentiation of MSCs derived from adipose connective tissue, bone marrow, and skeletal muscle tissue [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2012, 48(4): 203 - 215. DOI: 10.1007/s11626-012-9488-x.
- [13] Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, *et al.* Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation [J]. Immunity, 2014, 40(1): 91 - 104. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.11.019.
- [14] Schultze JL, Schmieder A, Goerdts S. Macrophage activation in human diseases [J]. Semin Immunol, 2015, 27(4): 249 - 256. DOI: 10.1016/j.smim.2015.07.003.
- [15] Si YL, Hao HJ, Han WD, *et al.* Infusion of mesenchymal stem cells ameliorates hyperglycemia in type 2 diabetic rats [J]. Diabetes, 2012, 61(6): 1616 - 1625. DOI: 10.2337/db11-1141.
- [16] Xie ZY, Hao HJ, Tong C, *et al.* Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells elicit macrophages into an anti-inflammatory phenotype to alleviate insulin resistance in type 2 diabetic rats [J]. Stem Cells, 2016, 34(3): 627 - 639. DOI: 10.1002/stem.2238.

(编辑: 吕青远)